

**Einfluss des aus *Helicobacter pylori* isolierten  
Hsp60 auf die Apoptose und den Zellzyklus von  
humanen AGS-Zellen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

**Dipl.-Biol. Jan Klukowski**

geb. am 09.03.1976  
in Hamburg

2006

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Einfluss des aus *Helicobacter pylori* isolierten Hsp60 auf die Apoptose und den Zellzyklus von AGS-Zellen“ eigenständig angefertigt habe und keine ausser den angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, den 15. Juni 2006

Jan Klukowski

Referent: Prof. Dr. Müller

Korreferent: Prof. Dr. Beil

Tag der Promotion: 28.09.2006

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Beil** und **PD Dr. Christoph Athmann** für die Ermöglichung dieser interessanten Doktorarbeit in der Abteilung Gastroenterologie/Hepatology herzlich bedanken. Ohne die zahlreichen anregenden Diskussionen mit Ihnen wäre die Doktorarbeit auf diese Weise kaum zustande gekommen.

Nicht zu vergessen sind natürlich die technischen Assistentinnen **Petra** und **Ute** aus dem Labor von Prof. Dr. Beil., sowie **Anke** und **Anja** aus dem Labor von Prof. Dr. Brunner und Dr. Christoph Athmann. Ohne Eure hervorragende Unterstützung sowie der guten Laboratmosphäre wäre ich wahrscheinlich immer noch nicht fertig.

Gleichfalls muss natürlich der vor kurzem promovierte **Mortimer** erwähnt werden. Die Pausen mit Dir waren immer klasse und sehr erholsam. Die unschätzbare Hilfe bei den beiden Umzügen soll aber hier ebenfalls erwähnt werden. Bei **allen anderen im Labor** will ich mich ebenfalls Bedanken für die Zeit und die mir zu teil geworden gelassene Unterstützung im Labor, wie natürlich auch privat beim Umzug.

Der letzte Dank gilt natürlich meiner über alles geliebten Freundin **Kaja** und meinen **Eltern**. Wofür ich Euch alles Danke sprengt hier doch den Rahmen, weswegen ich es kurz mit dem Satz zusammenfassen möchte: Ohne Euch wäre ich nicht das, was ich inzwischen bin !

## Zusammenfassung

Magengeschwüre hängen in der Regel mit einer Infektion des Bakteriums *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) zusammen. In seltenen Fällen verursacht eine Infektion mit *H. pylori* Magenkrebs oder das MALT-Lymphom. Der Kontakt mit dem Keim oder dessen bakteriellen Faktoren erhöht die Apoptoserate von Magenepithelzellen. Welche bakteriellen Faktoren die Magenepithelzellen zur Apoptose induzieren, wird zurzeit kontrovers diskutiert.

Aus *H. pylori* wurde ein Apoptose-induzierendes Protein mittels Affinitätschromatografie angereichert. Durch Ansequenzierung und Immunpräzipitation konnte dieses Protein als das Hitzeschockprotein Hsp60 identifiziert werden. Die Inkubation von der Magenzelllinie AGS mit dem *H. pylori*-Hsp60 erhöhte in einer konzentrationsabhängigen Weise die Apoptoserate um das 2 - 3 fache. Detektiert wurde die Apoptose mit verschiedenen Methoden, wie Histon-ELISA, Caspase-Aktivitätsmessung, Tunel und FACS. Wie die Caspase-Aktivitätsmessungen zeigten, erfolgte die Apoptose durch eine aktivierte Caspase-3, die nicht durch die Caspase-8 oder -9 aktivierte wurde. Gehemmt werden konnte die Apoptose durch die Koinkubation mit den spezifischen ATPase-Inhibitoren Ouabain oder Schering 28080. Folglich hängt die Apoptose-Induktion nicht mit der Konformation von dem Hsp60 zusammen, sondern basiert vermutlich auf der Funktion die Konformation von anderen Proteinen zu verändern. Eine Auswirkung von dem Hsp60 auf die AGS-Zellen war, dass es wie *H. pylori* die Expression von Fas induziert. Damit wurde mit dem *H. pylori*-Hsp60 ein bakterieller Faktor identifiziert, der für die *H. pylori*-induzierte Expression von Fas in den AGS-Zellen verantwortlich ist. Einen Einfluss auf die Expression von FasL, TRAIL und den TRAIL-Rezeptoren R1 - R4 hatte das *H. pylori*-Hsp60 hingegen nicht. Während der Inkubationsdauer mit dem Hsp60 nahm die Menge des zellregulatorischen p53 Proteins, trotz einer zwischenzeitlichen Hochregulierung, in den AGS-Zellen ab. Die Menge des am Serin 15 phosphorylierten p53 (pp53<sup>S15</sup>) stieg dagegen nach der kurzen Hochregulierung von p21 und p53 auf das Doppelte der Ausgangsmenge an. Das pp53<sup>S15</sup> dient der Zelle als Signal für einen DNA-Schaden.

Untersuchungen zum Einfluss des *H. pylori*-Hsp60 auf die Zellproliferation und den Zellzyklus zeigten, dass das Hsp60 die Zellproliferation der AGS-Zellen hemmt und diese mittels p21 zu einem G1-Arrest induziert. Die kurzzeitige Erhöhung von p21 fiel mit der gleichzeitigen Erhöhung von p53 zusammen. Demnach handelte es sich bei dem G1-Arrest um einen p53-abhängigen, und nicht um einen p53-unabhängigen, p21-induzierten G1-Arrest.

Welche humanen Proteine mit dem *H. pylori*-Hsp60 eine Interaktionen eingehen ist nicht bekannt. Von dem humanen Hsp60 ist bekannt, dass es an verschiedene Proteine, wie z. B. Procaspase-3, Bax, Bak, Bcl-xL, Proteinkinase-A, Ras, Src,  $\alpha3\beta1$ -Integrinrezeptor, assoziiert ist. In diesen Komplexen hat das Hsp60 verschiedene Funktionen: Es beschleunigt die Prozessierung der Procaspase-3 zur aktiven Caspase-3, verhindert durch Komplexbildung mit den proapoptischen Proteinen Bax und Bak die Apoptose-Induktion, kontrolliert die Aktivität der Src-Tyrosinkinase, wird von der Proteinkinase-A postranslational modifiziert, verhindert vermutlich durch postranslationale Modifikation die Polyubiquitinierung und somit die Degradierung des  $\beta1$ -Integrinrezeptors. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 72 % könnte durch das Vorkommen des bakteriellen Hsp60 in der Zelle eine Konkurrenz um die Bindung humaner Hsp60-Interaktionspartner auftreten. Solch eine Bindung dürfte mit einer anderen Bindungsaffinität als mit dem humanen Hsp60 erfolgen. Darin könnte der Grund liegen, wie das bakterielles Hsp60 die Zellen zur Apoptose induziert. Denn vermutlich induziert das *H. pylori*-Hsp60 die Zellen dadurch zur Apoptose, dass es mit mindestens einem dieser humanen Proteine eine Interaktion eingeht und dadurch dessen zelluläre Funktion in den pro- oder antiapoptischen Signaltransduktionsketten beschleunigt, hemmt oder sogar blockiert.

## Abstract

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infections are the main cause for peptic ulceration. In rare cases, *H. pylori* causes gastric cancer or MALT-lymphoma. Contact of *H. pylori* or single bacterial factors with gastric epithelia results in an increased epithelial apoptosis. Which of these bacterial factors induce the gastric epithelial cells to apoptosis is controversially debated at this time.

By affinity chromatography an apoptotic protein of *H. pylori* was concentrated. This protein was identified by sequencing and immune precipitation as heat shock protein Hsp60 (*H. pylori*-Hsp60). *H. pylori*-Hsp60 caused a time- and concentration-dependent increase in gastric epithelial AGS cell apoptosis by two- to threefold. Apoptosis was detected by using different methods, such as histone Elisa, measurement of caspase activity, Tunel or FACS. Caspase activity measurement detected an activated caspase-3, that had not been activated by caspase-8 or -9. Apoptosis could be inhibited by specific ATPase inhibitors ouabain or schering 28080. Therefore the ability of *H. pylori*-Hsp60 to induce apoptosis probably depends not on its conformation but rather on the function to change conformation of associated proteins. One effect of Hsp60 was to induce the expression of Fas in AGS cells such as *H. pylori*. Therefore with *H. pylori*-Hsp60 there was identified a bacterial factor which is responsible for the *H. pylori*-induced expression of Fas in AGS cells. However, *H. pylori*-Hsp60 had no influence on expression of FasL, TRAIL, and TRAIL receptor R1 - R4. During incubation with Hsp60 the amount of cell regulatory protein p53 decreased in AGS cells despite of an upregulation of this protein in the meantime. The amount of phosphorylated Serin 15 p53 (pp53<sup>S15</sup>) doubled after a short upregulation of p21 and p53. pp53<sup>S15</sup> serves as a signal molecule for DNA damage.

Analysis of the influence of *H. pylori*-Hsp60 on cell proliferation and cell cycle showed that Hsp60 inhibits cell proliferation of AGS cells and introduces a p21-induced G1 arrest. The short term increase in p21 correlated with a simultaneous increase in p53. Therefore, this is a p53 dependent, and not a p53 independent p21 induced G1 arrest.

Nothing is known about interactions between *H. pylori*-Hsp60 and human proteins. For human Hsp60 it is established that it is associated to several other human proteins, such as procaspase-3, Bax, Bak, Bcl-xL, protein kinase A, Ras, Src,  $\alpha$ 3b1 integrine receptor. In these complexes human Hsp60 has multiple function: It accelerates processing of procaspase-3 to activated caspase-3, prevents induction of apoptosis by complexing proapoptotic Bax and Bak, controls activity of src tyrosine kinase, is altered by posttranslational modification by protein kinase A and human Hsp60 likely prevents polyubiquitination and thereby the degradation of  $\alpha$ 3b1 integrine receptor by posttranslational modification. As a result of the high sequence homology of 72 % between human and *H. pylori*-Hsp60 there may be a competition for human Hsp60-binding proteins. The protein binding between *H. pylori*-Hsp60 and an human Hsp60-binding protein should be associated with different binding affinity compared to human Hsp60. Therein could lie a reason, how bacterial Hsp60 induces human gastric cells to apoptosis. Probably, *H. pylori*-Hsp60 induces cells to switch into apoptosis by interacting with at least one of these human proteins and thereby accelerating, inhibiting or blocking the latter's function in the pro- or antiapoptotic signal chain.

**Deutsche Schlagwörter:** *Helicobacter pylori*, Hsp60, Apoptose

**Englische Schlagwörter:** *Helicobacter pylori*, Hsp60, Apoptosis

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	<i>Helicobacter pylori</i> .....	1
1.2.	Epidemiologie .....	1
1.3.	Morphologie, Pathogenese und Klinik .....	2
1.4.	Pathogenitäts- und Kolonisierungsfaktoren .....	4
1.5.	Zelltod .....	6
1.5.1.	Caspasen, die Proteasen der Apoptose .....	7
1.5.2.	Rezeptorvermittelte Apoptose .....	9
1.5.3.	Mitochondrialvermittelte Apoptose .....	11
1.5.4.	Apoptoseinduktion durch das endoplasmatische Retikulum .....	14
1.6.	Hitzeschockproteine .....	15
1.6.1.	Hsp60 .....	17
1.6.2.	Hsp60-Zyklus .....	19
1.6.3.	Pathologische Bedeutung von Hsp60 .....	20
1.6.4.	Hitzeschockproteine und Apoptose .....	22
1.7.	Ziel der Arbeit .....	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1.	Material .....	25
2.1.1.	Zelllinie .....	25
2.1.2.	<i>Helicobacter pylori</i> Stamm .....	25
2.1.3.	<i>E. coli</i> Stämme .....	25
2.1.4.	Chemikalien .....	26

2.1.5.	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.6.	Kits .....	30
2.1.7.	Medien und Lösungen .....	30
2.1.8.	Kultur von Bakterien und Zellen.....	31
2.1.9.	Lösungen.....	33
2.1.9.1	ATPase-Assay .....	33
2.1.9.2	Caspase Aktivitätsbestimmung .....	33
2.1.9.3	FACS.....	34
2.1.9.4	Histon-Elisa.....	34
2.1.9.5	Immunhistologie.....	35
2.1.9.6	Plasmid-Minipräp .....	35
2.1.9.7	SDS-Gelelektrophorese .....	36
2.1.9.8	Western Blot.....	36
2.1.10.	Restriktionsenzyme .....	37
2.1.11.	Plasmide.....	37
2.1.12.	Antikörper .....	37
2.1.13.	Oligonukleotide.....	38
2.2.	Methoden .....	39
2.2.1.	Zellkultur .....	39
2.2.2.	Kultur und Ernten von <i>H. pylori</i> .....	39
2.2.3.	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	39
2.2.4.	Aufreinigung von Hsp60 aus <i>Helicobacter pylori</i> .....	40
2.2.5.	Inkubation von AGS-Zellen mit Reagenzien, Proteinen und Caspase- Inhibitoren.....	40
2.2.6.	Methoden zur Quantifizierung der Apoptose .....	41
2.2.6.1	In vitro Caspase-Aktivitätsmessung .....	41
2.2.6.2	Tunel .....	42

2.2.6.3	Histon-ELISA .....	42
2.2.6.4	FACS Nicoletti-Färbung .....	43
2.2.7.	ATPase Aktivitätsmessung .....	44
2.2.8.	Immunhistologische Quantifizierung der Zellproliferation mittels BrdU .....	44
2.2.9.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen .....	45
2.2.10.	Western Blot.....	45
2.2.11.	Ponceau-Färbung.....	46
2.2.12.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	46
2.2.13.	Klonierung einer Hsp60 Sequenz mit terminalen Restriktionsschnitt stellen mittels PCR .....	46
2.2.14.	Hsp60-Sequenzierung .....	48
2.2.15.	RNA-Extraktion aus <i>Helicobacter pylori</i> .....	48
2.2.16.	Quantifizierung von Ribonukleinsäuren.....	49
2.2.17.	Reverse Transkription der mRNA in cDNA.....	49
2.2.18.	Ligation von DNA-Fragmenten .....	50
2.2.19.	Transformation .....	50
2.2.20.	Klonierung von Hsp60 in den pGEX-6P-3 Vektor .....	50
2.2.21.	Mini Plasmid-DNA Präparation.....	51
2.2.22.	Maxi Plasmid-DNA Präparation .....	51
2.2.23.	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	52
2.2.24.	Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren .....	52
2.2.25.	Induzierung der Hsp60-Überexpression in <i>E. coli</i> mit IPTG .....	53
2.2.26.	Aufreinigung des Gluthation-S-Transferase Hsp60 Fusionproteins .....	54
2.2.27.	Statistische Auswertung .....	54
<b>3.</b>	<b>Ergebnis.....</b>	<b>55</b>

3.1.	Isolierung von Hsp60 aus <i>Helicobacter pylori</i> .....	55
3.2.	Aufreinigung des rekombinant hergestellten Hsp60 von <i>Helicobacter pylori</i> .....	56
3.3.	Vergleich der ATPase Aktivität und der Apoptose induzierenden Effekte von Hsp60 mit rekombinanten Hsp60 .....	58
3.4.	Hsp60 aus <i>Helicobacter pylori</i> induziert Apoptose in AGS-Zellen.....	60
3.5.	FCS-Zusatz im Zellkulturmedium hemmt die Hsp60-induzierte Apoptose.....	61
3.6.	Hsp60 Inkubation von AGS-Zellen aktiviert Caspase-3 .....	63
3.7.	Hsp60 induziert in isolierten Mitochondrien Cytochrom c und Smac Freisetzung.....	65
3.8.	Ouabain hemmt die Hsp60-induzierte Apoptose .....	66
3.9.	Kofaktoren erhöhen die Hsp60 vermittelten Apoptose .....	67
3.10.	Effekte von Kofaktoren auf die Hsp60 vermittelte Apoptose in AGS Zellen .....	68
3.11.	Hsp60 Regulierung von TRAIL und Fas Rezeptoren .....	70
3.12.	Hsp60-induzierte Hemmung der Zellproliferation von AGS-Zellen .....	72
3.13.	Einfluss von Hsp60 auf den Zellzyklus.....	74
3.14.	Hsp60 beeinflusst die Expression von p21, p53, pp53 .....	75
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>77</b>
4.1.	<i>Helicobacter pylori</i> und Apoptose .....	77
4.2.	Rekombinant hergestelltes <i>H. pylori</i> -Hsp60.....	81
4.3.	<i>H. pylori</i> -Hsp60 induzierte Effekte .....	85
4.4.	<i>H. pylori</i> -Hsp60 induziert Signalwege der Apoptose und Zellproliferation .....	86
4.4.1.	<i>H. pylori</i> -Hsp60 induziert Caspase-3 vermittelte Apoptose.....	87
4.4.2.	<i>H. pylori</i> -Hsp60 induziert AGS-Zellen zur Expression von Fas .....	89
4.4.3.	<i>H. pylori</i> -Hsp60 hemmt die Zellproliferation und induziert einen G1-Arrest.....	89

