

**Untersuchungen zur Immunbiologie der humanen  
*Helicobacter-pylori*-Infektion**

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

Genehmigte Dissertation  
von

Dipl.Biol. Liliane Sygulla

geboren am 8. Juli 1966 in Oppeln

Referent: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann

Korreferent: Prof. Dr. Hans Diekmann

Tag der Promotion: 16.07.1998

## Abstract

Liliane Sygulla

### **Untersuchungen zur Immunbiologie der humanen *Helicobacter-pylori*-Infektion**

Trotz einer systemisch wie lokal nachweisbaren antigenspezifischen humoralen und zellulären Immunantwort, ist eine spontane Eliminierung einer einmal etablierten *H. pylori*-Infektion sehr selten. In der Tiefe der Lamina propria kommt es immer zu einer entzündlichen Reaktion.

Zur Aufklärung der Immunreaktion der *H. pylori*-Infektion wurden sowohl die lokalen T-Lymphozytenpopulationen als auch antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* untersucht, da diese die Effektivität einer Abwehrreaktion bestimmen. Der Einfluß von *H. pylori* auf immunmodulatorische Mediatoren, die in den Verlauf einer Immunantwort eingreifen, wurde *in situ* charakterisiert.

Monozyten / Makrophagen als professionelle APC nehmen durch die Sekretion von Zytokinen Einfluß auf die Balance einer  $T_H1$  /  $T_H2$ -Immunreaktion. Aus der Mukosa *H. pylori*-positiver Patienten wurden 48% IL12 produzierende und ein Anteil von 7% IL10 produzierender Monozyten / Makrophagen isoliert. *In vitro* durchgeführte Stimulationsversuche mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen zeigten einen direkten Einfluß von *H. pylori* auf die Sekretion dieser Zytokine. Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer Patienten exprimierten nach Stimulation das IL12 Peptid mit erhöhtem Aktivitätsgrad. Der Anteil der IL12 exprimierenden APC aus diesem Gewebe ist von 13% auf 30% gestiegen. Die Expression von IL10 wurde gehemmt.

Untersuchungen an Epithelzellen als nicht professionelle APC zeigten eine erhöhte Expression von MHC I und MHC II auf Epithelien *H. pylori*-positiver Patienten. Dabei nimmt *H. pylori in vitro* einen direkten Einfluß auf die Ausbildung von MHC I und indirekt über die Stimulation von  $IFN\gamma$  auf die MHC II Expression. In 43% der Epithelzellen *H. pylori*-positiver Patienten wurde eine hohe Sekretion von IL12 gemessen, die transkriptionell von *H. pylori* gesteuert wird. Denn nach einer *in vitro* Stimulation mit *H. pylori*-Oberflächenproteinen stieg der Anteil der synthetisierenden Epithelzellen in der *H. pylori*-negativen Gruppe auf 54%, die Intensität der Sekretion wurde auf das fünffache verstärkt.

Aus humanen gastrointestinalen Zellisolaten wurden *H. pylori*-spezifische T-Lymphozyten phänotypisch und funktionell charakterisiert. Bei *H. pylori*-positiven Patienten wurde eine mit hohem Aktivierungsgrad  $IFN\gamma$  produzierende  $CD4^+$  Population von 42% gemessen. Eine erniedrigte Sekretion von IL4 und IL10 wurde in 32% bzw. 21% der Zellpopulation detektiert. *In vitro* kann diese erhöhte  $IFN\gamma$ -Sekretion auf einen direkten Einfluß des Bakteriums zurückgeführt werden, da Stimulationsversuche mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen einen Anstieg der Produktionsintensität des Peptids in der *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe zeigten. Klonierte T-Lymphozyten aus der Mukosa *H. pylori*-positiver Patienten wurden größtenteils phänotypisch und funktionell sowohl auf der Peptid- als auch auf der Transkriptionsebene als  $T_H1$ -T-Lymphozyten charakterisiert.

Der Nachweis der Transkripte der proinflammatorischen Zytokine  $TNF\alpha$  und IL8 in der Lamina propria *H. pylori*-positiver Patienten mittels *in-situ*-Hybridisierung, korreliert mit der Schwere der *H. pylori*-assoziierten Gastritis. Mit zunehmender Schwere der Gastritis nimmt aber die Aktivierung der einzelnen Zelle ab, und eine gleichmäßig verteilte  $TNF\alpha$  und IL8 Expression stellt sich ein. Während die Monozyten / Makrophagen die Hauptquellen der Mediatorexpression darstellen, spielt das Epithel eine untergeordnete Rolle.

Die *in situ* Detektion des immunmodulierenden Peptids TGF $\beta$  mit der intrazellulären histochemischen Methode ist abhängig vom *H. pylori*-Status, aber unabhängig von der Schwere der *H. pylori*-assoziierten Gastritis.

In der *H. pylori*-assoziierten Gastritis aktivieren die Oberflächenproteine Monozyten / Makrophagen zu Sekretion von immunregulierenden Zytokinen, die eine lokal vom Bakterium dissoziierte Immunantwort induzieren. Eine zunächst vorhandene  $T_H1$  /  $T_H2$  Balance wird gestört und eine inadäquate entzündliche Immunantwort entsteht, die nicht zur Eradikation von *H. pylori* führt.

## Abstract

Liliane Sygulla

### Investigation of immune regulation to human *Helicobacter pylori* infection

Despite the presence of a specific humoral and cellular immune response systemically and locally in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected patients, they remain chronically infected and are unable to clear the infection. An inflammatory reaction always persists.

To elucidate the immune regulation against *H. pylori*-infection the local T-lymphocytes and antigen-presenting cells were investigated *in vitro*. The pro-inflammatory and immune-modulatory cytokine response induced by *H. pylori* has been investigated *in situ*.

Monocytes/macrophages as professional APCs have an influence on the balance of a T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 immune reaction through the secretion of cytokine. From the mucosa of *H. pylori*-patients 48% IL12 producing and 7% IL10 producing monocytes/macrophages were isolated. *In vitro* stimulation experiments conducted with *H. pylori*-surface antigens showed a direct influence of *H. pylori* on the secretion of these cytokines. Monocytes/macrophages of *H. pylori*-negative patients expressed the IL12 peptide with a higher degree of activity after stimulation. The share of IL12 expressing APCs from this tissue rose from 13% to 30%. The expression of IL10 was suppressed.

Experiments on epithelial cells as not professional APCs showed an increased expression of MHC I and MHC II on epithelium of *H. pylori*-positive patients. It was shown that *H. pylori in vitro* takes a direct influence on the expression of MHC I and indirectly via the stimulation of IFN $\gamma$  on the expression of MHC II. In 43% of the epithelial cells of *H. pylori*-positive patients a higher secretion of IL12 was detected. The expression of this peptide was transcriptionally controlled by *H. pylori*. It turned out that after an *in vitro* stimulation with *H. pylori*- surface proteins the percentage of synthesising epithelial cells in the *H. pylori*- negative group rose to 54% with the intensity of the secretion being amplified 5-fold.

*H. pylori*-specific T-lymphocytes were isolated from the human gastro-intestinal mucosa and characterised in their phenotype and function. 42% of CD4<sup>+</sup> population of *H. pylori*-positive patients produced high degrees of IFN $\gamma$ . A lower secretion of IL4 and IL10 was detected in 32% and 21% respectively in these cellpopulations. The raised IFN $\gamma$  secretion can be explained *in vitro* by a direct influence of the bacterium, as stimulation experiments with *H. pylori*-surface antigens showed a rise in the production intensity of the peptide in the *H. pylori*-negative control group. Cloned T-lymphocytes from the mucosa of *H. pylori*- positive patients were predominantly characterised phenotypically and functionally on the peptide as well as on the transcription levels as T<sub>H</sub>1-lymphocytes.

The demonstration of the transcripts of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL8 in the mucosa of *H. pylori*-positive patients by *in-situ*-hybridisation is in correspondence with the severity of *H. pylori*-associated gastritis. With a raising severity of gastritis the activation of a single cell decreases and a constantly divided expression of TNF $\alpha$  and IL8 follows. While monocytes/macrophages represent the main source of this mediator expression, the epithelium has an unimportant part.

The detection of the immunomodulatory peptide TGF $\beta$  by means of the intracellular histochemical method *in situ* depends on the *H. pylori*-status but not on the severity of *H. pylori*-associated gastritis.

In *H. pylori*-associated gastritis the surface proteins activate monocytes/makrophages to secrete immune regulatory cytokines. These cytokines induce an immune response that is lokaly dissociated from the bacterium. They disturb an established equilibrium between the T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cytokines, that leads to an inefficient inflammatory immune reaction and not to eradication of *H. pylori*.

Helicobacter pylori; Antigenpräsentierende Zellen, T-Lymphozyten

Helicobacter pylori; antigen presenting cells; T-lymphocytes

---

## Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Einführung	1
1.2.	Das Bakterium <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.2.1.	Genus <i>Helicobacter</i>	2
1.2.2.	Charakteristische Eigenschaften von <i>Helicobacter pylori</i>	3
1.2.2.1.	Charakterisierung <i>in vivo</i>	3
1.2.2.2.	Charakterisierung <i>in vitro</i>	4
1.2.3.	Etablierung einer ökologischen Nische im Magen	4
1.2.3.1.	Kolonisation	5
1.2.3.2.	Persistenz	7
1.2.3.3.	Direkte Schädigung der Mukosa durch <i>H. pylori</i>	8
1.2.4.	Entzündung und Immunreaktion	9
1.2.5.	<i>H. pylori</i> -assoziierte Erkrankungen	10
1.3.	Immunantwort der T-Lymphozyten	12
1.3.1.	Die Differenzierung und Regulation der CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	12
1.3.2.	Die <i>H. pylori</i> -induzierte T-Zell-Immunantwort	16
1.4.	Fragestellung	17
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
2.1.	Medien und Platten	19
2.1.1.	Medien für die Kultivierung von <i>Helicobacter pylori</i>	19
2.1.2.	Medien für die Zellkultur	19
2.1.3.	Medien für die Isolation von Zellen aus Geweben	20
2.2.	Puffer und Lösungen für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung	22

---

2.3.	Puffer für die RNA-Isolierung	24
2.3.1.	RNA-Isolierung aus Geweben und Zellen	24
2.3.2.	mRNA-Isolierung aus Zellen mit Dynabeads®	24
2.4.	Puffer und Lösungen für Northern Blot	25
2.5.	Puffer für die RT-PCR	26
2.6.	Puffer für die Markierung von DNA-Sonden	26
2.7.	Puffer und Lösungen für die Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	26
2.7.1.	Phänotypische Oberflächenmarkierung	26
2.7.2.	Intrazelluläre Zytokinmarkierung	27
2.8.	Lösungen für die Immunhistochemie	27
2.9.	Oligodeoxynukleotide	27
2.9.1.	Primer	27
2.9.2.	Sonden für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung	28
2.10.	Zell- und Gewebematerial	28
2.11.	Bakterienstämme	29
2.12.	Bilddokumentation und Software für die EDV	29
2.13.	Statistik	30
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
3.1.	Kultivierung von <i>Helicobacter pylori</i>	31
3.2.	Kryokonservierung von <i>Helicobacter pylori</i>	31
3.3.	Nachweis von <i>Helicobacter pylori</i> über die Ureaseaktivität	31
3.4.	Antigenpräparation	32
3.4.1.	Gewinnung von Gesamtantigenen	32
3.4.2.	Gewinnung von Oberflächenproteinen von <i>Helicobacter pylori</i>	32
3.5.	Quantitative Proteinbestimmung	33

---

3.6.	Isolation von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten	34
3.6.1.	Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem humanen Blut	34
3.6.2.	Isolation mononukleärer Zellen aus der Lamina propria des Magens	34
3.6.3.	Aufreinigung von T- und B-Lymphozyten	36
3.7.	Isolation von Monozyten / Makrophagen	37
3.7.1.	Isolation von Monozyten / Makrophagen mittels Adhäsion	37
3.7.2.	Isolation von Monozyten / Makrophagen mittels Elutriation	38
3.8.	Isolation von Epithelzellen	40
3.9.	Überprüfung von Zellpopulationen	40
3.9.1.	Zellzahlbestimmung mit elektronischem Zellzählgerät	40
3.9.2.	Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung mit Trypanblau	41
3.9.3.	Zellvitalitätsbestimmung mit Propidiumiodid	41
3.9.4.	Mikroskopische Populationskontrolle	41
3.10.	Kultivierung von verwendeten Zellen bzw. Zelllinien	42
3.10.1.	Kultivierung und Stimulierung der humanen isolierten Zellen	42
3.10.2.	Kultivierung und Stimulation von KATO III-Zellen	43
3.11.	Identifizierung von Zellen anhand der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	43
3.11.1.	Färbung der Zellen für die FACS-Analyse	43
3.11.2.	Detektion intrazellulärer Zytokine mittels Durchflußzytometrie	44
3.11.3.	Messung und Auswertung	46
3.12.	Enzymgekoppelter Immunoassay (EIA) zur quantitativen IL8 Bestimmung	47
3.13.	Etablierung von <i>Helicobacter pylori</i> spezifischen T-Lymphozyten-Klonen aus dem Magengewebe	48
3.13.1.	Klonierung antigenspezifischer T-Lymphozyten aus der Lamina propria des humanen Magens	49
3.13.2.	Herstellung antigenpräsentierender Zellen (Monozyten)	50



---

3.13.3. Herstellung antigenpräsentierender Zellen (EBV-transformierte B-Lymphozyten)	50
3.14. Kryokonservierung von Zellen	51
3.15. Isolierung der mRNA	52
3.15.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen	52
3.15.2. Direkte Isolierung der poly A <sup>+</sup> -mRNA	53
3.16. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	54
3.17. Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	54
3.18. Northern Blot	55
3.19. RNA-Hybridisierung mit einer [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP-markierten DNA-Sonde	55
3.20. Markierung der Oligodeoxyribonukleinsäuren mit [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP bzw. [ $\gamma^{35}\text{S}$ ] ATP am 5'OH DNA-Ende	56
3.21. Aufreinigung markierter Oligonukleotide von ungebundenen Isotopen	56
3.22. Quantifizierung von mRNA Expression mit Hilfe der Polymerase- Kettenreaktion (RT-PCR)	57
3.22.1. Konstruktion einer immobilisierten cDNA-Bank für multiple RT-PCR Amplifikationen	57
3.22.2. Amplifikation spezifischer Transkripte aus der cDNA-Bank mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	58
3.22.2.1. PCR in Gegenwart von Dynabeads	59
3.22.2.2. PCR ohne Dynabeads	60
3.22.2.3. Kontrollen	60
3.22.3. Analyse der amplifizierten PCR-Produkte	61
3.23. Fixierung von Geweben	61
3.23.1. Gewebefixierung für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung und Immunhistochemie	61
3.23.2. Fixierung von Zellen für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung	62
3.24. Gewebeaufbereitung	62
3.25. Anfertigung von Gewebeschnitten	63
3.26. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten	64
3.27. Immunhistochemische Detektion von Zytokinen	64
3.28. <i>In-situ</i> -Hybridisierung zur Detektion von Zytokintranskripten	66

---

3.28.1.	Hybridisierungsschritte	68
3.28.2.	Autoradiographie	69
3.28.3.	Kontrollen	70
3.29.	Bilddokumentation der histologischen Schnitte	70
3.29.1.	Immunhistochemie	70
3.29.2.	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	71
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>72</b>
4.1.	Charakterisierung der T-Lymphozytenpopulation	73
4.1.1.	Evaluierung von mononukleären Subpopulationen aus der Lamina propria des humanen Antrums	73
4.1.2.	Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen in der Lamina propria des Antrums	76
4.1.2.1.	Optimierung der Detektion von intrazellulären Zytokinen mit dem fluoreszenzaktivierten Zellscanner (FACS)	76
4.1.2.2.	Detektion von relevanten Zytokinen der Lamina propria T-Lymphozyten - Ermittlung der Anzahl der produzierenden Zellen	80
4.1.2.3.	Detektion von relevanten Zytokinen der Lamina propria T-Lymphozyten - Ermittlung der Zytokinproduktion	86
4.1.3.	Einfluß von <i>Helicobacter pylori</i> auf die Zytokinsekretion der T-Zellen	88
4.1.4.	Erstellung eines Typ I / Typ II Profils der T-Lymphozyten aus der Lamina propria	91
4.1.4.1.	Erstellung eines T <sub>H</sub> 1 / T <sub>H</sub> 2 Profils auf der Peptidebene	91
4.1.4.2.	Bestätigung des T <sub>H</sub> 1 / T <sub>H</sub> 2 Profils auf der Transkriptionsebene	95
4.2.	Bedeutung von Monozyten / Makrophagen in der <i>H. pylori</i> -Infektion	98
4.2.1.	Charakterisierung der Mediatorfreisetzung von Monozyten / Makrophagen	99

---

4.2.2.	Einfluß von <i>Helicobacter pylori</i> auf die Effektorfunktion von Monozyten / Makrophagen	101
4.3.	Epithelzellen und ihre Bedeutung in der <i>H. pylori</i> -Infektion	103
4.3.1.	Antigenpräsentation der Epithelzellen in einer <i>Helicobacter pylori</i> -assoziierten Entzündung	104
4.3.2.	Aktivierung von Epithelzellen zur Mediatorsekretion in <i>Helicobacter pylori</i> -infiziertem Gewebe	106
4.3.3.	Aktivierung der Epithelzellen zur Sekretion von IL12 auf der Transkriptionsebene	108
4.4.	Charakterisierung der Gewebe für <i>in situ</i> Untersuchungen	110
4.5.	Nachweis von IL12 <i>in situ</i>	111
4.6.	Einfluß von <i>Helicobacter pylori</i> auf die Sekretion proinflammatorischer Immunmediatoren	115
4.6.1.	Etablierung der <i>in-situ</i> -Hybridisierung zur Detektion von IL8 und TNF $\alpha$ mRNA in der Lamina propria	116
4.6.1.1.	Überprüfung der Spezifität der IL8 bzw. TNF $\alpha$ Oligodeoxyribonukleinsäure im Northern Blot	116
4.6.1.2.	Etablierung der Bedingungen zur Detektion von Transkripten im gastrointestinalen Gewebe	118
4.6.2.	Verteilung von IL8 Transkripten in der Antrum mukosa bei der <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis	120
4.6.3.	Durchschnittliche Transkription von IL8 in der Antrum mukosa <i>H. pylori</i> -positiver und <i>H. pylori</i> -negativer Patienten	123
4.6.3.1.	Transkripte in der Lamina propria	123
4.6.3.2.	Transkripte im Epithel	124
4.6.4.	Bestimmung der Transkriptionsintensität von IL8	125
4.6.4.1.	Transkripte in der Lamina propria	126
4.6.4.2.	Transkripte im Epithel	128
4.6.5.	Einfluß von <i>Helicobacter pylori</i> auf die IL8 Produktion <i>in vitro</i>	129
4.6.5.1.	Einfluß von <i>Helicobacter pylori</i> auf Monozyten / Makrophagen	130
4.6.5.2.	Einfluß von <i>Helicobacter pylori</i> auf die IL8 Produktion der Epithelien	137

---

4.6.6.	Verteilung von TNF $\alpha$ Transkripten in der Antrum mukosa bei der <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis	141
4.6.7.	Durchschnittliche Transkription von TNF $\alpha$ in der Antrum mukosa <i>H. pylori</i> -positiver und <i>H. pylori</i> -negativer Patienten	145
4.6.7.1.	Transkripte in der Lamina propria	145
4.6.7.2.	Transkripte im Epithel	146
4.6.8.	Bestimmung der Transkriptionsintensität von TNF $\alpha$	147
4.6.8.1.	Transkripte in der Lamina propria	148
4.6.8.2.	Transkripte im Epithel	150
4.6.9.	TNF $\alpha$ Transkription von Monozyten / Makrophagen <i>in vitro</i>	151
4.6.10.	Verteilung von TGF $\beta$ in der Antrum mukosa bei der <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis	153
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>157</b>
5.1.	Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen in der Lamina propria	159
5.2.	Modulation der Sekretion von akzessorischen Faktoren professioneller antigenpräsentierender Zellen durch <i>Helicobacter pylori</i>	163
5.3.	Modulation der Zytokinsekretion und Antigenpräsentation nicht professioneller antigenpräsentierender Zellen durch <i>Helicobacter pylori</i>	167
5.4.	Induziert <i>H. pylori</i> eine präferentielle T-Helfer Typ 1 Immunantwort in der Mukosa des Antrums ?	170
5.5.	Die dissoziierte Immunantwort auf <i>H. pylori</i>	175
5.5.1.	Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen in der <i>Helicobacter pylori</i> -assoziierten Gastritis	175
5.5.2.	TGF $\beta$ in der Pathogenese der <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis	181
5.6.	Analogien in der Regulation der Infektabwehr	185
5.6.1.	Die Immunregulation einer Infektion im Mukosasytem	185

5.6.2.	Die Immunreaktion bei einer Infektion an epithelialen Oberflächen	189
5.7.	Ausblick	192
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	194
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	200
<b>8.</b>	<b>Abkürzungen</b>	223
<b>9.</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen und Bilder</b>	226

# 1. Einleitung

## 1.1. Einführung

Eine infektiöse Genese von chronisch entzündlichen Erkrankungen des Magens und des Zwölffingerdarms wurde lange Zeit nicht in Betracht gezogen. Es galt als gesichert, daß diese Organe aufgrund der hohen Salzsäurekonzentration des Magensaftes keine ökologische Nische für eine permanente bakterielle Besiedlung bieten. Allerdings konnte bereits im Jahre 1893 ein Spiralbakterium in Assoziation zum humanen Magenepithel histologisch nachgewiesen werden (BIZZOZERO, 1893). Drei Jahre später (1896) bestätigte Salomon, der auch in Mägen von Säugetieren Spirillen gefunden hat, diese Beobachtung. Die Befunde wurden aber als postmortale Artefakte der Schleimhaut interpretiert. Es folgten weitere histomorphologische Beschreibungen einer bakteriellen Besiedlung des humanen Magens; Versuche, die Bakterien zu kultivieren, scheiterten jedoch.

Erst 1982 gelang die Kultivierung eines Bakteriums aus humaner entzündlich veränderter Magenmukosa und somit die (Wieder)entdeckung von *Helicobacter pylori* (frühere Nomenklatur: *Campylobacter pylori*) (GOODWIN ET AL., 1989). Eine Verbindung zwischen dem Nachweis des Bakteriums und der gastrischen Entzündungsreaktion wurde postuliert (MARSHALL ET AL., 1983). Die Untersuchungen der folgenden Jahre belegten, daß eine *H. pylori*-Infektion, die auch als "slow bacterial infection" bezeichnet wird (BLASER, 1993b), eine der häufigsten Ursachen von gastroduodenalen Erkrankungen des Menschen ist, und *H. pylori* eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der chronischen Gastritis Typ B und des Ulcus duodeni spielt (NIEMELÄ ET AL., 1995; BLASER, 1992).

Epidemiologische Studien belegen, daß *H. pylori* weltweit vorkommt und insgesamt betrachtet die häufigste chronische Infektion der Menschheit ist. Man kann davon ausgehen, daß 50% der Weltbevölkerung *H. pylori*-positiv ist (BLASER, 1993a). Es gibt aber von Land zu Land erhebliche Unterschiede in der Prävalenz. In Entwicklungsländern sind bereits ein hoher Prozentsatz der Kinder und Jugendlichen infiziert, im Erwachsenenalter nähert sich die Prävalenz nahe 100%

(WHITAKER ET AL., 1993). Dabei findet die Infizierung mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Kindheit statt und nimmt mit dem Alter zu. Sie persistiert dann lebenslang (VINCENT, 1995).

Hinsichtlich der Übertragung von *H. pylori* kommen zwei Infektionswege in Betracht: fäkal-oral und oral-oral. Der Nachweis von *H. pylori* im Stuhl infizierter Personen (MAPSTONE ET AL, 1993), seine Kultivierung (THOMAS ET AL., 1992) und die Fähigkeit der Bakterien, monatelang im Wasser zu überleben, (SHAHAMAT ET AL., 1993; MAI ET AL., 1991a) unterstützen die Hypothese einer fäkal-oralen Übertragung. Die Isolation des Bakteriums aus der Mundhöhle und dentalen Plaques (NGUYEN ET AL., 1995), sowie die Häufung von *H. pylori*-Infektionen innerhalb von Familien spricht wiederum eher für einen direkten oral-oralen Infektionsweg (DRUMM ET AL., 1990). Es ist auch möglich, daß beide Infektionswege coexistent sind (VINCENT, 1995). Dabei korrelieren beengte Lebensverhältnisse und geringer Hygienestandard positiv mit der Häufigkeit einer Infektion (WEBB ET AL., 1994).

## **1.2. Das Bakterium *Helicobacter pylori***

### **1.2.1. Genus *Helicobacter***

Auf der Basis morphologischer, physiologischer und ökologischer Eigenschaften wurde das Bakterium zunächst dem Genus *Campylobacter* zugeordnet. Genauere Untersuchungen (Begeißelung, Zellwandaufbau, Fettsäuren, DNA) führten jedoch zur Bildung eines neuen Genus: *Helicobacter* (GOODWIN ET AL., 1989). Diesem gehören nach derzeitigem Stand 13 Spezies an (LEE ET AL., 1993; O'ROURKE ET AL., 1992) (s. Tabelle 1). Neben *H. pylori* sind *H. cinaedi* und *H. fennelliae* als Erreger von Enteritis und Proktitis sowie *H. heilmanii* als seltene Ursache einer Gastritis für den Menschen von Bedeutung (O'ROURKE ET AL., 1992).

Tab. 1: Spezies im Genus *Helicobacter* und ihre Wirte

<b><i>Helicobacter</i>-Spezies</b>	<b>natürlicher Wirt</b>
<i>H. acinonyx</i>	Gepard
<i>H. canis</i>	Hund
<i>H. cinaedi</i>	Hamster, Mensch
<i>H. felis</i>	Hund, Katze
<i>H. fennelliae</i>	Mensch
<i>H. heilmanii</i>	Hund, Katze, Mensch
<i>H. hepaticus</i>	Maus
<i>H. muridarum</i>	Maus, Ratte
<i>H. mustelae</i>	Frettchen
<i>H. nemestrini</i>	Makakaffen
<i>H. pametensis</i>	
<i>H. pylori</i>	Mensch, Affe, Katze, Schwein
<i>H. rappini</i>	Mensch, Katze

## 1.2.2. Charakteristische Eigenschaften von *Helicobacter pylori*

### 1.2.2.1. Charakterisierung *in vivo*

*H. pylori* ist ein Gram-negatives, gebogenes bis helikal gewundenes und bewegliches Bakterium, das 2,5 bis 4 µm lang und 0,5 bis 1 µm breit ist. Unipolar begeißelt besitzt es 4 bis 6 membranumhüllte Flagellen, die 2,5 µm in der Länge und 30 nm im Durchmesser aufweisen. Sie beinhalten ein 15 nm dickes Filament aus zwei etwa gleich großen Flagellinuntereinheiten (STARK ET AL., 1995; GOODWIN ET AL., 1993). Die helikale Form und die Geißeln ermöglichen dem Organismus, den epithelialen Mukus zu penetrieren und sich darin fortzubewegen (STARK ET AL., 1995). Der äußeren Membran ist eine etwa 40 nm dicke Glykokalix aufgelagert (GOODWIN ET AL., 1989), die einen Schutz gegen die Magensäure (pH 1) bietet. Denn sie hat die gleichen physikalischen Eigenschaften wie das Gewebe der gastrointestinalen Barriere des Wirtes, das die Mukosa vor der Zerstörung durch die Magensäure bewahrt (HILLS, 1993). Weiterhin besitzt das Bakterium die Fähigkeit, wie einige andere Mikroorganismen, nach Ingestion und Kolonisation der Magenschleimhautoberfläche, eine komplexe Mischung von Oberflächen-



proteinen, durch einen passiven Abstoßungsprozess in den umgebenden Mukus abzugeben (MAI ET AL., 1992).

#### 1.2.2.2. Charakterisierung *in vitro*

Bei einer Generationszeit von 6 Stunden zeigt die Kultur des mikroaerophilen Bakteriums etwa 0,3-1,5 mm große grau durchscheinende Kolonien (SHAHAMAT ET AL., 1991). Die Anzucht des Erregers und folgende ergänzende Methoden werden in der mikrobiologischen Diagnostik zum Nachweis einer *H. pylori*-Infektion eingesetzt (GOODWIN ET AL., 1993; LEE ET AL., 1990):

- Im ELISA werden anti-*H. pylori* IgG- und IgM-Antikörper im Serum nachgewiesen
- Mittels PCR werden *H. pylori*-spezifische Genabschnitte aus Biopsiematerial amplifiziert
- Nach Ingestion von  $^{13/14}\text{C}$ -markiertem Harnstoff wird markiertes  $\text{CO}_2$  nach seiner Spaltung bei vorhandener Ureaseaktivität in der Atemluft nachgewiesen
- Die Isolierung und Koloniezüchtung von *H. pylori* aus Biopsiematerial dient zur mikrobiologischen Bestimmung und Charakterisierung des Bakteriums mittels des Nachweises einer Urease-, Katalase- und Oxidaseaktivität. Eine Gram-Färbung wird zur bestätigenden Kontrolle durchgeführt.

#### 1.2.3. **Etablierung einer ökologischen Nische im Magen**

Die optimale Anpassung von *Helicobacter pylori* an die Lebensbedingungen im sauren Milieu des Magens und die Besiedlung dieser ökologischen Nische nach der oralen Aufnahme werden durch eine Reihe von Faktoren ermöglicht. Diese Virulenzfaktoren, die eine Kolonisation und Persistenz des Organismus erlauben, sind wesentliche Determinanten, die zur Pathogenität führen.

### 1.2.3.1. Kolonisation

Die große Beweglichkeit von *H. pylori* im Mukus mit Hilfe der unipolaren Flagellen, die auch durch seine helikale Form unterstützt wird, ist eine Voraussetzung für die Kolonisierungsfähigkeit (EATON ET AL., 1992). Das Bakterium besitzt außerdem Gene, die sie zur Chemotaxis befähigen. So kann es seine Motilität nutzen und sich aus einem ungünstigen Milieu, das durch Säureeinbruch aufgrund der Barrierestörung oder durch Nahrungsmangel aufgrund von Zellschädigungen entstanden ist, fortbewegen (MOBLEY, 1996).

Gelangt *H. pylori* schließlich an das Magenepithel, adhäriert es über verschiedene Strukturen (Adhäsine) an die Epithelzellen (LEE ET AL., 1993). Zur Zeit sind fünf verschiedene solche Faktoren, die eine spezifische Bindung an Rezeptoren dieser Zellen bewirken, bei *H. pylori* durch *in vitro* Experimente bekannt: Lipoproteine wie HpaA, die sich in der Flagellenscheide und der äußeren Membran befinden (JONES ET AL., 1996; LABIGNE ET AL., 1996), Hämagglutinine wie Laminin, Vitronectin, Fibronectin, Kollagen, die eine spezielle Affinität zum Zytoskelett und verschiedenen anderen Proteinen haben (FAUCHERE ET AL., 1990; EVANS ET AL., 1988), sowie Membranrezeptoren (Glycerolipide, Ganglioside und Galactoceramid) (LINGWOOD ET AL., 1991; LINGWOOD ET AL., 1989) wurden beschrieben. Außerdem begünstigen weitere Eigenschaften von *H. pylori* eine direkte Adhärenz an die Epithelzellen: Es bildet die Protease Mucinase, die zur Mukusdegradation führt (SIDEBOTHAM ET AL., 1991), und die Phospholipasen A<sub>2</sub> und C, die die hydrophobe Phospholipiddoppelschicht der Plasmamembranen zerstören, wodurch die Viskosität und die Hydrophobizität der Mukosa reduziert wird (HILLS, 1993).

Die Adhäsion von *H. pylori* an die Epithelzellen wurde dem "AE"-Mechanismus (Attaching and effacing) der enteropathogenen *Escherichia coli* gleichgesetzt, der zu charakteristischen Läsionen führt und eine Akkumulation von filamentösem Aktin an Orten der Bakterienbindung zeigt (SMOOT ET AL., 1993). Eine Induktion dieser Zytoskellefformation in infizierten Epithelzellen durch *H. pylori* wurde jedoch noch nicht bestätigt, da keine Aggregation von F-Aktin und  $\alpha$ -Aktinin gezeigt werden konnte. Die Bindung dieses Pathogens an die Epithelzelle führt aber zu ihrer Aktivierung, die an der Erhöhung der Konzentration des

Inositolphosphates festzumachen ist. Sie ist rezeptorvermittelt, wobei multiple Rezeptoren für die Adhäsion des Bakteriums angenommen werden (DYTOC ET AL., 1993). Die Arbeitsgruppe um Borén (1993) fand heraus, daß die Bakterienbindung an das Epithel auch von dem Lewis<sup>b</sup> Blutgruppen-Antigen abhängig ist. Die Adhäsion von *H. pylori* an die Mukosa von Individuen der Blutgruppen A und B ist reduziert.

Für eine aktive Kolonisierung und die Ausbreitung von *H. pylori* über die intakte Magenschleimhaut ist das oberflächenassoziierte Enzym Urease unerlässlich. Die Urease, die eine hohe spezifische Aktivität besitzt und aus zwei Untereinheiten besteht, hydrolisiert den im Magen vorhandenen Harnstoff zu Ammoniak und Hydrogenkarbonat (EATON ET AL., 1991; DUNN ET AL., 1990). Das bewirkt eine lokale Neutralisierung des niedrigen pH-Wertes und erlaubt dem Bakterium, kurzfristig im sauren Magenlumen zu überleben, bevor es in die Bikarbonat-gepufferte Schleimschicht der Magenmukosa eindringt (LEE ET AL., 1993). Ein weiterer Schutzmechanismus von *H. pylori* gegen die Magensäure besteht in der Aufrechterhaltung eines pH-Gradienten entlang seiner Membran und im Aufbau eines positiven Membranpotentials. So wird während der Kolonisierung ein Eintritt von Protonen verhindert, bis sich das Bakterium in der Mukusschicht eingegraben hat. Im frühen Stand der Infektion bildet *H. pylori* Proteine, die die Säureproduktion der Parietalzellen inhibieren (TOMB ET AL., 1997; MOBLEY, 1996; JABLONOWSKI ET AL., 1994).

Die beschriebenen Faktoren, insbesondere die Adhäsine, sind auch im fortgeschrittenen Stadium der Infektion wichtig. Denn nach der Zerstörung der Epithelzellschicht, die mit der Nahrungsaufnahme einhergeht, adhären die Bakterien schließlich an die Basallamina, um weiter kolonisieren und persistieren zu können. Hier kann *H. pylori* aufgeschlossene Nahrungssubstrate aufnehmen. Das geschieht durch die stark konservierten Proteine, die zur Familie der Porine Gram-negativer Bakterien zählen. Solche Porine sind in die äußere hydrophobe Membran der Bakterien eingeschlossen und bilden substratspezifische Poren. Diese dienen als eine selektive Barriere für die Permeabilität von hydrophilen überlebenswichtigen Molekülen in das Zytoplasma (DOIG ET AL., 1995; EXNER ET AL., 1995).

### 1.2.3.2. Persistenz

Ändert sich das Milieu nach der Etablierung der Nische in dem bereits geschädigten Gewebe, z.B. durch Säureeinstrom oder Nahrungsmangel in einer für den Mikroorganismus ungünstigen Weise, unterzieht sich *H. pylori* einer morphologischen Transformation von einer bakteriellen, helikal gekrümmten zu einer kokkoiden Form (JANAS ET AL., 1995; GOODWIN ET AL., 1993). Ein erster Typ der kokkoiden Form ist zu 99 % ein sterbender, degenerativer Typ, der nicht mehr infektiös ist (EATON ET AL., 1995). Ein zweiter vitaler jedoch nicht kultivierbarer Typ mit einer intakten zytoplasmatischen Membran und stark reduziertem Metabolismus, der bis zu 1 % gebildet wird, ist als Überdauerungsstadium für die Persistenz des Organismus wichtig. Solch eine Konservierung des genetischen Materials ist auch von anderen enteritischen Pathogenen wie *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* bekannt (BODE ET AL., 1993; SHAHAMAT ET AL., 1993).

Um persistieren zu können, ist es besonders wichtig, die wachsende Immunantwort des Wirtes abzuwehren. Dazu gibt *H. pylori* extrazelluläre Substanzen in die Umgebung ab, die ihn gegen die mobilisierten Phagozyten schützen. Die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase machen die toxischen Sauerstoffmetabolite wie Superoxidanione, Hydroxyl- und Sauerstoffradikale unschädlich, die von den neutrophilen Granulozyten zur Abwehr eines Fremdorganismus gebildet werden (SPIEGELHALDER ET AL., 1993; HAZEL ET AL., 1991).

Das "shedding" (passiver Abstoßungsprozess von Oberflächenproteinen) sättigt die spezifischen Immunglobuline und Rezeptoren, so daß eine bakterizide Reaktion ausbleibt (MOBLEY, 1996).

Die niedrige biologische Aktivität von *H. pylori*-LPS erlaubt ebenfalls die Persistenz dieses Organismus. Die isolierten Polymere sind 1000 mal weniger toxisch als die anderer Gram-negativer Bakterien. Daher wird angenommen, daß das LPS-Molekül die Immunantwort nicht stimuliert (MATTSBY-BALTZER ET AL., 1992; MUOTIALA ET AL., 1992).

### 1.2.3.3. Direkte Schädigung der Mukosa durch *H. pylori*

Die bakteriellen für die Kolonisierung wichtigen Faktoren, Mucinase und Phospholipasen (s. 1.2.3.1.), tragen zur Schädigung der Mukosa bei, indem sie durch Veränderungen des Mukus die Permeabilität für Hydroniumionen erhöhen. Auch Urease, die Harnstoff hydrolysiert (s. 1.2.3.1.), schädigt ebenfalls die gastrointestinale Barriere, da der entstehende Ammoniak bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch auf Epithelzellen wirkt (MOBLEY, 1996).

*H. pylori* produziert das Vakuolisierende Zytotoxin (VacA), das direkt eine Zellschädigung induziert. Das Oligomer VacA, das sich aus sechs 87 kDa Untereinheiten zusammensetzt, verändert den Ionentransportmechanismus der Epithelzellen und führt zur Bildung von Vakuolen (CATRENICH ET AL., 1992; COVER ET AL., 1992; LEUNK ET AL., 1988). Die Aktivität des Zytotoxins wird durch ein saures Milieu potenziert. Aktiviertes VacA ist gegen niedrige pH-Werte und gegen Pepsin resistent (BERNARD ET AL., 1995). Das *vacA*-Gen wird bei nahezu allen untersuchten *H. pylori*-Isolaten gefunden, wobei bei den meisten Isolaten ohne zytotoxischer Aktivität auch kein VacA nachweisbar ist, was auf eine Regulation der *vacA*-Genexpression schließen läßt (SCHMITT ET AL., 1994).

Ein stark immunogenes, oberflächenlokalisiertes Protein von 128 kDa wird meist parallel zum Zytotoxin produziert und als Zytotoxin-assoziiertes Antigen CagA bezeichnet (COVACCI ET AL., 1993; SCHMITT ET AL., 1993). Serologische Studien zeigten eine starke Korrelation zwischen dem Auftreten von Antikörpern gegen CagA und den schweren Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wie Ulkus und Magenkarzinom (BLASER, 1995 COVER ET AL., 1990). Das *cagA*-Gen ist an einem Ende einer Pathogenitätsinsel positioniert, die mehreren *H. pylori*-Stämmen eigen ist. Dort ist ebenfalls das *vacA*-Gen lokalisiert sowie Gene (*picA* und *picB*), die sekretorisch wirksame Proteine kodieren. Sie induzieren die Sekretion von Zytokinen (TOMB ET AL., 1997; MOBLEY, 1996). Es wurde vermutet, daß das Vorhandensein der Pathogenitätsinsel, für die das *cagA*-Gen ein Marker ist, die virulenten Typ I *H. pylori*-Stämme charakterisiert, die zu schweren Erkrankungen führen, während die weniger virulenten Typ II *H. pylori*-Stämme, die kein *cagA*-Gen besitzen und somit auch weder das Vakuolisierende Zytotoxin, noch das

Zytotoxin-assoziierte Antigen bilden, scheinbar keinen Ulkus, aber eine Gastritis hervorrufen (XIANG ET AL., 1995; BLASER, 1994).

#### 1.2.4. Entzündung und Immunreaktion

*H. pylori* und *H. pylori*-Antigene befinden sich zunächst im Mukus, wo sie die erste Immunantwort des Wirtes auslösen (s. 1.2.3.2.). So sind antigenspezifische Immun-globuline sowohl systemisch als auch lokal zu finden. Die lokale Sekretion von IgA kann protektiv wirken, indem die weitere Aufnahme von Antigenen in den Mukus inhibiert, die Adhärenz und Motilität geblockt und das Zytotoxin neutralisiert wird. Systemisch ist neben IgA hauptsächlich IgG nachweisbar (CRABTREE, 1996). Die chronische Stimulation der B-Zellen durch *H. pylori*-Antigene führt zu erhöhter IgG-Sekretion. Dies trägt durch Immunkomplexbildung und Komplement-aktivierung zur Entstehung von Läsionen bei (ERNST ET AL., 1994).

*H. pylori* befindet sich im Mukus in direkter Nähe zu den Magenepithelzellen oder an diese adhäriert (WAGNER ET AL., 1994; PAULL ET AL., 1989). Das Epithel wirkt dabei als erste zelluläre Abwehrlinie, die eine bakterielle Invasion der Mukosa verhindert. Neben der epithelialen Barrierefunktion sind die Epithelzellen ins Entzündungsgeschehen involviert. So führt die Adhärenz von *H. pylori* an Epithelzellen *in vitro* und *in vivo* zur Zellaktivierung und Freisetzung von IL8 (CRABTREE ET AL., 1994a; SMOOT ET AL., 1993). Eine weitere Beteiligung des Epithels an der Immunantwort wird auch in den späteren Phasen der Entzündung aufgrund der de novo Expression von HLA-DR Molekülen vermutet (FIOCCA ET AL., 1994).

Ständig gibt *H. pylori* durch einen vielen Mikroorganismen gemeinsamen passiven Abstoßungsprozeß (shedding) lipopolysaccharidfreie Oberflächenproteine, wie die stark immunogenen Antigene Urease und CagA, in die Umgebung ab. Sie werden im Magenschleim solubilisiert und gelangen durch die Epithelschicht, die durch die toxische Wirkung des Vakuolisierenden Toxins und des gebildeten Ammoniaks geschädigt ist, in die Lamina propria mucosae. *H. pylori* selbst ist in der Mukosa nicht zu finden (MAI ET AL., 1992). Dort werden aufgrund der chemotaktischen

Aktivität der Oberflächenantigene und der induzierten IL8 Produktion der Epithelzellen Neutrophile Granulozyten und Monozyten rekrutiert (GENTA, 1997; MAI ET AL., 1992). Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Eosinophile folgen. In der akuten Phase werden vermehrt Neutrophile rekrutiert und auch durch *H. pylori*-Proteine (HP-NAP: Neutrophil-Activating-Protein) aktiviert sowie zur Degranulation stimuliert (GENTA, 1997; EVANS ET AL., 1995; NØRGAARD ET AL., 1995). Monozyten / Makrophagen werden durch Oberflächenproteine von *H. pylori* in der Lamina propria mucosae ebenfalls angeregt (MAI ET AL., 1991b). Sie phagozytieren das Antigen und präsentieren es in Verbindung mit HLA-DR. So können sie lokal eine antigenspezifische Immunantwort durch T- und B-Lymphozyten auslösen. Die Phagozyten sezernieren außerdem weitere Zytokine wie IL6 und TNF $\alpha$  (CRABTREE ET AL., 1991), die wiederum zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beitragen. Weiterhin sind erhöhte Konzentrationen von IFN $\gamma$  zu beobachten, dessen Quelle jedoch unbekannt ist (ERNST ET AL., 1994). So tragen diese Zellen zur weiteren Gewebeerstörung bei.

### **1.2.5. *H. pylori*-assoziierte Erkrankungen**

Anzeichen einer Entzündungsreaktion in der Lamina propria mucosae sind schon kurz nach der Kolonisierung von *H. pylori* histologisch nachweisbar. Innerhalb von Monaten entwickelt sich aus der Infiltration verschiedener Immunzellen die klinisch meist asymptomatisch verlaufende chronische Gastritis Typ B (BLASER ET AL., 1992), die aber in der Histologie massive Entzündungsreaktionen aufweist (WYATT, 1995).

*H. pylori* bestimmt den Grad und die Aktivität der Gastritis, die im Antrum stärker als im Corpus ausgeprägt ist. Eine genauere Einteilung erlaubt das "Sydney-System" nach histologischen Gesichtspunkten. Dazu gehören:

1. Der Entzündungsgrad (Dichte der Infiltration mit inflammatorischen Zellen)
2. Die Entzündungsaktivität (intraepitheliale Neutrophileninfiltration)
3. Atrophie des Drüsengewebes
4. Dichte der *H. pylori*-Kolonisation
5. Intestinale Metaplasien.

Die morphologischen Parameter sind auf einer Skala von 0-3 (keine Gastritis B, Gastritis B vom Grad I, Grad II und Grad III) aufgeteilt (PRICE, 1991).

Als Folge einer Infektion mit *H. pylori* (s. Bild 1) und einer Gastritis können aufgrund von Hypergastrinämie und erhöhter Säureproduktion gastrische Metaplasien im Duodenum entstehen, die wiederum von *H. pylori* besiedelt werden. Daraus resultiert eine akute Entzündungsreaktion, die zum Ulkus duodeni führen kann (MARSHALL, 1995). Als weitere Folge einer *H. pylori*-Infektion entstehen in der Magenschleimhaut Lymphfollikel und basale lymphatische Aggregate (MALT-Lymphoma) (ISAACSON, 1995). Die Langzeitinfektion kann zu einer atrophischen Gastritis führen, einer Degeneration der Schleim-, Säure- oder Pepsin-produzierenden Zellen des Magenepithels, die als präkanzeröse Läsion betrachtet werden muß (HOUBEN ET AL., 1995).

Da nahezu 90% der an chronischer Gastritis erkrankten Patienten und 92% der MALT-Lymphoma auch *H. pylori* positiv sind, stellt das Pathogen einen wichtigen Faktor neben anderen Faktoren wie genetische Determination des Wirtes (Immunreaktion), Alter des Wirtes zum Zeitpunkt der Infektion und Umwelt-Co-Faktoren (Alkohol, Rauchen, Streß) im Konzept der multifaktoriellen Pathogenese dar (WYATT, 1995; WOTHERSPOON, 1991).



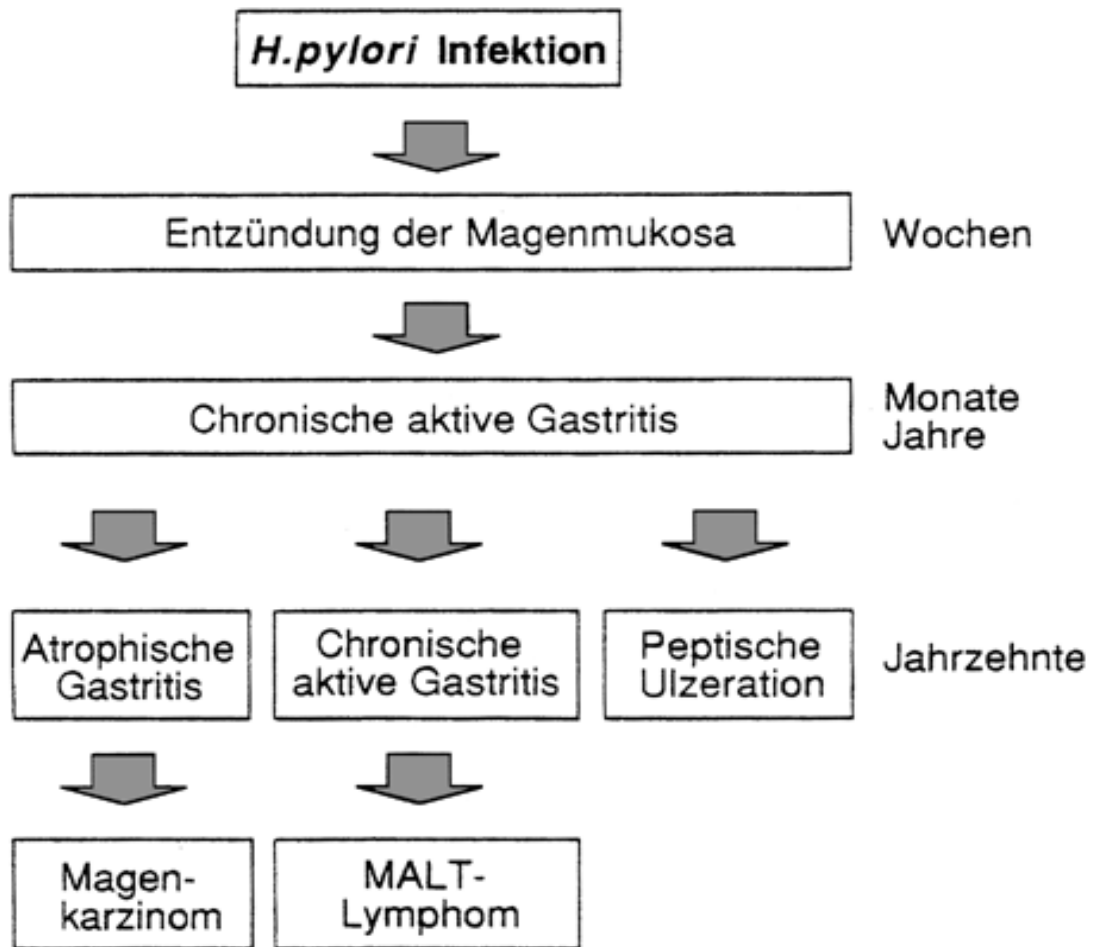


Bild 1: Die mit *H. pylori*-Infektion assoziierten Folgeerkrankungen

### 1.3. Immunantwort der T-Lymphozyten

#### 1.3.1. Die Differenzierung und Regulation der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Anhand von Oberflächenantigenen konnten innerhalb der T-Zell-Population CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen von CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen abgegrenzt werden. Weitere Unterschiede zeigten sich innerhalb der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozytenpopulation hinsichtlich der Effektorfunktion der Zellen. Zwei Subpopulationen wurden charakterisiert, die unterschiedliche Zytokine synthetisieren. Diese übernehmen wichtige Funktionen in der Regulierung der Immunreaktion und tragen somit zur Ausbildung als auch zur Unterdrückung von Immunantworten bei. Durch ihre Fähigkeit, Antigene spezifisch zu erkennen, können die CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen zu

zwei antagonistisch wirkenden Arten von Effektorzellen differenzieren, die aufgrund ihres Zytokinphänotyps eine zellvermittelte ( $T_H1$ ) oder eine humorale Immunantwort ( $T_H2$ ) steuern (MOSMANN ET AL., 1989a und b) (Bild 2).

Die zellvermittelte Immunität ist erforderlich in der Bekämpfung von Tumorzellen, Viren, Mycobakterien, intrazellulären Parasiten und mykotischen Infektionen. Sie beinhaltet die Zerstörung infizierter Zellen durch zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen, oder die Eliminierung dieser intrazellulären Pathogene durch Makrophagen, die durch inflammatorische  $T_H1$  T-Zellen aktiviert wurden. Sie setzen dann  $TNF\alpha$  und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite frei. Aufgrund der Stimulation von B-Zellen zur Produktion komplementbindender IgG, sind sie außerdem in die antikörperabhängige Zytotoxizität involviert. Der  $T_H1$  Phänotyp wird durch die Produktion von  $IFN\gamma$ , IL2,  $TNF\beta$  und Lymphotoxin charakterisiert (ROMAGNANI, 1994; MOSMANN ET AL., 1989a und b).

Die humorale Immunität richtet sich gegen extrazelluläre Pathogene.  $T_H2$  T-Zellen stimulieren die klonale Expansion von B-Zellen und die Produktion von IgG und IgE, wobei aber Komplement nicht gebunden wird. Sie tragen durch die Unterstützung von Wachstum und Differenzierung der Mastzellen und Eosinophilen zur mukosalen Immunität bei. Das  $T_H2$  Zytokinprofil beinhaltet IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 und IL13 (ROMAGNANI, 1994).  $T_H2$ -Zellen inhibieren die meisten zytotoxischen Effektorfunktionen von Makrophagen wie auch die Antigenpräsentation zu  $T_H1$  oder naiven T-Zellen (DING ET AL., 1992; STOUT ET AL., 1989).

Eine dritte  $CD4^+$  T-Lymphozytensubpopulation stellen die  $T_H0$ -Zellen dar, die entstehen, wenn kein polarisierendes Antigensignal vorhanden ist. Sie haben ein intermediäres Zytokinprofil bestehend aus  $T_H1$  und  $T_H2$  Zytokinen. Diese können abhängig vom Zytokinmilieu, in dem sie sich befinden, differenzieren und eine  $T_H1$  oder  $T_H2$  Antwort entwickeln (RÖCKEN ET AL., 1992; MOSMANN ET AL., 1989a und b).

In der T-Zell-Differenzierung und somit in der Determination der Immunantwort nehmen die Makrophagen eine wichtige Rolle, nicht nur als antigenpräsentierende Zellen, sondern auch als Quelle von Zytokinen, die die Entstehung einer T-Zell-Antwort manipulieren, ein. Eine Schlüsselbedeutung in der Differenzierung der

T-Zellen zu  $T_H1$  kommt dem Zytokin IL12 zu, das von Makrophagen nach Aktivierung gebildet wird (BELARDELLI, 1995; DOHERTY, 1995). Dabei ist die  $IFN\gamma$ -Produktion von T-Zellen stark erhöht, was wiederum reziprok stimulierend und aktivierend auf die Makrophagen und ihre IL12 Produktion wirkt (BELARDELLI, 1995). Das hat auch zur Folge, daß die Expression von den kostimulierenden Molekülen B7.1 und B7.2 erhöht wird (DING ET AL., 1993).

Eine dominante Rolle in der  $T_H2$ -Differenzierung spielen die Zytokine IL4, dessen primäre Sekretionsquelle *in vivo* noch nicht klar ist, und IL10 (RÖCKEN ET AL., 1996). Das Zytokin IL10, das von Makrophagen und T-Zellen gebildet wird, wirkt inhibitorisch auf viele Effektorfunktionen von Makrophagen und damit durch die Suppression der Expression von B7 indirekt auf T-Zell-Antworten (DOHERTY, 1995; DING ET AL., 1993). Fehlt das kostimulierende Signal, verfallen die T-Zellen in Anergie, wobei die IL2 abhängige Proliferation nicht mehr stattfindet (MUELLER ET AL., 1989). Die Makrophagen nehmen somit eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Modifizierung der T-Zell-Antwort zu einer zellvermittelten zytotoxischen oder einer humoralen Immunität ein. Sie wirken damit auf die Aktivierung des Immunsystems, die abhängig von der Balance der antagonistischen regulierenden Zytokine wie  $IFN\gamma$  / IL12 und IL4 / IL10 ist.

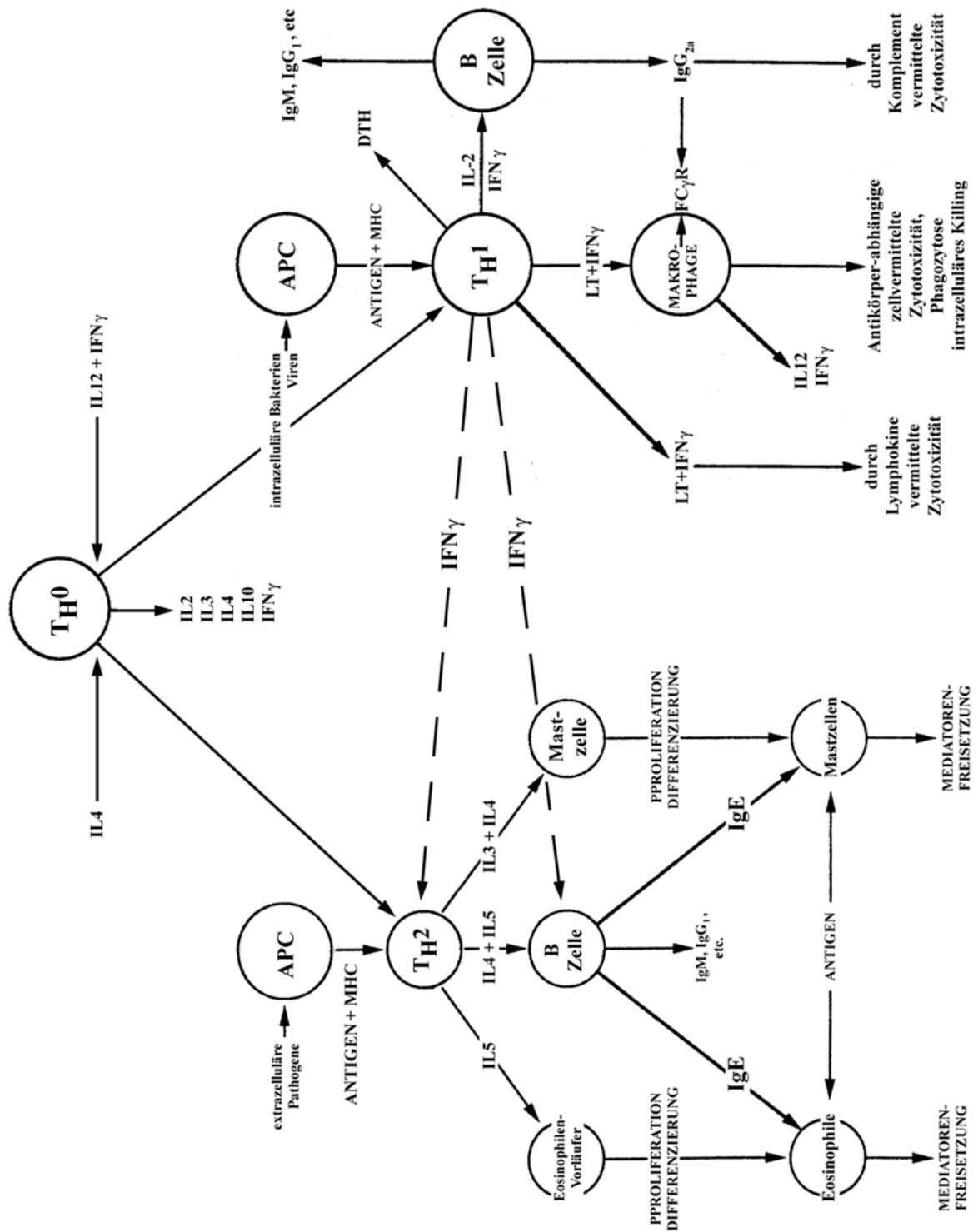


Bild 2: Differenzierung und Funktion der T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 CD4<sup>+</sup> Subpopulationen  
 Erklärung im Text (modifiziert nach MOSMANN und COFFMAN, 1989).

Durchgehender Pfeil: stimulierende Wirkung  
 Gestrichelter Pfeil: inhibierende Wirkung

### 1.3.2. Die *H. pylori*-induzierte T-Zell-Immunantwort

Die kontinuierliche Exposition der gastrischen Mukosa zu *H. pylori*-Antigenen resultiert in der Entstehung einer spezifischen Immunantwort. Die systemische Lymphozyten-Antwort zeigt unspezifische proliferative Reaktionen, unabhängig vom *H. pylori*-Status der Patienten, wobei eine Herunterregulierung der Proliferation und der Sekretion von IFN $\gamma$  bei seropositiven Individuen zu beobachten war (DI TOMMASO ET AL., 1995; FAN ET AL., 1994; KARTTUNEN ET AL., 1990). Die Folge daraus ist, daß die *H. pylori*-Infektion lokal im gastrischen Antrum eine starke Immunreaktion auslöst, die *H. pylori*-spezifische Effektor-Zellen rekrutiert und aktiviert.

Eine lokale Immunreaktion auf solch ein nicht invasives Pathogen kann durch das Aufnehmen der abgestoßenen bakteriellen Produkte in die Mukosa ausgelöst werden. Möglicherweise geschieht das über eine passive Absorption von gelösten Produkten, über die Passage von Antigenen durch die beschädigten "tight junctions" oder über die epitheliale Endozytose (CRABTREE, 1996). Die Epithelzellen exprimieren de novo MHC II Moleküle und das antigenprozessierende Enzym Cathepsin E sowie das antigentransportierende endozytisch-endosomale System, was zu einer ersten lokalen Antigenpräsentation beiträgt (FIOCCA ET AL., 1994).

Die stimulierten Epithelzellen nach Antigenkontakt und die lokal vorhandenen *H. pylori*-Antigene führen zur Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen, unter denen sich auch T-Lymphozyten befinden (LARSEN ET AL., 1989). In der entzündlich veränderten Mukosa sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen predominant, während in der histologisch normalen Schleimhaut überwiegend CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorkommen (PAPADIMITRIOU ET AL., 1988; WYATT ET AL., 1988). Andere Studien an lokalen Lamina propria Lymphozyten haben nach einer phänotypischen Charakterisierung einen Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt (KARTTUNEN ET AL., 1991) oder die Zunahme beider Subpopulation im Gewebe *H. pylori* seropositiver Patienten (ENGSTRAND ET AL., 1991).

Untersuchungen über die mukosale T-Zell Population aus Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion, zeigten einen Anstieg an Zellen, die IFN $\gamma$  sezernierten, aber keinen Anstieg in der Produktion von IL4, was auf eine dominierende T<sub>H</sub>1-Antwort hindeuten würde (KARTTUNEN ET AL., 1995; D'ELIOS ET AL., 1997a). Die lokale Produktion von IFN $\gamma$  stimuliert wiederum die IL8 Produktion und die Expression von MHC II Molekülen auf Epithelzellen, die dann mit T-Zellen interagieren können (YASUMOTO ET AL., 1992).

Auch diese spezifische zelluläre Immunantwort trägt zur Schädigung des Magenepithels bei und erlaubt einen weiteren Einstrom der immunogenen Oberflächenproteine und eine Perpetuierung der Entzündungsreaktion.

#### 1.4. Fragestellung

Jede *H. pylori*-Infektion erzeugt eine lokale Entzündungsreaktion, die in der Regel nicht spontan zu einer Eliminierung des Pathogens führt. Über die Regulation dieser Immunreaktion ist wenig bekannt. Somit fehlen experimentelle Befunde zur Rolle von professionellen (Monozyten / Makrophagen) und nicht professionellen (Epithelien) antigenpräsentierenden Zellen (APC) in der Induktion der inflammatorischen Reaktion; darüber hinaus liegt die T-Zellregulation der chronischen *H. pylori*-Immunreaktion weitgehend im Dunkeln. Weitere Studien zur Infektionsbiologie von *H. pylori* müssen von Untersuchungen sowohl zur Lokalisation der Entzündungsaktivität *in vivo* / *in situ* als auch zur Signalidentifizierung und der gleichzeitigen Zellzuordnung im Gewebe und dessen Klassifizierung bezüglich des Krankheitsbildes begleitet sein.

Aus Zellisolaten des humanen Gastrointestinaltraktes sollen *H. pylori*-spezifische T-Lymphozyten isoliert und T-Lymphozytenlinien für weiterführende Studien zur Immunregulation etabliert werden. Sie sollen phänotypisch anhand der Oberflächenmarker der CD-Nomenklatur und funktionell durch die Zytokinsekretion (T<sub>H</sub>1: IFN $\gamma$ ; T<sub>H</sub>2: IL4, IL10) charakterisiert werden. Dieser Untersuchungsabschnitt soll Aufschluß über die eingeschränkte Wirksamkeit der Immunantwort auf das extrazelluläre Pathogen geben, da die sich abzeichnende

Expansion von T<sub>H</sub>1 Immunantworten in diesem Fall ineffektiv ist und zur Schädigung der gastrointestinalen Barriere beiträgt.

Zur Untersuchung der Antigenpräsentation *in vitro* sollen Monozyten / Makrophagen, die aus der Lamina propria gewonnen werden, mit fraktionierten *H. pylori*-Antigenen stimuliert werden und so deren Einfluß über die Mediatorsekretion auf die Regulation der Immunreaktion beleuchtet werden. Desweiteren soll die Funktion des Epithels als nicht professionelle APC in der Antigenpräsentation untersucht werden und ggf. die damit im Zusammenhang stehende Induktion einer Anergie von naiven T-Zellen und Toleranz gegenüber *H. pylori*-Antigenen an der gastrointestinalen Barriere.

Fixierte Mukosabiopsien von Patienten mit verschiedenen *H. pylori*-assoziierten Krankheitsbildern definierter Krankheitsstadien werden hinsichtlich der proinflammatorischen und immunmodulierenden Mediatoren sowie immunsuppressiver Wachstumsfaktoren im Bereich der *H. pylori*-induzierten Barriere-störung untersucht. Der Nachweis der Zytokine in der Lamina propria, sezerniert durch Monozyten / Makrophagen bzw. Epithelzellen neben den kostimulativen *H. pylori*-Antigenen kann zur Erklärung der Destruktion des Gewebes sowie der gastrointestinalen Barrierefunktion beitragen. Somit können Hinweise für die Perpetuierung des Entzündungsgeschehens durch einen möglicherweise erhöhten Einstrom von *H. pylori*-Oberflächenproteinen durch das vorgeschädigte Epithel geliefert werden.

## 2. Material

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Chemikalien der Reinheitsstufe p.A. von folgenden Firmen bezogen:

Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Riedel de Haën (Seelze).

Steriles und pyrogenfreies Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde von Greiner (Nürtingen) und Nunc (Wiesbaden) geliefert.

Verbrauchsmaterialien und Geräte, die nicht zu einer üblichen Grundausstattung eines Laboratoriums gehören, sind gesondert aufgeführt.

Sämtliche Methoden wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt, sofern nicht anders erwähnt.

### 2.1. Medien und Platten

#### 2.1.1. Medien für die Kultivierung von *Helicobacter pylori*

<i>H. pylori</i> -Kulturmedium	3,7% (w/v)	Hirn-Herz-Bouillon (Difco, Augsburg)
	0,25% (w/v)	Hefeextrakt (Difco, Augsburg)
	10% (v/v)	hitzeinaktiviertes (30 min bei 56°C)
fötales		Kälberserum (FCS)
		(Life Technologies, Eggenstein)
Columbia-Blutagarplatte		Fertigplatte (Becton Dickenson, Heidelberg)
		Columbia-Agarplatte mit 5% (v/v) Schafblut

#### 2.1.2. Medien für die Zellkultur

Alle Substanzen der unten aufgeführten Medien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

RPMI-Wachstumsmedium ad 500 ml (humane T- und B-Zellen)		RPMI 1640 (mit Glutaminzusatz)
Kälberserum		50 ml hitzeinaktiviertes fötales (Myoclon Super Plus FBS)
	5 ml	L-Glutamin (0,584 mg/ml)
		(Fluka, Neu-Ulm)
	1 ml	Pyruvat (1 M/ml)
		(Sigma, Deisenhofen)
	5 ml	Penicillin (5000 U/ml)/
		Streptomycin (5 mg/ml)
	0,5 ml	Gentamicin (10 mg/ml)



	0,125 ml	Fungizone™ (250 µg/ml) Amphotericin B (0,0625 µg/ml)
RPMI-Medium (B95-8)	90% (v/v) 10% (v/v)	RPMI-Medium 1640 (mit Glutaminzusatz) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum
Medium für KATO III	ad 500 ml 20% (v/v) 5 ml	RPMI 1640 (mit Glutaminzusatz) inaktiviertes fötales Kälberserum Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5 mg/ml)
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05% (w/v) 0,02% (w/v)	Trypsin EDTA in PBS
Einfriermedium		Cell Culture Freezing Medium mit 10% (v/v) DMSO

### 2.1.3. Medien für die Isolation von Zellen aus Geweben

Alle Medien sind steril:

#### Hanks Isolationslösung I

ad 500 ml	HBSS w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
5 ml	Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5 mg/ml)
0,5 ml	Gentamicin (10 mg/ml)
0,125 ml	Fungizone™ (250 µg/ml) Amphotericin B (0,0625 µg/ml)
1 ml	Pyruvat (1 M/ml) (Sigma, Deisenhofen)
5 ml	L-Glutamin (0,584 mg/ml) (Fluka, Neu-Ulm)
250 mg	DL-Dithiothreitol (DTT)
12,5 ml	1 M HEPES

#### Hanks Isolationslösung II

ad 500 ml	HBSS w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
5 ml	Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5 mg/ml)
0,5 ml	Gentamicin (10 mg/ml)
0,125 ml	Fungizone™ (250 µg/ml) Amphotericin B (0,0625 µg/ml)
1 ml	Pyruvat (1 M/ml) (Sigma, Deisenhofen)
5 ml	L-Glutamin (0,584 mg/ml) (Fluka, Neu-Ulm)
1,875 ml	0,2M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma, Deisenhofen)

	0,025 ml	2-Mercaptoethanol
	12,5 ml	1 M HEPES
RPMI Enzymlösung	ad 500 ml	RPMI 1640 (mit Glutaminzusatz)
	5 ml	Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5 mg/ml)
	0,5 ml	Gentamicin (10 mg/ml)
	0,125 ml	Fungizone™ (250 µg/ml)
		Amphotericin B (0,0625 µg/ml)
	1 ml	Pyruvat (1 M/ml) (Sigma, Deisenhofen)
	5 ml	L-Glutamin (0,584 mg/ml) (Fluka, Neu-Ulm)
	225 mg	Dispase (Boehringer, Mannheim)
	25 mg	DNase II (Fluka, Neu-Ulm)
	12,5 ml	1 M HEPES
Transportmedium	ad 500 ml	RPMI 1640 (mit Glutaminzusatz)
	5 ml	Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5 mg/ml)
	0,5 ml	Gentamicin (10 mg/ml)
	0,125 ml	Fungizone™ (250 µg/ml)
		Amphotericin B (0,0625 µg/ml)
	1 ml	Pyruvat (1 M/ml) (Sigma, Deisenhofen)
	5 ml	L-Glutamin (0,584 mg/ml) (Fluka, Neu-Ulm)
	12,5 ml	1 M HEPES
RPMI für die Adhäsion	ad 500 ml	RPMI 1640 (mit Glutaminzusatz)
	10% (v/v)	inaktiviertes fötales Kälberserum
	1,5% (v/v)	1 M HEPES
	5 ml	Penicillin (5000 U/ml)/ Streptomycin (5 mg/ml)
	0,5 ml	Gentamicin (10 mg/ml)
	0,125 ml	Fungizone™ (250 µg/ml)
		Amphotericin B (0,0625 µg/ml)

## 2.2. Puffer und Lösungen für die *in-situ*-Hybridisierung

Die Substanzen, die nicht gesondert bezeichnet sind, wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) mit dem Reinheitsgrad MBQ und RNase frei bezogen. Alle Puffer sind RNase frei.

### Fixierungspuffer für Gewebe

6 ml	1,4 M Formaldehyd
6 ml	0,2 M Glutaraldehyd (EM-grade)
	mit 0,1 M Kaliumcarbonat pH 7,4 einstellen

### PLPG Fixierungspuffer für Zellen (Zytospins)

Lösung A:                   0,1 M                   Lysinmonohydrochlorid  
                                   0,05 M                Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
                                   in DEPC- H<sub>2</sub>O, mit HCL pH 7,4 einstellen

Lösung B:                   1,3 M                Paraformaldehyd  
                                   in DEPC- H<sub>2</sub>O

Lösung C:                   8% (v/v)           Glutaraldehyd (EM-grade)  
                                   in DEPC- H<sub>2</sub>O

Vor Gebrauch wurden die Lösungen mit folgenden Volumina vereinigt und Natriumperodat unter Rühren hinzugefügt:

Lösung A	120 ml
Lösung B	20 ml
Lösung C	20 ml
Natriumperodat	320 mg

Puffer für Proteinase K   10 mM           Tris / HCl, pH 7,4  
                                   2 mM            CaCl<sub>2</sub>  
                                   in DEPC-H<sub>2</sub>O

### Prähybridisierungslösung

50% (v/v)	deionisiertes Formamid (Roth, Karlsruhe)
2x	SSC (s.u.)
50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
1 mM	EDTA, pH 7,4
0,02% (w/v)	Ficoll
0,02% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon (PVP)

500 µg/ml Azetyliertes BSA (Gibco BRL)  
 500 µg/ml tRNA (Boehringer, Mannheim)  
 in DEPC-H<sub>2</sub>O

### Hybridisierungslösung

Lösung A: 20% (w/v) Dextransulfat (Pharmacia, Freiburg)  
 in deionisiertem Formamid (Roth,  
 Karlsruhe)  
 wurde bei 65°C gelöst

Lösung B: 300 mM Natriumchlorid  
 50 mM Tris/HCl, pH 7,4  
 1 mM EDTA, pH 7,4  
 0,02% (w/v) Ficoll  
 0,02% (w/v) PVP  
 10 mM DTT

500 µg/ml Azetyliertes BSA (Gibco BRL)  
 500 µg/ml tRNA (Boehringer)  
 in DEPC-H<sub>2</sub>O

Vor Gebrauch wurden die Lösungen wie folgt vermischt:

50% (v/v) Lösung A  
 14% (v/v) Lösung B  
 36% (v/v) DEPC-H<sub>2</sub>O mit markierter Sonde

DEPC-Wasser 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (Fluka, Neu-Ulm)

20x SSC-Stammlösung: 3 M Natriumchlorid  
 0,3 M Trinatriumcitrat, pH 7,0

Waschpuffer sind nicht RNase frei.

Waschpuffer I: 50% (v/v) Formamid (Roth, Karlsruhe)  
 0,1x SSC

Waschpuffer II: 2x SSC  
 1 mM EDTA, pH 7,4  
 5 mM DTT  
 0,1x Triton X  
 in ddH<sub>2</sub>O

Waschpuffer III:	0,1x 1 mM 5 mM 0,1x	SSC EDTA, pH 7,4 DTT Triton X in ddH <sub>2</sub> O
RNase-Waschpuffer:	10 mM 0,3 M 40 µg/ml 10 U/ml	Tris/HCl, pH 7,4 Natriumchlorid RNase A Ribonuklease T <sub>1</sub> in ddH <sub>2</sub> O

### 2.3. Puffer für die RNA-Isolierung

TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA
-----------	---------------	--------------------------

#### 2.3.1. RNA-Isolierung aus Geweben und Zellen

GTC-Puffer	4 M 25 mM 0,5% (w/v) 0,1 M	Guanidinthiocyanat, MBQ (USB, Cleveland, USA) Natriumcitrat, pH 7,0, MBQ N-Laurylsarkosin (Sarkosyl), MBQ β-Mercaptoethanol, MBQ
10x Agarose-Laufpuffer	200 mM 10 mM 50 mM	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) EDTA, pH 7,4 Natriumacetat in DEPC-H <sub>2</sub> O, pH 6,8
Ficoll®Orange	1 g 5 ml Spatelspitze	Ficoll® DEPC-Wasser Orange G

#### 2.3.2. mRNA-Isolierung aus Zellen mit Dynabeads®

Lyse-Bindungspuffer	100 mM 500 mM 10 mM 1% (w/v) 5 mM	Tris/HCl, pH 8,0 Litiumchlorid (LiCl) EDTA Litiumdodecylsulfat (LiDS) DTT
Waschpuffer mit LiDS	10 mM 0,15 mM 1 mM 0,1% (w/v)	Tris/HCl, pH 8,0 LiCl EDTA LiDS

Waschpuffer	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	0,15 mM	LiCl
	1 mM	EDTA

#### 2.4. Puffer und Lösungen für Northern Blot

Alle Bestandteile müssen RNase frei sein.

Denhardt's Stammlösung (50x)

1% (w/v)	Ficoll 400, MG 400 kDA, MBQ
1% (w/v)	PVP, MBQ
1% (w/v)	Bovines Serumalbumin (BSA), MBQ (Boehringer, Mannheim) in DEPC Wasser (s.o.)