4.4.4.	<i>H. pylori</i> -Hsp60 beeinflusst p21, p53 und pp53 .....	92
4.4.5.	Rolle von Hsp60 bei der Permeabilisierung von Mitochondrien.....	94
4.5.	Einfluss von Hsp60 auf die zellulären Signaltransduktionswege .....	95
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>133</b>

**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)]
Apaf-1	Apoptoseprotease aktivierender Faktor (apoptotic protease-activation factor)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATM	Ataxia telangiectasia mutierte Kinase
ATR	Ataxia telangiectasia verwandte Kinase
BHI	Brain-Heart Infusion Broth
BSA	Rinderserumalbumin
CagA	Zytotoxin assoziiertes Antigen
CARD	Caspase rekrutierende Domäne (caspase recruitment domain)
DD	Todesdomäne (death domain)
DED	Todeseffektor-Domäne (death effector domain)
DISC	Todesinduzierender Signalkomplex (death-inducing signaling complex)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas-assoziiertes Todesdomänenprotein (Fas-associated death domain)
FCS	Fötale Kälberserum
FPLC	Schnellauflösende Flüssigkeitschromatographie (fast performance liquid chromatography)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
Hp87	<i>Helicobacter pylori</i> Stamm 87
Hsp	Hitzeschockprotein
IgA	Immunglobulin A

## Abkürzungen

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysacchrid
M	molar (mol/l)
Mst-1	mammalian STE20 - like kinase 1
Nore1	Novel Ras effector
OD	optische Dichte
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pi	anorganische Phosphate
PKA	Proteinkinase A
PPARgamma	peroxisomal proliferator-activated receptor gamma
RASSF1	Ras Assoziationsdomäne Familie 1
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
U	Units
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminoethan
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin

# 1. Einleitung

## 1.1. *Helicobacter pylori*

Am Ende des 19. Jahrhunderts wurde zum ersten Mal über spiral gewundene Bakterien in der Magenschleimhaut von Menschen (Böttcher 1874), Hunden und Katzen berichtet (Bizzozero 1893, Salomon 1896). Die Kultivierung dieser Bakterien gelangte jedoch erst 1983 durch Marshall und Warren (1984). Sie kultivierten aus Biopsien von Menschen ein gramnegatives, spiralförmiges, mikroaerophiles sowie polar begeißeltes Bakterium, welches zunächst in die Gattung *Campylobacter* als *Campylobacter pyloridis* eingeordnet wurde (Marshall et al. 1984). Nach biochemischen Untersuchungen und 16S-rRNA-Analyse wurde 1989 dieses Bakterium dann als erster Vertreter der neue Gattung *Helicobacter* zugeordnet und als *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) bezeichnet (Goodwin 1989).

## 1.2. Epidemiologie

*H. pylori* ist nach dem Karieserreger *Streptococcus mutans* der zweithäufigste Infektionserreger weltweit (Megraud 1989). Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass ungefähr die Hälfte der Weltbevölkerung chronisch mit *H. pylori* infiziert ist (Covacci et al. 1999). In den Entwicklungsländern sind 70 - 90 % und in den Industriestaaten 25 - 50 % der Bevölkerung von einer Infektion mit dem Keim betroffen. Daher wird vermutet, dass mangelnde Hygienezustände einen großen Risikofaktor für eine Infektion mit dem Keim darstellt.

### 1.3. Morphologie, Pathogenese und Klinik

Das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein spiralig gekrümmtes, gramnegatives Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,5 - 0,9  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 2 - 4  $\mu\text{m}$  mit lophotricher Begeißelung (2 - 7 Flagellen an einem der Zellpole).

*H. pylori* kolonisiert und infiziert den Raum zwischen Mukus und Magenepithel (Hazell et al. 1991). Dabei ist der Keim hauptsächlich in den Intrazellulärspalten von Mukuszellen in der Nähe der *tight junction* und den sekretorischen Canaliculi anzutreffen. Die bevorzugte Besiedlungsregion ist das Magenantrum, aber auch der Corpus und Fundus. Zu den Pathogenitätsfaktoren zählen: starke Beweglichkeit, die das Aufsuchen von Zielzellen erleichtert; Adhärenz an oberflächliche Zellen des Magenepithels; Urease, die aus Harnstoff Ammoniak freisetzt und so das Überleben in einer stark sauren Umgebung ermöglicht (Leunk et al. 1988).

Nach dem Eindringen entwickelt sich eine akute, mit aber auch ohne Symptome ablaufende Gastritis. Der Ablauf der Magenschleimhautbesiedlung scheint wie folgt zu verlaufen: Zunächst erfolgt die chemotaktische Orientierung von *H. pylori* in Richtung Mukusgel, gefolgt vom Eindringen der Keime in den Mukus, der Adhärenz an die Rezeptoren des Mukus und der mukosaassoziierten Schichten, der Adhärenz an die Epithelzellen und der Vermehrung der mukosaassoziierten Keime.

Im infizierten Gewebe kommt es zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-8, IL-18, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  und zur Bildung von MCP-1, einem Chemoattraktanten für Monozyten. Dies führt zur Infiltration der Magenmukosa mit Entzündungszellen wie Neutrophilen und Monozyten, die ebenfalls an die hochregulierte interzelluläre Bindemoleküle wie ICAM-1 der Wirtszellen binden können (Mori et al. 2000). In den meisten Fällen kann das angeborene Immunsystem das Bakterium nicht eliminieren. Die

chronische Infektion mit *H. pylori* bleibt bei den meisten Infizierten asymptomatisch. Bei etwa 10 - 15 % der chronisch Infizierten entwickelt sich eine ernsthafte Erkrankung des Magens oder Duodenums (Ulkus, Karzinom). Die bei einer humoralen Immunantwort eingewanderten Plasmazellen reifen in Lymphfollikeln zu antikörperproduzierenden B-Zellen. Solch eine Lymphfollikelbildung ist in den meisten *H. pylori*-infizierten Mägen zu finden und stellt eine Vorstufe zur Ausbildung des mukosaassoziierten Lymphgewebes dar, aus dem sich ein MALT-Lymphom entwickeln kann. Studien zeigen, dass das Auftreten von MALT-Lymphomen eng mit im Magen persistierenden *H. pylori* korreliert. Von MALT-Lymphom positiven Patienten waren 72 - 98 % ebenfalls mit *H. pylori* infiziert (Parsonnet et al. 1994, Wotherspoon 1998).

Für die nachfolgenden Erkrankungen ist zumeist die Lokalisierung der Gastritis massgeblich. Eine vorwiegend im Antrum befindliche Gastritis führt über eine Stimulierung der Säuresekretion zu Ulzera im Duodenum. Eine Gastritis des Korpus oder eine multifokale Atrophie des Magens verursacht dagegen Magenulzera bzw. Adenokarzinome. Die Entwicklung eines Adenokarzinoms erhöht sich in Gegenwart von *H. pylori* um den Faktor 6. Daher erklärte die WHO 1994 *H. pylori* zum Klasse I Karzinogen (IARC 1994). Das Adenokarzinom entwickelt sich aus einer atrophischen Gastritis, bei der das zerstörte Drüsengewebe durch Dick- oder Dünndarmgewebe (intestinale Metaplasie) ersetzt wurde (Craanen et al. 1992, Malfertheiner 1996).

### 1.4. Pathogenitäts- und Kolonisierungsfaktoren

Im Allgemeinen ist die menschliche Magenmukosa durch den im Magenlumen vorherrschenden pH-Wert von 1 - 2 sehr gut gegen bakterielle Infektionen durch oral aufgenommene Mikroorganismen geschützt. *H. pylori* ist soweit das einzige bekannte Bakterium, das aufgrund seiner Adaption an den Magen ein Leben lang dort persistieren kann. Studien im Tiermodell mit *H. pylori*-Mutanten zeigten, dass zwei Faktoren für eine erfolgreiche Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* essenziell sind. *H. pylori*-Mutanten, die flagellenlos sind oder das Enzym Urease nicht mehr produzieren, waren nicht mehr fähig gnotobiotische Ferkel zu infizieren (Eaton et al. 1991, Tsuda et al. 1994). Es wird angenommen, dass die 2 - 7 Flagellen es *H. pylori* ermöglichen in die schützende Magenschleimhaut zu gelangen, wo ein bikarbonatgepuffertes Milieu von pH 6 - 7 vorherrscht (Hazell et al. 1986). Die Flagellen sind wie das gesamte Bakterium mit einer polysaccharidreichen Hülle umgeben, die es vor der depolymerisierenden Säurewirkung des Magenlumens schützt. (Geis et al. 1993).

Die Urease macht bis zu 6 % der Gesamtproteinmasse von *H. pylori* aus. Das Enzym hydrolysiert im Magen das in geringen Mengen vorkommende Harnstoff zu Ammoniak und Hydrogencarbonat (Labigne et al. 1991). Untersuchungen zur Lokalisierung der Urease zeigten, dass es hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Phadnis et al. 1996). Die Enzymaktivität wird durch den pH-kontrollierten Harnstoffkanal UreI in der zytoplasmatischen Membran reguliert (Scott et al. 2000). Bei niedrigem pH-Wert ist der Kanal geöffnet und Harnstoff gelangt hinein, währenddessen im neutralem Milieu der Kanal geschlossen ist. Im sauren Magensaft produziert *H. pylori* so ein ihn umgebendes pH-neutrales Mikromilieu, das es für seinen eigenen Energiestoffwechsel für das Überleben benötigt.

Die 40 kDa große Pathogenitätsinsel (PAI) ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Weltweit kommt sie bei 60 - 90 % aller *H. pylori* Stämmen vor (Perez-Perez 1997, van Doorn 1999). Die PAI enthält Gene, die ein Typ IV-Sekretionssystem kodieren, welche wiederum das 120 kDa große CagA (*cytotoxicity associated gene*) Protein in die Epithelzelle schleust (Odenbreit 2000, Aras 2003). Das in die Zelle translozierte CagA wird durch verschiedene zelluläre Proteine phosphoryliert (Odenbreit et al. 2000, Stein et al. 2000). Als Folge wurden zellmorphologischen Veränderungen beobachtet (Segal et al. 1999).

VacA (*vaculating cytotoxin*) ist ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor. Dieser kommt aber nicht in allen Stämmen von *H. pylori* vor. In der Phospholipidmembran der Mageneithelzellen bildet VacA Poren und es führt zur Vakuolenbildungen in Zellen (Cover 1992). Das Protein VacA kommt in einigen Varianten vor. Zum einen wird nach den Allelen s1 und s2 in der Signalregion, sowie in der mittleren Genregion nach den Allelen m1 und m2 unterschieden. Beim s2 Allel handelt es sich um eine N-terminal verkürzte Form von s1. Der s2 Typ verursacht im Vergleich zum s1 Typ eine reduzierte Anzahl von Poren in der Epithelienmembran, wodurch auch eine geringere Anzahl von Vakuolen in der Zelle gebildet werden (Dunn 1997).

Durch die verschiedenen Kombinationen von s1/s2 und m1/m2 vacA Gensequenzen entwickeln sich *H. pylori* Stämme mit unterschiedlicher Pathogenität. Der s1/m2 Haplotyp führt bei einer geringeren Zahl von Epithelzellen zu einer Schädigung als der s1/m1 Haplotyp (Letley 2003). Letzterer wurde bei Patienten mit Magenkarzinom gefunden (Kidd 1999, Miehle 2000).

### 1.5. Zelltod

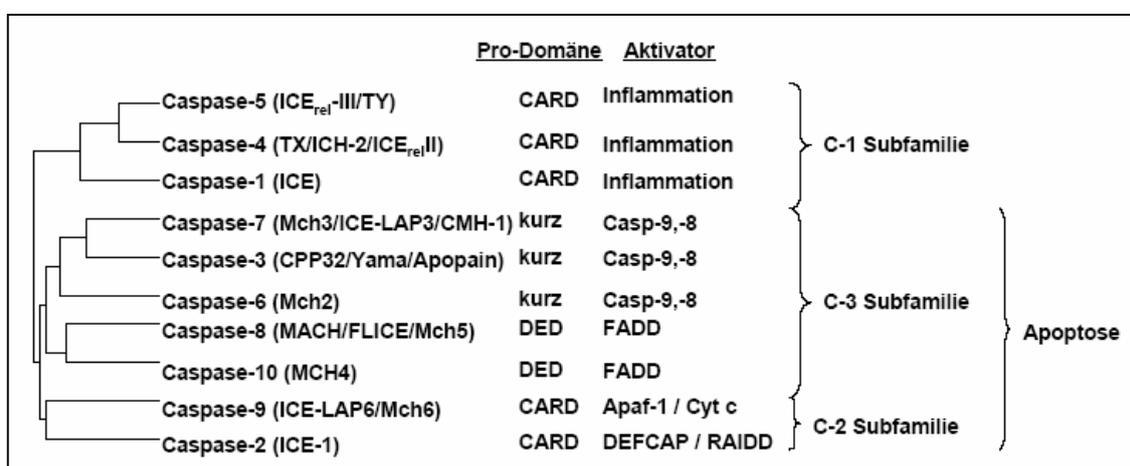
Nekrose und Apoptose stellen die beiden Wege dar, wie eine Zelle zerstört werden kann. Zur Nekrose kommt es durch physikalische oder chemische Verletzungen der Zelle, wie z. B. durch Sauerstoffmangel, der während eines Herzinfarktes im Herzmuskel auftritt oder infolge einer Membranschädigung durch Antikörper. Aufgrund solcher Verletzungen schwellen die Zellen an, platzen und setzen ihren intrazellulären Inhalt in den extrazellulären Raum frei, wodurch eine Entzündungsreaktion induziert wird. Die zum Ort der Entzündungsreaktion migrierenden phagozytierenden Zellen entfernen alle Komponenten von nekrotischen Zellen. Die andere und für den Organismus wichtigere Form des Zelltodes stellt der programmierte Zelltod (Apoptose) dar. Die ersten Beobachtungen von apoptotischen Zellen wurden 1890 von William Councilman beschrieben. Er beobachtete in Lebergewebe von Patienten mit Gelbfieber saure vakuolisierende Zellkörperchen (Councilman, 1890). Ungefähr 70 Jahre später zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass es sich bei den von William Councilman entdeckten sauren vakuolisierenden Zellkörperchen um sterbende Zellen handelt (Kerr 1969, Kerr 1971). 1972 veröffentlichte Kerr eine weitere Studie zur morphologischen Veränderung dieser Zellen und grenzte diesen Vorgang von der Nekrose ab, indem er es Apoptose nannte (Kerr 1972). Bei Zellen, die in Apoptose gehen, kommt es zu morphologischen Veränderungen. Das Zellvolumen nimmt stark ab und der Kontakt zu den Nachbarzellen wird gelöst (Wyllie et al. 1980). Die Kernmembran löst sich auf, das Chromatin kondensiert und wird anschließend defragmentiert (Wyllie et al. 1984). Auf molekularer Ebene kommt es dabei zum Verlust der Membranasymmetrie von den Phosphatidylserinen (PS). Die nur auf der intrazellulären Seite vorkommenden PS translozieren auf die extrazelluläre Seite des Zellmembranbilayers (Fadok et al. 1992). Die endogenen Nukleasen und Proteinasen werden aktiviert, wobei die Proteasen-Familie der Caspasen eine zentrale Rolle in der Apoptose einnimmt (Wyllie 1980, Cohen et al. 1997). Die DNA-Gerüstkomponente Lamin wird proteolysiert, welches zu der beobachteten Destabilisierung der Kernmembran und zur Kondensation des Chromatins führt. Die DNA im

Kern wird durch DNasen in internukleosomale Regionen gespalten (Sakahira et al. 1998). In der Endphase der Apoptose werden die Zellorganellen in kleine intakte Vesikeln eingeschlossen, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. Diese werden von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut. In den drauffolgenden Jahren zeigte sich, dass die morphologischen Veränderungen mit der Aktivität von Caspasen zusammenhängte.