Prähybridisierungslösung

5x	SSC
50% (v/v)	Formamid, MBQ (Roth, Karlsruhe)
5x	Denhardt's Lösung
5% (w/v)	Dextransulfat, MG: 500 kD, MBQ (Pharmacia, Freiburg)
0,5 mg/ml	Lachssperm-DNA, MBQ (Pharmacia, Freiburg)
25 mM	Natriumphosphatlösung, pH 6,5

Hybridisierungslösung

5x	SSC
50% (v/v)	Formamid, MBQ (Roth, Karlsruhe)
1x	Denhardt's Lösung
5% (w/v)	Dextransulfat, MG: 500 kD, MBQ (Pharmacia, Freiburg)
0,2 mg/ml	Lachssperm-DNA, MBQ (Pharmacia, Freiburg)
25 mM	Natriumphosphatlösung, pH 6,5

Waschpuffer (ist nicht RNase frei)

2x	SSC
0,1%v/v	Natriumdodecylsulfat (SDS)

**2.5. Puffer für die RT-PCR**

RT-Puffer (10x) (für die reverse Transkriptase)	500 mM 80 mM 300 mM	Tris/HCl, pH 8,3 MgCl <sub>2</sub> KCl
PCR-Puffer (10x)	500 mM 160 mM 15 mM	Tris/HCl, pH 9,2 (25°C) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub>
TAE-Puffer (10x)	400 mM 10 mM	Tris-Acetat, pH 8,1 EDTA
GEBS (5x)	20% (v/v) 50 mM 0,05% (v/v) 0,5% (w/v)	Glycerol EDTA Bromphenolblau Sarcosyl

**2.6. Puffer für die Markierung von DNA-Sonden**

Kinase-Puffer (10x) (Promega, Madison, USA)	500 mM 100 mM 50 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 7,5 MgCl <sub>2</sub> DTT Spermidine
Kinase-Puffer (10x) (Clontech, Palo Alto, USA)	500 mM 100 mM 100 mM	Tris/HCl, pH 9,5 MgCl <sub>2</sub> 2-Mercaptoethanol
STE-Puffer (1x)	100 mM 20 mM 10 mM	Natriumchlorid Tris/HCl pH 7,5 EDTA

**2.7. Puffer und Lösungen für die Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)**

Lagerungspuffer	2,5% (w/v) in PBS (Gibco BRL, Eggenstein)	Paraformaldehyd
-----------------	--	-----------------

**2.7.1. Phänotypische Oberflächenmarkierung**

Sättigungspuffer	10% (v/v) 0,01% (w/v) in Dulbecco's PBS (Gibco BRL, Eggenstein)	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )
Färbepuffer	2% 0,01% (w/v) in Dulbecco's PBS (Gibco BRL, Eggenstein)	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum NaN <sub>3</sub>

## 2.7.2. Intrazelluläre Zytokinmarkierung

Fixierungspuffer	4% (w/v)	Paraformaldehyd in Dulbecco's PBS (Gibco BRL, Eggenstein) pH 7,4 - 7,6
Permeabilisierungspuffer	1% (v/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v)	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum NaN <sub>3</sub> Saponin in Dulbecco's PBS (Gibco BRL, Eggenstein) pH 7,4 - 7,6
Färbepuffer	1% (v/v) 0,1% (w/v)	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum NaN <sub>3</sub> in Dulbecco's PBS (Gibco BRL, Eggenstein) pH 7,4 - 7,6

## 2.8. Lösungen für die Immunhistochemie

DAB-Substratlösung	0,1% (w/v)	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) 0,013% (v/v) Wasserstoffperoxid in HBSS (Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> ), (Gibco BRL, Eggenstein)
Eosinlösung	1% (w/v) 0,05% (v/v)	Eosin in ddH <sub>2</sub> O konzentrierte Essigsäure

## 2.9. Oligodeoxynukleotide

### 2.9.1. Primer

Die Oligonukleotide für die PCR wurden als Amplimer Sets von der Firma Clontech (Palo Alto, USA) bezogen. Im Folgenden sind die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt:

Primer für humanes  $\beta$ -Actin

5'Primer 5'ATCTGGCACACACCTTCTACAATGAGCTGCG3'  
3'Primer 5'CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC3'

Primer für humanes Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )

5'Primer 5'GCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGC3'  
3'Primer 5'CTCCTTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGCTGCTGG3'

Primer für humanes Interleukin 4 (IL4)

5'Primer 5'CGGCAACTTTGACCACGGACACAAGTGCGATA3'  
3'Primer 5'ACGTA CTCTGGTTGGCTTCCTTCACAGGACAG3'



Primer für humanes Interleukin 10 (IL10)

5'Primer 5'AAGCTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGCG3'  
 3'Primer 5'AGCTATCCCAGAGCCCCAGATCCGATTTTGG3'

Die Primer für das humane Interleukin 8 (IL8) wurden von der Firma Pharmacia (Freiburg) synthetisiert:

5'Primer 5'AAGGAACCATCTCACTG3'  
 3'Primer 5'GATTCTTGGATACCACAGAG3'

Die Primer für das humane Interleukin 12 (IL12) p40 (KANG ET AL.) wurden von der Firma Pharmacia (Freiburg) synthetisiert:

5'Primer 5'CCACATTCCCTACTTCTC3'  
 3'Primer 5'GTCTATTCCGTTGTGTC3'

### 2.9.2. Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung

Die DNA-Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung wurden als chemisch synthetisierte Designer Probes von der Firma R&D Systems (Abingdon, UK) bezogen. Es sind einzelsträngige Oligonukleotide, die auf der Antisensesequenz unterschiedlicher Genregionen basieren. Die probe cocktails bestehen aus äquimolarer Mischung der genspezifischen Sonden.

Probe cocktail für humanes  $\beta$ -Actin, bestehend aus:

#### **Exon 3: 30 Basen**

Exon 4: 29 Basen  
 Exon 5: 30 Basen  
 Exon 5 / 6: 30 Basen

Probe cocktail für humanen Tumornekrosefaktor h(TNF $\alpha$ ), bestehend aus:

Exon 3: 28 Basen  
 Exon 4A: 29 Basen  
 Exon 4B: 27 Basen

Probe cocktail für humanes Interleukin 8 (IL8), bestehend aus:

5'Region: 30 Basen  
 Mitte 30 Basen  
 3'Region 30 Basen

### 2.10. Zell- und Gewebematerial

B95.8 DSM ACC 100 (DSM, Braunschweig)

Diese Lymphozytenzelllinie wurde aus den peripheren Blutlymphozyten der Krallenaffen etabliert. Die Zellen sezernieren hohe Titer von Epstein-Barr Virus (EBV), was sie sehr geeignet als Quelle zur Transformation von B-Zellen und Etablierung von kontinuierlichen Zellkulturen sein läßt. Diese Zelllinie wurde von der ZKBS (Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit) der Risikogruppe 2 zugeordnet.

KATO III ATCC HTB 103 (ATCC, Rochville, USA)

Es handelt sich um eine humane Zelllinie aus einem gastrischen Karzinom.

Gewebeproben (Biopsien) des Magens für die *in-situ*-Hybridisierung und die Immunhistochemie wurden während einer routinemäßigen Gastroskopie in der Abteilung Gastroenterologie der Medizinischen Hochschule Hannover entnommen.

Gewebeproben für die Zellisolierung aus der Lamina propria des Magens stammen aus einer Magenresektion oder einer Operation nach Whipple in der Abdominalchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover. Der *H. pylori*-Status der Patienten wurde durch einen HLO-Test (Urease-Nachweis) bestimmt. Die serologische *H. pylori*-Diagnose wurde im ELISA gestellt und durch die Anzucht des *H. pylori* die Diagnose bestätigt (LEE ET AL., 1990). Das Blut zur Zellisolation und das Serum der jeweiligen Patienten wurde bei der morgendlichen Blutabnahme zur Verfügung gestellt.

**2.11. Bakterienstämme**

Die bei gastrokopischen Routineuntersuchungen aus Biopsien gewonnenen *H. pylori*-Stämme wurden für diese Arbeit aus der Stammsammlung von der diagnostischen Abteilung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover gestellt. Sie waren bezüglich ihrer Ulcus duodeni bzw. Gastritis B Assoziation spezifiziert. Folgende Stämme wurden benutzt:

Ulcus duodeni assoziiert: #5268  
#10109  
#20109  
#42626

Gastritis assoziiert: #1688  
#1689  
#4205  
#41352  
#44557

**2.12. Bilddokumentation und Software für die EDV**

Bilddokumentation: Photoabteilung der Medizinischen Hochschule Hannover  
Software: Photoshop 4.0  
Video-Bilddokumentation mit EASY Image Plus Rev.4.15  
(Herolab GmbH, Wiesloch)

wiss. Software: Microsoft: WinMDI (Joseph Trotter, 1996)  
PC-LYSIS™ 1,0  
(Auswerteprogramme für die Durchflußzytometrie)

E.A.S.Y.<sup>TM</sup> Herolab-Auswerteprogramm  
(Semiquantitative Auswertung der durch das EASY  
Image Plus aufgenommenen und gespeicherten Bilder  
der Agarosegele)

### 2.13. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der *t*-Test angewendet. Die Signifikanz anhand des berechneten Parameters *p* wurde mit Hilfe der Statistik-Software GraphPad Prism mit 95 prozentiger Genauigkeit ermittelt. Dabei wurden die drei international eingebürgerten Signifikanzschwellen als Entscheidungshilfen beachtet:

$p < 0,05$  → signifikant  
 $p < 0,01$  → gut signifikant  
 $p < 0,001$  → sehr hoch signifikant

### 3. Methoden

#### 3.1. Kultivierung von *Helicobacter pylori*

(SHAHAMAT ET AL., 1991)

Material: Columbia-Blutagarplatten (s. 2.1.1.)  
*H. pylori*-Kulturmedium (s. 2.1.1.)

##### Durchführung:

Die aus der Stammsammlung zur Verfügung gestellten *H. pylori*-Stämme wurden bei RT aufgetaut. Die primäre Anzucht erfolgte auf nicht-selektiven Nährböden aus Schafblutagar, indem 0,1 ml der Bakteriensuspension ausgestrichen wurden. Die inokulierten Platten wurden bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> im humiden Brutschrank 3 - 5 Tage lang inkubiert. Zur Anreicherung wurden einige Kolonien in 5 ml Flüssigmedium passagiert und ebenfalls bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> im humiden Brutschrank 2 Tage bis zur logarithmischen Wachstumsphase bebrütet. Jede weitere Passage erfolgte alle 2 - 3 Tage in einer 1:10 Verdünnung. Zur Überprüfung der Stamm- und Flüssigkulturen wurde nach jeder Passage ein Verdünnungsausstrich auf Blutagar angelegt.

#### 3.2. Kryokonservierung von *Helicobacter pylori*

(SHAHAMAT ET AL., 1992)

Material: *H. pylori*-Flüssigkultur  
Pferdeblut (Unipath, Hampshire, GB)  
Columbia-Blutagarplatten

##### Durchführung:

1,2 ml einer gut bewachsenen ( $10^8$  -  $10^9$  Bakterienzellen / ml) und sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen *H. pylori*-Kultur wurden mit 1,8 ml Pferdeblut vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Stämme konnten so mehrere Monate bei -70°C aufbewahrt werden.

#### 3.3. Nachweis von *Helicobacter pylori* über die Ureaseaktivität

(KOLTS ET AL., 1993; MCNULTY, 1989)

Bei diesem Nachweisverfahren wird eine in der zu testenden Probe enthaltene Ureaseaktivität qualitativ detektiert. Die durch die *H. pylori*-Urease katalysierte Harnstoffspaltung führt zu einer Alkalisierung des Christensen-Mediums, die mit dem pH-Indikator Phenolrot nachgewiesen wird. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag von gelb nach pink.

Material: Gewebeprobe  
Christensen-Nährmedium oder HLO-Testagar

Durchführung:

Ein etwa Biopsie-großes Gewebestück oder die Biopsie selbst wurden in HLO-Testagar oder in das Christensen-Nährmedium (1 ml) überführt und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Test wurde in den ersten 6 Stunden kontrolliert, die letzte Kontrolle fand nach 24 Stunden statt. Das Ergebnis war *H. pylori* positiv, wenn sich die Farbe des Testmediums innerhalb der 24 Stunden von gelb nach pink verändert hatte.

### 3.4. Antigenpräparation

#### 3.4.1. Gewinnung von Gesamtantigen

Die Ultraschallzelyse ist eine nicht denaturierende Methode, so daß die desintegrierten Zellbestandteile ihre Antigenität nicht verlieren. Diese werden durch die mechanische Auflösung der Bakterienzelle mit Hilfe von Schallwellen sowohl von der äußeren Zellmembran als auch aus dem Zellinneren freigesetzt.

Material / Geräte: *H. pylori*-Flüssigkultur, frühe stationäre Phase  
phosphatgepufferte Saline (PBS)  
RPMI-Medium (Life Technologies, Eggenstein)  
Sonifikator (Branson Ultraschall Desintegrator, Sonifier W-250, Branson, Danbury.USA)

Durchführung:

40 ml einer gut bewachsenen *H. pylori*-Kultur ( $10^9$  Bakterienzellen / ml) wurden bei 1000 x g, 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 40 ml PBS resuspendiert und die Suspension erneut wie oben zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 5 ml RPMI-Medium aufgenommen und nach OD<sub>600</sub>-Messung wie folgt bei 4°C 6 min lang beschallt: Bei 50%iger Impulsabgabeleistung (entspricht 100 W) und bei einer Nennfrequenz von 20 kHz wurden 20 s Beschallung mit 20 s Pause abgewechselt. Dabei war darauf zu achten, daß keine Schäumung entstand. Der Erfolg der Lyse (Trübungsabnahme) wurde mit einer erneuten OD<sub>600</sub>-Messung überprüft. Die gelösten Bakterienproteine wurden von intakten Bakterien und Bakterienresten über eine 5 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C getrennt. Die so gewonnenen Antigene wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.4.2. Gewinnung von Oberflächenproteinen von *Helicobacter pylori* (MAI ET AL., 1991; DUNN ET AL, 1990)

Durch einen passiven *in vivo* Abstoßungsprozeß der Membran (shedding), gibt *H. pylori* ständig Oberflächenmembranproteine in seine Umgebung ab. Diese wasserlöslichen Antigene werden *in vitro* lipopolysaccharidfrei gewonnen.

Material: *H. pylori*-Flüssigkultur, frühe stationäre Phase  
ddH<sub>2</sub>O  
0,25 M Natriumchloridlösung, 4°C

Durchführung:

Die Zentrifugation einer 40 ml *H. pylori*-Flüssigkultur erfolgte bei 1000 x g (4°C) für 15 min. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskalter NaCl-Lösung resuspendiert, erneut bei 1000 x g (4°C) 10 min sedimentiert und in 0,1 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Diese Suspension wurde 30 s kräftig gevortext und anschließend in ein 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Nach 3 min Zentrifugation bei 1000 x g (4°C) und anschließender 1 min Zentrifugation bei 11.600 x g (4°C) wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

**3.5. Quantitative Proteinbestimmung**  
(LANE ET AL., 1986; SMITH ET AL., 1985)

Bei der Biuret-Reaktion erfolgt die Reduktion der Kupferionen (Cu<sup>2+</sup>) mit der alkalischen Peptidlösung zu (Cu<sup>4+</sup>). Diese bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) unter alkalischen Bedingungen einen violetten Komplex, der bei 540 nm sein Absorptionsmaximum besitzt und mit der Proteinkonzentration der Probe korreliert.

Material/Geräte: BCA-Protein-Assay-Reagenz (Pierce, München):  
a) Reagenz A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Detektionsreagenz, Natriumtartrat in 0,1 M NaOH)  
b) Reagenz B: 4% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
Mikrotiterplatten mit Rundboden (Greiner, Nürtingen)  
ELISA-Reader Titertek Multiskan<sup>®</sup> MCC 1340  
(Labserv, Finnland)

Durchführung:

Mit einer 1:50 Verdünnung von Reagenz B mit Reagenz A wurde das Gebrauchsreagenz hergestellt. Zur Aufstellung einer Eichkurve wurde Rinderserumalbumin in 0,9% NaCl in Konzentrationen von 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 150 µg/ml und 200 µg/ml angesetzt. Die zu bestimmenden Proteinproben wurden ebenfalls in 0,9% NaCl 1:20 und 1:40 verdünnt. In die Mikrotiterplatte wurden 20 µl der Standardverdünnungen (vierfacher Ansatz) und 20 µl der Probenverdünnungen (zweifacher Ansatz) pipettiert und mit 200 µl des BCA-Gebrauchsreagenz versetzt. Nach einer 30 - 60 min Inkubation bei 50°C erfolgte die Bestimmung der Extinktion der Farbreaktion bei 540 nm am ELISA-Photometer.

### 3.6. Isolation von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten

#### 3.6.1. **Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem humanen Blut**

(COLIGAN ET AL., 1991; BØUM, 1968)

Die Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen erfolgt über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque<sup>®</sup>, dessen spezifische Dichte mit 1,076 -1.078 g/ml unter der von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten liegt, aber über der von mononukleären Zellen. Die Auftrennung dieser Zellfraktionen erfolgt nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes während der Zentrifugation.

Material: Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus (Pharmacia, Freiburg)  
Liquemin<sup>®</sup>, N 2500 (Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH)  
oder heparinisieretes Röhrchen  
PBS, pH 7,4 (Life Technologies, Eggenstein)  
RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)

Durchführung:

Durch intravenöse Punktion wurden 20 ml peripheres Blut in ein heparinisieretes Röhrchen oder in ein Röhrchen mit 2500 U Liquemin<sup>®</sup> / 10 ml Blut gewonnen und 1:2 mit PBS (4°C) verdünnt. 20 ml Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus wurden vorsichtig mit 20 ml des verdünnten Blutes überschichtet und 30 min bei 900 x g (10°C) ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene Interphase mit den mononukleären Zellen wurde geerntet und in doppeltem Volumen PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 150 x g für 10 min (4°C) ohne Bremse wurde das Zellpellet erneut mit PBS gewaschen (Zentrifugation wie oben) und schließlich in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen konnten bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C 24 Stunden ohne Vitalitätsverlust gehalten werden. Sie waren immer zu 95% vital.

#### 3.6.2. **Isolation mononukleärer Zellen aus der Lamina propria des Magens**

(modifiziert nach YOUNGMAN ET AL., 1993 und FIOCCHI ET AL., 1979)

Aus dem Bereich der intestinalen Lamina propria mucosae des Menschen wird eine repräsentative Population von vitalen mononukleären Zellen isoliert, die dort unter physiologischen Bedingungen aber auch während einer Entzündung zu finden ist. Diese Methode beruht auf einer Kombination aus chemischer, enzymatischer und mechanischer Separation. Der Versuchsaufbau sieht hier die Zellisolation der intestinalen Monozyten / Makrophagen sowie Lymphozyten über eine enzymatische Lyse der Lamina propria nach chemischer Mukuslyse durch DTT und Ablösung der Epithelzellschicht mit den intraepithelialen Makrophagen mittels EDTA vor.

Material: Transportmedium (s. 2.1.3.)  
Hanks Isolationslösung I (s. 2.1.3.)  
Hanks Isolationslösung II (s. 2.1.3.)  
Enzymlösung (s. 2.1.3.)  
RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)  
PBS, pH 7,4 (Life Technologies, Eggenstein)

RPML, 10% (v/v) FCS  
70% (v/v) Ethanol  
sterile Plastikbecher mit Deckel  
Petrischalen (Ø 100 mm)  
Teesieb aus Plastik (steril)  
sterile Gewebeschere und Pinzette

Durchführung:

Sofort nachdem das Organgewebe während einer Operation nach Whipple bzw. einer Magenresektion entnommen worden war, wurde es unter fließendem Wasser gewaschen, um Blut und andere Flüssigkeiten zu entfernen. Der Magen wurde in der Längsachse, ohne die klinische Diagnose zu gefährden, aufgeschnitten, um die makroskopische Erscheinung der Mukosa sichtbar zu machen und ein morphologisch geeignetes etwa 2 x 3 cm großes Gebiet aus dem Antrum in vollständiger Dicke zu präparieren. Diese Gewebeprobe wurde in das eiskalte Transportmedium überführt und ins Labor transportiert.

Das Gewebe wurde über ein durch Alkohol sterilisiertes Sieb mit reichlich PBS gewaschen und in eine Petrischale gelegt. Dort wurde es von Fettgewebe, nekrotischem Gewebe und anderer Debris befreit, nochmals mit PBS gewaschen und die Lamina propria mucosae mit Hilfe der Schere von dem Muskelgewebe getrennt. Reste vom Muskel und vom Bindegewebe mußten restlos entfernt sein.

Die sauber abpräparierte Lamina propria wurde wieder mit PBS gewaschen, in etwa 5 x 5 mm große Stücke zerschnitten und in 150 ml auf 37°C vorgewärmte Hanks Isolationslösung I in einen Plastikbecher transferiert und 30 min in einem Wasserbad bei 37°C kräftig geschüttelt. Um eine vollständige Mukuslyse zu gewährleisten wurde dieser Schritt nochmals wiederholt, nachdem die Gewebeprobe über ein Sieb abgegossen und mit PBS gewaschen worden waren. Bei einer vollständigen Lyse blieb der Überstand durchsichtig. Bei starker Trübung mußte dieser Versuchsteil ein drittes Mal wiederholt werden. Das Gewebe verlor seinen Glanz und hatte makroskopisch ein granuläres Aussehen.

Nach gründlicher Spülung der Gewebeteile mit PBS (über dem Sieb) wurden diese in 150 ml Hanks Isolationslösung II, die auf 37°C vorgewärmt war, überführt. Zur Ablösung der Epithelzellen und der intraepithelialen Monozyten / Makrophagen wurden die Gewebeprobe 30 min in einem Wasserbad bei 37°C kräftig geschüttelt. Über ein Sieb wurde der Überstand mit den Zellen vom übrigen Gewebe getrennt, das mit PBS nachgespült wurde, und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Dieser Schritt und die Waschung wurden zur vollständigen Epithelablösung 1 - 2 Mal wiederholt und der Überstand mit den Epithelzellen auf Eis gesammelt. Das Gewebe wurde wieder glänzend.

Für die Isolierung der Monozyten / Makrophagen und Lymphozyten aus der Lamina propria wurden die Gewebeteile sehr gründlich mit reichlich PBS gewaschen und in einen Plastikbecher überführt. Nach Zugabe von 20 ml Enzymlösung (37°C) wurden die Gewebeprobe mit der Schere zerkleinert. Die Enzymlösung wurde auf 150 ml aufgefüllt und in einem Wasserbad bei 37°C unter Schütteln 40 min inkubiert. Der Überstand wurde über ein Sieb abgegossen und sofort mit RPML-Medium mit 10% FCS 1:2 verdünnt, um die Enzyme zu deaktivieren. Diese Schritte wurden noch einmal wiederholt. Die verdünnten



Überstände wurden auf Eis gelagert und der übriggebliebene Geweberest verworfen.

Die so gewonnenen Zellen wurden sofort 10 min bei 150 x g (4°C) ohne Bremse zentrifugiert und die Pellets vereinigt. Nach einem Waschschrift mit PBS und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium (s. 2.1.2.) aufgenommen. Sichtbare Verunreinigungen mit Binde- und Fettgewebe sowie Zellklumpen wurden mit einer Pasteurpipette entfernt. Die weitere Aufreinigung der Monozyten / Makrophagen und Lymphozyten erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.6.1.), die Adhärenz (s. 3.7.1.) und die Auftrennung von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (3.6.3.). Der Vitalitätsverlust war < 5%.

Nach jedem Präparationsschritt wurde die Beschaffenheit der Populationen anhand des Zellgrößenprofils (3.9.1.) kontrolliert.

### **3.6.3. Aufreinigung von T- und B-Lymphozyten**

(JULIUS ET AL., 1973; BERKE ET AL., 1972)

Die Separation von T- und B-Lymphozyten beruht auf der Zellpassage über eine sterile Säule aus Nylonwollfäden, wobei man sich die Adhärenz der B-Lymphozyten an die Nylonwolle zu Nutze macht, die bei T-Lymphozyten nicht vorhanden ist. Die Anreicherung und Reinheit der so gewonnenen Zellpopulationen beträgt 95% mit einer Vitalität > 92%.

**Material:** Zellsuspension mit mononukleären Zellen  
(s. 3.6.1., 3.6.2. und 3.7.1.)  
PBS, pH 7,4  
RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)  
Säule Uni-Sorb™ T&B  
(Nycomed Pharma A.S., Oslo, Norwegen)

#### **Durchführung:**

Die mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen wurden nach Adhäsion von Monozyten / Makrophagen (s. 3.7.1.) auf eine maximale Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen / ml eingestellt. Das Gesamtvolumen richtete sich nach der Kapazität der Säule, die 7 - 8 ml betrug. Die Nylonwollsäule wurde luftblasenfrei mit der Zellsuspension beladen und anschließend im Brutschrank 60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die nicht adhärennten T-Lymphozyten wurden im dreifachen Volumen PBS eluiert, bei 150 x g (4°C) 10 min ohne Bremse zentrifugiert und in 5 ml RPMI-Wachstumsmedium aufgenommen.

Die Ernte der adhärennten B-Lymphozyten erfolgte durch Zusammenpressen der Nylonwollfäden mit dem Druckstempel einer Spritze. Die so herausgewaschenen Zellen wurden ebenfalls bei 150 x g (4°C) 10 min ohne Bremse zentrifugiert und in 5 ml RPMI-Medium aufgenommen.

Die Reinheit der Zellpopulationen wurde anschließend mikroskopisch (s. 3.9.4.) und anhand des Zellgrößenprofils (s. 3.9.1.) überprüft. Die Vitalität (s. 3.9.2.)

wurde ebenfalls einer Kontrolle unterzogen. Nur Zellpopulationen mit einer Vitalität > 95% wurden zu weiteren Experimenten herangezogen.

### **3.7. Isolation von Monozyten / Makrophagen**

#### **3.7.1. Isolation von Monozyten / Makrophagen mittels Adhäsion**

Es handelt sich um eine schnelle Methode zur Separation von Monozyten / Makrophagen aus einer mononukleären Suspension. Jedoch ist eine Aktivierung der Monozyten / Makrophagen nicht auszuschließen (HASKILL ET AL. 1988; FUHLBRIGGE ET AL, 1987).

**Material:** durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigte Zellsuspension (s. 3.6.1. und 3.6.2.)  
RPMI für die Adhäsion (s. 2.1.3.)  
RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)  
Petrischalen für die Zellkultur, Ø100 mm  
steriler Zellschaber (Nunc, Wiesbaden-Biebrich)

#### **Durchführung:**

Die erhaltenen mononukleären Zellen (s. 3.6.1. und 3.6.2.) wurden bei 150 x g 10 min ohne Bremse bei 4°C zentrifugiert und im RPMI für die Adhäsion in einer Konzentration 2 - 3 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml aufgenommen. 10 ml dieser Suspension wurden in einer Petrischale gleichmäßig verteilt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im humiden Milieu 1 - 2 Stunden inkubiert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle wurden die in der Suspension schwimmenden Zellen mit einer Pipette abgenommen und der Schalenboden sehr vorsichtig, um die adhärenierten Zellen nicht abzulösen, mit 5 ml Medium gespült. Nach einer erneuten mikroskopischen Kontrolle wurde der Überstand abgenommen und dieser Schritt gegebenenfalls wiederholt, um die nicht adhärenierenden Lymphozyten vollständig zu entfernen.

Die am Boden festsitzenden Monozyten / Makrophagen wurden durch ein kräftiges Spülen mit 10 ml Medium, das mehrmals hochgesaugt und direkt auf den geneigten Schalenboden verteilt wurde, abgelöst. Unter dem Mikroskop wird die Ablösung kontrolliert und die Prozedur so lange gegebenenfalls mit neuem Medium wiederholt, bis keine Zellen mehr am Boden zu sehen sind. Konnten die Zellen nicht vollständig geerntet werden, wurde ein Zellschaber zur Hilfe genommen, mit dem die Zellen schonend vom Boden abgeschabt werden konnten.

Die Zellsuspensionen wurden dann bei 150 x g, 4°C 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Pellets wurden im Wachstumsmedium (4°C) resuspendiert, gezählt (s. 3.9.1.), die Vitalität überprüft (s. 3.9.2.) und eine mikroskopische Kontrolle (s. 3.9.4.) durchgeführt. Um Zellbindungen der Monozyten / Makrophagen und Zellverlust zu unterbinden, wurden die Suspensionen immer bei 4°C gehalten.

### 3.7.2. Isolation von Monozyten / Makrophagen mittels Elutriation

(modifiziert nach MASON AND WEINER, 1985; WAHL ET AL., 1984; FIGDOR ET AL., 1983)

Die Gegenstromzentrifugation ermöglicht es, spezifische Zellpopulationen im großen Maßstab zu isolieren, ohne diese zu aktivieren. Das Prinzip der Elutriation beruht auf der Trennung der Zellen nach Größe und nach Dichte mittels eines sanften Waschvorgangs mit einem isotonischen Medium. Die Zellen werden in eine trichterförmige Kammer in den sich drehenden Rotor eingepumpt. Sie werden zwei gegensätzlichen Kräften unterworfen: Die Drehgeschwindigkeit des Rotors verursacht eine Zentrifugalkraft und der entgegengesetzt gerichtete Fluß des einströmenden Elutriationsmediums bewirkt die Zentripetalkraft. Drehzahl und Pumpgeschwindigkeit werden so aufeinander abgestimmt, daß Zellen bestimmter Größe oder Dichte gemäß ihrem Sedimentationsverhalten in Suspension gehalten werden können, während andere herausgepumpt werden. Wird die Flußrate stufenweise erhöht oder die Rotorgeschwindigkeit stufenweise gesenkt, werden aufeinanderfolgende Populationen von homogener Zellgröße aufgetrennt. Die zuerst aus dem Rotor herausgepumpten Populationen enthalten kleinere Zellen oder Zellen mit geringerer Dichte als die nachfolgenden.

Material und Geräte:

- Monozytenpräparation aus buffy-coats (Blutbank der Medizinischen Hochschule Hannover) (s. 3.6.1.)
- RPMI-Medium (Life Technologies, Eggenstein)
- RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)
- PBS, pH 7,4 w/o  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$
- Elutriationsmedium:
  - PBS, pH 7,4; w/o  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$
  - 10 mg/l Gentamicin (Life Technologies, Eggenstein)
  - 100 mg/l DNase (Fluka, Neu-Ulm)
  - 2000 U / l Heparin (Sigma, Deisenhofen)
- 70% (v/v) Ethanol
- Beckmann-Elutriations-System (Beckmann Instruments GmbH, München):
  - Beckmann J2-HS-Zentrifuge
  - Beckmann JE-6B-Rotor
  - Standard-Elutriationskammer
  - Silikon-Schläuche mit Ventilen
  - Probenreservoir, vakuumverschießbar
- Masterflex<sup>®</sup>-Pumpe mit Potentiometer, geeicht (Barnant company, Barrington, USA)

#### Durchführung:

Nach Trennung der mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation von den Erythrozyten (s. 3.6.1.), wurden diese in RPMI-Medium in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Der JE-6B-Rotor wurde nach der Instruktionsanweisung zusammgebaut, wobei alle beweglichen Teile sorgfältig mit Silikon-Vakuum-Fett eingefettet wurden. Die Elutriationskammer und die Bypass-Kammer wurden ebenfalls an den Kontaktstellen eingefettet und in den Rotor eingebaut. Nachdem die Schläuche an den Rotor angebracht worden waren, die Pumpe und das Probenreservoir angeschlossen und die Dichte des Rotors kontrolliert worden war, indem 70%iger

Alkohol durchgepumpt wurde, konnte der Rotor in die Zentrifuge eingesetzt werden. Zur Desinfektion des Systems wurden weitere 300 ml 70%iger Alkohol durchgespült (CLOUSE ET AL., 1989). Dem folgte eine Spülung mit 500 ml PBS und die Kontrolle nach ggf. vorhandener Luft im System. Diese mußte vollständig entfernt werden.

Die Zentrifugengeschwindigkeit wurde auf 500 x g (4°C ) eingestellt und konnte mit der Zellsuspension beladen werden, indem diese in das Reservoir mit einer Spritze überführt wurde und mit einer Durchflußrate von 5 ml/min in den Elutriator gepumpt wurde. Die Beladung der Kammer war vollständig, wenn die Trübung im Reservoir gänzlich abgenommen hatte. Das ganze System war auf 4°C eingestellt.

Die Durchflußrate wurde auf 9 ml/min erhöht und 100 ml Elutriationssuspension gesammelt (Fraktionen bestehen aus Erythrozyten und Lymphozyten). Die Durchflußrate wurde um einen Zuwachs von 0,5 ml/min bis 12 ml/min erhöht und von jeder Probe 50 ml gesammelt. So konnten Lymphozyten vollständig herausgewaschen werden. Jedoch wurden schon einige Monozyten elutriert (ab 11 ml/min in einem 50%-Anteil der heraustretenden Zellen).

Um Monozyten zu elutrieren, wurde die Durchflußrate auf 19 ml/min erhöht und von dieser Fraktion 150 ml gesammelt. Zur vollständigen Auswaschung der Kammer wurde die Pumpkraft auf 25 ml/min erhöht und 100 ml der Fraktion gesammelt. Bei stehendem Rotor wurden weitere 100 ml Elutriationspuffer durchgepumpt und gesammelt. Auch diese Fraktionen enthielten Monozyten/Makrophagen.

Nach Beendigung des Elutriationsvorgangs wurde das System mit 200 ml 70%igem Alkohol desinfiziert und auseinandergebaut. Nach jedem dritten Lauf wurden die Schläuche und die Elutriationskammer in 3%igem Hypochlorid ü/N gelagert, um akkumuliertes Protein zu entfernen.

Jede Fraktion wurde bei 150 x g (4°C) zentrifugiert, in 5 ml RPMI-Wachstumsmedium (4°C) aufgenommen und die Vitalität der Zellen überprüft (s. 3.9.2.). Eine erste Subpopulationskontrolle erfolgte über die Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung (s. 3.9.1.) und über eine mikroskopische Kontrolle (s. 3.9.4.). Weitere Untersuchungen zur Identifizierung der Zellsubpopulationen erstreckten sich über die phänotypische Markierung mit Hilfe der analytischen Durchflußzytometrie (s. 3.11.1.).

### **3.8. Isolation von Epithelzellen** (modifiziert nach YOUNGMAN ET AL., 1993)

Die Isolation der Epithelzellen erfolgt wie beschrieben unter 3.6.2.

**Material:** Isolierte Epithelzellen (s. 3.6.2.), bei 4°C gelagert.  
 RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)  
 PBS, pH 7,4 (Life Technologies, Eggenstein)  
 Percol<sup>®</sup> (Pharmacia, Freiburg)  
 HBSS / 2,5% (v/v) 1 M HEPES  
 Petrischalen für die Zellkultur, Ø 50 mm

#### **Durchführung:**

Die Überstände mit den Epithelzellen wurden bei 400 x g und 4°C 15 min zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden im RPMI-Medium aufgenommen und die Konzentration auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Um Verunreinigungen wie Zellklumpen und Zelltrümmer zu entfernen, wurden 20 ml eines 40%igen Percoll-Gradienten mit HBSS / 2,5% HEPES-Puffer bereitet und vorsichtig mit 20 ml der Zellsuspension überschichtet. Die Zentrifugation fand bei 800 x g für 30 min und bei 4°C ohne Bremse statt. Die Interphase mit den Zellen wurde abgenommen und die Zellen 2x in PBS gewaschen. Nach der mikroskopischen Zellpopulationskontrolle (s. 3.9.4.), der Zellzahlbestimmung (s. 3.9.1.) und der Vitalitätsüberprüfung (s. 3.9.2.) wurden die zu 95% vitalen Zellen im RPMI-Wachstumsmedium in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml in einer Petrischale kultiviert.

### **3.9. Überprüfung von Zellpopulationen**

#### **3.9.1. Zellzahlbestimmung mit elektronischem Zellzählgerät**

Die für die Messung in einer Elektrolyt-Lösung suspendierten Zellen werden durch eine Kapillare definierten Durchmessers gesaugt. Beim Durchtritt durch die Kapillare, an der über zwei Elektroden eine Spannung anliegt, verdrängen die Zellen die Menge an Elektrolyt-Lösung, die ihrem Volumen entspricht. Dabei wird der elektrische Widerstand verändert, da intakte Zellen isolierend wirken. Dieses Meßsignal wird in hoher Frequenz erfaßt und dessen Amplitude und Signalverlauf analysiert. Aus den Einzelmessungen wird das Integral der Meßsignale berechnet. Diese Pulsflächenanalyse in Kombination mit der Widerstandsmessung macht es möglich, Zellzahl und Zellgrößen zu ermitteln.

**Material:** Zellsuspension  
 isotone Meßlösung CASYton<sup>®</sup>  
 (Schärfe Systeme, Reutlingen)  
 Proberöhrchen (Schärfe Systeme, Reutlingen)  
 elektronisches Zellzählgerät CASY 1<sup>®</sup>  
 (Schärfe Systeme, Reutlingen)

Durchführung:

Die Zellsuspension wurde 1:100 mit CASYton® (4°C) im Proberöhrchen verdünnt und vorsichtig gemischt. Die Meßkapillare wurde in die verdünnte Suspension getaucht und der Meßvorgang gestartet. Anhand des Zellgrößenprofils der in der Suspension enthaltenen Zellen wurde der Meßbereich eingestellt:

- Lymphozyten: 5,5 bis 8 µm
- Monozyten : 8 bis 12 µm
- Epithelzellen: 6 bis 16 µm

Die Anzahl der Zellen (n/ml) wurde gemessen.

**3.9.2. Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung mit Trypanblau**

Trypanblau diffundiert durch die geschädigte Zellmembran absterbender oder toter Zellen und färbt das Zytoplasma gleichmäßig blau, während vitale Zellen keine Veränderung zeigen.

Material: Zellsuspension  
Trypanblau-Lösung, 0,1% (w/v) in PBS, pH7,4  
Neubauer-Zählkammer (Omnilab, Hannover)

Durchführung:

Eine 1:5 Verdünnung der Zellsuspension mit der Trypanblau-Lösung wurde im Doppelansatz in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der prozentuale Anteil der toten Zellen von den Gesamtzellen berechnet.

**3.9.3. Zellvitalitätsbestimmung mit Propidiumiodid**

Propidiumiodid dringt in die Zellmembran toter Zellen ein, so daß diese in der FACS-Analyse bestimmt werden können. Diese Methode wird zur Überprüfung der Vitalität von Zellen in einem FACS-Ansatz eingesetzt.

Material: Zellsuspension  
Propidiumiodid (1%)  
FACScan (Becton Dickinson)

Durchführung: Propidiumiodid wurde in einer 1:10 Verdünnung zur Zellsuspension hinzugegeben und in einem FACScan gemessen. Es wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet.

**3.9.4. Mikroskopische Populationskontrolle**

Die mikroskopische Kontrolle der isolierten Zellen erfolgt, nachdem sie über eine Zytozentrifugation auf einen Objektträger transferiert und mit Hilfe der Diff-Quik®-Schnellfärbemethode angefärbt worden sind. Die Ergebnisse sind mit denen der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald) vergleichbar.

Material:

- Zellsuspension
- Beschichtete Objektträger
- Cytoklip™ Objektträgerhalter (Shandon, Japan)
- Cytofunnel™ Probenkammer (Shandon, Japan)
- Cytospin-Zentrifuge (Heraeus, Göttingen)
- Dade Diff-Quik®-Färbetest (Baxter, Düringen, CH)
  - a) Fixierlösung: Fast Green in Methanol
  - b) Eosin G in Phosphatpuffer (pH 6,6) 1,22g /l
  - c) Thiazin-Farbstoff Phosphatpuffer (pH 6,6) 1,1g /l in Färbeküvetten

Durchführung:

$1 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ l wurden in die Probenkammer pipetiert und zusammen mit einem beschichteten Objektträger in dem Objektträgerhalter fixiert. Die Zentrifugation lief bei 200 x g, 10 min. Nachdem die Probenkammer und der Objektträgerhalter vorsichtig entfernt worden waren, erfolgte eine 5 min Lufttrocknung der auf eine kreisförmige Stelle mit einem Durchmesser von 0,5 mm transferierten Zellen. Danach wurden die Zellen fixiert, indem der Objektträger 10 x 1 Sekunde in die Fixierlösung eingetaucht und zwischendurch kurz abgetropft wurde. Nach kurzem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Vorgehen mit Eosin G und nach erneuter Spülung mit ddH<sub>2</sub>O mit Thiazin-Farbstoff wiederholt. Die Objektträger wurden nochmals mit ddH<sub>2</sub>O gespült und an der Luft getrocknet. Die Zelldifferenzierung konnte direkt, oder nachdem das Probenmaterial mit einem Deckgläschen bedeckt worden war, vorgenommen werden.

### 3.10. Kultivierung von verwendeten Zellen bzw. Zelllinien

#### 3.10.1. Kultivierung und Stimulierung der humanen isolierten Zellen

Material:

- RPMI-Wachstumsmedium
- Zellsuspensionen
- Petrischalen, TC, 50 mm  $\varnothing$  (Greiner, Nürtingen)

Durchführung: Alle humanen mononukleären Zellen und Populationen wurden in Zellkulturflaschen und die Epithelzellen in Plastischalen in einem CO<sub>2</sub> - begasbaren Brutschrank bei 90% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zelldichte bei der Aussaat betrug  $1 \times 10^6$  Zellen / ml. Alle drei Tage wurde 1 Volumen frisches Medium hinzugefügt, alle 7 Tage wurden die Zellen geteilt, d.h.: sie wurden bei 200 x g, 4°C ohne Bremse 10 min zentrifugiert und erneut in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  vitalen Zellen / ml im vorgewärmten Medium (37°C) resuspendiert.

Die Zellen wurden mit *H. pylori*-Bakterienlysate (20  $\mu$ g/ml), Oberflächenantigenen von *H. pylori* (10  $\mu$ g/ml) und dem Mitogen Phytohämagglutinin (1  $\mu$ g/ml) als Positivkontrolle kontinuierlich stimuliert. Die Medien wurden jedesmal mit den Stimulantien supplementiert. Negativkontrolle beinhaltete keinen Stimulus. Andere Kontrollen sind im Text erwähnt.

T-Lymphozyten wurden immer in Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen (deaktivierte B-Zellen oder deaktivierte Monozyten aus peripherem Blut des T-Zell-donors) kultiviert.

### 3.10.2. Kultivierung und Stimulation von KATO III-Zellen

Es handelt sich um humane gastrische Karzinomzellen.

Material: KATO III-Zellen ATCC HTB 103  
Medium (s. 2.1.2.)  
Trypsin-EDTA-Lösung (s. 2.1.2.)  
rhTNF $\alpha$  (PBH, Hannover)

Durchführung: Von einer dicht gewachsenen KATO III-Kultur wurden die adhärennten Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung durch eine Inkubation von 5 min bei 37°C abgelöst und in 10 ml Medium 2 Mal gewaschen (Zentrifugation: 200 x g, 10 min). Das Zellpellet wurde in einer Konzentration von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml im Medium resuspendiert und kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Stimulation der Zellen wurde mit 10 ng / ml rhTNF $\alpha$  bzw. mit 75  $\mu$ g / ml *H. pylori*-Oberflächenantigen vorgenommen.

### 3.11. Identifizierung von Zellen anhand der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

(SCHLOSSMANN ET AL, 1995, BONNER ET AL., 1972)

Zellen des Immunsystems lassen sich durch die Expression von Zelloberflächenmolekülen (Oberflächenmarker) voneinander unterscheiden, die in der international standardisierten CD-Nomenklatur („Differenzierungscluster“) zusammengefaßt sind. Zahlreiche funktionelle Subpopulationen können durch spezifische Antikörper differenziert und charakterisiert werden. In der Durchflußzytometrie können gleichzeitig fünf verschiedene Parameter erfaßt werden: relative Zellgröße, Granularität der Zelle und drei verschiedene Fluoreszenzintensitäten.

#### 3.11.1. Färbung der Zellen für die FACS-Analyse

Material: Zellsuspension  
PBS, pH 7,4 (4°C)  
Sättigungspuffer (4°C) (s. 2.7.1.)  
Färbepuffer (4°C) (s. 2.7.1.)  
Lagerungspuffer (4°C) (s. 2.7.)  
Monoklonale Antikörper (s.u.) von  
DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim  
Pharmingen, San Diego, USA  
Becton Dickenson, Heidelberg  
FACS-Röhrchen: Falcon Polystyrol-Reagenzglas  
(Becton Dickinson, Heidelberg)



**Durchführung:** Von der zu messenden Suspension stimulierter und nicht stimulierter Zellen (s. 3.10.1.) wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS aufgefüllt und bei 250 x g und 4°C für 5 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Zellpellet in 100 µl der Sättigungslösung resuspendiert und 10 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (s.o.) und Resuspension der Zellen in 100 µl Färbepuffer wurden 10 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper dazugegeben und 30 min bei 4°C im Dunkeln auf den Zellen belassen. Die verwendeten Antikörper hatten folgende Spezifität:

Spezifität	Zelluläre Zuordnung
IgG <sub>1</sub> FITC / IgG <sub>2a</sub> R-PE	Isotypkontrolle (Negativkontrolle)
CD45 FITC / CD14 R-PE	Identifizierung von Leukozyten/ Monozyten
CD3 FITC / CD19 R-PE	T-Lymphozyten und B-Lymphozyten
CD3 FITC / CD8 R-PE	T-Lymphozyten und CD8+ T-Zellen (Zytotoxische und Suppressorzellen)
CD3 FITC / CD4 R-PE	T-Lymphozyten und CD4+ T-Zellen
CD4 FITC	CD4+ T-Zellen
CD8 FITC	CD8+ T-Zellen
HLA-DR,DP,DQ FITC	MHC-Klasse II - Rezeptoren
HLA-A,B,C	MHC-Klasse I - Rezeptoren
CD15 FITC	Monozyten
CD16 FITC	Makrophagen

Anschließend wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS in 250 µl Lagerungspuffer aufgenommen, wo sie fixiert wurden und bis zur Messung bei 4°C gelagert werden konnten (bis 7 Tage).

Folgende Kontrollen wurden durchgeführt:

Eine Isotypkontrolle wurde mit den gleichen Subklassen der verwendeten Antikörper gemacht, um die unspezifische Antikörperbindung, die überwiegend durch die Bindung an Fc-Rezeptoren hervorgerufen wird, abschätzen zu können. Eine Negativkontrolle wurde mit nicht markierten Zellen durchgeführt, um die Autofluoreszenz der Zellen detektieren zu können. Diese Kontrolle diente zur Definition der Lage der positiven und negativen Zellen. Als Positivkontrolle diente das pan-Leukozyten-Antigen CD45 in der Doppelmarkierung mit dem Monozytenantigen CD14, deren Einsatz die Reinheits- und Vollständigkeitskontrolle sowie die Abgrenzung zu Monozyten erleichterte.

### 3.11.2. Detektion intrazellulärer Zytokine mittels Durchflußzytometrie

(PRUSSIN ET AL., 1995; JUNG ET AL., 1993; SANDER ET AL., 1991)

Monoklonale, fluoreszenzmarkierte Antikörper ermöglichen den Nachweis der Zytokinproduktion und die Bestimmung ihrer Frequenz auf Einzelzellebene mit deren phänotypischer Charakterisierung in einer heterogenen Zellpopulation. Hierzu muß die Zellmembran für den Eintritt des Antikörpers permeabilisiert werden. Das nach einer Stimulation produzierte Zytokin wird außerdem durch den

Einsatz des Ionophors Monensin intrazellulär aufgrund der verursachten Störung des Proteintransports im Golgi-Apparat akkumuliert (TARTAKOFF, 1983). Da die de novo Synthese nicht beeinflusst wird, führt dies zu einer Erhöhung der Quantität des intrazellulären Zytokins und somit des zu detektierenden Signals.

**Material:** stimulierte und nicht stimulierte Zellsuspension  
 PBS, pH 7,4 (4°C)  
 Monensin-Stock-Lösung (300 µM) in PBS, pH 7,4  
 Färbepuffer (4°C) (s. 2.7.2.)  
 Fixierungspuffer (4°C) (s. 2.7.2.)  
 Permeabilisierungspuffer (4°C) (s. 2.7.2.)  
 Lagerungspuffer (4°C) (s. 2.7.)  
 Antikörper für die Zytokinmarkierung  
 (Pharmingen, San Diego, USA)  
 Antikörper für die Oberflächenmarkierung (s. 3.11.1.)  
 FACS-Röhrchen: Falcon Polystyrol-Reagenzglas  
 (Becton Dickinson, Heidelberg)

**Durchführung:** Die zu untersuchenden Zellen wurden wie unter 3.10.1. beschrieben kultiviert und stimuliert. 6 Stunden vor der Ernte der Zellen wurden diese restimuliert und mit 3 µM Monensin behandelt.  $1 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz wurden abgenommen und wie folgt für die FACS-Analyse gefärbt:

Zunächst wurde eine phänotypische Markierung wie unter 3.11.1. beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen nicht in Lagerungspuffer aufgenommen, sondern mit 2 ml Färbepuffer gewaschen und bei 250 x g, 5 min bei 4°C ohne Bremse pelletiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Fixierungspuffer resuspendiert und die Zellen 20 min bei 4°C im Dunkeln fixiert. Nach einer folgenden Waschung mit 1 ml Färbepuffer wurden die Zellen in 50 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und zusammen mit dem Zytokin-spezifischen Antikörper 30 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Die Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen benutzt:

IgG <sub>1</sub> FITC / IgG <sub>2a</sub> R-PE	10 µl / $10^5$ Zellen (Isotypkontrolle)
CD45 FITC / CD14 R-PE	10 µl / $10^5$ Zellen (Positivkontrolle)
CD4 FITC	10 µl / $10^5$ Zellen
CD8 FITC	10 µl / $10^5$ Zellen
HLA-DR,DP,DQ FITC	10 µl / $10^5$ Zellen
HLA-A,B,C FITC	10 µl / $10^5$ Zellen
CD15 FITC	10 µl / $10^5$ Zellen
CD16 FITC	10 µl / $10^5$ Zellen
α IL4 R-PE (spezifisch für T <sub>H2</sub> )	0,1 µg / $1 \times 10^5$ Zellen
α IL10 R-PE (spezifisch für T <sub>H2</sub> )	0,25 µg / $1 \times 10^5$ Zellen
α IL12 R-PE (spezifisch für T <sub>H1</sub> )	0,125 µg / $1 \times 10^5$ Zellen
α IFNγ R-PE (spezifisch für T <sub>H1</sub> )	0,25 µg / $1 \times 10^5$ Zellen

Die Lymphozytenoberflächenmarker und MHC-Klassenmarker wurden jeweils mit αIL4, αIL10 und αIFNγ kombiniert, während die Monozyten- / Makrophagen-

antikörper sowie die Epithelzellen in Kombination mit  $\alpha$  IL12 gefärbt wurden. Die Epithelzellen wurden zusätzlich mit MHC-Klassen-Markern inkubiert.

Der Antikörperinkubation folgte ein Waschschrift mit 1 ml Permeabilisierungspuffer und die Resuspension der pelletierten Zellen in 250  $\mu$ l Lagerungspuffer. Bei 4°C konnte die Suspension lichtgeschützt bis zur Messung (maximal 7 Tage) gelagert werden.

Zusätzlich zu den Kontrollen, die im Kapitel 3.11.1. aufgeführt sind, wurden folgende Positivkontrollen der Zytokinproduktion an peripheren mononukleären Zellen (PBMC) (s. 3.6.1.) durchgeführt:

Produktion von IL4: Stimulation mit 20 ng/ml PHA, 1  $\mu$ M Kalziumionophor und 10 ng/ml PHA mit Zusatz von von 3  $\mu$ M Monensin für 6 Stunden

Produktion von IL10: Stimulation mit 10 ng/ml LPS für 6 mit Zusatz von 3  $\mu$ M Monensin

Produktion von IL12: Stimulation mit 10 ng/ml rhIFN $\gamma$  für 2 h und Restimulation mit 10 ng/ml rhIFN $\gamma$  und 100 ng/ml LPS für weitere 10 Stunden mit Zusatz von 3  $\mu$ M Monensin.

Produktion von IFN $\gamma$ : Stimulation mit 20 ng/ml PHA, 10 ng/ml PHA und 1  $\mu$ M Kalziumionophor für 6 Stunden mit Zusatz von 3  $\mu$ M Monensin.

Die Präinkubation der fixierten / permeabilisierten Zellen mit einem Überschuß an unkonjugiertem Antikörper gleichen Klons und die daraus resultierende Blockade der Bindungsstellen für denselben nachfolgenden R-PE-markierten Antikörper stellte eine Negativkontrolle dar. Außerdem wurde ein Ansatz der fixierten / permeabilisierten Zellen mit der IgG $_1$  FITC / IgG $_{2a}$  R-PE - Isotypkontrolle inkubiert.

### 3.11.3. Messung und Auswertung

Material und Geräte: Becton Dickinson FACScan, Bauserie 12 / 89  
(Becton Dickinson, Heidelberg)  
isotonischer Puffer (Becton Dickinson, Heidelberg)  
Software zum Auswerten der Meßdaten (s. 2.12.)

Einstellung des Gerätes: Bei den Messungen wurden die Signale für die Vorwärts- (FSC) und Rechtwinkelstreuung (SSC), Maß für die Zellgröße bzw. Granularität der Zelle, linear und die Fluoreszenzsignale logarithmisch verstärkt. Der Schwellenwert (Threshold), mit dem man Rausch- und Störsignale abgrenzt, betrug 150. Die Kompensationen FL1 (FITC) -% FL2 (R-PE) bzw. FL2 -% FL1 wurden auf 1,8% bzw. auf 24% eingestellt, so daß die Fluoreszenzkanäle ohne Störung die zugehörige Wellenlänge messen konnten.

Messung: Gemessen wurde in dem anhand des FSC / SSC - Profils für mononukleäre Zellen bzw. für Epithelzellen definierten Meßfenster (Live-Gate),

das die markierten Zellen von Aggregaten, Zelltrümmern, toten Zellen und nicht erwünschten Zellpopulationen trennt.

Um den optimalen Meßbereich der Zellen zu erreichen, wurden 10.000 Ereignisse der Negativkontrolle und der Isotypkontrolle gemessen und die Detektion der Fluoreszenz so eingestellt, daß > 95% der Ereignisse in der ersten Dekade des Fensters zu liegen kamen. Die Bandbreite der detektierten Fluoreszenz betrug 565 - 650 nm.

In dem definierten Meßfenster wurden für jede Probe 5000 Ereignisse aufgenommen. Die Messung wurde drei Mal wiederholt und die Messergebnisse gemittelt.

Auswertung: Zur Auswertung wurden Microsoft: WinMDI und PC-LYSIS™ 1,0 benutzt. Nach der Definition der Lymphozytenpopulation bzw. der Monozytenpopulation über die Parameter FSC / SSC, CD45 / SSC, CD14 / SSC wurde die Isotypkontrolle evaluiert: Über die Projektion FL1 / FL2 wurde der Bereich der Zellen festgelegt, deren Fluoreszenzsignal als nicht spezifisch anzusehen war (Quadrant III, erste Dekade). Bei der intrazellulären FACS-Analyse wurde zusätzlich die Negativkontrolle des verwendeten Antikörpers auf die gleiche Weise berücksichtigt. Die Zellkluster der übrigen Quadranten zeigten ein spezifisches Signal und konnten somit einer Subpopulation zugeordnet werden. Die statistische Auswertung basierte auf Häufigkeitshistogramm- und korrelierten Zweiparameterdarstellungen (Punkthistogrammen).

### **3.12. Enzymgekoppelter Immunoassay (EIA) zur quantitativen IL8 Bestimmung**

(OELLERICH, 1984)

Ein in Überschuß vorhandener monoklonaler hIL8-Antikörper, der an die Probenvertiefungen einer Mikrotiterplatte gebunden ist, bindet die gesamte im Zellkulturüberstand vorliegende IL8-Menge. Ungebundenes Protein wird herausgewaschen. Ein mit Meerrettichperoxidase konjugierter polyklonaler  $\alpha$ IL8-Antikörper bindet an weitere Determinanten des IL8-Peptids (Sandwichkomplex). Die IL8-Konzentration der Probe, die proportional zur gebundenen enzymatischen Aktivität im Probenansatz ist, wird durch Umsetzung des Chromogens Tetramethylenbenzidin und anschließender Absorptionsmessung anhand einer Standardreihe bestimmt.

Material: Monozytenkulturüberstand  
 „Quantikine“ Interleukin-8  
 (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim) beinhaltet:  
 a) mit murinem monoklonalem  $\alpha$ IL8-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte  
 b) polyklonaler Peroxidase-konjugierter  $\alpha$ IL8-Ak  
 c) IL8-Standard (6 ng / ml)  
 d) Diluent für Zellkulturüberstände  
 e) Assay Diluent  
 f) Waschpufferkonzentrat  
 g) Farbreagenz A (Wasserstoffperoxid)  
 h) Farbreagenz B (Chromogenlösung)  
 i) Schwefelsäure, 2 N  
 ELISA-Reader Titertek Multiskan<sup>®</sup>MCC 1340  
 (Labserv, Finnland)

Durchführung: Elutrierte Monozyten / Makrophagen (s. 3.7.2.) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml wurden mit 20  $\mu$ g/ml *H. pylori*-Oberflächenantigen (s. 3.4.2.), mit 10  $\mu$ g/ml LPS und ohne Stimulus 24 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden bei 500 x g 15 min pelletiert und der Überstand bezüglich IL8 im ELISA untersucht. Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:20 und unverdünnt eingesetzt.

Eine IL8-Standardverdünnungsreihe wurde in dem Diluent für Zellkulturüberstände erstellt, indem die Ausgangskonzentration von 3000 pg/ml 7 Mal 1:2 bis zu einer Konzentration von 46,9 pg/ml verdünnt wurde. Das Waschpufferkonzentrat wurde 1:25 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

In die mit Antikörper versehenen Probenvertiefungen wurden 100  $\mu$ l des Assay Diluent pipettiert und jeweils 100  $\mu$ l des Standards und der zu untersuchenden Probe im Doppelansatz dazugegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei RT. Anschließend wurden die Vertiefungen gründlich abgesaugt, 3x mit ca. 350  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und mit 200  $\mu$ l polyklonalem Peroxidase-konjugiertem  $\alpha$ IL8-Ak aufgefüllt. Nach zweistündiger Inkubation bei RT, wurden die Waschschrte wiederholt. Die Farbreaktion fand während einer 20 min Inkubation mit 200  $\mu$ l der vorbereiteten Substratlösung (Farbreagenz A und B in gleichen Volumina) statt und wurde dann mit 50  $\mu$ l Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm mit 540 nm Referenz und die Bestimmung der IL8-Konzentration wurde anhand der Eichkurve der Standardverdünnungsreihe in pg/ml vorgenommen.

### 3.13. Etablierung von *Helicobacter pylori* spezifischen T-Lymphozyten-Klonen aus dem Magengewebe

Um die Pathogenese einer chronischen organspezifischen Infektion besser zu verstehen, ist es wichtig, außer der Pathogenität des Bakteriums auch Phänotyp und Funktion der lokalen Lymphozyten zu untersuchen. Durch die Klonierung von diesen immunrelevanten Zellen kann man deren Spezifität und Funktion

bestimmen und somit Rückschlüsse auf die Immunantwort des Wirts und die Immunogenität des Pathogens ziehen.

### 3.13.1. Klonierung antigenspezifischer T-Lymphozyten aus der Lamina propria des humanen Magens

(DI TOMMASO ET AL., 1995; COLIGAN ET AL., 1991; DE MAGISTRIS ET AL., 1988)

Um antigenspezifische T-Zellklone zu erhalten, müssen diese zusammen mit antigenpräsentierenden Zellen kultiviert werden, da sie Fremdstoffe nur in Kombination mit körpereigenen MHC-Molekülen erkennen. Periphere Blutmonozyten gehören zu diesen Immunzellen. Sie können die Fremdstoffe durch Phagozytose aufnehmen und diese nach Antigenprozessierung an der Zelloberfläche mit den MHC-Molekülen den T-Lymphozyten präsentieren. Zusätzlich ist es notwendig, das Zytokin IL2 hinzuzufügen, das als Wachstumsfaktor von den T-Lymphozyten gebraucht wird (MORGAN ET AL., 1976).

Die Etablierung von T-Zellklonen kann man in vier Schritte unterteilen:

- 1.) Aktivierung
- 2.) Expandierung
- 3.) Klonierung
- 4.) Expandierung der T-Zell-Klone

**Material:** T-Zellsuspension aus der Lamina propria (s. 3.6.2.)  
 Suspension mit Antigenpräsentierenden Zellen (s. 3.13.2. und 3.13.3.)  
 RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)  
 2000 U/ml rIL2 (R & D Systems, Wiesbaden)  
*H. pylori* - Antigenpräparation (s. 3.4.1.)  
 Phytohemagglutinin (PHA, 100 µg/ml)  
 24-well-Flachbodenplatten, TC (Greiner, Nürtingen)  
 96-well-Flachbodenplatten, TC (Greiner, Nürtingen)  
 Terasaki-Platten

#### Durchführung:

1.)  $1,5 \times 10^4$  aufgereinigte T-Lymphozyten aus der Lamina propria (s. 3.6.2.) wurden mit  $5 \times 10^5$  autologen Monozyten (PBMC), die als antigenpräsentierende Zellen und als Feeder-Zellen fungierten (s. 3.13.2.), in 1 ml RPMI-Wachstumsmedium in einer 24-well-Flachbodenplatte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Es wurden jeweils 2 Ansätze in Anwesenheit von 20 µg/ml *H. pylori* - Antigen, 1 µg/ml PHA und ohne Stimulus angesetzt.

2.) Nach 48 Stunden wurden die Kulturen mit 50 U/ml rIL2 supplementiert. Die Kultivierung wurde 15 Tage lang fortgesetzt, wobei alle 3-4 Tage die Versorgung mit rIL2 stattfand und alle 6-7 Tage mit dem Antigen bzw. mit dem Mitogen nachstimuliert wurde.

3.) Die Klonierung erfolgte mittels „Limiting dilution“: Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $5 \times 10^1$  Zellen / ml RPMI-Wachstumsmedium verdünnt, so daß daraus eine Klonierungsverdünnung von 1 Zelle / Vertiefung resultierte. Die T-

Lymphozyten wurden zusammen mit allogenen autologen Blutmonozyten (s. 3.13.2.) in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  PBMC / ml, 1  $\mu\text{g/ml}$  PHA und 100 U/ml rIL2 in 20  $\mu\text{l}$ -Kulturen in Terasaki-Platten ausgesät und 10 bis 14 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

4.) Die gewachsenen einzelnen T-Lymphozytenklone, die durch eine dreidimensionale Sprossung innerhalb des Monozytenrasens zu erkennen waren, wurden hinsichtlich Ihrer Proliferationsantwort bezüglich *H. pylori* überprüft. Sie wurden zusammen mit  $3 \times 10^4$  EBV-transformierten B-Zellen (s. 3.13.3.) des gleichen T-Zell-donors in 200  $\mu\text{l}$  RPMI-Wachstumsmedium mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Antigen in 96-well-Platten angezüchtet und ihre Zellzahl nach 7 Tagen (s. 3.9.1.) bestimmt. Die responsiven (antigenspezifischen) Klone wurden in Kultur gehalten. Sie wurden bei regelmäßiger Restimulation (alle 7 Tage) und in Anwesenheit von  $1,5 \times 10^5$  EBV-B-Zellen / ml Kulturmedium expandiert. Aliquots wurden kryokonserviert (s. 3.14.).

### 3.13.2. Herstellung antigenpräsentierender Zellen (Monozyten)

Material: Monozytensuspension (s. 3.6.1.)  
Mitomycin C (2 mg / ml PBS)  
PBS, pH 7,4  
RPMI-Wachstumsmedium ( s. 2.1.2.)

Durchführung: Monozyten / Makrophagen wurden aus peripherem Blut über Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt (s. 3.6.1.) und über Adhäsion angereichert (s. 3.7.1.). Sie wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml RPMI-Medium eingestellt und zur Deaktivierung mit 25  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin C versetzt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in RPMI-Wachstumsmedium in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml aufgenommen. Sie wurden entweder der T-Zell-Kultur zugesetzt oder zur Konservierung eingefroren (s. 3.14.).

### 3.13.3. Herstellung antigenpräsentierender Zellen (EBV-transformierte B-Lymphozyten)

(DE MAGISTRIS ET AL., 1988; LANZAVECCHIA, 1985; AMAN ET AL., 1984)

Immortalisierte - mit Epstein-Barr-Virus transformierte - B-Zellen stellen eine unerschöpfliche Quelle an antigenpräsentierenden Zellen dar. Die EBV-Transformation ist die einzige Möglichkeit, langzeitliche humane B-Zelllinien zu etablieren. Da T-Zellen diesen Prozeß hemmen können (RICKINSON ET AL., 1979) werden diese entfernt und die verbliebenen T-Zellen mit Cyclosporin A funktionell deaktiviert (EMMEL ET AL., 1989; TOSATO ET AL., 1982).

**Material:** Monozytensuspension  
 RPMI-Wachstumsmedium (s. 2.1.2.)  
 Cyclosporin A (1 mg/ml 100% Ethanol)  
 Mitomycin C (2 mg/ml PBS)  
 B95-8 Lymphozytenlinie DSM ACC 100 (s. 2.10.)  
 RPMI für B95-8 (s. 2.1.2.)

**Durchführung:** Die gefrorenen B95-8 Zellen wurden wie im Kapitel 3.14. aufgetaut und im Medium in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml aufgenommen. Nach 5 Tagen Kultur bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden sie 1:3 gesplittet und für weitere 3 Tage kultiviert. Die Zellen wurden 10 min bei 300 x g , 4°C zentrifugiert, um den EBV-enhaltenden Überstand zu ernten. Dieser wurde aliquotiert und bei -120°C eingefroren. Die Zellen wurden ebenfalls eingefroren (s. 3.14.) oder weiter kultiviert.

Nachdem periphere mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.6.1.) präpariert worden waren und mit Hilfe der Nylonsäule (s. 3.6.3.) B-Lymphozyten isoliert worden waren, wurden diese im RPMI-Wachstumsmedium in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml aufgenommen.

Die Transformation von  $1 \times 10^7$  B-Zellen fand in 10 ml RPMI für B95-8 mit 30% EBV-enhaltenden Überstand und 600 ng/ml Cyclosporin A während 3 wöchiger Kultur bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Nach makroskopisch und mikroskopisch sichtbarer Transformation wurden die B-Zellen zentrifugiert (10 min bei 300 x g , 4°C) und sowohl in Aliquots eingefroren (s. 3.14.) als auch weiter kultiviert. Zur Expansion wurden sie im Medium in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml resuspendiert und alle 3 Tage 1:3 verdünnt. Vor dem Einsatz als antigenpräsentierende Zellen wurden sie wie in 3.13.2. mit Mitomycin C funktionell deaktiviert.

### **3.14. Kryokonservierung von Zellen**

**Material:** Zellsuspension  
 PBS, pH 7,4  
 Einfriermedium (s. 2.1.2.)  
 Kulturmedium

#### **Durchführung:**

##### **Einfrieren der Zellen:**

Die mit PBS gewaschenen Zellen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten) wurden in kaltem Einfriermedium in einer Zelldichte von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen / ml in 1 ml Portionen über Nacht langsam bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

##### **Auftauen der Zellen:**

Die Zellen wurden möglichst schnell in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort zu 10 ml Kulturmedium (RT) gegeben. Durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 250 x g ohne Bremse wurden die Zellen pelletiert, mit Medium gewaschen und in 5 ml auf 37°C vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen und bebrütet.



### 3.15. Isolierung der mRNA

#### 3.15.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen

(CHOMCZYNSKI ET AL., 1986)

Totale nicht degradierte RNA wird mittels einer Kombination aus Guanidin-thiocyanat-Denaturierung (GTC) und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. GTC denaturiert Proteine, d.h.: Es schließt Zellen auf und inaktiviert Ribonukleasen. Die Phenol-Chloroform-Extraktion trennt die nukleinsäurehaltige Lösung von Proteinen, die durch Phenol denaturiert werden und im Grenzbereich zwischen organischer und wäßriger Phase ausfallen. Die Präzipitation der Ribonukleinsäure erfolgt im Isopropanol in Gegenwart von Natriumazetat.

Material, Geräte:

- Zellmaterial (KATO III-Zellen)
- GTC-Puffer (s. 2.3.1.)
- Chloroform / Isoamylalkohol (49:1, v/v)
- Phenol
- Isopropanol
- Natriumazetatlösung, 3 M (pH 4)
- Ethanol, 70% (v/v)
- DEPC-Wasser (s. 2.2.)
- PBS, pH 7,4 (Life Technologies, Eggenstein)
- Zellschaber (Nunc, Wiesbaden-Biebrich)
- Speedvac<sup>®</sup> (Savant, New York, USA)

Durchführung: Die gewachsenen stimulierten und nicht stimulierten adhärennten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Wand der Zellkulturflasche abgelöst und mit PBS 2 mal gewaschen (200 x g, 10 min, 4°C). Die bei 500 x g pelletierten Zellen (maximal  $2 \times 10^7$ ) wurden mit 2 ml GTC-Puffer unter Vortexen aufgeschlossen. Die Suspension wurde zum Scheren der DNA mehrmals durch eine Kanüle gezogen. Nacheinander wurden 200 µl Natriumazetatlösung, 2 ml Phenol und 400 µl Chloroform / Isoamylalkohol zugegeben, wobei nach jeder Substanz die Suspension gemischt wurde. Nach Zugabe der letzten Substanz wurde der Ansatz 10 s gevortext und 15 min bei 4°C inkubiert. Die anschließende Zentrifugation zur Trennung der Phasen erfolgte bei 10.000 x g, 4°C für 20 min. Die RNA, die sich in der oberen wäßrigen Phase befand, wurde nach Zugabe von 2 ml Isopropanol bei -20°C über Nacht präzipitiert und durch Zentrifugation bei 10.000 x g, 4°C für 20 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 µl GTC-Puffer resuspendiert, in ein Reagiergefäß überführt und die RNA mit 1 Volumen Isopropanol 3 Stunden bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation wurde das RNA-Sediment 2 mal in 70%igem Alkohol (eiskalt) gewaschen (1. Zentrifugation 20 min, 2. Zentrifugation 10 min, 4 °C, 10.000 x g), im Speedvac<sup>®</sup> im Vakuum getrocknet, in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 65°C (5 min) gelöst.

Die Menge der isolierten RNA wurde anhand der Absorption bei 260 nm wie in 3.16. beschrieben bestimmt.

### 3.15.2. Direkte Isolierung der poly A<sup>+</sup>-mRNA

(LARSEN ET AL., 1993; SPURKLAND, 1992)

Nach der Zellyse mit Hilfe des Aufschlußpuffers erfolgt die Isolierung der mRNA über die Dynabeads<sup>®</sup>Oligo (dT)<sub>25</sub>, das sind superparamagnetische, uniforme Polystyren-Kugeln, unmittelbar aus dem Rohextrakt. Für das Isolationsprinzip macht man sich die Basenpaarungen zwischen dem poly A<sup>+</sup>-Anteil am 3'Ende der meisten eukaryotischen mRNA-Moleküle und der über einen 5'-Linker kovalent an die Dynabeads<sup>®</sup> gebundenen Oligo (dT)<sub>25</sub>-Sequenz zu Nutze.

Material / Geräte: Dynabeads<sup>®</sup>Oligo (dT)<sub>25</sub>, (1 ml Stammlösung = 5 mg)  
(Deutsche Dynal GmbH, Hamburg)  
Lyse-Bindungspuffer (s. 2.3.2.)  
Waschpuffer mit Litiumdodecylsulfat (s. 2.3.2.)  
Waschpuffer (s. 2.3.2.)  
Dynal MPC<sup>®</sup> 9600 - Magnethalterung  
(Deutsche Dynal GmbH, Hamburg)  
PBS, pH 7,4

Durchführung: Aliquots von 10 µl (50 µg) der Dynabeads<sup>®</sup>Oligo (dT)<sub>25</sub> der Stammlösung wurden für die Separation vorbereitet: Nach der Überführung der Aliquots in ein Rnase-freies Reagiergefäß folgte die magnetische Separation im MPC<sup>®</sup>. Nach 30 s wurde der Überstand entfernt und die Magnetpartikel in 100 µl Lyse-Bindungspuffer resuspendiert. Die magnetische Separation erfolgte direkt vor dem Gebrauch.

Die RNA wurde aus gekonnten T-Lymphozyten bzw. aus den aM stimulierten und unstimulierten Monozyten isoliert.  $1,5 \times 10^5$  Zellen wurden in PBS gewaschen und durch Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4 °C) pelletiert. Sie wurden mit 100 µl Lyse-Bindungspuffer aufgeschlossen. Die Suspension wurde bis zur vollständigen Lyse mehrfach durch eine dünne Pipettenspitze gespült. Durch Scheren der freiwerdenden DNA wurde die entstandene Viskosität reduziert und die dadurch bewirkte Aufschäumung mit Hilfe der Zentrifugation (30 s) verringert.

Das Lysat wurde zu den vorbereiteten Dynabeads<sup>®</sup>Oligo (dT)<sub>25</sub> gegeben, und gut gemischt. Die Hybridisierung fand während einer Inkubation für 5 min bei RT statt. Es folgte die magnetische Separation für 3 min, wonach der Überstand entfernt wurde. Die hybridisierten Dynabeads<sup>®</sup>Oligo (dT)<sub>25</sub> wurden 2 mal in 200 µl Waschpuffer mit LiDS und für die enzymatische Nachfolgereaktion einmal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurden die Dynabeads<sup>®</sup> gut suspendiert und der Überstand sorgfältig entfernt.

### 3.16. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

(SAMBROOK ET AL., 1989)

Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, während das der Proteine bei 280 nm liegt. Der Quotient aus den beiden Absorptionswerten, der bei RNA zwischen 1,9 und 2,2 liegen sollte, gibt Aufschluß über den Grad der Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen.

Material / Geräte: DEPC-Wasser (s. 2.2.)  
Quarzküvetten (Pharmacia, Freiburg)  
Photometer Ultrospec III (Pharmacia, Freiburg)

Durchführung: Die Nukleinsäuren (4 µl) wurden in 1 ml DEPC-Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Die Reinheit wurde aus dem Quotienten bestimmt und die Konzentration nach folgender Näherungsformel berechnet:

$$1 \text{ OD}_{260} = 20 \text{ µg RNA / ml}$$

### 3.17. Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

(LEHRACH ET AL., 1977)

Nukleinsäuren wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im Gel bei angelegter Spannung von Kathode zu Anode, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional dem dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts ist (HELLING ET AL., 1974). Durch Zugabe von Ethidiumbromid kann das Bandenmuster sichtbar gemacht werden, da es in die Nukleinsäurehelix interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht eine Fluoreszenz-Strahlung abgibt.

Material / Geräte: isolierte RNA in DEPC-Wasser  
Agarose MBQ  
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml  
Ficoll®-Orange  
37% Formaldehyd MBQ  
Formamid MBQ  
10x Laufpuffer (s. 2.3.1.)  
Formamid-Formaldehyd-(10x) Laufpuffer-Gemisch 2:1:1  
RNA-Leiter (Life Technologies, Eggenstein)  
SSC-Lösung  
Elektrophoresekammer (Roth, Karlsruhe)  
Spannungsgeber (Pharmacia, Freiburg)

Durchführung: Die für ein 1,3%iges (w/v) Agarosegel erforderliche Menge an Agarose wurde in 1x Laufpuffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf 55°C wurden 1,75% Formaldehyd (v/v) und 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen.

Die RNA-Proben (10 µg) wurden in 7,5 µl DEPC-Wasser aufgenommen und mit 15 µl des Formamid-Formaldehyd-Laufpuffer-Gemisches und 2,5 µl Ficoll®-Orange gemischt. Die RNA wurde durch 15 min Inkubation bei 65°C denaturiert, danach sofort 2 min auf Eis gestellt und auf das Agarosegel aufgetragen. Es wurden auch 3 µg des RNA-Markers aufgetragen, die zur späteren Abschätzung der Größe der RNA dienen. Die elektrophoretische Auftrennung lief bei 70 V etwa 2 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 30 min in 10x SSC gewaschen und die RNA unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht.

### 3.18. **Northern Blot**

(ALWINE ET AL., 1977)

Durch wirkende Kapillarkräfte wird die Nukleinsäure aus der Agarose auf eine Nylonmembran transferiert.

**Material:** Agarosegel mit RNA (s. 3.17.)  
Hybond® Nylonmembran (Amersham, Braunschweig)  
20x SSC  
Whatmanpapier (Omnilab, Hannover)  
Papiertücher

**Durchführung:** Auf eine Brücke aus 3 mm-Whatmanpapier (in 20x SSC getränkt), deren Enden in 20x SSC-Puffer eingetaucht waren, wurde das Agarosegel gelegt und mit auf die Größe des Gels zurechtgeschnittener Nylonmembran bedeckt. Diese wurde mit zwei 1 mm Filterpapieren bedeckt und darauf ein 10 cm hoher saugfähiger Papierstapel gelegt. Zur Verstärkung der Sogwirkung wurde der Blot mit einem 500 g-Gewicht beschwert. Nach 16 Stunden Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2x SSC gewaschen und dann getrocknet. Durch 5 min UV-Bestrahlung (254 nm) wurde die RNA kovalent mit der Nylonmembran vernetzt.

### 3.19. **RNA - Hybridisierung mit einer [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP-markierten DNA-Sonde**

(MEVARECH ET AL., 1979; ALWINE ET AL., 1977)

Spezifische Transkripte werden mit Hilfe einer radioaktiv markierten Oligodeoxyribonukleotidsonde detektiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

**Material / Geräte:** Nylonmembran mit vernetzter RNA (s. 3.18.)  
Hybridisierungslösung (s. 2.4.)  
Prähybridisierungslösung (s. 2.4.)  
Oligodeoxyribonukleotidsonde (s. 3. 21. und 3. 22.)  
SSC-Stammlösung (s. 2.2.)  
Waschpuffer (s. 2.4.)  
Filmkassette, X-OMAT (Kodak, GB)  
Röntgenfilm X-Omat AR (Kodak, GB)  
Hybridisierungsofen, Modell HY 400 (Bachofer)

Durchführung: Die Membran wurde 2 min in 2x SSC äquilibriert und vorsichtig in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindungsstellen mit Lachssperma-DNA wurde der RNA-Filter für 2 Stunden in der Prähybridisierungslösung (50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Filter) bei 37°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurde die  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA-Sonde durch 5 min Erhitzen bei 95°C denaturiert, danach sofort in Eiswasser abgekühlt und in die Hybridisierungslösung gegeben (ca.  $10^6$  cpm/ml). Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung eingetauscht. Die Hybridisierung erfolgte 20 Stunden bei 41°C im Hybridisierungssofen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden wurde die Membran 3 x 10 min in 6x SSC bei RT und 3 x 15 min in Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Auf die in Haushaltsfolie eingewickelte Membran wurde ein Röntgenfilm gelegt und die Autoradiographie in der Filmkassette für 6 Tage bei -70°C durchgeführt.

### 3.20. Markierung der Oligodeoxyribonucleinsäuren mit $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP bzw. $[\gamma^{35}\text{S}]$ ATP am 5'OH DNA-Ende

(AGARWAL ET AL., 1981; CHACONAS ET AL., 1980)

Die T4 Polynukleotidkinase katalysiert den Transfer des terminalen  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -Phosphats oder  $[\gamma^{35}\text{S}]$ -Sulfats vom ATP an den 5'-Hydroxyl Terminus von Polynukleotiden.

Material:

- hIL8 und hTNF $\alpha$  Designer probes (s. 2.9.2.)
- (R & D Systems, Abingdon, GB)
- T4 Polynukleotidkinase (Promega, Madison, USA)
- T4 Polynukleotidkinase (Clontech, Palo Alto, USA)
- 10x Kinase-Puffer (s. 2.6.)
- $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP, 10  $\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$  (Amersham, Braunschweig)
- $[\gamma^{35}\text{S}]$  ATP, 10  $\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$  (ICN, Irvine, USA)
- DEPC-Wasser
- 0,5 M EDTA, pH 8,0

Durchführung: 70 ng (7 pmol 5'Enden) Oligonukleotid wurden in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  zusammen mit 100  $\mu\text{Ci}$   $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP oder  $[\gamma^{35}\text{S}]$  ATP und 20 U T4 Polynukleotidkinase (Promega) oder 4 U T4 Polynukleotidkinase (Clontech) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Pufferbedingungen wurden mit einem 10x Kinasepuffer eingestellt.

### 3.21. Aufreinigung markierter Oligonukleotide von ungebundenen Isotopen

Diese Säulenchromatographie macht es möglich, markierte Ribonucleinsäuren im Größenbereich von 17 bp - 50.000 bp von nicht inkorporierten Radionucleotiden in einem Volumen von 140  $\mu\text{l}$  zu separieren.

Material / Geräte: Reaktionsansatz zur Nukleinsäuremarkierung (s. 3.20.)  
 Nuc Trap<sup>®</sup>-Reinigungssäulen mit Spritze  
 (Stratagene, Heidelberg)  
 Filterpapier (Schleicher und Schuell, Dassel)  
 1x STE-Puffer (s. 2.6.)  
 Szintilationsmeßbecher (Beckmann, München)  
 Szintilationsmeßgerät (Beckmann, München)

Durchführung: Die Säule wurde mit 70 µl STE - Puffer äquilibriert. Das Probenmaterial wurde auf 70 µl mit STE-Puffer aufgefüllt, auf die Säule pipetiert und in das Säulenmaterial gedrückt. Die an der unteren Öffnung der Säule heraustretende Flüssigkeit wurde aufgefangen und verworfen. Die Eluation der Nukleinsäuren erfolgte 2 mal mit 70 µl STE-Puffer. Die beiden Eluate wurden vereinigt und im Szintilator gemessen: 1 µl der eluierten Probe wurde auf ein Stück Filterpapier aufgetropft, luftgetrocknet, in einem Szintilationsbecher mit 5 ml Szintilationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität gemessen.

### **3.22. Quantifizierung von mRNA Expression mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

(DOI ET AL., 1994; PLUSCHKE ET AL., 1994)

Die RT-PCR kombiniert den Prozeß der reversen Transkription (RT) mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ermöglicht somit die Amplifikation von spezifischen RNA-Molekülen. Die hohe Sensitivität der RT-PCR macht die Detektion kleinster Mengen von mRNA möglich.

#### **3.22.1. Konstruktion einer immobilisierten cDNA-Bank für multiple RT-PCR Amplifikationen**

(LAMBERT ET AL., 1993; LEE ET AL., 1992)

Dynabeads<sup>®</sup> Oligo (dT)<sub>25</sub> ermöglichen die Synthese von Festphasen cDNA Bibliotheken für spezifische Zellen. Die Oligo (dT)-Sequenz an den Dynabeads<sup>®</sup> dient dabei nicht nur für die Bindung der poly(A)<sup>+</sup>-mRNA sondern fungiert gleichzeitig als Primer für die Synthese der Erststrang-cDNA durch Reverse Transkriptase. Diese Erststrang-cDNA ist kovalent an die Oberfläche gebunden und kann für die gewünschten Applikationen wiederverwendet werden.

Material: AMV Reverse Transkriptase (Pharmacia, Freiburg)  
 dNTP Set, 100 mM Lösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia, Freiburg)  
 RNAsin (Pharmacia, Freiburg)  
 TE-Puffer (s. 2. 3.)  
 Dynal MPC<sup>®</sup> 9600 - Magnethalterung  
 Thermomixer (Eppendorf, Hamburg)

RT-Mix, ein Ansatz:

<b>Reagenzien</b>	<b>Endkonzentration</b>	
1x RT-Puffer (s. 2.5.)	2 µl	50 mM Tris-HCl, pH 8,3 30 mM KCl 8 mM MgCl <sub>2</sub>
10x DTT	2 µl	10 mM
dNTPs	je 0,4 µl	2 mM je dNTP
RNAsin	0,5 µl	20 U
AMV-RT	0,3 µl	5 U
Endvolumen	20 µl mit ddH <sub>2</sub> O	

Durchführung: Die mRNA/Dynabeads-Komplexe (s. 3.15.2.) wurden direkt zur Reversen-Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Sie wurden zunächst 3 mal mit 50 µl eiskaltem RT-Puffer gewaschen und separiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Dynabeads in 20 µl RT-Mix für die Reaktion resuspendiert. Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C für eine Stunde in einem Thermomixer. Nach dieser Erststrang-cDNA-Synthese wurden die Dynabeads durch die magnetische Separation gesammelt und der RT-Mix entfernt. Zur Trennung der synthetisierten cDNA von der mRNA wurde die Denaturierung nach Resuspension der Magnetkugeln in 50 µl TE-Puffer bei 95°C für 1 min durchgeführt, die Dynabeads bei 4°C sofort gesammelt und der Überstand mit dem mRNA-Strang entfernt. Anschließend wurden die Beads mit der cDNA in 50 µl TE-Puffer gewaschen und in 50 µl TE-Puffer bei 4°C gelagert.

### 3.22.2. Amplifikation spezifischer Transkripte aus der cDNA-Bank mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

(BARNES, 1994; LAMBERT ET AL., 1993; BELL, 1989; SAIKI ET AL., 1988)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die *in vitro*-Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte, die von spezifischen Oligodeoxynukleotiden (Primer) flankiert werden. Die PCR besteht aus folgenden sich wiederholenden Schritten: Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung („Annealing“) und Primerverlängerung („Elongation“).

Für die Amplifikation der Zytokin-spezifischen komplementären cDNA in der PCR wurde das Expand High™ Fidelity PCR-System gewählt, da es besonders geeignet ist, kleine Mengen von Template-DNA und Fragmente bis 5 kb effektiv zu amplifizieren. Dieses System besteht aus einer Enzymmischung, die die Taq Polymerase aus dem thermophilen Eubacterium *Thermus aquaticus* und die Pwo Polymerase aus dem hyperthermophilen Archaeobacterium *Pyrococcus woesei* enthält. Die erstere besitzt eine 5´-3´ Polymerase-Aktivität, die zweite hat zusätzlich eine für das Korrekturlesen notwendige 3´-5´ Exonuklease-Aktivität.

Material / Geräte: Expand High™ Fidelity PCR-System  
(Boehringer, Mannheim):  
 a) Enzym-Mix ( $3,5 \times 10^3$  U/ml)  
 b) 10x PCR-Puffer mit  $MgCl_2$  (15 mM)  
 Zytokin-Amplimer Sets, 20  $\mu$ M (Clontech, Palo Alto,  
 USA)  
 (s. 2.9.1)  
 dNTP Set, 10 mM Lösung (dATP, dCTP, dGTP,  
 dTTP) (Pharmacia, Freiburg)  
 PCR-Puffer (s. 2.5.)  
 TE-Puffer (s. 2.3.)  
 Mineralöl („heavy white oil“, Sigma, Deisenhofen)  
 Thermo-Cycler (Perkin-Elmer)

### 3.22.2.1. PCR in Gegenwart von Dynabeads

Durchführung: Zunächst wurden zwei separate Master-Mixe entsprechend der Anzahl der PCR-Proben angesetzt:

<b>Reagenzien (Master- Mix I)</b>		<b>Endkonzentration</b>
3'-Primer	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
5'-Primer	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
dNTPs	je 1 $\mu$ l	0,2 mM je dNTP
Template DNA	Dynabeads	
Endvolumen	25 $\mu$ l mit ddH <sub>2</sub> O	
<b>Reagenzien (Master Mix II)</b>		<b>Endkonzentration</b>
PCR-Puffer (10x):	5 $\mu$ l	
500 mM Tris/HCl, pH 9,2		50 mM Tris/HCl, pH 9,2
160 mM (NH <sub>4</sub> )SO <sub>2</sub>		160 mM (NH <sub>4</sub> )SO <sub>2</sub>
15 mM MgCl <sub>2</sub>		1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Enzym-Mix	0,75 $\mu$ l	2,6 U
Endvolumen	25 $\mu$ l mit ddH <sub>2</sub> O	

Nach der magnetischen Separation der in TE-Puffer gelösten Dynabeads (s. 2.23.1.) wurden sie 1 Mal in 100  $\mu$ l PCR-Puffer (1x) gewaschen. Nach Entfernen des Puffers wurden für einen 50  $\mu$ l Ansatz jeweils 25  $\mu$ l von jedem Master-Mix dazugegeben. Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und mit 30  $\mu$ l Mineralöl überschichtet. Die Amplifikationen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:



	<u>Denaturierung:</u> 120 s, 94°C	<b>1 Mal</b>
<b>Zyklus I</b>	Denaturierung: 15 s, 95°C	<b>10 Mal</b>
	Annealing: 30 s, 60°C	
	<u>Elongation:</u> 45 s, 72°C	
<b>Zyklus II</b>	Denaturierung: 15 s, 94°C	<b>20 Mal</b>
	Annealing: 30 s, 60°C	
	Elongation: 45 s, 72°C	
	jeweils zusätzliche 20 s zu jedem <u>folgendem Elongationsschritt</u>	
<b>Abschluß:</b>	<u>Elongation</u> 420 s	<b>1 Mal</b>

Bei dem Oligonukleotid für ein IL8-Fragment wurde die Annealing-Temperatur auf 48°C eingestellt.

Dabei wurde in Vorversuchen die Sättigung der Reaktion ermittelt.

Nach beendeter PCR wurden die Dynabeads separiert, der Überstand mit den Amplifikaten entnommen und bei -20°C gelagert. Die Dynabeads mit der cDNA wurden für weitere Amplifikationen vorbereitet, indem sie 3 Mal für 2 min bei 94°C in 50 µl TE-Puffer denaturiert und schließlich in 50 µl TE-Puffer aufgenommen wurden.

#### 3.22.2.2. PCR ohne Dynabeads

Nach der Dynabeads-cDNA-Matrize wurde zuerst eine Zytokin-spezifische Zweitstrang-DNA synthetisiert: Nachdem der TE-Puffer entfernt worden war und die Magnetkugeln mit dem PCR-Puffer gewaschen worden waren, wurden 50 µl PCR-Mix dazugegeben und der Ansatz bei 72°C 5 min im Thermomixer inkubiert. Nach einer 2 min Denaturierung bei 94°C wurde der separierte Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt und der PCR-Amplifikation (s. 3.22.2.1.) unterzogen. Die Dynabeads wurden mit 100 µl TE-Puffer gewaschen, anschließend wieder in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

#### 3.22.2.3. Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde 1 µl (50 mM) des Positiv-Kontroll-PCR-Produktes als DNA-Probe der Amplifikation unterzogen. Die Negativkontrolle hatte keine DNA zur Amplifikation. Als Kontrolle der reversen Transkription und der Amplifikation wurde die RT-PCR mit β-Actin durchgeführt. Die Expression dieses Gens diente auch zum Vergleich zu der eines Zytokins in den nachfolgenden Untersuchungen.

### 3.22.3. Analyse der amplifizierten PCR-Produkte

Material / Geräte: Elektrophoresekammer (Roth, Karlsruhe)  
1x TAE-Puffer (s. 2.5.)  
5x GEBS (s. 2.5.)  
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)  
2 kb DNA-Mass-Ladder (Life Technologies, Eggenstein)  
Videodokumentation , UV-Leuchttisch  
(Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch)

Durchführung: Für die Auftrennung von 0,1 - 2 kb großen DNA-Molekülen wurde ein 2%iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl 5x GEBS, dem Gelladepuffer, versetzt und das Gel mit den Proben beladen. Die Elektrophorese lief in 1x TAE-Puffer etwa 2 Stunden bei einer Spannung von 70 V.

Durch den Vergleich mit dem mitgeführten Marker, dessen Fragmentgrößen einer definierten DNA-Menge zugeordnet sind, konnten die Größe und die Menge der Probe abgeschätzt werden.

Die semiquantitative Analyse erfolgte mit dem Herolab-Auswerteprogramm E.A.S.Y.: Jeder Bande wurde eine mittlere Intensitätshöhe im Verhältnis zueinander zugeordnet. Eine Wertzuweisung fand dann durch eine quantitative Kalibrierung statt. Da die DNA-Menge der Marker-Banden bekannt war, konnte für jeden Einzelwert die entsprechende Konzentration des PCR-Produktes errechnet werden.

## 3.23. Fixierung von Geweben

### 3.23.1. Gewebefixierung für die *in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie

(FOX ET AL., 1988; HOPWOOD ET AL., 1972)

Glutaraldehyd führt zur besten Erhaltung der morphologischen Strukturen und fixiert die mRNA im Gewebe. Es verursacht eine Vernetzung der Eiweißmoleküle ähnlich wie Formaldehyd, aber schneller und es penetriert langsamer in das Gewebe. Für die Fixierung des Gewebes für die *in-situ*-Hybridisierung werden die Eigenschaften beider Aldehyde genutzt.

Material: Gewebefixativ für die *in-situ*-Hybridisierung (s. 2.2.)

Durchführung: Bei gastrokopischen Routineuntersuchungen wurden Zangenbiopsien entnommen und in 12 ml des Fixativs gegeben. Es folgte eine Inkubation von 2 Stunden bei RT und die Lagerung bei 4°C.

### 3.23.2. Fixierung von Zellen für die *in-situ*-Hybridisierung

(FOX ET AL., 1988)

Für die Fixierung der Zellen für die *in-situ*-Hybridisierung hat sich das PLPG-Fixativ bewährt, welches Glutaraldehyd und Formaldehyd, verdünnt im Lysinpuffer, enthält.

Material: Zellfixativ für die *in-situ*-Hybridisierung (s. 2.2.)  
Oblekträger mit Zellen

Durchführung: Die zu untersuchenden Zellen wurden wie unter 3.9.4. beschrieben auf beschichtete und aktivierte Objektträger (s. 3.28.1.) mit Hilfe der Zytozentrifugation gebracht und anschließend fixiert. Die Fixierung erfolgte nach 5 min Lufttrocknen bei 4°C für 20 min im frischen PLPG. Anschließend wurden die Objektträger in PBS gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 95%) je 5 min dehydriert. Sie konnten bis zur Hybridisierung bei -20°C mehrere Monate gelagert werden.

### 3.24. Gewebeaufbereitung

(GORDAN, 1982)

Die Gewebeaufbereitung bis zum Einbetten hat zum Ziel, dem Gewebe mechanische Stabilität zu verleihen und Gewebeschnitte zu ermöglichen.

Die Gewebeaufbereitung besteht aus folgenden Schritten:

1. Vollständige Fixierung des Gewebes
2. Dehydrierung  
Hierbei entfernt eine aufsteigende Alkoholreihe das Fixierungsmittel und im Gewebe befindliches Wasser
3. „Clearing“  
Der „Clearing“-Prozess entfernt den Alkohol, da dieser mit dem Einbettmedium Paraffin nicht mischbar ist.
4. Einbettung  
Paraffin dringt in das Gewebe und härtet es dort aus.

Material / Geräte: Fixiertes Biopsiematerial (s. 3.23.1. und 2.)  
Isopropanol / Ethanol  
Methylbenzoat  
Rothihiston<sup>®</sup> (Ersatz für Xylol)  
Paraffin, Schmelzpunkt 60°C  
Ausgießrahmen für Paraffin  
Holzklötzchen (ca. 2,5 x 2,5 x 1 cm)  
Einbettungsautomat „Citadel 1000“ (Shandon, Japan)

Durchführung: Die fixierten Biopsien wurden in Gase eingepackt, in die Kapseln des Einbettungsautomaten gelegt und 16 Stunden mit ddH<sub>2</sub>O / DEPC-H<sub>2</sub>O gespült.

Vor dem Programmstart erfolgte der erste Dehydrierungsschritt in 50% Isopropanol bzw. Ethanol für eine Stunde. Die weiteren Prozesse liefen in der Histokinette in angegebener Reihenfolge für die angegebene Zeit:

<b>Prozeß</b>	<b>Histochemie / <i>In-situ</i>-Hybridisierung</b>	<b>Zeit</b>
<i>Dehydrierung</i>	70% Isopropanol / Ethanol	3 h
	96% Isopropanol / Ethanol	2 h
	96% Isopropanol / Ethanol	1,5 h
	100% Isopropanol / Ethanol	1,5 h
	100% Isopropanol / Ethanol	1,5 h
	100% Isopropanol / Ethanol	1,5 h
„ <i>Clearing</i> “	Methylbenzoat	2 h
	Methylbenzoat	2 h
	Methylbenzoat	2 h
	Rothihiston®	1 h
<i>Einbettung</i>	Paraffin, 70°C	1 h
	Paraffin, 70°C	5 h

Nach Beendigung der Prozesse wurden die Biopsien den Kapseln entnommen und in frischem Paraffin in Ausgießrahmen eingebettet. Dabei war darauf zu achten, daß das Gewebe so orientiert wurde, daß die Schnittebene einen Querschnitt der Lamina propria möglich machte.

Über Nacht härtete das Paraffin aus, und der Block wurde auf ein Holzklötzchen montiert.

In der Gewebeaufbereitung für die *in-situ*-Hybridisierung war streng darauf zu achten, daß alle Lösungen RNase frei waren, die Behälter und Kapseln mit 3% Hypochlorid von RNasen befreit wurden und die Ethanolverdünnungen mit DEPC-H<sub>2</sub>O vorgenommen wurden.

### **3.25. Anfertigung von Gewebeschnitten**

(BANCROFT ET AL., 1982)

Material / Geräte: Paraffinblöcke (s. 3.24.)  
beschichtete Objektträger  
(Omnilab, Hannover)  
Schlittenmikrotom (Reichert, Hamburg)  
Mikrotommesser „S35“ (Feather, Japan)  
Wasserbad

Durchführung: Mit dem Schlittenmikrotom, versehen mit Einmal-Mikrotommessern, wurden 4 µm starke Schnitte angefertigt. Die Deklination betrug 90°, der Neigungswinkel des Messers 14°. Die Schnitte wurden in ca. 45°C warmem Wasser geglättet und auf die Objektträger aufgezogen.

Bei der Herstellung der Schnitte für die *in-situ*-Hybridisierung wurde wieder streng darauf geachtet, daß keine Verunreinigung durch RNasen geschah.

### **3.26. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten**

(STEVENS, 1982)

Die dunkelblaue Kernfärbung entsteht durch die Schwermetallanteile des Alauns, die positiv geladene Komplexe mit den Phosphorgruppen der Nukleinsäuren bilden. Das Eosin hat eine hohe Affinität zu positiv geladenen Strukturen und färbt das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern rosa. Die Färbung wurde zur Überprüfung der Schnittebene eingesetzt.

#### **Material:**

Objektträger mit Gewebeschnitten  
Eosin-Lösung (s. 2.8.)  
Mayer's saures Hämatoxylin  
Isopropanol  
Xylol  
Eukitt® (Kindler, Freiburg)  
Färbewannen (Omnilab, Hannover)  
Deckgläschen (Omnilab, Hannover)

**Durchführung:** Die Schnitte wurden 2 x 10 min in Xylol deparaffiniert, und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert: Die Schnitte wurden jeweils 3 min 2x durch 100% Isopropanol und dann jeweils 1x durch 90%, 70%, 50%, und 30% Isopropanol gezogen. Nach einer 2 min Spülung mit ddH<sub>2</sub>O folgte die Färbung. Zuerst wurden die Kerne mit Hämatoxylin 10 min angefärbt. Nach einer 10 min Spülung mit Leitungswasser wurde 2 min das Plasma mit der Eosinlösung sichtbar gemacht. Die nachfolgende Dehydrierung fand in einer aufsteigenden Alkoholreihe statt: Die Schnitte wurden jeweils 5 s in 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Isopropanol getaucht. Das „Clearing“ wurde 2x in Xylol je 5 min durchgeführt. Die Objekte konnten so mit Eukitt® eingedeckt und nach Aushärtung mikroskopisch untersucht werden.

### **3.27. Immunhistochemische Detektion von Zytokinen**

(ANDERSSON ET AL., 1994)

Die Detektion der Zytokine mittels Immunhistochemie ermöglicht es, die Lokalisation der aktiven Zellen anhand des Genproduktes im Gewebe aufzuzeigen. Diese werden mit einem primären spezifischen Antikörper gebunden. Die Detektion erfolgt mit einem sekundären Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert ist, aufgrund der Substratumsetzung dieses Enzyms. Daher ist es notwendig endogene Peroxidase, wie sie bei Erythrozyten und Leukozyten vorkommt, durch eine Vorinkubation mit Wasserstoffperoxid zu deaktivieren (STREEFKERK ET AL., 1972). Das Substrat ist DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid), das durch eine oxidative Polymerisierung und Zyklisierung in einen braunen wasserunlöslichen Niederschlag umgewandelt wird (GRAHAM ET AL., 1966).

Material: Gewebeschnitte auf Objektträgern  
Antikörper:

Präimmunserum	Primärantikörper	Peroxidasekonjugat
Kaninchenserum Ziegenserum	anti-human TGF $\beta$ (Ziegen IgG <sub>1</sub> ) anti-human IL12p40 (Maus IgG <sub>1</sub> )	Kaninchen-Anti-Ziege Ziegen-Anti-Maus IgG

Xylol, Ethanol  
3% (v/v) Wasserstoffperoxid in HBSS (w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)  
Waschpuffer: HBSS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) (Life Technologies, Eggenstein) mit 0,1% (w/v) Saponin (Sigma, Deisenhofen)  
1 M HEPES (Life Technologies, Eggenstein)  
DAB-Farbreakanz (0,5 mg/ml HBSS)  
Aquatex (Merck, Darmstadt)  
Färbewannen (Omnilab, Hannover)  
Feuchte Kammer (Omnilab, Hannover)

Durchführung: Die Schnitte, die auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern (HUANG ET AL., 1983; MAZIA ET AL., 1975) aufgezogen wurden, wurden 1 Stunde bei 60°C erwärmt und durch dreimaliges Eintauchen in Xylol für jeweils 5 min entparaffiniert. Die Hydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe von 100%, 96%, 70% und 50%. Anschließend wurden sie 2 x 5 min in HBSS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) bei RT gespült. Nachfolgend wurden die Zellen permeabilisiert und die endogene Peroxidase deaktiviert, indem der Schnitt in 500  $\mu$ l 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit 0,1% Saponin 45 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert wurde. Der Objektträger wurde danach 2 x 5 min mit HBSS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) / 0,01 M HEPES gewaschen und der Schnitt mit 150  $\mu$ l Präimmunserum (1:150 verdünnt im Waschpuffer) 10 min inkubiert. Nach einer 5 min Spülung im Waschpuffer wurden 60  $\mu$ l von dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 im Waschpuffer auf den Schnitt appliziert und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen der Objektträger für jeweils 10 min im Waschpuffer, wurde der Schnitt mit 100  $\mu$ l Peroxidasekonjugat (Verdünnungen 1:400 und 1:500 im Waschpuffer) 1 Stunde bei RT inkubiert und danach wiederum 2 x 10 min gewaschen. Hierauf folgte die Farbreaktion mit DAB / 0,06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 100  $\mu$ l wurden auf den Schnitt pipettiert und 10 min - 20 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Die Blockierung der Reaktion wurde durch 3x Waschen mit HBSS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) und durch eine Spülung mit ddH<sub>2</sub>O vorgenommen. Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet.

Mit Hämatoxylin (1 min) und Eosin (2 min) wurde eine H.E.-Gegenfärbung des Gewebes vorgenommen (s 3.2.7.) und mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel (Aquatex) der Schnitt eingedeckt.

Folgende Kontrollen wurden durchgeführt:

1. Präimmunserum und primärer Antikörper ohne Peroxidasekonjugat
2. Präimmunserum und Peroxidasekonjugat ohne primären Antikörper

### **3.28. In-situ-Hybridisierung zur Detektion von Zytokintranskripten**

(STAHL ET AL., 1993; WARFORD ET AL., 1991; STOLER, 1990; NAKAMURA, 1990)

Die *in-situ*-Hybridisierung erlaubt den spezifischen Nachweis von Genexpression auf der Ebene der Transkription, ohne die nachzuweisende Nukleinsäure aus ihrer anatomischen Lokalisation zu entfernen. Man kann einige mRNA-Moleküle innerhalb eines histologisch komplexen Gewebes in einigen wenigen Zellen lokalisieren, diese Zellen phänotypisch anhand ihrer Morphologie bestimmen und diesen genau den Ursprung der spezifischen mRNA zuordnen. Eine quantitative Schätzung der relativen Konzentrationen der Ziel-Nukleinsäuren ist dadurch ebenfalls möglich.

Eine Übersicht über die einzelnen Schritte gibt die folgende Graphik:

**Beschichtung der Objektträger mit Organosilan**

- > nach Aktivierung: kovalentes Binden durch Aldehydgruppen des Gewebes an Aminopropylgruppen des beschichteten Objektträgers
- > kein Abschwimmen der Schnitte

**Fixierung des Gewebes mit Glutaraldehyd / Formaldehyd**

- > Fixierung der mRNA im Gewebe
- > Morphologie / Gewebestruktur wird erhalten
- > Proteine werden kreuzvernetzt

**Dehydratation, Einbettung, Schneiden des Gewebes**

- > Objektträger

**Deparaffinisierung, Permeabilisierung**

- > Deproteinisierung mit HCl und Proteinase K  
Optimierung konkurrierender Prinzipien zwischen Erhaltung der Gewebestruktur (Barriere für die Diffusion der Probe) und gutem mRNA-Nachweis (Signalstärke)

**Reduktion des Hintergrundes**

- > Acetylierung  
Erniedrigung der elektrostatischen Bindung der Negativladungen der Nucleinsäuren an Positivladungen im Gewebe und auf dem Objektträger
- > Prähybridisierung  
Haarnadelstreifen der mRNA werden geschmolzen - Exposition von mehr Ziel-RNA  
Unspezifische Nucleinsäureinteraktionen werden reduziert

**Hybridisierung**

- > Sondengröße - Penetration des Gewebes

**Posthybridisierung**

- > Kontrolle und Erhöhung der Stringenz
- > Stabilisierung der Hybride
- > Entfernung der nicht hybridisierten RNA durch RNasen

**Dehydrierung, Autoradiographie, Gegenfärbung**

- > Gegenfärbung (Hämatoxylin / Eosin)
- > mikroskopische Analyse und statistische Auswertung



### 3.28.1. Hybridisierungsschritte

<u>Material:</u>	Oblektr�ager mit Gewebeschnitten (s. 3.25.)
	Xylol, Ethanol
	2 N HCl
	Proteinase K (Sigma, Deisenhofen)
	in Proteinase K Puffer (s. 2.2.)
	Azetylierungspuffer:
	0,1 M Triethanolamin, pH 8,0 (TEA)
	mit 0,25%(v/v) Essigsäureanhydrid
	Pr�hybridisierungspuffer (s. 2.2.)
	Hybridisierungspuffer mit Sonde (s. 2.2.)
	2x SSC (s. 2.2.)
	Waschpuffer I (s. 2.2.)
	Waschpuffer II (s. 2.2.)
	Waschpuffer III (s. 2.2.)
	RNase-Waschpuffer (s. 2.2.)
	Ethanol (70% und 95%) mit 0,3 M Ammoniumacetat
	Feuchte Kammer
	Färbewannen (Omnilab, Hannover)

Durchführung (modifiziert nach FOX ET AL, 1988): Die fixierten, in Paraffin eingeschlossenen, geschnittenen und auf beschichtete Objektträger (MAPLES, 1985) aufgebrachten Biopsieschnitte wurden zunächst 1 Stunde bei 60°C erwärmt und dann in Xylol (3 x 10 min) entparaffiniert. Die Rehydrierung erfolgte in absteigender Alkoholreihe (100%, 95%, 70% und 50%) für jeweils 10 min. Danach wurden die Gewebeschnitte an der Luft getrocknet. Die fixierten Zellen wurden auf die RT erwärmt und ebenfalls rehydriert.

Danach wurden die Proben durch die Inkubation in 0,2 N HCl für 20 min bei RT und nach 2 Waschschr ten in DEPC-H<sub>2</sub>O für 10 min durch die nachfolgende Digestion mit Proteinase K permeabilisiert. Für die Biopsien waren 100 µg/ml Enzym notwendig, während für die Permeabilisierung der Zellen 10 µg/ml ausreichend waren. Die Inkubation fand bei 37°C für 15 min statt.

Nach zweimaligem Waschen in DEPC-H<sub>2</sub>O für 10 min wurden die Proben mit dem Azetylierungspuffer wie folgt behandelt: Das Essigsäureanhydrid wurde direkt auf das Gewebe bzw. die Zellen appliziert, dann in TEA sofort 30 s kräftig geschüttelt und danach bei RT 10 min inkubiert. Nach 2 Waschschr ten in DEPC-H<sub>2</sub>O folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe: 50%, 70%, 95% und 100% für jeweils 5 min. Die Objektträger wurden hiernach luftgetrocknet.

Zur Prähybridisierung wurden auf das Gewebe bzw. auf die Zellen 50 µl Prähybridisierungslösung in DEPC-H<sub>2</sub>O pipettiert und bei 42°C 4 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung vollständig entfernt.

Die Gewebe- und Zellproben wurden mit 16 µl der Hybridisierungslösung mit  $1 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  cpm Oligonukleotidsonde / Objektträger versorgt und mit Deckgläschen zugedeckt. Es folgte zunächst eine 15 min Inkubation bei 95°C zur

Denaturierung und dann die Inkubation bei 40°C (TNF $\alpha$ ) / 42°C (IL8) zur Hybridisierung für 6 Stunden.

Anschließend wurden die Deckgläschen in 2x SSC durch leichtes Schwenken abgespült und die Objektträger 10 min bei RT in 2x SSC gewaschen. Die stringenten Waschungen wurden wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde 20 min bei 40°C in Waschpuffer I ohne Schütteln, dann 2 x 20 min bei 80°C in Waschpuffer II und 1 Mal 30 min bei 80°C in Waschpuffer III unter Schütteln gewaschen. Die Entfernung der nicht hybridisierten RNA erfolgte in RNase-Waschpuffer für 40 min bei 37°C. Es folgte ein 20 min Waschschrift mit Waschpuffer III bei 80°C und anschließend in 2x SSC für 20 min ebenfalls bei 80°C (LIMB ET AL., 1994; WAHL ET AL., 1991). Die Dehydrierung wurde in 70% und 95% Ethanol mit Zusatz von Ammoniumacetat zur Stabilisierung der Hybride für jeweils 10 min bei RT durchgeführt. Die Objektträger wurden gründlich an der Luft getrocknet.

### 3.28.2. Autoradiographie

(FOX ET AL., 1988)

#### Material:

Fotoemulsion NTB3 (Kodak, New York, USA)  
 (1:1 mit 0,6 M Ammoniumacetat)  
 Entwickler D-19 (Kodak, New York, USA):  
 15,7 g / 100 ml H<sub>2</sub>O  
 30% (w/v) Natriumthiosulfat  
 0,1% (v/v) Essigsäure  
 Kodak Safe light filter # 2 mit einer 15 W Birne  
 Objektträgerboxen mit Kupfersulfatgranulat  
 Färbewannen (Omnilab, Hannover)

Durchführung: Die Fotoemulsion wurde in der Dunkelkammer ohne Licht vor dem Gebrauch auf 42°C erwärmt und vorsichtig gemischt. Zunächst wurden blanke Objektträger eingetaucht, bis keine Luftblasen in der Emulsion zu sehen waren. Erst dann wurden die hybridisierten Objektträger mit der Fotoemulsion durch Eintauchen beschichtet. Sie wurden einige Zeit senkrecht stehen gelassen, so daß überschüssige Emulsion abtropfen konnte. Anschließend wurden die Objektträger in einer Objektträgerbox mit Kupfersulfatgranulat angeordnet und diese in mehrere Lagen Alufolie lichtundurchlässig eingepackt. Die Exposition bei 4°C dauerte 6 Tage.

Die Box wurde auf RT gebracht. Die Entwicklung fand in der Dunkelkammer bei Licht mit Kodak Safe light filter # 2 statt. Zunächst wurden die exponierten Objektträger bei 15°C für 5 min in den Entwickler getaucht, dann 10 s in 0,1% Essigsäure ebenfalls bei 15°C gespült und anschließend 5 min bei 15°C in Natriumthiosulfat fixiert. Zuletzt wurden die Objektträger 10 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, die Emulsion von der Rückseite des Objektträgers entfernt und diese getrocknet.

Die *in-situ*-Hybridisierungen wurden 2 min mit 100  $\mu$ l Hämatoxylin und nach Spülen mit Leitungswasser 2 min mit 100  $\mu$ l Eosin gegengefärbt. Nach einer Spülung mit aqua dest wurden die Proben dehydriert: 3 x 70%, 1 x 95% und

1 x 100%. Nach Eintauchen in Xylol wurden die Gewebeschnitte und Zellen mit Eukitt eingedeckt.

### 3.28.3. Kontrollen

Als Positivkontrolle für die Hybridisierungsreaktion wurde  $\beta$ -Actin eingesetzt. Zwei negative Kontrollen wurden durchgeführt: 1. indem das Gewebe hybridisiert wurde, nachdem es vor der Prähybridisierung eine Stunde bei 37°C mit RNase-Puffer behandelt worden war, und 2. durch die Entwicklung des nicht hybridisierten Testgewebes.

Eine positive Gewebekontrolle und Oligonukleotidkontrolle wurde durch den Nachweis der Ziel-mRNA im Northern Blot gemacht. Eine positive Zellkontrolle fand mit dem Nachweis der mRNA durch die *in-situ*-Hybridisierung in aktivierten Zellen statt.

## 3.29. Bilddokumentation der histologischen Schnitte

### 3.29.1. Immunhistochemie

Material: Film Fujichrome Velvia (50 asa) für Farbdiapositive  
Filter: 25 Magenta (Zeiss)  
29 Yellow (Zeiss)  
Mikroskop mit Photoaufsatz und Bedienerpult (Zeiss)

Durchführung: Die Photographie der histologischen Schnitte erfolgte bei 25 asa mit zusätzlichen Graufiltern unterschiedlicher Stärke. Die eingesetzten Farbfilter dienten zum Erhalt der Farbechtheit der Diapositive. Da ein Blaulicht (3200k-lamp) benutzt wurde, wurde ein Blaufilter eingesetzt.

Die Belichtung sollte 10 s nicht überschreiten.

Geeignete Gewebeausschnitte wurden bei einer Vergrößerung von 40x, 630x und 1000x photographiert.

Die Entwicklung wurde in der Photoabteilung der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

### 3.29.2. *In-situ*-Hybridisierung

Material: Film AGFAPAN APX 25 · 100 · AP 400 für  
Schwarz-Weiß-Photographie  
Interferenzbreitbandfilter  
Mikroskop mit Photoaufsatz und Bedienerpult (Zeiss)  
Entwicklungsspule mit Entwicklungsdose  
Entwickler (HC 110), (Agfa)  
0,2% Essigsäure  
Expressfixierer (Tetanal)

Durchführung: Die Photographie der hybridisierten Schnitte erfolgte bei 32 asa mit dem Interferenzbreitbandfilter zur Kontrastverstärkung.

Die Belichtung war immer kürzer als 4 s.

Geeignete Gewebeausschnitte wurden bei einer Vergrößerung von 40x, 630x und 1000x photographiert. Mit der Technik der Doppelbelichtung konnten unterschiedliche Ebenen von einem Gewebeausschnitt gleichzeitig photographiert werden.

Im absoluten Dunkel wurde der Film aus der Filmrolle auf die Entwicklungsspule aufgerollt und in der Entwicklungsdose plaziert. Eine 1:32-Verdünnung des Entwicklers mit Wasser wurde auf genau 20°C eingestellt und in die Entwicklungsdose gegossen. Es folgten 5 min Schüttelentwicklung. Die Entwicklung wurde durch eine 30 s Einwirkung von Essigsäure gestoppt und 5 min unter Schütteln fixiert. Danach wurde der Film 15 min gewässert und 20 min getrocknet. Die Abzüge wurden in der Photoabteilung der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

## 4. Ergebnisse

Eine Infektion mit dem Bakterium *H. pylori* führt immer zu einer entzündlichen Reaktion des Gewebes, auch wenn klinische Symptome nur schwach oder gar nicht vorhanden sind. Es kommt zu einer chronischen Kolonisation des epithelnahen intestinalen Mukus (DUNN, 1993) und, obwohl das Bakterium nicht invasiv ist, zu einer Immunreaktion in der Tiefe der Lamina propria mucosae (WYATT, 1995).

Dort findet sich ein chronisches mononukleäres Zellinfiltrat unter Beteiligung von Monozyten / Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. In akuten Phasen der entzündlichen Aktivität lassen sich zusätzlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten in der Lamina propria, intraepithelial und im Mukus nachweisen. Darüber hinaus sind aktivierte T-Zellen in der Mukosa zu finden (FIOCCA ET AL., 1994; PAULL AND YARDLEY, 1989).

Dennoch liegen die Charakterisierung der lokalen zellvermittelten Immunantwort und deren Rolle in der Pathogenese einer *H. pylori*-Infektion weitgehend im Dunkeln, und es sind keine Erkenntnisse über den Einfluß von *H. pylori* auf die antigenpräsentierenden Zellen und ihre Bedeutung in der Regulation der Immunabwehr vorhanden. Weiterhin fehlen Informationen über die immunmodulierenden Faktoren, die den Verlauf einer *H. pylori*-Entzündung wesentlich beeinflussen.

In diesem Zusammenhang wurden Experimente zur Aufklärung der zellulären Immunantwort durchgeführt, die eine Charakterisierung der in der Mukosa vorhandenen Subpopulationen mononukleärer Zellen beinhalteten. Diese behandelten die Untersuchungen der T-Zell-Populationen sowie der antigenpräsentierenden Zellen, da sie in die Differenzierung von  $T_H0$  Zellen und damit in die Steuerung der Effektivität einer Abwehrreaktion involviert sind (REINER AND SEDER., 1995). Die Beeinflussung der Immunantwort durch das Epithel, die primäre Kontaktstelle zwischen *H. pylori* und Wirtsgewebe (WAGNER ET AL., 1994; PAULL AND YARDLEY, 1989), wurde ebenfalls untersucht. Proinflammatorische Zytokine

einer dissoziierten Immunantwort im Bereich der *H. pylori*-induzierten Barrierestörung, die für eine Immunmodulation verantwortlich sind (FAN ET AL., 1995), wurden *in situ* charakterisiert.

#### 4.1. Charakterisierung der T-Lymphozytenpopulation

Experimente zur Charakterisierung der T-Lymphozytenpopulation der Lamina propria mucosae im humanen Gastrointestinaltrakt *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten erfolgten direkt über eine Messung von isolierten Zellen. Sie wurden phänotypisch (Oberflächenmarker: CD3, CD4, CD8) und funktionell über ihre Zytokinsekretion ( $T_H1$ : IFN $\gamma$ ;  $T_H2$ : IL4 und IL10) charakterisiert. Die Klonierung und Expandierung isolierter *H. pylori*-spezifischer T-Lymphozyten erlaubte eine genaue Zuordnung einer Zelle zur bestimmten Subpopulation. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte sowohl auf Peptid- als auch auf Transkriptionsebene. Das Populationsprofil dieser *in vitro*-Versuche spiegelt die Zusammensetzung der Subpopulationen einer *H. pylori*-Entzündung *in situ* wider.

##### 4.1.1. Evaluierung von mononukleären Subpopulationen aus der Lamina propria des humanen Antrums

Zur Untersuchung der zellulären Immunantwort *in vitro* wurden Gewebeproben von ca. 4 cm<sup>2</sup> aus dem Bereich der intestinalen Lamina propria mucosae des Menschen entnommen und die mononukleären Zellen daraus gewonnen. Die Bestimmung des *H. pylori*-Status der Patienten erfolgte serologisch im ELIZA und kulturell durch die Anzucht des Bakteriums.

Die Zellisolation der intestinalen Lymphozyten und Monozyten fand über eine enzymatische Lyse der Lamina propria statt, nachdem der Mukus durch DTT abgelöst und die Epithelzellschicht mit den intraepithelialen Makrophagen mittels EDTA abgetrennt worden war (s. 3.6.2.). Die Aufreinigung der mononukleären Zellen erfolgte dann anhand von Dichtegradientenzentrifugation wie unter 3.6.1. beschrieben. Die Zellen waren immer > 98% vital. Die Ausbeute der über Ficoll aufgereinigten mononukleären Zellen betrug 60% - 70%. Die Reinheit der

mononukleären Zellen wurde mikroskopisch (s. 3.9.4.) und durch die Erstellung eines Zellprofils (s. 3.9.1.) kontrolliert.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Gewebe und die daraus gewonnenen mononukleären Zellen wieder. Aus der Mukosa *H. pylori*-positiver Patienten wurden signifikant mehr Zellen isoliert ( $p=0,0147$ ) als aus *H. pylori*-negativem Gewebe.

Tab. 2: Übersicht über die Charakteristik des verwendeten Gewebes und die Zahl der daraus isolierten mononukleären Zellen

<b>Patient</b>	<b><i>H. pylori</i>-Status</b>	<b>Zellen / g</b>
1. Magenresektat	negativ	$7 \times 10^6$
2. Op. n. Whipple	negativ	$5,3 \times 10^6$
3. Op. n. Whipple	negativ	$6,5 \times 10^6$
4. Op. n. Whipple	negativ	$6,2 \times 10^6$
<u>5. Magenresektat</u>	<u>negativ</u>	<u><math>5,5 \times 10^6</math></u>
6. Gastrektomie	positiv	2, $2 \times 10^7$
7. Gastrektomie	positiv	$3 \times 10^7$
8. Gastrektomie	positiv	$2 \times 10^7$
9. Op. n. Whipple	positiv	1, $7 \times 10^7$
10. Op. n. Whipple	positiv	$3 \times 10^7$

Angegeben ist die Art der Operation, *H. pylori*-Status und die Menge der gewonnenen mononukleären Zellen / 1g Frischgewicht.

Die Bestimmung der Zusammensetzung der aus der Lamina propria isolierten mononukleären Zellpopulationen erfolgte durch die Analyse relevanter Oberflächenmarker mittels Durchflußzytometrie (s. 3.11.1. und 3.11.3.). Eine systematische Eingrenzung der zu messenden Zellen erfolgte zunächst anhand der Größe und der typischen Lichtstreuung (Granularität). Nach Abgrenzung der Eigenfluoreszenz unmarkierter Zellen und unspezifisch gebundener Antikörper wurde dann das Pan-Leukozytenantigen CD45 in der Doppelmarkierung mit dem

Monozytenantigen CD14 zur Reinheits- und Vollständigkeitskontrolle der gewählten Populationen eingesetzt. CD3<sup>+</sup> T-Zellen konnten nun mit den Antigenen CD4 (für T-Helfer-Zellen) und CD8 (für zytotoxische / Suppressor T-Zellen) differenziert werden. Außerdem kam das Antigen CD19 zur Bestimmung des prozentualen Anteils der B-Zellen an den Gesamtlymphozyten zum Einsatz. Der Anteil an Monozyten / Makrophagen wurde mit den Antigenen CD15 / CD16 gemessen. Die Zusammensetzung der mononukleären Populationen aus der Lamina propria eines jeden Patienten ist in Tabelle 3 zusammengefaßt. Es sind jeweils die prozentualen Anteile an der mononukleären Gesamtpopulation dargestellt.

Tab. 3: Zusammensetzung der Populationen der mononukleären Zellen aus der Magenmukosa *H. pylori*-negativer und *H. pylori*-positiver Patienten

Patient	<i>Helicobacter pylori</i> negativ					<i>Helicobacter pylori</i> positiv				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>CD3/4</b>	40,4	32,7	57,6	53,0	51,6	19,0	18,0	19,1	38,0	35,4
<b>CD3/8</b>	11,9	35,6	16,9	8,0	12,8	7,5	4,0	6,5	11,0	11,0
<b>CD19</b>	20,2	19,5	18,5	27,8	22,8	34,0	33,6	32,9	12,2	20,9
<b>CD15/16</b>	27,2	20,4	16,6	12,2	17,4	42,5	47,5	41,1	39,6	35,5
<b>CD45/14 Ratio</b>	2,7	4,3	5,6	7,3	5,0	1,4	1,2	1,4	1,5	1,9

Dargestellt sind die prozentualen Größen der charakterisierten Populationen und das Verhältnis von Lymphozyten zu Monozyten (CD45 / 14 Ratio). Es ist jeweils der Mittelwert aus drei Messungen dargestellt.

Im Vergleich der evaluierten mononukleären Populationen *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten gibt es signifikante Unterschiede: Während sich bei *H. pylori*-negativen Patienten die mononukleäre Population in der Lamina propria hauptsächlich aus Lymphozyten zusammensetzt (85% im Mittel), beträgt der Lymphozytenanteil in *H. pylori*-positivem Gewebe im Mittel 60%. Dieser Unterschied zeigt sich auch in der CD45/14 Ratio ( $p=0,002$ ). Der Anteil von 47% an CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen ist bei *H. pylori*-negativen Patienten auf das Doppelte der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten *H. pylori*-positiver Patienten erhöht ( $p=0,01$ ). Bei



*H. pylori*-positiven Patienten besteht das Mukosainfiltrat im Mittel zu 41,2% aus Monozyten / Makrophagen. Ihr Kontingent an diesen Zellen ist doppelt so hoch wie in *H. pylori*-negativem Gewebe ( $p < 0,0001$ ).

#### **4.1.2. Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen in der Lamina propria des Antrums**

Bezüglich einer adäquaten Immunreaktion auf ein Pathogen, spielen die  $CD3^+$  T-Zellen eine wichtige Rolle, denn sie beeinflussen sich antagonistisch in der Ausbildung einer humoralen ( $T_H2$ ) bzw. einer zellulären ( $T_H1$ ) Immunantwort. Die Regulation findet durch die Sekretion von Zytokinen nach ihrer Aktivierung durch einen spezifischen Antigenkontakt statt.

Zur Untersuchung der von *H. pylori* ausgelösten immunologischen Reaktion wurde die Effektorfunktion der T-Zellen anhand des Zytokinpiegels unter der Anwendung der intrazellulären FACS-Analyse (s. 3.11.2.) bestimmt. Relevante und für die T-Zell Antwort typische Zytokine wie IL4, IL10 ( $T_H2$ ) und  $IFN\gamma$  ( $T_H1$ ) wurden für die intrazytoplasmatische Färbung ausgewählt. Eine gleichzeitige Phänotypbestimmung mit den Oberflächenmarkern CD4 und CD8 erlaubte eine Zuordnung der Zytokinsekretion und die Bestimmung der Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen. Damit konnten Rückschlüsse auf die Art der *H. pylori*-spezifischen immunologischen Reaktion gezogen werden.

##### 4.1.2.1. Optimierung der Detektion von intrazellulären Zytokinen mit dem fluoreszenzaktivierten Zellscanner (FACS)

Die Herkunft der Zellen aus der humanen Lamina propria erforderte eine Evaluierung der optimalen Versuchsbedingungen. In Vorversuchen mußte die optimale Antikörperkonzentration für den Nachweis der einzelnen Zytokine in den jeweiligen Zellen bestimmt werden. Die Inkubationszeit und die Konzentration von dem Proteintransporthemmer Monensin wurde bereits eingestellt (DIEKMANN, 1996).

Zur Optimierung der Detektion intrazellulärer Zytokine auf dem Einzelzellniveau in der Durchflußzytometrie wurden periphere mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.6.1.) isoliert, die T-Zellen aufgereinigt (s. 3.6.3. und 3.7.1.) und mit 1% Monozyten gleichen Gewebetyps maximal (s. 3.11.2.) stimuliert.

$1 \times 10^6$  Zellen wurden 6 Stunden vor der Ernte mit 3  $\mu$ M Monensin versetzt, geerntet, fixiert und nach Permeabilisierung mit Saponin die Zytokine mit verschiedenen Konzentrationen von Antikörpern detektiert. Die Messung erfolgte wie unter 3.11.3. beschrieben.

Tab. 4: Titration der Antikörperkonzentration und prozentualer Anteil der angefärbten Population

<u><math>\mu</math>g</u>	<u>IFN<math>\gamma</math></u>	<u>IL4</u>	<u>IL10</u>	<u>IL12</u>
0,05		88,1 $\pm$ 2		
0,1	19,3 $\pm$ 1	<b>96,8<math>\pm</math>2</b>	54,5 $\pm$ 1	29,3 $\pm$ 3
0,125				<b>63,8<math>\pm</math>2</b>
0,15		93,4 $\pm$ 1		
0,2		91,0 $\pm$ 1	59,5 $\pm$ 2	27,3 $\pm$ 2
0,25	<b>62,8<math>\pm</math>2</b>	95,4 $\pm$ 2	<b>60,4<math>\pm</math>2</b>	
0,3	24,0 $\pm$ 1		58,2 $\pm$ 1	26,7 $\pm$ 1
0,4	28,5 $\pm$ 1		58,7 $\pm$ 2	25,3 $\pm$ 2
0,5	29,1 $\pm$ 2		56,5 $\pm$ 1	23,6 $\pm$ 1

Zur Optimierung der Detektion von Zytokinen mittels FACScan wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen eingesetzt. Die Konzentrationen sind in  $\mu$ g/ $1 \times 10^5$  Zellen angegeben. Die angefärbten Zellpopulationen sind prozentual angegeben. Die Werte stellen den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) von n=3 Messungen dar. Die jeweils größte angefärbte Population ist durch Fettdruck hervorgehoben.

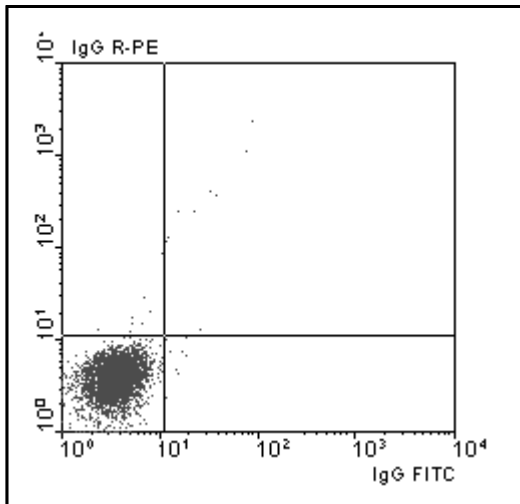
Tabelle 4 zeigt die verwendeten Antikörperkonzentrationen pro Ansatz von  $1 \times 10^5$  Zellen und den Anteil der Ereignisse in %, die in dem entsprechenden

Quadranten nach Abgrenzung der Negativkontrollen Punktwolken gebildet haben. Für den R-PE-markierten Antikörper, (Phycoerythrin - Fluoreszenz 2) ist es der Quadrant Q1 (OL). Für die weitere Vorgehensweise wurde die Antikörperkonzentration gewählt, die den größten angefärbten Zellanteil lieferte. Diese Werte sind durch Fettdruck hervorgehoben.

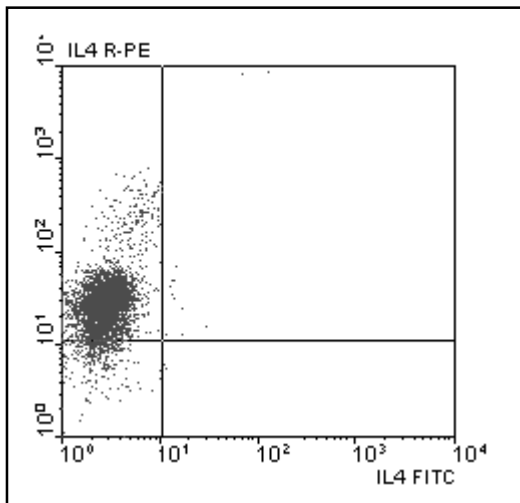
Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden Blockierungsversuche (n=3) durchgeführt: Die Bindung eines R-PE-markierten Antikörpers an das entsprechende Zytokin wurde durch die Präinkubation der fixierten und permeabilisierten Zellen mit einem Überschuß an FITC-markiertem Antikörper des gleichen Klons blockiert.

Die Kultivierung und Maximalstimulierung der T-Lymphozyten erfolgte wie oben beschrieben. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte gemäß dem vorliegenden Protokoll (s. 3.11.2.) in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Nach vorausgegangener Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde erst mit 5 µg FITC-konjugiertem Antikörper präinkubiert. Als zweiter Antikörper kam dann der R-PE-konjugierter Antikörper in der optimierten Konzentration zum Einsatz und umgekehrt.

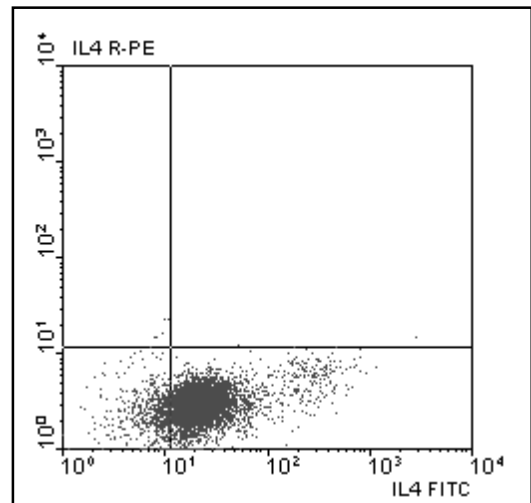
Bild 3 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer Doppelfärbung mit FITC- und R-PE-konjugiertem Antikörper gegen IL4. Die Blockierung des R-PE-markierten Antikörpers durch den vorher eingesetzten FITC-markierten Antikörper ist vollständig (C), sobald der FITC-konjugierte Antikörper vollständig durch die Präinkubation mit dem R-PE-Antikörper inhibiert wird (B).



A. Isotypkontrolle (Simultest™ Control  $\gamma_1/\gamma_2$ )  
IgG<sub>1</sub> FITC / IgG<sub>2a</sub> R-PE



B. Inhibition mit 5  $\mu$ g anti IL4-R-PE



C. Inhibition mit 5  $\mu$ g anti IL4-FITC

Bild 3: Experiment zur Untersuchung der Spezifität der Antikörperbindung

Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Doppelmarkierungsversuches (aus  $n=3$ ). Die fixierten und permeabilisierten T-Lymphozyten wurden im ersten Schritt mit einem Überschuß von R-PE-konjugiertem Antikörper mit nachfolgender FITC-Antikörper-Markierung (B) sowie mit einem Überschuß von FITC-markiertem Antikörper und dann mit R-PE-konjugiertem Antikörper inkubiert (C).

Auch die Doppelmarkierungsversuche der anderen Antikörper zeigten ähnliche Ergebnisse. Wurden die Zellen mit dem entsprechenden Antikörper im Überschuß präinkubiert, fand der nachfolgende anders markierte Antikörper gleichen Klons keine Bindungsstelle. Somit zeigte sich in der FACS-Messung nur ein Signal in der Wellenlänge des präinkubierten Antikörpers.

#### 4.1.2.2. Detektion von relevanten Zytokinen der Lamina propria T-Lymphozyten - Ermittlung der Anzahl der produzierenden Zellen

Nach der Isolation und Aufreinigung der mononukleären Zellen aus der Lamina propria des humanen Antrums (s. 4.1.1.) *H. pylori*-positiver (n=5) und -negativer (n=5) Patienten wurden die in der Tabelle 5 zusammengestellten Zellzahlen für die isolierten und aufgereinigten (s. 3.6.3. und 3.7.1.) Lymphozyten ermittelt. Dabei wurde aus *H. pylori*-positivem Gewebe die dreifache Menge an Lymphozyten isoliert ( $p < 0,0001$ ).

Tab. 5: Menge der isolierten Lymphozyten

<b>Patient 1</b>	<b>Patient 2</b>	<b>Patient 3</b>	<b>Patient 4</b>	<b>Patient 5</b>
$4,2 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
<b>Patient 6</b>	<b>Patient 7</b>	<b>Patient 8</b>	<b>Patient 9</b>	<b>Patient 10</b>
$1,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$2 \times 10^7$

Nach Auflösung des Mukus und Ablösung der Epithelschicht wurden die mononukleären Zellen aus der Lamina propria enzymatisch isoliert und über eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die Bestimmung der Lymphozytenpopulation erfolgte mit Hilfe des elektronischen Zellzählgerätes. Dargestellt sind die Zellzahlen / 1g Frischgewicht.

Patienten 1 - 5: *H. pylori*-negativ

Patienten 6 - 10: *H. pylori*-positiv

Zur Untersuchung des Zytokinprofils wurden Ansätze von  $1 \times 10^6$  Zellen zur Akkumulation der gebildeten Zytokine 6 Stunden mit  $3 \mu\text{M}$  bei  $37^\circ\text{C}$  und  $10\% \text{CO}_2$  inkubiert.

Die Färbung der Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen / Ansatz) erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurden die Subpopulationen mit den monoklonalen Antikörpern CD4 und CD8 (s. 3.11.1.) markiert. Es folgte die Fixierung und Permeabilisierung der nun phänotypisch gefärbten Zellen und die Detektion der intraplasmatischen Zytokine

IFN $\gamma$ , IL4 und IL10 (s. 3.11.2.). Blockierungs- und Inhibierungskontrollen sowie die Messungen erfolgten wie in Kapitel 3.11. beschrieben.

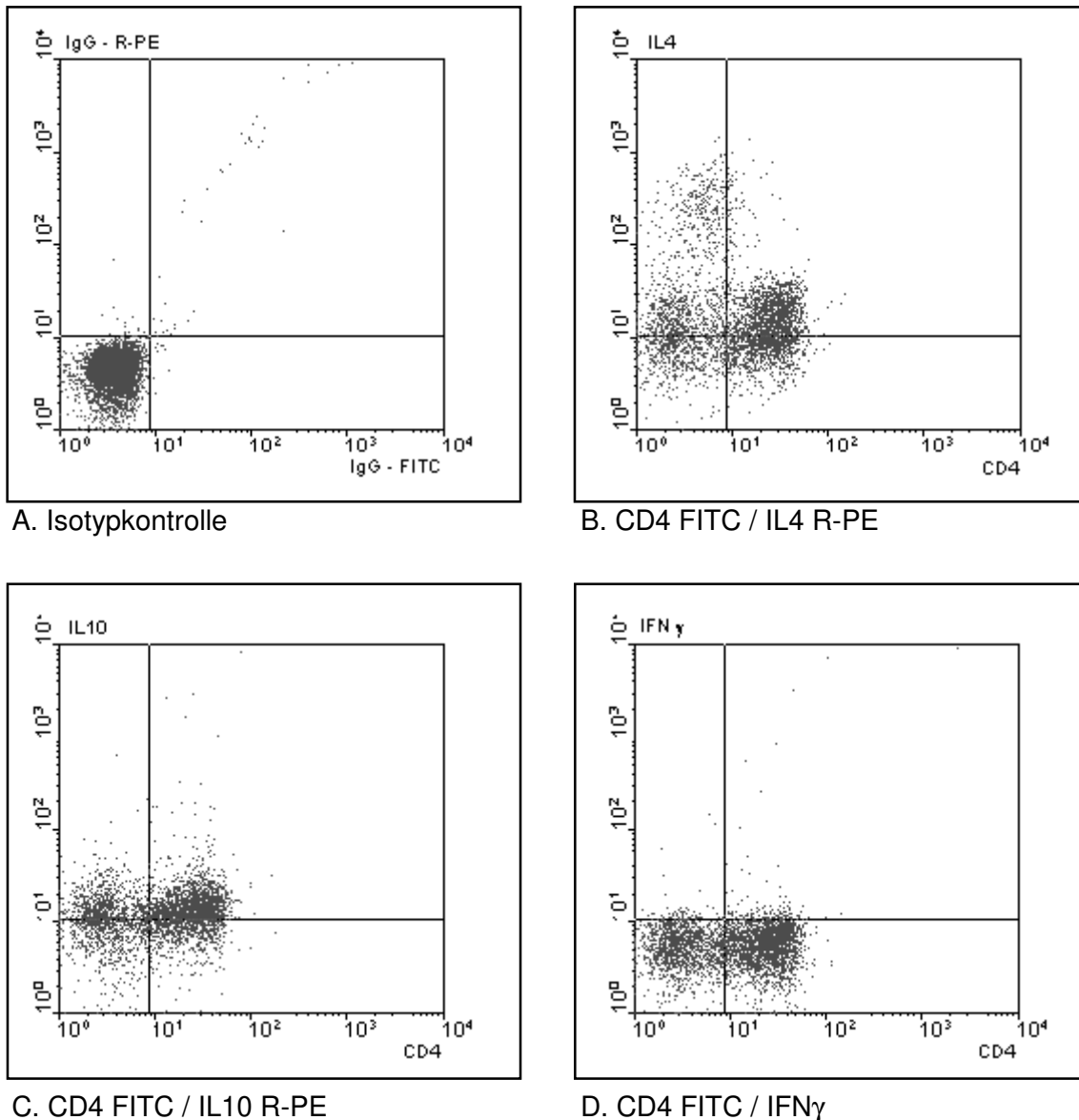


Bild 4: Synthese intrazellulärer Zytokine von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten aus der Lamina propria des gastrointestinalen Bereiches, repräsentativ für die *H. pylori*-negative Gruppe (n=4): Patient 2

Die mononukleären Zellen wurden aus der Lamina propria des humanen Antrums isoliert und nach 6 stündiger Inkubation mit 3  $\mu$ M Monensin geerntet. Ansätze von jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden zuerst mit einem Oberflächenantikörper markiert, danach fixiert, mit Saponin permeabilisiert und schließlich mit einem monoklonalen Zytokinantikörper intrazellulär die entsprechenden Zytokine detektiert. Es folgten drei Messungen.

- A. Isotypkontrolle mit Simultest™ Control  $\gamma_1 / \gamma_{2a}$  (IgG<sub>1</sub> FITC / IgG<sub>2a</sub> PE).  
 B. Färbung mit 0,1  $\mu$ g anti-IL4 nach CD4<sup>+</sup> Phänotypbestimmung.  
 C. Detektion von IL10 (0,25  $\mu$ g Antikörper) in der CD4<sup>+</sup> Lymphozytensubpopulation.  
 D. Expression von IFN $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (gefärbt mit 0,25  $\mu$ g Antikörper).

Die statistische Auswertung der systematisch eingegrenzten Lymphozytenpopulation konnte nach Determination der Quadranten erfolgen, wobei die Isotypkontrolle im ersten Quadranten eine Punktwolke bildete. Die Größe der einzelnen Subpopulationen ließ sich aus den statistischen Werten ermitteln. So wurde der prozentuale Anteil der zytokinsynthetisierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen für jedes einzelne Zytokin in der jeweiligen Subpopulation bestimmt.

Die Zytokin-Expression in der Lamina propria der nicht mit *H. pylori* infizierten Personengruppe (n=4), wurde im Bild 4 repräsentativ für Patient 2 dargestellt. Die dazugehörige Tabelle 6 zeigt die prozentuale Verteilung der sezernierenden Zellen in der CD4<sup>+</sup> Gesamtpopulation. Sie wurden durch die FACS-Analyse mit Hilfe der vier Quadranten der Punkthistogramme ermittelt.

Tab. 6: Sezernierende CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (%) nach der FACS-Analyse von Bild 4, repräsentativ für die *H. pylori*-negative Personengruppe (n=4): Patient 2

	<b>Q1 (OL)</b>	<b>Q2(OR)</b>	<b>Q3(UL)</b>	<b>Q4(UR)</b>
<b>A. Isotypkontrolle</b>	0,3%	0,7%	98,6%	0,4%
<b>B. CD4 FITC / IL4 R-PE</b>	15,8%	52,7%	16,9%	14,6%
<b>C. CD4 FITC / IL10 R-PE</b>	12,6%	56,5%	14,2%	16,7%
<b>D. CD4 FITC / IFN<math>\gamma</math> R-PE</b>	0,9%	2,7%	39,5%	56,8%

Im Quadranten Q1 liegen die PE-markierten Zellen, die ein Zytokin exprimieren. Quadrant Q2 beinhaltet die doppelt markierten Zellen, also Zellen, die CD4<sup>+</sup> sind und ein Zytokin exprimieren. Im Quadranten Q3 befinden sich alle nicht markierten Zellen (Autofluoreszenz, bzw. unspezifische Bindungen) und im Q4 sind die FITC-markierten CD4<sup>+</sup> Zellen, die kein Zytokin exprimieren.

Die Meßergebnisse der Sekretion mononukleärer Zellen aus der Lamina propria von der *H. pylori*-positiven Personengruppe (n=4) sind beispielhaft im Bild 5 zu sehen. Repräsentativ wurden die Analysen der Lymphozytenpopulation des Patienten 7 dargestellt. In Tabelle 7 ist die dazugehörige prozentuale Verteilung der charakterisierten CD4<sup>+</sup> Zellen aufgeführt.

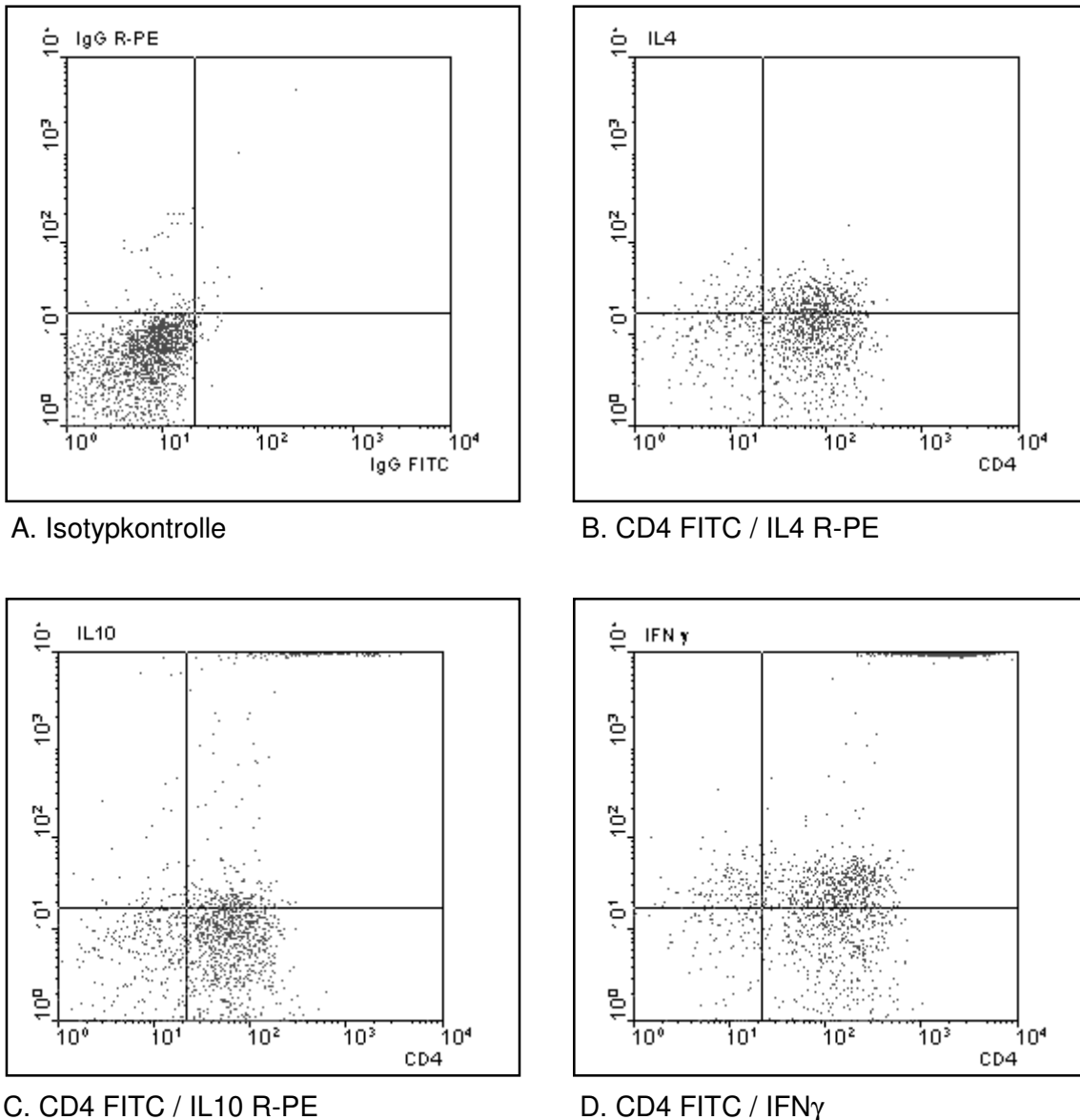


Bild 5: Synthese intrazellulärer Zytokine von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten aus der Lamina propria des gastrointestinalen Bereiches, repräsentativ für die *H. pylori*-positive Gruppe (n=4): Patient 7

Die mononukleären Zellen wurden aus der Lamina propria des humanen Antrums isoliert und 6 Stunden mit 3  $\mu$ M Monensin inkubiert. Ansätze von jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden zuerst phänotypisch markiert, danach fixiert, mit Saponin permeabilisiert. Schließlich wurden mit einem monoklonalen Zytokinantikörper intrazellulär die Zytokine detektiert. Es folgten drei Messungen.

- A. Isotypkontrolle mit Simultest™ Control  $\gamma_1 / \gamma_{2a}$  (IgG<sub>1</sub> FITC / IgG<sub>2a</sub> PE).  
 B. Färbung mit 0,1  $\mu$ g anti-IL4 nach Oberflächen-markierung.  
 C. Detektion von IL10 (0,25  $\mu$ g Antikörper) in der CD4<sup>+</sup> Lymphozytensubpopulation.  
 D. Expression von IFN $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (gefärbt mit 0,25  $\mu$ g Antikörper).



Tab. 7: Sezernierende CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (%) nach der FACS-Analyse von Bild 4, repräsentativ für die *H. pylori*-positive Personengruppe (n=4): Patient 7

	Q1 (OL)	Q2(OR)	Q3(UL)	Q4(UR)
A. Isotypkontrolle	2,4%	0,6%	96,3%	0, 8%
B. CD4 FITC / IL4 R-PE	8,5%	30,7%	17,6%	43, 2%
C. CD4 FITC / IL10 R-PE	4,3%	14,8%	28,2%	52, 6%
D. CD4 FITC / IFN $\gamma$ R-PE	10,7%	43,5%	13,5%	32, 9%

Im Quadranten Q1 liegen die PE-markierten Zellen, die ein Zytokin synthetisieren. Quadrant Q2 beinhaltet die doppelt markierten Zellen, also Zellen, die CD4<sup>+</sup> sind und ein Zytokin synthetisieren. Im Quadranten Q3 befinden sich alle nicht markierten Zellen (Autofluoreszenz, bzw. unspezifische Bindungen) und im Q4 sind die FITC-markierten CD4<sup>+</sup> Zellen, die kein Zytokin bilden.