### 1.5.1. Caspasen, die Proteasen der Apoptose

Die ersten Erkenntnisse zur Funktion und Struktur von den an der Apoptose beteiligten Genen und Signalkaskaden wurden während der Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gewonnen. Mittels Mutationsanalysen und biochemischen Studien wurden zentrale Gene für den Zelltod gefunden und als CED-3, -4, -9 (*cell death abnormal*) bezeichnet. Die Proteine der Gene CED-3 und CED-4 sind vor allem für die Ausführung des programmierten Zelltods verantwortlich. Bei dem Protein von CED-9 handelt es sich dagegen um ein Apoptose hemmendes Protein (Liu und Hengartner 1999). Zu allen in *C. elegans* gefundenen CED-Proteinen kommen in Säugetiere Homologe vor. Von CED-9 ist es das Protein Bcl-2, dessen Expression häufig in Tumoren fehlreguliert ist (Reed 1995). Das Bcl-2 Protein kommt in der Mitochondrienmembran, in der Membran des ER sowie in der Kernmembran vor, wo es vor einigen Formen der Apoptose schützt (Thomenius und Distelhorst 2003). CED-3 zeigt eine große Ähnlichkeit in der Sequenz zu dem humanen Interleukin-1 $\beta$  konvertierenden Enzym (*Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*) welches die erste entdeckte Caspase im Menschen war. Das humane Homolog zu CED-4 ist Apaf-1, welches durch seine Caspase-3 aktivierende Funktion entdeckt wurde (Zou et al. 1997). Seitdem wurden mehr als 14 Caspasen über das bei der Aktivierungssequenz vorkommende konservierte Pentapeptid QACR(N/Q)G identifiziert.

Caspasen sind wichtige Proteasen in der zelleigenen Signalkette, über die die Apoptose von Zellen reguliert wird. In Zellen liegen die Caspasen als inaktive Zymogene vor. Sie werden entweder durch andere Caspasen prozessiert oder sie werden autokatalytisch aktiviert. Die freigesetzten Untereinheiten bilden aktive Heterotetramere, bestehend aus je zwei p20/p10 Heterodimeren mit einem katalytischen Zentrum. Zymogene sind nach dem Muster, dass einer aminoterminalen Prodomäne eine größere p20 (20 kDa) und eine kleinere p10 (10 kDa) Domäne nachfolgt, aufgebaut. Die kleinsten Prodomänen haben die Caspase-6 und -7 mit 23 Aminosäuren, wo hingegen die Caspase-10 mit 219 Aminosäuren die größte Prodomäne besitzt.



**Abb. 1: Dendrogramm humaner Caspasen:** Alternative Bezeichnungen sind in Klammern angegeben. Zu den in entzündliche Prozesse involvierten Caspasen gehören die Caspasen der C-1-Subfamilie. Die Mitglieder der C-2 und C-3 Subfamilie sind an der Exekution von Apoptose beteiligt (Cohen 1997).

Nach der Größe ihrer funktionellen Prodomäne werden Caspasen in Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen eingeteilt. Die Initiatorcaspasen besitzen eine große Prodomäne, welche die DED- (*death effector domain*) und die CARD- (*caspase recruitment domain*) Bindemotive enthalten kann. Die DED vermittelt die Bindung von aktivierenden Adapterproteinen. Das CARD-Bindemotiv ermöglicht elektrostatische Wechselwirkungen mit Caspasen und Adapterproteinen (Weber und Vincenz 2001, Stennicke und Salvesen 2000).

Effektorcaspasen besitzen dagegen eine kleine Prodomäne und werden von Initiatorproteasen durch sequenzielle Prozessierung aktiviert.

Zu der Gruppe der Initiatorcaspasen gehören die Caspasen-2, -8, -9, -10, und -12. Diese Initiatorcaspasen werden entweder extrinsisch über die Todesrezeptoren der Zellmembran oder intrinsisch von den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum ausgehend aktiviert. Die Caspasen-8 und -10 werden an den aktivierten Todesrezeptoren durch Bildung eines DISC (*death inducing signaling complex*) aktiviert. Die Caspase-9 wird hingegen nach intrinsischen Signalen vom Mitochondrium im Apoptosom-Komplex aktiviert. Zur Caspase-14 sind die Erkenntnisse noch widersprüchlich. Im Menschen wurde eine Zytokin-aktivierende Funktion beobachtet. In der Maus wurde dagegen eine Involvierung im oberen Teil der apoptotischen Caspase Signalkaskade nachgewiesen (Mikolajczyk et al. 2004). Die aktivierten Initiatorcaspasen prozessieren die Effektorcaspasen. Zu diesen Effektorcaspasen gehören die Caspasen-3, -6 und -7. Als Substrate der Caspasen dienen viele unterschiedliche Proteine. Bisher wurden mehr als 100 Proteine als Substrate der Caspasen nachgewiesen. Dazu zählen beispielsweise Proteine des Zytoskletts, der Zellproliferation und der DNA-Reperatur. Die Caspasen-1 und -11, möglicherweise auch die Caspasen-4 und -5, sind hauptsächlich in die proteolytische Aktivierung von Zytokinen, wie z.B. Interleukin-1 $\beta$  und IL-18, involviert (Cerretti et al. 1994, Siegmund et al. 2001). Diese Caspasen haben mit der Apoptose von Zellen wahrscheinlich sehr wenig zu tun.

### 1.5.2. Rezeptorvermittelte Apoptose

Oberflächenrezeptoren können neben der Übertragung von Signalen zur Aktivierung, Proliferation und der Differenzierung von Zellen, auch Signale für den programmierten Zelltod an die Zellen weiterleiten. Diese Rezeptoren stellen eine Unterfamilie von Todesrezeptoren dar, welche zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren gehören. Todesrezeptoren

enthalten intrazelluläre Todesdomänen (*death domain*, DD), die für die Weiterleitung des Apoptosesignals essenziell sind (Ashkenazi und Dixit 1998). Gegenwärtig sind sechs Mitglieder von der Unterfamilie der Todesrezeptoren bekannt: TNF-R1 (CD120a), CD95 (Apo-1, Fas), TRAMP (DR3, Apo-3), TRAIL-R1 (Apo-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER) und DR6 (Schulze-Osthoff et. al. 1998).

Aktiviert werden Todesrezeptoren durch Liganden, die zur TNF-Familie gehören. Bis auf die Lymphotoxine sind Liganden Typ II Transmembranproteine. Sie bestehen aus einem intrazellulären Anteil und einem extrazellulären Bindungsmotiv. Proteasen können das extrazelluläre Bindungsmotiv abspalten, sodass der Ligand auch löslich vorkommt. (Mariani et al. 1998).

Die Todesrezeptoren sind dagegen Typs I Transmembranproteine. Sie bestehen aus einem extrazellulären Bindungsmotiv und einem intrazellulären Teil, der bei einigen Todesrezeptoren (z.B. Fas, DR4, DR5) eine Todesdomäne enthält. Die Bindung eines Liganden an die Todesrezeptoren führt zu deren Trimerisierung (Mongkolsapaya et al. 1999). Als Folge kommt es intrazellulär zur Aggregation der intrazellulären DD-Domänen, welche die Bindung von Adaptermolekülen über ihre C-terminale DD-Sequenz, wie z.B. FADD (*Fas-associated protein with death domain*), ermöglicht. Am N-Terminus enthalten diese Adaptermoleküle eine *death effector* Domäne (DED), die mit der DED von der Prodomäne der Initiatorcaspase-8 und 10 aggregiert (Vincenz et al. 1997, Kischkel et al. 2001). Dieser Proteinkomplex aus trimerisiertem Rezeptoren, Adaptermolekül und Caspase-8 Zymogen bilden zusammen den sogenannten *Death inducing signaling complex* (DISC). Die proteolytische Prozessierung zur Caspase-8 erfolgt dabei nach dem Modell der räumlichen Nähe von Caspase-8 Zymogenen; die als Folge der induzierten räumlichen Nähe dimerisieren und katalytisch aktive Heterotetramere bilden (Muzio et al. 1998). Die autokatalytische Spaltung führt dabei aber nicht zwangsläufig zu einer Aktivierung der Procaspase-8 (Boatright et al. 2003). Neben Caspase-8 spielt auch die homologe Caspase-10 eine

initiiierende Rolle bei der rezeptorvermittelten Apoptose (Boatright und Salvesen, 2003). Zusätzlich zu den Initiatorcaspasen-8 und -10 können auch andere Moleküle in die Steuerung dieses Signalkomplexes eingreifen.

Ein Beispiel dafür ist das Caspase-8 Homolog FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*), das in verschiedenen Isoformen (FLIP-L und FLIP-S) exprimiert wird und selbst keine proteolytische Aktivität besitzt (Thome und Tschopp 2001). FLIP bindet wie Caspase-8 an die DED von FADD und verhindert so die Rekrutierung von Procaspase-8, wie auch deren proteolytische Aktivierung am Rezeptorkomplex (Irmeler *et al.* 1997, Scaffidi *et al.* 1999).

Experimente zeigten, dass der Einfluss von FLIP auf die Regulation der rezeptorvermittelten Aktivierung von Caspase-8 sowohl inhibitorisch, als auch aktivierend sein kann. Hohe Konzentrationen von FLIP-L verhinderten die Aktivierung der Caspase-8 im DISC, indem sie vermutlich um Bindungsstellen kompetitierten. In niedrigen, physiologisch relevanten Konzentrationen wirkte FLIP-L durch Heterodimerisierung mit der Procaspase-8 hingegen aktivierend (Chang *et al.* 2002, Micheau *et al.* 2002).

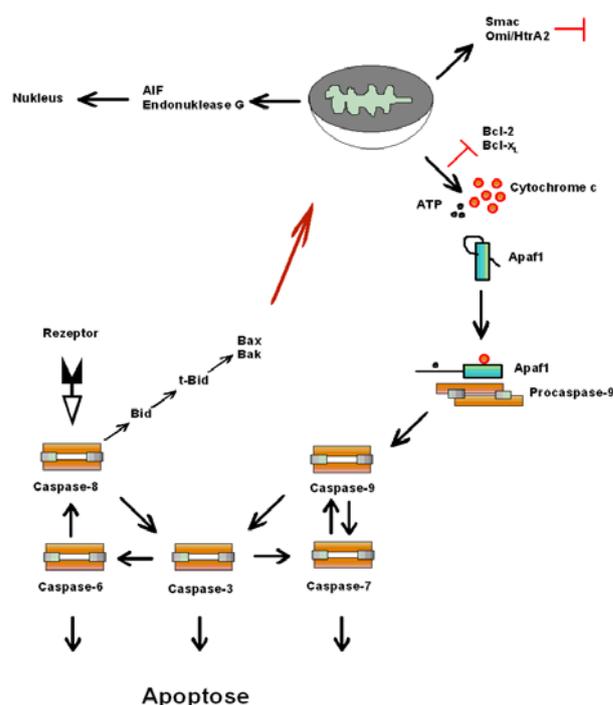
### 1.5.3. Mitochondrialvermittelte Apoptose

Die Mitochondrien stellen eine zentrale Komponente innerhalb des Apoptose-Netzwerkes von Zellen dar. Unterschiedliche äußere Einflüsse auf Zellen, wie z.B. durch Zytostatika, Hitzeschock, Bestrahlung oder der Entzug von Wachstumsfaktoren, können zu einem Abfall des Membranpotenzials bei Mitochondrien führen, welches dann immer die Apoptose der Zelle anschließt.

In dem mitochondrialen Intermembranraum – der schmale Raum zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran – kommen eine Vielzahl von proapoptotischen Proteinen vor, die nach Freisetzung ins Zytosol die Zelle zur Apoptose induzieren können. Zu den

## 1. Einleitung

Intermembran-Proteinen zählen neben Caspase unabhängige Nukleasen und Proteasen auch Caspase-Aktivatoren. Cytochrom c ist ein Caspase-Aktivator und war das erste mitochondriale Protein, von dem nachgewiesen wurde, das es ins Zytosol von in Apoptose befindenden Zellen freigesetzt wird. Es bildet gemeinsam mit dATP, Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) und der rekrutierten Procaspase-9 das Apoptosom (Li et al. 1997, Zou et al. 1997, Rodriguez und Lazebnik 1999).



**Abb. 2: Übersicht über die mitochondriale Induktion der Caspasesignalkaskade und Verknüpfung mit dem Todesrezeptorsignalweg.** Der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials durch apoptotische Stimuli führt zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren in das Zytosol. Cytochrom c bildet mit (d)ATP, Apaf-1 und Procaspase-9 das Apoptosom, was zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 führt. Ausgehend davon werden die Effektorcaspasen -3, -6, -7 aktiviert, Todessubstrate gespalten und Zelltod exekutiert. Die Aktivierung des Mitochondriums selbst kann durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert, bzw. durch Bax und Bak initiiert werden. Eine Verknüpfung mit dem Todesrezeptorsignalweg und eine Amplifikation der mitochondrialen Signalkaskade ist über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid und die Caspase-6 vermittelte Spaltung von Caspase-8 möglich. Ferner ist eine Caspase-3 induzierte Proteolyse von Bid möglich.

Dabei handelt es sich um einen hochmolekularen Komplex, der die Caspase-3 und -7 aktivieren kann. Durch nachfolgende Prozessierung der Procaspasen-2, -6, -8 und -10 kann

auf diesem Weg das gesamte Caspase Netzwerk aktiviert und die Zelle zur Apoptose induziert werden (Boatright und Salvesen 2003, Kang *et al.* 2002).

Solch eine von den Mitochondrien ausgehende Apoptose wird auch als Typ II Apoptose bezeichnet. Als Typ I Apoptose wird dagegen die von den Todesrezeptoren ausgehende Apoptose bezeichnet, welche zur Aktivierung der Caspase-3 nicht über die Mitochondrien laufen muss. Eine Verbindung der beiden Apoptose Typen kann durch die Initiatorcaspase-8 mittels Prozessierung des Proteins Bid zu seiner truncierten Form tBid vermittelt werden. Die Bindung von tBid an Bax oder Bak löst in diesen Proteinen eine Konformationsänderung. Der gebildete Komplex inseriert in die Mitochondrienmembran und führt zur Permeabilisierung der Mitochondrien, welches die Freisetzung von Cytochrom c und anderer proapoptotischer Faktoren (AIF, Omi/HtrA2, Smac) zur Folge hat. Dadurch wird eine Amplifikation des proapoptotischen Signals von den Todesrezeptoren zur Aktivierung der Caspase-3 erreicht, sodass die Zelle in Apoptose geht.

Reguliert wird die Permeabilisierung der Mitochondrien durch die Familie der Bcl-2 Proteine, welche mindestens eine der Bcl-2 homologen Domänen (BH1-BH4) enthalten (Muchmore *et al.* 1996, Minn *et al.* 1997, Borner 2003, Willis *et al.* 2003). Eingeteilt wird die Bcl-2 Proteinfamilie in drei Untergruppen entsprechend ihren pro- oder antiapoptotischen Funktionen sowie nach den enthaltenen BH-Domänen (Adams und Cory 1998). Antiapoptotische Bcl-2 Proteine (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 und A1/Bfl-1) enthalten die vier BH-Domänen BH1-BH4. Den proapoptotischen Proteinen (z.B. Bax, Bak, und Bok/Mtd) fehlt von den vier BH-Domänen die BH4-Domäne und die proapoptotischen BH3-Proteinen (z.B. Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nkb, Blk, Noxa, Puma/Bbc3 und Hrk/DP5) enthalten von den vier BH-Domänen BH1-BH4 nur die BH3-Domäne (Lucken-Adjomande und Martinou 2005).

### 1.5.4. Apoptoseinduktion durch das endoplasmatische Retikulum

Die Rolle des endoplasmatischen Retikulums (ER) bei der Vermittlung von Apoptose gewinnt immer mehr an Bedeutung. Als Ort der Proteinsynthese führen dort Stresssignale, wie z.B. die Akkumulation missgefalteter Proteine im Lumen des ER, zur Aktivierung der protektiven UPR- (*unfolded protein response*) Signaltransduktion (Kaufmann 2002a, 2002b). Die UPR verändert zum einen die Transkriptions- und Translationsniveaus, um eine weitere Akkumulation von missgefalteten Proteinen im Lumen des ER vorzubeugen. Zum anderen werden verschiedene Proteine wie beispielsweise Hitzeschockproteine induziert und die auf der ER-Membran lokalisierte Caspase-12 aktiviert (Nakagawa et al. 2000, Morishima et al. 2004). Studien mit Caspase-12 KO-Mäusen zeigten, dass die Aktivierung der Caspase-12 unabhängig von der rezeptor- oder mitochondrial vermittelten Apoptose ist.

Immer größere Bedeutung wird aber der Regulation der intrazellulären Calcium-Homöostase, der Interaktion des ER mit den Mitochondrien und der nachfolgenden Aktivierung der Caspasen-Signalkaskade beigemessen. Unter physiologischen Bedingungen ist der Hauptteil der  $\text{Ca}_2^+$ -Ionen im ER gespeichert. Die Aufnahme erfolgt energieabhängig über die Sarco(Endo)Plasmatische Retikulum  $\text{Ca}_2^+$ -ATPase (SERCA), während die Freisetzung über die Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ )-regulierte Rezeptoren oder den Ryanodin (RyR)  $\text{Ca}_2^+$ -Rezeptor erfolgt (Berridge *et al.* 2000). Größtenteils wird das freigesetzte Calcium über die  $\text{Ca}_2^+$ -Kanäle der benachbarten Mitochondrien aufgenommen. Das Übersteigen eines bestimmten  $\text{Ca}_2^+$ -Potenzials in der mitochondrialen Matrix löst die Öffnung der *Permeability Transition Pore* (PTP) aus. Dies führt zum Verlust des Membranpotenzials was zur nachfolgenden Freisetzung von proapoptotischen Faktoren, wie beispielsweise Cytochrom c, und somit zur Apoptose der Zelle führt.

### 1.6. Hitzeschockproteine

Auf unterschiedlichste Belastungen reagieren Zellen mit der Bildung von sogenannten Stressproteinen. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Proteinen, welche ubiquitär in allen Organismen vorkommt. Ritossa entdeckte 1962 in Drosophilalarven eine Genaktivität, die nach einer 30minütigen Temperaturerhöhung von 25 auf 30°C auftrat. Innerhalb der Stressprotein-Familie stellen die Hitzeschockproteine (HSPs) die bekannteste Gruppe dar. Diese wurden 1974 erstmals isoliert (Tissieres et al. 1974). Ihren Namen erhielten sie durch die Eigenschaft, bei Hitzeeinwirkung verstärkt exprimiert zu werden.

Weitere Stresssituationen ausgelöst durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Reizen, können zur erhöhten Expression von Hitzeschockproteinen führen. Eine erhöhte Expression wurde beispielsweise nach der Inkubation von Zellen mit einigen Chemikalien, wie z.B. Schwermetallen, Ethanol, oder Salizylaten beobachtet (Lindquist et al. 1986, Feige et al. 1992).

Die Funktion von Hitzeschockproteinen ist in Stresssituationen vor allem in der Stabilisierung von Proteinen sowie die Verhinderung von Proteinaggregationen zu sehen. In ungestressten Zellen sind die Hitzeschockproteine für die korrekte Faltung und Entfaltung, Zusammenlagerung der Proteine zu Makromolekülen, der Translokation von Proteinen durch Membranen und für den Abbau von Proteinen essenziell (Burel et al. 1992, Craig et al. 1993, Craig et al. 1994, Becker et al. 1994, Frydman et al. 1994, Hartl et al. 1994, Hartl et al. 1996).

Aufgrund der zuvor beschriebenen physiologischen Funktionen in Zellen wurde für Hitzeschockproteine auch der Begriff „Chaperone“, hergeleitet vom griechischen Wort für Anstandsdame, eingeführt (Ellis 1987). Nach heutigen Erkenntnissen sind den meisten Chaperonen die Bindung an ein oder mehrere kurze Peptidsegmente, die reich an hydrophoben Aminosäuren sind, gemein. Solche Peptidsegmente kommen in nativ gefalteten

Proteinen meist im Innern, dem hydrophoben Kern, vor. Bei noch nicht gefalteten oder missgefalteten Proteinen können diese Segmente exponiert sein und somit von den Chaperonen gebunden werden.

Eingeteilt werden die Hitzeschockproteine in vier große Familien, die ähnliche Funktionen besitzen, aber eine unterschiedliche Expression zeigen (Tab. 1).

Chaperon-Familie	Zelluläre Lokalisation	Funktion
Hsp90 (ca. 80 - 110 kDa)	Chloroplasten, ER, Mitochondrien, Prokaryonten, Zellkern Zytoplasma,	-Disaggregation zusammen mit Hsp70 -Thermoresistenz -Resistenz gegen extremen Hitzeschock -Stressresistenz -Kontrolle der Faltung und Aktivität von Steroidrezeptoren, Proteinkinasen u. a.
Hsp70 (ca. 69 - 79 kDa)	ER, Mitochondrien, Plastiden, Prokaryonten, Zellkern, Zytoplasma	- De-novo-Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen -Auflösung von Proteinaggregaten zusammen mit ClpB -Regulation der Hitzeschockantwort
Hsp60 (ca. 56 - 62 kDa)	ER, Mitochondrien, Prokaryonten, Zellkern, Zytoplasma	- De-novo-Proteinfaltung - Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen
kleine Hsps (ca. 5 - 40 kDa)	Chloroplasten, ER, Mitochondrien, Periplasma, Prokaryonten, Zellkern Zytoplasma,	-Aggregationsverhinderung von Hitze-denaturierten Proteinen -Bindung an Inclusion Bodies -Ribosomen-assoziiertes Chaperon mit Funktion in der De-novo-Proteinfaltung -Sekretion von Proteinen

**Tab. 1: Übersicht zu der Familie der Hitzeschockproteine und ihrer Lokalisierungen in der Zelle (nach Gething 1997)**

Größere Proteine, die aus mehreren Domänen bestehen, haben oft Faltungsprobleme und sind häufig in aggregationsgefährdeten, nicht nativen, Konformationen gefangen. Solche Proteine werden als Substrate von den Chaperonen der Hsp70 oder Hsp60 Proteinfamilie erkannt und durch Zyklen von Bindung und Loslösung von dem jeweiligen Chaperonsystem auf ihrem

Weg zur nativen Struktur begleitet (Mogk et al. 2001).

Aus historischen Gründen gibt es für Hitzeschockproteine weitere etablierte Bezeichnungen, z.B. HtpG (Hsp90), DnaK (Hsp70), GroEL (Hsp60), GroES (Hsp10), die vor allem bei Prokaryonten vorkommen. Diese Bezeichnungen wurden vergeben, als diese Proteine noch nicht mit den Stressproteinen in Verbindung gebracht wurden. Entdeckt wurden diese als Reaktion einer Infektion von *E. coli* mit Bakteriophagen (Georgopoulos und Herskowitz 1971).

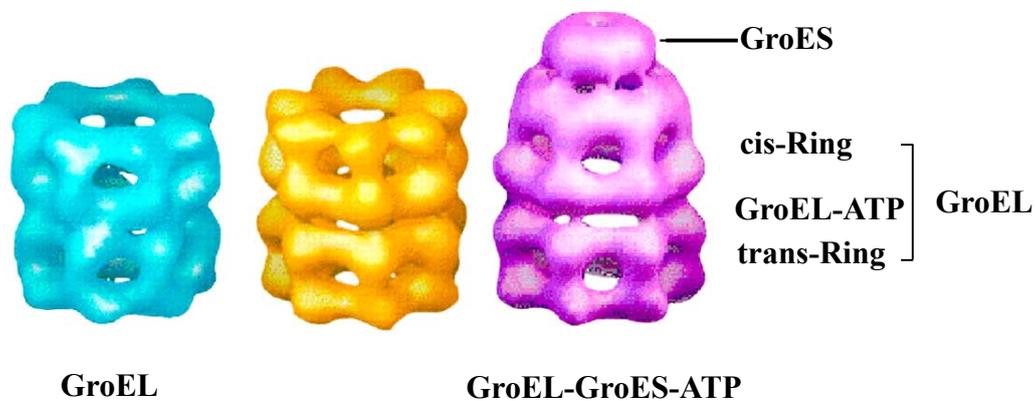
Die Synthese von Hitzeschockproteinen wird bei Eukaryonten hauptsächlich von dem spezifischen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF-1 kontrolliert. Dieser liegt in ungestressten Zellen in einer inaktiven monomeren Form vor. HSF-1 bildet als Folge von Stress Trimere. Diese akkumulieren im Zellkern und initiieren die Transkription der Stressgene (Morimoto et al. 1998).

### 1.6.1. Hsp60

Das Hsp60-Chaperon kommt in allen Prokaryoten, Mitochondrien und Chloroplasten vor und besitzt eine tonnenförmige Quartärstruktur, die aus zwei übereinander liegenden Ringen besteht. Untersuchungen zum Aufbau des Hsp60 von verschiedenen Organismen zeigten, dass die Anzahl der Untereinheiten in den Ringen zwischen den Prokaryonten, Eukaryonten und den Archaeobakterien variiert. Bei Prokaryonten besteht der Ring aus 7 gleichen Untereinheiten. Im Zytosol von Eukaryonten hat der Ring 8 verschiedene Untereinheiten und bei Archaeobakterien der TF55/CCT-Familie hat der Ring 8 oder 9 Untereinheiten, wobei der erstere aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist (Siegler et al. 1998).

Eine Hsp60-Untereinheit hat eine Molekularmasse von ~ 60 kDa und enthält eine apikale, intermediäre und äquatoriale Domäne. Die allgemeine Funktionalität der Aminosäuren von

prokaryontischen Hsp60 wurden durch systematische Mutagenese an GroEL aufgeklärt (Fenton et al. 1994). Die apikale Domäne vermittelt die Substraterkennung durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der entfalteten Polypeptidkette eines Proteinsubstrates (Motojima *et al.*, 2004). Die äquatoriale Domäne enthält die ATPase-Aktivität des Hsp60-Proteins und steht im Kontakt mit der äquatorialen Domäne der Hsp60-Untereinheit vom zweiten Ring. Die apikale und die äquatoriale Domäne sind durch die intermediäre Domäne über zwei *hinge* – Regionen verbunden.

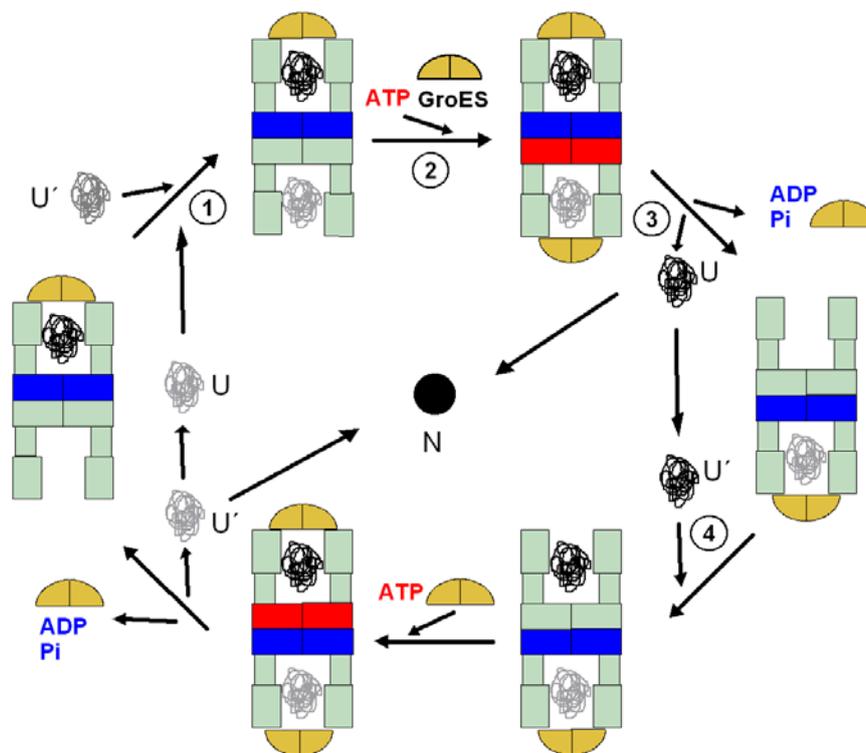


**Abb. 3: Konformationen von GroEL während des Reaktionszyklus.** Computer simulierte Darstellung der Konformationen von GroEL, GroEL mit gebundenen ATP (GroEL-ATP) und GroEL mit gebundenen GroES und ATP (GroEL-GroES-ATP). ([www.crbmb.com](http://www.crbmb.com))

Das elektronenmikroskopische Bild (Chen et al. 1994) und die Kristallstruktur (Braig et al. 1994) zeigen das Molekül als „Tonne“, deren Abmessungen vom Status des ATP-Zyklus variieren.

## 1.6.2. Hsp60-Zyklus

Die meisten Untersuchungen zum Aufbau und dem Funktionszyklus wurden mit dem aus *E. coli* isolierten Hsp60 (GroEL) durchgeführt. Die verschiedenen Hsp60 Konformationen während des ATP-abhängigen Zyklus wurden im Detail aus experimentellen Datensätze von enzymatischen (Fersht 1999, Ranson und Clarke 1999, Todd et al. 1994), als auch strukturellen Methoden der Elektronenmikroskopie hergeleitet (Burston und Saibil 1999, Schmidt et al. 1994) .



**Abb. 4: Reaktionszyklus von GroEL:** Der Reaktionszyklus für das Substrat (U') beginnt mit der Anlagerung an die hochaffinen Substratbindungsstellen am offenen trans-Ring eines GroEL-Chaperons mit gebundenen Substrat (U) und ADP (blau) am cis-Ring (1). Nach der Bindung von ATP (rot) und des GroES-Cochaperons, welches gleichfalls aus sieben Untereinheiten besteht und als Deckel fungiert, wird das Substrat (U', orange) in die Faltungskammer eingeschlossen (2). Durch die ATP- und GroES-Bindung sowie der ATP-Hydrolyse kommt es zu Konformationsänderungen im GroEL-Chaperon, die zur Dissoziation des GroES-Co-Chaperons vom cis-Rings und zur Freisetzung des Substrats (U) führen (3). Das freigesetzte Substrat hat entweder die native Konformation erreicht (N) oder es wird erneut von einem GroEL-Chaperone gebunden und durchläuft einen oder mehrere weitere Reaktionszyklen bis es die native Konformation (N) erreicht hat (4). ([www.chemie.tu-muenchen.de/biotech/groel-pic.html](http://www.chemie.tu-muenchen.de/biotech/groel-pic.html))

Beide Ringe können Substrate phasenverschoben falten, wobei der Faltungszyklus eines Rings etwa 15 - 20 Sekunden dauert. Dieser Mechanismus wird daher auch mit der Arbeitsweise eines Zweitaktmotors verglichen (Mogk et al. 2001). Während des Faltungszyklus kommt es zu einer auf die gesamte Polypeptidkette wirkenden Entfaltung des gebundenen Polypeptids. Daher wird angenommen, daß dadurch ungünstige hydrophobe Interaktionen gelöst werden damit das Protein eine neue Gelegenheit bekommt, sich richtig zu falten (Shtilerman et al. 1999).

Aufgrund der Größe der Faltungskammer von den Hsp60-Chaperonen wird vermutet, daß nur Polypeptide, die kleiner als 60 kDa sind, in eine native Konformation von Hsp60 überführt werden (Mogk et al. 2001).

### 1.6.3. Pathologische Bedeutung von Hsp60

Die mikrobielle Invasion stellt für den Keim wie auch für den Wirtsorganismus eine Streßsituation dar. Bei beiden kommt es dabei zur vermehrten Bildung von Hitzeschockproteinen. Obwohl diese Proteine hoch konserviert sind und somit zumeist schlechte Antigene sind, werden sie vom Immunsystem als Antigene erkannt. Es konnten bei verschiedenen Infektionskrankheiten, wie z.B. bei Infektionen mit bestimmten Mycobakterien und Chlamydien, hohe Antikörpertiter gegen die bakteriellen Hitzeschockproteine sowie eine erhöhte Anzahl Hsp60 und Hsp70 reaktive T-Zellen im Menschen und in Tiermodellen nachgewiesen werden.

Bei Patienten mit einer *Helicobacter pylori* Infektion wurde ebenfalls ein hoher Antikörpertiter gegen Hsp60 nachgewiesen. Es wird vermutet, daß die Schädigung der Schleimhaut durch kreuzreagierende HspB Antikörper verursacht wird.

Hsp60 wurde bei bakteriellen Infektionen mit den Erregern von Lepra und Cholera als Hauptantigen festgestellt (Kaufmann et al. 1989). Bei diesen Infektionen führte eine vorhergehende Hitzeschockprotein-induzierte Immunantwort in einigen Fällen zu einer Protektivität.

Auch bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen spielt Hsp60 anscheinend eine Rolle. Erhöhte Antikörpertiter gegen Hsp60 konnten u.a. für die nachfolgenden Erkrankungen nachgewiesen werden: Arteriosklerose, chronisch juvenile Arthritis, Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Systemische Sklerose und Zystische Fibrose (Danieli et al. 1992, Xu et al. 1993, Rambukkana et al. 1993, de Graeff-Meeder et al. 1993). Neben den kreuzreaktiven humoralen (Kaufmann und Schoel 1994) wurden auch T-zelluläre Vorgänge gegen humane Hitzeschockproteine beobachtet (Lamb et al. 1989, Anderton et al. 1993). So konnte z.B. für einige zum angeborenen Immunsystem zugehörenden  $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden, dass diese mit HSP60 interagieren, da die Interaktion durch spezifische anti-HSP60-Antikörper gehemmt werden konnte (Fisch et al. 1990, Kaur et al. 1993). Für  $\alpha\beta$  T-Zellen, welche zum adaptiven Immunsystem gehören, konnte eine Kreuzreaktivität gegen mykobakterielles und humanes HSP60 nachgewiesen (Li et al. 1992).

Eine Vielzahl von Untersuchungen anhand von mikrobiellen Infektionen zeigten, dass das normalerweise intrazellulär lokalisierte Hsp dann verstärkt an der Zelloberfläche exprimiert wird, wo es von Antikörper erkannt werden kann (Multhoff und Hightower 1996).