Zur Berechnung des Anteils der sezernierenden Subpopulationen an der gesamten CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> bzw CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Population wurde folgende Formel angewendet:

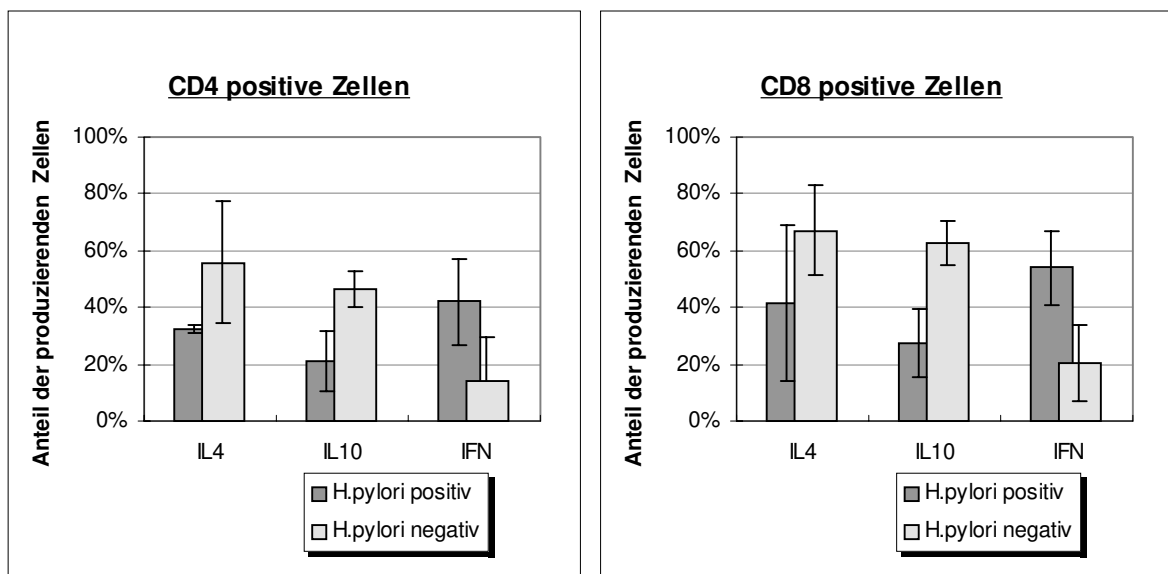
$$\text{Prozentwert synthetisierender Zellen} = \frac{\text{Anzahl positiver Ereignisse in Q2} \cdot 100}{\text{Gesamtzahl der Ereignisse in Q2} + \text{Q4}}$$

Dabei liegen im Quadranten Q2 doppelt markierte Zellen, also Zellen, die sowohl CD4 oder CD8 als auch für ein Zytokin positiv sind. Die Summe aus Q2 und Q4 faßt alle CD-positiven Zellen zusammen.

Für jedes Zytokin und jeden Patienten wurde so der Anteil der sezernierenden Zellen an der gesamten CD4<sup>+</sup> bzw. an der CD8<sup>+</sup> Population anhand der absoluten Zellzahlen errechnet. Innerhalb der *H. pylori*-negativen und *H. pylori*-positiven Gruppe wurden die Ergebnisse gemittelt und miteinander verglichen.

Die oben beschriebenen Untersuchungen, die in Bild 6 zusammengefaßt sind, zeigten folgende Ergebnisse: Bei *H. pylori*-positiven Patienten (n=4) produziert sowohl eine größere CD4<sup>+</sup> Population (42%) als auch eine größere CD8<sup>+</sup> T-Lymphozytenpopulation (54%) IFN $\gamma$ . Im Vergleich dazu sezerniert in der *H. pylori*-negativen Gruppe (n=4) nur ein Anteil von 14% der CD4<sup>+</sup> und 20% der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten IFN $\gamma$  ( $p=0,03$  und  $p=0,006$ ).

Umgekehrt sind die IL4 und IL10 produzierenden T-Helfer und Suppressor-Zellen bei der negativen Kontrollgruppe erhöht (> 46%), während der Anteil dieser Zellen bei *H. pylori*-infizierten Patienten erniedrigt ist (< 41%). Der Unterschied von 25% bei den CD4<sup>+</sup> und 35% bei den CD8<sup>+</sup> IL10 sezernierenden Populationen *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten ist signifikant ( $p=0,006$  und  $p=0,003$ ). Für die IL4 Sekretion sind keine Signifikanzen feststellbar, obwohl bei *H. pylori*-positiven Patienten die CD4<sup>+</sup> Population, die IL4 sezerniert, um 23% und die IL4 synthetisierende CD8<sup>+</sup> Population um 26% erniedrigt sind.



A.

B.

Bild 6: Anteil der Zytokin produzierenden CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation von Lymphozyten *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung in den jeweiligen Gruppen ( $n=4$ , jeweils 3 Messungen) der prozentualen Anteile CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> (B) T-Lymphozyten, die ein Zytokin exprimieren.

*H. pylori*-positives Gewebe ist angereichert mit IFN $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten, jedoch läßt sich keine Aussage darüber machen, ob die Produzenten Typ I T-Zellen sind. Ebenso kann man nicht sagen, daß die IL4 und IL10 synthetisierenden Zellen ausschließlich T-Zellen vom Typ II sind, denn undifferenzierte Zellen vom Typ 0, die IFN $\gamma$ , aber auch IL4 und IL10 synthetisieren, werden mit dieser Messung ebenfalls erfaßt.

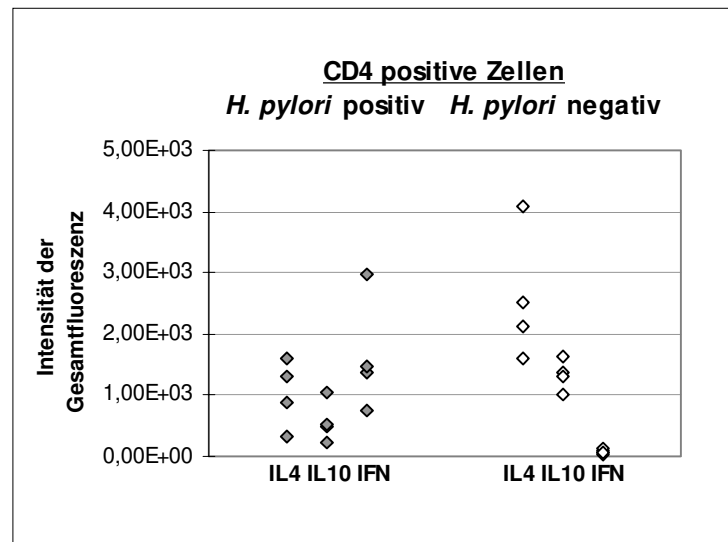
#### 4.1.2.3. Detektion von relevanten Zytokinen der Lamina propria T-Lymphozyten - Ermittlung der Zytokinproduktion

Zur Erlangung genauerer Erkenntnisse über das Milieu in der Lamina propria einer *H. pylori*-Infektion ist für die Ermittlung der Quantität einer Zytokinsekretion neben dem Ausmaß einer Zytokin produzierenden T-Zell-Subpopulation auch die Intensität der Zytokinproduktion von Bedeutung. Das hierfür berechnete Summensignal einer Zytokin sezernierenden Population spiegelt dabei den Grad der Aktivität einer Zelle wieder.

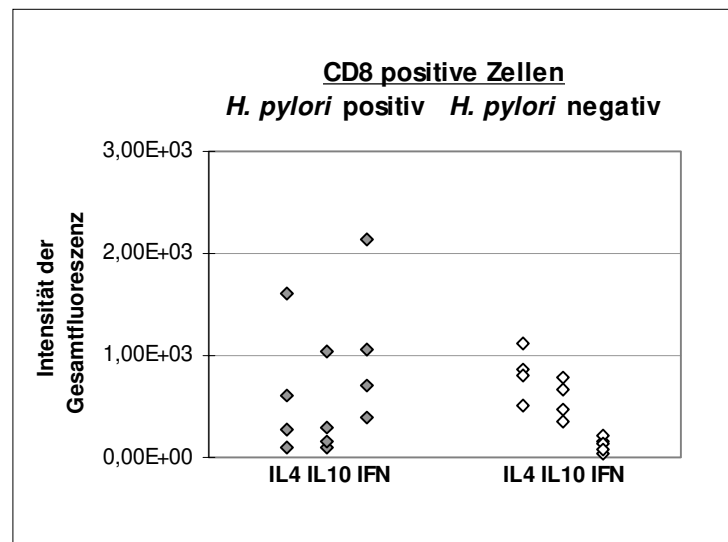
Dazu wurde anhand der Einparameter-Darstellung (Häufigkeitshistogramm) die absolute Fluoreszenzintensität bestimmt. Diese wurde über die Differenz der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der Probe und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle errechnet. Die Fluoreszenzintensität ist das Integral über der Fläche des Skalenbereiches in einem Häufigkeitsdiagramm. Das Produkt aus der Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen (%)  $n$  und der absoluten Fluoreszenzintensität  $FI$  stellt das Summensignal dar.

Diese Berechnungen wurden für *H. pylori*-positive ( $n=4$ ) und *H. pylori*-negative ( $n=4$ ) Patienten durchgeführt. Die Mittelwerte der Summensignale der  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  Zellpopulation in der jeweiligen Gruppe sind im Bild 7 für jedes Zytokin gezeigt.

In der *H. pylori*-positiven Gruppe ist in der  $CD4^+$  Population die Sekretion des  $T_H1$  Zytokins  $IFN\gamma$  16-fach erhöht, in der  $CD8^+$  T-Lymphozytenpopulation 7-fach ( $p=0,007$  bzw.  $p=0,025$ ). Dagegen ist die Intensität der IL4 und IL10 Produktion im *H. pylori*-infizierten Gewebe von  $CD4^+$  T-Zellen signifikant erniedrigt ( $p=0,041$  und  $p=0,012$ ). In der  $CD8^+$  Population *H. pylori*-positiver Gewebe ist die Sekretion dieser Typ II -Zytokine ebenfalls erniedrigt, jedoch sind keine Signifikanzen feststellbar.



A.



B.

Bild 7: Aktivierungsgrad der Zytokin produzierenden T-Lymphozyten

Dargestellt sind die Summensignale (Produkt aus der prozentualen Anzahl (n) der Zytokin-produzierenden Zellen und der absoluten Fluoreszenzintensität (FI) ) *H. pylori*-positiver (n=4) und -negativer (n=4) Patienten. Die Produktion von IL4, IL10 und IFN $\gamma$  wurde jeweils drei Mal gemessen.

A. Aktivierungsgrad CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

B. Aktivierungsgrad CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Das Milieu in der infizierten Lamina propria des humanen Antrums weist eine signifikant höhere Anreicherung mit dem T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN $\gamma$  auf. Dieses Zytokin wird mit einem signifikant stärkeren Aktivierungsgrad von einer signifikant größeren T-Lymphozytenpopulation (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) sezerniert. Eine

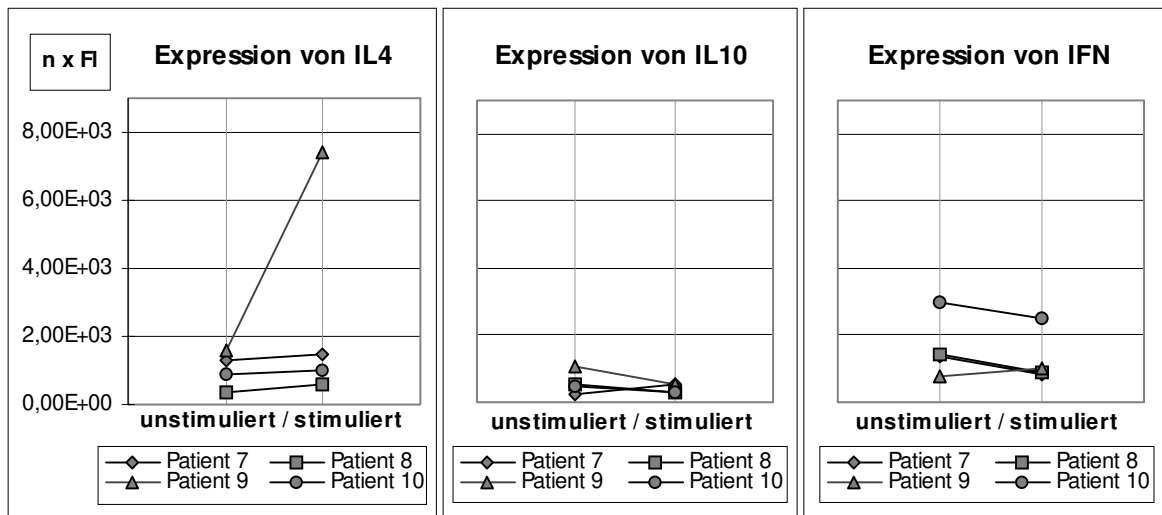
eindeutige Charakterisierung und Zuordnung der Produzenten zu einer Subpopulation ( $T_H1$  oder  $T_H2$ ) ist jedoch nicht möglich.

#### 4.1.3. Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die Zytokinsekretion der T-Zellen

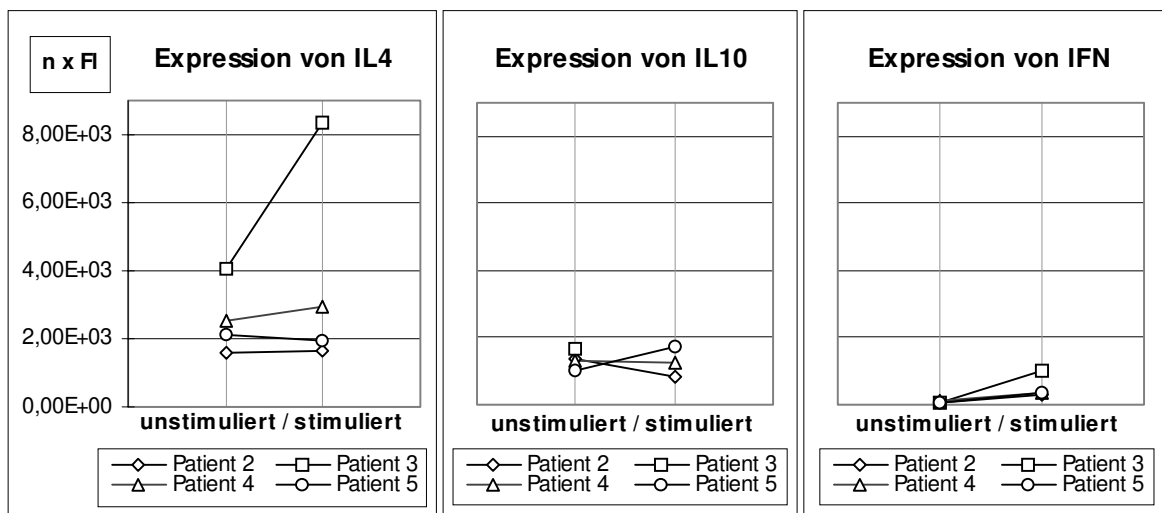
Die Einflußnahme von *H. pylori* auf die Zytokinsekretion in den untersuchten Zellpopulationen wurde anhand von Stimulationsexperimenten untersucht. Lamina propria T-Lymphozyten *H. pylori*-positiver (n=4) und -negativer (n= 4) Patienten wurden in Gegenwart von Monozyten / Makrophagen mit Gesamtantigenen von *H. pylori* (s. 3.4.1.) stimuliert.

1,5 - 2 x 10<sup>6</sup> intestinale T-Lymphozyten / ml (s. 3.6.2. und 3.6.3.) wurden mit 1% peripheren Blutmonozyten gleichen Gewebetyps (s. 3.6.1. und 3.7.1) und 20 µg/ml *H. pylori*-Antigen bzw. mit 10 µg/ml PHA als Mitogenkontrolle 24 Stunden wie unter 3.10.1. beschrieben inkubiert. Die Messung der Zytokinsekretion erfolgte wie im Kapitel 3.11.2. und 3.11.3. beschrieben. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des eindimensionalen Häufigkeitsdiagramms durchgeführt (s. 4.1.2.3.).

Der Einfluß von *H. pylori* auf die Zytokinsekretion der Mukosa-T-Lymphozyten wurde anhand der Intensitätsänderung der Zytokin Expression im Summensignal der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen für jedes Zytokin gemessen. Bild 8 zeigt graphisch die Änderungen der Fluoreszenzintensität in der CD4<sup>+</sup> Population der *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Gruppe, die nach der Stimulation mit den Gesamtantigenen auftrat. Die *H. pylori*-positive Gruppe weist keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion auf. Die Produktion von IFN $\gamma$  in der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozytenpopulation *H. pylori*-negativer Patienten steigt dagegen nach Stimulation um das fünffache an (p=0,023).



A.



B.

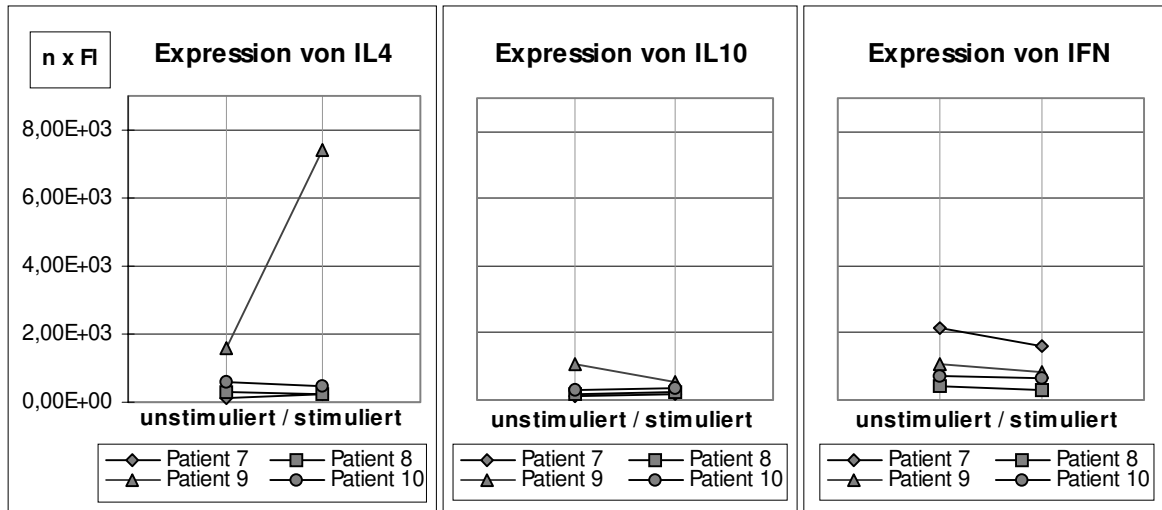
Bild 8: Aktivierungsgrad der CD4 positiven T-Lymphozyten vor und nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen

Aus der Lamina propria isolierte T-Lymphozyten wurden in Anwesenheit von PBMC mit *H. pylori*-Antigenen stimuliert und die Zytokinproduktion intrazellulär in der Durchflußzytometrie gemessen. Der Aktivierungsgrad der T-Zellen für die Sekretion von IFN $\gamma$ , IL4 und IL10 wurde vor und nach Stimulation errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen.

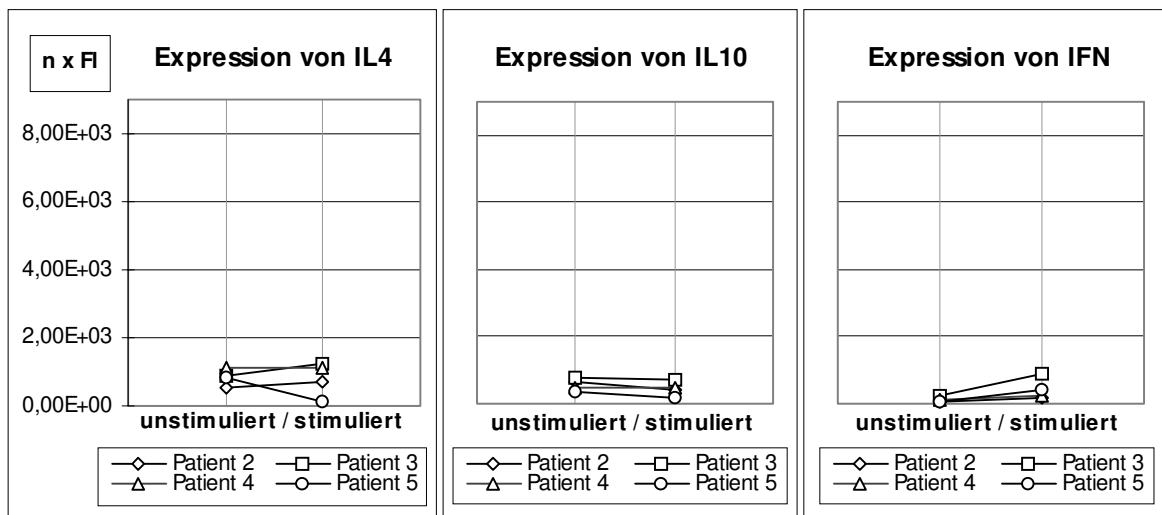
A. *H. pylori*-positive Patienten (n=4)

B. *H. pylori*-negative Patienten (n=4)

In Bild 9 ist die Änderung des Aktivierungsgrades bezüglich der Zytokinsekretion in der CD8<sup>+</sup> Population *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten vor und nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen graphisch dargestellt. Die Summensignale zeigen jedoch in dieser Population keine signifikanten Abweichungen.



A.



B.

Bild 9: Aktivierungsgrad der CD8 positiven T-Lymphozyten vor und nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen

Aus der Lamina propria isolierte T-Lymphozyten wurden in Anwesenheit von PBMC mit *H. pylori*-Antigenen stimuliert und die Zytokinproduktion intrazellulär in der Durchflußzytometrie gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität ( $n=3$ ) der Sekretion von IFN $\gamma$ , IL4 und IL10 CD8 $^+$  Zellen, die vor und nach Stimulation errechnet wurde.

A. *H. pylori*-positive Patienten ( $n=4$ )

B. *H. pylori*-negative Patienten ( $n=4$ )

Nur in der CD4 positiven Lymphozytengruppe *H. pylori*-negativer Patienten bewirkte die Stimulation der Zellen mit *H. pylori*-Antigenen einen Anstieg in der IFN $\gamma$  Produktion. Die Sekretion der übrigen Zytokine wurde nicht beeinflusst.

#### 4.1.4. Erstellung eines Typ I / Typ II Profils der T-Lymphozyten aus der Lamina propria

Die vorangegangenen Experimente erlaubten eine Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, die in der Mukosa *H. pylori*-infizierter Patienten zu finden sind. Mit Hilfe der intrazellulären Durchflußzytometrie wurde der Phänotyp der Lymphozyten mit gleichzeitiger Zuordnung der Sekretion von Zytokinen auf dem Einzelzellniveau bestimmt. Hier war insbesondere die Sekretion von IFN $\gamma$  durch T-Lymphozyten stark erhöht. Eine Zuordnung der T-Lymphozyten zu einer Typ I / Typ II Subpopulation ist aber nicht möglich, da eine Typ 0 Population, die ebenfalls IFN $\gamma$  aber auch IL4 und IL10 produziert, von diesen nicht abgetrennt werden kann.

Die Zuordnung *H. pylori*-spezifischer Lymphozyten zu einer Typ I- oder Typ II-Subpopulation und der Nachweis der Antigenpezifität der Immunreaktion gelingt mit der Technik der Klonierung. Hierbei expandiert eine Zellpopulation, die auf eine einzige Ursprungszelle zurückzuführen ist. Die Charakterisierung der klonierten *H. pylori*-spezifischen T-Lymphozytenlinien findet sowohl phänotypisch als auch funktionell anhand der Expression von IFN $\gamma$ , IL4 und IL10 statt. Die Effektorfunktion wird einerseits auf der Peptidebene und andererseits auf der Transkriptionsebene charakterisiert.

##### 4.1.4.1. Erstellung eines T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Profils auf der Peptidebene

Intestinale mononukleäre Zellen *H. pylori*-positiver Patienten (Patient 6 und 7) und *H. pylori*-negativer Patienten (Patient 1 und 2) wurden, wie im Kapitel 3.6.2. beschrieben, isoliert. Nach der Aufreinigung der mononukleären Zellen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.6.1.) wurden die Monozyten/Makrophagen durch Adhäsion abgetrennt (s. 3.7.1.), so daß die verbliebene Population nach der mikroskopischen Kontrolle (s. 3.9.4.) und der Kontrolle im Zellzählgerät (s. 3.9.1.) zu 80% aus Lymphozyten bestand. Die T-Lymphozyten wurden dann über eine Nylonsäule von B-Lymphozyten getrennt (s. 3.6.3.). Eine durchflußzytometrische Analyse ergab nur 2 - 5% CD19-positive Zellen. Die restlichen 95% waren CD3-



positiv. Die Vitalitätskontrolle wurde mit Propidiumiodid durchgeführt (s. 3.9.3.) und betrug 98%.

Die Etablierung *H. pylori*-spezifischer T-Zelllinien erfolgte über die Klonierung und Expandierung der isolierten Zellen wie im Kapitel 3.13. beschrieben. Dabei erfolgte die Selektion der expandierenden Zellen nach der Antigen-spezifität. Denn durch die angewandte Technik, wurde IL2 nur diskontinuierlich verabreicht, während die Antigene stetig zugegeben wurden. So konnten aus Zellen, die keine Antigene bekamen, keine Klone etabliert werden.

Aus der eingesetzten T-Zellpopulation *H. pylori*-positiver Patienten (n=2) wurden durch Reklonierung 58 *H. pylori*-spezifische Klone des Patienten 6 und 54 Klone vom Patienten 7 etabliert. In der Gruppe der *H. pylori*-negativen Individuen konnten 4 Klone aus den T-Zellen des Patienten 1 und 21 Klone aus den T-Zellen des Patienten 2 expandiert werden.

Die T-Zelllinien wurden zuerst mit dem CD4 bzw. CD8 Oberflächenmarker charakterisiert und so den Subpopulationen T-Helfer bzw. zytotoxische / T-Suppressor-Zellen zugeordnet. Tabelle 8 gibt die Anzahl der klonierten CD3<sup>+</sup> Subpopulationen wieder.

Tab. 8: Phänotypische Charakterisierung der *H. pylori*-spezifischen Klone

	Anzahl der Klone	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Patient 1 ( <i>H. pylori</i> -)	4	4 (100%)	0
Patient 2 ( <i>H. pylori</i> -)	21	20 ( 95%)	1 ( 5%)
Patient 6 ( <i>H. pylori</i> +)	51	44 ( 87%)	7 (13%)
Patient 7 ( <i>H. pylori</i> +)	58	49 ( 84%)	9 (16%)

Die Untersuchung des T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Profils bzw. des Typ I / Typ II Profils dieser Klone wurde funktionell anhand des Zytokinspiegels mit gleichzeitiger Phänotypbestimmung auf dem Niveau einer Einzelzelle vorgenommen. Hier kam die intrazelluläre Durchflußzytometrie zur Anwendung (s. 3.11.).

Die Analyse erfolgte im zweidimensionalen Punkthistogramm zur Ermittlung der Anzahl der sezernierenden Zellen und im eindimensionalen Häufigkeitsdiagramm zur Ermittlung der Intensität der Zytokinproduktion. Bild 10 stellt graphisch die prozentuale Verteilung der  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  und  $T_{H0}$  Lymphozyten-subpopulationen in der gesamten klonierten  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  Population dar. Die Klonierung folgt einem Zufallsprinzip, so daß das erhaltene Profil der Subpopulationen als beispielhaft zu werten ist.

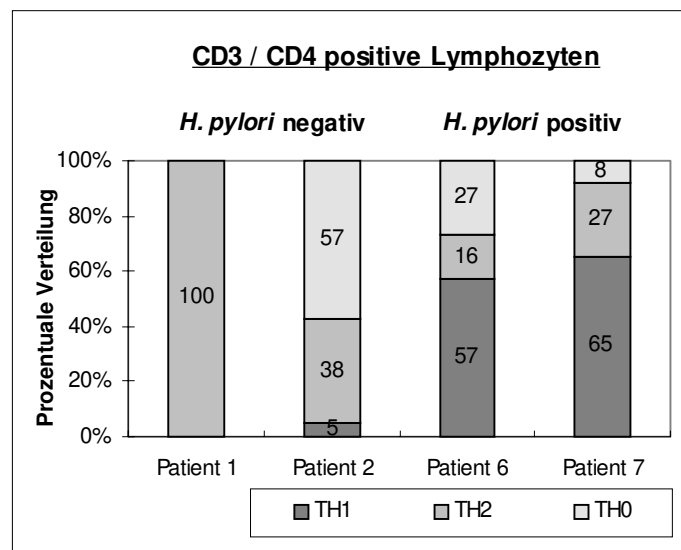


Bild 10: Profil der *H. pylori*-spezifischen  $CD4$  positiven Klone

Für die klonierten und expandierten *H. pylori*-spezifischen T-Lymphozytenlinien aus der Lamina propria des humanen Antrums *H. pylori*-positiver ( $n=2$ ) und -negativer ( $n=2$ ) Patienten wurde anhand der Produktion von  $IFN\gamma$ , IL4 und IL10 ein  $T_{H1}$  /  $T_{H2}$  Profil erstellt. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der charakterisierten Subpopulationen in der  $CD4^+$  Gesamtpopulation.

Aus der Mukosa der *H. pylori*-positiven Gruppe wurden 57  $T_{H1}$  Klone etabliert. Sie setzen sich aus 25 = 57% (Patient 6) und 32 = 65% (Patient 7) Klonen zusammen, die aufgrund ihrer  $IFN\gamma$  Sekretion dieser Subpopulation zugeordnet wurden. Der  $T_{H2}$  Subpopulation (Sekretion von IL4 und IL10) konnten 20 Zelllinien zugeordnet werden, die sich aus 7 = 16% (Patient 6) und 13 = 27% (Patient 7) Klonen zusammensetzten. Die 16  $T_{H0}$  Klone, bei denen  $IFN\gamma$ , IL4 und IL10 detektiert wurde, bestehen aus 12 = 27% Klonen vom Patienten 6 und 4 = 8%

Klonen vom Patienten 7. Die Häufigkeit der etablierten T-Zelllinien vom T<sub>H</sub>1 Typ in der *H. pylori*-positiven Gruppe weist präferentiell auf eine zelluläre Immunantwort hin.

Bei *H. pylori*-negativen Patienten wurden vorwiegend T-Helferzellen mit einem T<sub>H</sub>0 / T<sub>H</sub>2 Profil kloniert. T-Zellklone vom Patienten 1 zeigen alle ein T<sub>H</sub>2 Profil (4 Klone). Vom Patienten 2 wurden 8 Klone = 38% mit einem T<sub>H</sub>2 Zytokinmuster, 12 = 57% Klone vom T<sub>H</sub>0 Typ und ein T<sub>H</sub>1 Klon etabliert.

Die Klonierung der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten etablierte nur einen Klon, der das Typ II-Zytokinmuster aufweist, vom *H. pylori*-negativen Patienten 2. In der Expansion der Klone von *H. pylori*-positiven Patienten ist keine Tendenz zu erkennen. Bei Patient 6 wurden 6 T<sub>H</sub>1 Klone und 1 T<sub>H</sub>2 Klon generiert, bei Patient 7 dagegen 6 T<sub>H</sub>2, 1 T<sub>H</sub>1 und 2 T<sub>H</sub>0 CD8 positive T-Lymphozytenlinien etabliert. Bild 11 zeigt die prozentuale Verteilung der anhand ihres Zytokinmusters definierten Subpopulationen in der gesamten CD8<sup>+</sup> Population.

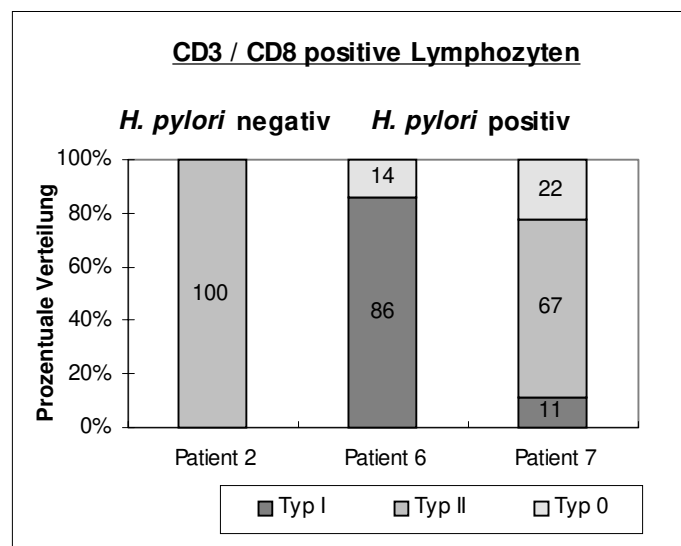


Bild 11: Profil der *H. pylori*-spezifischen CD8 positiven Klone

Für die klonierten und expandierten *H. pylori*-spezifischen T-Lymphozytenlinien aus der Lamina propria des humanen Antrums *H. pylori*-positiver (n=2) und -negativer (n=1) Patienten wurde anhand des Zytokinmusters ein Typ I / Typ II Profil erstellt. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der charakterisierten Subpopulationen in der CD8<sup>+</sup> Gesamtpopulation.

Zusammenfassend ergaben die Profiluntersuchungen, daß von *H. pylori*-positiven Patienten vorwiegend *H. pylori*-spezifische T<sub>H</sub>1-Lymphozyten kloniert werden konnten, während die Klone *H. pylori*-negativer Patienten ein T<sub>H</sub>0 / T<sub>H</sub>2 Profil zeigen.

Von den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnten von *H. pylori*-positiven Patienten alle drei Typen kloniert werden, während nur ein Klon des Typ II eines *H. pylori*-negativen Patienten etabliert werden konnte.

#### 4.1.4.2. Bestätigung des T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Profils auf der Transkriptionsebene

Auf dem Peptidniveau konnte eine Polarität der geklonten Populationen anhand ihres Zytokinmusters festgestellt werden. Ausgehend von einer Zelle wurden Zytokinmuster einer einzelnen Population erstellt, die dann einer Effektorpopulation zugeordnet werden konnte. Durch den Aufbau einer cDNA-Bank eröffnete sich die Möglichkeit, Informationen über die Zytokinexpression aus einer einzelnen Zelle auf der Transkriptionsebene zu erhalten.

Hierzu wurden die Lymphozytenklone mit 20 µg *H. pylori*-Antigenen für 12 Stunden restimuliert. Die Gesamt-mRNA wurde direkt aus 1,5 x 10<sup>5</sup> klonierten T-Lymphozyten mit paramagnetischen Oligo-dT-Dynabeads<sup>®</sup> isoliert (s. 3.15.2). Die Konstruktion der Festphasen-cDNA-Bank erfolgte gekoppelt an paramagnetische Partikel, die eine mehrmalige Verwendung der cDNA für die RT-PCR ermöglichten (s. 3.22.1.).

Nach der Synthese der Erststrang-cDNA durch die AMV-Reverse-Transkriptase, die kovalent an der Oberfläche der Partikel gebunden blieb, wurde zunächst zur Amplifikation spezifischer IFN $\gamma$ , IL4 und IL10 mRNA der komplementäre Strang mit spezifischen Primern synthetisiert, der dann in die Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt wurde (s. 3.22.2.2). Die Kontrollen sind im Kapitel 3.22.2.3. aufgeführt.

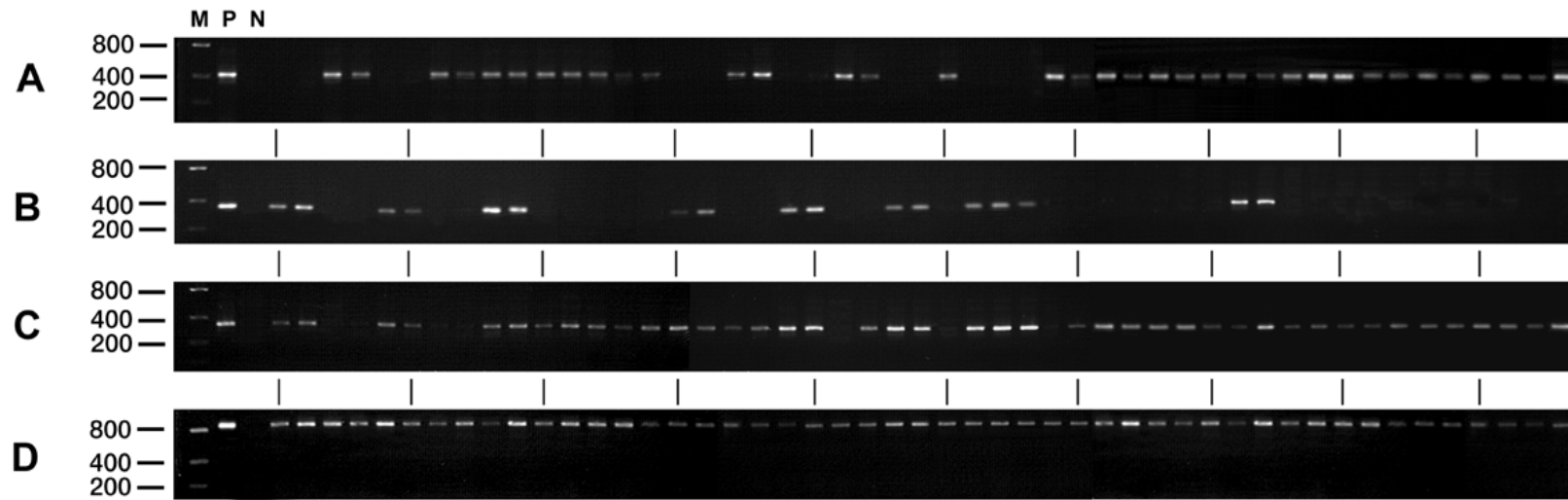


Bild 12: T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Profil eines *H. pylori*-positiven Patienten auf der Ebene der Transkription

Im Agarosegel (2%) aufgetrennte PCR-Amplifikate von IFN $\gamma$  (A), IL4 (B), IL10 (C) und  $\beta$ -Actin (D) cDNA der T-Lymphozytenklone des *H. pylori*-positiven Patienten 7. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l PCR-Produkt aufgetragen. IFN $\gamma$  bildet eine Bande bei 427 bp, IL4 bei 344 bp und IL10 bei 328 bp.  $\beta$ -Actin läuft bei 838 bp.

Spur M: Marker (bp): 400 bp  $\rightarrow$  40 ng  
 Spur P: PCR-Positivkontrolle  
 Spur N: PCR-Negativkontrolle  
 folgende Spuren: CD4<sup>+</sup> Klone

Im Bild 12 ist repräsentativ die amplifizierte IFN $\gamma$  (A), IL4 (B) und IL10 (C) cDNA sowie  $\beta$ -Actin cDNA (D) der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klone des *H. pylori*-positiven Patienten (7) gezeigt (n=2). Anhand des Expressionsmusters der Zytokine wurde der Klon der entsprechenden Subpopulation zugeordnet.

Bild 13 demonstriert repräsentativ die Amplifikation der mRNA von IFN $\gamma$ , IL4, IL10 und  $\beta$ -Actin der CD4 positiven Klone des *H. pylori*-negativen Patienten 2 (n=2). Anhand der Zytokin Expression wurde der Klon einem Effektortyp zugeordnet.

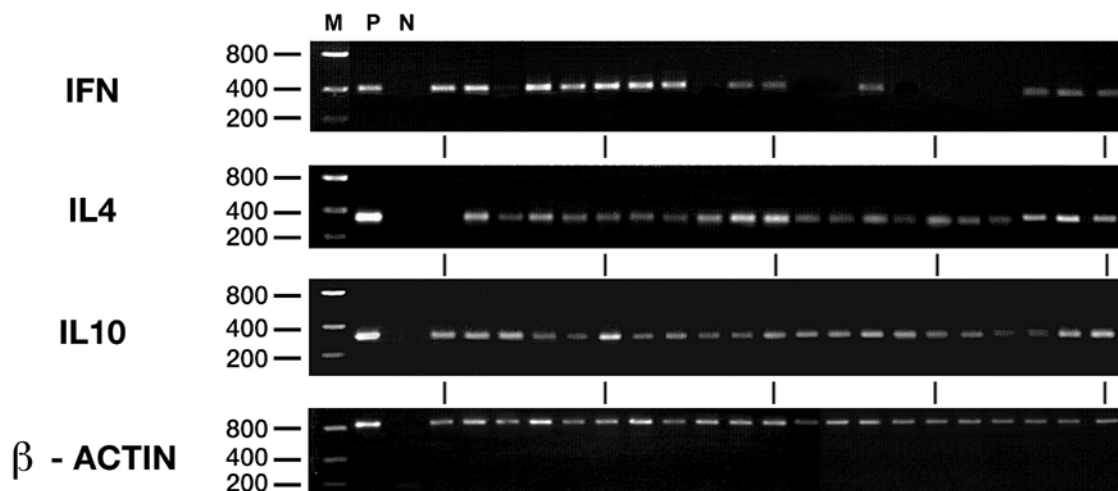


Bild 13: T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Profil eines *H. pylori*-negativen Patienten auf der Ebene der Transkription

Im 2%igen Agarosegel aufgetrennte PCR-Amplifikate von IFN $\gamma$ , IL4, IL10 und  $\beta$ -Actin mRNA der T-Lymphozytenklone des *H. pylori*-negativen Patienten 2. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l PCR-Produkt aufgetragen. IFN $\gamma$  bildet eine Bande bei 427 bp, IL4 bei 344 bp und IL10 bei 328 bp.  $\beta$ -Actin läuft bei 838 bp.

Spur M: Marker (bp): 400 bp  $\rightarrow$  40 ng

Spur P: PCR-Positivkontrolle

Spur N: PCR-Negativkontrolle

folgende Spuren: Klone

Die auf der Peptidebene charakterisierten Typ I - Populationen, die IFN $\gamma$  produzieren, aber kein IL4 und kein IL10, transkribieren die mRNA für IFN $\gamma$ , aber auch für IL10. Als Typ II definierte Klone, die IL4 und IL10, jedoch kein IFN $\gamma$  exprimieren, zeigen auf der Transkriptionsebene das gleiche Bild: IL4 und IL10 mRNA wurde detektiert. Es wurden aber keine IFN $\gamma$  Transkripte nachgewiesen. Die Typ 0 Subpopulationen entsprechen sich ebenfalls auf der Translations- und

Transkriptionsebene.  $\beta$ -Actin mRNA konnte erwartungsgemäß in allen Zellen amplifiziert werden.

Die aufgenommenen Peptidsignale eines expandierten Klons wurden auf dem mRNA-Niveau in einer Zelle detektiert. Die Synthese der Zytokine IFN $\gamma$  und IL4 erfolgt dabei über die Regulierung der Transkription. Die IL10 Produktion wird posttranskriptionell gesteuert.

Die klonierten *H. pylori*-spezifischen T-Lymphozytenlinien von *H. pylori*-positiven Patienten sind größtenteils der T<sub>H</sub>1 Subpopulation zuzuordnen. Klone *H. pylori*-negativer Patienten zeigen dagegen ein T<sub>H</sub>2 / T<sub>H</sub>0 Profil.

#### **4.2. Bedeutung von Monozyten / Makrophagen in der *H. pylori*-Infektion**

Die Induktion von Zytokinen und damit die Regulierung der Immunreaktion ist multifaktoriell. Nicht nur das Antigen sondern auch das Zytokinmilieu sind prägend für die Differenzierung von Typ I und Typ II T-Lymphozytensubpopulationen und damit für die Entwicklung einer Abwehr.

In der *H. pylori*-assoziierten Entzündung wurde eine deutliche Polarität in der Population der T-Lymphozyten festgestellt, die auf eine Induktion einer zellvermittelten Immunantwort hinweist. Doch sezernieren nicht nur T-Lymphozyten die regulierenden Zytokine. Die Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion ist neben dem Antigen besonders von Monozyten / Makrophagen abhängig (HEINZEL, 1995; TRINCHIERI, 1993).

Der Einfluß der professionellen antigenpräsentierenden Zellen wurde anhand der Mediatorfreisetzung untersucht. Besonders wichtig sind hier die antagonistischen Zytokine IL10 (T<sub>H</sub>2) und IL12 (T<sub>H</sub>1), die die Differenzierung der Immunantwort wesentlich beeinflussen (BELARDELLI, 1995; DOHERTY, 1995).

Innerhalb der isolierten mononukleären Zellen des Antrums *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten (s. 3.6.2.) wurden Monozyten / Makrophagen anhand ihrer

Oberflächenmarker CD15 und CD16 charakterisiert. Tabelle 9 gibt die evaluierten Populationen der Monozyten / Makrophagen für jeden Patienten wieder. Aus dem Gewebe *H. pylori*-positiver Patienten konnte die sechsfache Menge an Monozyten / Makrophagen isoliert werden ( $p < 0,0001$ ).

Tab. 9: Menge der isolierten Monozyten / Makrophagen

<b>Patient 1</b>	<b>Patient 2</b>	<b>Patient 3</b>	<b>Patient 4</b>	<b>Patient 5</b>
$2,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$9 \times 10^5$
<b>Patient 6</b>	<b>Patient 7</b>	<b>Patient 8</b>	<b>Patient 9</b>	<b>Patient 10</b>
$8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$8 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$1 \times 10^7$

Aus der Lamina propria isolierte Monozyten / Makrophagen wurden aufgereinigt und mikroskopisch überprüft. Dargestellt sind die mit einem elektronischen Zählgerät ermittelten Zellzahlen / 1g Frischgewicht.

Patienten 1 - 5: *H. pylori* negativ (n=5)

Patienten 6 - 10: *H. pylori* positiv (n=5)

#### 4.2.1. Charakterisierung der Mediatorfreisetzung von Monozyten / Makrophagen

Die Analyse der Zytokinproduktion erfolgte mit Hilfe der intrazellulären Durchflußzytometrie auf dem Einzelzellniveau wie es im Kapitel 4.1.2. für Lymphozyten beschrieben wurde. Hierbei wurden die Zellen zuerst mit CD15 und CD16 Antikörpern markiert, danach folgte die Detektion des intrazellulären  $T_H1$  steuernden Zytokins IL12 und des  $T_H2$  Zytokins IL10.

Das Kontingent der IL12 und IL10 produzierenden Monozyten / Makrophagen in der Gesamtpopulation wurde anhand der Formel im Kapitel 4.1.2.2. prozentual ermittelt. Im Bild 14 sind die Mittelwerte der sezernierenden Populationsgrößen der Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer (n=4) und *H. pylori*-positiver Patienten (n=3) dargestellt.



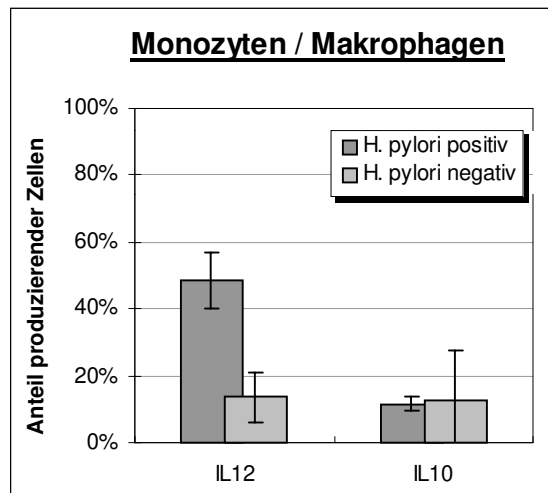


Bild 14: Prozentualer Anteil der IL12 bzw. IL10 produzierenden Monozyten/Makrophagen in der Gesamtpopulation *H. pylori*-positiver und *H. pylori*-negativer Patienten

Monozyten / Makrophagen aus der Mukosa von *H. pylori*-positiven (n=3) und *H. pylori*-negativen (n=4) Personen wurden in der intrazellulären FACS-Analyse untersucht (drei Messungen). Die dargestellten prozentualen Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung geben die Größe der produzierenden Zellpopulation wieder.

Der Anteil der Monozyten / Makrophagen in der Lamina propria *H. pylori*-positiver Patienten, die das Zytokin IL12 synthetisieren, beträgt 48%. Er ist um 35% größer als der Anteil IL12 sezernierender Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer Patienten ( $p=0,002$ ).

Hinsichtlich der Größe der IL10 sezernierenden Zellpopulationen in der Lamina propria beider untersuchten Patientengruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Sie betragen 7% und 8% der Gesamtpopulation von Monozyten / Makrophagen.

Vergleicht man aber die Größe der IL10 und IL12 sezernierenden Monozyten / Makrophagen innerhalb einer Patientengruppe, so fällt auf, daß die IL12 produzierende Zellpopulation in der *H. pylori*-positiven Gruppe um 41% größer ist als die IL10 sezernierende Population ( $p=0,002$ ). Innerhalb der *H. pylori*-negativen Gruppe gibt es diesen Unterschied nicht.

#### 4.2.2. Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die Effektorfunktion von Monozyten / Makrophagen

Auch die antigenpräsentierenden Zellen werden durch das vorhandene Zytokinmilieu in ihrer Effektorfunktion inhibiert oder aktiviert. Diese wird aber auch direkt durch ein Antigen gesteuert.

Der Einfluß von *H. pylori* auf die Effektorfunktion der Monozyten / Makrophagen wurde in Stimulationsexperimenten untersucht.  $0,5 - 1 \times 10^6$  Monozyten / Makrophagen / ml (s. 3.6.2.) wurden mit 20 µg/ml *H. pylori*-Antigen bzw. mit 10 µg/ml PHA als Mitogenkontrolle 24 Stunden, wie unter 3.10.1. beschrieben, inkubiert. Nach der Messung der Zytokinsekretion (s. 3.11.2. und 3.11.3.) erfolgte die statistische Auswertung. Die Änderung des Aktivierungsgrades, also der Mediatorensekretion, der untersuchten Zellpopulationen nach der Stimulation mit *H. pylori* wurde wie unter 4.1.2.3. mit Hilfe des eindimensionalen Häufigkeitsdiagramms als Änderung des Summensignals der Zytokin Expression einer Makrophagenpopulation bestimmt.

Die Bilder 15a und c zeigen graphische Darstellungen der Summensignale der Sekretion von IL10 und IL12 in den Makrophagenpopulationen *H. pylori*-positiver (n=3) und *H. pylori*-negativer Patienten (n=4) vor und nach der Stimulation mit den eingesetzten Antigenen. Unstimulierte Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-positiver Patienten sezernieren IL12 mit vierfacher Intensität im Vergleich zur Basisexpression der untersuchten Populationen der *H. pylori*-negativen Patientengruppe (p=0,022).

Die Aktivierung mit *H. pylori*-Antigenen ergab keine signifikante Änderung des Aktivierungsgrades in beiden Patientengruppen, obwohl in der *H. pylori*-negativen Gruppe bei allen Patienten ein Anstieg der IL12 Sekretion zu beobachten ist. Nur Patient 3, der nicht mit *H. pylori* infiziert ist, zeigt eine deutliche Reaktion auf die Stimulation, die einen Anstieg der IL12 Produktion auf das sechsfache mit gleichzeitiger Hemmung der IL10 Synthese bewirkt.

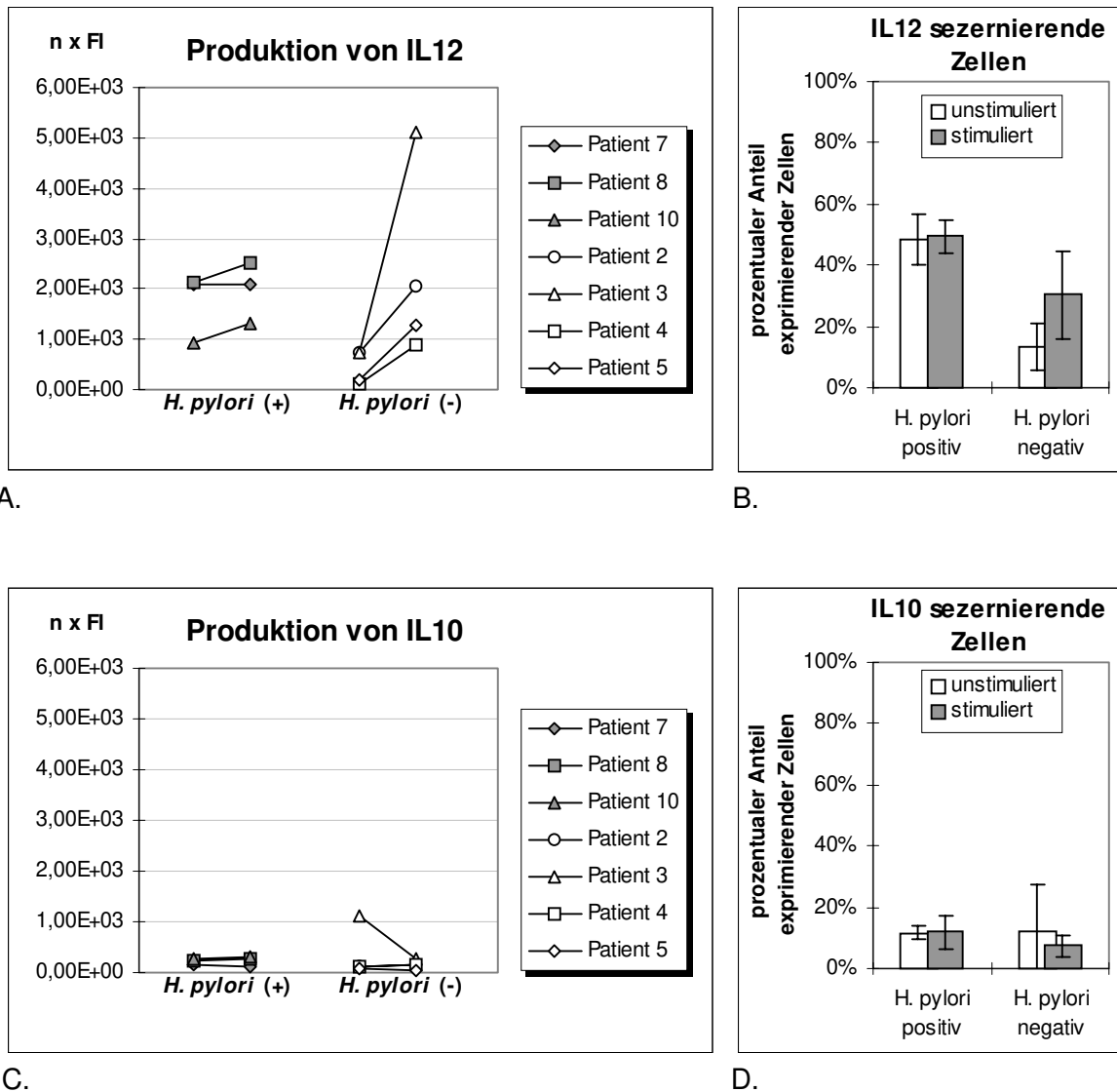


Bild 15: Zytokin-Expression von Monozyten / Makrophagen vor und nach der Stimulation mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen

Mononukleäre Isolate aus der Lamina propria *H. pylori*-positiver ( $n=3$ ) und -negativer ( $n=4$ ) Patienten wurden mit  $20 \mu\text{g}$  *H. pylori*-Oberflächenantigenen stimuliert und der Aktivierungsgrad der Mediatorensekretion in der Durchflußzytometrie ( $n=3$ ) bestimmt. Dargestellt sind die Summensignale für IL12 (A.) und IL10 (C.) sowie der Anteil sezernierender Monozyten / Makrophagen (IL12: B.; IL10: D.) vor und nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen.

Eine signifikante Veränderung ist aber im Profil der Monozyten / Makrophagen Population zu verzeichnen. Nach der Aktivierung dieser Zellen durch ein *H. pylori*-Antigen ist der Anteil an IL12 produzierenden antigenpräsentierenden Zellen in der

*H. pylori*-negativen Gruppe von 13% auf 30% ( $p=0,009$ ) angestiegen, während die IL10 produzierende Population keine signifikanten Unterschiede zeigte (s. Bild 15b und d).

Aus den beschriebenen Experimenten wird ersichtlich, daß *H. pylori* direkt die naive Monozyte / Makrophage zur Synthese von IL12 aktiviert.

#### **4.3. Epithelzellen und ihre Bedeutung in der *H. pylori*-Infektion**

Das Epithelium stellt als "first line of defence" die einzige direkte Kontaktstelle des Bakteriums mit dem Wirtsgewebe. Die Interaktion von *H. pylori* mit den Epithelzellen (WAGNER ET AL., 1994) führt zu deren Aktivierung und Mediatorfreisetzung. Da sie massiv mit löslichen und unlöslichen *H. pylori*-Antigenen in Berührung kommen, können sie außerdem als nicht professionelle antigenpräsentierende Zellen fungieren (BRANDTZAEG ET AL., 1988). Das Epithel kann also auch in der Immunmodulation eine Rolle spielen.

Vor diesem Hintergrund wurden die Epithelzellen *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten von der Lamina propria wie beschrieben (s. 3.6.2.) abgetrennt und aufgereinigt (s. 3.8.). Die Beschaffenheit und Reinheit der Populationen wurde mikroskopisch (s. 3.9.4.) und mit dem elektronischen Zellzählgerät (s. 3.9.1.) überprüft. In Tabelle 10 sind die Mengen der einzelnen isolierten Epithelzellen aus 1g Frischgewicht Gewebe zusammengestellt.

Tab. 10: Menge der isolierten Epithelzellen

<b>Patient 1</b>	<b>Patient 2</b>	<b>Patient 3</b>	<b>Patient 4</b>	<b>Patient 5</b>
8,2 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>	8,7 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>6</sup>
<b>Patient 6</b>	<b>Patient 7</b>	<b>Patient 8</b>	<b>Patient 9</b>	<b>Patient 10</b>
3,2 x 10 <sup>7</sup>	5 x 10 <sup>7</sup>	8,4 x 10 <sup>6</sup>	6,7 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>

Die Epithelzellen wurden nach Ablösung des Mukus mit DTT unter Schütteln bei 37°C mit Hilfe von EDTA abgelöst. Sie wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation von Zellaggregaten und Debris gereinigt. Aufgeführt sind die isolierten Zellmengen / 1g Gewebe.

Patienten 1- 5: *H. pylori* negativ (n=5)  
 Patienten 6 - 10: *H. pylori* positiv (n=5)

#### **4.3.1. Antigenpräsentation der Epithelzellen in einer *Helicobacter pylori*-assozierten Entzündung**

Die Epithelien einer *H. pylori*-positiven (n=4) und -negativen (n=4) Gruppe wurden funktionell über die Expression von MHC I und MHC II charakterisiert. Dabei wurde einmal die Größe der exprimierenden Population innerhalb der Gesamtpopulation der Epithelzellen prozentual bestimmt. Ferner wurde die Dichte der Expression anhand der Fluoreszenzintensität im Summensignal festgestellt.

Die Messung der Expression dieser Histokompatibilitätsmoleküle erfolgte in der Durchflußzytometrie, nachdem die Epithelzellen nach ihrer Größe und Lichtbrechung im Meßfenster eingegrenzt worden waren (s. 3.11.1. und 3.11.3.). Der Anteil der exprimierenden Population wurde anhand der zweidimensionalen Punktdiagramme prozentual errechnet (s. 4.1.2.2.) und das Summensignal der Expression von MHC im Häufigkeitsdiagramm ermittelt (s. 4.1.2.3.).

Wie im Bild 16 zu sehen ist, bilden im Mittel 86% der untersuchten Epithelzellen sowohl in der *H. pylori*-positiven als auch in der -negativen Patientengruppe

MHC I. MHC II Moleküle werden dagegen von 45% der Epithelzellen *H. pylori*-negativer Patienten und von 66% der Epithelzellen in der *H. pylori*-positiven Patientengruppe exprimiert.

Die Dichte der exprimierten Histokompatibilitätsmoleküle Klasse I ist auf den Epithelzellen *H. pylori*-positiver Patienten dreimal größer als auf den Epithelien in der *H. pylori*-negativen Gruppe ( $p=0.0005$ ). Auch die Intensität der Expression von MHC II Molekülen ist auf den *H. pylori*-positiven Epithelien 2,5 mal stärker als in der Vergleichsgruppe ( $p=0,008$ ). Da MHC I Moleküle von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, MHC II Moleküle jedoch erst nach einer Antigenstimulation, deutet die verstärkte MHC II Expression *H. pylori*-positiver Epithelien auf die antigenpräsentierende Funktion der Epithelzellen hin.

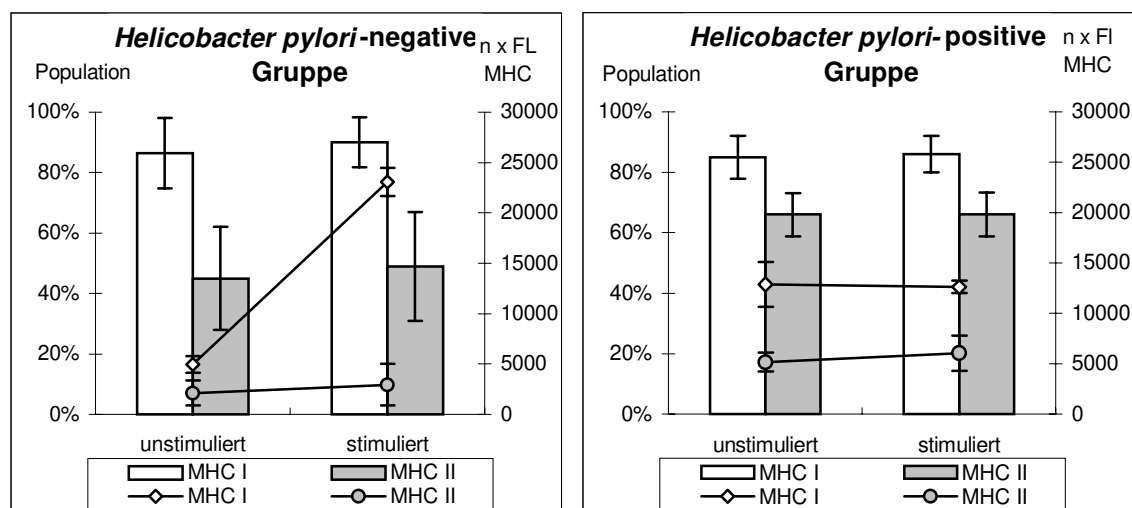


Bild 16: Expression und Dichte von Histokompatibilitätsmolekülen der Klassen I und II auf Epithelien vor und nach Stimulation mit *Helicobacter pylori*

Epithelzellen *H. pylori*-positiver ( $n=4$ ) und *H. pylori*-negativer ( $n=4$ ) Patienten wurden anhand der Dichte und Expression von MHC I und MHC II charakterisiert. Es sind die Mittelwerte der prozentualen Größen der exprimierenden Epithelzellpopulationen innerhalb der gesamten Epithelzellen in einer Patientengruppe dargestellt (linke Y-Achse, Säulendiagramm) und die Mittelwerte der Dichte der MHC-Expression (rechte Y-Achse, Punktdiagramm) als Summensignal. Die Charakteristika wurden vor und nach Stimulation mit *H. pylori* graphisch dargestellt.

Der direkte Einfluß von *H. pylori* auf die Expression der MHC-Moleküle wurde in Stimulationsversuchen untersucht.  $5 \times 10^5$  Epithelzellen wurden 24 Stunden mit

20 µg / ml *H. pylori*-Oberflächenantigen stimuliert (s. 3.10.1.). Als Maß für die Dichte der Expression der Histokompatibilitätsmoleküle wurde die Fluoreszenzintensität im Summensignal der exprimierenden Epithelzellpopulation bestimmt (s. 4.1.2.3.), sowie die Größe der exprimierenden Population nach der Antigenstimulation (s. 4.1.2.2.).

Die Stimulation der Epithelien führte zur fünffach verstärkten Expression der MHC I Moleküle auf Epithelzellen *H. pylori*-negativer Patienten ( $p < 0,0001$ ). Es gab aber keine Änderungen im MHC I / MHC II Profil der Populationen. Die Dichte der MHC II Moleküle auf Epithelzellen *H. pylori*-negativer Patienten ist zwar angestiegen, ist aber nicht signifikant ( $p=0,052$ ). Es wird dennoch deutlich, daß das Epithel in einer *H. pylori*-Infektion eine Funktion als nicht-professionelle antigepräsentierende Zellpopulation innehat.

#### **4.3.2. Aktivierung von Epithelzellen zur Mediatorsekretion in *Helicobacter pylori*-infiziertem Gewebe**

Die Rolle der Epithelien in der Beeinflussung der Immunreaktion während einer *H. pylori* Infektion wurde anhand der Sekretion von dem potenten Zytokin IL12 untersucht, da dieses Zytokin den größten Stellenwert in der Steuerung der zellulären Immunabwehr einnimmt.

Die unstimulierten und stimulierten Epithelzellen (s. 4.3.1.) wurden mittels intrazellulärer Durchflußzytometrie (s. 3.11.2. und 3.11.3.) hinsichtlich der Synthese von IL12 auf dem Einzelzellniveau untersucht. Das Kontingent der IL12 produzierenden Epithelzellen in den Gesamtpopulationen *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten wurde prozentual bestimmt (s. 4.1.2.2.). Ebenso wurde die Intensität der IL12 Produktion wie unter 4.1.2.3. statistisch ermittelt.

Bild 17 faßt graphisch die Aktivität der Epithelzellen in der *H. pylori*-positiven ( $n=4$ ) und -negativen ( $n=4$ ) Patientengruppe zusammen. 43% der Epithelzellen *H. pylori*-positiver Patienten exprimieren IL12. Das sind 28% mehr als in der *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe ( $p=0,02$ ). Im Vergleich zu diesen Epithelzellen

wurde auch eine vierfach erhöhte Sekretion von IL12 durch das *H. pylori*-positive Epithel festgestellt ( $p=0,003$ ).

Stimulationsversuche mit *H. pylori* führten zu keinen signifikanten Änderungen der Aktivität der Epithelzellen innerhalb der *H. pylori*-positiven Gruppe. Das Epithel nicht infizierter Patienten dagegen zeigte einerseits einen fünffachen Anstieg in der Produktion von IL12 ( $p=0,03$ ) und andererseits eine signifikante Vermehrung der Anzahl der IL12 synthetisierenden Epithelzellen von 15% auf 54% ( $p=0,019$ ).

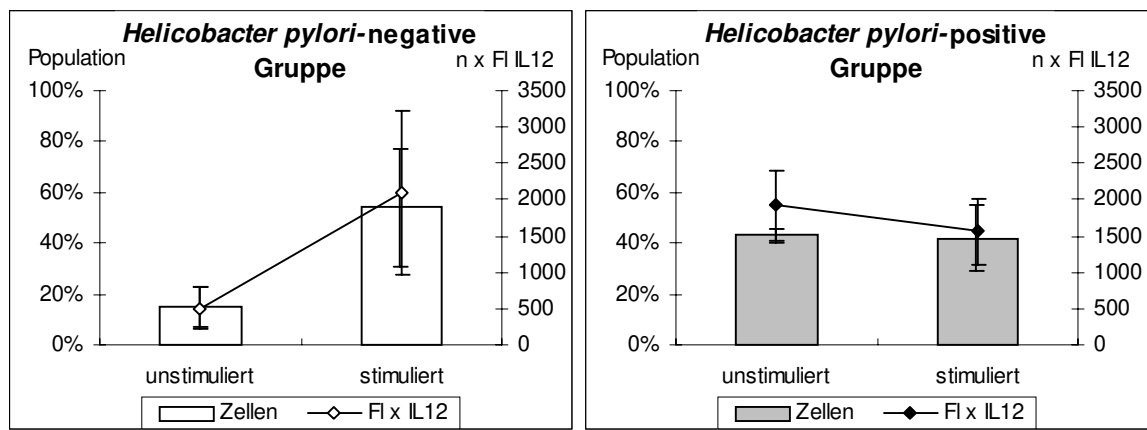


Bild 17: Expression von IL12 innerhalb einer Population von Epithelzellen

Dargestellt sind die Mittelwerte der IL12 exprimierenden Populationen innerhalb einer Gesamtpopulation von Epithelzellen *H. pylori*-positiver ( $n=4$ ) und -negativer ( $n=4$ ) Patienten (linke Y-Achse, Säulendiagramm) sowie die Intensität der Zytokin-Expression anhand des Summensignales (rechte Y-Achse, Punktdiagramm) vor und nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen. Die einzelnen Messwerte wurden mittels Durchflußzytometrie in dreifacher Wiederholung ermittelt.

Die Stimulierung der Epithelzellen *H. pylori*-negativer Patienten zur Sekretion von IL12 läßt sich auf eine direkte Beeinflussung des Epitheliums durch dieses Bakterium zurückführen.



### 4.3.3. Aktivierung der Epithelzellen zur Sekretion von IL12 auf der Transkriptionsebene

Der Nachweis der IL12 mRNA in Epithelzellen *H. pylori*-positiver (n=4) und -negativer Patienten (n=4) ermöglicht den Ausschluß von Artefakten wie eine mögliche Kreuzreaktivität von Antikörpern. Auf der Transkriptionsebene wird das Peptidsignal in Form eines Transkripts aufgenommen und semiquantifiziert.

Dazu wurde aus  $2 \times 10^5$  Epithelzellen die mRNA mit Hilfe der paramagnetischen Partikel direkt isoliert (s. 3.15.2.) und zur cDNA transkribiert (s. 3.22.1.). Die Amplifikation der an die Partikel gekoppelten IL12 cDNA erfolgte in der PCR in Anwesenheit von 3' und 5' Primern, die für die biologisch wichtige p40 Untereinheit von IL12 spezifisch sind (D'ANDREA ET AL.; 1992) (s. 3.22.2. und 3.22.3.). Untersucht wurden sowohl unstimulierte Epithelzellen als auch Epithelien, die zur mRNA Produktion 4,5 Stunden mit  $20 \mu\text{g}$  *H. pylori*-Oberflächenantigen stimuliert (s. 3.10.1.) worden waren.

Tab. 11: Expression von IL 12 durch Magenepithelzellen vor und nach Stimulation mit *Helicobacter pylori*-Antigenen

	IL12				β-Actin	
	ng		Größe der exprimierenden Zellpopulation (%)		ng	
	vor Stimulation	nach Stimulation	vor Stimulation	nach Stimulation	vor Stimulation	nach Stimulation
Patient 2	14	79	15,56	54,48	90	145
Patient 3	17	76	20,00	97,44	85	78
Patient 4	22	86	24,18	90,53	91	95
Patient 5	17	56	20,73	59,57	82	94
Patient 7	49	82	56,98	85,42	86	96
Patient 8	48	81	60,76	89,01	79	91
Patient 9	46	77	58,97	80,21	78	96
Patient 10	56	81	72,73	83,51	77	97
Positivkontrolle	87	78			168	118

Aufgeführt sind die semiquantitativ anhand des Markers ermittelten DNA-Mengen von IL12 und β-Actin. Anhand von β-Actin, das einer Größe für die Gesamtzellmasse entspricht (100%), wurden die prozentualen Anteile der IL12 exprimierenden Epithelzellen für jeden Patienten errechnet.

Patient 2-5: *H. pylori* negativ  
 Patient 7 – 10: *H. pylori* positiv

Bild 18 zeigt die amplifizierte IL12- und  $\beta$ -Actin-cDNA der Epithelzellen von *H. pylori*-negativen Patienten (2-5) und *H. pylori*-positiven Patienten (7-10) vor und nach der Stimulation mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen. Die dazugehörigen Werte sind in der Tabelle 11 dargestellt, wobei der exprimierende Anteil der Epithelzellen an der Gesamtzellmasse (Menge von amplifizierter  $\beta$ -Actin cDNA) prozentual und semiquantitativ berechnet wurde (s. 3.22.3.).

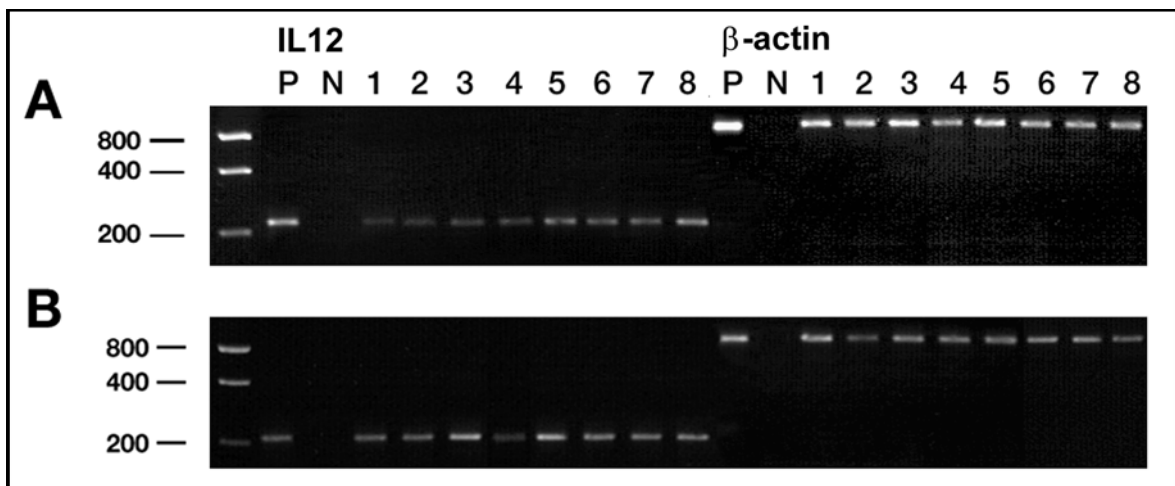


Bild 18: Expression der IL12p40 mRNA durch das intestinale Epithel

A. Amplifikation von IL12p40 und  $\beta$ -Actin spezifischer cDNA aus dem intestinalen Epithel vor der Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen  
 B. Amplifikation von IL12p40 und  $\beta$ -Actin spezifischer cDNA aus dem intestinalen Epithel nach der Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen

Spurbelegung: Spur 1 - 4: *H. pylori*-negative Patienten  
 Spur 5 - 8: *H. pylori*-positive Patienten

Spur M: DNA-Marker (400 bp  $\rightarrow$  80 ng DNA)  
 Spur P: PCR-Positivkontrolle  
 Spur N: PCR-Negativkontrolle  
 Spur 1-4: Patient 2-5  
 Spur 5-8: Patient 7-10

Innerhalb der *H. pylori*-positiven Gruppe wurde auch auf der Transkriptionsebene eine dreifach größere Aktivität der IL12 Expression festgestellt als in der negativen Kontrollgruppe ( $p < 0,0001$ ). Nach der Stimulation mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen steigt die Transkription der IL12 mRNA in beiden Patientengruppen an

(*H. pylori*-negative Patienten:  $p=0,002$ ; *H. pylori*-positive Patienten:  $p=0,001$ ). Dabei steigt die IL12 Transkription in den Epithelzellen der *H. pylori*-negativen Gruppe so stark an, daß kein signifikanter Unterschied mehr in der Transkriptionsintensität zwischen den Patientengruppen besteht ( $p=0,44$ ). Bild 19 stellt diese Ergebnisse für jede Patientengruppe graphisch dar. Wie aus den Stimulationsexperimenten ersichtlich, aktiviert *H. pylori* die Expression von IL12 durch Epithelzellen bereits auf der Transkriptionellen Ebene.

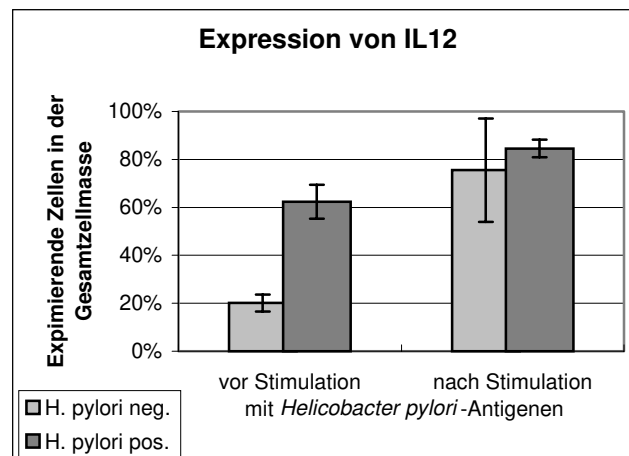


Bild 19: Aktivierung der Epithelzellen auf der Transkriptionsebene

Vor und nach 4,5 stündiger Stimulation der Epithelzellen mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen wurde die mRNA direkt isoliert und in der RT-PCR amplifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Kontingents der aktivierten Population innerhalb der Gesamtzellmasse, die anhand der semiquantifizierten IL12p40 cDNA der *H. pylori*-positiven ( $n=4$ ) und -negativen ( $n=4$ ) Patientengruppe errechnet wurde.

#### 4.4. Charakterisierung der Gewebe für *in situ* Untersuchungen

Eine *in vivo* Situation wird durch die Untersuchungen von Mediator-Expressionen auf der Peptid- aber auch auf der mRNA-Ebene direkt im Gewebe widerspiegelt.

Für alle *in situ* Untersuchungen wurden Zangenbiopsien des humanen Antrums, die bei gastrokopischen Routineuntersuchungen gewonnen wurden, im angefertigten Fixativ (s. 3.23.1.) fixiert. Diese wurden in Paraffin eingebettet (s. 3.24.), geschnitten (s. 3.25.) und auf Objektträger aufgezogen (s. 3.27. und

3.28.1.). Eine Kontrolle der Schnittebene fand über die Eosin / Hämatoxylin-färbung statt (s. 3.26.).

Die Biopsien wurden Patienten mit einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis der Entzündungsgrade 1 - 3 nach der Sydney-Klassifikation (n=24) sowie *H. pylori*-negativen Patienten (n=13) entnommen. In dieser Gruppe befanden sich histologisch normale Gewebe (Entzündungsgrad 0) und Entzündungen bzw. Gastriten anderer Genese. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über den Biopsiepool, der in den *in situ* Untersuchungen zum Einsatz kam:

Tab. 12: Charakterisierung der verwendeten Biopsien

<i>H. pylori</i> -positives Gewebe:	Gastritis Typ B, Entzündungsgrad 1	10 Biopsien
	Aktivität 0	6 Biopsien
	Aktivität 1	4 Biopsien
	Gastritis Typ B, Entzündungsgrad 2	11 Biopsien
	Aktivität 1	7 Biopsien
	Aktivität 2	4 Biopsien
	Gastritis Typ B, Entzündungsgrad 3	3 Biopsien
	Aktivität 3	3 Biopsien
<i>H. pylori</i> -negatives Gewebe:	Entzündungsgrad 0	7 Biopsien
	Gastritis Typ C	3 Biopsien
	Entzündung	3 Biopsien

#### 4.5. Nachweis von IL12 *in situ*

Die Sekretion des IL12 Peptids durch Monozyten / Makrophagen sowie die Expression von IL12 durch das Epithelium auf der Translations- und Transkriptionsebene wurde in den vorangegangenen *in vitro* Experimenten eindeutig nachgewiesen. Die Aktivierung dieser Zellpopulationen zur Synthese von IL12 ist dabei von *H. pylori*-Antigenen abhängig. Der Nachweis des Peptids *in situ* stellt einen Abgleich mit der gefundenen *in vitro* Situation dar.

Durch die Kombination einer wenig denaturierenden Kreuzvernetzung des verwendeten Fixatives (s. 3.23.1.) und die schonende Permeabilisierung mit Hilfe von Saponin gelang die histochemische Detektion des IL12p40 Peptids, das intrazellulär und auch an die Matrix gebunden vorhanden ist (s. 3.27.). Die IL12 Produktion wurde extra- und intrazellulär mit Hilfe des braunen DAB-Niederschlags lokalisiert und den Zellen im Gewebe zugeordnet.

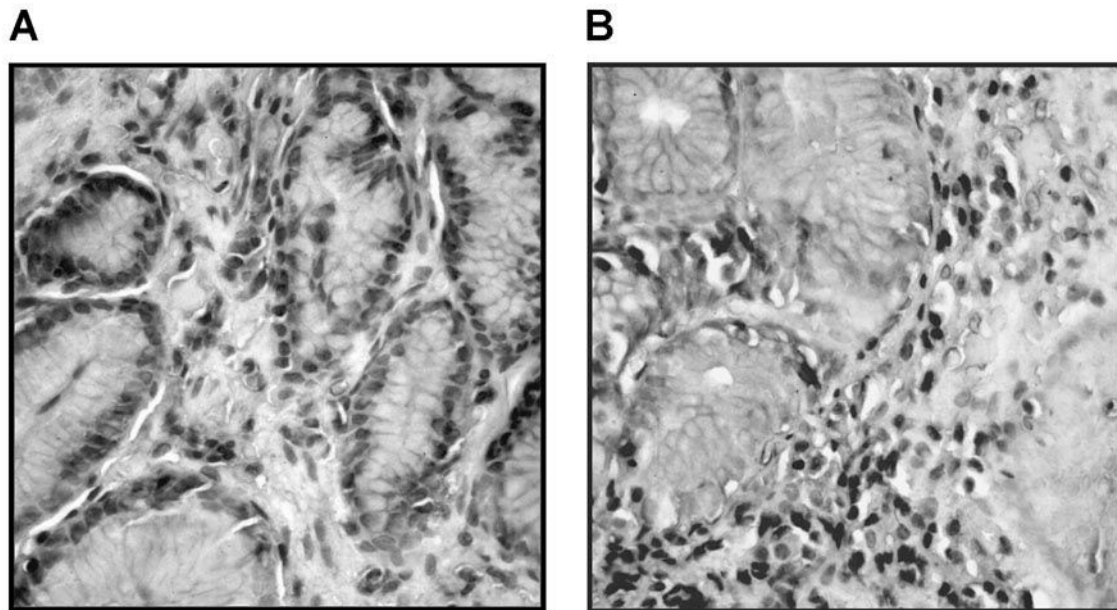


Bild 20: Nachweis von IL12 im *H. pylori*-negativen Gewebe

Zangenbiopsien des humanen Antrums wurden fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 4 µm dicken Schnitte wurden deparaffiniert, rehydriert und permeabilisiert. Die endogene Peroxidase wurde deaktiviert. Die Detektion von IL12 erfolgte mit einem spezifischen Primärantikörper und nachfolgendem Peroxidasekonjugat. Als Peroxidasesubstrat diente DAB, das einen braunen Niederschlag bildete.

A.: histologisch normales Gewebe (n= 3)

B.: Gastritis, die nicht mit *H. pylori* assoziiert ist (n=2)

Bild 20 zeigt repräsentative Gewebeschnitte für ein histologisch normales Gewebe (n=3) und eine nicht mit *H. pylori*-assoziierte Gastritis (n=2). In Geweben mit Entzündungsgrad 0 ist das Fehlen eines Zellinfiltrates charakteristisch. Damit ist eine geringe Zelldichte in der Lamina propria verbunden. Monozyten / Makrophagen sind nur vereinzelt zu detektieren. In der Lamina propria von Geweben mit einer Gastritis, die nicht mit *H. pylori* assoziiert ist, finden sich

größere Zellpopulationen, die jedoch nur wenig Monozyten / Makrophagen enthalten.

In *H. pylori*-negativen Geweben ist vereinzelt eine IL12 Sekretion von Epithelien zu detektieren. In der Lamina propria wurde IL12 nur in Epithelnähe nachgewiesen.

Bild 21 zeigt repräsentativ die Entzündungsgrade 1 bis 3 einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis (n=8). In der Lamina propria von allen Geweben ist eine hohe Zelldichte vorhanden, die mit dem Grad der Entzündung steigt. Dort befinden sich Monozyten / Makrophagen, die an ihrem typischen Zellkern zu erkennen sind.

In der *H. pylori*-positiven Patientengruppe exprimieren die Epithelzellen in allen Entzündungsgraden das IL12 Peptid. Auch in der Tiefe der Lamina propria wurde IL12 in den Monozyten / Makrophagen intrazellulär und an die Matrix gebunden detektiert. Die Sekretion des Zytokins von Monozyten / Makrophagen nimmt mit dem Entzündungsgrad zu.

Der semiquantitative Nachweis des IL12 Peptids *in situ* in Geweben *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten zeigt einen deutlichen Unterschied in der Sekretion des Zytokins abhängig vom *H. pylori*-Status und dem Grad der Entzündung. Obwohl die Epithelzellen und Monozyten / Makrophagen in einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis massiv IL12 produzieren, zeigt die Detektion des Zytokins in *H. pylori*-negativen Geweben, daß seine Sekretion nicht ausschließlich durch *H. pylori* bedingt ist.

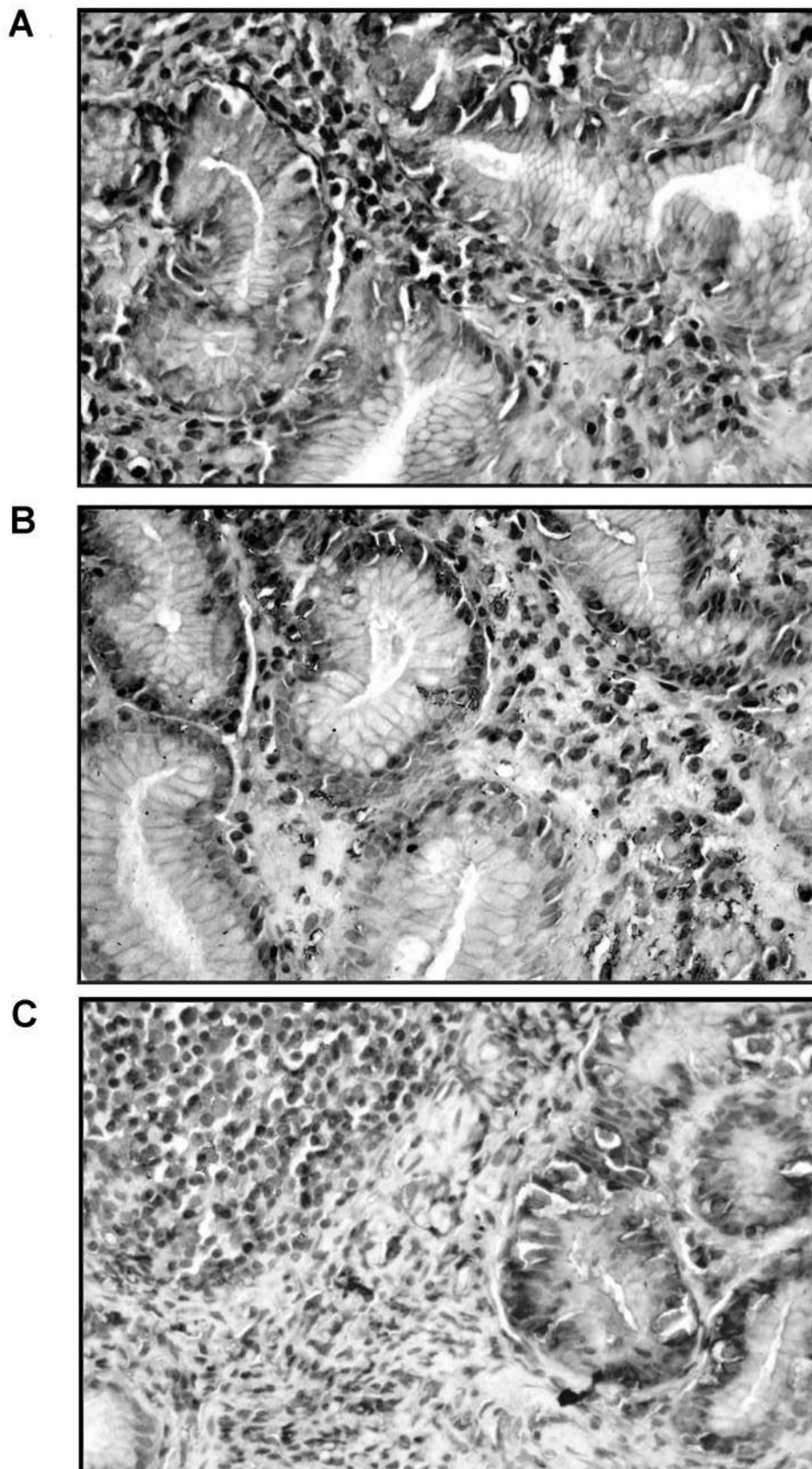


Bild 21: Nachweis von IL12 in *H. pylori*-positivem Gewebe (Entzündungsgrade 1 bis 3)

- A. *H. pylori*-assoziierte Gastritis, Entzündungsgrad 1 nach der Sydney-Klassifikation(n=3)
- B. *H. pylori*-assoziierte Gastritis, Entzündungsgrad 2 nach der Sydney-Klassifikation(n=3)
- C. *H. pylori*-assoziierte Gastritis, Entzündungsgrad 3 nach der Sydney-Klassifikation(n=2)

#### **4.6. Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die Sekretion proinflammatorischer Immunmediatoren**

Die Entstehung einer Entzündung ist neben *H. pylori*-Antigenen auch von Mediatoren abhängig, die von Immunzellen sezerniert werden. Monozyten / Makrophagen spielen dabei eine zentrale Rolle. Abgesehen von ihren Regulationsfaktoren einer assoziierten Immunantwort, sind proinflammatorische Zytokine für den Verlauf einer Entzündungsreaktion prägend.

Ein Korrelat der Entzündungsaktivität stellt die Rekrutierung und Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten dar. Neben den kostimulativen *H. pylori*-Antigenen (CRAIG ET AL., 1992; MAI ET AL., 1991b) ist das Zytokin IL8 ein wichtiger Rekrutierungsfaktor für diese Entzündungszellen (BAGGIOLINI ET AL., 1989).

Die Anwesenheit des nekrotischen Faktors  $TNF\alpha$  (BEUTLER AND CERAMI, 1986) in der Lamina propria kann direkt eine Destruktion des Gewebes und somit der gastrointestinalen Barrierefunktion herbeiführen (CRABTREE ET AL., 1991; FAN ET AL., 1995).

Das immunmodulierende Zytokin  $TGF\beta$  übt eine potente chemotaktische Aktivität auf Monozyten und andere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten aus und bewirkt eine verstärkte Migration dieser Zellen in das entzündete Gewebe (WAHL ET AL., 1987; WAHL ET AL., 1989). Es kann eine lymphoproliferative Immunantwort supprimieren, (WAHL ET AL., 1988) oder zusammen mit  $IFN\gamma$  und IL12 eine zellvermittelte Immunantwort fördern (ROMAGNANI, 1992, 1994).

Der Nachweis dieser immunrelevanten proinflammatorischen Mediatoren *in situ* ermöglichte die Charakterisierung der sezernierenden Zellen und die Lokalisation der Mediatorfreisetzung direkt im Bereich der *H. pylori*-induzierten Barrierestörung.



#### 4.6.1. Etablierung der *in-situ*-Hybridisierung zur Detektion von IL8 und TNF $\alpha$ mRNA in der Lamina propria

Für die Darstellung der Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL8 und TNF $\alpha$  in der Lamina propria wurde die Technik der *in-situ*-Hybridisierung etabliert. Als Untersuchungsmaterial dienten Zangenbiopsien des humanen Antrums, die bei gastrokopischen Routineuntersuchungen gewonnen und fixiert wurden (s. 4.4.) Zur Etablierung dieser Technik wurden Biopsien mit einem Entzündungsgrad 2 verwendet.

Zur Detektion der Transkripte mußten die kritischen Schritte aufeinander abgestimmt werden. Die antigenerhaltende Kreuzvernetzung durch die Fixation durfte nur durch einen schwachen Andau für die Sonde permeabel gemacht werden, um die Gewebestruktur nicht zu schädigen. Ebenfalls sollten die Reduktion des Hintergrundes, die Hybridisierung und die Posthybridisierung miteinander korrespondieren, damit spezifische Bindungen und mRNA-Signale erhalten werden (s. 2.28.).

##### 4.6.1.1. Überprüfung der Spezifität der IL8 bzw. TNF $\alpha$ Oligodeoxyribonukleinsäure im Northern Blot

Die Überprüfung der Spezifität der verwendeten Sonden erfolgte im Northern Blot. Dazu wurden  $1 \times 10^7$  KATO III-Zellen mit 10 ng/ml rhTNF $\alpha$  zur IL8 Produktion und  $1 \times 10^7$  mononukleäre Zellen mit 20  $\mu$ g/ml *H. pylori*-Oberflächenantigenen zur TNF $\alpha$  Produktion 4,5 Stunden stimuliert (s. 3.10.). Von diesen Kulturen wurde anschließend die Gesamt-RNA präpariert (s. 3.15.1.) und die Menge sowie die Reinheit des Isolats photometrisch bestimmt (s. 3.16.).

Zur Northern Blot Analyse wurden 20  $\mu$ g Gesamt-RNA im denaturierenden ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.17.), anschließend auf eine Nylonmembran transferriert und immobilisiert (s. 3.18.). Durch Hybridisierung der Membran mit der [ $\gamma^{32}$ P]-ATP-markierten (s. 3.20. und

3.21.) IL8 bzw. TNF $\alpha$  Sonde und die nachfolgende Autoradiographie konnte die jeweils spezifische mRNA detektiert werden (s. 3.19.).

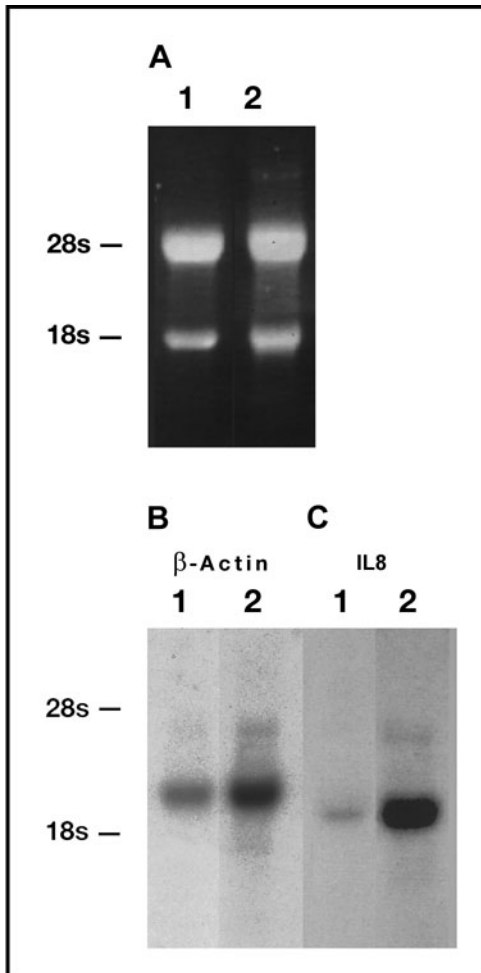


Bild 22: Detektion von IL8 mRNA

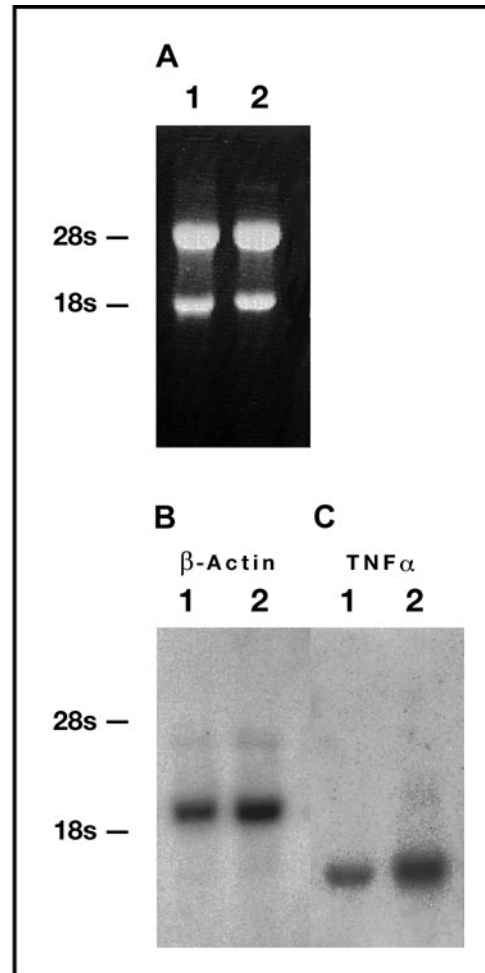


Bild 23: Detektion von TNF $\alpha$  mRNA

Die Gesamt RNA wurde durch kombinierte Proteindenaturierung mit GTC und Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der spezifischen [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP markierten Oligodeoxynukleotidsonde ( $10^6$  cpm/ml). Es wurden pro Spur 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aufgetragen. Als Größensmarker dienten 3  $\mu\text{g}$  einer RNA- Leiter.

22.A. Gesamt-RNA  
22.B. Autoradiogramm der IL8 mRNA  
22.C. Autoradiogramm der  $\beta$ -Actin mRNA

Spur 1: unstimulierte mononukleäre Zellen  
Spur 2: mit 20  $\mu\text{g}$  / ml *H. pylori*-Antigenen  
stimulierte mononukleäre Zellen

23.A. Gesamt-RNA  
23.B. Autoradiogramm der TNF $\alpha$  mRNA  
23.C. Autoradiogramm der  $\beta$ -Actin mRNA

Spur 1: unstimulierte KATO III-Zellen  
Spur 2: mit 10 ng / ml rhTNF $\alpha$   
stimulierte KATO III-Zellen

In den Bildern 22 und 23 sind die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchungen dargestellt. Bild 22 / 23A zeigt die aufgetrennte Gesamt-RNA, deren 28s und 18s Banden in beiden Proben gleich intensiv sind. Die Menge und der intakte Zustand der aufgetrennten Gesamt-RNA kann hier kontrolliert werden. Das Autoradiogramm im Bild 22B zeigt eine Bande in der Größe von 1,7 kb, die der IL8 spezifischen mRNA anderer Zelltypen entspricht (ECKMANN ET AL., 1993). Die im Bild 23 B. sichtbare Bande von etwa 1,6 kb des Autoradiogramms stellt die TNF $\alpha$  spezifische mRNA (IKEJIMA ET AL., 1990) dar.  $\beta$ -Actin wurde als endogene Kontrolle detektiert. Die Bande der spezifischen mRNA ist im Bild 22 / 23C zu sehen.

Die Spezifität der verwendeten Sonden ist erwiesen, da über die Hybridisierung nur die richtige mRNA detektiert wurde. Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden die Oligodeoxyribonukleinsäuren mit [ $\gamma^{35}$ S]-ATP markiert (s. 3.20.).

#### 4.6.1.2. Etablierung der Bedingungen zur Detektion von Transkripten im gastrointestinalen Gewebe

Die Etablierung der *in-situ*-Hybridisierung zur Detektion der Transkripte von IL8 und TNF $\alpha$  im intestinalen Gewebe erfolgte ausgehend von einem Protokoll nach Fox und Mitarbeitern (1988). In Anpassung an das zu untersuchende Material und unter Berücksichtigung der kritischen Schritte wurden verschiedene Parameter des Detektionsverfahrens adaptiert:

1. Konzentration der Sonde
2. Dauer der Prähybridisierung und Hybridisierung
3. Hybridisierungstemperatur
4. Stringenz der Waschungen
5. Expositionsdauer

Zu 1)

Die Hybridisierung mit  $1 \times 10^6$  cpm Sonde pro Gewebeschnitt resultierte in sehr hoher Hintergrundreaktion. Die nach der Autoradiographie sichtbaren Granula

konnten den Zellen nicht zugeordnet werden, deren Kerne durch Radiolyse beschädigt waren. Die Konzentration der radioaktiv markierten Sonde wurde schrittweise auf  $1 \times 10^4$  cpm / Objektträger gesenkt.

Zu 2)

Die mRNA-Signale, die einzelnen Zellen zugeordnet werden konnten, waren anhand der durchgeführten Kontrollen unspezifisch. Daher wurde die Dauer der Prähybridisierung zur Inhibition unspezifischer Bindungsstellen von 2 auf 4 Stunden verlängert und die Dauer der Hybridisierungsreaktion schrittweise von 14 auf 6 (IL8 ) bzw. 8 (TNF $\alpha$  ) Stunden gesenkt.

Zu 3)

Die Hybridisierungstemperatur wurde ebenfalls optimiert. Ausgehend von 37°C erfolgte die Hybridisierung mit der IL8 Sonde schließlich bei 42°C und die Hybridisierung mit der TNF $\alpha$  Sonde bei 40°C (2 °C unter der Schmelztemperatur). Der Hybridisierungsansatz wurde zuerst in der feuchten Kammer für 15 min bei 95°C inkubiert, um die bereits entstandenen unspezifischen Bindungen zu danaturieren und in der nachfolgenden Hybridisierung bei der entsprechenden Temperatur eine spezifische Detektion zu sichern.

Zu 4)

Die Stringenz der Waschungen wurde ebenfalls erhöht. Die Temperatur wurde von 64°C auf 80°C (4 - 6°C unter der Schmelztemperatur) erhöht. Außerdem wurde ein zusätzlicher Waschschrift mit Waschpuffer I (s. 2.2.) zur besseren Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonde bei 40°C eingefügt.

Zu 5)

Schließlich wurde die Expositionsdauer von 14 Tagen auf 6 Tage verkürzt.

Die Adaptation der Bedingungen für die *in-situ*-Hybridisierung bewirkte stringente Hybridisierungssignale mit sehr geringen Hintergrundsignalen. Die Transkripte konnten genau lokalisiert und die Ursprungszelle anhand ihres Kerns charakterisiert werden.

#### 4.6.2. Verteilung von IL8 Transkripten in der Antrum mukosa bei der *H. pylori*-assoziierten Gastritis

Da der antikörperabhängige immunhistochemische Nachweis die Produktion dieses Mediators nur in Epithelzellen (CRABTREE ET AL., 1994) oder nur in Monozyten / Makrophagen (ENGELKING, 1995) zeigte, wurde in dieser Arbeit die Methode der *in-situ*-Hybridisierung angewendet, um die Transkription von IL8 im Gewebe *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten zu detektieren und damit die Ursprungszellen zu identifizieren.

Die *in-situ*-Hybridisierung wurde an fixierten Gewebeproben mit einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis (Entzündungsgrad 1 - 3) (n=24) und an *H. pylori*-negativen Geweben (Normales Gewebe, Entzündung, Gastritis anderer Genese) (n=13), die während einer gastroscopischen Untersuchung entnommen wurden (s. 4.4.), nach den evaluierten Bedingungen für IL8 durchgeführt (s. 3.28.1.). Die Autoradiographie zeigte die Transkriptsignale als Silbergranula. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin ermöglichte die Beurteilung des Gewebes und die Identifizierung der aktivierten Ursprungszellen (s. 3.28.2.). Es wurden Gewebe von jeweils  $\geq 3$  Patienten untersucht und davon inklusive der durchgeführten Kontrollen zur Absicherung der Signalspezifität (s. 3.28.3.) jeweils 30 Schnitte.

Repräsentative Gewebeschnitte wurden in der Schwarz-Weiß-Photographie aufgenommen.

Bild 24 zeigt repräsentative Gewebe *H. pylori*-negativer Patienten. Im Bild 24a ist beispielhaft ein Schnitt durch ein histologisch normales Gewebe dargestellt (n=6). Ein repräsentatives entzündetes Gewebe ohne *H. pylori*-Assoziation (n=3) ist im Bild 24b zu sehen. Exemplarisch sieht man im Bild 24c eine Gastritis, die nicht mit *H. pylori* assoziiert ist (n=3). Die Zelldichte in der Lamina propria steigt mit dem diagnostizierten Krankheitsbild der Gewebe. Es sind jedoch nur wenige Monozyten / Makrophagen im Zellinfiltrat identifizierbar. Eine IL8 Transkription ist nur in sehr geringem Maße vereinzelt detektiert worden.

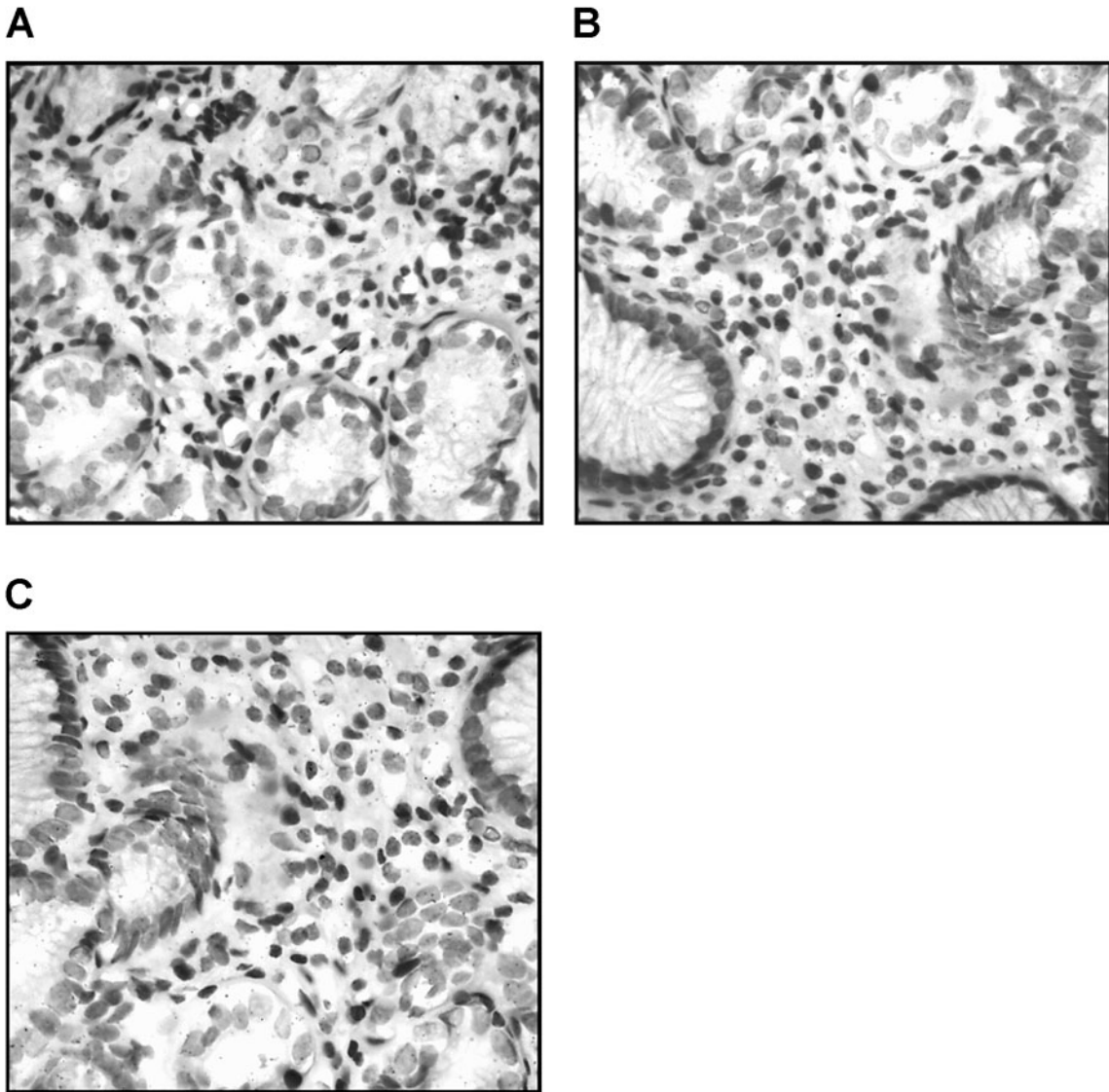


Bild 24: IL8 Transkription in *H. pylori*-negativem Gewebe

Von Zangenbiopsien des humanen Antrums wurden nach Fixierung und Paraffin-einbettung 4  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, die der *in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis von IL8 Transkripten unterzogen wurden. Die Lokalisierung der IL8 Transkription erfolgte anhand der Silbergranula, die nach der Autoradiographie an Orten der Hybridisierung auf der Filmemulsion entstanden sind.

A.: Entzündungsgrad 0 (n=6); Vergrößerung: 400 x

B.: Entzündung ohne *H. pylori*-Assoziation (n=3); Vergrößerung: 400 x

C.: Gastritis Typ C (n=3); Vergrößerung: 400 x

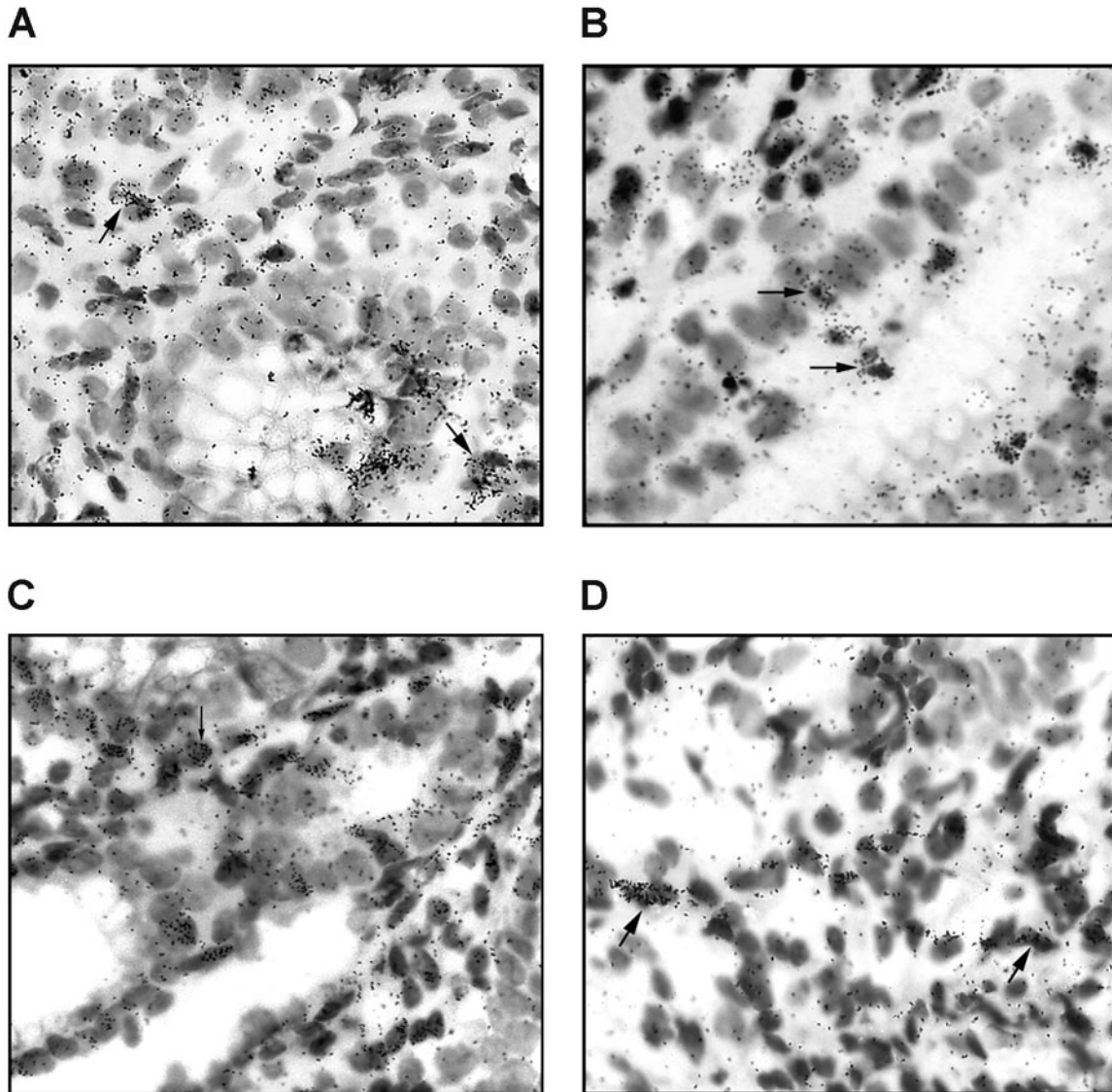


Bild 25: IL8 Transkription in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis

4  $\mu$ m starke Schnitte von Zangenbiopsien des humanen Antrums von Patienten mit einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis wurden zum Nachweis von IL8 Transkripten der *in-situ*-Hybridisierung unterzogen. Die Lokalisierung der IL8 Transkription erfolgte anhand der Silbergranula, die durch die Autoradiographie an Orten der Hybridisierung auf der Filmemulsion entstanden sind (Pfeile). Bild 25b zeigt einwandernde neutrophile Granulozyten im Epithel, die bereits zur IL8 Transkription aktiviert sind (Pfeile).

- A.: Entzündungsgrad 1 (n=6); Vergrößerung: 630 x  
 B.: Entzündungsgrad 1 (n=6); Vergrößerung: 1000 x  
 C.: Entzündungsgrad 2 (n=8); Vergrößerung: 630 x  
 D.: Entzündungsgrad 3 (n=3); Vergrößerung: 630 x

Im Bild 25 sind repräsentative Schnitte für die *H. pylori*-assoziierte Gastritis Typ B zu sehen. Sie weisen nach der Sydney-Klassifikation die Entzündungsgrade 1 (A. und B.) (n=6), 2 (C.) (n=8) und 3 (D.) (n=3) auf. Für die IL8 Transkription im

untersuchten Gewebe war der Aktivitätsgrad der Gastritis nicht von Bedeutung. Im Vergleich zu *H. pylori*-negativem Gewebe, ist hier eine wesentlich höhere Zelldichte vorhanden, die auf die Einwanderung von Entzündungszellen wie Monozyten / Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, die ebenfalls zur IL8 Transkription aktiviert wurden, (Bild 25b) zurückzuführen ist. Die Transkription ist sowohl in Epithelzellen als auch im Infiltrat der Lamina propria in unterschiedlicher Intensität nachweisbar. Die IL8 mRNA wurde direkt über den Kernen aber auch neben diesen im Zytoplasma detektiert.

#### **4.6.3. Durchschnittliche Transkription von IL8 in der Antrumukosa *H. pylori*-positiver und *H. pylori*-negativer Patienten**

Die Aktivierungsintensität der Entzündungszellen zur Transkription von IL8 wurde nach etablierten immunometrischen Methoden zweidimensional statistisch ausgewertet (MCCABE ET AL., 1993). Dabei wurde einmal die durchschnittliche Transkription von IL8 mRNA im Gewebe berechnet, die sich in Granula pro Zelle ausdrückt. Anhand eines definierten Rasters wurde die Gesamtanzahl der Signaltragenden Zellpopulationen sowie die der Silbergranula (IL8 mRNA) ermittelt. Der Quotient Silbergranula / Zellzahl spiegelt die durchschnittliche Transkription wider. Diese Signalwerte jeder Diagnose wurden gemittelt und miteinander verglichen.

##### 4.6.3.1. Transkripte in der Lamina propria

Die statistische Auswertung der Parameter, die im Bild 26 zusammengefaßt sind, legt die *in situ* Situation bezogen auf die mittlere Aktivität der IL8 Expression von Monozyten / Makrophagen folgendermaßen dar: Die durchschnittliche Transkription der IL8 mRNA mit 7-8 Granula / Zelle im Gewebe einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis I ist 4 – 8 Mal stärker als im *H. pylori*-negativen Gewebe, das nur eine Aktivierung von 15% - 28% zeigt, unabhängig von der histologischen Diagnose (1 - 2 Granula / Zelle,  $p < 0,0001$ ). Die Signifikanzen der Auszählung einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis II und III und einem *H. pylori*-negativen Gewebe bleiben bestehen:  $p < 0,005$ . Der Anstieg der IL8 Expression um das



Doppelte in einer Entzündung bzw. einer Gastritis C im Vergleich zu histologisch normalem Gewebe (1 Granulum / Zelle) ist ebenfalls signifikant ( $p=0,007$  bzw.  $p < 0,0001$ ).

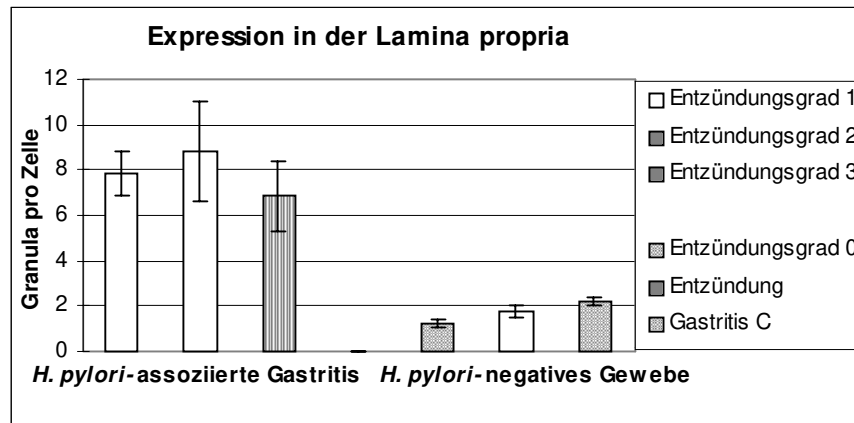


Bild 26: Durchschnittliche Transkription von IL8 mRNA der Monozyten / Makrophagen in der Lamina propria

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 (n=6), dem Entzündungsgrad 2 (n=8), dem Entzündungsgrad 3 (n=3) und histologisch normalem Gewebe (Entzündungsgrad 0, n=6) sowie vom Gewebe einer nicht *H. pylori*-assoziierten Entzündung (n=3) und Gastritis C (n=3), wurde die durchschnittliche Transkription (Granula / Zelle) von Monozyten / Makrophagen bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte der einzelnen Diagnosen.

#### 4.6.3.2. Transkripte im Epithel

Zur Ermittlung der mittleren Transkription im Epithel wurden im Raster die transkribierenden Epithelzellen und die gesamten IL8 Signale gezählt. Im Bild 27 sind die Mittelwerte der errechneten durchschnittlichen Transkription in den einzelnen Diagnosen graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß mit steigendem Entzündungsgrad einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis die mittlere Transkription von IL8 im Epithel sinkt. Die Epithelzellen in einer Gastritis mit dem Entzündungsgrad 2 und 3 transkribieren nur noch 32% - 38% der IL8 mRNA einer Gastritis ersten Grades (Von 8 auf 3 Granula / Zelle,  $p < 0,0001$ ). Im Vergleich zu einem *H. pylori*-

negativen Gewebe (1-2 Granula / Zelle) ist die mRNA Expression in einer Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1 die durchschnittliche Transkription um 85% gesteigert ( $p < 0,0001$ ). Die mRNA-Expression einer Gastritis II und III ist um das dreifache höher als im histologisch normalen Gewebe ( $p < 0,0001$  und  $p=0,0005$ ). Ihr IL8 Transkriptionsstatus nähert sich dem Expressionsstatus *H. pylori*-negativer Gewebe mit einer Entzündung bzw. einer Gastritis anderer Genese stark an, bleibt jedoch signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Die Epithelzellen innerhalb der *H. pylori*-negativen Gruppe zeigen in der Gastritis C ebenfalls signifikant stärkere IL8 Transkription als im histologisch normalen Gewebe ( $p=0,023$ ).

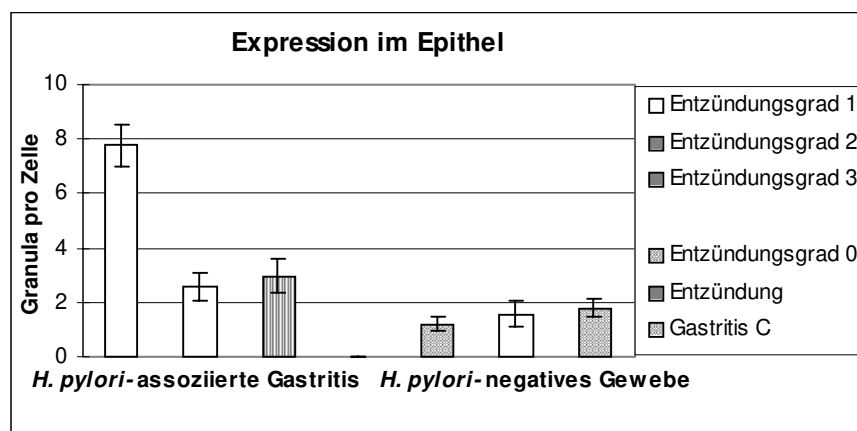


Bild 27: Durchschnittliche Transkription von IL8 mRNA im Epithel

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 (n=6), dem Entzündungsgrad 2 (n=8), dem Entzündungsgrad 3 (n=3) sowie der histologisch normalen Gewebe (Entzündungsgrad 0, n=6), der Gewebe einer nicht mit *H. pylori*-assoziierten Entzündung (n=3) und Gastritis C (n=3), wurde durch den Quotienten Signale / Zellzahl die durchschnittliche Transkription der IL8 mRNA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Diagnosen.

#### 4.6.4. Bestimmung der Transkriptionsintensität von IL8

Die Abschätzung des Ausmaßes einer Mediator Expression schließt neben der durchschnittlichen Transkription auch den Aktivierungsgrad der einzelnen Zellen und ihre Häufigkeit im Gewebe ein. Die Signaldichte spiegelt dabei den Aktivierungszustand wider (MCCABE ET AL., 1993).

Die Zellen wurden nach der Dichte der Transkriptionssignale in zwei Gruppen nach etablierter Methode aufgeteilt (WAGNER ET AL., 1993; LEE ET AL., 1993; COX ET

AL., 1984): Die Zellen, die 5 - 15 Signale beinhalteten waren aktiviert, die Zellen, die mehr als 15 Granula aufwiesen, wurden zu den stark aktivierten Zellen zugeordnet. Die Auszählung erfolgte auch hier mit Hilfe eines Zählrasters definierter Größe. Zur Ermittlung der Transkriptionsintensität wurde die Gesamtzellzahl im definierten Gewebe ermittelt, sowie die Zuordnung der Aktivierung von Einzelzellen zu einer der beiden Gruppen vorgenommen. Die prozentualen Anteile der aktivierten und nicht aktivierten Zellen an der Zellpopulation wurden für jeden Patienten ermittelt.

#### 4.6.4.1. Transkripte in der Lamina propria

Wie aus der graphischen Darstellung im Bild 28 ersichtlich ist, wurden im *H. pylori*-negativen Gewebe stark aktivierte Zellen in der Lamina propria nicht detektiert. In der *H. pylori*-assoziierten Gastritis steigt der Aktivierungsgrad bezüglich der IL8 Transkription der Monozyten / Makrophagen mit dem Entzündungsgrad an. Dabei ist der Anteil von 18,3%, der stark aktivierten Zellen in der Gastritis III signifikant erhöht im Vergleich zur Gastritis I, in der nur 10,6% der Zellen mehr als 15 Granula aufweisen ( $p=0,023$ ). Das Kontingent der aktivierten Zellen von 65,3% ist in der Gastritis mit dem Entzündungsgrad III signifikant größer im Vergleich zur Gastritis I (44,5%,  $p < 0,0001$ ) und zu Gastritis II (42,9%,  $p=0,001$ ). Die absoluten Zellzahlen in dem berechneten Bereich sind annähernd gleich, sinken aber ausgehend von der Gastritis mit Entzündungsgrad 1 in der Gastritis III ab ( $p=0,024$ ). Hier sind insgesamt 83% der Zellen bezüglich IL8 aktiviert, 20% mehr als in der Gastritis I.

Der Anteil der aktivierten Zellen in *H. pylori*-assoziiertem Gewebe ist größer als im *H. pylori*-negativen Gewebe, in dem nur 2% bis 22% der Zellen eine Aktivität von 5 - 15 Granula / Zelle aufweisen ( $p < 0,0005$ ). Auch das Zellinfiltrat ist im *H. pylori*-negativen Gewebe (Entzündungsgrad 0) signifikant geringer als in den *H. pylori*-assoziierten Gastriten (Gastritis I und II:  $p < 0,0001$ ; Gastritis III:  $p=0,05$ ), steigt aber in der Entzündung an ( $p=0,039$ ), so daß dieses Gewebe sowie die Gastritis C keine signifikanten Unterschiede mehr zu *H. pylori*-assoziiertem Gewebe aufweisen.

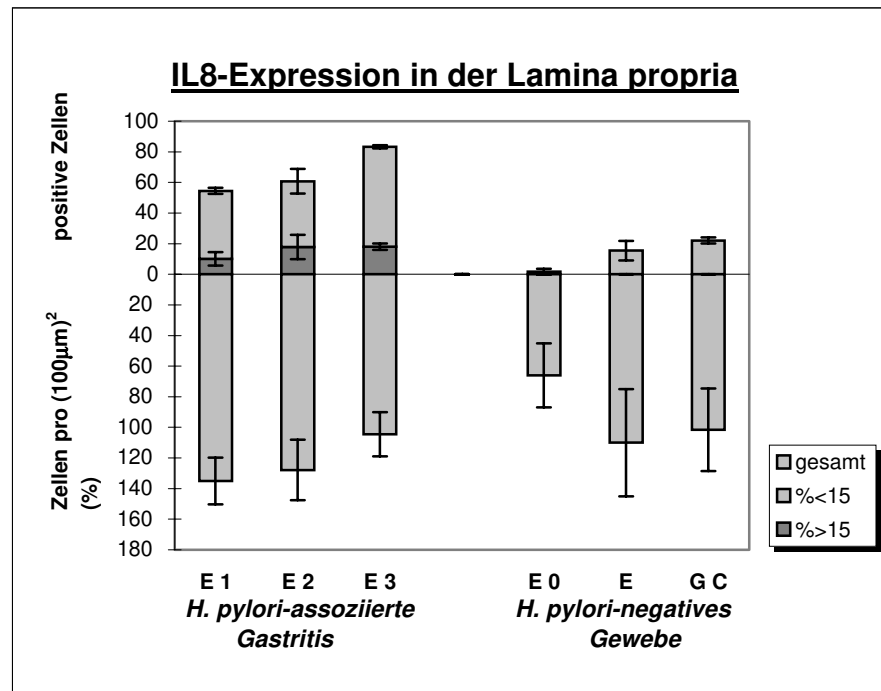


Bild 28: Aktivierungszustand der IL8 Transkription in den Monozyten / Makrophagen der Lamina propria

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 (n=6), dem Entzündungsgrad 2 (n=8), dem Entzündungsgrad 3 (n=3) sowie histologisch normalem Gewebe (Entzündungsgrad 0, n=6), vom Gewebe einer nicht *H. pylori*-assoziierten Entzündung (n=3) und Gastritis C (n=3), wurden die Monozyten / Makrophagen auf einer Fläche von  $3 \times (100\mu\text{m})^2$  gezählt. Zusätzlich wurden in jeder Zelle die IL8-mRNA-Signale ermittelt, wonach die Zuordnung der Zellen zu einem Aktivitätsgrad vorgenommen wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte jeder Diagnose, die die absolute Zellzahl (untere Diagrammhälfte) und den prozentualen Anteil der transkribierenden Zellen auf einem Gebiet von  $(100\mu\text{m})^2$  darstellen.

Abkürzungen: E1: *H. pylori*-assoziierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1  
 E2: *H. pylori*-assoziierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 2  
 E3: *H. pylori*-assoziierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 3  
 E0: histologisch normales Gewebe  
 E : Entzündung, die nicht mit *H. pylori* assoziiert ist  
 GC: Gastritis C, nicht mit *H. pylori* assoziiert

Aktivierungsgrad: 5 - 15 Granula / Zelle: aktiviert  
 > 15 Granula / Zelle : stark aktiviert

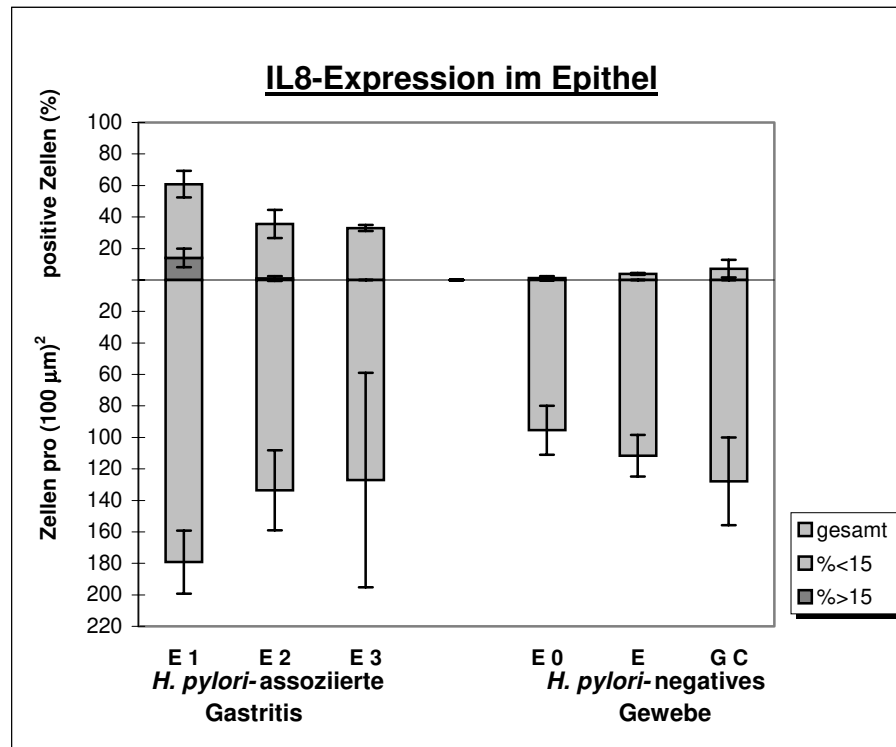
4.6.4.2. Transkripte im Epithel

Bild 29: Aktivierungszustand der IL8 Transkription im Epithel

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assozierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 (n=6), dem Entzündungsgrad 2 (n=8), dem Entzündungsgrad 3 (n=3) und histologisch normalem Gewebe (Entzündungsgrad 0, n=6) sowie vom Gewebe einer nicht mit *H. pylori*-assozierten Entzündung (n=3) und Gastritis C (n=3) wurden die Epithelzellen auf einer Fläche von  $3 \times (100\mu\text{m})^2$  gezählt. Zusätzlich wurden in jeder Zelle die IL8-mRNA-Signale ermittelt, wonach die Zuordnung der Zellen zu einem Aktivitätsgrad vorgenommen wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der absoluten Epithelzellzahl (untere Diagrammhälfte) und des prozentualen Anteils der transkribierenden Zellen auf einer Fläche von  $(100\mu\text{m})^2$  in der jeweiligen diagnostischen Gruppe.

Abkürzungen: E1: *H. pylori*-assozierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1  
 E2: *H. pylori*-assozierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 2  
 E3: *H. pylori*-assozierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 3  
 E0: histologisch normales Gewebe  
 E : Entzündung, die nicht mit *H. pylori* assoziiert ist  
 GC: Gastritis C, nicht mit *H. pylori* assoziiert

Aktivierungsgrad: 5 - 15 Granula / Zelle: aktiviert  
 > 15 Granula / Zelle : stark aktiviert

Die Charakterisierung der Expressionsintensität von IL8 im Epithel *H. pylori*-positiver Gewebe stellt sich etwas anders dar: Sowohl der Anteil stark aktivierter Zellen von 1% als auch der Zellen mit 5 - 15 Granula (35%) ist in der *H. pylori*-

assoziierten Gastritis II im Vergleich zum Entzündungsgrad 1 (15% und 47%) um 94% bzw. um 30% gesunken ( $p < 0,0001$ ;  $p=0,024$ ). In der Gastritis III reduziert sich die Intensität der IL8 Transkription auf 5 - 15 Granula / Zelle und ändert sich im Vergleich zur Gastritis II nur noch unwesentlich (Unterschied zur Gastritis I:  $p=0,031$ ). Die Anzahl der Epithelzellen in dem definierten Areal bleibt nahezu konstant, sinkt aber im Entzündungsgrad 2 signifikant ab ( $p=0,004$ ).

Der Aktivierungsgrad des Epithels in *H. pylori*-negativem Gewebe, der nur einen Zellanteil von 1% - 7% mit 5 - 15 Granula aufweist, ist unabhängig von der Diagnose signifikant niedriger als das Epithel in einer *H. pylori* assoziierten Gastritis ( $p < 0,002$ ). Die *H. pylori*-negative Gastritis C und die Entzündung zeigen auch signifikante Unterschiede im Anteil an aktivierten Zellpopulationen im Epithel im Vergleich zum histologisch normalen Gewebe ( $p=0,032$  und  $p=0,02$ ).

Während einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis ist auf der Transkriptionsebene sowohl in den Monozyten / Makrophagen der Lamina propria als auch in den Epithelzellen eine IL8 Aktivierung gezeigt. In den Epithelzellen jedoch fällt die Intensität und die durchschnittliche Transkription von IL8 bei aufsteigendem Entzündungsgrad drastisch ab, gleichzeitig korreliert der Aktivierungszustand der Monozyten / Makrophagen in der Mukosa mit der Schwere der Gastritis. *H. pylori*-negative Gewebe zeigen nur sehr schwache Transkriptionssignale, die mit der Schwere der Entzündung ansteigen.

#### **4.6.5. Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die IL8 Produktion *in vitro***

Die Transkription der IL8 mRNA wurde in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis eindeutig sowohl in der Lamina propria als auch im Epithel nachgewiesen. Da *H. pylori*-negative Patienten nur eine sehr geringe Aktivität zeigen, liegt der Schluß nahe, daß die Transkription der IL8 mRNA und somit die Produktion des Peptids von dem Bakterium abhängig ist. Diese Ergebnisse sagen nichts darüber aus, ob diese Zellen direkt durch *H. pylori*-Antigene oder indirekt durch andere Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  zur Produktion von IL8 angeregt werden. Dazu wurden *in vitro* Stimulationsversuche mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen durchgeführt.

#### 4.6.5.1. Einfluß von *Helicobacter pylori* auf Monozyten / Makrophagen

Zur Klärung des Stimulationsfaktors zur Transkription und Translation von IL8 wurden Monozyten / Makrophagen seronegativer Personen (n=2) durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt (3.6.1.) und über die Elutriation isoliert (s. 3.7.2.). Diese Isolierungsmethode gewährleistet, daß die aufgetrennten Zellen nicht voraktiviert sind. Außerdem erhält man eine reine Population, die nicht auf Mediatoren anderer Zellen reagiert sondern nur auf den Stimulus selbst.

In Vorversuchen mit "buffy coats" wurden zunächst die Elutriationsbedingungen für humane Monozyten / Makrophagen optimiert. Die Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge und die Durchflußrate (Pumpgeschwindigkeit) des Elutriationsmediums mit den Zellen mußten im Zusammenhang mit der Elutriationskammer optimal aufeinander abgestimmt werden.

Anfangs wurden die aufgereinigten mononukleären Zellen bei 2500 rpm und folgenden Durchflußraten pro Minute elutriert (FIGDOR ET AL., 1983):

#### **Fraktion Durchflußrate (ml / min)**

1.:	5 ml:	→	Beladung der Elutriationskammer
2.:	10 ml:	→	Elutriation von Blutplättchen
3.:	15 ml:	→	Elutriation von Lymphozyten (3x)
4.- 7.:	17 ml - 22 ml :	→	Elutriation von Lymphozyten
5.	28 ml:	→	Elutriation von Monozyten (6x)
7.-8.:	30 und 32 ml:	→	Elutriation von Monozyten (je 3x)

Eine Fraktion beinhaltete 50 ml elutrierte Zellen. Die Fraktionen 3, 7 und 8 hatten ein Volumen von 150 ml. Von Fraktion 5, in der Monozyten elutriert wurden, wurden 300 ml gesammelt.

Da die Zellen im Lauf der Elutriation Zellaggregate bildeten und am Ende des Versuchs mehr als 50% der Zellen als eine Proteinmasse in der Kammer verblieben, wurde das Elutriationsmedium mit EDTA und später mit Heparin versetzt. Im folgenden wurde die Ausbeute gesteigert, indem die Rotor-

geschwindigkeit und die Durchflußrate auf die aufgereinigten mononukleären Zellen optimal eingestellt wurden und eine entsprechend große Fraktion der herausgespülten Zellpopulationen gesammelt wurde:

Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 1960 rpm konnten nicht voraktivierte Monozyten / Makrophagen bei einer Durchflußrate von 19 ml/min in einer Fraktion von 200 ml elutriert werden. Vorher wurden die Lymphozyten bei einer Durchflußrate von 10 - 12 ml/min in einem Volumen von 250 ml herausgespült. Die Zellausbeute betrug 78%, d.h., daß 78% der eingesetzten Zellen nach der Elutriation wiedergewonnen wurden. Sie waren zu 95% vital. Im Bild 30 sind die Elutriationsprofile der einzelnen Fraktionen repräsentativ dargestellt.

Die Charakterisierung der mononukleären Zellen wurde mittels Fluoreszenz-durchflußzytometrie (s. 3.11.1. und 3.11.3.) vorgenommen. Dabei kam in der Doppelmarkierung das pan-Monozytenantigen CD14 und das pan-Lymphozytenantigen CD45 zum Einsatz. Eine genauere Charakterisierung der Zellfraktionen fand mit der Färbung der Oberflächenmarker CD3/CD19 (Lymphozyten) und CD15/ CD16 (Monozyten / Makrophagen) statt.

Die elutrierte Population von 78% bestand aus:

45% Lymphozyten bzw. Lymphozyten mit Monozyten, die mit einer Durchflußrate von 10-12 ml/min elutriert wurden

**9% reine Monozyten, die mit 19 ml/min elutriert wurden**

14% mononukleäre Zellen, die bei der Beladung bei 5 ml/min Durchflußrate herausgespült wurden und

10% mononukleäre Zellen, die im Waschschrift bei einer Durchflußrate von 25 ml/min elutriert wurden.



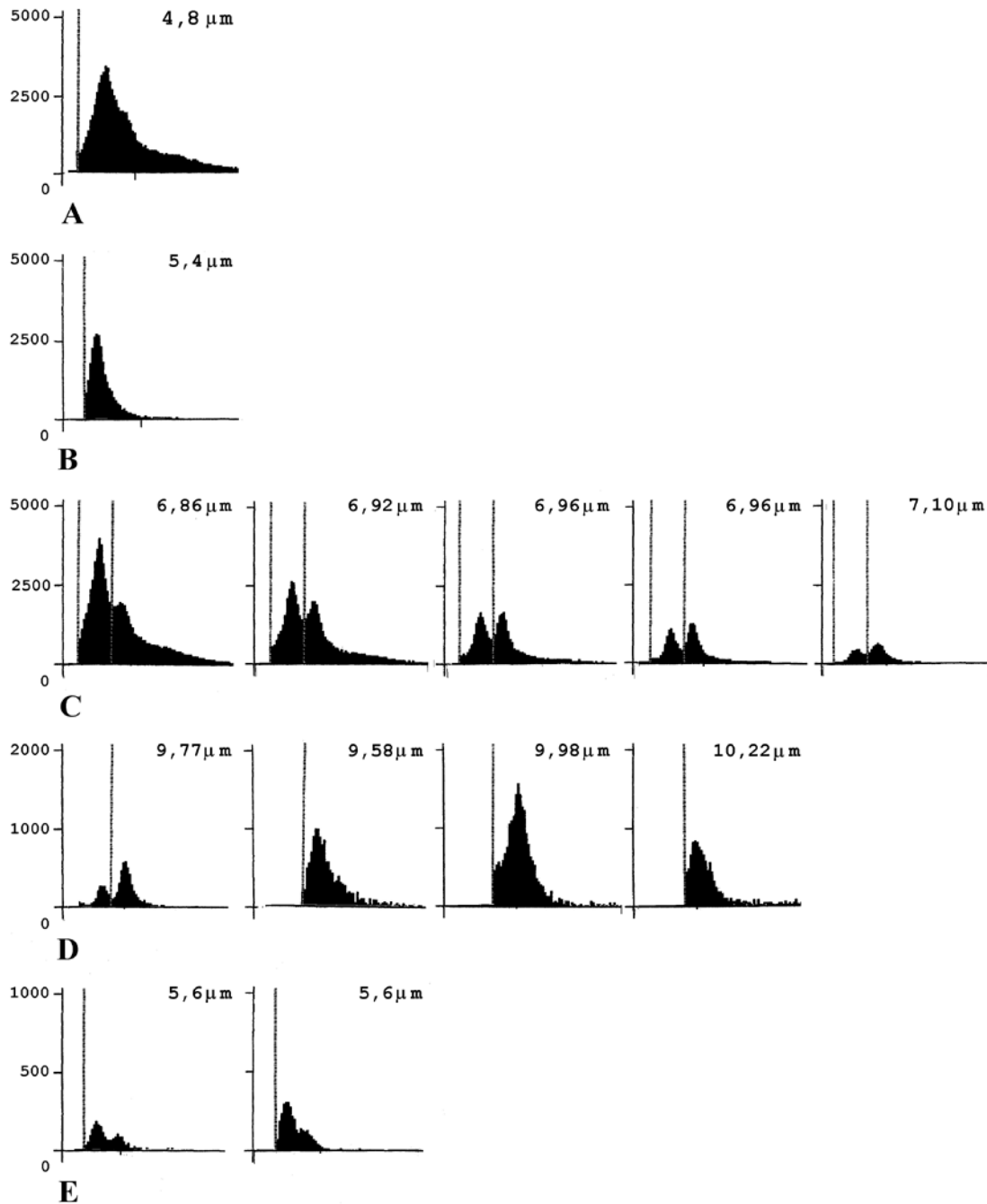


Bild 30: Elutriationsprofile

Periphere mononukleäre Zellen wurden über die Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und über die Gegenstromzentrifugation nach Populationen aufgetrennt. Die Pumpgeschwindigkeit der jeweiligen Fraktionen ist in ml/min angegeben.

- A. durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigte Population aus Monozyten / Makrophagen
- B. 5 ml: Beladung und Elutriation von kleinen Lymphozyten und Blutplättchen
- C. 10 ml / 12 ml: Elutriation vorwiegend von Lymphozyten und auch Monozyten (250 ml)
- D. 19 ml: Elutriation vorwiegend von Monozyten (200 ml)
- E. 25 ml: Zellaggregate

Bild 31 zeigt eine elutrierte Monozytenpopulation, die für die Stimulationsexperimente aus peripherem Blut *H. pylori* negativer Individuen (n=2) eingesetzt wurde. Die Lymphozytenfraktion (10 -12 ml/min) besteht hier aus 78% CD3 und CD19 positiven Lymphozyten und aus 21% Monozyten. Die Monozytenfraktion hat einen 4%igen Anteil an Lymphozyten und besteht zu 85% aus Monozyten und Makrophagen. Die übrigen Zellen wurden nicht angefärbt.

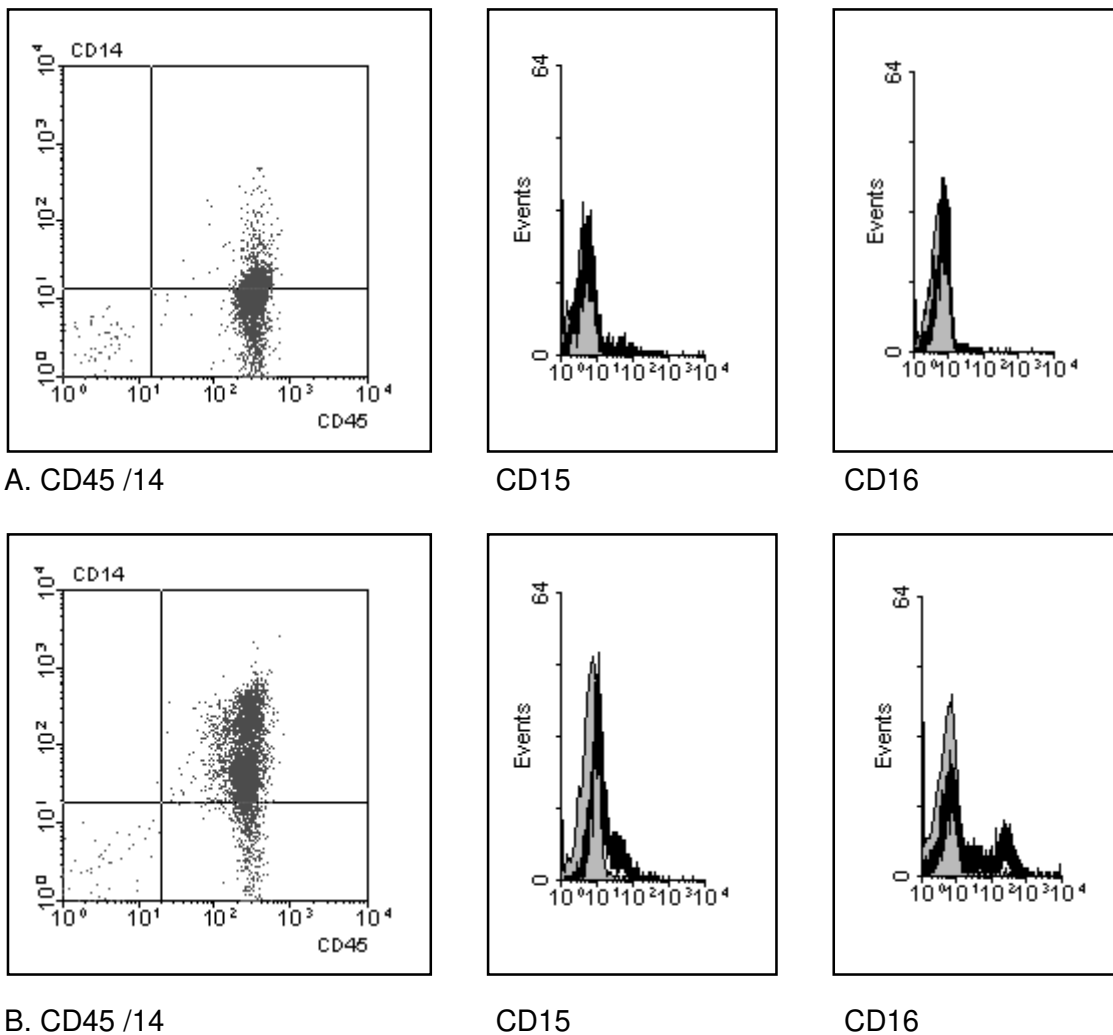


Bild 31: Charakterisierung der elutrierten Populationen.

Populationen, die nach der Aufreinigung von mononukleären Zellen (n=2) durch Dichtegradientenzentrifugation über die Gegenstromzentrifugation aufgetrennt wurden, wurden in der FACS-Analyse charakterisiert. Dargestellt ist jeweils ein Punkthistogramm für die CD45/CD14 Charakterisierung, und zwei Häufigkeitshistogramme für die Monozyten / Makrophagen Markierungen (CD15 / CD16) mit sichtbarer Populationsverschiebung zwischen den Fraktionen A und B.

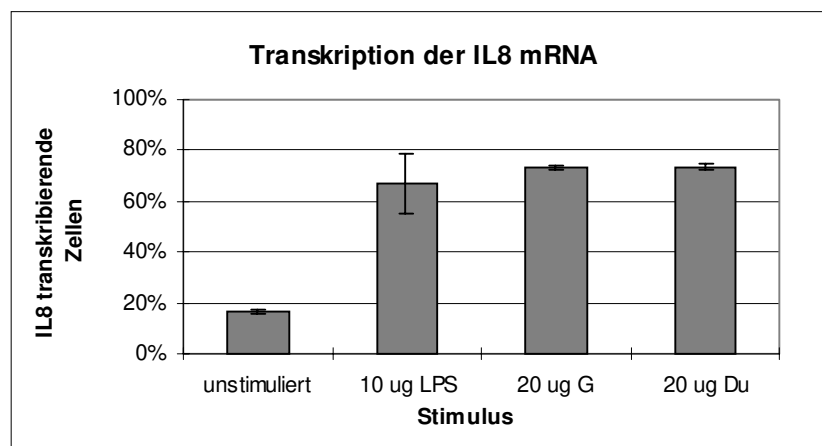
- A. Fraktionen 10-12 ml/min
- B. Fraktion 19 ml/min

Die Ansätze mit je  $5 \times 10^5$  Monozyten / Makrophagen wurden jeweils mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Oberflächenantigenen von *H. pylori* stimuliert. Es wurde ein Stamm, der mit einem Ulcus duodeni assoziiert ist (# 5268) und ein Stamm, der mit einer Gastritis assoziiert ist (# 4205), ausgesucht. Im Parallelansatz wurde eine Negativkontrolle ohne Stimulus und eine Positivkontrolle mit 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS mitgeführt (s. 3.10.2.).

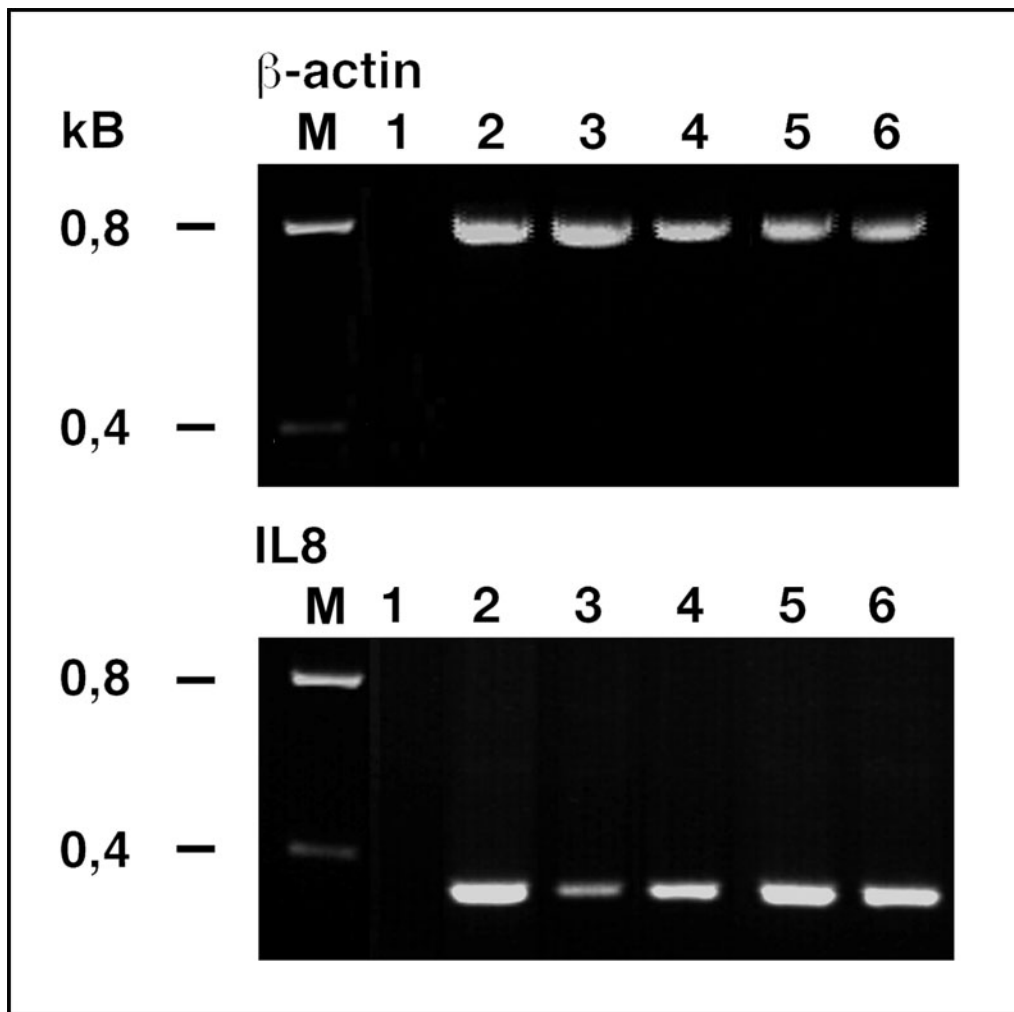
Die *in vitro* Aktivierung dieser Zellen zur IL8 Synthese sollte auf der Transkriptionsebene durch die RT-PCR und auf der Peptidebene mittels eines EIA untersucht werden.

#### *Transkription der IL8-mRNA in vitro nach Aktivierung mit H. pylori-Antigenen*

Für die Experimente auf der Ebene der Transkription wurde nach 4,5 Stunden Stimulation die mRNA mit Hilfe paramagnetischer Partikel (s. 3.15.2.) direkt isoliert und nach der reversen Transkription (s. 3.22.1.) mit spezifischen Primern für IL8 in der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (s. 3.22.2.1.). Eine semiquantitative Analyse erfolgte anhand eines DNA-Standards mit definierter Menge, indem die Stärke der PCR-Banden mit der Stärke der Markerbanden in Beziehung gesetzt wurden. Als eine Größe für die Gesamtzellmasse wurde die Amplifikation von  $\beta$ -Actin eingesetzt. Bild 32 zeigt die IL8 Banden und die Menge der detektierten DNA als prozentualer Anteil der Gesamtzellmasse. Die Werte sind in Tabelle 13 zusammengestellt.