### 1.6.4. Hitzeschockproteine und Apoptose

Die Rolle von Hitzeschockproteinen in der Apoptose von Zellen ist noch ein sehr junger Forschungszweig. Eine eindeutige pro- oder antiapoptotische Funktion konnte den Hitzeschockproteinen bisher nicht zugeordnet werden. Vielmehr scheinen einige Hitzeschockproteine eine proapoptotische, manche eine antiapoptotische und andere eine pro- und antiapoptotische Funktionen zu besitzen. Hsp70 verhindert beispielsweise die Rekrutierung der Caspase-9 zum Apoptosom (Beere et al. 2000, Saleh et al. 2000). Zusätzlich wurde für Hsp70 eine schützende Funktion bei der stressinduzierten Apoptose gezeigt (Mosser et al. 2000). Die Überexpression von Hsp90 in der Monoblastoiden Zelllinie U937 erhöht dagegen nach Inkubation mit TNF und Cyclohexamidin die Apoptose (Galea-Lauri et al. 1996).

Zu der Rolle von Hsp60 und seinem Cochaperon Hsp10 in der Apoptose von eukaryontischen Zellen gibt es ebenfalls nur wenige Untersuchungen. Das Hsp60 wurde im Zytosol von Herzmuskel- und Nierenzellen im Komplex mit Bax gefunden. Bax ist ein proapoptotische Protein, welches ungebunden zu den Mitochondrien transloziert, dort Membranporen bildet und dadurch Apoptose induziert. Das aus dem Komplex freigesetzte Hsp60 translozierte hingegen zur Zellmembran. Warum Hsp60 zur Zellmembran transloziert, ist bisher nicht bekannt. Im Zytosol vorliegenden Bax-Hsp60 Komplex nimmt Hsp60 eine antiapoptotische Funktion ein.

Bei Untersuchungen mit Mitochondrien wurde ein Komplex aus Procaspase-3, Hsp60 und Hsp10 gefunden. Nach Induktion der Apoptose durch Staurosporine wurde die Procaspase-3 prozessiert und dissoziierte vom Komplex. Die Proteine Hsp60 und Hsp10 wurden zusammen mit Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Zur Rolle von Hsp60 wurde vermutet, dass es passiv als Bindemolekül diene oder gering die Prozessierung der Procaspase-3 förderte. In vitro Untersuchungen von den gleichen Autoren mit rekombinanten

Hsp60 und Hsp10 zeigten dagegen, dass deren Anwesenheit die Cytochrome c und ATP induzierte Caspase-3 Aktivität erhöhte. Daher könnte Hsp60 neben der proapoptotischen auch eine antiapoptotische Funktion in eukaryontischen Zellen besitzen (Samali et al. 1999).

Im Menschen wurde nach einem Herzinfarkt und bei dilatativer Kardiomyopathie eine erhöhte Hsp60 Konzentration im Herzen nachgewiesen. Bei einer chronischen Entzündung oder Atherosklerose wurde ebenfalls eine Erhöhung von Hsp60 nachgewiesen. In *E. coli* z.B. repräsentiert das von Hendrix et al. zuerst beschriebene HSP60-Homolog GroEL unter normalen Bedingungen 1 - 2 % des Gesamtproteingehaltes (Hendrix et al. 1979). Unter Stressbedingungen erhöht sich der Anteil des GroEL um das 4 - 5fache (Shinnick et al. 1991).

### 1.7. Ziel der Arbeit

Eine Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* ist der Auslöser für Magengeschwüre und häufig verantwortlich für die Ausbildung von Magenkrebs und des MALT-Lymphoms. Trotz Identifizierung verschiedener Pathogenitätsfaktoren sind bis jetzt immer noch nicht die genauen molekularen Mechanismen zur Ausbildung dieser Symptome bekannt. Die Induktion von Apoptose in Magenepithelzellen spielt eine Rolle für die Pathogenese des Bakteriums. Die mit an der Apoptose von Magenepithelzellen verantwortlichen Faktoren sind immer noch nicht vollständig bekannt.

In dieser Arbeit soll der Apoptose induzierende Effekt von aus *H. pylori* isolierten nativen Hsp60 auf die Magenzelllinie AGS genauer untersucht werden. Dazu wird das native Hsp60 nach einem in einer vorangegangenen Arbeit etablierten Aufreinigungsverfahren angereichert und mit AGS-Zellen inkubiert, um die an der Apoptose beteiligten Proteine zu untersuchen. Des Weiteren soll der Einfluss auf die Zellproliferation und auf den Zellzyklus untersucht werden. Zusätzlich soll das Hsp60 Protein aus *H. pylori* kloniert und eine

Aufreinigungsmethode für das rekombinante Hsp60 entwickelt werden, damit es schneller und in größeren Mengen für Versuche verfügbar ist. Im weiteren sollen mit dem rekombinanten Hsp60 die mit dem isolierten nativen Hsp60 beobachteten Effekte bestätigt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zelllinie

Die verwendete Magenkarzinomzelllinie AGS (ATCC 1739-CRL), wurde von der American Type Culture Collection bezogen. Sie entstammt aus einem 1979 isolierten humanen Adenokarzinom einer 54 Jahre alten Frau.

#### 2.1.2. *Helicobacter pylori* Stamm

Der verwendete *Helicobacter pylori* Stamm Hp87 wurde aus einer Gastritispatientin isoliert und von Prof. Dr. Siegfried Wagner (Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der MHH) zur Verfügung gestellt. Die Charakterisierung bezüglich des Vac- und Cag-Status wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Hp87 stellt einen für beide Pathogenitätsfaktoren positiven Keim (Vac<sup>+</sup>/Cag<sup>+</sup>) dar.

#### 2.1.3. *E. coli* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den *E. coli* Stämmen XL-10 Gold (Stratagene) und dem proteasendefizienten Stamm BL-21 (Amersham) gearbeitet. Das Bakterium XL-10 Gold verfügt über das folgende Genom: Tetr  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]  
Das Bakterium BL-21 verfügt über das Genom: *E. coli* B F<sup>-</sup>, ompT, hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm.

### 2.1.4. Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 30 % / 0,8 % (Roth, Karlsruhe)  
Agarose (Electrophoresis grade) (Life Technologies, Karlsruhe)  
Ammoniak (25 %) (Merck, Darmstadt)  
Ammoniumpersulfat (APS) (Serva, Heidelberg)  
Amphotericin B (PAA, Cölbe)  
Ampicillin (Sigma, Deisenhofen)  
Ampuwa<sup>TM</sup> für Spülzwecke (Fresenius, Bad Homburg)  
BioRad Farbreagenz (BioRad, München)  
Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, England)  
Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)  
BSA (Bovines Serumalbumin) (Serva, Heidelberg)  
Butanol (J.T. Baker, Griesheim)  
Calciumchlorid (Merck, Darmstadt)  
Chloroquin (Sigma, Deisenhofen)  
Dimethylsulfoxid (Sigma, Deisenhofen)  
Dithiothreitol (Sigma, Deisenhofen)  
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Karlsruhe)  
dNTP's (Promega, Madison, USA)  
EDTA (Merck, Darmstadt)  
EGTA (Sigma, Deisenhofen)  
Essigsäure (J.T. Baker, Griesheim)  
Ethanol (J.T. Baker, Griesheim)  
Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen)  
FCS (fetal calf serum) (Life Technologies, Karlsruhe)  
Glykogen (Roche Diagnostics, Mannheim)

Glucose (Sigma, Deisenhofen)

L-Glutamin (Life Technologies, Karlsruhe)

Glycerin (Sigma, Deisenhofen)

Glycin (AppliChem, Darmstadt)

Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt)

Hefeextrakt (Life Technologies, Karlsruhe)

N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (ICN, Eschwege)

Isopropanol (J.T. Baker, Griesheim)

Kaisers Glyceringelantine (Merck, Darmstadt)

Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt)

LipofectAmine2000<sup>TM</sup> (Life Technologies, Karlsruhe)

Lysozym (Applichem, Darmstadt)

Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)

Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) (Life Technologies, Karlsruhe)

Methanol (J.T. Baker, Griesheim)

2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)

Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma, Deisenhofen)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt)

Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt)

Natriumhydroxid (NaOH) (Merck, Darmstadt)

Neomycin (G418) (Calbiochem, Schwalbach)

Nonidet<sup>TM</sup> P-40 (Sigma, Deisenhofen)

Oligo (dT)12-18-Primer (Invitrogen, Carlsbad, USA)

OptiMEM (Life Technologies, Karlsruhe)

10 x PCR-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, Karlsruhe)

RPMI 1640 (Life Technologies, Karlsruhe)

Saccharose (Merck, Darmstadt)

Salzsäure (Merck, Darmstadt)

TEMED (Sigma, Deisenhofen)

Tris (Sigma, Deisenhofen)

Triton-X-100 (Sigma, Deisenhofen)

Trypanblau (Sigma, Deisenhofen)

Tween<sup>TM</sup> 20 (Serva, Heidelberg)

### **2.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Agarplatten mit 5 % Schafsblut (Becton Dickinson, Heidelberg)

Aufsatzkamera Progressive 3CCD (Sony, Köln)

Bakterienbrutschrank 2737 (Köttermann, Uetze)

Cell Scraper (Sarstedt, Nümbrecht)

Complete<sup>TM</sup> Mini-Proteasen-Inhibitoren Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim Columbia)

ECL-Detektions Kit<sup>TM</sup> (NEN, Brüssel, Belgien)

Einmalpipetten (steril) 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Greiner, Nürtingen)

Elektrophoresekammer, horizontal (Biometra, Göttingen)

Elektrophoresekammer, vertikal (Biometra, Göttingen)

Fastblot/Semi-Dry-Blot B33 (Biometra, Göttingen)

Feinwaage Mettler H20T (Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz)

Filmkassette mit Verstärkerfolie (Amersham, Freiburg)

Fotofilm Ektachrom 400 und 100 (Kodak, Rochester, USA)

Kühlzentrifuge 2 K 15 (Sigma, Deisenhofen)

Kühlzentrifuge GS-6G (Beckman, München)

## **2. Material und Methoden**

Kühlzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)  
Magnetrührgerät (Jürgens-Omnilab, Hannover)  
Mikroskop BX60 (Olympus, Hamburg)  
3MM Filterpapier (Whatman, Göttingen)  
Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim/Main)  
Nunc-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden)  
PCR-Maschine (Biometra, Göttingen)  
Phasenkontrastmikroskop (Hund, Wetzlar)  
pH-Meter MP220 (Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz)  
Photometerplatten zur DNA-Bestimmung (Corning Costar, Bodenheim)  
Plastikküvetten (Sarstedt, Nümbrecht)  
Polypropylenröhrchen (Reagiergefäß, 15 ml, 50 ml) (Greiner, Nürtingen)  
PVDF-Membran, Immobilon-P (Millipore, Eschborn)  
Reaktionsgefäß (1,5 ml) (Eppendorf, Hamburg)  
Röntgenfilme (HyperfilmMPTM) (Amersham, Freiburg)  
Schüttler für Bakterienkulturen (Edmund Bühler, Tübingen)  
Schwenkgerät (Red Rocker) (Amersham, Freiburg)  
Spannungsgerät (Life Technologies, Karlsruhe)  
Sterilarbeitsbank HERA safe (Heraeus, Hanau)  
Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)  
Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)  
Variopipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)  
Vortex (Jürgens-Omnilab, Hannover)  
Waage Sartorius MC1 (Sartorius, Göttingen)  
Wasserstrahlpumpe Plastibrand PP (Jürgens-Omnilab, Hannover)  
Zellkulturbrutschrank (Heraeus, Hanau)  
Zellkulturflaschen 5 ml mit Filter (Nunc Life Technologies, Karlsruhe)

Zellkulturflaschen, -platten und -schalen (Greiner, Nürtingen)

### **2.1.6. Kits**

Cell Death Detection ELISAPLUS (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Histostain<sup>®</sup>-Plus-Kit (Zymed Laboratories INC., San Francisco, USA)

In Situ Cell Death Detection, POD (Roche, Mannheim)

Qiagen Endofree Maxi Kit (Qiagen, Hilden)

Qiashredder (Qiagen, Hilden)

Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

### **2.1.7. Medien und Lösungen**

Alle Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt; bei Puffern, die für die Verwendung in einer PCR oder zur Aufarbeitung von RNA vorgesehen waren, kam Ampuwa<sup>®</sup>-Wasser (Fresenius) zur Anwendung. Die Puffer und Lösungen wurden bei nicht anders lautender Angabe wie angegeben eingesetzt. Hier nicht aufgeführten Puffer oder Lösungen sind bei der Beschreibung der jeweiligen Methode gesondert angeführt.

Soweit erforderlich wurden die verwendeten Lösungen und Puffer autoklaviert (45 min; 1 bar, 120°C) oder sterilfiltriert (0,22 µm Filtermembran). Alle Lösungen und Puffer wurden bei nicht anderslautender Angabe bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.1.8. Kultur von Bakterien und Zellen

#### Medien für die Kultur von *H. pylori*

Columbia-Agar Platten:	12,0 g pankreatisch abgebautes Casein 5,0 g peptisch abgebautes Tiergewebe 3,0 g Hefeextrakt 3,0 g Rindfleischextrakt 1,0 g Maisstärke 5,0 g NaCl 13,5 g Agar 5 % defibriniertes Schafblut
Flüssigkulturmedium	38 g/l BHI 2,5 g/l Hefe-Extrakt 10 % FCS sterilfiltriert
Eingefriermedium	Flüssigkulturmedium mit 10 % Glycerin

#### Medien für die Kultur von *E. coli*

LB-Vollmedium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl add 1000 ml ddH <sub>2</sub> O pH 7,5 eingestellt mit 1M NaOH
---------------	---

## **2. Material und Methoden**

Antibiotika-Stammlösung.: Ampicillin 1 g/20 ml (ddH<sub>2</sub>O)

Arbeitskonzentration: Ampicillin 100 - 150 µg/ml

Agar-Platten: Dem LB-Flüssigmedium wurden 1,5 % (w/v) Agarose (MCM) zugesetzt. Zusätzlich wurde Antibiotikum in der entsprechenden Arbeitskonzentration zugegeben.

### **Medien und Puffer für die Zellkultur**

Gebrauchsmedien für die Zellzucht: RPMI 1640 Medium mit Glutamin  
FCS 10 %, hitzeinaktiviert  
Penicillin/Streptomycin 100 U  
L-Glutamin 200 mmol/l

Einfriermedium: Gebrauchsmedium mit 10 % DMSO

Trypsinlösung: 90 ml PBS  
10 ml Citratlösung  
10 ml 1 % Glucose-Lösung (w/v)  
0,14 g Trypsin





### 2.1.9.5 Immunhistologie

Fixierungslösung:	95 % Ethanol 5 % Essigsäure
Waschlösung:	0,1 % TTBS
SCTX100:	0,1 % Natriumcitrat 0,1 % Triton X-100
Tunel-Reaktionslösung:	1 Teil Enzymlösung 9 Teile Labellösung
DAB-Substratlösung:	30 µl DAB-substrate-solution 1:10 mit DAB-Buffer verdünnen
Zellgegenfärbelösung	1 % Methylengrün

### 2.1.9.6 Plasmid-Minipräp

Lösung 1	50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung 2	200 mM NaOH 1 % SDS



### 2.1.10. Restriktionsenzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktions- und DNA-modifizierenden Enzyme wurden von New England Biolabs und Boehringer-Mannheim bezogen.

### 2.1.11. Plasmide

pGEX6P3 (Amersham Pharmacia Biotech)

pcDNA4 (Invitrogen)

### 2.1.12. Antikörper

Für den Western Blot wurden die im folgenden aufgeführten 1. Antikörper und 2. Antikörper von Alexis Biochemicals, Amersham, BD Bioscience, Calbiochem, Oncogene, Pharmingen, ProSci Incorporated, Santa Cruz Biotechnology und R&D verwendet.

#### 1. Antikörper

Ziege polyclonal anti-human Actin

Maus monoclonal anti-human Bcl-2

Maus monoclonal anti-human Caspase-8

Maus monoclonal anti-human Caspase-9 p-10

Maus monoclonal anti-human Cyclin E

Maus monoclonal anti-human Cytochrom c

Ziege polyclonal anti-human DcR1

Kaninchen polyclonal anti-human DcR2

#### Firma

Santa Cruz Biotechnology

Santa Cruz Biotechnology

Oncogene

Santa Cruz Biotechnology

Pharmingen

R&D

Alexis Biochemicals

ProSci Incorporated

## 2. Material und Methoden

Kaninchen polyclonal anti-human DR4	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen polyclonal anti-human Fas	Santa Cruz Biotechnology
R2/DR5 Ziege polyclonal anti-human TRAIL-R3	R&D
Kaninchen polyclonal anti-human FasL	Santa Cruz Biotechnology
Maus monoclonal anti-human p21	BD Bioscience
Maus monoclonal anti-human p53	Pharmingen
Kaninchen polyclonal anti-pp53 (pSer <sup>15</sup> )	Oncogene
Ziege Polyclonal anti-human Smac	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen polyclonal anti-human TRAIL	Santa Cruz Biotechnology
Maus polyclonal anti-human Hsp60	Calbiochem

### 2. Antikörper

	<u>Firma</u>
Esel anti-Ziege IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Esel anti-Kaninchen IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Ziege anti-Maus IgG-HRP	BD Bioscience

### **2.1.13. Oligonukleotide**

Für die PCR (Methode s. 2.3) verwendete Primer wurden von MWG Biotech bezogen.