A.

Bild 32 A: Transkription des Mediators IL8 von Monozyten / Makrophagen *in vitro*

B.

Bild 32 B: Transkription des Mediators IL8 von Monozyten / Makrophagen *in vitro*

Durch die Elutriation isolierte Monozyten / Makrophagen (n=2) wurden für die mRNA-Isolierung 4,5 Stunden mit LPS, *H. pylori*-Antigenen # 4205 (G) und # 5268 (DU) stimuliert und die isolierte mRNA nach der reversen Transkription mit IL8 spezifischen Primern amplifiziert. Zur Analyse wurden 10  $\mu$ l der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

A. Menge der IL8 Transkription als prozentualer Anteil der transkribierenden Zellen an der Gesamtzellmasse (Mittelwert aus n=2)

B. Dargestellt sind repräsentativ die Banden der  $\beta$ -Actin- und der IL8-cDNA (Spender I)

Spur M: DNA-Marker: (0,8 kB  $\rightarrow$  80 ng DNA)

Spur 1: PCR-Negativkontrolle

Spur 2: PCR-Positivkontrolle

Spur 3: unstimulierte Monozyten / Makrophagen

Spur 4: mit 10  $\mu$ g/ml LPS stimulierte Monozyten / Makrophagen

Spur 5: mit 20  $\mu$ g/ml *H. pylori*-Antigenen (# 5268) stimulierte Monozyten / Makrophagen

Spur 6: mit 20  $\mu$ g/ml *H. pylori*-Antigenen (# 4205) stimulierte Monozyten / Makrophagen

Die Stimulation von elutrierten und dadurch nicht vorstimulierten Monozyten / Makrophagen mit den *H. pylori*-Stämmen, aber auch mit LPS bewirkt eine vierfach stärkere Transkription der IL8 mRNA als sie in nicht stimulierten Zellen zu finden ist.

#### *Translation der IL8-mRNA in vitro nach Aktivierung mit H. pylori-Antigenen*

Der Nachweis der Sekretion des Genproduktes der Monozyten / Makrophagen erfolgte nach 24 Stunden Stimulation im Kulturüberstand mit einem spezifischen EIA. Die Konzentration des IL8 Peptids wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve bestimmt. (s. 3.12.). In Bild 33 ist der Produktionsindex dargestellt, der über die Ratio von stimulierten zu unstimulierten Ansätzen errechnet wurde. In Tabelle 13 sind die rohen Meßwerte für die Genexpression zusammengefaßt:

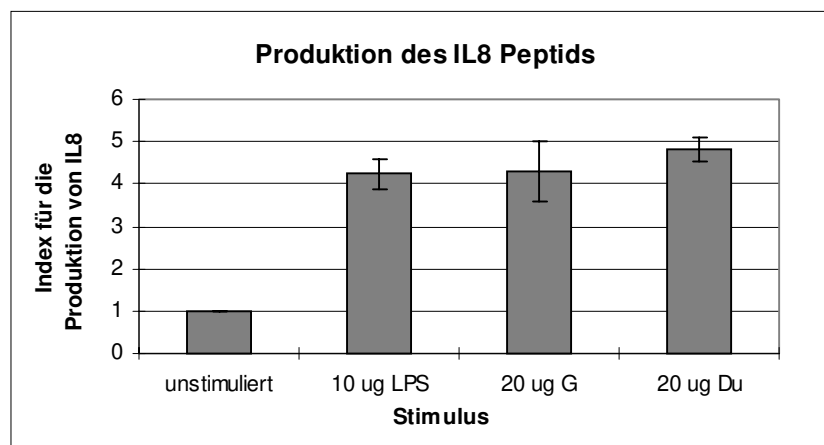


Bild 33: Nachweis des Genproduktes IL8 in Monozyten / Makrophagen

Die IL8 Peptidkonzentrationen wurden im Kulturüberstand nach einer 24-stündigen Stimulation mit LPS, *H. pylori*-Stamm # 4205 (G) und # 5268 (DU) im EIA anhand einer Eichkurve bestimmt. Zur vergleichenden Quantifizierung wurde die Ratio stimuliert / unstimuliert bestimmt und als Produktionsindex aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2 Versuchsansätzen.

Die Synthese des IL8 Peptids durch *H. pylori*-stimulierte Monozyten / Makrophagen ist 4 - 5 mal stärker als in nicht stimulierten Zellen. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Sekretion des Peptids nach Stimulation mit LPS oder den beiden eingesetzten *H. pylori*-Stämmen.

Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente *in vitro* zeigen übereinstimmend, daß *H. pylori* direkt in der Lage ist, Monozyten und Makrophagen zur IL8 Peptid-expression und -sezernierung zu stimulieren. Die Proteinsynthese wird transkriptionell reguliert.

Tab. 13: Quantifizierung von mRNA und Peptid des Mediators IL8 nach Stimulation von Monozyten / Makrophagen mit *H. pylori*-Oberflächenantigen

	β-Actin-Menge in ng		IL8 DNA-Menge in ng		IL8 Peptidmenge in µg	
	Spender I	Spender II	Spender I	Spender II	Spender I	Spender II
unstimuliert	301	419	48	72	22	53
10 µg LPS	150	380	87	289	100	212
20 µg # 4205	198	375	144	278	84	255
20 µg # 5268	191	378	142	279	110	260
Positivkontrolle	312	316	166	158		
			IL8 DNA / Zellmasse (%)		Index (Peptid)	
			Spender I	Spender II	Spender I	Spender II
unstimuliert			15,90	17,10	1,00	1,00
10 µg LPS			58,30	75,00	4,50	4,00
20 µg # 4205			72,70	74,00	3,80	4,80
20 µg # 5268			74,22	73,00	5,00	4,60

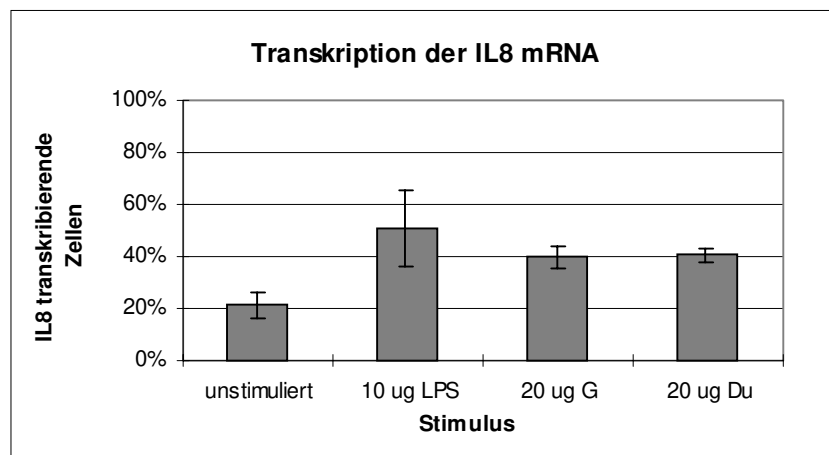
#### 4.6.5.2. Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die IL8 Produktion der Epithelien

Vitale *H. pylori* aktivieren durch Adhärenz an KATO III-Zellen die Freisetzung von IL8 Peptid (CRABTREE ET AL., 1994). In den folgenden Stimulationsexperimenten wurde der direkte Einfluß von extrahierten *H. pylori*-Oberflächenproteinen auf die Transkription und die Sezernierung von IL8 untersucht. Dazu wurden wie unter 4.6.5.1. beschrieben  $5 \times 10^5$  Epithelzellen, die aus Geweben von *H. pylori*-negativen Patienten (n=2) mit Hilfe von EDTA (s. 3.6.2.) und Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden (s. 3.8.), den Experimenten unterzogen.

#### *Transkription der IL8-mRNA in vitro nach Aktivierung mit H. pylori-Antigenen*

In Bild 34a ist die semiquantitative Bestimmung der amplifizierten IL8 spezifischen mRNA (s. 4.6.5.1.) graphisch dargestellt. Sie spiegelt den prozentualen Anteil der

durch die Stimulantien aktivierten Epithelzellen in der Gesamtzellmasse, die durch die amplifizierte  $\beta$ -Actin-cDNA reflektiert wird, wider. Repräsentativ für beide Spender sind im Bild 34b die in einem Agarosegel aufgetrennten Banden der IL8 und  $\beta$ -Actin Amplifikation von Spender I gezeigt und in Tabelle 14 die Rohwerte und die Werte der semiquantitativen cDNA-Ermittlung zusammengestellt.



A.

Bild 34 A: Transkription des Mediators IL8 von Epithelzellen *in vitro*

Aus der Lamina propria isolierte und aufgereinigte Epithelzellen (n=2) wurden für die mRNA-Isolierung 4,5 Stunden mit LPS, *H. pylori*-Antigenen # 4205 (G) und # 5268 (DU) stimuliert und nach der reversen Transkription der isolierten mRNA diese mit spezifischen IL8 Primern amplifiziert. Zur Analyse wurden 10  $\mu$ l der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

- 
- A. Die Mengen der amplifizierten cDNA wurden als prozentualer Anteil der Gesamtzellmasse ( $\beta$ -Actin cDNA) errechnet und aus 2 Experimenten gemittelt.  
 B. Dargestellt sind repräsentativ die Banden der  $\beta$ -Actin Kontrolle und der IL8 cDNA (Spender I).
- 

Spur M: DNA-Marker (0,8 kB  $\rightarrow$  80 ng)

Spur 1: PCR-Negativkontrolle

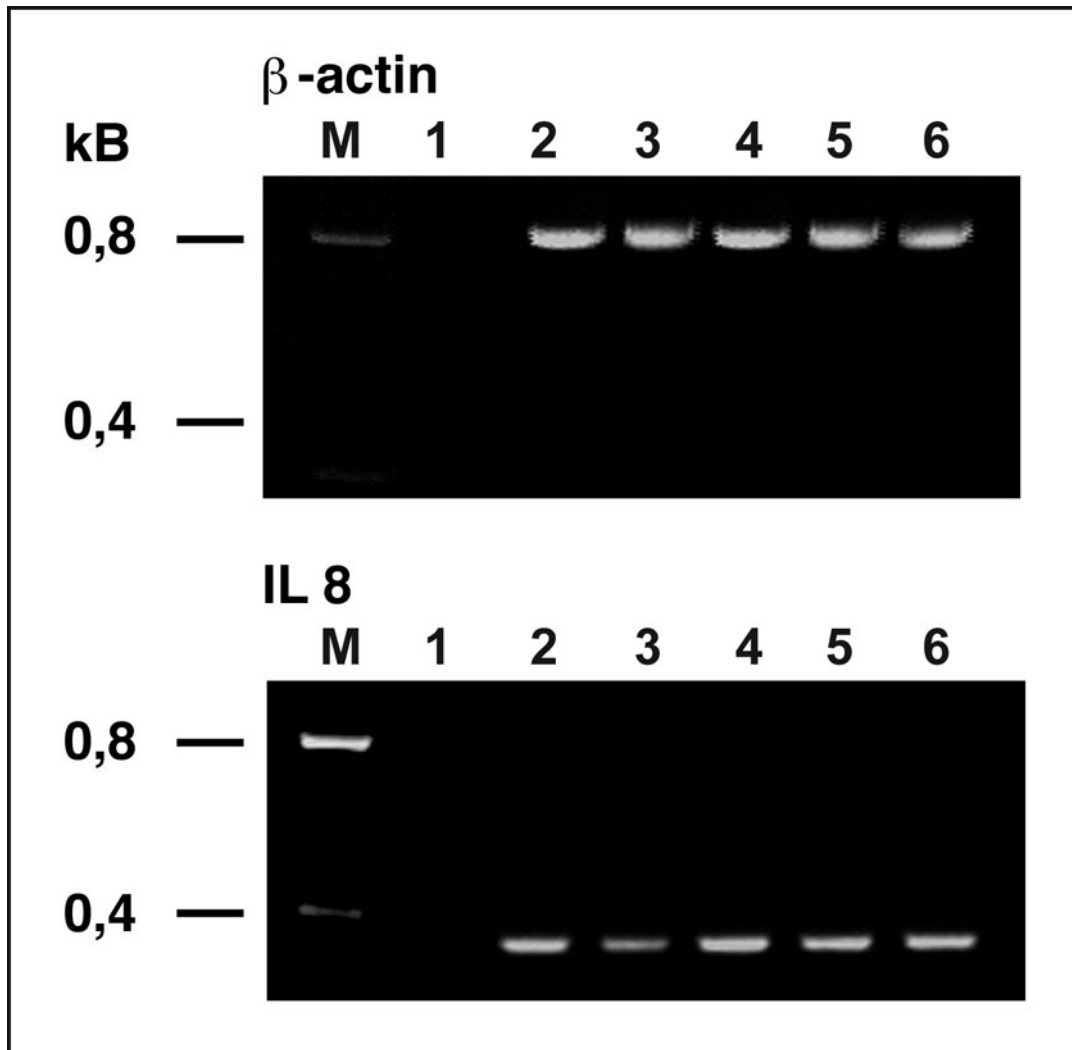
Spur 2: PCR-Positivkontrolle

Spur 3: unstimulierte Epithelzellen

Spur 4: mit 10  $\mu$ g/ml LPS stimulierte Epithelzellen

Spur 5: mit 20  $\mu$ g/ml *H. pylori*-Antigenen (# 5268) stimulierte Epithelzellen

Spur 6: mit 20  $\mu$ g/ml *H. pylori*-Antigenen (# 4205) stimulierte Epithelzellen



B.

Bild 34 B: Transkription des Mediators IL8 von Epithelzellen *in vitro*

Eine Stimulation der isolierten Epithelzellen *H. pylori*-negativer Patienten mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen bewirkt eine Steigerung der Transkription der IL8 mRNA auf das doppelte.

*Translation der IL8-mRNA in vitro nach Aktivierung mit H. pylori-Antigenen*

Für die Untersuchung der IL8 Sekretion wurde eine Kultur von  $1 \times 10^6$  Epithelzellen / ml wie im Kapitel 4.6.5.1. beschrieben 24 Stunden mit LPS und Oberflächenantigenen von zwei *H. pylori*-Stämmen (Gastritis und Ulcus duodeni assoziiert) stimuliert. Die IL8 Peptidkonzentration wurde im Überstand im EIA



gemessen (Tabelle 14). Im Bild 35 ist der Index der Produktion von IL8 als die Ratio der stimulierten zu unstimulierten Zellen dargestellt.

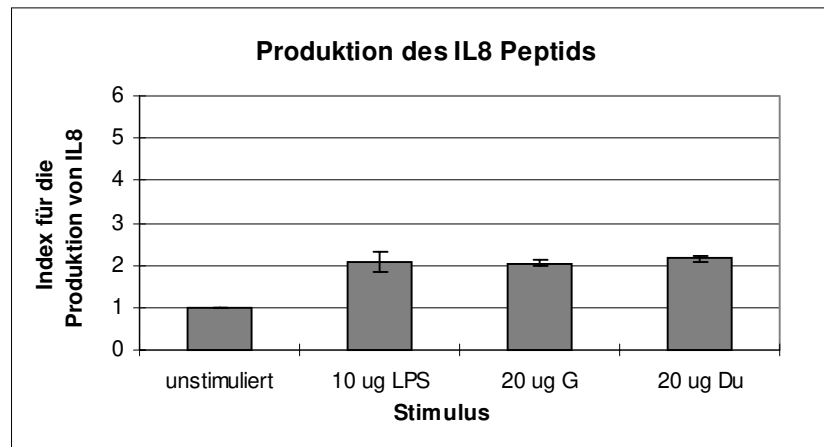


Bild 35: Nachweis des Genproduktes IL8 in Epithelzellen

Die IL8 Peptidkonzentrationen wurden im Kulturüberstand (n=2) nach einer 24 stündigen Stimulation der Epithelzellen im EIA anhand einer Eichkurve bestimmt. Es wurde die Ratio stimuliert / unstimuliert bestimmt und als Produktionsindex aufgetragen.

Tab. 14: Quantifizierung von mRNA und Peptid des Mediators IL8 nach Stimulation von Epithelzellen mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen

	β-Actin-Menge in ng		IL8 DNA-Menge in ng		IL8 Peptidmenge in µg	
	Spender I	Spender II	Spender I	Spender II	Spender I	Spender II
unstimuliert	274	256	49	64	3	3
10 µg LPS	175	177	71	108	6	6
20 µg (# 4205)	181	226	66	97	5	6
20 µg (# 5268)	166	234	64	99	6	6
Positivkontrolle	285	368	70	107		
			IL8 DNA / Zellmasse (%)		Index (Peptid)	
			Spender I	Spender II	Spender I	Spender II
unstimuliert			17,86	24,81	1,00	1,00
10 µg LPS			40,69	60,98	2,26	1,90
20 µg (# 4205)			36,68	42,67	2,00	2,10
20 µg (# 5268)			38,80	42,41	2,20	2,10

Die Epithelzellen zeigen nach Stimulation mit LPS und Oberflächenantigenen der eingesetzten Stämme eine doppelt so hohe Sekretion von IL8 wie die nicht stimulierten Epithelzellen.

*H. pylori* vermag auch die Epithelzellen, aber in geringerem Maße als Monozyten und Makrophagen, direkt zur IL8 Sekretion zu stimulieren. Diese Stimulation wird transkriptionell reguliert.

Ausgehend von diesen Befunden, erlaubt die Detektion der IL8 Transkripte in der Lamina propria und im Epithel *H. pylori*-positiver Gewebe (s. 4.6.2.) einen Rückschluß auf die Sekretion des Peptides. *H. pylori* stimuliert direkt die Produktion des Mediators IL8 sowohl im Gewebe als auch im Epithel, und bewirkt somit auch indirekt die Rekrutierung und Aktivierung von polymorphkernigen Granulozyten und die Perpetuierung der Entzündung.

#### **4.6.6. Verteilung von TNF $\alpha$ Transkripten in der Antrummukosa bei der *H. pylori*-assoziierten Gastritis**

Ein weiterer Faktor, der zur Arretierung der neutrophilen Granulozyten führt und direkt eine Destruktion der gastrointestinalen Barriere verursachen kann, ist der Mediator TNF $\alpha$ .

Stimulationsexperimente mit *H. pylori*-Oberflächenproteinen *in vitro* (ENGELKING, 1995) und Untersuchungen der *H. pylori*-assoziierten Gastritis zeigten hohe TNF $\alpha$  Konzentrationen (CRABTREE ET AL., 1991; FAN ET AL., 1995) im Gewebe und in der Magenflüssigkeit. Es ließen sich jedoch keine Aussagen über die TNF $\alpha$  Produzenten in der Mukosa machen, da das Peptid mit den verwendeten immunhistochemischen Methoden (ENGELKING, 1995) nicht nachweisbar war. Daher wurde mit der Technik der *in-situ*-Hybridisierung die Charakterisierung der Ursprungszellen der TNF $\alpha$  Produktion auf der Transkriptionsebene vorgenommen.

Zur Untersuchung der TNF $\alpha$  Transkription wurden Gewebe aus dem Antrum von Patienten mit einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis (Entzündungsgrade 1 - 3, n=17) und von Patienten ohne *H. pylori*-Assoziation (histologisch normales Gewebe, Entzündung und Gastritis C, n=12) herangezogen (s. 4.4.). Nach der Etablierung der *in-situ*-Hybridisierung für die TNF $\alpha$  Sonde (s. 4.6.1.) wurden die Gewebe bei

40°C für 8 Stunden (s. 3.28.1.) inkubiert. Die Autoradiographie auf der Photoemulsion und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin / Eosin (s. 3.28.2.) erlaubte eine genaue Charakterisierung der TNF $\alpha$  produzierenden Zellen im Gewebe. Die Spezifität der detektierten Transkriptsignale wurde anhand der durchgeführten Kontrollen gesichert (s. 3.28.3.). Pro Patient wurden 30 Objektträger hybridisiert.

Bild 36a zeigt beispielhaft ein histologisch normales Gewebe mit wenig Zellinfiltrat und nur wenig Hybridisierungssignalen, die aber meist im Mukus lokalisiert sind. Die Bilder 34b und c zeigen repräsentativ ein entzündetes Gewebe und eine Gastritis C ohne *H. pylori*-Assoziation. Bei stärkerem Zellinfiltrat sind die TNF $\alpha$  mRNA-Signale im Zytoplasma neben dem Zellkern in Zellen der Lamina propria gehäufte zu finden.

Bild 37 zeigt repräsentative Schnitte für die *H. pylori*-assoziierte Gastritis Typ B, die nach der Sydney-Klassifikation die Diagnosen Entzündungsgrad 1 (A. und B.), 2 (C.) und 3 (D.) bekamen. Durch die Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe ist hier eine wesentlich höhere Zelldichte vorhanden als im *H. pylori*-negativen Gewebe. In diesem Zellinfiltrat befinden sich u.a. Monozyten / Makrophagen, die die TNF $\alpha$  mRNA transkribieren. Die Epithelzellen in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis sind nur im geringen Maße an der TNF $\alpha$  Transkription beteiligt. Die Signaldichte der Transkripte im Gewebe nimmt mit dem steigenden Grad der Entzündung zu.

In der *H. pylori*-assoziierten Gastritis I und II sind besonders epithelnahe Monozyten / Makrophagen zur TNF $\alpha$  Transkription aktiviert (Bild , 37b), während die Transkriptionsaktivität in der Gastritis III mehr in der Tiefe der Lamina propria verteilt zu finden ist und nicht mehr in der Nähe der Epithelien.

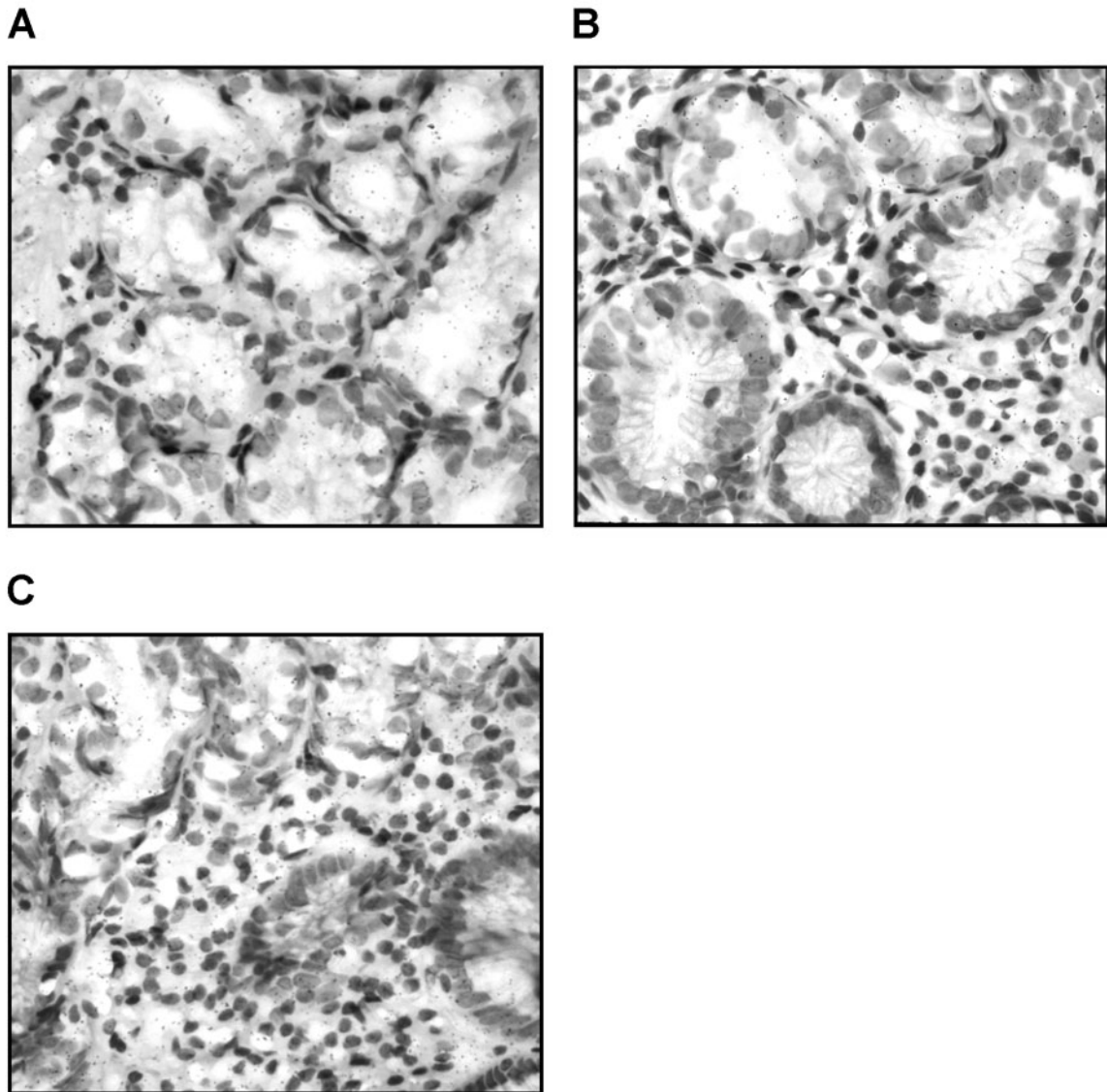


Bild 36: TNF $\alpha$  Transkription im *H. pylori*-negativen Gewebe

Von Zungenbiopsien des humanen Antrums *H. pylori*-negativer Patienten mit histologisch normalem Gewebe (A., n=6), von Patienten mit Entzündung (B., n=3) und einer Gastritis Typ C (C., n=3), wurden nach Fixierung und Paraffineinbettung 4  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und der *in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis von TNF $\alpha$  Transkripten unterzogen. Die Lokalisierung der TNF $\alpha$  Transkription erfolgte anhand der Silbergranula, die nach der Autoradiographie an Orten der Hybridisierung auf der Filmemulsion entstanden sind.

---

A.: histologisch normales Gewebe; Vergrößerung: 400 x  
B.: Entzündung, nicht mit *H. pylori* assoziiert; Vergrößerung: 400 x  
C.: Gastritis C, nicht mit *H. pylori* assoziiert; Vergrößerung: 400 x

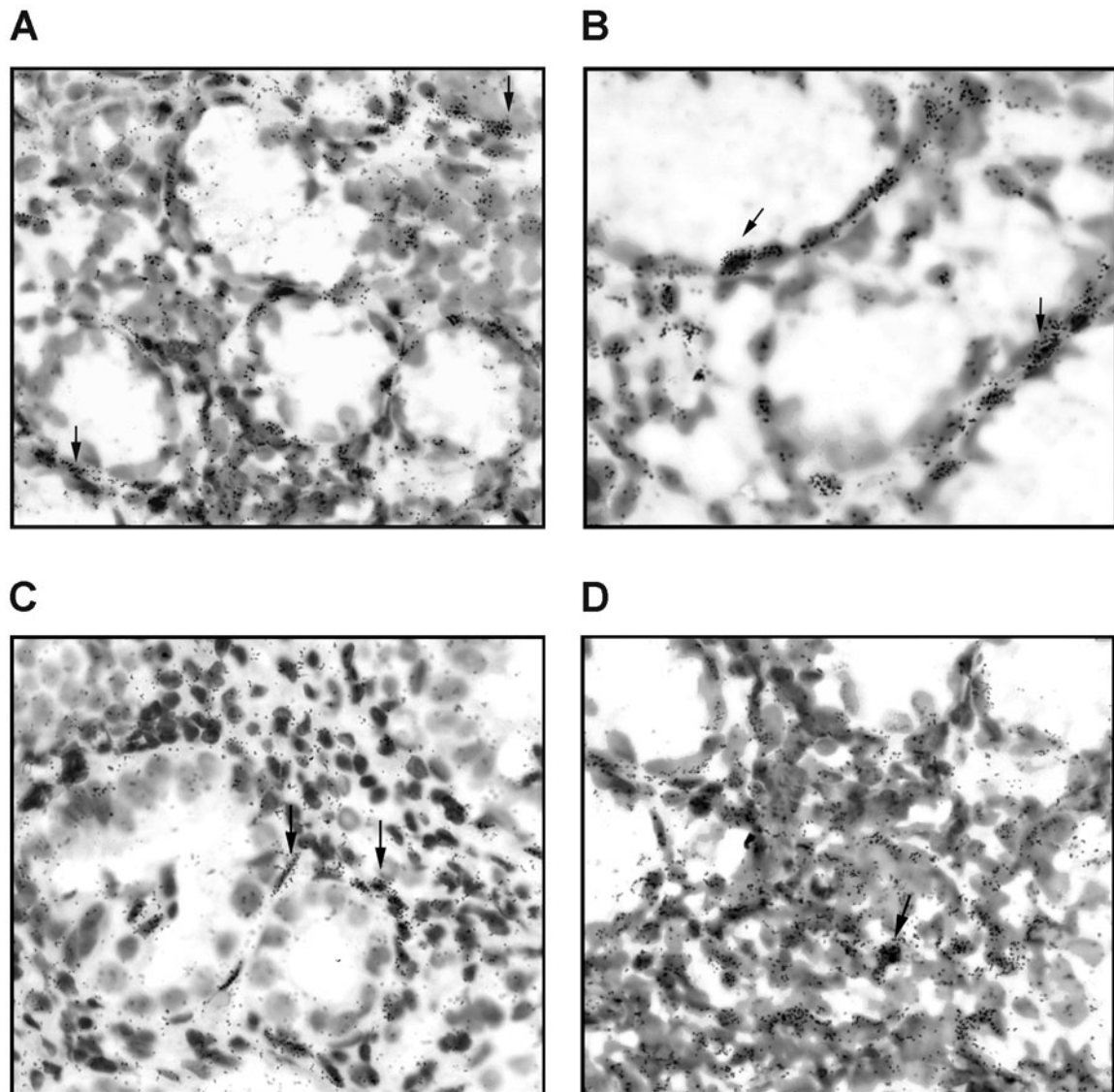


Bild 37: TNF $\alpha$  Transkription in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis

Von Zangenbiopsien des humanen Antrums von Patienten mit einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1 (A. und B., n=6), mit dem Entzündungsgrad 2 (C., n=8), und dem Entzündungsgrad 3 (D., n=3) wurden nach Fixierung und Paraffineinbettung 4  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und zum Nachweis von TNF $\alpha$  Transkripten hybridisiert. Nach der Autoradiographie erfolgte die Lokalisierung der TNF $\alpha$  Transkription anhand der Silbergranula, die die mRNA im Gewebe sichtbar machen.

- A.: Gastritis B mit Entzündungsgrad 1; Vergrößerung: 400 x  
 B.: Gastritis B mit Entzündungsgrad 1; Vergrößerung: 1000 x  
 C.: Gastritis B mit Entzündungsgrad 2; Vergrößerung: 400 x  
 D.: Gastritis B mit Entzündungsgrad 3; Vergrößerung: 400 x

#### 4.6.7. Durchschnittliche Transkription von TNF $\alpha$ in der Antrummukosa *H. pylori*-positiver und *H. pylori*-negativer Patienten

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Aktivierung der Zellen im Gewebe wurde wie im Kapitel 4.6.3. die Gesamtanzahl der signaltragenden Zellen sowie die der Silbergranula (TNF $\alpha$  RNA) im Gewebe ermittelt. Der Quotient Signal (gesamt) / Zellzahl (gesamt) spiegelt die durchschnittliche Transkription wieder (Granula / Zelle).

##### 4.6.7.1. Transkripte in der Lamina propria

Die durchschnittliche Transkriptionsaktivität von TNF $\alpha$  in den Monozyten / Makrophagen wurde im *H. pylori*-negativen Gewebe (histologisch normales Gewebe (n=6), Entzündung (n=3), Gastritis C (n=3) und in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis I (n=6), II (n=8) und III (n=3) evaluiert. Bild 38 zeigt die Mittelwerte der berechneten durchschnittlichen Transkription in jeder diagnostischen Gruppe.

In der *H. pylori*-assoziierten Gastritis I ist die durchschnittliche Transkriptionsaktivität von TNF $\alpha$  mit 7 Granula / Zelle niedriger als in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis II (11 Granula / Zelle) oder III (11 Granula / Zelle) (p=0,0001 bzw. p=0,0012). Die durchschnittliche Transkription in den Entzündungsgraden 2 und 3 bleibt gleich.

Obwohl die Aktivierung in der *H. pylori*-negativen Gruppe mit der Schwere der Diagnose von 1 Granula / Zelle (p=0,0003) im histologisch normalen Gewebe auf 3 Granula / Zelle in einer Entzündung und 4 Granula / Zelle in einer Gastritis C zunimmt (p < 0,0001), bleibt das Niveau der durchschnittlichen Transkription im *H. pylori*-negativen Gewebe unter dem in einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis (p < 0,0004).

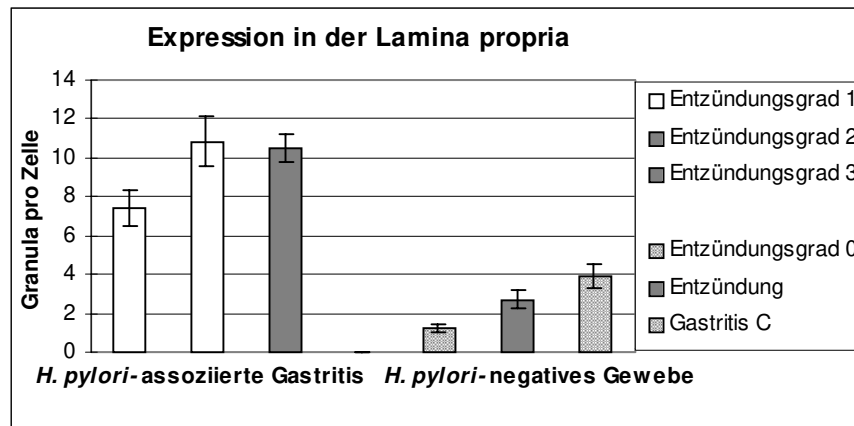


Bild 38: Durchschnittliche Transkription von TNF $\alpha$  mRNA der Monozyten / Makrophagen in der Lamina propria

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 (n=6), dem Entzündungsgrad 2 (n=8), dem Entzündungsgrad 3 (n=3) und von histologisch normalem Gewebe (Entzündungsgrad 0, n=6), vom Gewebe einer nicht *H. pylori*-assoziierten Entzündung (n=3) und Gastritis C (n=3), wurden mit Hilfe eines Zählrasters die TNF $\alpha$  mRNA-Signale gezählt und die Anzahl der Monozyten / Makrophagen bestimmt, die diese Signale zeigten. Durch den Quotienten Signale / Zellzahl wurde die durchschnittliche Transkription der IL8 mRNA bestimmt.

#### 4.6.7.2. Transkripte im Epithel

Die Bestimmung der durchschnittlichen Transkription von TNF $\alpha$  im Epithel *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten stellt sich anders dar. Bild 39 zeigt die errechneten Mittelwerte der Aktivierung des Epithels in den einzelnen Diagnosen.

Das Epithel in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1 zeigt die stärkste Aktivierung der Transkription von TNF $\alpha$  (7 Granula / Zelle). Diese fällt in der Gastritis II auf die Hälfte (3 Granula / Zelle) und bleibt dann in der Gastritis III gleich. (p=0,0004).

In der *H. pylori*-negativen Gruppe wurde eine schwache durchschnittliche Transkription detektiert, die sich aber innerhalb der einzelnen histologischen Diagnosen nicht unterschied (normales Gewebe: 1 Granulum / Zelle; Entzündung: 1 Granulum / Zelle; Gastritis C: 1 Granulum / Zelle). Obwohl sich die durchschnittliche Transkription in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis III stark an die der Gastritis C näherte, blieb die Aktivierung des Epithels in der Gastritis III erhöht

( $p=0,02$ ). Insgesamt aber war die durchschnittliche Transkription des Epithels im *H. pylori*-positiven Gewebe signifikant stärker als im Kontrollgewebe ( $p < 0,0007$ ).

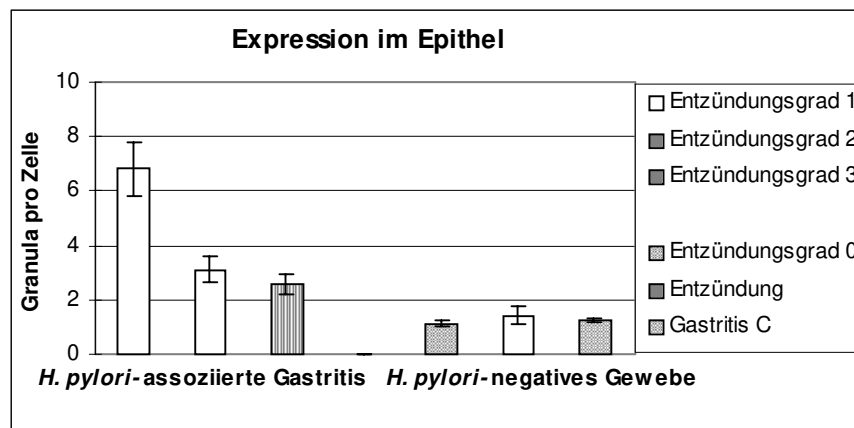


Bild 39: Durchschnittliche Transkription von TNF $\alpha$  mRNA der Epithelzellen

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 ( $n=6$ ), dem Entzündungsgrad 2 ( $n=8$ ), dem Entzündungsgrad 3 ( $n=3$ ) und vom histologisch normalen Gewebe (Entzündungsgrad 0,  $n=6$ ), vom Gewebe einer nicht *H. pylori*-assoziierten Entzündung ( $n=3$ ) und Gastritis C ( $n=3$ ), wurden die Epithelzellen, die TNF $\alpha$  mRNA-Signale zeigten, sowie die Signale selbst mit Hilfe eines Zählrasters gezählt und die durchschnittliche Transkription der TNF $\alpha$  mRNA bestimmt.

#### 4.6.8. Bestimmung der Transkriptionsintensität von TNF $\alpha$

Wie im Kapitel 4.6.4. beschrieben, wurde der Aktivierungsgrad der einzelnen Zellen und ihre Häufigkeit im Gewebe zur Abschätzung des Ausmaßes der Mediator Expression berechnet. Den Aktivierungszustand einer Zelle spiegelt dabei die Signaldichte wider. Die Zellen, die mehr als 15 Granula aufwiesen, zeigten eine hohe Aktivität, aktivierte Zellen enthielten 5 - 15 Signale. Die Transkriptionsintensität drückt sich als der prozentuale Anteil von Zellen unterschiedlicher Aktivierungsgrade innerhalb einer Population aus.



#### 4.6.8.1. Transkripte in der Lamina propria

Monozyten / Makrophagen im Gewebe *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten wurden anhand ihrer Signaldichte einem Aktivierungsgrad zugeordnet und ihre Häufigkeit in der Lamina propria im definierten Areal prozentual bestimmt. Bild 40 stellt eine graphische Zusammenfassung der Intensität der Transkription von aktivierten Monozyten / Makrophagen innerhalb der Gesamtpopulation in jeder Diagnose dar.

In der *H. pylori*-assoziierten Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1 ist der Anteil an hoch aktivierten Monozyten / Makrophagen mit 38% um das vierfache höher als in der Gastritis II mit 10% und der Gastritis III mit 6% ( $p < 0,0001$ ). Der Anteil der Zellen mit 5 - 15 Granula in den Entzündungsgraden 1 - 3 verhält sich reziprok dazu. Während diese Zellen in der Gastritis I nur 13% in der Gesamtpopulation einnehmen, steigt ihr Anteil in der Gastritis II auf das vierfache (43%) und erreicht in der Gastritis III einen Anteil von 85%. Diese Zunahmen sind signifikant ( $p < 0,0001$ ). Der Anteil an aktivierten Zellen erreicht im Entzündungsgrad 3 einen Anteil von 90% innerhalb der gesamten Monozyten / Makrophagenpopulation.

In der *H. pylori*-negativen Gruppe gibt es zwischen den einzelnen Diagnosen in der Intensität der Transkription keine signifikanten Unterschiede, obwohl der Anteil der aktivierten Zellen mit steigender Schwere der Entzündung größer wird (histologisch normales Gewebe: 4%, Entzündung: 20%, Gastritis C: 25%). Die Intensität der Transkription im *H. pylori*-negativen Gewebe liegt immer niedriger als im *H. pylori*-positiven Gewebe ( $p < 0,005$ ).

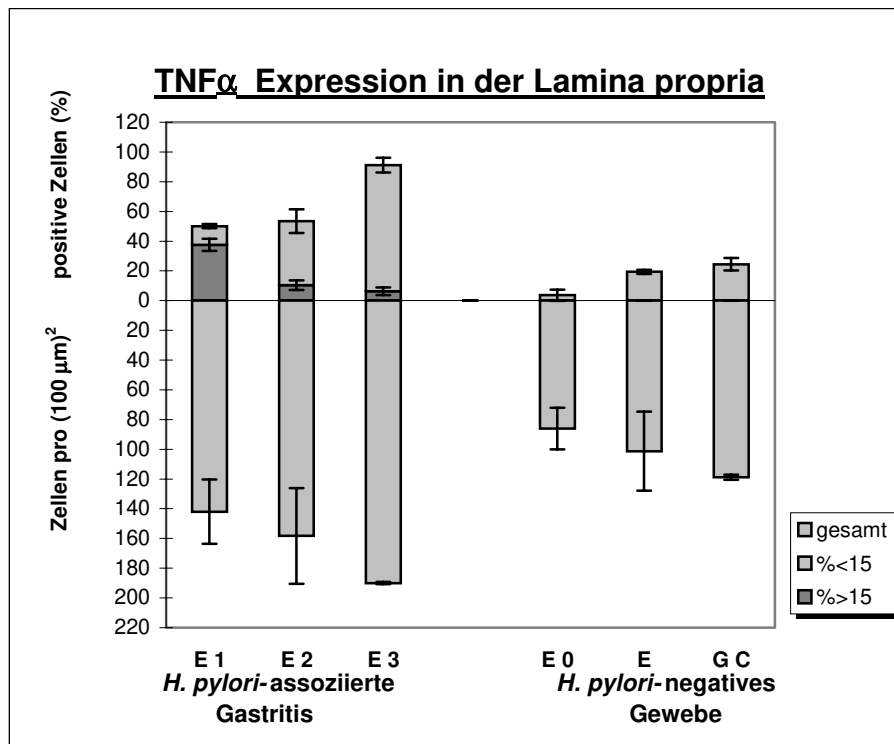


Bild 40: Intensität der TNF $\alpha$  Transkription in den Monozyten / Makrophagen

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 (n=6), dem Entzündungsgrad 2 (n=8), dem Entzündungsgrad 3 (n=3) und vom histologisch normalen Gewebe (Entzündungsgrad 0, n=6), vom Gewebe einer nicht *H. pylori*-assoziierten Entzündung (n=3) und von einer Gastritis C (n=3) wurden die Monozyten / Makrophagen auf einer Fläche von  $3 \times (100\mu\text{m})^2$  gezählt. Zusätzlich wurden in jeder Zelle die TNF $\alpha$  mRNA-Signale ermittelt, wonach die Zuordnung der Zellen zu einem Aktivitätsgrad vorgenommen wurde. Dargestellt ist die absolute Monozyten- / Makrophagenzahl (untere Diagrammhälfte) und der prozentuale Anteil der transkribierenden Zellen auf einem Gebiet von  $(100\mu\text{m})^2$ .

Abkürzungen: E1: *H. pylori*-assoziierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1  
 E2: *H. pylori*-assoziierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 2  
 E3: *H. pylori*-assoziierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 3  
 E0: histologisch normales Gewebe  
 E : Entzündung, die nicht mit *H. pylori* assoziiert ist  
 GC: Gastritis C, nicht mit *H. pylori* assoziiert

Aktivierungsgrad: 5 - 15: aktiviert  
 > 15 : stark aktiviert

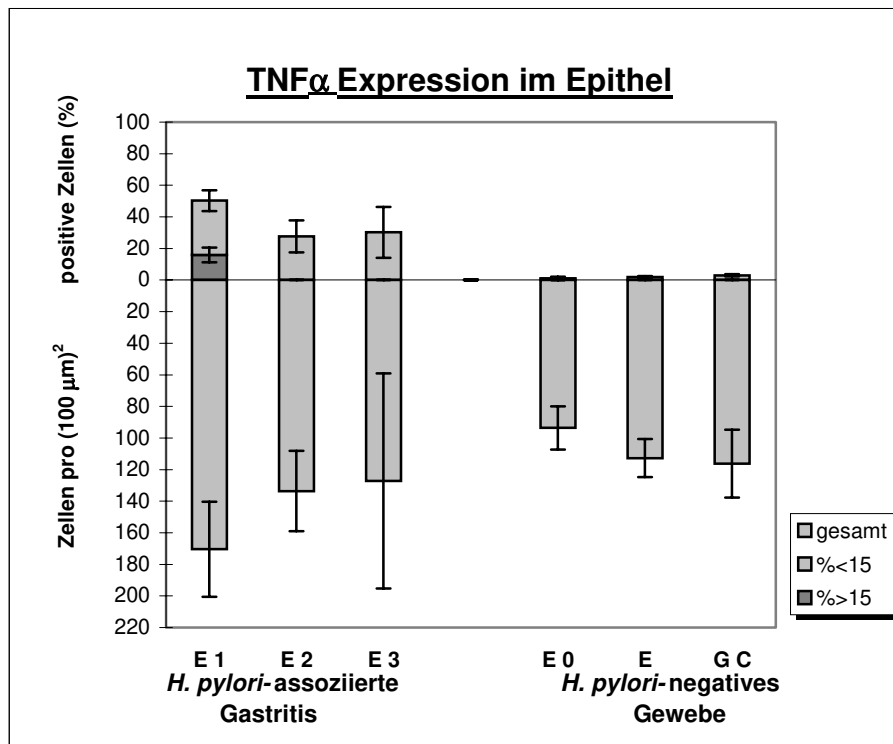
4.6.8.2. Transkripte im Epithel

Bild 41: Intensität der TNFα Transkription im Epithel

Von den hybridisierten Gewebeschnitten einer *H. pylori*-assozierten Gastritis B mit dem Entzündungsgrad 1 (n=6), dem Entzündungsgrad 2 (n=8), dem Entzündungsgrad 3 (n=3) und vom histologisch normalen Gewebe (Entzündungsgrad 0, n=6), vom Gewebe einer nicht *H. pylori*-assozierten Entzündung (n=3) und Gastritis C (n=3) wurden die Epithelzellen auf einer Fläche von  $3 \times (100\mu\text{m})^2$  gezählt. Zusätzlich wurden in jeder Zelle die TNFα mRNA-Signale ermittelt, wonach die Zuordnung der Zellen zu einem Aktivitätsgrad vorgenommen wurde. Dargestellt ist die absolute Epithelzellzahl (untere Diagrammhälfte) und der prozentuale Anteil der transkribierenden Zellen auf einer Fläche von  $(100\mu\text{m})^2$ .

Abkürzungen: E1: *H. pylori*-assozierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1  
 E2: *H. pylori*-assozierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 2  
 E3: *H. pylori*-assozierte Gastritis mit dem Entzündungsgrad 3  
 E0: histologisch normales Gewebe  
 E : Entzündung, die nicht mit *H. pylori* assoziiert ist  
 GC: Gastritis C, nicht mit *H. pylori* assoziiert

Aktivierungsgrad: 3 - 15: aktiviert  
 > 15 : stark aktiviert

Die Untersuchung der Transkriptionsintensität im Epithel stellt sich folgendermaßen dar (Bild 41): Nur in der *H. pylori*-assozierten Gastritis I wurde

ein hoher Aktivierungsgrad der Epithelzellen festgestellt. Der Anteil dieser Zellpopulation beträgt 16%. Epithelzellen mit 5 - 15 Granula / Zelle wurden in allen Geweben festgestellt. Der Anteil dieser Zellen von 34% in der Gastritis I, 28% in der Gastritis II und 30% in der Gastritis III zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Der Anteil an aktivierten Epithelzellen in der *H. pylori*-negativen Gruppe ist im histologisch normalen Gewebe (1%) sehr gering und steigt in einer Entzündung auf 2%. Der Anstieg der aktivierten Zellen in einer Gastritis C auf 3% ist signifikant ( $p=0,003$ ). In einem *H. pylori*-negativen Gewebe gibt es unabhängig von der histologischen Diagnose immer weniger aktivierte Epithelzellen als im *H. pylori*-positiven Epithel ( $p < 0,04$ ).

Mit der Technik der *in-situ*-Hybridisierung wurde die Transkription von  $TNF\alpha$  in der Mukosa und im Epithel nachgewiesen. Dabei nimmt das Epithel eine untergeordnete Rolle in der  $TNF\alpha$  Expression ein. Dagegen ist die Transkription von  $TNF\alpha$  in den Monozyten / Makrophagen reguliert, denn sie weisen in der Gastritis I einen hohen Aktivierungsgrad auf. Dieser sinkt aber in den aufsteigenden Entzündungsgraden, und gleichzeitig steigt die Anzahl der aktivierten Zellen mit dem Entzündungsgrad an.

#### **4.6.9. $TNF\alpha$ Transkription von Monozyten / Makrophagen *in vitro***

$TNF\alpha$  wurde *in situ* in der *H. pylori*-assozierten Gastritis sowohl in den Epithelzellen als auch in den Monozyten / Makrophagen in der Tiefe der Lamina propria nachgewiesen. Da die Stimulation zur  $TNF\alpha$  Produktion multifaktoriell ist, wurde ein direkter bzw. indirekter Einfluß von *H. pylori* auf die  $TNF\alpha$  Transkription in Monozyten / Makrophagen in *in vitro* Stimulationsversuchen mit Oberflächenproteinen eines mit Gastritis assoziierten *H. pylori*-Stammes (# 1689) untersucht.

Zur Stimulation reiner nicht voraktivierter Monozyten / Makrophagen Populationen wurden mononukleäre Zellen *H. pylori*-negativer Spender ( $n=5$ ) über die Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.6.1.) aufgereinigt und mittels Elutriation separiert (s. 3.7.2.). Sie wurden mit 20  $\mu\text{g}$  *H. pylori*-Oberflächenproteinen 4,5

Stunden stimuliert (s. 3.10.1.) und die TNF $\alpha$  spezifische mRNA in den fixierten Zellen (s. 3.23.2.) mittels der *in-situ*-Hybridisierung detektiert (s. 3.28.). Im Parallelansatz wurde die Detektion der spezifischen mRNA in Zellen nach einer Stimulation mit 10  $\mu$ g LPS und, als Negativkontrolle, in Zellen ohne Stimulus vorgenommen. Es wurden jeweils 30 Objektträger inklusive der durchgeführten Kontrollen (s. 3.28.3.) in der *in-situ*-Hybridisierung behandelt.

In Bild 42 sind repräsentativ die mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen stimulierten Monozyten / Makrophagen sowie nicht stimulierte Zellen nach der Autoradiographie (s. 3.28.2.) von Spender 1 gezeigt. Während alle nicht stimulierten Zellen keine TNF $\alpha$  spezifischen Signale zeigten, wurden über den Kernen von *H. pylori*- und LPS-stimulierten Zellen TNF $\alpha$  Transkripte detektiert.

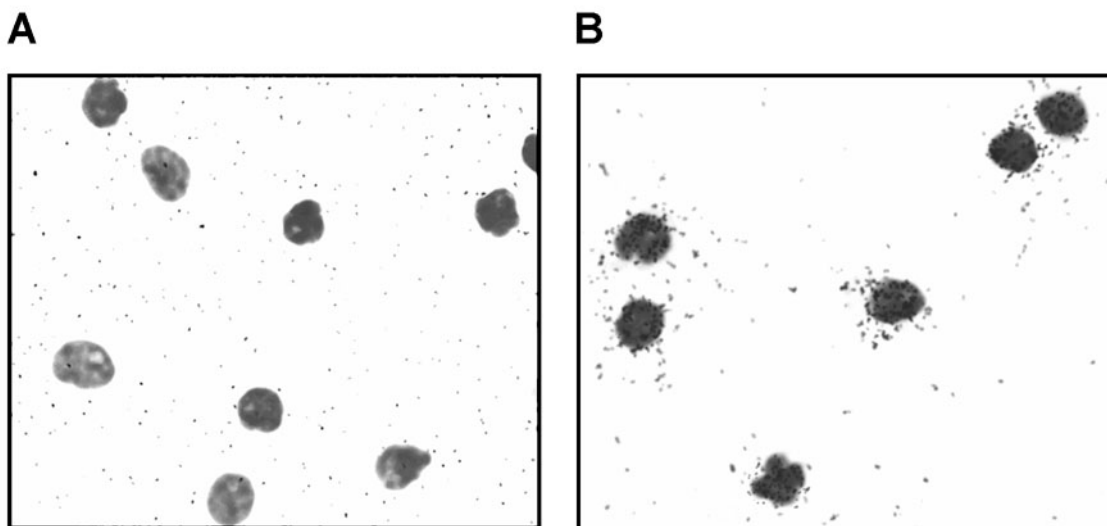


Bild 42: TNF $\alpha$  Transkription von Monozyten / Makrophagen *in vitro*

Elutrierte Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer Spender (n=5) wurden mit *H. pylori*-Antigenen stimuliert. Die Aktivierung wurde anhand der Detektion von TNF $\alpha$  mRNA in der *in-situ*-Hybridisierung vorgenommen (repräsentativ: Spender 1).

- 
- A. unstimulierte Monozyten / Makrophagen
  - B. stimulierte Monozyten / Makrophagen

Die eingesetzten nicht voraktivierten Monozyten / Makrophagen wurden durch *H. pylori* zur Transkription von TNF $\alpha$ -mRNA direkt stimuliert. Übertragen auf die *in*

*situ* Situation ist eine transkriptionelle Regulation der TNF $\alpha$  Produktion durch das Bakterium nicht auszuschließen.

#### **4.6.10. Verteilung von TGF $\beta$ in der Antrum mukosa bei der *H. pylori*-assoziierten Gastritis**

TGF $\beta$  ist ein stark immunmodulierendes Zytokin, das die Immunreaktion beeinflusst und auch einen chemotaktischen Faktor für Monozyten und andere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten darstellt (WAHL ET AL., 1987). Der Nachweis von TGF $\beta$  im Gewebe *H. pylori*-assoziiierter Gastritis ist ein weiterer Bestandteil, der zur Schädigung der Mukosa und Destruktion des Gewebes führt.

Da Monozyten konstitutiv das TGF $\beta$  Gen exprimieren und nur nach Aktivierung das Peptid synthetisieren und sezernieren (WAHL ET AL., 1989), wurde das TGF $\beta$  Peptid in der Mukosa *H. pylori*-positiver (n=9) und *H. pylori*-negativer (n=9) Patienten immunhistochemisch detektiert.

Die immunhistochemische Detektion des TGF $\beta$  Peptids in fixierten (s. 3.23.1), in Paraffin eingebetteten (s. 3.24.) und geschnittenen (s. 3.25.) Geweben erfolgte nach Permeabilisierung intrazellulär und gleichzeitig extrazellulär mit einem primären Antikörper nach Titrierung und Optimierung der Antikörperkonzentration in einer Verdünnung von 1:50 in Kombination mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in den Verdünnungen 1:400 und 1:500. Der braune Niederschlag des Substrats zeigte die Peptidproduktion an (s. 3.27.).

Zur Bestimmung der Verteilung des TGF $\beta$  Peptids im Gewebe wurden nach der Evaluierung der besten Antikörper-Konzentrationen jeweils 30 Schnitte gefärbt und untersucht, in die auch die durchgeführten Kontrollen zur Wertigkeit des Nachweises einbezogen wurden (s. 3.27.).

Bild 43 zeigt repräsentative Schnitte von Geweben *H. pylori*-negativer Patienten mit folgenden histologischen Diagnosen: ein histologisch normales Kontrollgewebe (A., n=3), ein entzündetes Gewebe ohne *H. pylori*-Assoziation (B., n=3)

und eine Gastritis (C., n=3). Das Zellinfiltrat in der Lamina propria des entzündeten Gewebes und der Gastritis C ist erhöht. Jedoch ist kein TGF $\beta$  Protein in diesen Geweben detektierbar.

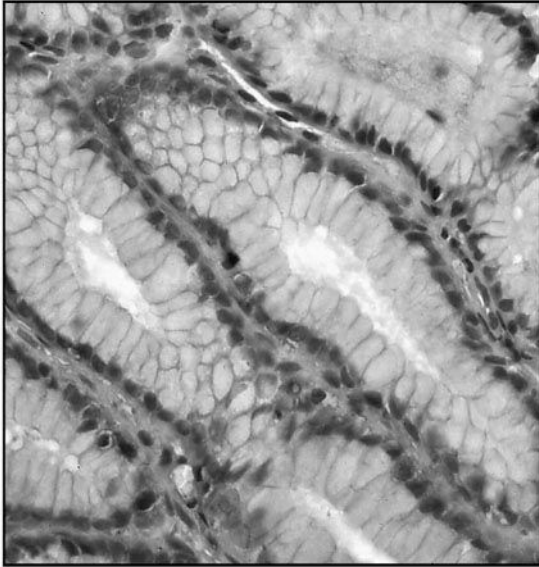
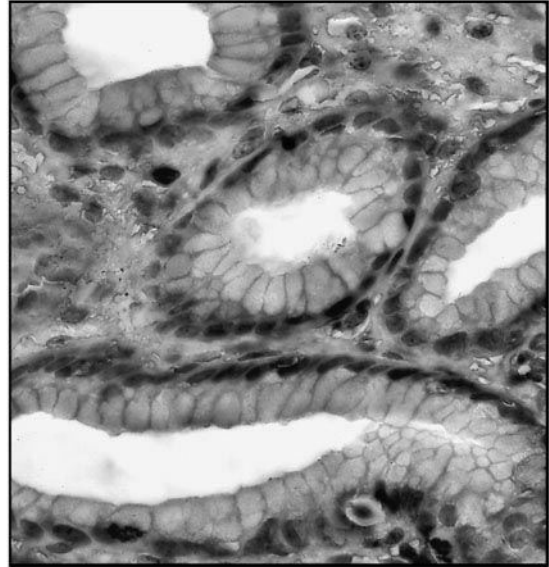
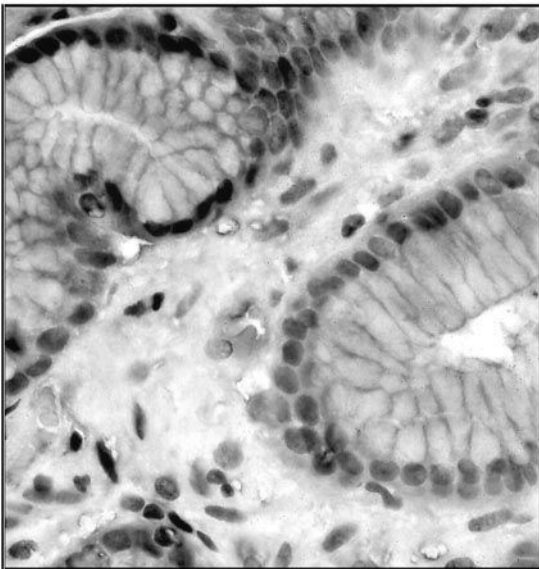
**A****B****C**

Bild 43: TGF $\beta$  Synthese in *H. pylori*-negativem Gewebe

A.: Histologisch normales Gewebe, Entzündungsgrad 0 (n=3), Vergrößerung: 630 x

B.: Entzündung, nicht mit *H. pylori* assoziiert (n=3), Vergrößerung: 630 x

C.: Gastritis C, nicht mit *H. pylori* assoziiert (n=3), Vergrößerung: 630 x

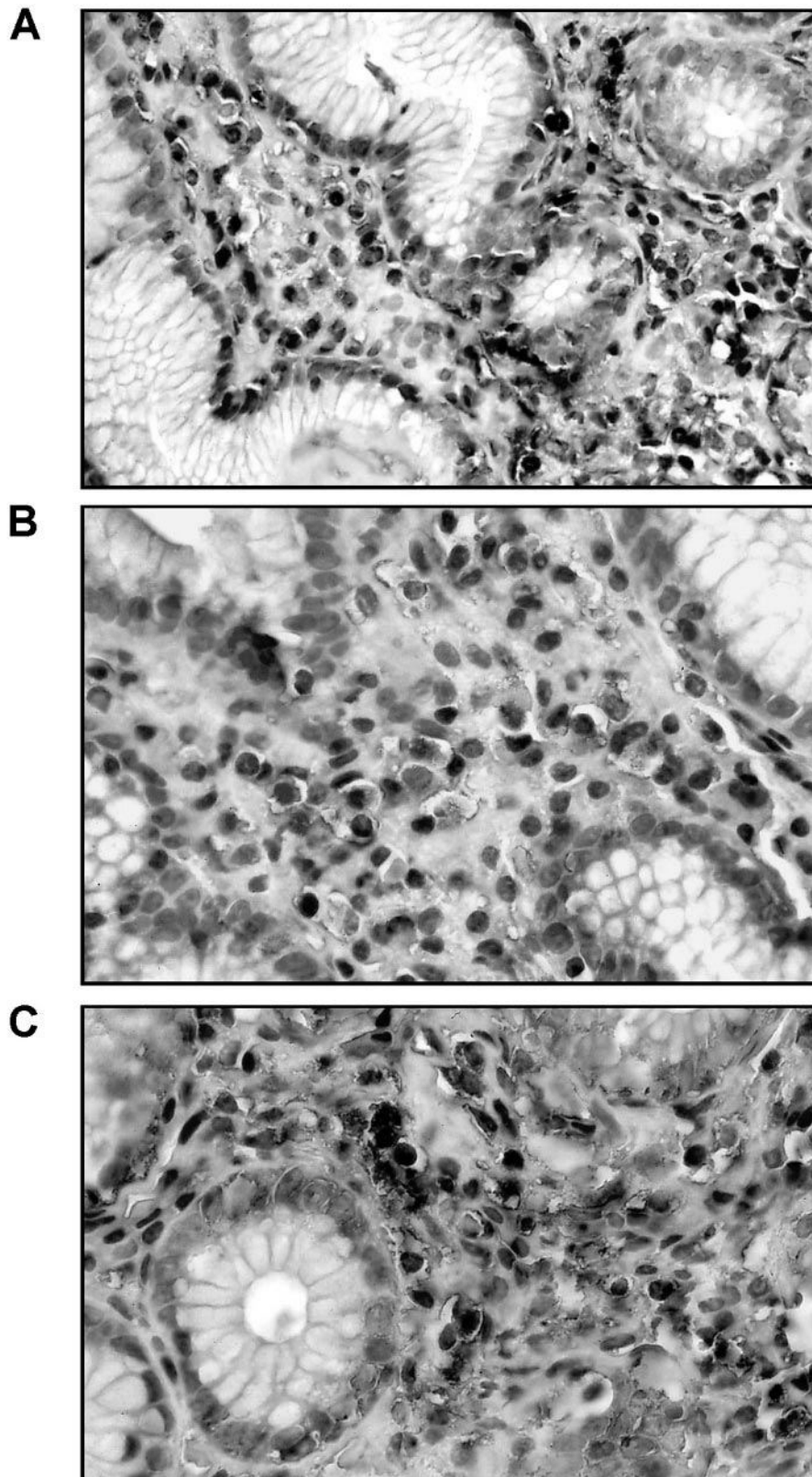


Bild 44: TGF $\beta$  Synthese in einer *H. pylori*- assoziierten Gastritis

A.: Gastritis mit Entzündungsgrad 1 (n=3), Vergrößerung: 400 x  
B.: Gastritis mit Entzündungsgrad 2 (n=3), Vergrößerung: 630 x  
C.: Gastritis mit Entzündungsgrad 3 (n=3), Vergrößerung: 400 x



Im Bild 44 sind repräsentativ Gewebeproben von Patienten mit einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis mit dem Entzündungsgrad 1 (n=3), 2 (n=3) und 3 (n=3) zu sehen. Mit der Schwere der Entzündung vergrößert sich auch das Zellinfiltrat in der Lamina propria, in dem deutliche Signale in Form eines braunen granulären Präzipitates erkennbar sind. Diese so detektierten TGF $\beta$  Peptide sind über und um die Zellkerne im Zytoplasma von Monozyten / Makrophagen lokalisiert, aber nicht in Epithelzellen zu finden.

## 5. Diskussion

Eine Spontanelimination einer einmal etablierten chronischen *Helicobacter pylori*-Infektion scheint ein seltenes Ereignis zu sein, trotz einer antigenspezifischen humoralen wie zellulären Immunreaktion, die sowohl lokal als auch systemisch nachweisbar ist. Über den immunregulatorischen Status dieser „slow bacterial infection“ gibt es aber wenig Erkenntnisse.

Der natürliche Ort einer *H. pylori*-Infektion ist der Magen, wo die antigenspezifischen Zellen akkumulieren und sich eine Immunantwort entwickelt. Sie entsteht aber räumlich dissoziiert vom Bakterium. Denn während das Bakterium außerhalb der Mukosa am Epithel adhärirt, findet eine immunologische Abwehr in der Tiefe der Lamina propria statt. Sie wird auf zwei Ebenen gesteuert: Einmal gibt *H. pylori* ständig Oberflächenproteine ins Gewebe ab, die die Immunantwort induzieren und beeinflussen, zum zweiten übt die Zytokinsekretion der Entzündungszellen eine Wirkung auf die Immunregulation aus. Eine nachweisbare humorale jedoch physiologisch offensichtlich unwirksame Immunität ist durch hohe Titer an sekretorischen IgA Globulinen in der Mukosa und erhöhten systemischen IgG Vorkommen gekennzeichnet (GENTA, 1997).

Die Aufklärung der zellulären immunologischen Reaktion ist von entscheidender Bedeutung sowohl für unser Verständnis der Pathogenese der *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen, als auch für die Entwicklung wirksamer Vaccinationsstrategien. Dabei geben die durchgeführten Studien der systemischen Immunantwort (DI TOMMASO ET AL., 1995; FAN ET AL., 1994; SHARMA ET AL., 1994; TARKKANEN ET AL., 1993; KARTTUNEN., 1991; KARTTUNEN ET AL., 1990) an peripheren mononukleären Zellen keine Erkenntnisse über die immunologischen Verhältnisse einer *H. pylori*-Infektion.

Infolgedessen wurde das Konzept der Immunpathogenese der humanen *H. pylori*-Infektion direkt an der gastrointestinalen Barriere mit folgenden Zielen untersucht:

- Regulationszustand von T-Lymphozyten in einer *H. pylori*-Infektion.

Lokale T-Zell-Subpopulationen wurden phänotypisch charakterisiert und ihr sekretorischer Status bestimmt. In der Lamina propria konnte so ein T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Konzept erstellt werden. Die Antigenpezifität der Immunreaktion wurde durch die Klonierung der lokalen T-Zellen sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Peptidebene gezeigt und ein T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>2 Profil im Gewebe erstellt.

- Untersuchung der gastrointestinalen Makrophagen in einer *H. pylori*-Entzündung.

Der prägende Einfluß von gastrointestinalen Monozyten / Makrophagen als professionelle antigenpräsentierende Zellen auf die Regulation einer zellulären Immunantwort auf *H. pylori* wurde *in vitro* phänotypisch und sekretorisch bestimmt.

- Die Bedeutung des Epithels in einer Immunreaktion gegen *H. pylori*.

Die Antigenpräsentation des gastrointestinalen Epithels als nicht professionelle antigenpräsentierende Zellpopulation und ihre Wirkung auf die Immunreaktion in einer *H. pylori*-Infektion wurde charakterisiert.

- Nachweis der Akutparameter IL8 und TNF $\alpha$  in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis *in situ*.

Die Charakterisierung der Ursprungszellen der Mediatoren der chronischen neutrophilen Akutphase erfolgte durch den Direktnachweis ihrer Transkripte im Bereich der *H. pylori*-induzierten Barrierestörung. Der direkte Einfluß von *H. pylori* auf die Transkription und Sekretion des Genproduktes wurde *in vitro* an isolierten Monozyten / Makrophagen untersucht.

- Sekretion des Immunmodulators TGF $\beta$  in einer Gastritis Typ B.

Der Nachweis der TGF $\beta$  Produktion wurde *in situ* auf der Peptidebene durchgeführt und ihr Ursprungszelltyp direkt in der Tiefe der Lamina propria detektiert.

### 5.1. Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen in der Lamina propria

Die Population der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten wird in zwei Subpopulationen unterteilt: Die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen und die CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen. Letztere greifen in die Regulation einer Immunantwort ein. Sie werden anhand ihres Zytokinprofils in zwei antagonistische CD4<sup>+</sup> Subpopulationen eingeteilt: Die T<sub>H</sub>1-Subpopulation, die IFN $\gamma$ , IL2 und Lymphotoxin sezerniert, steuert die Ausbildung einer inflammatorischen zellvermittelten Immunreaktion, T<sub>H</sub>2 Zellen, die IL4, IL5, IL6 und IL10 produzieren, regulieren die Entwicklung einer humoralen Immunantwort. Eine dritte CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation besteht aus noch nicht determinierten T-Lymphozyten, die das Zytokinprofil der T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen zeigen (MOSMANN ET AL., 1986). Die Balance bzw. Disbalance in diesem Zytokinkonzert hat eine regulierende Wirkung auf die Entwicklung einer Immunantwort und wird durch mehrere Faktoren beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden daher T-Lymphozyten aus der Lamina propria *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten isoliert und charakterisiert. Anhand der phänotypischen und sekretorischen Charakterisierung auf dem Einzelzellniveau konnten sie einer Subpopulation zugeordnet werden. In diese Messungen, die sich auf die relevanten Zytokine IFN $\gamma$ , IL4 und IL10 konzentrierten, wurden auch die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten einbezogen, denn auch diese Population weist die Marker auf, die auf eine Aufteilung in Typ I (T<sub>H</sub>1) und Typ II (T<sub>H</sub>2) Subpopulationen hindeuten (MANETTI ET AL., 1994; SALGAME ET AL., 1991).

Frühere Arbeiten dokumentieren eine lokale Zytokinsekretion in der Lamina propria *H. pylori*-positiver Patienten, die auf eine verstärkte IFN $\gamma$  Sekretion hinweisen. Die Forschungsgruppe um Karttunen (1995) zeigte mittels

ELISPOT, daß in einer *H. pylori*-Gastritis die Konzentration an IFN $\gamma$  sezernierenden Lymphozyten höher ist als im gesunden Gewebe. Auf der Transkriptionsebene von gastrischen Lymphozyten und gesamten Biopsien *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten konnte IFN $\gamma$  mRNA ohne signifikante Unterschiede detektiert werden (KARTTUNEN ET AL., 1997; YAMAOKA ET AL., 1995). Diese konstitutive IFN $\gamma$  mRNA Expression läßt aber auf eine posttranskriptionelle Regulation der Peptidproduktion schließen, da auf der Proteinebene die Zytokinsekretion von dem *H. pylori*-Status abhängig ist (KARTTUNEN ET AL., 1997).

In der Literatur dokumentierte Untersuchungen der Sekretion des antagonistischen T<sub>H</sub>2 Zytokins IL4 in der Mukosa des Magens im ELISPOT ohne Zelltypbestimmung zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Lymphozyten einer *H. pylori*-positiver und -negativer Gastritis sowie gesunder Mukosa (KARTTUNEN ET AL., 1995).

Experimente bezüglich der Expression des T<sub>H</sub>2 steuernden IL10 beschränkten sich auf die Detektion der Transkripte von lokalen Lymphozyten bzw. gesamten Biopsien. Da die IL10 mRNA jedoch konstitutiv von humanen T-Lymphozyten gebildet wird (DEL PRETE ET AL., 1993), differierten die Konzentrationen der IL10 mRNA nach einer RT-PCR aus isolierten Lymphozyten zwischen den *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Gruppen nicht (KARTTUNEN ET AL., 1997). Der Nachweis des IL10 Transkripts in der RT-PCR von gesamten Biopsien *H. pylori*-negativer Patienten gelang jedoch nicht (YAMAOKA ET AL., 1995).

Für die Abschätzung der Regulation der Immunantwort auf *H. pylori* ist aber die Charakterisierung der Ursprungszellen der Zytokinproduktion besonders wichtig, denn das T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN $\gamma$  wird nicht nur von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sezerniert. Auch Monozyten / Makrophagen und NK-Zellen kommen nach Aktivierung durch *H. pylori* als Produzenten in Frage (TARKKANEN ET AL., 1993). Ebenso haben die T<sub>H</sub>2 Zytokine IL4 und IL10 außer den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten Mastzellen bzw. B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen als Ursprungszellen in der mononukleären Population (PEARCE ET AL., 1995).

Die Experimente in dieser Arbeit zeigen eindeutig, daß sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten maßgeblich in die Produktion der charakteristischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zytokine involviert sind.

Die zytometrischen Analysen demonstrieren eine starke spontane IFN $\gamma$ -Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus *H. pylori*-positivem Gewebe. Dabei korreliert die in der Magennukosa erhöhte Anzahl an IFN $\gamma$  produzierenden Zellen positiv mit der Intensität der Produktion dieses Zytokins. Die lokalen T-Lymphozyten *H. pylori*-negativer Patienten dagegen zeigen nur eine geringe Basissekretion von IFN $\gamma$ . Auch hier korrespondiert die um 50% reduzierte Anzahl der IFN $\gamma$  sezernierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer sehr schwachen Intensität der Zytokinproduktion.

Umgekehrt verhält sich dagegen die Produktion der T<sub>H</sub>2 Peptide. Hier konnte ebenfalls in den Lymphozytenpopulationen von *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Patienten das Peptid beider Zytokine detektiert werden. Jedoch sind die Anzahl der produzierenden T-Lymphozyten und die Intensität der Zytokinproduktion um die Hälfte geringer in *H. pylori*-positivem Gewebe als in *H. pylori*-negativem Gewebe.

Gesamtantigen von *H. pylori* vermag nur T-Lymphozyten *H. pylori*-negativer Patienten zur IFN $\gamma$  Produktion anzuregen, während Lymphozyten *H. pylori*-positiver Patienten keine signifikante Änderung der Zytokinsekretion zeigen. Andere Arbeiten berichten sogar von einer Reduktion der IFN $\gamma$ -Sekretion von Lymphozyten *H. pylori*-positiver Patienten nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigen (FAN ET AL., 1994; FAN ET AL., 1993).

Diese reduzierte IFN $\gamma$  Sekretion antigenspezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen kann dadurch erklärt werden, daß die T-Zellen *in vivo* maximal aktiviert wurden und auf eine weitere Stimulation *in vitro* nicht mehr mit einer Erhöhung der IFN $\gamma$ -Produktion reagieren können (KARTTUNEN ET AL., 1995).

Bezüglich der Sekretion von IL4 in mit *H. pylori*-infiziertem Gewebe nach einer Stimulation werden unterschiedliche Aussagen gemacht: Fan und Mitarbeiter (1996) berichten von einer Erhöhung der Konzentration von IL4 im Kulturüberstand von stimuliertem Magengewebe, während Karttunen und Kollegen (1997) eine verminderte IL4 Sekretion von Lymphozyten in einer Antwort auf *H. pylori*-Antigene beobachtete. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten haben die *H. pylori*-Antigene keinen Einfluß auf die IL4 und IL10 Sekretion, deren Produktion sich nach Stimulation nicht ändert.

Die stark erhöhte Anzahl IFN $\gamma$  produzierender Zellen in *H. pylori*-positiver Gastritis (KARTTUNEN ET AL., 1995), die in dieser Arbeit als CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten charakterisiert werden konnten, und die stark erhöhte Intensität der IFN $\gamma$  Produktion dieser Zellen aus mit *H. pylori*-infiziertem Gewebe, läßt folgende Hypothese zu, die im Bild 45 schematisiert ist: Die Translation der konstitutiv transkribierten IFN $\gamma$  mRNA scheint von Faktoren, wie prozessierte *H. pylori*-Antigene und von Faktoren, die mit der Entzündungsreaktion zusammenhängen, abhängig zu sein. Auch unter der Berücksichtigung der geringeren spontanen IL4 und IL10 Sekretion, kann hier postuliert werden, daß *H. pylori*-Antigene eine inflammatorische T<sub>H</sub>1 Antwort hervorrufen (KARTTUNEN ET AL., 1997). Durch die Charakterisierung des Milieus in der *H. pylori*-infizierten Mukosa, die reich an IFN $\gamma$  ist und die Bestimmung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen als wichtige IFN $\gamma$ -Produzenten, können diese Zellen als Typ I / Typ II Zellen charakterisiert werden.