Hsp60 Forward Primer mit angehängter EcoI Restriktionsschnittstelle:

5'-GTC AGA AGC CAC GAA TTC CGC AAA AGA AAT CAA ATT TTC AG-3'

Hsp60 Reverse Primer mit angehängter XhoI Restriktionsschnittstelle:

5'-CAG GAG TGC CTC GAG CAT CAT GCC GCC CAT G-3'

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Zellkultur

Die adhärent wachsende humane Mageneithelzelllinie AGS wurde in 250 ml Gewebekulturflaschen mit 10 ml RPMI 1640 Zellkulturmedium (supplementiert mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Begasungsbrutschrank kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschen und mit einer 0,13 %igen Trypsinlösung für eine Minute im Brutschrank inkubiert. Zum Trypsin wurde anschließend RPMI 1640 Zellkulturmedium zugegeben und die Zellen im Verhältnis 1:10 in frischem RPMI 1640 Zellkulturmedium resuspendiert und erneut ausgesät.

#### 2.2.2. Kultur und Ernten von *H. pylori*

*H. pylori* wurde auf Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafsblut unter mikroaerophilen Bedingungen (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) bei 37°C angezüchtet. Nach zwei Tagen hatte sich ein geschlossener Bakterienrasen gebildet, der für weiterführende Experimente verwendet werden konnte. Für die vorliegende Arbeit wurde der *H. pylori*-Stamm Hp87 mit den Passagen 5 - 8 verwendet. Zur Stammerhaltung wurden die Bakterien 20 % BHI, 10 % FCS, 10 % Glycerin bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3. Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen

Es wurde 1 ml einer *E. coli* Übernachtskultur in 100 ml RPMI 1640 Zellkulturmedium transferiert. Nach Kultivierung bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,4 wurde die Bakteriensuspension auf Eis abgekühlt. Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis bzw. in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge durchgeführt und die zugesetzten Lösungen waren vorgekühlt. Die gekühlte Bakteriensuspension wurde 10 min. bei 3500 rpm. zentrifugiert. Das

## **2. Material und Methoden**

---

Bakterienpellet wurde darauf mit 40 ml 100 mM MgCl<sub>2</sub> und mit 40 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Anschließend wurde das *E. coli* Pellet in 4 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, 20 min. auf Eis inkubiert, mit 400 µl Glycerin vermischt und, sofort in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert, welche darauf in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Zum Abschluss wurden die Aliquots mit den kompetenten Zellen bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.4. Aufreinigung von Hsp60 aus *Helicobacter pylori***

Die *Helicobacter pylori* Keime wurden von 40 Blutagarplatten in 100 mM Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und sonifiziert. Danach wurde durch zweimalige Ultrazentrifugation bei 50.000 rpm für 30 min bei 4°C ein Zellzytosol gewonnen. Mit CL-30 Millipore Konzentratoren wurde der proteinhaltige Überstand für die Beladung der Heparin-Säule nach Anleitung des Herstellers aufkonzentriert. Auf die Säule wurden dann 5 - 10 mg des aufkonzentrierten Proteins aufgetragen und ab Fraktion 10 mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten (0,1 - 2,0 M) eluiert.

Für Zellinkubationsexperimente wurden die proteinhaltigen Fraktionen gepoolt und für die Zellinkubationsversuche gegen RPMI 1640 Zellkulturmedium dialysiert. Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität von Hsp60 wurde die gepoolten Fraktionen gegen die ATPase Reaktionslösung umdialysiert.

### **2.2.5. Inkubation von AGS-Zellen mit Reagenzien, Proteinen und Caspase-Inhibitoren**

Für die Kokultivierung-Experimente wurden die AGS-Zellen 24 Std. zuvor passagiert, damit sie zum Inkubationsstart eine Konfluenz von 70 - 90 % hatten. Dafür wurden sie je nach weiterführender Fragestellung mit unterschiedlichen Zellzahlen und Kulturvolumina in

verschiedene große Zellkulturplatten passagiert. Direkt vor dem Inkubationsstart wurde das RPMI 1640 Zellkulturmedium gewechselt. Zum frischen Zellkulturmedium wurden darauf entsprechend der experimentalen Anordnung die Konzentrationen an Reagenzien, Proteinen und Caspase-Inhibitoren zugeführt.

### **2.2.6. Methoden zur Quantifizierung der Apoptose**

Die Apoptose von Zellen wurde mittels verschiedener Methoden, wie z.B. Histon-Elisa, Caspase-3 Aktivitätsmessung, Tunel-Immunhistologie oder durch FACS-Messung von mit Propidiumjodid gefärbten Zellen, bestimmt.

#### **2.2.6.1 In vitro Caspase-Aktivitätsmessung**

In 6-Wellplatten wurden 250.000 Zellen/Well 24 Std. in RPMI 1640 Medium + 10 % FCS kultiviert. Das RPMI 1640 Zellkulturmedium wurde direkt vor Zugabe von Hsp60 gewechselt. Nach der Inkubation mit Hsp60 wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen in 200 µl Lysispuffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, mit einer Kanüle sechsmal geschert und für 30 min. auf Eis lysiert. Die Trennung der Zelltrümer vom Proteinlysate erfolgte mit 15.000 rpm für 5 min. bei 4°C. Die Messung der Caspaseaktivität im Proteinlysate erfolgte in 96 Wellplatten. Dafür wurden zwei Reaktionsansätze je Probe angesetzt. Die Reaktionsansätze bestanden aus 1x Reaktionspuffer, AFC-Substrat und waren mit oder ohne einem spezifischen Caspase Inhibitor angesetzt.

Die Messung der Caspaseaktivität erfolgte in 100 µl einer 96 Wellplatte als dreifach Bestimmung nach 60 und 120 Min. bei 390 nm (Ex) und 510 nm (Em).

### 2.2.6.2 Tunel

Während der Apoptose von Zellen kommt es zu DNA-Strangbrüchen, dessen 3'OH Enden mittels der Tunel Methode immunhistologisch markiert werden können. An einem Lichtmikroskop können danach die apoptotischen Zellen identifiziert werden.

Auf die in 24 Well-Platten befindlichen sterilisierten Deckgläschen wurden 50.000 Zellen passagiert und für 24 Std. kultiviert. Das RPMI 1640 Zellkulturmedium wurde direkt vor Inkubation mit Hsp60 gewechselt. Nach der Inkubation mit Hsp60 für 24 Std. wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen für max. 5 min. mit Fixierungslösung fixiert und einmal mit 0,1 % TTBS gewaschen. Nach jedem der folgenden Schritte wurden die Zellen bis zur Abstoppreaktion zweimal gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurde die Zellen mit 0,3 % Wasserstoffperoxid für 10 min. inkubiert. Auf Eis folgte eine Inkubation mit SCTX100 für 2 min. Die mit 30 µl Tunel Reaktionsmix bedeckten Zellen wurden für 1 Std. bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 30 µl DAB Substartlösung für 30 - 60 sek. inkubiert und die Reaktion mit 0,1 % TTBS abgestoppt. Zum Schluss wurden die ungefärbten Zellen mit Methylengrün ca. 15 Sek. gegengefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurden die durch die Substratreaktion bräunlich-rot angefärbten, apoptotischen Zellen im Lichtmikroskop ausgezählt.

### 2.2.6.3 Histon-ELISA

An die Nukleosomen bindende DNA ist im Gegensatz zur internukleosamalen DNA in den Linker-Regionen vor Endonukleasen geschützt. Während der Apoptose spalten die Endonukleasen die DNA in 180 bp große Mono- und Oligonukleosomen, die mit dem *Cell Death Detection* ELISA Kit nachgewiesen werden können.

Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von 50.000/Well in 24-Well Platten ausgesät und für 24 Std. bei 37 °C, um die Zellen adhären zu lassen, in RPMI 1640 Zellkulturmedium inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit den Testsubstanzen für 24 Std. Anschließend wurden die Platten 10 min bei 960 x g zentrifugiert, Zellkulturmedium abgesaugt, 1 ml

Lysispuffer auf die Wells pipettiert und 30 min. bei RT inkubiert. Die Platten wurden im weiteren 10 min. bei 960 x g zentrifugiert, um die zytoplasmatische Fraktion mit den Mono- bzw. Oligonukleosomen abzutrennen. Von der zytoplasmatischen Fraktion wurden 20 µl auf eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Des Weiteren wurden 80 µl des Immunomixes, bestehend aus Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-Peroxidase zugegeben und für 2 h auf einem Schüttler mit 300 U/min bei RT inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit 200 µl Inkubationspuffer wurden überschüssige Antikörper von der Mikrotiterplatte entfernt. Nach der Inkubation von 100 µl Substratlösung für 15 Minuten bei RT wurden die gebundenen Mono- bzw. Oligonukleosomen bei einer OD von 405 nm quantifiziert.

### **2.2.6.4 FACS (Nicoletti-Färbung)**

Propidiumiodid ist ein in doppelsträngigen Nukleinsäuren interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Von mit Propidiumiodid gefärbte Zellen können die Zellzyklusphasen einer Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Zellen in der G1-Phase enthalten einen einfachen Chromosomensatz (2n), Zellen in der G2/M-Phase (4n) einen doppelten und Zellen in der S-Phase enthalten einen dazwischen liegenden Chromosomensatz (Synthesephase > 2n). Apoptotische Zellen befinden sich im Histogramm aufgrund ihrer erhöhten Granularität in der SubG1-Phase.

Dafür wurden die mit Hsp60 inkubierten  $5 \times 10^5$  Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und in 5 ml PBS aufgenommen. Die für 15 min. und 100 x g bei RT pelletierten Zellen wurden danach in 200 µl Kernfärbelösung aufgenommen und für 15 Minuten bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten mit 200 µl RNase A Lösung inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl FACS-Messpuffer wurden die Zellen bis zur Messung im FACScalibur in Aluminiumfolie lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Gemessen wurden in einem Histogramm die Beschaffenheit der einzelnen Zellen nach FSC (Zellgröße) und SSC (Granularität). In einem zweiten Histogramm wurden zum anderen die verschiedenen Propidiumiodid-Intensitäten (FL-2) der Zellen gemessen. Beides erfolgte parallel bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und 520 nm.

### **2.2.7. ATPase Aktivitätsmessung**

Die ATPase-Aktivität wurde nach der Methode von Carter und Karl (1982) bestimmt. Dazu wurde 1 ml Reaktionspuffer mit 50 µg Protein und 10 mM Salzlösung (NaCl, KCl oder NH<sub>4</sub>Cl) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 2 mM Tris-ATP gestartet. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 1 N HCl gestoppt. 1 ml von dieser Lösung wurde darauf mit 0,7 ml Molybdatlösung und 0,3 ml Malachitgrünlösung versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml 7,8 %iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das gebildete Phosphat bei 625 nm gemessen.

### **2.2.8. Immunhistologische Quantifizierung der Zellproliferation mittels BrdU**

5-Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Basenanalogen. Wenn es im Überschuss im Zytosol vorkommt, wird es von den Zellen während der S-Phase anstelle des endogenen Thymidins in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Auf diese Weise kann die Zellproliferation von Zellpopulationen immunhistologisch durch Vergleich der BrdU positiven Zellen miteinander verglichen werden.

Hierfür wurden 100.000 Zellen/Well auf Deckgläschen in einer 12-Well Platte passagiert. Dem RPMI 1640 Zellkulturmedium wurde 100 µg BrdU / ml Medium zugesetzt, damit die Zellen das im Überschuss vorkommende BrdU anstelle des Thymidins in die neu synthetisierte DNA inkorporieren. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen für max. 5 min. mit Fixierungslösung fixiert und dreimal mit 0,1 % TTBS gewaschen. Nach jedem der folgenden Schritte wurden die Zellen bis zur Abstoppreaktion zweimal gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Zellen mit 0,3 % Wasserstoffperoxid für 10 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurde nach dem Protokoll des Zymed Kits die Zellen weiter behandelt. Zusammengefasst wurden die Zellen mit 1 Tropfen Lösung A für 15 min., dann für 60 min. mit dem BrdU Antikörper und nach dreimaligen Waschen mit PBS mit einem Tropfen B für 15 min. bei RT inkubiert.

### **2.2.9. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgt aufgrund ihres relativen Molekulargewichts mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Unter reduzierenden Bedingungen werden die Proteine durch SDS im Probenpuffer proportional zur Anzahl ihrer Aminosäure mit negativen Ladungen besetzt, sodass sie in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe bzw. Ladung aufgetrennt werden können.

Für die denaturierende Auftrennung von Proteinlysaten wurden je nach Größe des zu analysierenden Proteins ein 7,5 bis 12,5 % Polyacrylamid Trenngel mit einem darüber befindlichen 5 % Sammelgel gegossen. Die Proteine wurden 1:4 mit Probenpuffer verdünnt, für 5 min. bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Je nach Proteingröße wurden zwei verschiedene Standards mitlaufen gelassen.

### **2.2.10. Western Blot**

Der Western Blot ist eine sensitive Methode, um Proteine ab einer Konzentration von 100 - 200 ng mittels Antikörper autoradiographisch auf einem Film zu detektieren.

Die im Polyacrylamid Gel enthaltenen Proteinbanden wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die proteinfreien Flächen mit Magermilchproteinen abgesättigt. Anschließend wurde die Membran nacheinander mit einem spezifischen Antikörper und einen gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörper, inkubiert. Nach der jeweiligen Antikörper-Inkubation wurde dieser durch mehrmaliges Waschen mit TTBS von den nichtspezifischen Bindungspositionen entfernt. Zum Schluss wurde die Membran mit einem Substratgemisch aus Cumarsäure, Luminol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, welches die an den 2. Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase umsetzte. Nach dieser Methode wurde daraufhin das von der Peroxidase erzeugte Signal auf einem Film autoradiographisch detektiert.

### 2.2.11. Ponceau-Färbung

Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese in Ponceau-Färbelösung für einige Minuten inkubiert. Der Farbstoff band auf der Membran die immobilisierten Proteine reversibel und ermöglicht somit eine genaue Beurteilung der Blotqualität und der aufgetrennten Proteine. Der Ponceau Farbstoff wurde während der Inkubation mit der Blocklösung zum Absättigen der Membran für den Western Blot wieder entfernt.

### 2.2.12. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinproben wurde mittels des Bradford-Tests (Bradford, 1976) bestimmt. Dieser Assay beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie *brilliant blue* G250 von 465nm auf 595 nm bei Bindung an Proteine. Für den Bradford-Test wurden 2  $\mu$ l Proteinextrakt mit 798  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O und 200  $\mu$ l Farbstoffkonzentrat (BioRad) verdünnt, gut durchmischt und bei Raumtemperatur kurz inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei 595 nm photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einer BSA-Eichreihe ermittelt.

### 2.2.13. Klonierung einer Hsp60 Sequenz mit terminalen Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Mit der PCR wird eine DNA-Sequenz durch zwei den Sequenzbereich komplementär flankierende synthetische Oligonukleotide spezifisch amplifiziert. Das Anhängen einer Restriktionsschnittstelle an das 5'-Ende des sense und antisense Oligonukleotids ermöglichte die Klonierung des Amplifikats in ein Plasmid. Für die Amplifizierung der 1,7 kb großen Hsp60 cDNA Sequenz wurde die Pfx-Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet.

## 2. Material und Methoden

Die PCR funktioniert nach einer längeren Anfangdenaturierung nach einem sich mehrmals wiederholenden dreistufigen Zyklus:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge bei 95°C.
2. Anlagerung der synthetischen Oligonukleotide an die komplementäre DNA-Sequenz im Bereich der Schmelztemperatur des Oligonukleotids.
3. Elongation der Oligonukleotidprimer durch eine DNA-Polymerase bei 72°C.

Die Amplifikation der Hsp60-Sequenz erfolgte nach der folgenden Zyklen:

<u>Schritt</u>	<u>Zyklen</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
<b>Anfangsdenaturierung</b>	1	95°C	5 min.
<b>Denaturierung</b>		95°C	30 sek
<b>Anlagerung</b>	25	63°C	30 sek
<b>Elongation</b>		72°C	30 sek
<b>End-Elongation</b>	1	72°C	2 min.
<b>Endlagerung</b>	1	4°C	Endlos

Reaktionsansatz: 10x Accu Prime Reaktionsmix  
10 µM Sense Primer  
10 µM antisense Primer  
5 µl DNA  
2 U Pfx-Polymerase  
add 50 µl destH<sub>2</sub>O

Die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern > 20 bp:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times n(\text{AT}) + 4^\circ\text{C} \times n(\text{GC})$$

Die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern  $< 20$  bp ( $n$  = Anzahl der Basenpaare):

$$T_m = 59,8^\circ\text{C} + 0,41 (\%GC) - 675/n$$

Für die weitere Verwendung wurde das Amplifikats von Salzen und Nukleotiden durch die Phenolfällung gereinigt.