Aufgrund seiner proinflammatorischen Eigenschaften kann IFN $\gamma$  lokal auch zu der Entzündungsreaktion in der infizierten Lamina propria des Magens beitragen. Es induziert MHC II Antigene auf Epithelzellen (TRINCHIERI ET AL., 1985) und schwächt die gastrointestinale Barriere, ohne toxisch auf die Epithelzellen zu wirken (ADAMS ET AL., 1993; MADARA ET AL., 1989). Auch die vermehrte Produktion von Gastrin *H. pylori*-infizierter Patienten wird der Stimulation der antralen G-Zellen durch IFN $\gamma$  zusammen mit TNF $\alpha$  und IL2 zugesprochen (LEHMANN ET AL., 1996).

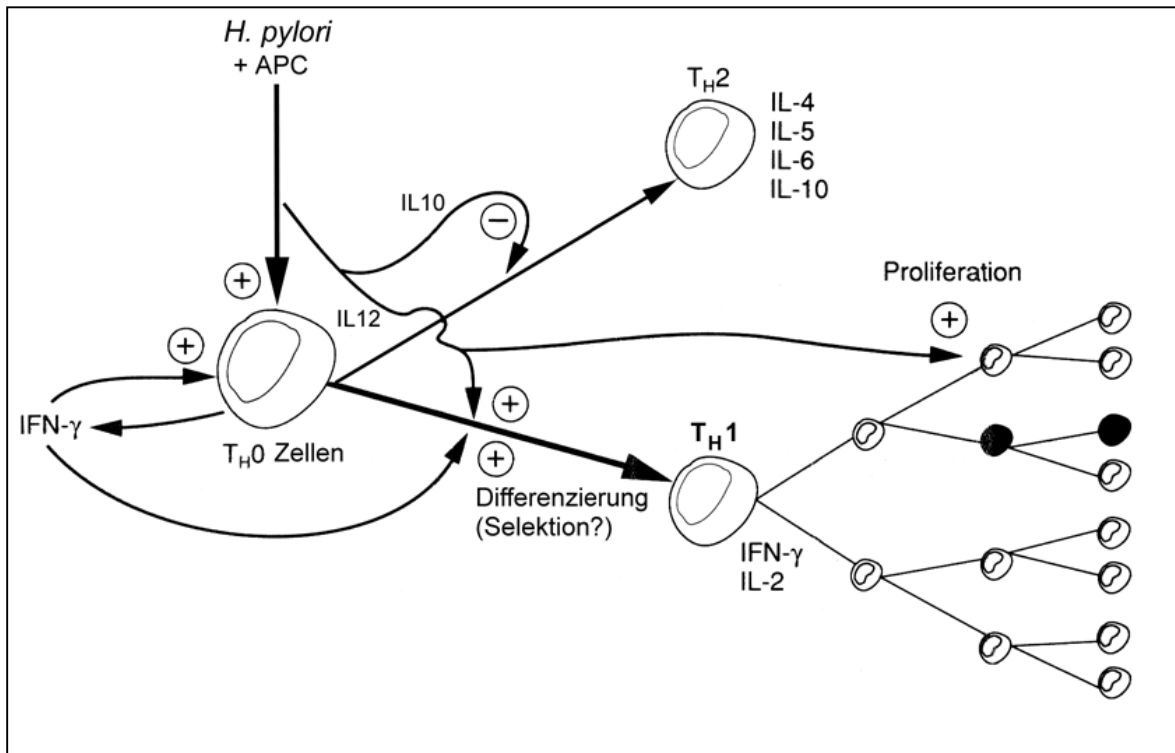


Bild 45: Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die Differenzierung von T-Lymphozyten.

Negative und positive Rückkopplungsmechanismen sind durch  $\ominus$  bzw.  $\oplus$  kenntlich gemacht. Nähere Erklärung im Text (modifiziert nach BELARDELLI, 1995).

APC: Antigenpräsentierende Zellen  
 T<sub>H</sub>: T-Helfer-Zellen

## 5.2. Modulation der Sekretion von akzessorischen Faktoren professioneller antigenpräsentierender Zellen durch *Helicobacter pylori*

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Zytokine IL10 und IL12, da diese Mediatoren einen zusätzlichen Einfluß seitens der Monozyten / Makrophagen auf die Balance zwischen einer humoralen T<sub>H</sub>2 (IL10) und einer zellvermittelten T<sub>H</sub>1 (IL12) Antwort ausüben.

IL12, das von Monozyten / Makrophagen sowie von B-Zellen in einer Antwort auf eine Stimulation durch Bakterien, bakterielle Produkte und Parasiten produziert wird, hat mehrere Effekte auf verschiedene Zellfunktionen *in vitro* und *in vivo*. Sie beinhalten die Induktion der Transkription und der Sekretion von Zytokinen wie



IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in T-Lymphozyten und NK-Zellen, die Erhöhung der Zytokinaktivität sowie die Induktion der Proliferation und zytotoxischen Aktivität dieser Immunzellen. Eine besondere Bedeutung kommt IL12 in der Induktion von IFN $\gamma$  zu, entweder direkt oder durch einen synergistischen Effekt mit anderen Induktoren wie z.B. IL2 (BELARDELLI, 1995; D'ANDREA ET AL., 1992). Die Antigenpräsentation dieser MHC II positiven Zellen für die T-Zellen findet zusammen mit der Zytokinsekretion statt, so daß IL12 ein bedeutender und wahrscheinlich obligatorischer Faktor zur Generation und Proliferation von T<sub>H</sub>1-Zellen ist (MANETTI ET AL., 1993; TRINCHIERI, 1993).

Während IL12 einen negativen Effekt auf die Entwicklung von IL4-produzierenden Zellen *in vitro* ausübt, bewirkt das Zytokin IL10 eine negative Rückkopplung und inhibiert die Produktion von IL12 (TRINCHIERI, 1993). Es wirkt immunsuppressiv auf phagozytierende Effektorzellen und hemmt die Zytokinsynthese von aktivierten Monozyten / Makrophagen und die davon abhängige T<sub>H</sub>0- und T<sub>H</sub>1-Zellproliferation. Die Expression von MHC II Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Makrophagen wird reduziert. Auf B-Zellen findet aber eine stimulierende Wirkung des IL10 statt (BELARDELLI, 1995).

Die bestehende Balance zwischen diesen antagonistischen Zytokinen kann durch hohe Konzentrationen von IFN $\gamma$  gestört werden. IFN $\gamma$  blockiert die endogene IL10 Produktion von Monozyten / Makrophagen und hebt damit die Suppression der Effektormechanismen auf. Dieser positive Rückkopplungseffekt erhöht wiederum die Sekretion von IL12 (BELARDELLI, 1995).

In der Mukosa *H. pylori*-infizierter Patienten sind neben der Akkumulation von antigenspezifischen T-Lymphozyten auch antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten / Makrophagen epithelnah und in der Tiefe der Lamina propria zu finden (FIOCCA ET AL., 1994; PAULL ET AL., 1989). Antigene, die *H. pylori* in die Mukosa abgibt (MAI ET AL., 1992), können diese aktivieren (MAI ET AL., 1991b). Es gibt jedoch bisher keine Untersuchungen über die Rolle von Monozyten / Makrophagen in der *H. pylori*-assoziierten Immunreaktion.

Daher beinhalten die Studien dieser Arbeit die phänotypische und sekretorische Charakterisierung naiver Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer Patienten und bereits voraktivierter Zellen *H. pylori*-positiver Patienten auf der Ebene der Peptidproduktion von IL10 und IL12 *in vitro* sowie den *in situ* Nachweis des Peptids in der Tiefe der Lamina propria.

Die IL12 Basissekretion von Monozyten / Makrophagen aus der Mukosa *H. pylori*-infizierter Patienten ist signifikant höher als bei gesunden Personen. Der Befund bezieht sich sowohl auf die vermehrte Anzahl IL12 produzierender Monozyten / Makrophagen als auch auf die Intensität ihrer Zytokinproduktion im *H. pylori*-positiven Gewebe. Die Stimulationsversuche mit *H. pylori*-Antigenen zeigten nur bei Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer Patienten, also bei naiven Zellen, einen signifikanten Anstieg der IL12 synthetisierenden Zellen. Eine mögliche Folgerung daraus ist, daß naive Monozyten / Makrophagen durch das *H. pylori*-Antigen direkt aktiviert und zur IL12 Produktion angeregt werden, während voraktivierte Zellen bereits maximal stimuliert sind. IFN $\gamma$  spielt jedoch auch eine wesentliche Rolle in der IL12 Stimulation. Untersuchungen der Makrophagenantwort zeigten, daß die IL12 Sekretion abhängig von den Zytokinen IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ist. In der Immunantwort auf *Mycobacterium bovis* ist IL12 nicht das erste Zytokin, das nach einer Infektion synthetisiert wird. Vielmehr scheint IFN $\gamma$  zusammen mit dem Antigen die Makrophagen zur Produktion von TNF $\alpha$  zu stimulieren, und beide Zytokine induzieren dann die IL12 Synthese (FLESCH ET AL., 1995). Dieser Mechanismus wäre auch im Verlauf einer *H. pylori*-Infektion denkbar, jedoch mit der Konsequenz, daß erst in Anwesenheit von *H. pylori*-Antigenen eine IL12 Produktion bei naiven Monozyten / Makrophagen induziert wird (Bild 46).

Anders verhält sich die Situation bei der Sekretion von IL10. Monozyten / Makrophagen, die IL10 synthetisieren, konnten zwar detektiert werden, aber in niedrigerer Konzentration als Monozyten / Makrophagen, die IL12 produzieren. Dabei gab es keine Unterschiede zwischen *H. pylori*-positivem und *H. pylori*-negativem Gewebe. Auch Stimulationsversuche mit Oberflächenantigenen von *H. pylori* ergaben keine signifikanten Änderungen in beiden Patientengruppen.

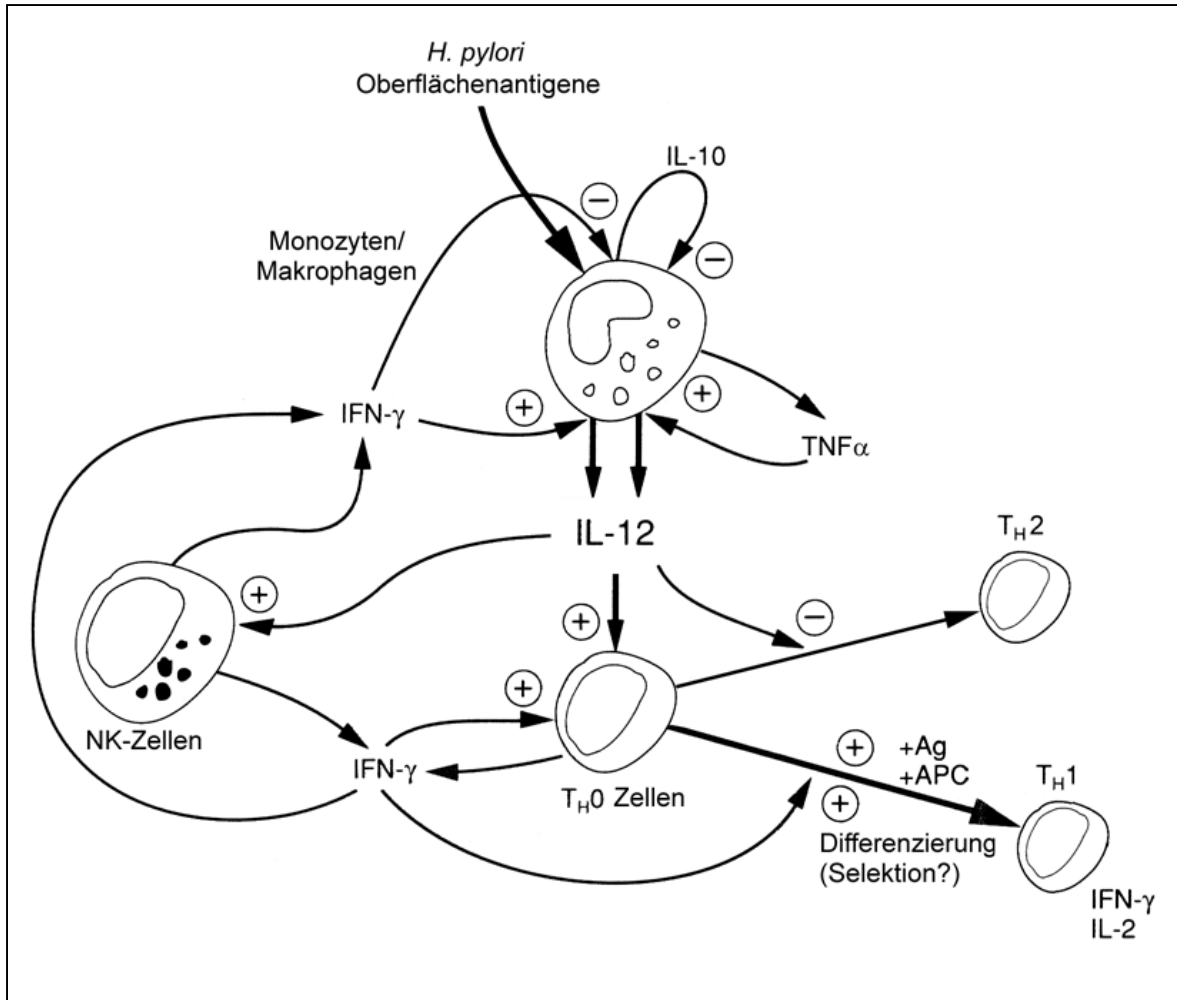


Bild 46: Die Rolle von IL12 in der Generation von TH1 Lymphozyten.

Negative und positive Rückkopplungsmechanismen sind durch ⊖ bzw. ⊕ kenntlich gemacht. Nähere Erklärung im Text (modifiziert nach BELARDELLI, 1995).

Ag: Antigen  
 APC: Antigenpräsentierende Zellen  
 TH: T-Helfer-Zellen

Das zu IL12 antagonistische IL10 spielt eine essentielle Rolle in der Kontrolle einer intestinalen Immunantwort auf enteritische Antigene, die von der Nahrung und von Mikroorganismen stammen und zu einer kontinuierlichen Stimulation des intestinalen Immunsystems führen. Die Mukosaoberfläche des Magen-Darm-Traktes ist permanent hohen Konzentrationen an diesen Antigenen ausgesetzt. *In vivo* beeinflusst IL10 nicht die Differenzierung von TH2-Zellen, inhibiert aber die Entwicklung von TH1-Zellen und damit eine permanente inflammatorische Immunreaktion, der eine Schädigung des Gewebes folgt (KÜHN ET AL., 1993).

Monozyten / Makrophagen in der Lamina propria mucosae *H. pylori*-infizierter Individuen exprimierten *in vitro* und *in situ* IL12. Diese antigenpräsentierenden Zellen sowie dendritische Zellen (MACATONIA ET AL., 1995) und Langerhans Zellen in der Haut (KANG ET AL., 1996) beeinflussen somit direkt die Entwicklung der zellvermittelten T<sub>H</sub>1 Immunantwort über die Produktion von IL12, wobei die IL12 mRNA konstitutiv exprimiert wird und die Transkription sich erst nach einer Antigenstimulation erhöht (KANG ET AL., 1996).

Für die LPS-freien Oberflächenantigene von *H. pylori* gilt, daß diese das IL10 / IL12 Gleichgewicht stören, indem sie die IL12 Produktion stimulieren. Daher scheint die IL10-Produktion in der *H. pylori*-Infektion durch IL12 gehemmt zu sein, denn die nicht adäquate folgeschwere Immunantwort auf Antigene dieses Bakteriums kann nicht eingedämmt werden. Ferner reicht die Konzentration von IL10 im *H. pylori*-positiven Gewebe nicht aus, um die IL12-Effektorfunktionen zu inhibieren.

### **5.3. Modulation der Zytokinsekretion und Antigenpräsentation nicht professioneller antigenpräsentierender Zellen durch *Helicobacter pylori***

Ähnlich wie im Dickdarm, exprimieren die entzündeten gastrischen Epithelzellen in der chronischen *H. pylori*-assoziierten Gastritis Histokompatibilitätsantigene der Klasse II (ENGSTRAND ET AL., 1989). Das weist auf die Beteiligung des Epithels an der lokalen Antigenpräsentation hin (MAYER ET AL., 1991; MAYER ET AL., 1987; BLAND ET AL., 1986a). Zusätzlich belegen die Studien von Fiocca und Mitarbeitern (1994), daß das endozytisch-endosomale antigentransportierende System aktiviert ist und die Expression des antigenprozessierenden Enzyms Cathepsin E während der Entzündung in den Epithelzellen erhöht ist (FINZI ET AL., 1993).

Für die Epithelzellen als nicht professionelle antigenpräsentierende Zellen ist neben der Expression von MHC II auch die Expression der MHC I Moleküle von Bedeutung. Die MHC II Moleküle, die vorwiegend von professionellen

antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten / Makrophagen exprimiert werden, präsentieren Antigene exogenen Ursprungs, die im Endosom prozessiert werden und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aktivieren. Über die Expression von MHC I werden im Zytosol prozessierte Antigene von endogenem Ursprung präsentiert, wobei auch Peptide von intrazellulär gebildeten Viren und Selbst-Antigene dazugehören (LADEL ET AL., 1995). Diese aktivieren CD8<sup>+</sup> Zellen. Da alle kernhaltigen Zellen des Körpers MHC I exprimieren, werden sie ständig von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten kontrolliert. Wenn gegen das präsentierte Peptid keine Toleranz besteht, wie es bei Fremdanthigenen der Fall ist, kommt es zur Reaktivität der CD8<sup>+</sup> Zellen, d.h. zur Abtötung der infizierten Zelle (GERMAIN, 1994).

Aufgrund von Beobachtungen, daß epitheliale Zellen präferentiell CD8<sup>+</sup> Zellen durch Antigenpräsentation in hohen Dosen stimulieren, nimmt das Epithel die Bedeutung eines negativen immunmodulatorischen Kontrollfaktors ein (RÖCKEN ET AL., 1996; MAYER ET AL., 1987; BLAND ET AL., 1986a; BLAND ET AL., 1986b). Durch einen neuartigen Rezeptor (Typ-I-NK-Rezeptor), der auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurde, kann in Zusammenhang mit dem MHC I Rezeptor die Effektorfunktion dieser Zellen inhibiert werden (MORETTA ET AL., 1997).

Eine weitere Konsequenz einer Antigenpräsentation durch Epithelzellen, die keine kostimulierenden Faktoren exprimieren, ist die direkte Inaktivierung (Anergie) und die anschließende Erschöpfung von T<sub>H</sub>1 Lymphozyten. Sie beeinflusst die Fähigkeit der T-Lymphozyten IL2 zu produzieren, ohne die Produktion anderer Zytokine zu vermindern. Im später nachfolgenden Erschöpfungszustand verlieren die Zellen ihre Fähigkeit, auch Zytokine wie IL4, IFN $\gamma$  oder IL3 zu produzieren (RÖCKEN ET AL., 1996).

Epithelzellen stellen eine primäre Kontaktstelle des Wirtsgewebes mit *H. pylori* dar. Ihre Rolle wurde in der Antigenpräsentation sowie in der Teilnahme an der Immunantwort in einer *H. pylori*-Infektion untersucht. Dazu wurde die Expressionsdichte von MHC Molekülen der Klasse I und II auf den isolierten Zellen *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten bestimmt.

In der *H. pylori*-positiven Gruppe exprimieren 66% der Epithelzellen sowohl MHC I als auch MHC II Moleküle in hoher Dichte, die durch eine Stimulation mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen nur unwesentlich gesteigert werden konnte. In der *H. pylori*-negativen Gruppe, wo nur 45% der Epithelzellen MHC II exprimieren, wurde direkt durch die *H. pylori*-Antigene nur die Expression von epithelialen MHC I induziert. Die Expression von MHC II wurde durch die verabreichten Antigene nicht beeinflusst. Da IFN $\gamma$  die Expression von MHC II induziert, nimmt hier *H. pylori* nur indirekt durch die Stimulation der Zytokinsekretion in der Mukosa Einfluß auf die Ausbildung der MHC II Moleküle auf Epithelzellen (CRABTREE, 1996; KARTTUNEN ET AL., 1995).

Das sich einstellende Gleichgewicht zwischen Infektabwehr und Toleranz kann den Erhalt der perpetuierenden Infektion der Mukosa *H. pylori*-infizierter Individuen gewährleisten. Dabei stellen sich mäßige, meist asymptomatische Entzündungsreaktionen auf Seiten des Wirtes ein, ohne daß es zu extensiver Destruktion des Gewebes kommt. Für *H. pylori* bietet sich dabei die Möglichkeit, in seiner ökologischen Nische über Jahre hinweg zu persistieren. Diese Balance kann durch exogene Substanzen, Änderung der Disposition oder der individuellen Immunitätslage und durch psychische Faktoren zusammenbrechen und zur Entzündungseskalation oder zu Folgeerkrankungen führen.

Einer dieser Faktoren ist die Expression von IL12. Sowohl *in vitro* als auch *in situ* wurde die Sekretion von IL12 durch Epithelzellen *H. pylori*-positiver Individuen nachgewiesen. Stimulationsversuche verdeutlichten einen direkten Einfluß von *H. pylori* auf die Sekretion dieses immunregulierenden Zytokins. Epithelien *H. pylori*-negativer Patienten zeigten einen Anstieg der produzierenden Zellpopulation um 17% mit gleichzeitiger Erhöhung der Produktionsintensität, während Epithelien *H. pylori*-positiver Patienten bereits maximal stimuliert waren.

Die Stimulation von IL12 bewirkt die Entwicklung eines Ungleichgewichts zwischen Wirt und Bakterium, die eine deletäre Immunreaktion hervorruft und zur Schädigung der gastrointestinalen Barriere führt (Bild 47).

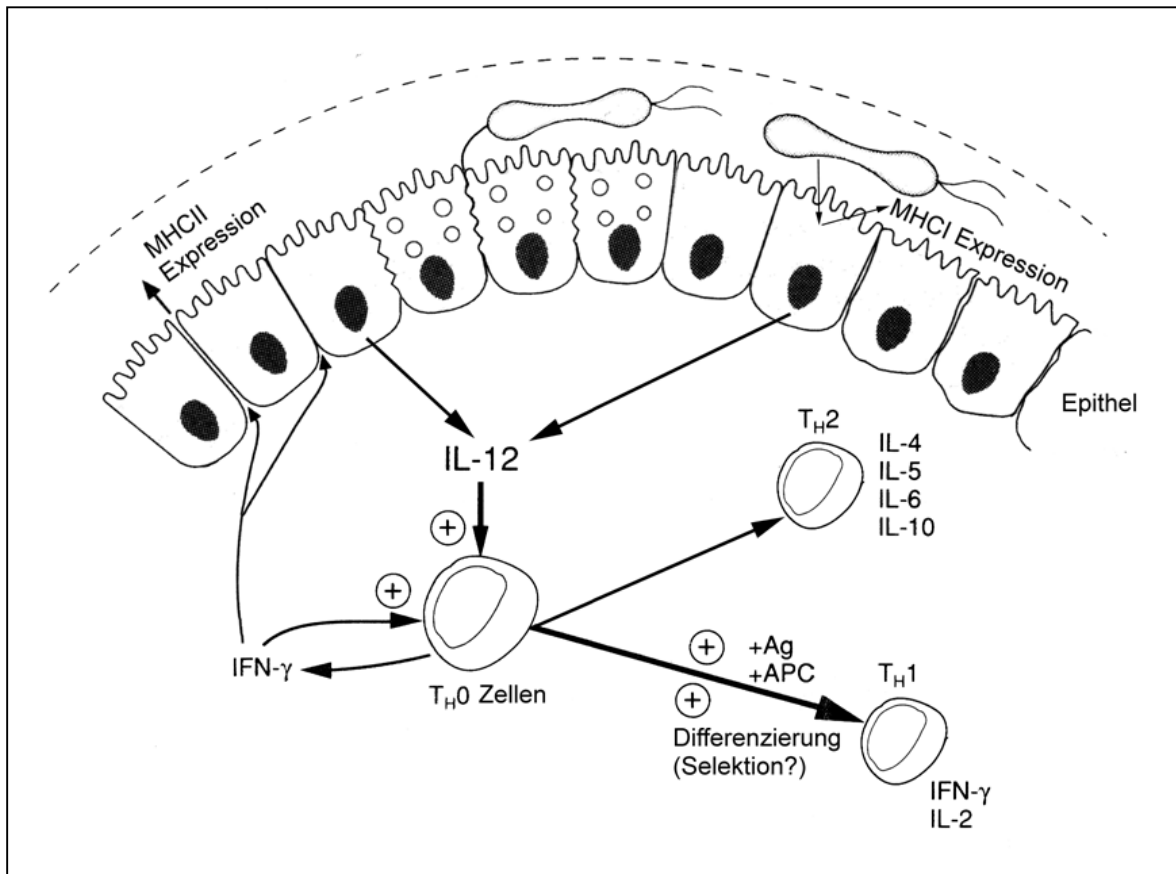


Bild 47: Immunmodulation durch das Epithel

Negative und positive Rückkopplungsmechanismen sind durch ⊖ bzw. ⊕ kenntlich gemacht. Nähere Erklärung im Text (modifiziert nach BELARDELLI, 1995).

Ag: Antigen

APC: Antigenpräsentierende Zellen

T<sub>H</sub>: T-Helfer-Zellen

#### 5.4. Induziert *H. pylori* eine präferentielle T-Helfer Typ 1 Immunantwort in der Mukosa des Antrums?

Der *H. pylori*-assoziierte, chronische mononukleäre Entzündungskomplex ist, durch die gastrointestinale Barriere getrennt, in der Lamina propria mukosae nachzuweisen. Dabei ist jedoch nur der epithelnahe, intestinale Mucus durch das nicht invasive Bakterium kolonisiert, während in der Lamina propria eine komplexe Mischung abgestoßener Oberflächenproteine von *H. pylori* nachweisbar ist. Sie wirken *in vitro* chemotaktisch auf humane neutrophile Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes und können diese phänotypisch, funktionell und

sekretorisch aktivieren (MAI ET AL., 1992; MAI ET AL., 1991b). In dieser Arbeit konzentrierten sich die Untersuchungen auf immunrelevante Zellen aus der Magenmukosa und deren Eingriff in die Regulation der Immunantwort. Die in die Entzündungsreaktion involvierten Zellen und deren effektorspezifische Immunreaktion wurden charakterisiert, indem bei gleichzeitiger Oberflächenmarkierung die Produktion von relevanten Zytokinen untersucht wurde. Die immunologisch aktiven Zellen in den Infiltraten des mit *H. pylori* infizierten Antrums produzieren IL12 (Monozyten / Makrophagen und Epithelzellen) und signifikant erhöhte Mengen an IFN $\gamma$  (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen). Das bedeutet, daß lösliche *H. pylori*-Produkte nach Aufnahme in die Lamina propria in der Lage sind, immunregulierende Zellen zu aktivieren, wie in den Stimulationsversuchen gezeigt, und eine entzündliche Reaktion zu unterhalten.

Um diese *in vivo* Verhältnisse zu untermauern, wurden Untersuchungen auf klonaler T-Zell-Ebene *in vitro* durchgeführt, die es erlauben, antigenspezifische T-Lymphozyten, die auf eine Ursprungszelle zurückzuführen sind, nicht nur phänotypisch sondern auch funktionell zu charakterisieren.

Aus der Mukosa des Antrums *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten wurden *H. pylori*-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klone durch Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen generiert. Durch diese Methode, die exemplarisch die Mengenverhältnisse *in vivo* widerspiegelt, ist aber eine bestmögliche Näherung an ein repräsentatives Profil der Subpopulationen evaluiert worden.

Die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten-Klone aus *H. pylori*-positiver Mukosa sind vorwiegend dem T<sub>H</sub>1-Zelltyp zuzuordnen, da sie IFN $\gamma$ , aber nicht IL4 und IL10 produzieren. Die Expression dieser Zytokine auf der transkriptionellen Ebene entspricht der Peptidsynthese in den jeweiligen Subpopulationen. Eine Ausnahme bildet dabei IL10, dessen Transkription auch in T<sub>H</sub>1-Zellklonen detektiert wurde. Die Regulation der Synthese dieses Zytokins stützt sich wahrscheinlich auf posttranskriptionelle Ereignisse (ROSS, 1995). Andere Autoren konnten auch in geringen Konzentrationen die Sekretion von IL10 im Zellkulturüberstand von T<sub>H</sub>1-Klonen nach Stimulation detektieren (DEL PRETE ET AL., 1993; YSSEL ET AL., 1992).



Aus *H. pylori*-negativen Geweben wurden ebenfalls *H. pylori*-spezifische Klone gewonnen. Diese Klone können aber nur aufgrund von gruppenspezifischen Antigenen generiert worden sein, die *H. pylori* genauso exprimiert wie andere *Helicobacter*-Spezies auch. Weiterhin können auch kreuzreagierende Antigene, beispielsweise das heat shock Protein, das *H. pylori* analog zu anderen Bakterien exprimiert, die Generation der Klone ermöglicht haben (GOODWIN, 1995). CEA (Common enteric antigens), die von allen enteritischen Bakterien, zum Beispiel *E. coli*, exprimiert werden, stellen einen weiteren Faktor für die Klonierung von T-Zellen *H. pylori*-negativer Patienten dar (NEGRINI ET AL., 1991). T-Zellen *H. pylori*-positiver Patienten erkennen diese Antigene auch, zusätzlich reagieren sie aber auf Antigene, die nur *H. pylori*-spezifisch sind.

Daß auch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten-Klone abhängig von ihrem Stimulus die Zytokine IFN $\gamma$  und IL4 produzieren können, zeigten Paliard und seine Kollegen bereits 1988. Man kann auch hier eine Aufteilung nach dem sezernierten Zytokinmuster vornehmen. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> *Mycobacterium leprae*-spezifische T-Zellklone produzierten IFN $\gamma$  und IL10 (Typ I), CD8<sup>+</sup> Suppressor Klone (Typ II) sezernierten IL4 (SALGAME ET AL., 1991). Der überwiegende Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut ist dem T<sub>H</sub>1-Typ der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gleichzustellen (ROMAGNANI, 1994; PALIARD ET AL. 1988).

Die Klonierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen brachte Aufschluß darüber, welcher Gruppierung diese Zellen bei einer *H. pylori*-Infektion zuzuordnen sind. CD8<sup>+</sup> Klone aus *H. pylori*-positivem Gewebe zweier Patienten zeigen ein gegenteiliges Bild. Einmal wurden zytotoxische Klone mit dem Typ I (IFN $\gamma$ , IL10) / Typ 0 Profil generiert, bei dem zweiten Patienten etablierten sich CD8<sup>+</sup> Klone mit dem Typ II (IL4) / Typ 0 Phänotyp.

Bei Abwesenheit von polarisierenden Signalen zur T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 gesteuerten Entwicklung einer Immunantwort *in vivo*, treten T<sub>H</sub>0-Lymphozyten auf, die sowohl T<sub>H</sub>1- als auch T<sub>H</sub>2-Lymphokine sezernieren. Diese dienen als Vorläuferzellen, die weiterer Differenzierung bedürfen (ROMAGNANI, 1994; PALLIARD ET AL., 1988) oder aufgrund ihrer Zytokinsekretion andere, noch nicht bekannte, Funktionen übernehmen können (STREET ET AL., 1990).

Der Differenzierungsprozeß der Thymuszelle zur T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2 Zelle findet *in vivo* aufgrund der Regulation der endogen vorhandenen Zytokine und als Konsequenz der Aktivierung durch ein Antigen statt (MAGGI ET AL., 1992). Die naive, in ihrem sekundären Lymphorgan nicht polarisierte CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> Zelle, produziert IL2, IL4 und IL5. Sie hat somit ein Basispotential, sich zu einer T<sub>H</sub>2 Zelle zu entwickeln. Die Möglichkeit zur Sekretion von IFN $\gamma$  wird ihr erst durch die Voraktivierung mit IL12 während einer Infektion gegeben. Dann kann sich die Zelle zur T<sub>H</sub>0 oder, nach Verlust der Fähigkeit, T<sub>H</sub>2-Zytokine zu produzieren, zur T<sub>H</sub>1 Zelle differenzieren (MINGARI ET AL., 1996). IL 12 kann auch zusammen mit einem spezifischen Antigen in etablierten T<sub>H</sub>2-Lymphozytenklonen transient die IFN $\gamma$  Transkription und Synthese induzieren, ohne die IL4 Produktion zu ändern. Das führt dazu, daß diese Zellen dann ein T<sub>H</sub>0-Zytokinprofil zeigen, denn auch eine schon polarisierte T-Zelle kann abhängig von ihrem Milieu und den darin vorhandenen Zytokinen alle Zytokine produzieren (MANETTI ET AL., 1994a).

Während der Generierung *H. pylori*-spezifischer T-Zell-Klone, wurden auch T-Zellen mit dem Zytokinprofil einer T<sub>H</sub>0 T-Zelle (IFN $\gamma$ , IL4, IL10) auf der Transkriptions- und Translationsebene gezogen. Die von *H. pylori*-negativem Gewebe generierten T-Zellklone zeigen vorwiegend ein T<sub>H</sub>2 / T<sub>H</sub>0 Profil. Die T-Zellklone aus *H. pylori*-infiziertem Gewebe sind vorwiegend dem T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>0 Typ zuzuordnen. Es besteht die Möglichkeit, daß die etablierten T<sub>H</sub>2 Klone durch die von *H. pylori*-Antigenen induzierte IL12 Produktion der eingesetzten antigenpräsentierenden Zellen (YSSEL ET AL., 1994) ihr Zytokinprofil in Richtung T<sub>H</sub>0 geändert haben. Die T<sub>H</sub>0 Populationen können aber auch Memory-T-Zellen darstellen, die aufgrund der Restimulation kloniert wurden, da humane T-Zell-Klone *in vitro* im Differenzierungsstadium der T<sub>H</sub>0 Zelle sehr stabil bleiben (STREET ET AL., 1990).

Da bei *H. pylori*-negativen Patienten vorwiegend antigenspezifische T<sub>H</sub>2 / T<sub>H</sub>0 Zellen kloniert wurden, die eine humorale Antwort induzieren würden, bei *H. pylori*- positiven Patienten aber Klone, aufgrund des *in vivo* vorhandenen Voraktivierungs-effektes durch *H. pylori*-Antigene, mit dem T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>0 Profil generiert wurden, kann man einen Einfluß des Bakteriums auf die Regulation der Immunantwort annehmen. Mohammadi und seine Mitarbeiter (1996) konnten im

Mausmodell mit *H. felis* zeigen, daß *Helicobacter* eine spezifische zellvermittelte Immunantwort mit dem T<sub>H</sub>1 Phänotyp in der Mukosa des Magens hervorruft. Zellkulturüberstände *H. pylori*-spezifischer T-Zell-Klone aus dem Antrum von *H. pylori*-positiven Patienten zeigten ebenfalls ein T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>0 Profil (D'ELIOS ET AL., 1997a). Ein weiterer Hinweis auf die Regulation der Immunantwort durch *H. pylori* in Richtung T<sub>H</sub>1 liegt darin, daß auch keine CD30 Expression in der Magenmukosa von *H. pylori*-infizierten Patienten nachzuweisen war (D'ELIOS ET AL., 1997b). CD30 gehört zu der TNF- Rezeptor-Familie und wird präferenziell von T<sub>H</sub>2 Zellen exprimiert (DEL PRETE ET AL., 1995; MANETTI ET AL., 1994b).

T-Lymphozyten mit dem T<sub>H</sub>1 Profil sind bei einer niedrigen T-Zell:B-Zell-Ratio auch potente Helfer für die B-Zell-Proliferation und die Produktion von IgM, IgG und IgA (ROMAGNANI, 1994). Diese B-Zell-Aktivierung kann auch direkt von IL12 beeinflußt und verstärkt werden (JELINEK ET AL., 1995). Während einer chronischen *H. pylori*-Infektion entstehen somit hohe systemische Antikörpertiter und intensive B-Zell-Aktivierung, die zu den beschriebenen Lymphomen führen kann (D'ELIOS ET AL., 1997a).

In einer Entzündungsreaktion im *H. pylori*-positiven Gewebe existieren nebeneinander sowohl Typ I als auch Typ II T-Lymphozytenpopulationen. Die Klonierung beider Populationen aus der Lamina propria *H. pylori*-positiver Patienten kann dieses belegen. Daß präferenziell aus *H. pylori*-positiven Geweben T<sub>H</sub>1 Klone generiert wurden, ist ein Hinweis auf Schwankungen in der aktiven Entzündung, die in der Dominanz einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort resultiert.

## 5.5. Die dissoziierte Immunantwort auf *H. pylori*

Das Bakterium *H. pylori* adhärirt an des Epithel der gastrointestinalen Barriere und induziert eine Immunantwort, die sich humoral und zelluär manifestiert. Die humorale Immunreaktion ist systemisch durch erhöhte IgG-Titer nachzuweisen. Lokal in der Mukosa werden sekretorische antigenspezifische IgA-Antikörper gebildet. Eine dissoziierte proinflammatorische Reaktion, die eine Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und mononukleären Entzündungs-zellen ins Gewebe bewirkt, ist für eine *H. pylori*-assoziierte Gastritis von entscheidender Bedeutung. Dieses Zellinfiltrat stellt die unspezifische zelluläre Immunantwort da, die zur Elimination extrazellulärer Bakterien führt. Da aber diese Immunreaktion in der Tiefe der Lamina propria stattfindet, und *H. pylori* außen am Epithel der gastrointestinalen Barriere bleibt, führt sie nicht zur Eliminierung des Bakteriums.

### 5.5.1. Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen in der *Helicobacter pylori*-assoziierten Gastritis

Eine besondere Bedeutung kommt den Zytokinen IL8 und TNF $\alpha$  zu, deren Sekretion bei einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis erhöht ist (FAN ET AL., 1995). Die Produktion dieser sich auf die Immunantwort synergistisch auswirkenden Mediatoren wurde in normaler Mukosa und entzündeter, *H. pylori*-positiver und -negativer Antrumukosa des Menschen vielfach untersucht. Die Ursprungszellen der Zytokine sind jedoch immer noch nicht klar definiert.

IL8, das Einfluß auf die Entstehung einer Immunantwort gegen *H. pylori* nimmt, ist ein spezifischer und potenter chemotaktischer Rekrutierungsfaktor für polymorphkernige neutrophile Granulozyten und T-Zellen (COLDITZ ET AL., 1989; LARSEN ET AL., 1989). Endotheliales IL8, das nach Aktivierung von Endothelzellen mit LPS oder TNF $\alpha$  sezerniert wird, unterstützt die Migration der Neutrophilen vom peripheren Blut in das entzündete Gewebe, indem die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen reguliert wird, und ein chemotaktischer transendothelialer Gradient entsteht (HUBER ET AL., 1991). Im Gewebe aktiviert IL8

Neutrophile zur Degranulation (WILLEMS ET AL., 1989) und Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite sowie zur Induktion verschiedener gewebeschädigender Faktoren (BAGGLIONI ET AL., 1989; PEVERI ET AL., 1988).

Erste Untersuchungen der IL8 Produktion im Antrum wurden mit Überständen von kurzzeitigen Gewebekulturen (24 h) (CRABTREE ET AL., 1993) und in Gewebekomogenaten (GIONCHETTI ET AL., 1994) *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten durchgeführt. Im ELISA zeigte sich eine erhöhte Konzentration des IL8 Peptids im Antrum *H. pylori*-positiver Patienten, wobei IL8 in der aktiven Gastritis verstärkt produziert wurde (GIONCHETTI ET AL., 1994; CRABTREE ET AL., 1993). Auch die RT-PCR der totalen RNA von Gewebebiopsien zeigte eine erhöhte Expression von IL8 in *H. pylori*-positivem Gewebe, wobei die Expression der mRNA mit der Schwere der Gastritis korrelierte (YAMAOKA ET AL., 1995). Eine erste Charakterisierung der IL8 produzierenden Zellen *in situ* gelang mit der immunhistochemischen Nachweismethode mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern an kryofixierten Gewebeproben. Hier wurde IL8 im Magenepithel von *H. pylori*-positiven Patienten lokalisiert. Bei *H. pylori*-negativen Patienten konnte IL8 ebenfalls im Epithel detektiert werden, aber in geringen Konzentrationen (CRABTREE ET AL., 1994a). Stimulationsversuche von Epithelzelllinien mit Bakterienzellen und Bakterienproteinen konnten die Induktion von IL8 auf der Transkriptions- und Translationsebene durch *H. pylori* bestätigen (HUANG ET AL., 1995). Peek und Kollegen (1995) konnten das IL8 Protein direkt in Gewebekomogenaten nachweisen und die Assoziation zwischen IL8 und dem Entzündungsgrad der Gastritis aufzeigen. Obwohl die Konzentration des Zytokins bei Patienten mit einer *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*-Infektion und seine Induktion in Epithelzelllinien mit *cagA*<sup>+</sup> Stämmen erhöht war (CRABTREE ET AL., 1995a; PEEK ET AL., 1995; CRABTREE ET AL., 1994b), induzieren andere bakterielle Bestandteile, die mit dem Zytotoxin exprimiert werden, im gleichen Maße das proinflammatorische Zytokin (CRABTREE ET AL., 1995b; SHARMA ET AL., 1995).

Die Bestimmung der Lokalisation der IL8 produzierenden Zellen konzentrierte sich auf die Epithelzellen, die durch ihre Sezernierung des Peptids eine aktive Rolle im Entzündungsgeschehen und der Regulation einer Immunantwort auf *H. pylori* einnehmen. Obwohl Monozyten / Makrophagen wichtige Ursprungszellen einer

IL8 Sekretion darstellen, ist in den vorangegangenen Arbeiten die Detektion des Peptids *in situ* nicht gelungen (CRABTREE ET AL., 1994a). Engelking (1995) konnte dagegen das IL8 Peptid nur in der Lamina propria aufzeigen. Diese gegensätzlichen Beobachtungen können darauf zurückzuführen sein, daß verschiedene Nachweisverfahren verwendet wurden. Es ist aber auch eine unterschiedliche Affinität der verwendeten monoklonalen Antikörper zu epithelialeem bzw. zu monozytärem IL8 vorstellbar (KOCH ET AL., 1993). Ob die Epithelzellen oder Monozyten / Makrophagen die höhere IL8 Expression zeigen, läßt sich nicht entscheiden. Die hier durchgeführte *in-situ*-Hybridisierung zeigt, daß Epithelzellen gleichermaßen wie Monozyten / Makrophagen an der Expression von IL8 beteiligt sind. Epithelzellen und Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer Patienten zeigen nur eine sehr geringe Expression von IL8. Die Detektion des Peptids in Epithelzellen *H. pylori*-negativer Patienten in der Literatur (CRABTREE ET AL., 1994a) kann auf eine unspezifische Antikörperbindung zurückgeführt werden.

Auch TNF $\alpha$  ist ein bedeutender Mediator in der Entzündungsreaktion. Dieses Zytokin wirkt chemotaktisch auf Monozyten und auf polymorphkernige Leukozyten (WANG ET AL., 1987). Makrophagen (PATTON ET AL., 1989) und neutrophile Granulozyten (SHALABY ET AL., 1985) werden aktiviert. Ist TNF $\alpha$  lokal vorhanden, erfolgt eine Arretierung dieser Zellen im Gewebe. So trägt das Zytokin zur Entstehung lokaler Entzündungen mit Leukozytenakkumulation bei (OTSUKA ET AL., 1990) und unterstützt außerdem die Proliferation von T- und B-Zellen (PATTON ET AL., 1989). TNF $\alpha$  bewirkt sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellyse, was zur Gewebedestruktion führt (LARRICK ET AL., 1990). Durch Modulation von Endothelzellen kann TNF $\alpha$  die Adhärenz von Neutrophilen und Lymphozyten erhöhen und dadurch die immunologisch relevanten Zellen zum Ort des Geschehens leiten. Dort kann dann die Produktion der Substanzen induziert werden, die die Entzündungsreaktion regulieren (PATTON ET AL., 1989). Ferner erhöht TNF $\alpha$  die Sekretion von IL8 (ERNST ET AL., 1994).

Die Untersuchungen der Produktion von TNF $\alpha$  in einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis beschränken sich auf eine Konzentrationsbestimmung im Kulturüberstand kurzzeitiger Gewebekulturen (CRABTREE ET AL., 1991) und auf die

Quantifizierung der TNF $\alpha$  Transkripte in der Antrum mukosa im Northern Blot (MOSS ET AL., 1994). TNF $\alpha$  Konzentrationen wurden auch in der Magenflüssigkeit und im Gewebehomogenat gemessen (FAN ET AL., 1995). Alle Ergebnisse zeigen übereinstimmend eine erhöhte Sekretion von TNF $\alpha$  in Geweben *H. pylori*-positiver Patienten.

Die bisherige Detektion des Zytokins TNF $\alpha$  läßt keine Rückschlüsse auf die Ursprungszellen und somit auf die Lokalisation der TNF $\alpha$  Synthese im Epithel oder in der Lamina propria zu. Die Detektion des TNF $\alpha$  Peptids im Gewebe mittels immunhistochemischen Methoden war nicht möglich. Es ist nicht auszuschließen, daß dieses Peptid während der Gewebeprozessierung ausgewaschen wurde oder für die benutzten monoklonalen Antikörper nicht detektierbar war (ENGELKING, 1995). Als Detektionsverfahren für TNF $\alpha$  im Gewebe konnte in dieser Arbeit die *in-situ*-Hybridisierung angewendet werden. Die Transkripte konnten sowohl in der Lamina propria als auch in Epithelzellen *H. pylori*-positiver Patienten detektiert werden. Biopsien *H. pylori*-negativer Patienten zeigten eine geringe Expression der TNF $\alpha$  mRNA. Da die *in-situ*-Hybridisierung nur die Transkription eines Gens zeigt, lassen sich die Befunde nicht direkt auf eine Synthese des Produktes übertragen. Da aber TNF $\alpha$  in hohen Konzentrationen im Gewebe *H. pylori*-positiver Patienten vorhanden ist, liegt der Schluß nahe, daß sowohl Epithelzellen, als auch Monozyten / Makrophagen an der TNF $\alpha$  Produktion beteiligt sind.

Die Expression beider Zytokine in der Lamina propria *H. pylori*-positiver Patienten korrespondiert mit der Schwere der *H. pylori*-assoziierten Gastritis, wobei aber der zweite und dritte Grad sich nur noch wenig unterscheiden. Mit zunehmender Schwere der Gastritis nimmt die Aktivierung der einzelnen Zelle aber ab, und eine gleichmäßig verteilte Aktivierung bezüglich TNF $\alpha$  und IL8 stellt sich ein. *In vitro* Stimulationsversuche von elutrierten Monozyten / Makrophagen mit Oberflächenantigenen von *H. pylori* bestätigten den Einfluß des Pathogens auf die TNF $\alpha$  und IL8 Expression dieser Zellen auf der mRNA- und Peptidebene.

Die Epithelzellen zeigen ein anderes Bild. Mit zunehmender Schwere der Gastritis sinken sowohl die Zahl der aktivierten Zellen als auch die Aktivierungsintensität

beider Zytokine. Die Aktivierung ist aber im Vergleich zu *H. pylori*-negativem Gewebe immer noch signifikant erhöht. Allem Anschein nach wirkt *H. pylori* inhibierend auf die Expression von IL8 und TNF $\alpha$  in Epithelzellen. Diese Beobachtung wurde in Stimulationsversuchen von einer Epithelzelllinie mit *H. pylori*-Oberflächenproteinen *in vitro* bestätigt. Hierbei zeigte die Magenkarzinomzelllinie KATO III nach Stimulation mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen eine erniedrigte IL8 Sekretion, während sich die TNF $\alpha$  Produktion nicht veränderte (ENGELKING, 1995).

Somit sind, wie im Bild 48 dargestellt, Monozyten / Makrophagen als Hauptquellen der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL8 zu werten. Ein chemotaktisch wirkender IL8 Gradient zum Magenepithel ist nur in der Gastritis I anzunehmen, der sich im Fortschreiten der Entzündungsreaktion zurückbildet. Die neutrophilen Granulozyten werden dann in der Lamina propria selbst durch IL8 und TNF $\alpha$  an der Migration gehindert. Sie setzen nach Voraktivierung und Aktivierung toxische Sauerstoffmetabolite und degradierende Enzyme in das Gewebe frei. Diese Autoaggression kann zusammen mit der direkten gewebedestruierenden Wirkung des TNF $\alpha$  die Läsionen erklären, die typisch für hohe Entzündungsgrade der gastrischen Mukosa sind.



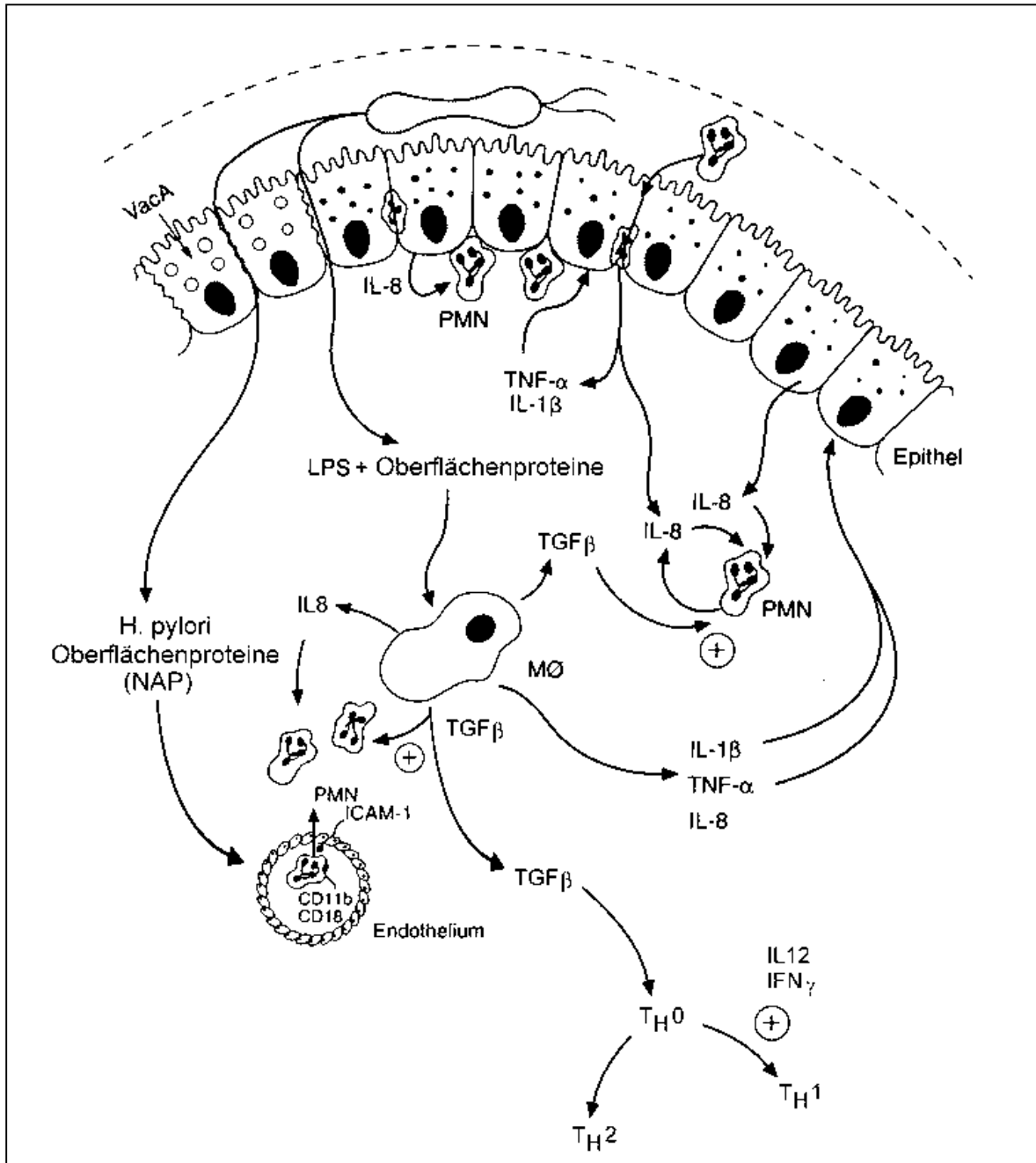


Bild 48: Dissoziierte Immunantwort in der *H. pylori*-Infektion

Positive Rückkopplungsmechanismen sind durch  $\oplus$  kenntlich gemacht. Nähere Erklärung im Text (modifiziert nach CRABTREE, 1996).

PMN: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten  
MØ: Makrophagen  
T<sub>H</sub>: T-Helfer-Zellen

### 5.5.2. TGF $\beta$ in der Pathogenese der *H. pylori*-assoziierten Gastritis

Als potenter Immunmodulator schließt das multifunktionale Zytokin TGF $\beta$  sowohl die Regulation (Initiation und Resolution) von Entzündungsgeschehen und Immunantworten, wie Differenzierung und Proliferation von Leukozyten, als auch Angiogenese, Zelladhäsion und Wiederherstellung von Geweben ein (WYSS-CORAY ET AL., 1997; WEINER ET AL., 1994).

Das sezernierte TGF $\beta$  hat eine starke chemotaktische Aktivität auf Monozyten und induziert ihre Migration zum Entzündungsort, wo sie zur Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL1, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  selbst stimuliert werden (WAHL ET AL., 1992; WAHL ET AL., 1989). Eine Überexpression von TGF $\beta$  kann so zuerst eine lokale Entzündung initiieren und fördern (WYSS-CORAY ET AL., 1997). Die Differenzierung und Aktivierung der Monozyten / Makrophagen zieht eine Modulierung der TGF $\beta$  Rezeptoren nach sich, worauf sich das Profil der Antwort auf das Zytokin ändert. Die Expression der TGF $\beta$  Rezeptoren in der durch LPS, IFN $\gamma$  oder TGF $\beta$  aktivierten Monozytenpopulation verringert sich, und sie verlieren allmählich die Sensitivität gegenüber TGF $\beta$ . So wird die Aktivierung der Makrophagen inhibiert, was zu einer Reduktion der oxidativen Antwort führt.

Auf nicht aktivierte T-Lymphozyten wirkt TGF $\beta$  ebenfalls zunächst stimulierend. Einhergehend mit ihrer Aktivierung erhöht sich die Expression der TGF $\beta$ -Rezeptoren, was allmählich zur Herunterregulierung der Proliferation dieser Zellen in chronisch entzündeten Läsionen führt (MCCARTNEY-FRANCIS ET AL., 1994; WAHL ET AL., 1988). Die Inhibierung der B-Zell-Proliferation und ihrer Expression der Immunglobuline G und M sowie eine erhöhte Expression von IgA, folgen ebenfalls der TGF $\beta$  Stimulation. Dieses Zytokin kann auch die Apoptose verschiedener Zellen wie humaner B-Zellen (DOUGLAS ET AL., 1997), NK-Zellen und zytotoxischer T-Zellen induzieren. Dieser Effekt auf Immunzellen spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und in der Genese von T-Zell-Lymphomen. Epitheliale wie auch lymphoidale Tumorzellen sind gegen die inhibitorischen Auswirkungen von TGF $\beta$  aufgrund einer Rezeptormutation resistent (LETTERIO ET AL., 1997).

Der Einfluß von TGF $\beta$  auf die Ausbildung und Regulierung einer T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2 Immunantwort ist abhängig vom Aktivierungsstatus der Entzündungszellen. Takeuchi und Mitarbeiter (1997) fanden heraus, daß antigenpräsentierende Zellen in Gegenwart von exogenem TGF $\beta$  die Produktion von IL4, aber nicht von IFN $\gamma$ , bei naiven T-Zellen *in vitro* stimulieren und somit eine humorale Immunantwort auslösen. Bei mitogenvoraktivierten Lymphozyten inhibiert TGF $\beta$  die Produktion von IL4 und nicht von IFN $\gamma$ , so daß hier die T<sub>H</sub>1 Antwort favorisiert wird (FARGEAS ET AL., 1992). TGF $\beta$  kann also eine etablierte Immunantwort beeinflussen und sie in Gegenwart von Zytokinen durch die Erhöhung der Effektivität der Chemokine verstärken (WYSS-CORAY ET AL., 1997; ROMAGNANI ET AL., 1994; FARGEAS ET AL., 1992).

Diese Arbeit hat eine hohe Expression des TGF $\beta$  Peptids in der Lamina propria des Magens *H. pylori*-positiver Patienten gezeigt. Da sowohl Monozyten / Makrophagen (WAHL ET AL., 1988) als auch B-Lymphozyten (DOUGLAS ET AL., 1997) fähig sind TGF $\beta$  zu synthetisieren, ist eine Charakterisierung der Ursprungszellen bedeutsam. Um die Situation *in situ* darzustellen, wurde die Methode der Immunhistochemie gewählt, da Monozyten konstitutiv das TGF $\beta$  Gen exprimieren und nur nach Aktivierung das Peptid synthetisieren und sezernieren (WAHL ET AL., 1989). TGF $\beta$  ist in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis unabhängig von ihrem Entzündungsgrad vorhanden, so daß man diesem Peptid auch hier eine immunregulative Bedeutung zuschreiben kann. Es ist möglich, daß TGF $\beta$ , sezerniert von Makrophagen, einen wichtigen Rekrutierungs- und Aktivierungsfaktor für Monozyten / Makrophagen darstellt. Zusammen mit IFN $\gamma$  und IL12 induziert und verstärkt es die zelluläre T-Lymphozytenantwort (ROMAGNANI ET AL., 1994). Monozyten / Makrophagen produzieren und sezernieren aufgrund der Aktivierung durch *H. pylori*-Antigene TGF $\beta$  und proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  (Bild 48). Mit fortschreitender Entzündung in einem TGF $\beta$ -angereicherten Milieu werden diese Zellen in ihrer Aktivierung gehemmt. Die Produktion dieser Mediatoren läßt nach. So steigt die exprimierende Zellzahl während der Entwicklung einer Gastritis I zur Gastritis II an und sinkt in der Gastritis III nur geringfügig. Der Aktivierungsgrad aber fällt massiv in der

Entwicklung von der Gastritis I zur Gastritis II, aber nur geringfügig in der Gastritis III.

Die Expression von TGF $\beta$  in einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis kann einmal die beschriebene Immunreaktion lokal induzieren, indem ein ständiges chemotaktisches Signal im Zielgewebe vorhanden ist, das auf eine undifferenzierte Leukozytenpopulation aktivierend und auf eine differenzierte inhibierend wirkt. Das ständige Vorhandensein von Antigenen in der Lamina propria läßt die Makrophagen migrieren und auch ins Blut austreten, von wo sie in die Lymphorgane gelangen. Dort können sie T- und B-Zellen die Antigene präsentieren mit gleichzeitiger Voraktivierung bezüglich der Sekretion von TGF $\beta$ . So könnten sie die spezifischen naiven T-Lymphozyten zur IL4 Produktion anregen und eine systemische humorale Antwort induzieren.

Auf *in vivo* Verhältnisse übertragen kann man folgende Regulation der Entzündungsreaktion herleiten, die im Bild 49 schematisch dargestellt ist: *H. pylori* kolonisiert den Magenschleim und ruft eine Evasion polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyten in den Magenschleim hervor. Lösliche lipopolysaccharid-freie Oberflächenantigene werden in die Lamina propria ausgeschieden und führen dort zur Ausbildung einer lokalen, aber vom Bakterium dissoziierten humoralen und zellulären Immunantwort. Sekretorische Immunglobuline der Klasse A werden in der Mukosa gebildet und neutrophile Granulozyten sowie Monozyten / Makrophagen in die Lamina propria rekrutiert. Zusammen mit den Oberflächenantigenen aktivieren die antigenpräsentierenden Zellen durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen die Granulozyten. Sie rekrutieren und arretieren diese im Gewebe. T-Zellen regen sie durch die Sekretion von IL12 und IL10 zur Proliferation und Zytokinsekretion an. Dabei können protektive T<sub>H</sub>2 Zytokine zusammen mit entzündlichen T<sub>H</sub>1 Zytokinen induziert werden. Beide T-Zell-Subpopulationen koexistieren, und es stellt sich eine anfänglichen Balance zwischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 ein. Sie stellt einen Zustand der Toleranz dar, der es dem Bakterium erlaubt, zu persistieren, da Abwehrleistung und Gewebsdestruktion im Gleichgewicht stehen. Durch die verstärkte Stimulation von IL12 und IFN $\gamma$  dominiert dann in der *H. pylori*-Infektion die inflammatorische T<sub>H</sub>1 Immunantwort. Die durch *H. pylori* verschobene Balance zwischen T<sub>H</sub>1 und

T<sub>H2</sub> hebt den Schutz des Gewebes durch T<sub>H2</sub> vor der Destruktion durch T<sub>H1</sub> auf. Die Mediatorfreisetzung in dieser *H. pylori*-assoziierten Entzündungsreaktion führt zur Induktion einer nicht adäquaten Immunreaktion und zur weiteren Zerstörung der Lamina propria mucosae. Es kommt zur Schädigung des Zellverbandes der gastrointestinalen Barriere ohne Eradikation des Bakteriums.

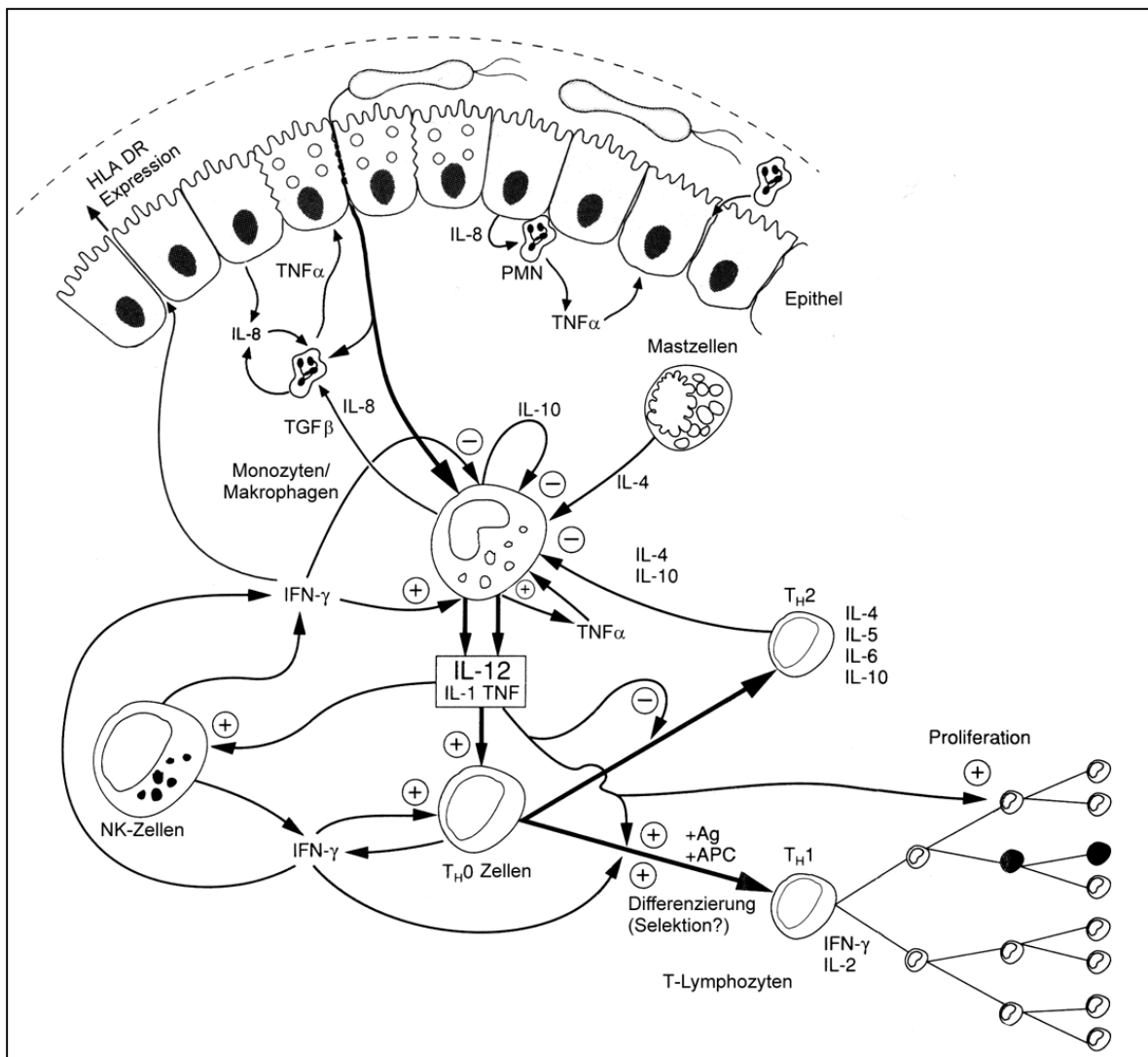


Bild 49: Immunreaktion in der *Helicobacter pylori*-Infektion

Negative und positive Rückkopplungsmechanismen sind durch  $\ominus$  bzw.  $\oplus$  kenntlich gemacht. Nähere Erklärung im Text (modifiziert nach BELARDELLI, 1995; CRABTREE, 1996).

- Ag: Antigen
- APC: Antigenpräsentierende Zellen
- T<sub>H</sub>: T-Helfer-Zellen
- PMN: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

## 5.6. Analogien in der Regulation der Infektabwehr

Das Fließgleichgewicht der Zytokinproduktion und das synergistische bzw. antagonistische Ineinandergreifen der Regulationsmechanismen in einem Zytokinkonzert hat verschiedene Auswirkungen bei einer großen Palette von Infektionskrankheiten. Eine Disbalance im Konzept einer  $T_H1 / T_H2$  Immunantwort spielt dabei immer eine wesentliche Rolle. Um Analogien zur Immunregulation in einer *H. pylori*-Infektion ziehen zu können, sind dabei Untersuchungen zur Infektabwehr von Mikroorganismen bedeutsam, die chronische Erkrankungen an einer Oberfläche (Epithelien) verursachen oder ihre Nische in einem Mukosasytem gefunden haben.

### 5.6.1. Immunregulation einer Infektion im Mukosasytem

Die im Mukosagewebe vorhandenen T-Lymphozytenpopulationen kennzeichnen die Integrität des Immunsystems der gastrointestinalen Lamina propria. Diese Zellen wurden vorwiegend als spezialisierte Memory-T-Zellen charakterisiert, die, aufgrund einer hohen Expression des IL2 Rezeptors, eine große Bereitschaft zur Aktivierung besitzen. Die Bioaktivität des IL2 von mukosalen T-Zellen erhöht ihre Helfer-Aktivität für die Immunglobulinsynthese und IgA Produktion durch B-Zellen (JAMES ET AL., 1994).

Das Zytokinmuster dieser gastrointestinalen T-Zellen zeigt die Expression von IL2, IL4, IL5 und  $IFN\gamma$ . Es ist das Profil der  $T_H0$  T-Zellen. Der Kontakt mit einem Antigen (z.B.: intestinale Nematoden, enteritische Pathogene) führt vorwiegend zur Differenzierung und Aktivierung von  $T_H2 / T_H0$  T-Lymphozyten, die wiederum eine spezifische IgA Antwort stimulieren (ANAYA-VELAZQUEZ, ET AL., 1994). Eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität führt dann zur Elimination der invasiven enteritischen Mikroorganismen (LEVINE ET AL., 1994).

Diese vorherrschende Abwehr wird von intrazellulären Bakterien, die ein Mukosasytem besiedeln (z.B.: *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila*

und *Mycobacterien*), moduliert, da spezifische ( $T_H1$ ) und unspezifische (Makrophagen) zelluläre Komponenten des Immunsystems für eine Kontrolle des Infektionsverlaufs verantwortlich sind. Für die Elimination des extrazellulären intestinalen Bakteriums *Yersinia enterocolitica* sind ebenfalls solche Wirtsmechanismen notwendig, da dieses Pathogen enteroinvasiv ist. Die Immunreaktionen dieser Infektionen können in Analogie zu *H. pylori* diskutiert werden.

#### *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* wird als Modellerreger für andere enteroinvasive Bakterien wie *Campylobacter*, *Salmonella* und *Shigella* betrachtet. Dieser Erreger der Enteritis oder Enterokolitis invadiert die M-Zellen der Peyerschen Plaques des Dünndarms und führt zu intestinalen und extraintestinalen Organmanifestationen mit Abszessen und Granulom-ähnlichen Läsionen (AUTENRIETH ET AL., 1993).

Über die genaue Pathogenese chronischer Yersiniosen liegen bislang keine klinisch-experimentellen Daten vor. Aufgrund einer Serum-IgA-Persistenz wird jedoch vermutet, daß bestimmte Patienten auf eine akute Yersinieninfektion mit einer  $T_H2$  Immunantwort reagieren, was eine persistierende Infektion mit dem Erreger zur Folge hätte (AUTENRIETH ET AL., 1994; KRAEHENBUHL ET AL., 1992).

Das Bakterium ist wie *H. pylori* ein extrazellulärer Erreger, jedoch invasiv, der durch Produktion verschiedener Virulenzfaktoren die unspezifische Infektabwehr des Wirtes unterläuft (BEUSCHER ET AL., 1995). Deshalb sind zelluläre Wirtsabwehrmechanismen zur Elimination von *Y. enterocolitica* aus infizierten Geweben essentiell. Während der Frühphase der Infektion scheinen die von Makrophagen produzierten Zytokine  $TNF\alpha$  und IL12 die bedeutendste Rolle zu spielen. Später ist eine signifikante T-Zellbeteiligung mit  $IFN\gamma$  Produktion festzustellen, die eine dominante essentiell-protective Bedeutung erlangen (BOHN ET AL., 1996).

#### *Legionella pneumophila*

Die Legionellose tritt meist in Form einer Pneumonie auf. Der intrazelluläre Erreger infiziert präferentiell Makrophagen, die sich hier in einem Mukosaimmunsystem befinden und vermehrt sich dort. *In vivo* reagiert der

Organismus mit einer zellvermittelten Immunabwehr, die aus einer Lymphozytenproliferation, Makrophagenaktivierung, Zytokinproduktion (IFN $\gamma$ ) sowie Aktivierung von Killerzellen besteht und eine Lyse der *L. pneumophila*-infizierten Zellen bewirkt (KLEIN ET AL., 1995).

*In vitro* Experimente mit humanen peripheren Blutlymphozyten bestätigten die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1 Antwort nach Stimulation mit ganzen Bakterien. Wurden die Zellen mit dem Überstand, der lösliche *L. pneumophila*-Antigene enthielt, stimuliert, konnte auch neben der IFN $\gamma$  mRNA auch IL4 mRNA detektiert werden (KITSUKAWA ET AL., 1995).

### *Chlamydia trachomatis*

Chlamydien sind obligat intrazellulär wachsende Bakterien, die zahlreiche Zellarten im Mukosasystem befallen. Nach vollendetem Vermehrungszyklus kann die Wirtszelle beim Austritt der neugebildeten Elementarkörperchen zerstört werden. Die Art und Stärke der Wirtsreaktion ist für das klinische Bild von Bedeutung.

So könnte die Entwicklung einer Reaktiven Arthritis aus dem Ausbleiben einer effektiven T<sub>H</sub>1 Immunantwort resultieren, die essentiell für die Elimination der intrazellulären Erreger ist. Eine dominante T<sub>H</sub>2 Antwort führt dagegen zur anhaltenden Infektion mit diesen Bakterien und den typischen Läsionen (YIN ET AL., 1997a).

Im Mausmodell ist die Abwehr einer Reinfektion stark von CD4<sup>+</sup> Zellen abhängig, sowie von IFN $\gamma$ , IL12 und TNF $\alpha$ . Die Elimination der Chlamydien aus der genitalen Mukosa wird durch einen IL12 abhängigen aber IFN $\gamma$  unabhängigen Mechanismus gesteuert, während die Prävention einer Ausbreitung der Bakterien das Zytokin IFN $\gamma$  erfordert (WILLIAMS ET AL., 1997; PERRY ET AL., 1997).

### *Mycobacterium tuberculosis*

Das Mukosaimmunsystem der Lunge stellt die wichtigste Eintrittspforte für den Tuberkuloseerreger sowie den häufigsten Manifestationsort der Erkrankung dar. *M. tuberculosis* ist ein intrazelluläres Pathogen, das in erster Linie ruhende



Makrophagen als Wirtszellen mißbraucht. Dort werden sie von der Wirtszelle zerstört oder vermehren sich im Endosol.

Dabei spielen  $T_H1$  Lymphozyten und  $CD8^+$  T-Zellen eine bedeutende Rolle, da sie anhand ihrer Zytokine Makrophagen und weitere Lymphozyten rekrutieren und aktivieren, so daß sie sie bei der Bakterieneliminierung unterstützen. Dazu gehören u.a.  $IFN\gamma$ ,  $IL12$  und  $TNF\alpha$ . Unter diesem Einfluß entstehen Granulome, in denen ein labiles immunologisches Wechselspiel den Erreger möglicherweise über Jahre in Schach hält. Störungen dieses sensitiven Gleichgewichts führen noch nach Jahrzehnten zum Krankheitsausbruch und nach Induktion der zellvermittelten Immunität zur Gewebeschädigung (MUNK ET AL., 1995; KAUFMANN, 1993b).

### *Mycobacterium leprae*

Ein klassisches Beispiel für den unterschiedlichen Entzündungstyp bei entweder  $T_H1$  oder  $T_H2$  dominierter Immunantwort ist die Lepra. Klinisch unterscheidet man bei dieser heterogenen Infektionskrankheit zwei polare Extreme mit mehreren Übergangs- und Grenzformen, die mit der induzierten Immunantwort des Wirtes korrelieren:

1. Die tuberkulöse Form ist durch eine  $T_H1$  Antwort und Elimination der intrazellulären Parasiten charakterisiert. Sie zeigt meist wenige erythematöse Hautläsionen (MISRA ET AL., 1995; MODLIN, 1994). Bei Individuen mit einer starken zellulären Immunantwort verläuft die Infektion meist ohne klinische Symptome (HOWE ET AL., 1995).
2. Bei der  $T_H2$ -dominierten lepromatösen Form entwickelt sich eine für intrazelluläre Mikroorganismen ineffiziente Immunantwort, bei der durch  $IL4$  Stimulation spezifische Antikörper gebildet werden, aber keine ausreichende zelluläre Immunreaktion vorhanden ist. Trotz starker und spezifischer Immunantwort ist der Körper mit Parasiten überschwemmt. Von der Gewebeerstörung sind Haut und muköse Membranen stark betroffen (MISRA ET AL., 1995; MODLIN, 1994).

Bei der Regulation der Immunantwort auf *M. leprae*, die *in vitro* und *in vivo* untersucht wurde, spielen die Zytokine IL10 und IL12 eine bedeutende Rolle. In den Hautläsionen der Lepra tuberculosa wurde IL12 mRNA in hohen Konzentrationen detektiert, deren Peptid die Expansion von Typ I-produzierenden Zellen bewirkt. In Läsionen der Lepra lepromatosa dagegen wurden hohe Konzentrationen an IL10 mRNA detektiert. Dieses Zytokin wiederum, von Makrophagen gebildet, inhibiert die Makrophagenaktivität sowie Zytokinproduktion und führt zur Ausbildung einer T<sub>H</sub>2 Immunantwort (SIELING AND MODLIN, 1994).

Die Entwicklung der Infektion wird auf einen Defekt der zellulären Immunantwort zurückgeführt. Während Makrophagen normaler Personen die phagozytierten Bakterien abtöten, kommt es bei einem bestehenden zellulären Immundefekt (Zytokindisbalance) zu einer intrazellulären Vermehrung. Dabei wird die T<sub>H</sub>1 Antwort unterdrückt, während die Bildung humoraler Antikörper ausgeprägt ist (KAUFMANN, 1994).

Die ökologische Nische von *H. pylori* ist der Mukus des Magens, wo er der T<sub>H</sub>2 Immunantwort des Wirtes entkommen kann, denn er gibt ständig Oberflächenproteine in die Mukosa ab, die zu einer T<sub>H</sub>1 Entzündungsreaktion führen. Da *H. pylori* aber weder invasiv noch intrazellulär ist, ist diese Immunreaktion nicht adäquat.

### 5.6.2. Die Immunreaktion bei einer Infektion an epithelialen Oberflächen

Analog zur Immunabwehr gegen *H. pylori*, der als ein extrazelluläres, nicht invasives, helikales Bakterium nur durch die Adhäsion an das Epithelium einen direkten Kontakt zum Wirt besitzt, können Immunreaktionen gegen extrazelluläre Spirochäten wie *Borrelia burgdorferi* und *Treponema pallidum* und ihre Immunmodulation diskutiert werden. Zur Eliminierung nicht invasiver Bakterien gehören die unspezifischen humoralen und zellulären oder die spezifischen humoralen Komponenten der Infektabwehr (HAHN AND KAUFMANN, 1981).

*Borrelia burgdorferi*

Die Erreger der Rückfallfieber gelangen nach Eindringen durch die Haut in verschiedene parenchymatöse Organe, wo sich aufgrund eines Antigendriftes der Pathogene eine chronische Infektion manifestiert.

Die chronisch verlaufende Lyme-Borreliose zeigt Symptome wie Arthritis und Karditis. Dabei spielt die Immunantwort des Wirtes eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Infektion. Patienten mit einer Lyme-Borreliose exprimieren eine inadäquate, das Gewebe schädigende  $T_H1$  Immunantwort, die die Persistenz der Infektion begünstigt. Zur Hemmung der Vermehrung und Eliminierung des Pathogens führt aber eine  $T_H2$  Immunantwort (KANG ET AL., 1997; YIN ET AL., 1997b).

Im Mausmodell wurde gezeigt, daß in der Frühphase der Infektion mit einer  $IFN\gamma$  Produktion eine  $T_H1$  Antwort ausgebildet wird, die zu Gewebeschädigungen führt. Im weiteren Verlauf entwickelt sich dann eine  $T_H2$  Immunantwort, die eine Rückbildung der inflammatorischen Reaktion und einen Schutz gegen das Bakterium bewirkt (KANG ET AL., 1997). *In vivo* kontrolliert IL4 das Wachstum der Bakterien, während  $IFN\gamma$  die Vermehrung der Spirochäten fördert (KEANE-MYERS ET AL., 1995).

*Treponema pallidum*

Der invasive Erreger der Syphilis dringt in das Wirtsgewebe ein und wird von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen prozessiert. Er beeinflusst stark die Balance in der zellulären Immunreaktion des Wirtes.

Durch Stimulation der IL2 Produktion proliferieren T-Zellen und werden zur  $IFN\gamma$  Produktion angeregt. Das aktiviert wiederum Makrophagen zur Phagozytose, was zunächst zu einer raschen Eradikation der Pathogene führt. Die Konsequenz davon ist die Produktion von Prostaglandin, das die  $IFN\gamma$  Produktion hemmt und dadurch die Makrophagenaktivierung unterbricht. Die  $T_H1$  Immunantwort wird somit unterdrückt und eine  $T_H2$  Antwort mit erhöhter B-Zell-Aktivität sowie der Sekretion von IL4 und IL10 dominiert. Die nicht phagozytierten Tryponemen können sich vermehren, aber langsam, da sie von den vorhandenen Antikörpern

kontrolliert werden. Die akute Infektion etabliert sich als eine lebenslange chronische Infektion (FITZGERALD, 1992).

Das klinische und immunologische Spektrum der Infektion mit *T. pallidum* kann man mit dem der Lepra vergleichen. Dabei ist das tertiäre Stadium der Syphilis analog zur lepromatösen Form der *M. leprae*-Infektion, die durch eine schwache  $T_H1$  Immunantwort und die Anwesenheit von persistierenden Organismen gekennzeichnet ist. Die latente und sekundäre Syphilis entspricht den Übergangsformen der Lepra lepromatosa. Das Primärstadium der Syphilis mit einer starken zellulären Immunantwort ist der tuberkulösen Form einer *M. leprae*-Infektion ähnlich, da auch dort wenige persistierende Organismen zu finden sind (SELL ET AL., 1993).

Das Immunsystem hat die Aufgabe, gegen die unterschiedlichen Keime eine effektive Abwehr zu entwickeln. Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Strategien entwickelt. So beruht die Immunantwort gegen extrazelluläre Parasiten vor allem auf komplementbindenden Antikörpern, während intrazellulär sich vermehrende Bakterien durch eine zellvermittelte Immunreaktion kontrolliert werden. Organismen, die eine chronische Infektion verursachen, haben aber Mechanismen entwickelt, der Immunabwehr, die in einem akuten Stadium der Infektion ausgelöst wird, zu entkommen und zu persistieren. Es stellt sich ein sensibles Gleichgewicht zwischen Parasit und Wirt ein, das durch Disbalancen im Zytokinmilieu wiederum zu einer akuten Infektion führen kann (FITZGERALD, 1992).

Eine Störung der Balance im Zytokinkonzert die zum Ungleichgewicht der  $T_H1$  /  $T_H2$  Antwort führt, wirkt pathogen (YIN ET AL., 1997a). Fehlt die Regulation der zellvermittelten  $T_H1$  Immunantwort, die aufgrund von Sekretion der Zytokine wie IL12 und IFN $\gamma$  eskalieren kann, wird einerseits das Pathogen durch Zellyse der befallenen Zellen eliminiert. Andererseits aber begünstigt die Zellyse die Ausbreitung der Parasiten und trägt entscheidend zur Bildung von Läsionen im Wirtsgewebe bei, da die  $T_H2$  Antwort und dadurch die Kontrolle der Pathogene unterdrückt ist (KAUFMANN, 1993a).

Der individuelle Krankheitsverlauf wird also nicht nur durch das Pathogen bestimmt, sondern auch durch Wirtsfaktoren wie Alter und Immunstatus, die die Ausbildung einer Immunantwort bestimmen (DARVILLE ET AL., 1997).

### 5.7. Ausblick

Der Schädigung des Intestinalgewebes in einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis scheinen zwei Mechanismen zu Grunde zu liegen:

- die direkte Toxizität des Bakteriums, die die Epithelzellen schädigt und den weiteren Einstrom von Antigenen und Säure begünstigt sowie
- die Aggression der aktivierten Immunzellen, die zu Läsionen in der Mukosa und nicht zur Eradikation des Pathogens führt.

Die Aggressivität der lokalen Entzündungsreaktion und der inadäquaten Immunantwort, die mit *H. pylori* assoziiert ist, legt den Schluß nahe, daß eine Prävention der Gastritis B in der Wiederherstellung des Gleichgewichts der lokalen Immunantwort und der daraus resultierenden Beseitigung der Infektion liegt.

Eine Infektion mit *H. pylori* induziert sowohl  $T_H1$  als auch  $T_H2$  Antworten, wobei die zellvermittelte Immunantwort dominiert und die Produktion von  $T_H2$  Zytokinen unterdrückt wird. Der  $T_H1$  Phänotyp führt so zu der beschriebenen Pathogenese. Eine Modulation des Zytokinnetzwerkes, das dann zum Schutz gegen *H. pylori* führt, kann aber durch Zytokinbehandlung oder durch eine Induktion von Zytokinen erreicht werden (BELLARDELLI, 1995).

*In vitro* kann die Gabe von IL4 und Antikörpern gegen IFN $\gamma$  und IL12 ein  $T_H1$  /  $T_H0$  Profil in ein  $T_H2$  Profil umwandeln (MANETTI ET AL., 1993). Eine weitere Möglichkeit stellt eine Anti-Zytokintherapie dar, die die Inhibierung der Sekretion von Zytokinen durch Antikörper gegen entsprechende Rezeptoren und gegen Zytokine oder die Inhibierung durch Antagonisten beinhalten (BELLARDELLI, 1995).

So wird IL12 *in vitro* und *in vivo* durch ein Adjuvanz wie Pentoxifyllin supprimiert und eine Disregulation der Immunantwort aufgehoben (MOLLER ET AL., 1997).

Solche Möglichkeiten der Immunmodulation sollten für die *H. pylori*-Infektion *in vitro* und *in vivo* erörtert und diskutiert werden. Eine anti-IFN $\gamma$  Behandlung bzw. die Neutralisation von IFN $\gamma$  beispielsweise kann die Präsenz der vorhandenen T<sub>H</sub>2 Zellen demaskieren und die *H. pylori*-assoziierte Gastritis inhibieren. In einem *H.-felis* Modell wurde bereits gezeigt, daß dann T<sub>H</sub>2 Zellen B-Zellen zur Immunglobulinproduktion stimulieren und so zur Protektion gegen *H. pylori* führen (MOHAMMADI ET AL., 1996).

Die Modulation der T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Balance, also die Induktion einer T<sub>H</sub>2 Immunantwort durch protektive Vaccinen wie

- 1) den Einsatz von verschiedenen Adjuvantien
- 2) die Konjugation eines modulierenden Proteins an Carrier
- 3) die Immunisierung in Gegenwart von Zytokinen
- 4) den Gebrauch alternativer Verabreichungswege

könnte *H. pylori* beseitigen. Ist das der Fall, sinken auch die TNF $\alpha$  und IL8-Spiegel (MOSS ET AL., 1994), die als proinflammatorische Mediatoren wesentlich zur Zerstörung des Gewebes beitragen.

## 6. Zusammenfassung

Die Reaktion des Immunsystems bestimmt den Ausgang einer Infektionsabwehr. Durch die Art und Menge des Antigens, den Ort der Antigenaufnahme, der Antigenpräsentation, die Art der antigenpräsentierenden Zellen und vor allem durch das Zytokinmilieu sowie durch genetische Komponenten wird der Ausgang beeinflusst. Trotz einer antigenspezifischen humoralen wie zellulären Immunreaktion auf eine *H. pylori*-Infektion, die sowohl systemisch als auch lokal vorhanden ist, kommt es zu einer chronischen Kolonisation des epithelnahen intestinalen Mukus durch dieses Bakterium. Sie führt immer zu einer von klinischen Symptomen unabhängigen Entzündung in der Tiefe der Lamina propria mucosae, wo sich ein mononukleäres Infiltrat unter Beteiligung von Monozyten / Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen findet. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten lassen sich in der akuten Phase nachweisen. Eine spontane Eliminierung der *H. pylori*-Infektion ist dennoch ein seltenes Ereignis.

Vor diesem Hintergrund wurden immunkompetente mononukleäre Zellen aus der lokalen Entzündung *H. pylori*-positiver Patienten sowie aus der Mukosa negativer Personen isoliert. Eine phänotypische Charakterisierung, die gleichzeitig mit der Bestimmung der Sekretion von Zytokinen mittels der intrazellulären Durchflußzytometrie auf der Einzelzellebene erfolgte, erlaubte Rückschlüsse auf die Effektorfunktionen der untersuchten Zellen.

Die antigenpräsentierenden Zellen (APC) sind ein wichtiges Glied in der Steuerung einer Immunantwort auf ein Pathogen. Monozyten / Makrophagen als professionelle APC nehmen durch die Sekretion von Zytokinen Einfluß auf die Balance einer  $T_H1$  /  $T_H2$  Immunreaktion, indem sie die eine unterdrücken und die andere stimulieren. Diese Regulation wird durch die antagonistische Wirkungsweise der Zytokine IL12 und IL10 bewirkt. IL12 fördert eine zellvermittelte Immunreaktion, IL10 hemmt diese.

Die aus *H. pylori*-positivem Gewebe isolierte und aktivierte Monozyten / Makrophagen Population bestand zu 48% aus IL12 und einem Anteil von 7% aus IL10 produzierenden Zellen. Nur 13% der aktivierten APC in der *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe exprimierten das IL12 Peptid, allerdings auch mit niedrigerer Intensität. Daß *H. pylori* selbst einen direkten Einfluß auf die Aktivierung dieser Population zur IL12 Produktion ausübt, zeigten die *in vitro* durchgeführten Stimulationsversuche mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen. Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-negativer Patienten exprimierten mehr vom IL12-Peptid und weniger IL10. Der Anteil der IL12 exprimierenden APC aus diesem Gewebe ist nach der Stimulation auf 30% gestiegen.

Das Magenepithel, an das *H. pylori* adhärert, bildet die primäre Kontaktstelle zwischen Wirt und Bakterium. Durch die Antigenpräsentation und Sekretion von regulierenden Zytokinen nehmen die Epithelzellen als nicht professionelle APC aktiv Teil am Entzündungsgeschehen. Sie können die Histokompatibilitätsmoleküle der Klasse I und II exprimieren, sowie unterschiedliche Zytokine sezernieren und so in die Regulation einer Immunantwort eingreifen.

Die isolierten Epithelzellen *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten exprimieren zu 86% MHC I, wobei die Intensität der Expression dieser Moleküle auf *H. pylori*-positivem Epithel erhöht ist. *H. pylori* beeinflusst dabei direkt die Expression von MHC I, deren Expressionsdichte nach Stimulation der Epithelzellen aus der *H. pylori*-negativen Gruppe auf das fünffache gestiegen ist.

Der Anteil von 66% an MHC II exprimierenden Epithelzellen in einer *H. pylori*-Infektion gegenüber 45% auf *H. pylori*-negativem Epithel und die erhöhte Expressionsdichte von MHC II auf *H. pylori*-positiven Epithelien ist allerdings auf die verstärkte Produktion von IFN $\gamma$  in einer *H. pylori*-Entzündung zurückzuführen. Denn Stimulationsversuche mit Oberflächenantigenen bewirkten keine Änderungen in der Expression dieser Moleküle. Damit nimmt *H. pylori* indirekt durch die Stimulation von IFN $\gamma$  auf die MHC II Expression Einfluß.



Die Zunahme der Dichte der MHC I und MHC II Moleküle bei fehlenden kostimulatorischen Faktoren in der *H. pylori*-Infektion legt die Vermutung nahe, daß das Epithel nicht zur Immunität sondern zur Induktion von Toleranz mit einem hypoergen Endzustand der Immunzellen beiträgt. Dabei sind CD8<sup>+</sup> Zellen, die MHC I Moleküle erkennen, wie CD4<sup>+</sup> Zellen, die MHC II Moleküle erkennen, betroffen.

Eine Population von 43% aus *H. pylori*-positivem Epithel sezernierte auch das Zytokin IL12. In Epithelzellen aus der *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe produzierten dagegen nur 15% das Peptid. Nach einer *in vitro* Stimulation mit *H. pylori*-Oberflächenproteinen stieg der Anteil der synthetisierenden Epithelzellen in dieser Gruppe auf 54%, die Intensität der Sekretion wurde auf das fünffache verstärkt. Die Stimulation der Peptidproduktion durch *H. pylori* ist transkriptionell gesteuert.

*In situ* konnte mit Hilfe von intrazellulärer Immunhistochemie das Peptid direkt in Monozyten / Makrophagen in der Tiefe der Lamina propria und in den Epithelzellen *H. pylori*-assoziierter Gastritis definierter Schweregrade detektiert werden. Dabei korrelierte der *H. pylori*-Status mit der Produktion des Peptids. Der vereinzelte Nachweis des IL12 Peptids in *H. pylori*-negativem Gewebe macht deutlich, daß seine Sekretion nicht ausschließlich *H. pylori* bedingt ist.

Der Nachweis des potenten Immunmodulators IL12 in Epithelzellen aber auch in Monozyten / Makrophagen *H. pylori*-positiver Gewebe kann wahrscheinlich zusammen mit den Oberflächenantigenen als ein T<sub>H</sub>1 induzierender Faktor betrachtet werden, der zur Disbalance zwischen Immunität und Toleranz führt und damit zur Schädigung der gastrointestinalen Barriere.

T-Lymphozyten, die in der Immunantwort auf eine *H. pylori*-Infektion eine wesentliche Population von Abwehrzellen darstellen, konnten einer T<sub>H</sub>1 bzw. einer T<sub>H</sub>2 Subpopulation zugeordnet werden. Hierfür wurde die Sekretion charakteristischer Zytokine wie IFN $\gamma$  für die T<sub>H</sub>1 Subpopulation sowie IL4 und IL10 für die T<sub>H</sub>2 Subpopulation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemessen.

In der *H. pylori*-positiven Gruppe dominierten T-Lymphozyten (42% und 54%), die mit einem hohen Aktivitätsgrad IFN $\gamma$  bildeten. In der *H. pylori*-negativen Gruppe produzierten 46% CD4<sup>+</sup> und 62% CD8<sup>+</sup> Zellen IL10 sowie 55% bzw. 67% IL4. Eine Population von 14%, die IFN $\gamma$  nur in sehr niedriger Konzentration sezernierte, konnte im *H. pylori*-negativen Gewebe detektiert werden. Die Produktion der T<sub>H</sub>2-Zytokine von T-Zellen *H. pylori*-positiver Patienten lag unter dem Sekretionsniveau von Zellen *H. pylori*-negativer Patienten. *In vitro* kann die erhöhte IFN $\gamma$ -Sekretion in der Lamina propria *H. pylori*-positiver Patienten auf einen direkten Einfluß des Bakteriums zurückgeführt werden, da Stimulationsversuche mit *H. pylori*-Oberflächenantigenen einen Anstieg der Produktionsintensität des Peptids in der *H. pylori*-negativen Kontrollgruppe zeigten, aber keine Änderungen in der IL4 und IL10 Synthese bewirkten.

Die Technik der Klonierung zeigte die Antigenspezifität dieser Immunreaktion. Sie ermöglichte die phänotypische und sekretorische Charakterisierung sowie die funktionelle Zuordnung der aus einer Ursprungszelle entstandenen *H. pylori*-spezifischen T-Zellpopulation zu einer T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 oder T<sub>H</sub>0 Subpopulation. Auf der Peptidebene aber auch auf der Transkriptionsebene konnte ein annähernd repräsentatives Profil der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozytenpopulation in der Mukosa *H. pylori*-positiver und -negativer Patienten erstellt werden. Dabei wurden aus dem Gewebe *H. pylori*-positiver Patienten vorwiegend CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 Klone generiert. T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>0 Zellen konnten aber auch kloniert werden. Die wahrscheinlich als Memory-Zellen oder aufgrund von einer Kreuzreaktion mit heat shock Proteinen klonierten CD4<sup>+</sup> Zellen *H. pylori*-negativer Patienten zeigten ein T<sub>H</sub>0 / T<sub>H</sub>2 Profil.

Die Invasion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten kennzeichnet die chronisch akuten Phasen einer *H. pylori*-Entzündung. Ihre Rekrutierung wird durch die proinflammatorischen Zytokine IL8 und TNF $\alpha$  hervorgerufen. Diese Akutphasenmediatoren tragen so zur Autodigestion bei. IL8 ist dabei ein starker Rekrutierungs- und Aktivierungsfaktor für polymorphkernige neutrophile Granulozyten. TNF $\alpha$  arretiert diese im Gewebe und verursacht selbst eine direkte Destruktion der gastrointestinalen Barriere.

Der Nachweis der Transkripte beider Zytokine in der Lamina propria *H. pylori*-positiver Patienten mittels *in-situ*-Hybridisierung, korrespondiert mit der Schwere der *H. pylori*-assoziierten Gastritis. Mit zunehmender Schwere der Gastritis nimmt aber die Aktivierung der einzelnen Zelle ab, und eine gleichmäßig verteilte Aktivierung bezüglich TNF $\alpha$  und IL8 stellt sich ein. Elutrierte Monozyten / Makrophagen zeigen in *in vitro* Stimulationsversuchen mit Oberflächenantigenen von *H. pylori*, daß das Bakterium direkt die Expression von TNF $\alpha$  bzw. IL8 auf der mRNA- und Peptidebene beeinflusst.

In den Epithelzellen sinken sowohl die Zahl der aktivierten Zellen als auch die Aktivierungsintensität beider Zytokine mit zunehmender Schwere der Gastritis. Die Aktivierung ist aber im Vergleich zu *H. pylori*-negativem Gewebe immer noch sowohl auf der Peptid- als auch auf der Transkriptionsebene erhöht. Allem Anschein nach wirkt *H. pylori* inhibierend auf die Expression von IL8 und TNF $\alpha$  in Epithelzellen.

Die antigenpräsentierenden Zellen nehmen auch in der Akutphase eine bedeutende Rolle ein. Denn zusammen mit den Oberflächenantigenen rekrutieren, aktivieren und arretieren sie durch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine polymorphkernige neutrophile Granulozyten im Gewebe und führen so zu einer lokal vom Bakterium dissoziierten Entzündung.

Das potente immunmodulierende Zytokin TGF $\beta$  beeinflusst in starkem Maße die Initiation und Resolution einer Immunantwort. Außerdem ist es ein chemotaktischer Faktor für Monozyten, die zum Ort des Geschehens migrieren, wo sie zur Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL1, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  angeregt werden.

Abhängig vom *H. pylori*-Status, aber unabhängig von der Schwere der *H. pylori*-assoziierten Gastritis wurde die Expression von TGF $\beta$  mit der intrazellulären histochemischen Methode detektiert. Der Einfluß von TGF $\beta$ , sezerniert von Monozyten / Makrophagen, kann in der Induktion der beschriebenen T<sub>H</sub>1 Immunreaktion bestehen, da im Zielgewebe ein ständiges chemotaktisches Signal

vorhanden ist, das auf eine undifferenzierte Leukozytenpopulation aktivierend wirkt.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine *H. pylori*-Infektion, anders als untersuchte Modellerkrankungen, eine Immunantwort induziert, die nicht nur räumlich sondern auch funktionell vom Bakterium dissoziiert ist. Während *H. pylori* im Mukus, an den Epithelzellen adhäriert, persistiert, wird in der Tiefe der Lamina propria eine Abwehrreaktion durch vom Bakterium abgegebene Oberflächenproteine induziert. Sie zeigt den Reaktionstyp einer zellvermittelten, für den extrazellulären Mikroorganismus inadäquaten T<sub>H</sub>1 Immunantwort, die zur Schädigung des Intestinalgewebes ohne Eradikation des Bakteriums führt.

Um eine protektive Vaccine zu entwickeln, muß daher in den Mechanismus der Immunantwort des Wirts auf *H. pylori* eingegriffen, und die T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 Disbalance in eine protektive T<sub>H</sub>2 Immunität gelenkt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adams RB, Planchon SM, Roche JK (1993): IFN $\gamma$  modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J Immunol*, 150: 2356-63
- Agarwal KL, Brunstedt J, Noyes BE (1981): A general Method for Detection and Characterization of an mRNA using a Oligonucleotide probe. *Biol Chem*, 256: 1023-28
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5350-54
- Aman P, Ehlin-Henriksson B, Klein G (1984): Epstein-Barr virus susceptibility of normal human B lymphocyte populations. *J Exp Med*, 159: 208-20
- Anaya-Velazquez F, Jackson GDF, Ernst PB, Underdown BJ, Gauldie (1994): Cytokines in the liver and gastrointestinal tract. In Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J (Hrsg): *Handbook of mucosal immunology*, Academic Press, USA: 315-24
- Andersson J, Abrams J, Björk L, Funa K, Litton M, Agren K, Andersson U (1994): Concomitant *in vivo* production of 19 different cytokines in human tonsils. *Immunol* 83: 16-24
- Autenrieth IB, Beer M, Hantschmann P, Preger S, Vogel U, Heymer B, Heesemann J (1993): The cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in different inbred strains of mice: evidence for an important role of T-lymphocytes. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis*, 278: 383-95
- Autenrieth IB, Beer M, Bohn E, Kaufmann SH, Heesemann J (1994): Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c mice and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect Immun*, 62:2590-99
- Bøum A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from peripheral blood. *Scand J Clin Lab Invest*, 21 (Suppl. 97): 77-89
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel L (1989): Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest*, 84: 1045-49
- Bancroft JK (1982): Frozen and related sections. In: *Theory and practice of histological techniques*. Bancroft JD, Stevens A (Hrsg.), Longman Group, New York, 82-94
- Barnes WM (1994): PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:2216-20

- Belardelli F (1995): Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS*, 103: 161-79
- Bell J (1989): The Polymerase chain reaction. *Immunol Today*, 10: 351-55
- Berke G, Sullivan KA, AMOS B (1972): Rejection of ascites tumor allografts. I. Isolation, characterization, and in vitro reactivity of peritoneal lymphoid effector cells from BALB/c mice immune to EL4 leukosis. *J Exp Med*, 135 (6):1334 - 50
- Bernard M, Papini E, Filippis V, Gottardi E, Telford J, Manetti R, Fontana A, Rappuoli R, Montecucco C (1995): Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J Biol Chem*, 270: 23937-40
- Beuscher HU, Rodel F, Forsberg A, Rollinghoff M (1995): Bacterial evasion of host immune defense: *Yersinia enterocolitica* encodes a suppressor for tumour necrosis factor alpha expression. *Infect Immun*, 63: 1270-77
- Beutler B, Cerami A (1986): Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*, 320: 584-88
- Bizzozero G (1893): Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch Mikr Anat*, 23: 82-152
- Bland PW, Warren LG (1986a): Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology*, 58: 9-14
- Bland PW, Warren LG (1986b): Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology*, 58: 1-7
- Blaser MJ (1992): Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* induced inflammation. *Gastroenterol*, 102: 720-27
- Blaser MJ (1993a): *Helicobacter pylori*: its role in disease. *Clin Infect Dis*, 15: 386-393
- Blaser MJ (1993b): *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. *TIM*, 1: 255-60
- Blaser MJ (1994): *Helicobacter pylori* phenotypes associated with peptic ulceration. *Scand J Gastroenterol*, 29 Suppl 205: 1-5
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stermmernann GN, Nomura A (1995): Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 55: 2111-2115

- Bode G, Mauch F, Malfertheiner P (1993): The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect*, 111: 483-90
- Bohn E, Autenrieth IB (1996): IL12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, 156: 1458-68
- Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA (1972): Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum*, 43: 404-9
- Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S (1993): Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262: 1892-95
- Brandtzaeg P, Sollid LM, Thrane PS, Kvale D, Bjerke K, Scott H, Kett K, Rognum TO (1988): Lymphoepithelial interactions in the mucosal immune system. *Gut*, 29: 1116-30
- Catrenich CE, Chestnut MH (1992): Character and origin of vacuoles induced in mammalian cells by the Cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 37: 389-395
- Chaconas G, van de Sande JH (1980): 5<sup>-32</sup>P-labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Meth Enzymol*, 65: 75-88
- Chomczynski HM, Sacchi H (1986): Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal Biochem*, 163: 156-59
- Clouse KA, Robbins PB, Fernie B, Ostrove JM, Fauci AS (1989): Viral Antigen stimulation of the production of human monokines capable of regulating HIV1 expression. *J Immunol*, 143: 470-75
- Colditz I, Zwahlen R, Dewald B, Baggiolini (1989): *In vivo* inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes. *Am J Pathol*, 134: 755-60
- Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober, W (1991): *Current Protocols in Immunology*. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R (1993): Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 5791-95
- Cover TL, Blaser MJ (1992): Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 267: 10570-75

- Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ (1990): Characterization and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immunol*, 58: 603-10
- Cox KH, DeLeon DV, Angerer LM, Angerer RC (1984): Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Develop Biol*, 101: 485-502
- Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JI (1991): Mucosal tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut*, 32: 1473-77
- Crabtree JE, Peichl P, Wyatt JI, Stachl U, Lindley IJD (1993): Gastric interleukin-8 and IgA IL8-autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Immunol*, 37: 65-70
- Crabtree JE, Wyatt JI, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PN, Ramsay N, Primrose JN, Lindley IJD (1994a): Interleukin-8 Expression in *Helicobacter pylori* infected, normal and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol*, 47: 61-66
- Crabtree JE, Farmery SM, Lindley IJD, Figura N, Peichl P, Tompkins DS (1994b): CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J Clin Pathol*, 47: 945-50
- Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IJD, Rappuoli R (1995a): *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol*, 48: 41-45
- Crabtree JE, Xiang Z, Lindley IJD, Tompkins DS, Rappuoli R, Covacci A (1995b): Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, 48: 967-69
- Crabtree JE, Farmery SM (1995c): *Helicobacter pylori* and Gastric Mucosal Cytokines: Evidence That CagA-Positive Strains Are More Virulent. *Lab Invest*, 73: 742-45
- Crabtree JE (1996): Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*, 31 Suppl 215: 3-10
- Craig PM, Territo MC, Karnes WE, Walsh JH (1992): *Helicobacter pylori* secretes a chemotactic factor for monocytes and neutrophils. *Gut*, 33: 1020-23
- D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan S, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, Chizzonite R, Wolf SF, Trinchieri G (1992): Production of Natural Killer Cell Stimulatory Factor (Interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med*, 176: 1387-98



- D'Elcios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burrioni D, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G (1997a): T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol*, 158: 962-67
- D'Elcios MM, Romagnani P, Scaletti C, Annunziato F, Manghetti M, Mavilia C, Parronchi P, Pupilli C, Pizzolo G, Maggi E, Del Prete G, Romagnani S (1997b): In vivo CD30 expression in human diseases with predominant activation of Th2-like T cells. *J Leukocyte Biol*, 61: 539-544
- Darville T, Andrews CW Jr, Laffoon KK, Shymasani W, Kishen L, Rank RG (1997): Mouse strain-dependent variation in the course and outcome of chlamydial genital tract infection is associated with differences in host response. *Infect Immun*, 65: 3065-73
- De Magistris MT, Romano M, Nuti S, Rappuoli R, Tagliabue A (1988): Dissecting human T-cell responses against *Bordetella* species, *J Exp Med*, 168: 1351-62
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S (1993): Human IL10 is produced by both type 1 helper (T<sub>H</sub>1) and type 2 helper (T<sub>H</sub>2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*, 150: 353-360
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Daniel CK, D'Elcios MM, Zancuoghi G, Vinante F, Pizzolo G, Romagnani S (1995): Preferential expression of CD30 by human CD4<sup>+</sup> cells producing T<sub>H</sub>2-type cytokines. *FASEB J*, 9: 81-86
- Di Tommaso A, Xiang Z, Bugnoli M, Pileri P, Figura N, Bayeli PF, Rappuoli R, Abrignani S, De Magistris MT (1995): *Helicobacter pylori*-Specific CD4<sup>+</sup> T-Cell Clones from Peripheral Blood and Gastric Biopsies. *Infect Immun*, 63: 1102-06
- Diekmann S (1996): Untersuchungen zur systematischen T-Lymphozyten-Immunantwort bei humanen *Helicobacter pylori*-Infektionen. Diplomarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover
- Ding L, Shevach EM (1992): IL 10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol*, 148: 3133-39
- Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM (1993): IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol*, 151: 1224-34
- Doherty TM (1995): T-cell regulation of macrophage function. *Curr Opin Immunol*, 7: 400-4

- Doi S, Gemou-Engesaeth V, Kay AB, Corrigan CJ (1994): Polymerase chain reaction quantification of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute exacerbations of asthma: effect of glucocorticoid therapy. *Clin Exp Allergy*, 24: 854-67
- Doig P, Exner MM, Hancock REW, Trust TJ (1995): Isolation and Characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 177: 5447-52
- Douglas RS, Woo EY, Capocasale RJ, Tarshis AD, Nowell PC, Moore JS (1997): Altered response to and production of TGF $\beta$  by B-cells from autoimmune NZB mice. *Cell Immunol*, 179: 126-37
- Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM (1990): Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 322: 359-63
- Dunn BE, Campbell G, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1990): Purification and characterisation of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 265: 9464-69
- Dunn BE (1993): Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*, 22: 43-57
- Dytoc M, Gold B, Louie M, Huesca M, Fedorko L, Crowe S, Lingwood C, Brunton J, Sherman P (1993): Comparison of *Helicobacter pylori* and Attaching-Effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infect Immun*, 61: 448-56
- Eaton KA, Brooks CL, Morgan CR, Krakowka S (1991): Essential role of Urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, 59: 2470-75
- Eaton KA, Morgan CR, Krakowka S (1992): Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 37: 123-27
- Eaton KA, Catrenich CE, Makin KM, Krakowka S (1995): Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis*, 171: 459-62
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J (1993): Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun*, 61: 4569-74
- Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, Crabtree GR (1989): Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science*, 246: 1617-20
- Engelking O (1995): Nachweis von *Helicobacter pylori* induzierten Immunmediatoren (*in vitro und in situ*). Diplomarbeit, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

- Engstrand L, Scheynius A, Pahlson C, Grimelius L, Schwan A, Gustavsson S (1989): Association of *Campylobacter pylori* with induced expression of class II transplantation antigens on gastric epithelial cells. *Infect Immun*, 57: 827-32
- Engstrand L, Scheynius A, Pahlson C (1991): An increased number of  $\gamma\delta$  T-cells and gastric epithelium cell expression of the groEL stress protein homologue in *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis of the antrum. *Am J Gastroenterol*, 86: 976-80
- Ernst PB, Jin Y, Reyes VE, Crowe SE (1994): The role of the local immune response in the pathogenesis of peptic ulcer formation. *Scand J Gastroenterol*, 29 Suppl 205: 22-8
- Evans DG, Evans DJ, Moulds JJ, Graham DY (1988): *N*-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: A putative colonization factor. *Infect Immunol*, 56: 2896-2906
- Evans DJ, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN, Kvietys PR (1995): Characterization of a *Helicobacter pylori* Neutrophil-Activating Protein. *Infect Immunol*, 63: 2213-20
- Exner MM, Doig P, Trust TJ, Nancock REW (1995): Isolation and Characterization of a family of Proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immunol*, 63: 1567-72
- Fan XJ, Chua A, Shahi CN, O'Farrelly C, Keeling PWN, Kelleher D (1993): Antigen-specific gastric lymphocyte responses to patients with gastric *Helicobacter pylori* infection and IFN $\gamma$  production. *Gastroenterology*, 104: A698
- Fan XJ, Chua A, Shahi CN, McDevitt J, Keeling PWN, Kelleger D (1994): Gastric T-lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H. pylori* colonisation. *Gut*, 35: 1379-84
- Fan XG, Chua A, Fan XJ, Keeling PWN (1995): Increased gastric production of interleukin 8 and tumour necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol*, 48: 133-36
- Fan XG, Yakoob J, Fan XJ, Keeling PWN (1996): Enhanced T-helper 2 lymphocyte responses: immune mechanism of *Helicobacter pylori* infection. *Irish J Med Sci*, 165: 37-9
- Fargeas C, Wu CY, Nakajima T, Cox D, Nutman T, Delespesse G (1992): Differential effect of transforming growth factor  $\beta$  on the synthesis of T<sub>H</sub>1- and T<sub>H</sub>2-like lymphokines by human T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 22: 2173-76
- Fauchere JL, Blaser MJ (1990): Adherence of *Helicobacter pylori* cells and their surface components to HeLa membranes. *Microb Pathog*, 9: 427-39

- Figdor C.G., Leemans J.M.M., Bont W.S., de Vries J.E. (1983): Theory and practice of centrifugal elutriation (CE). Factors influencing the separation of human blood cells. *Cell Biophys* 5: 105-18
- Finzi G, Cornaggia M, Capella C, Fiocca R, Bosi F, Solcia E, Samloff IM (1993): Cathepsin E in follicle associated epithelium of intestine and tonsils: localization to M cells and possible role in antigen processing. *Histochemistry*, 99: 201-11
- Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Chiaravalli AM, Capella C, Solcia E (1994): Epithelial cytotoxicity, immune responses, and inflammatory components of *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand J Gastroenterol*, 29 Suppl 205: 11-21
- Fiocchi C, Battisto JR, Farmer RG (1979): Gut mucosal lymphocytes in inflammatory bowel disease. Isolation and preliminary functional characterization. *Dig Dis Sci*, 24: 705-17
- Fitzgerald TJ (1992): The T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-like switch in syphilitic infection: is it detrimental? *Infect Immun*, 60: 3475-9
- Flesch IE, Hess JH, Huang S, Aguet M, Rothe J, Bluethmann H, Kaufmann SHE (1995): Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J Exp Med*, 181: 1615-21
- Fox CH, Koenig S, Fauci AS (1988): *In Situ* Hybridization. A Protocol. Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and infectious Diseases, National Institutes of Health. USA
- Fuhlbrigge RC, Chaplin DD, Kiely JM, Unanue ER (1987): Regulation of interleukin 1 gene expression by adherence and lipopolysaccharide. *J Immunol*, 138: 3799-3802
- Genta, RM (1997): The Immunobiology of *Helicobacter pylori* Gastritis. *Sem Gastrointestinal Dis*, 8: 2-11
- Germain RN (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide-presentation: providing ligands for T-Lymphocyte activation. *Cell*, 76: 287-99
- Gionchetti P, Vaira D, Campieri M, Holton J, Menegatti M, Belluzzi A, Bertinelli E, Ferretti M, Brignola C, Miglioli M, Barbara L (1994): Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in *Helicobacter pylori* positive dyspeptic patients. *Am J Gastroenterol*, 89: 883-87
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES (1989): Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*, 39: 397-405

- Goodwin CS, Path FRC, Worsley BW (1993): Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am, 22: 5-42
- Goodwin S (1995): Helicobacters shed new light on chaperonins. Lancet, 346: 653-55
- Gordan KC (1982): Tissue processing. In: Theory and practice of histological techniques. Bancroft JD, Stevens A (Hrsg.) Longman Group, New York: 41-60
- Graham RC, Karnowsky MJ (1966): The early stages of absorption of infected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem, 14: 291-302
- Hahn H, Kaufmann SHE (1981): The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. Rev Infect Dis, 3: 1221-50
- Haskill S, Johnson C, Eiermann D, Becker S and Warren K (1988): Adherence includes selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. J Immunol, 140: 1690-94
- Hazel SL, Evans DJ, Graham DY (1991): *Helicobacter pylori* catalase, J Gen Microbiol, 137: 57-61
- Heinzel FP (1995): T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells in the cure and pathogenesis of infectious diseases. Curr Opin Infect Dis, 8: 151-55
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HM (1974): Analysis of endonuclease *Eco* RI fragments of DNA from lamboid bacteriophages and other viruses by agarosegel electrophoresis. J Virol, 14: 1235-44
- Hills BA (1993): Gastric mucosal barrier: evidence for *Helicobacter pylori* ingesting gastric surfactant and deriving protection from it. Gut, 34: 588-93  
Histochem J, 4: 267-303
- Houben GMP, Stockbrügger RW (1995): Bacteria in the Aetio-pathogenesis of gastric cancer: A review. Scand J Gastroenterol, 30 Suppl 212, 13-18
- Howe RC, Wondimu A, Demissew A, Frommel D (1995): Functional heterogeneity among CD4+ T-cell clones from blood and skin lesions of leprosy patients. Identification of T-cell clones distinct from T<sub>H</sub>0, T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2. Immunology, 84: 585-94
- Huang J, O'Toole PW, Doig P, Trust TJ (1995): Stimulation of Interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. Infect Immun, 63: 1732-38

- Huang WM, Gibson SJ, Facer P, Gu J, Polak JM (1983): Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-Lysine as a slide coating. *Histochem*, 77: 275-79
- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ (1991): Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*, 254: 99-102
- Ikejima T, Okusawa S, Ghezzi P, van der Meer JWM, Dinarello CA (1990): Interleukin 1 induces Tumor Necrosis Faktor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells in vitro and a circulating TNF-like activity in rabbits. *J Infect Dis*, 162: 215-23
- Isaacson PG (1995): Primary gastric lymphoma. *Br J Biomed Sci*, 52: 291-96
- Jablonowski H, Hengels KJ, Kraemer N, Geis G, Opferkuch W, Strohmeyer G (1994): Effects of *Helicobacter pylori* on histamine and carbachol stimulated acid secretion by human parietal cells. *Gut*, 35: 755-57
- James SP, Zeitz M (1994): Human gastrointestinal mucosal T cells. In Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J (Hrsg): *Handbook of mucosal immunology*, Academic Press, USA: 275-86
- Janas B, Czkwianianc E, Bak-Romaniszyn L, Bartel H, Tosik D, Planeta-Malecka I (1995): Electron microscopic study of association between coccoid forms of *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells. *Am J Gastroenterol*, 90: 1829-33
- Jelinek DF, Braaten JK (1995): Role of IL12 in human B Lymphocyte Proliferation and differentiation. *J Immunol*, 154: 1606-13
- Jones AC, Foyne S, Cockayne A, Penn CW (1996): Gene cloning of a flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* shows its identity with the putative adhesin HpaA. *Gut*, 39, Suppl 2: A62
- Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA (1973): A rapid method for the isolation of functional, thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol*, 3 (10): 645-49
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993): Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 159: 197-207
- Kang K, Kubin M, Cooper KD, Lessin SR, Trinchieri G, Rook AH (1996): IL-12 Synthesis by Human Langerhans Cells. *J Immunol*, 156: 1402-1407
- Kang I, Barthold SW, Persing DH, Bockenstedt LK (1997): T-helper-cell cytokines in the early evolution of murine Lyme arthritis. *Infect Immun*, 65: 3107-11
- Karttunen R, Andersson G, Poikonen K, Kosunen TU, Karttunen T, Juutinen K, Niemelä S (1990): *Helicobacter pylori* induces lymphocyte activation in peripheral blood cultures. *Clin Exp Immunol*, 82: 485-488

- Karttunen R (1991): Blood lymphocyte proliferation, cytokine secretion and appearance of T cells with activation surface markers in cultures with *Helicobacter pylori*. Comparison of the responses of subjects with and without antibodies to *H. pylori*. Clin Exp Immunol, 83: 396-400
- Karttunen R, Karttunen T, Ekre HPT, MacDonald TT (1995): Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. Gut, 36: 341-45
- Karttunen RA, Karttunen TJ, Yousfi MM, El-Zimaity HMT, Graham DY, El-Zaatari FAK (1997): Expression of mRNA for Interferon-gamma, Interleukin 10, and Interleukin 12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol, 32: 22-27
- Kaufmann SH (1993a): Immunity to intracellular bacteria. Annu Rev Immunol, 11: 129-63
- Kaufmann SHE (1993b): Tuberculosis: the role of the immune response. The Immunologist, 1: 109-14
- Kaufmann SHE (1994): Die Familie der Mycobacteriaceae. In Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. Fischer, Stuttgart - New York 1994, 544-62
- Keane-Myers A, Nickell SP (1995): Role of IL-4 and IFN-gamma in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. J Immunol, 15, 155: 2020-8
- Kitsukawa K, Nakamoto A, Koito H, Matsuda Y, Saito A, Yamamoto H (1995): Interferon-gamma (IFN-gamma) production by human T lymphocytes upon *Legionella pneumophila* stimulation in vitro. Clin Exp Immunol, 99: 76-81
- Klein TW, Newton C, Zhu W, Daaka Y, Friedman H (1995): delta 9-Tetrahydrocannabinol, cytokines, and immunity to *Legionella pneumophila*. Proc Soc Exp Biol Med, 209: 205-12
- Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK (1993): In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Pathbiol, 61: 239-46
- Kolts BE, Joseph B, Achem SR, Bianchi T, Monteiro C (1993): *Helicobacter pylori* Detection: A Quality and Cost Analysis. Am J Gastroenterol, 88: 650-55
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR (1992): Transepithelial transport and mucosal defence II: secretion of IgA. Trends Cell Biol, 2: 170-74
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W (1993): Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell, 22: 263-274
- Labigne A, de Reuse H (1996): Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. Infect Agents Disease, 5:191-202

- Ladel C, Daugelat S, Kaufmann SHE (1995): Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur J Immunol*, 25: 377-84
- Lambert KN, Williamson VM (1993): cDNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. *Nucleic Acids Res.*, 21: 775-776
- Lane RC, Federmann D, Flora JL, Beck BL (1986): Computer-assisted determination of protein concentrations from dye-binding and bicinchoninic acid protein assays performed in microtiter plates. *J Immunol Methods*, 92: 261-270
- Lanzavecchia A (1985): Antigen-specific interaction between T and B Cells. *Nature*, 314: 537-39
- Larrick JW, Wright SC (1990): Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *FASEB J*, 4: 3215-3223
- Larsen CG, Anderson AO, Appellia F, Oppenheim IJ, Matsushima K (1989): The neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T-lymphocytes. *Science*, 243: 1464-66
- Larsen F, Solheim J, Kristensen T, Kolstø A-B, Prydz H (1993): A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1. *Hum Mol Genet*, 2: 1589-95
- Lee A, Fox J, Hazell S (1993): Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun*, 61: 1601-10
- Lee AM, Vadhan-Raj S, Hamilton RF, Jr., Scheule RK, Holian A (1993): The in vivo effects of rhIL-1 $\alpha$  therapy on human monocyte activity. *J Leukoc Biol*, 54: 314-21
- Lee N, Tsai HN, Fang KM (1990): Comparison of Four Different Methods for Detection of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Chinese J Microbiol Immunol* 23: 220-31
- Lee YH, Vacquie VD (1992): Reusable cDNA libraries coupled to magnetic beads. *Anal Biochem*, 206: 206-7
- Lehmann FS, Golodner EH, Wang J, Chen MCY, Avedian D, Calam J, Walsh JH, Dubinett S, Soll AH (1996): Mononuclear cells and cytokines stimulate gastrin release from canine antral cells in primary culture. *Am J Physiol*, 270: G783-G788
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry*, 16: 4743-51



- Letterio JJ, Roberts AB (1997): Molecule of the month. TGF $\beta$ : a critical modulator of immune cell function. Clin Immunol Immunopathol, 84: 244-50
- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR (1988): Cytotoxic activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori*. J Med Microbiol, 26: 93-99
- Levine MM, Nataro JP (1994): Intestinal infections. In Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J (Hrsg): Handbook of mucosal immunology, Academic Press, USA: 505-12
- Limb GA, Earley O, Jones SE, LeRoy F, Chignell AH, Dumonde DC (1994): Expression of mRNA coding for TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL6 by cells infiltrating retinal membranes. Arch Clin Exp Ophthalmol, 232: 646-51
- Lingwood CA, Law H, Pellizzari A, Sherman P, Drumm B (1989): Gastric glycerolipid as a receptor for *Campylobacter pylori*. Lancet, 2: 238-41
- Lingwood CA, Woods DE, Krivan HC (1991): *Helicobacter pylori*: Its lipid receptors and adhesin. Microbial Ecology in Health and Disease, 4: 123
- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A (1995): Dendritic cells produce IL12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. J Immunol, 154: 5071-79
- Madara JL, Stafford J (1989): Interferon- $\gamma$  directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. J Clin Invest, 83: 724-7
- Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Ruggiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S (1992): Reciprocal regulatory effects of IFN $\gamma$  and IL4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. J Immunol, 148: 2142-47
- Mai UEH, Shahamat M, Colwell RR (1991a): Survival of *Helicobacter pylori* in the aquatic environment. In: Menge H, Gregor M, Tytgat GNJT, Marshall BJ, McNulty CAM (Hrsg): *Helicobacter pylori* 1990. Springer Berlin, 91-4
- Mai UEH, Perez-Perez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD (1991b): Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes / macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. J Clin Invest, 87: 894-900
- Mai UEH, Perez-Perez GI, Allen JB, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD (1992): Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. J Exp Med, 175: 517-25

- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S (1993): Natural Killer Cell Stimulatory Factor (Interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (T<sub>H</sub>1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*, 177: 1199-1204
- Manetti R, Gerosa F, Giudizi MG, Biagiotti R, Parronchi P, Piccinni MP, Sampognaro S, Maggi E, Romagnani S, Trinchieri G (1994a): Interleukin 12 induces stable priming for Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN- $\gamma$  production in established Th2 cell clones. *J Exp Med*, 179: 1273-83
- Manetti R, Annunziato F, Biagiotti R, Giudizi MG, Piccinni MP, Giannarini R, Sampognaro S, Parronchi P, Vinante F, Pizzolo G, Maggi E, Romagnani S (1994b): CD30 expression by CD8<sup>+</sup> T cells producing type 2 helper cytokines. Evidence for large numbers of CD8<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup> T cell clones in human immunodeficiency virus infection. *J Exp Med*, 180: 2407-2411
- Maples JA (1985): A Method for the Covalent Attachment of Cells to Glass Slides for Use in Immunohistochemical assays. *Am J Clin Pathol* 83: 356-63
- Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, Axon ATR, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P (1993): PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* 1: 447
- Marshall BJ, Warren JR (1983): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-15
- Marshall BJ (1995): *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: Have Koch's postulates been fulfilled? *Ann Med*, 27: 565-68
- Mason R.R., Weiner R.S. (1985): Application of the Beckmann JE6-B Elutriator System<sup>®</sup> in the isolation of human monocyte subpopulations. *Scand J Haematol*, 34: 5-8
- Mattsby-Baltzer I, Mielniczuk Z, Larsson L, Lindgren K, Goodwin S (1992): Lipid A in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 60: 4383-87
- Mayer L, Shlien R (1987): Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med*, 166: 1471-83
- Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L (1991): Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease [see comments] *Gastroenterology*, 100: 3-12
- Mazia D, Schatten G, Sale W (1975): Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J Cell Biol*, 66: 189-200
- McCabe JT, Bolender RP (1993): Estimation of Tissue mRNAs by In Situ Hybridization. *J Histochem Cytochem*, 41: 1777-83

- McCartney-Francis N, Wahl SM (1994): Transforming growth factor  $\beta$ : a matter of life and death. *J Leukocyte Biol*, 55: 401-9
- McNulty, C.A.M (1989): Detection of *Campylobacter pylori* by the biopsy urease test. In: Rathbone, B.J., Heatley, R.V. (Hrsg.): *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Oxford: Blackwell Scientific Publications: 69-73
- Mevarech M, Noyes BE, Agarwal KL (1979): Detection of gastrin-specific mRNA using Oligodeoxynucleotide probes of defined sequence. *J Biol Chem*, 254: 7472-75
- Ming WJI, Bersani L, Mantovani A (1987): Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphnuclear leukocytes. *J Immunol*, 138: 1469-74
- Mingari MC, Maggi E, Cambiaggi A, Annunziato F, Schiavetti F, Manetti R, Moretta L, Romagnani R (1996): Development *in vitro* of human CD4<sup>+</sup> thymocytes into functionally mature Th2 cells. Exogenous interleukin-12 is required for priming thymocytes to produce both Th1 cytokines and interleukin-10. *Eur J Immunol*, 26: 1083-87
- Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, Singh S, Colston MJ, Nath I (1995): Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology*, 86: 97-103
- Mobley HL (1996): Defining *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. *Am J Med*, 100: 2S-11S
- Modlin RL (1994): Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*, 102: 828-32
- Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J (1996): *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant T<sub>H</sub>1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol*, 156: 4729-38
- Moller DR, Wysocka M, Greenlee BM, Ma X, Wahl L, Trinchieri G, Karp CL (1997): Inhibition of human interleukin 12 production by pentoxifylline. *Immunol*, 91: 197-203
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Pende D, Vitale M, Poggi A, Mingari MC, Moretta L (1997): Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev*, 155: 105-17
- Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R (1976): Selective in vitro growth of T-Lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007-8

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136: 2248-57
- Mosmann TR, Coffman RL (1989a): Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*, 46: 111-47
- Mosmann TR, Coffman RL (1989b): T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells: Different patterns of Lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol*, 7: 145-73
- Moss SF, Legon S, Davies J, Calam J (1994): Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. *Gut*, 35: 1567-70
- Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH (1989): Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T-cell antigen receptor occupancy. *Ann Rev Immunol*, 7: 445-80
- Munk ME, Emoto M (1995): Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur Respir J Suppl*, 20: 668s-75s
- Muotiala A, Helander IM, Pyhala L, Kosunen TU, Moran AP (1992): Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 60: 1714-16
- Nørgaard A, Andersen LP, Nielsen H (1995): Neutrophil degranulation by *Helicobacter pylori* proteins. *Gut*, 36: 354-57
- Nakamura RM (1990): Overview and Principles of *In-Situ* Hybridization. *Clin Biochem*, 23: 255-59
- Negrini R, Lisato L, Zanella I, Cavazzini L, Gullini S, Villanacci V, Poiesi C, Albertini A, Ghielmi S (1991): *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology*, 101: 437-45
- Nguyen AMH, El-Zaatari FAK, DY Graham (1995): *Helicobacter pylori* in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 76: 705-9
- Niemelä S, Karttunen T, Kerola T, Karttunen R (1995): Ten year follow up study of lymphocytic gastritis: further evidence on *Helicobacter pylori* as a cause of lymphocytic gastritis and corpus gastritis. *J Clin Pathol*, 48: 1111-16
- O'Rourke J, Solnick J, Lee A, Tompkins C (1992): *Helicobacter heilmannii* (previously *Gastrospirillum*) a new species of *Helicobacter* in humans and animals. *Ir J Med Sci*, 161, Suppl. 10: 31
- Oellerich M (1984): Enzyme-Immunoassay: A review. *J Clin Chem Clin Biochem*, 22: 895-904

- Otsuka Y, Nagano K, Nagano K, Hori K, Oh-Ishi J, Hayashi H, Watanabe N, Niitsu Y (1990): Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. Ex vivo and in vivo studies in comparison with in vitro effect. *J Immunol*, 145: 2639-43
- Paliard X, De Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chrétien I, Abrams J, De Vries J, Spits H (1988): Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN- $\gamma$  by activated human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell clones. *J Immunol*, 141: 849-55
- Papadimitriou CS, Ioachim-Velogianni EE, Tsianos EB, Moutsopoulos (1988): Epithelial HLA-DR expression and lymphocyte subsets in gastric mucosa in type B chronic gastritis. *Virchows Arch (Pathol Anat)*, 413: 197-204
- Patton JS, Rice GC, Ranges GE, Palladino MA (1989): Biology of the tumor necrosis factors. *Cytokines*, 1: 89-104
- Paull G, Yardley J (1989): Pathology of *Campylobacter pylori* associated gastric and esophageal lesions. In: *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. Blaser MJ (Hrsg.), Igaku Shoin Medical Publishers, New York: 73-97
- Pearce EJ, Reiner SL (1995): Induction of T<sub>H</sub>2 responses in infectious diseases. *Curr Opin Immunol*, 7: 497-504
- Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ (1995): Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*<sup>+</sup> *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*, 71: 760-70
- Perry LL, Feilzer K, Caldwell HD (1997): Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Immunol*, 158: 3344-52.
- Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggolini M (1988): A neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 167: 1547-59
- Pluschke G, Taube H, Krawinkel U, Pfeffer K, Wagner H, Meinhard C, Deusch K (1994): Oligoclonality and Skewed T Cell Receptor V $\beta$  Gene Segment Expression in *in vivo* Activated Human Intestinal Intraepithelial T-Lymphocytes. *Immunobiol*, 192: 77-93
- Price AB (1991): The Sydney system: Histological division. *J Gastroenterol Hepatol*, 6: 209-222
- Prussin C, Metcalfe DD (1995): Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods*, 188: 117-28
- Reiner SL, Seder RA (1995): T helper cell differentiation in immune response. *Curr Opin Immunol*, 7: 360-66

- Rickinson AB, Moss DJ, Pope JH (1979): Long-term T cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. II. Components necessary for regression in virus-infected leukocyte cultures. *Int J Cancer*, 23: 610-17
- Röcken M, Saurat J-H, Hauser C (1992): A common precursor for CD4<sup>+</sup> T cells producing IL2 or IL4. *J Immunol*, 148: 1031-36
- Röcken M, Shevach EM (1996): Immune deviation - the third dimension of nondeletional T cell tolerance. *Immunol Rev*, 149: 175-94
- Romagnani S (1992): Induction of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 response: a key role for the „natural“ immune response? *Immunol Today*, 13: 379-81
- Romagnani S (1994): Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*, 12: 227-57
- Ross J (1995): mRNA Stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*, 59: 423-50
- Sacco RE, Jensen RJ, Thoen CO, Sandor M, Weinstock J, Lynch RG, Dailey MO (1996): Cytokine secretion and adhesion molecule expression by granuloma T lymphocytes in *Mycobacterium avium* infection. *Am J Pathol*, 148: 1935-48
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi RG, Horn GT, Mulli KB, Ehrlich HA (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487-91
- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convitt J, Modlin RL, Bloom BR (1991): Differing lymphokine profiles and functional subsets of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell clones. *Science*, 254: 279-81
- Salomon H (1896): Über das Spirillum des Säugertiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, 19: 433-42
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y
- Sander BJ, Andersson J, Andersson U (1991): Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev*, 119: 65-93
- Schlossmann SL, Boumsell W, Gilks (1995): *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Oxford University Press, New York
- Schmitt H, Haas R (1993): Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene. *Acta Gastroenterol Belg (Suppl)*, 105

- Schmitt H, Haas R (1994): Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported proteins. *Molec Microbiol*, 12: 307-19
- Sell S, Hsu PL (1993): Delayed hypersensitivity, immune deviation, antigen processing and T-cell subset selection in syphilis pathogenesis and vaccine design. *Immunol Today*, 14: 576-82
- Shahamat M, Mai UEH, Paszko-Kolva C, Yamamoto H, Colwell RR (1991): Evaluation of liquid Media for growth of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 29: 2835-7
- Shahamat M, Paszko-Kolva C, Mai UEH, Yamamoto H, Colwell R R (1992): Selected cryopreservatives for long term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. *J Clin Pathol*, 45: 735-36
- Shahamat M, Mai UEH, Paszko-Kolva C, Kessel M, Colwell RR (1993): Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol*, 59: 1231-35
- Shalaby M, Aggrawal B, Rinderknecht E (1985): Activation of human polymorphnuclear neutrophil function by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor. *J Immunol*, 135: 2069-73
- Sharma SA, Miller GG, Perez-Perez GI, Gupta RS, Blaser MJ (1994): Humoral and cellular immune recognition of *Helicobacter pylori* proteins are not concordant. *Clin Exp Immunol*, 97: 126-32
- Sidebotham RI, Batten JJ, Karim QN, Spencer J, Baron JH (1991): Breakdown of gastric mucus in presence of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, 44: 52-57
- Sieling PA, Modlin RL (1994): Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*, 191: 378-87
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD; Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150: 76-85
- Smoot DT, Resau JH, Naab T, Desbordes C, Gilliam T, Bull-Henry K, Curry SB, Nidiry J, Sewchand J, Mills-Robertson K, Frontin K, Abebe E, Dillon M, Chippendale GR, Phelps PC, Scott VF, Mobley HLT (1993): Adherence of *Helicobacter pylori* to cultured human gastric epithelial cells. *Infect Immun*, 61: 350-55
- Spiegelhalter C, Gerstenecker B, Kersten A, Schlitz E, Kist M (1993): Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun*, 61: 5315-25
- Spurkland A (1992): Magnetic isolation of mRNA for in vitro amplification. *Trends Genet*, 8: 225-26

- Stahl WL, Baskin DG (1993): Workshop on In Situ Hybridization: What You Need to Know to Get It to Work. *J Histochem Cytochem*, 41: 1721-23
- Stark RM, Greenman J, Millar MR (1995): Physiology and biochemistry of *Helicobacter pylori*. *Br J Biomed Sci*, 52: 282-290
- Stevens A (1982): The haematoxylin. In: Theory and practice of histological techniques. Bancroft JD, Stevens A (Hrsg.), Longman Group, New York, 109-21
- Stoler MH (1990): In Situ Hybridization. *Clin Med Lab*, 10: 215-36
- Stout RD, Bottomly K (1989): Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN $\gamma$  producing (T<sub>H</sub>1) T cell clones: failure of IL4 producing (T<sub>H</sub>2) T cell Clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol*, 142: 760-65
- Streefkerk JG (1972): Inhibition of erythrocytes pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol fixation. *J Histochem Cytochem*, 20: 829-31
- Street N, Schumacher JH, Fong AT, Bass H, Fiorentino DF, Leverah JA, Mosmann TR (1990): Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells. *J Immunol*, 144: 1629-39
- Tarkkanen J, Kosunen TU, Saksela E (1993): Contact of Lymphocytes with *Helicobacter pylori* Augments Natural Killer Cell Activity and Induces Production of Gamma Interferon. *Infect Immun*, 61: 3012-3016
- Tartakoff AM (1983): Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*, 32: 1026-28
- Thomas J, Gibson G, Darboe M, Dale A, Weaver L (1992): Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1: 1194-95
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weldman JM, Fujili C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388: 539-47
- Tosato G, Pike SE, Koski I, Blaese RM (1982): Selective inhibition of immunoregulatory cell functions by cyclosporin A. *J Immunol*, 128: 1986-91
- Trinchieri G, Perussia B (1985): Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today*, 6: 131-6



- Trinchieri G (1993): Interleukin 12 and its role in the generation of T<sub>H</sub>1 cells. *Immunol Today*, 14: 335-337
- Vincent P (1995): Transmission and acquisition of *Helicobacter pylori* infection: evidences and hypothesis. *Biomed Pharmacother*, 49: 11-18
- Wagner RD, Czuprynski CJ (1993): Cytokine mRNA expression in livers of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *J Leukoc Biol* 53: 525-31
- Wagner S, Beil W, Mai UEH, Bokemeyer C, Meyer HJ, Manns MP (1994): Interaction between *Helicobacter pylori* and Human Gastric Epithelial Cells in Culture: Effect of Antiulcer Drugs. *Pharmacology*, 49: 226-37
- Wahl LM, Katona IM, Wilder RL, Winter CC, Haraoui B, Scher I and Decker JL (1984): Isolation of human mononuclear cell subsets by counterflow centrifugal elutriation (CCE) I. Characterization of B-Lymphocyte-, T-Lymphocyte- and monocyte-enriched fractions by flow cytometric analysis. *Cell Immunol*, 85 (2): 373-83
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB (1987): Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Induces Monocyte Chemotaxis and Growth Factor Production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5788-92
- Wahl SM, Hunt DA, Bansal G, McCartney-Francis N, Ellingsworth L, Allen J (1988): Bacterial Cell Wall-Induced Immunosuppression. *J Exp Med*, 168: 1403-17
- Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE (1989): Inflammatory and Immunomodulatory role of TGF $\beta$ . *Immunol Today* 10: 258-61
- Wahl SM, Allen JB, McCartney-Francis N, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Ellingsworth L, Mai UEH, Mergenhagen SE, Orenstein JM (1991): Macrophage- and Astrocyte-derived Transforming Growth Factor  $\beta$  as a Mediator of Central Nervous System Dysfunction in Acquired Immune Deficiency Syndrome. *J Exp Med*, 173: 981-91
- Wahl SM (1992): Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol*, 12: 1-14
- Warford A, Lauder I (1991): In situ hybridization in perspective. *J Clin Pathol*, 44: 177-81
- Webb PM, Knight T, Greaves S, Wilson A, Newell DG, Elder J, Forman D (1994): Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. *Br Med J*, 308: 750-53

- Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trentham DE, Hafler DA (1994): Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol*, 12: 809-37
- Whitaker CJ, Dubiel AJ, Galpin OP (1993): Social und geographical risk factors in *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Infect*, 111: 63-70
- Willems J, Joniau S, Cinque S, Van Damme J (1989): Human granulocyte chemotactic peptide (IL8) as a specific neutrophil degranulator: comparison with other monokines. *Immunology*, 67: 540-42
- Williams D, Grubbs BG, Pack E, Kelly K, Rank RG (1997): Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*, 65: 2876-82
- Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG (1991): *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*, 338: 1175-76
- Wyatt JI, Rathbone BJ (1988): Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Gastroenterol Suppl* 142: 44-49
- Wyatt JI (1995): Histopathology of gastroduodenal inflammation: the impact of *Helicobacter pylori*. *Histopathology*, 26: 1-15
- Wyss-Coray T, Borrow P, Brooker MJ, Mucke L (1997): Astroglial overproduction of TGF $\beta$ 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol*, 77: 45-50
- Xiang Z, Censini S, Bayeli BF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, 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. *Infect Immun*, 63: 94-98
- Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J (1995): Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*, 30: 1153-59
- Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida M, Murakami S, Mai M, Matsushima K (1992): Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cell line through acting concurrently on AP-1 and NP-kappa B-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem*, 267: 22506-11
- Yin Z, Braun J, Neure L, Wu P, Liu L, Eggens U, Sieper J (1997a): Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis. *Arthritis Rheum*, 40: 1788-97

- Yin Z, Braun J, Neure, Wu P, Eggens U, Krause A, Kamradt T, Sieper J (1997b): T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines. *Arthritis Rheum*, 40: 69-79
- Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C (1993): Localization of Intestinal Interleukin 1 Activity and Protein and Gene Expression to Lamina Propria Cells. *Gastroenterology*, 104: 749-58
- Yssel H, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, de Vries JE (1992): IL-10 is produced by subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol*, 149: 2378-84
- Yssel H, Fasler S, De Vries JE, de Waal Malefyt R (1994): IL12 transiently induces IFN-gamma transcription and protein synthesis in human CD4<sup>+</sup> allergen-specific T<sub>H</sub>2 T cell clones. *Int Immunol*, 6: 1091-96

## 8. Abkürzungen

$\alpha$	anti-
Ag	Antigen
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APC	Antigenpräsentierende Zellen
asa	American Standards Associaton
ATCC	“American Type Culture Collection“
ATP	Adenosinriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Centi-
ca.	Circa
CD	Differenzierungscluster
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
dATP	Desoxyadenosinriphosphat
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
dCTP	Desoxycytidinriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destiliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidinriphosphat
d.h.	Das heißt
dH <sub>2</sub> O	Destiliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
dT	Desoxythymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidinriphosphat
DU	Ulcus duodeni
E	Entzündung
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIA	Enzymgekoppelter Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay
F	Fraktion
Fa.	Firma
FACS	“Fluorescent Activated Cell Sorter“
FCS	Fötales Kälberserum

FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Angle Light Scatter
g	Erdbeschleunigung
g (Gewicht)	Gramm
GC	Gastritis C
GTC	Guanidinthiocyanat
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
h	Stunde
HBSS	Hanks balanced saline solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HLA	Humane Leukozyten Antigene
Hrsg.	Herausgeber
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KATO III	Magenepithelzelllinie
kB	Kilobasenpaare
l	Liter
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LB	“Luria Broth“
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli-
$\mu$	Mikro-
M	Mol
MALT	mucosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
M $\emptyset$	Makrophagen
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
mAb	Monoklonaler Antikörper
MBQ	molekularbiologische Qualität
MG	Molekulargewicht
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MN	Monozyten
MOPS	$\gamma$ -Morpholinopropansulfonsäure
MPC	Magnethalter
mRNA	Boten-RNA
n	nano-
n.	nach
(n)	Anzahl
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
OL	Oben links
Op.	Operation
OR	Oben rechts
p	Signifikanzparameter
p (Größe)	Pico-
p.A.	Pro Analyse
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen

PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PHA	Phytohämagglutinin
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
poly(A) <sup>+</sup>	Polyadenin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q	Quadrant
rh	Rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	Siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtslichtstreuung
s.o.	Siehe oben
<i>T. pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Geeignet für Gewebekulturen
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGFβ	Transforming-Growth-Factor β
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zellen
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Triton X-100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl)-phenyldecaethylenglycolether
tRNA	Transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
U	Unit (definierte Einheit der Enzymaktivität)
UL	Unten links
UR	Unten rechts
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
v/w	Volumen / Gewicht
W	Watt
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
z.B.	Zum Beispiel
#	Nummer

## 9. Verzeichnis der Tabellen und Bilder

Tab. 1: Spezies im Genus <i>Helicobacter</i> und ihre Wirte	3
Tab. 2: Übersicht über die Charakteristik des verwendeten Gewebes und die Zahl der daraus isolierten mononukleären Zellen	74
Tab. 3: Zusammensetzung der Populationen der mononukleären Zellen aus der Magenmukosa <i>H. pylori</i> -negativer und <i>H. pylori</i> -positiver Patienten	75
Tab. 4: Titration der Antikörperkonzentration und prozentualer Anteil der angefärbten Population	77
Tab. 5: Menge der isolierten Lymphozyten	80
Tab. 6: Sezernierende CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (%) nach der FACS-Analyse von Bild 4, repräsentativ für die <i>H. pylori</i> -negative Personengruppe (n=4): Patient 2	82
Tab. 7: Sezernierende CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (%) nach der FACS-Analyse von Bild 4, repräsentativ für die <i>H. pylori</i> -positive Personengruppe	84
Tab. 8: Phänotypische Charakterisierung der <i>H. pylori</i> -spezifischen Klone (n=4): Patient 7	92
Tab. 9: Menge der isolierten Monozyten / Makrophagen	99
Tab. 10: Menge der isolierten Epithelzellen	104
Tab. 11: Expression von IL 12 durch Magenepithelzellen vor und nach Stimulation mit <i>Helicobacter pylori</i> -Antigenen	108
Tab. 12: Charakterisierung der verwendeten Biopsien	111
Tab. 13: Quantifizierung von mRNA und Peptid des Mediators IL8 nach Stimulation von Monozyten/Makrophagen mit <i>H. pylori</i> Oberflächenantigen	137
Tab. 14: Quantifizierung von mRNA und Peptid des Mediators IL8 nach Stimulation von Epithelzellen mit <i>H. pylori</i> -Oberflächenantigen	140

---

Bild 1: Die mit <i>H. pylori</i> -Infektion assoziierten Folgeerkrankungen.	12
Bild 2: Differenzierung und Funktion der T <sub>H</sub> 1 und T <sub>H</sub> 2 CD4 <sup>+</sup> Subpopulationen	15
Bild 3: Experiment zur Untersuchung der Spezifität der Antrikörperbindung	79
Bild 4: Synthese intrazellulärer Zytokine von CD4 <sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten aus der Lamina propria des gastrointestinalen Bereiches, repräsentativ für die <i>H. pylori</i> -negative Gruppe (n=4): Patient 2	81
Bild 5: Synthese intrazellulärer Zytokine von CD4 <sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten aus der Lamina propria des gastrointestinalen Bereiches, repräsentativ für die <i>H. pylori</i> -positive Gruppe (n=4): Patient 7	83
Bild 6: Anteil der Zytokin produzierenden CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation von Lymphozyten <i>H. pylori</i> -positiver und -negativer Patienten	85
Bild 7: Aktivierungsgrad der Zytokin produzierenden T-Lymphozyten	87
Bild 8: Aktivierungsgrad der CD4 positiven T-Lymphozyten vor und nach Stimulation mit <i>H. pylori</i> -Antigenen	89
Bild 9: Aktivierungsgrad der CD8 positiven T-Lymphozyten vor und nach Stimulation mit <i>H. pylori</i> -Antigenen	90
Bild 10: Profil der <i>H. pylori</i> -spezifischen CD4 positiven Klone	93
Bild 11: Profil der <i>H. pylori</i> -spezifischen CD8 positiven Klone	94
Bild 12: T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2 Profil eines <i>H. pylori</i> -positiven Patienten auf der Ebene der Transkription	96
Bild 13: T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2 Profil eines <i>H. pylori</i> -negativen Patienten auf der Ebene der Transkription	97
Bild 14: Prozentualer Anteil der IL12 bzw. IL10 produzierenden Monozyten/Makrophagen in der Gesamtpopulation <i>H. pylori</i> -positiver und <i>H. pylori</i> -negativer Patienten	100
Bild 15: Zytokin-Expression von Monozyten/Makrophagen vor und nach der Stimulation mit <i>H. pylori</i> -Oberflächenantigenen	102
Bild 16: Expression und Dichte von Histokompatibilitätsmolekülen der Klassen I und II auf Epithelien vor und nach Stimulation mit <i>Helicobacter pylori</i>	105
Bild 17: Expression von IL12 innerhalb einer Population von Epithelzellen	107
Bild 18: Expression der IL12p40 mRNA durch das intestinale Epithel	109
Bild 19: Aktivierung der Epithelzellen auf der Transkriptionsebene	110



---

Bild 20: Nachweis von IL12 in <i>H. pylori</i> -negativem Gewebe	112
Bild 21: Nachweis von IL12 in <i>H. pylori</i> -positivem Gewebe (Entzündungsgrade 1 bis 3)	114
Bild 22: Detektion von IL8-mRNA	117
Bild 23: Detektion von TNF $\alpha$ -mRNA	117
Bild 24: IL8 Transkription in <i>H. pylori</i> -negativem Gewebe	121
Bild 25: IL8 Transkription in der <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis	122
Bild 26: Durchschnittliche Transkription von IL8 mRNA der Monozyten/Makrophagen in der Lamina propria	124
Bild 27: Durchschnittliche Transkription von IL8 mRNA im Epithel	125
Bild 28: Aktivierungszustand der IL8 Transkription in den Monozyten/Makrophagen der Lamina propria	127
Bild 29: Aktivierungszustand der IL8 Transkription im Epithel	128
Bild 30: Elutriationsprofile	132
Bild 31: Charakterisierung der elutrierten Populationen	133
Bild 32A: Transkription des Mediators IL8 von Monozyten/Makrophagen <i>in vitro</i>	134
Bild 32B: Transkription des Mediators IL8 von Monozyten/Makrophagen <i>in vitro</i>	135
Bild 33: Nachweis des Genproduktes IL8 in Monozyten/Makrophagen	136
Bild 34A: Transkription des Mediators IL8 von Epithelzellen <i>in vitro</i>	138
Bild 34B: Transkription des Mediators IL8 von Epithelzellen <i>in vitro</i>	139
Bild 35: Nachweis des Genproduktes IL8 in Epithelzellen	140
Bild 36: TNF $\alpha$ Transkription in <i>H. pylori</i> -negativem Gewebe	143
Bild 37: TNF $\alpha$ Transkription in der <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis	144
Bild 38: Durchschnittliche Transkription von TNF $\alpha$ mRNA der Monozyten/Makrophagen in der Lamina propria	146
Bild 39: Durchschnittliche Transkription von IL8 mRNA der Epithelzellen	147
Bild 40: Intensität der TNF $\alpha$ Transkription in den Monozyten/Makrophagen	149

Bild 41: Intensität der TNF $\alpha$ Transkription im Epithel	150
Bild 42: TNF $\alpha$ Transkription von Monozyten / Makrophagen <i>in vitro</i>	152
Bild 43: TGF $\beta$ Synthese in <i>H. pylori</i> -negativem Gewebe	154
Bild 44: TGF $\beta$ Synthese in einer <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis	155
Bild 45: Einfluß von <i>Helicobacter pylori</i> auf die Differenzierung von T-Lymphozyten	163
Bild 46: Die Rolle von IL12 in der Generation von T <sub>H</sub> 1 Lymphozyten	166
Bild 47: Immunmodulation durch das Epithel	170
Bild 48: Dissoziierte Immunantwort in der <i>H. pylori</i> -Infektion	180
Bild 49: Immunreaktion in der <i>Helicobacter pylori</i> -Infektion	184

Herrn Prof. Dr. D. Bitter-Suermann danke ich für die freundliche Überlassung des überaus interessanten Themas dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. H. Diekmann möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Vielen Dank an Herrn Dr. U. Mai für die Betreuung dieser Arbeit, die mit zahlreichen Anregungen und ständiger Diskussionsbereitschaft verbunden war.

Herrn Priv. Doz. Dr. S. Wagner und Herrn Priv. Doz. Dr. H.-J. Rothkötter sowie ihren Arbeitsgruppenmitgliedern danke ich für ihre sehr freundliche Kooperations- und Hilfsbereitschaft.

Bei den Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe "Mai" möchte ich mich ganz herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Teamarbeit bedanken.

Schließlich sei allen Mitgliedern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie für ihre Hilfsbereitschaft gedankt.

Mein großer Dank geht an Christiane und Volker, die mich moralisch und mit viel Enthusiasmus bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Für seine Geduld, sein Engagement und seine Unterstützung bei der Gestaltung der Dissertation möchte ich mich ganz besonders bei meinem Bruder bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern, die sich immer sehr für diese Arbeit interessiert haben und mir in jeder Situation zur Seite standen, ganz herzlich danken.