### 2.2.14. Hsp60-Sequenzierung

Das pGEX-6P-3 Plasmid mit der einklonierten Hsp60 Sequenz wurde zur Sequenzierung an GATC-Biotech (Konstanz) verschickt. Dort wurde die Hsp60 Sequenz mittels *Primer walking* sequenziert. Es wurden dafür von GATC-Biotech drei Primer verwendet. Die Überprüfung des Sequenzierergebnisses erfolgte mit der Software von Chromas (Technelysium Pty. Ltd.) und Vector NTI (Invitrogen).

### 2.2.15. RNA-Extraktion aus *Helicobacter pylori*

Die RNA wurde aus *H. pylori* mit dem RNeasy Kit nach dem entsprechenden Protokoll (RNeasy *Mini Protocol for Isolation of total RNA from Bacteria*, S. 56 - 60, Die Qiagen Juni 2001) extrahiert. Dazu wurde das *H. pylori* Suspensionpellet in 100  $\mu\text{l}$  Lysozym aufgenommen und 5 min. bei RT inkubiert. Zur Suspension wurden zuerst mit 350  $\mu\text{l}$  RLT-Buffer, dann mit 250  $\mu\text{l}$  100 %igem Ethanol vermischt und auf RNeasy-Säule überführt. Durch Zentrifugierung wurde das Lysat durch die Matrix gezogen, wobei Nukleinsäuren an der Matrix haften blieben. Die Nukleinsäuren wurden mit 700  $\mu\text{l}$  RW1- und darauf zweimal mit 250  $\mu\text{l}$  RPE-Waschpuffer gewaschen. Zum Schluss wurde mit 30 - 50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser die RNA per Zentrifugation eluiert.

### 2.2.16. Quantifizierung von Ribonukleinsäuren

Die RNA-Quantifizierung mit dem Spektrometer war die einfachste und schnellste Methode. Dabei war von Vorteil, dass Nukleinsäuren ein spezifisches Adsorptionsmaximum bei 260 nm besitzen, wobei eine  $OD_{260} = 1,0$  der gemessenen Probe 40  $\mu\text{g}$  RNA/ml entspricht.

Für die Quantifizierung der RNA wurden die eluierten Ribonukleinsäuren in bidestilliertem Wasser verdünnt, damit die OD der Messlösung im linearen Quantifizierungsbereich des Spektrometers (OD 0,1 - 1,0) sich befindet. Die Quantifizierung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:  $OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 = \mu\text{g RNA} / \text{ml}$

### 2.2.17. Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Die reverse Transkription der mRNA in cDNA erfolgte mit dem Omniscript™ Kit nach dem entsprechenden Protokoll (*Omniscript™ Reverse Transkriptase Handbook*, S. 9 - 19, Qiagen April 1999). Für den Reaktionsansatz wurden 0,5 mM dNTP mix, 1  $\mu\text{M}$  Oligo(dT), 12,5 Units RNase Inhibitor, 2  $\mu\text{g}$  RNA und 4 Units reverse Transkriptase in 1x RT-Puffer angesetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

### 2.2.18. Ligation von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente mit dem QiaEx II Kit von Salzen und Nukleotiden befreit, damit diese nicht die nachfolgende Transformation behindern. Die Ligationen wurden in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Um das Insert-DNA / Vektor-DNA Verhältnis für den Ligationsansatz zu bestimmen, wurde zuvor deren optisches Verhältnis zueinander mit einem Agarosegel-Lauf ermittelt. Dementsprechend wurde für den Ansatz ein Volumen an Insert-DNA gewählt, sodass die Konzentration der Insert DNA höher als die der Vektor-DNA

war. Des Weiteren bestand der Ligationsansatz aus 1x Ligationspuffer und 1U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, 1 U/ $\mu$ l).

### **2.2.19. Transformation**

Für die Transformation von Vektor-DNA in kompetente *E. coli* Stämme wurden die Bakterien zuerst auf Eis aufgetaut. Zu 100  $\mu$ l kompetenten Zellen wurden 5  $\mu$ l des Ligationsansatz zugegeben und für 20 min. auf Eis inkubiert. Darauf folgte zunächst eine Inkubation von 47 sek. bei 42°C, dann 2 min. auf Eis und nach Zugabe von 900  $\mu$ l LB-Medium<sup>-Amp</sup> für weitere 20 min. auf einem Schüttler bei 37°C. Nach Pelletierung der *E. coli* Bakterien für 2 min. bei 3500 x g wurden 800  $\mu$ l vom Überstand verworfen. Das Pellet wurde in den verbliebenen 200  $\mu$ l resuspendiert und auf den bei 37°C vorgewärmten LB-Medium<sup>+Amp</sup> Platten steril ausplattiert. Ungefähr nach 12 Std. waren Einzelklone für die weitere Analyse auf den Platten gewachsen.

### **2.2.20. Klonierung von Hsp60 in den pGEX-6P-3 Vektor**

Die amplifizierte Hsp60-Sequenz wurde über die bei der PCR angehängten Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI in das Plasmid kloniert. Dazu werden 2  $\mu$ g Plasmid und das aufgereinigte Hsp60 Amplifikat zusammen im NEB-Puffer 2 für 2 - 3 Std. bei 37°C verdaut. Das mit destH<sub>2</sub>O aufgefüllte Endvolumen des Reaktionsansatzes war 30  $\mu$ l.

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und nach den DNA-Fragmentlängen hin aufgetrennt. Bevor das Hsp60 DNA-Fragment mit dem Vektor ligiert wurde, wurden die beiden Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QiaExII Kit aufgereinigt. Für die Ligation wurden dann die beiden aufgereinigten Fragmente in Gegenwart von 1x Ligationspuffer für 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 16°C miteinander ligiert. Zur Überprüfung der Ligation wurden 2  $\mu$ l der

Ligation in den *E. coli*-Stamm XL-10 Gold transformiert, um durch Ausplattieren auf einer LB-Medium<sup>+Amp</sup>-Platte Einzelklone zu erhalten.

### **2.2.21. Mini Plasmid-DNA Präparation**

Für eine Mini-Plasmid-DNA Präparation wurde am Vortag mit sterilen 10 µl Eppendorfspitzen Einzelklone von der LB<sup>+Amp</sup>-Platte gepickt, und damit 3 ml LB/Ampicillin-Vorkulturen angeimpft. Nach der Übernacht-Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttler wurden 1,5 ml der Vorkulturen 2 min. bei 4000 rpm. pelletiert. Die Pellets wurden darauf in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und für 5 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde der Präparationsansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Das darin enthaltene SDS löste die bakterielle Zellwand auf und denaturierte die Proteine. Durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 wurde die Lysierung gestoppt, wodurch es zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den neutralen Bereich kam. Die im alkalischen Bereich denaturierte chromosomale DNA und bakteriellen Proteine präzipitierten aufgrund ihrer Unlöslichkeit. Nach Zentrifugation bei 15000 rpm. für 5 min. wurde die lösliche Plasmid-DNA mit 500 µl Ethanol präzipitiert, kurz luftgetrocknet und mit 70 % Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde das Plasmid-DNA-Pellet in 30 - 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert.

### **2.2.22. Maxi Plasmid-DNA Präparation**

Größere Mengen reiner, endotoxinfreier Plasmid-DNA wurden mit dem Plasmid Endofree Maxi Kit nach den Protokollen des Herstellers Qiagen extrahiert. Das Prinzip dieser Plasmid Maxi-Präparation beruht zuerst auf einer alkalischen Lyse mit den Kit-Komponenten. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule gereinigt und am Ende durch Isopropanolfällung aufkonzentriert. Mit diesen Präparationsansätzen ließen sich zwischen 200 - 500 µg Plasmid-DNA isolieren.

### 2.2.23. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die DNA wurde mit dem QiAquick Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers aus Agarose-Gelen extrahiert.

Für die Extraktion von DNA wurde die gewünschte DNA-Fragmentbande aus Agarose-Gelen mit einem Skalpell unter UV-Licht geringer Intensität ausgeschnitten, gewogen und dem Protokoll entsprechend in Lösung gebracht. Am Ende wurde die an die Säule gebundene DNA gewaschen und mit 2 x 30 µl Wasser eluiert.

### 2.2.24. Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren

Geringe Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden mit Ethanol, Isopropanol oder einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch aus wässrigen Lösungen gefällt, um sie für weitere Reaktionsschritte zu entsalzen und aufzukonzentrieren.

#### Ethanol-Fällung

Für die Ethanolfällung wurde zuerst 0,1 Volumenteile 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gefolgt von 2,5 Volumenteile 100 % Ethanol zu der DNA haltigen Lösung zugegeben. Die DNA wurde zuerst 20 min. bei -80°C gefällt und danach 20 min. lang bei 14000 rpm. und 4°C pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, um die mitgefällten Salze zu entfernen. Zum Abschluss wurde die DNA kurz luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen aufgenommen.

#### Isopropanolfällung

Isopropanol wurde anstelle von Ethanol verwendet, um das Gesamtvolumen einer Fällung möglichst gering zu halten. Zur DNA-Lösung wurden 0,6 Volumenteile 100 % Isopropanol

zugegeben. Die Präzipitatbildung erfolgte bei RT, sodass sofort mit der ersten Zentrifugation gemäß dem Protokoll zur Ethanol-Fällung fortgefahren werden konnte.

### Phenolextraktion

Mit der Phenolextraktion wurden die PCR-Produkte gefällt, um die proteinfreie DNA für weitere enzymatische Reaktionen zu präparieren. Das Amplifikat wurde zunächst auf 100 µl aufgefüllt, mit dem gleichem Volumenteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gevortext und bei 15000 rpm 1 min. zentrifugiert. Von der oberen wässrigen Phase wurde ohne Berührung der weißen proteinhaltigen Interphase der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

Nach Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µl 100 % Ethanol wurde die DNA 20 min. bei -80°C inkubiert und danach für 20 min. bei 4°C und 15.000 rpm pelletiert. In einem weiteren Waschschrift wurde zum Pellet 500 µl Ethanol zugegeben und danach die Lösung für 5 min. bei 15.000. rpm pelletiert. Das vom Überstand befreite Pellet wurde zum Schluss kurz luftgetrocknet, um es dann in einem entsprechenden Volumen für den nachfolgenden Versuch aufzunehmen.

### **2.2.25. Induzierung der Hsp60-Überexpression in E. coli mit IPTG**

Das Plasmid pGEX-6P-3 von Amersham ist mit einer IPTG Bindungsstelle vor dem 5'-terminalen Ende der MCS konstruiert. Dies ermöglicht durch Zugabe von IPTG zum LB-Flüssigmedium die selektive Expression von der in der MCS einklonierten Nukleinsäuresequenz.

Für die Überexpression der in die MCS einklonierten Hsp60-Sequenz von *H. pylori* wurde die Übernachtskultur 1:10 verdünnt und weiter bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Erreichen von OD<sub>600</sub>= 0,6 - 0,8 wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG die Expression des rekombinanten Hsp60 induziert.

### 2.2.26. Aufreinigung des Gluthation-S-Transferase Hsp60 Fusionproteins

Nach zweistündiger Überexpression des rekombinanten Hsp60 wurden die Bakterien sedimentiert (4000 rpm., 4°C, 15 min., JA-10 Rotor), in einer 100 ml eiskalten PBS/Lysozym Lösung resuspendiert und durch 2 x 30 sek. sonifizieren lysiert. Die Bakterentrümmer wurden sedimentiert (12000 rpm., 4°C, 20 min., JA-20 Rotor) und der Überstand für 60 min. bei RT mit 3 ml Gluthation-Agarose, die zuvor von der 20 % Ethanol Aufbewahrungslösung durch mehrmaliges Waschen mit PBS ausverdünnt wurde, inkubiert. Die Gluthation-Agarose wurde sedimentiert (500 rpm., 4°C, 5 min., Rotor) und mehrmalig mit PBS gewaschen. Für die Elution des Hsp60-GST Fusionsproteins von den Beats wurden diese auf eine Säule überführt und mit reduzierter Glutathionpuffer eluiert. Das Eluat wurde PreScission Protease über Nacht bei 4°C verdaut, um den GST-Tag von dem rekombinanten Hsp60 abzuspalten. Am nächsten Tag wurde der Reaktionsansatz mit frischen Glutathion-Agarosebeats für 60 min. inkubiert und auf eine Säule überführt. Der Durchfluss sowie die mit PreScission Proteasepuffer eluierten Fraktionen enthielten das fertig aufgereinigte rekombinante Hsp60. Von den gesammelten Fraktionen wurden Aliquots für die Bestimmung der Proteinkonzentration sowie der Proteinreinheit abgenommen, um diese mit dem Bradford-Assay und anhand eines SDS-Polyacrylamidgel mit nachfolgendem Blot und Poinceau-Färbung zu analysieren. Die Eluate wurden für weitere Zellinkubationsexperimente aliquotiert und bei -80°C gelagert.

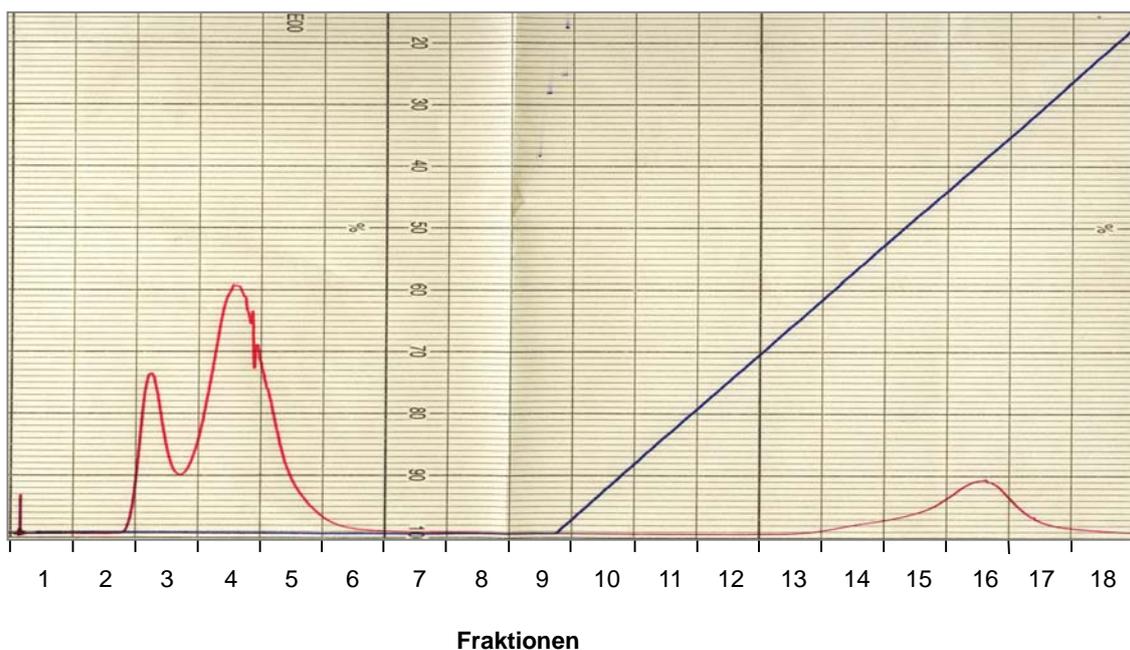
### 2.2.27. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte mit dem Student's t-Test für paarige Stichproben. Als signifikant galten Werte von  $p < 0,05$ .

### 3. Ergebnis

#### 3.1. Isolierung von Hsp60 aus *Helicobacter pylori*

Hsp60 wurde mittels Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zellinkubationsexperimente mit dem aufgereinigten nativen Hsp60 zeigten, dass 10 µg natives Hsp60 eine doppelt so hohe Apoptose nach 24 Std. in AGS-Zellen wie in Kontrollzellen induzierte. In dieser Arbeit sollte daher die Hsp60-induzierte Apoptose bei AGS-Zellen näher bestimmt werden, sowie andere Einflüsse auf AGS-Zellen nachgewiesen werden.



**Abb. 5: Elution des an die Heparin-Säule gebundenen nativen Hsp60.** Die Elution von spezifisch an die Säulenmatrix gebundenen Proteinen erfolgte mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradient (0,1 - 2,0 M, blaue Linie), welche in den Fraktionen 14 - 16 (roter Peak) aufgefangen gesammelt wurde. An die Heparin-Säule nicht gebundene Proteine wurden in den Fraktionen 3 - 6 (roter Doppelpeak) als Säulen-Durchfluss aufgenommen.

Hierfür wurde eine Heparinsäule mit ultrazentrifugierten Sonifikatüberstand beladen. Der

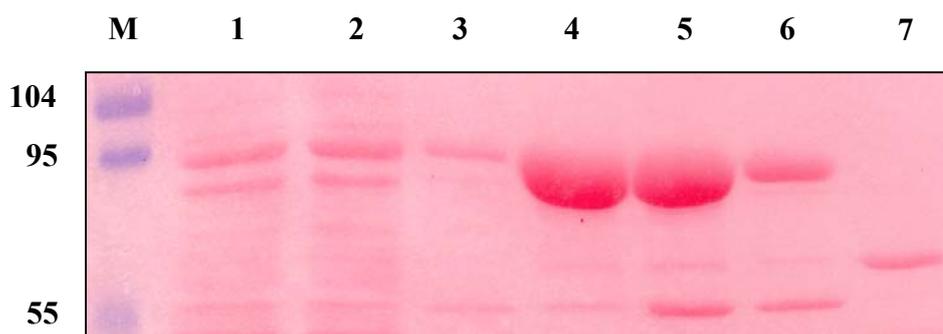
Hauptteil der im Sonifikatüberstand enthaltenen Proteine wurde mit dem Durchfluss in den Fraktionen 2 - 6 aufgefangen. Im Elutionsprotokoll ist dieses an dem Doppelpeak zu erkennen.

Die aus dem *H. pylori* Sonifikat an die Heparin-Säule spezifisch gebundenen Hsp60-Proteine, wurden mit einem linear-aufsteigendem NaCl Gradienten um Fraktion 14 - 15 eluiert. Weiter Proteinfractionen wurden nicht mit dem NaCl Gradienten eluiert (Abb. 5).

Das nach dieser Aufreinigungsmethode eluierte native Hsp60 wurde für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

#### 3.2. Aufreinigung des rekombinant hergestellten Hsp60 von *Helicobacter pylori*

Für die spezifische Isolierung des rekombinanten Hsp60 (~ 60 kDa) aus *E. coli* wurde es mit einem GST-Tag (~ 28 kDa) am N-Terminus fusioniert. Die Überexpression erfolgte in dem *E. coli*-Stamm XL-10 Gold (Stratagene) oder in dem proteasendefizienten Stamm BL21 (Amersham).

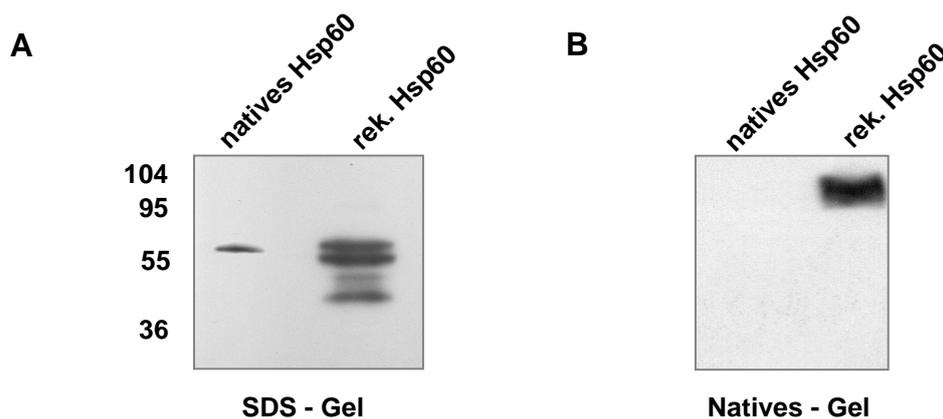


**Abb. 6: Isolierung vom rekombinanten Hsp60 aus *E. coli*:** M: Proteinmarker (kDa); 1: *E. coli* Pellet; 2: Sonifikatüberstand; 3: Überstand GST-Beats; 4, 5, 6: GSH-Hsp60-Eluate 1, 2, 3 von der Säule mit GST-Beats; 7: PreScission Protease Verdau des Hsp60 Eluat 3.

Für die spezifische Isolierung des rekombinanten Hsp60 (~ 60 kDa) aus *E. coli* wurde es mit

einem GST-Tag (~ 28 kDa) am N-Terminus fusioniert. Die Überexpression erfolgte in dem *E. coli*-Stamm XL-10 Gold (Stratagene) oder in dem proteasendefizienten Stamm BL21 (Amersham).

Das im Überstand des abzentrifugierten Sonifikats befindliche rekombinante Hsp60 wurde durch Inkubation mit GST gekoppelten Beads aus dem Überstand isoliert. An die Beads gebundene rekombinante Hsp60 Proteine wurden mit reduziertem Glutathion-Puffer eluiert. Gleichzeitig wurde durch diese Aufreinigungsmethode das überexprimierte rekombinante Hsp60 aufkonzentriert (Abb. 6, Spur 4-6). Zum Abschluss wurde der 28 kDa GST-Tags vom Hsp60 mittels der Prescission Protease spezifisch abgespalten, was zu einer ~ 60 kDa Hsp60 Bande führte (Abb. 6, Spur 7).



**Abb. 7: Western Blot Analyse von nativen und rekombinanten Hsp60.** Vergleich des Laufverhaltens von isolierten nativen Hsp60 aus *H. pylori* und dem rekombinanten Hsp60 aus *E. coli* im denaturierenden SDS Gel (A) und im nichtdenaturierenden nativen Gel (B).

Der Vergleich des aus *H. pylori* isolierten nativen Hsp60 mit dem rekombinanten Hsp60 zeigte bei der Detektion mittels eines humanen Hsp60 Antikörpers im Western Blot Unterschiede. Bei dem isolierten nativen Hsp60 wurde bei ~ 60 kDa durch den humanen anti-Hsp60 Antikörper eine spezifische Proteinbande detektiert. Dagegen wurden beim rekombinanten Hsp60 drei dicke Proteinbanden, bei ~ 60 kDa, ~ 55 kDa, und ~ 40 kDa, von dem humanen anti-Hsp60 Antikörper detektiert (Abb. 7 A).

Im nativen Gel wurde zusätzlich das Laufverhalten der beiden Hsp60 Proteine miteinander verglichen. Dazu wurde die gleiche Proteinmenge aufs SDS-Gel aufgetragen. Von dem humanen anti-Hsp60 Antikörper wurde nur das rekombinante Hsp60 Protein im Western Blot in Form von einer Bande detektiert. Das isolierte Hsp60 aus *H. pylori* konnte in dem nativen Gel hingegen vom humanen anti-Hsp60 Antikörper nicht detektiert werden (Abb. 7 B).

#### 3.3. Vergleich der ATPase Aktivität und der Apoptose induzierenden Effekte von Hsp60 mit rekombinanten Hsp60

Die Kationen-stimulierbare ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) ATPase Aktivität und der Apoptose induzierende Effekt von dem rekombinant hergestellten Hsp60 wurde mit dem aus *H. pylori* isolierten nativen Hsp60 verglichen. Dadurch sollte untersucht werden, ob die im Western Blot zuvor beobachteten Unterschiede zwischen dem rekombinanten und dem nativen Hsp60 aus *H. pylori* die ATPase Aktivität bzw. die Hsp60 induzierte Apoptose beeinflussten.

	natives Hsp60 [ $\mu\text{M Pi}/\text{mg Protein h}$ ]	rek. Hsp60 [ $\mu\text{M Pi}/\text{mg Protein h}$ ]
<b>Kontrolle</b>	1,6 $\pm$ 0,27	1,1 $\pm$ 0,16
<b>10 mM NaCl</b>	5,5 $\pm$ 0,30	0
<b>10 mM KCl</b>	5,2 $\pm$ 0,73	1,8 $\pm$ 0,31
<b>10 mM NH<sub>4</sub>Cl</b>	11,8 $\pm$ 4,40	8,5 $\pm$ 1,62

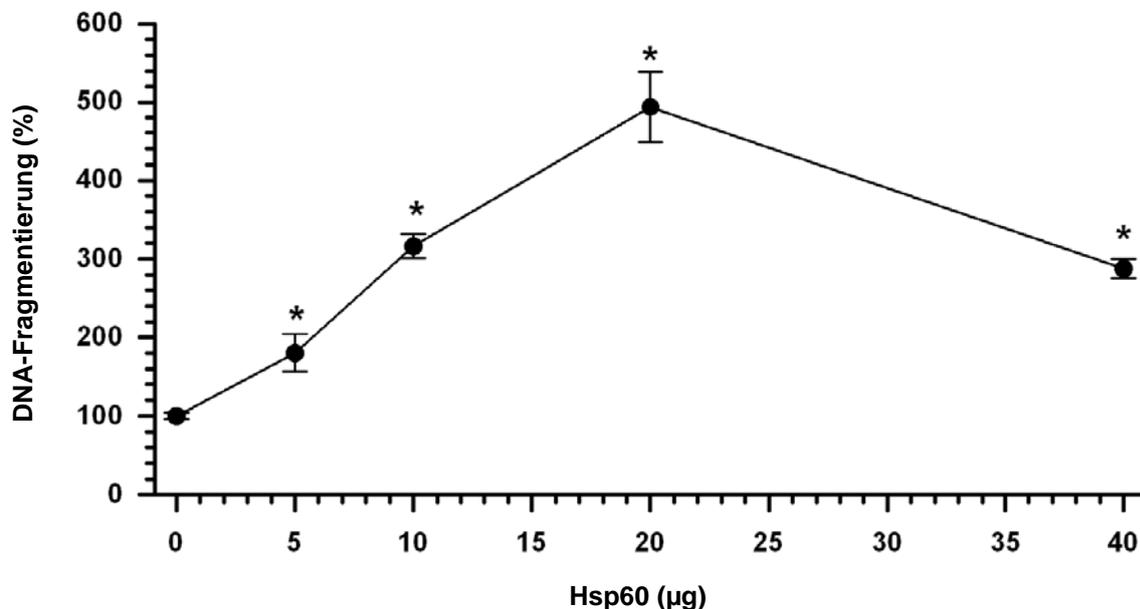
**Tab. 2: Vergleich der ATPase Stimulierbarkeit von HpHsp60 und recHpHsp60.** Durch Inkubierung mit  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  Ionen wurde die Stimulierbarkeit der ATPase Aktivität von nativen Hsp60 mit der von rek. Hsp60 verglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle

Mit  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ - Ionen wurde eine Verdreifachung der ATPase Aktivität bei dem isolierten nativen Hsp60 gemessen. Eine Aktivierung der ATPase vom rekombinanten Hsp60 ließ sich hingegen durch  $\text{Na}^+$ -Ionen nicht messen. Mit  $\text{K}^+$ - Ionen wurde bei rekombinanten Hsp60 beinahe eine Verdopplung der ATPase Aktivität gemessen. Die höchste Stimulierbarkeit der ATPase wurde mit  $\text{NH}_4^+$ - Ionen erzielt. Beim rekombinanten und dem aus *H. pylori* isolierten nativen Hsp60 wurde eine 6- bzw. 8- fache Erhöhung der ATPase Aktivität gemessen (Tab. 2). Beim Vergleich der Hsp60 induzierten Apoptose mittels Histon Elisa wurde bei dem aus *H. pylori* isolierten nativen Hsp60 nach einer Inkubation von 24 Std. eine Hsp60 induzierte Erhöhung der Apoptose um das 2 - 3 fache gemessen. Beim rekombinanten Hsp60 mit einer eingeschränkten ATPase Aktivität konnte hingegen keine erhöhte Apoptose in AGS-Zellen gemessen werden. Modifikationen in der Aufreinigung, sowie den Bedingungen der Überexpression in XL-10 Gold oder den Protease defizienten *E. coli* Bakterien zeigten keine Veränderungen bei der vom rekombinanten Hsp60 induzierten Apoptose.

Daher wurden für die folgenden Untersuchungen der Hsp60-induzierten Effekte in AGS Zellen nur mit aus *H. pylori* isolierten nativen Hsp60 durchgeführt.

### 3.4. Hsp60 aus *Helicobacter pylori* induziert Apoptose in AGS-Zellen

Die Hsp60 induzierte Apoptose in AGS Zellen wurde durch Detektion der oligonukleosomalen Fragmente in der cytoplasmatischen Fraktion mittels des Histon-Elisa gemessen. Zur Bestimmung des apoptotischen Effektes von nativen Hsp60 auf AGS-Zellen wurden diese mit verschiedenen Proteinkonzentrationen inkubiert. Die Quantifizierung der oligonukleosomalen Fragmente in der zytoplasmatischen Fraktion der AGS-Zellen zeigte eine signifikante Erhöhung der Hsp60-induzierten Apoptose in einer konzentrationsabhängigen Weise. (Abb. 8).

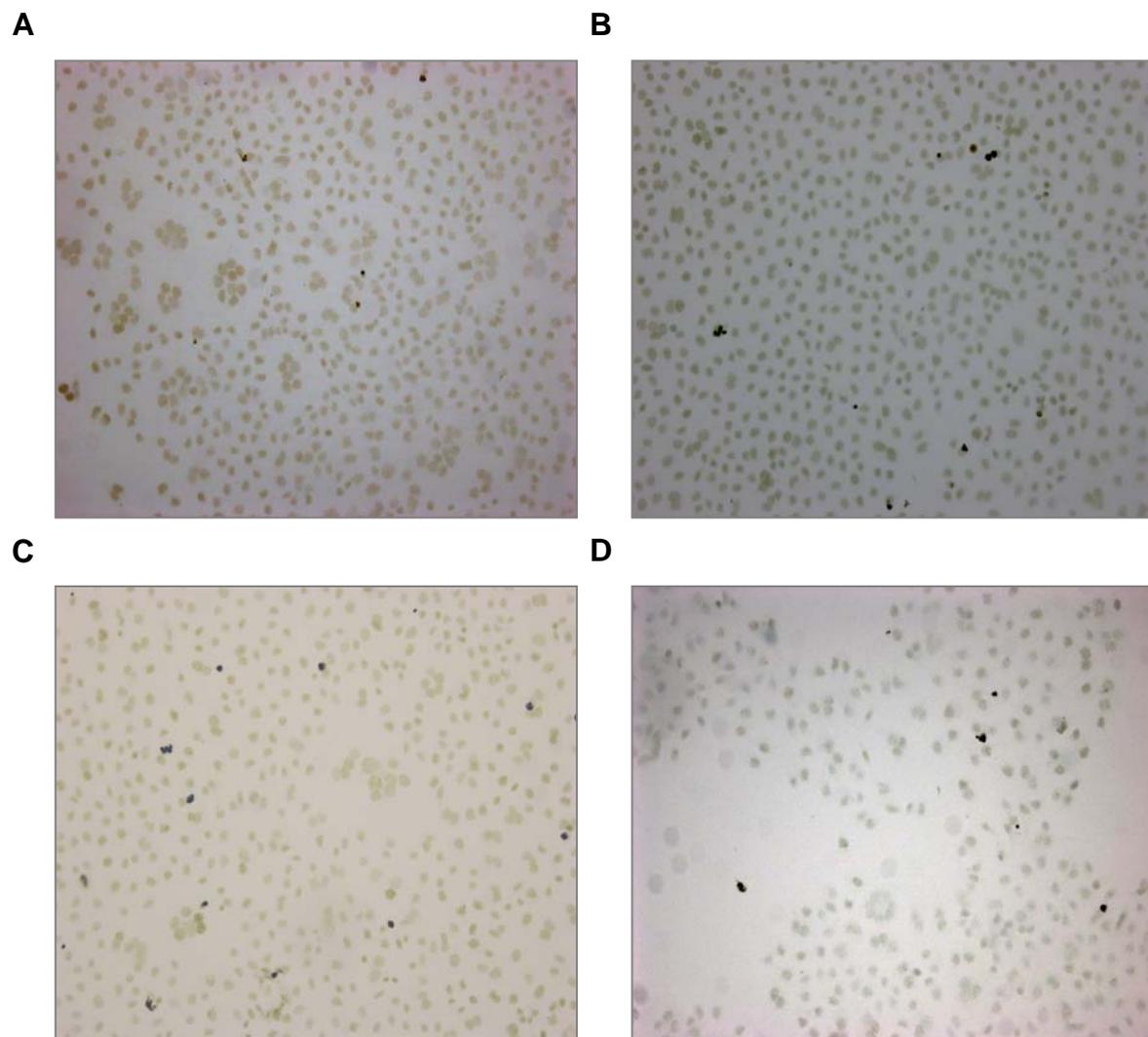


**Abb. 8: Hsp60 induziert DNA-Fragmentierung.** AGS-Zellen wurden für 24 Std. mit 5 - 40 µg nativen Hsp60 inkubiert. Messung der DNA-Fragmentierung erfolgte mit dem Histon-Elisa. Werte der Medium-Kontrolle (0 µg Hsp60) wurden auf 100 % gesetzt. Nachfolgende Konzentrationswerte stehen in Relation zu diesem Wert. Versuche wurden dreimal als Triplicats durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle

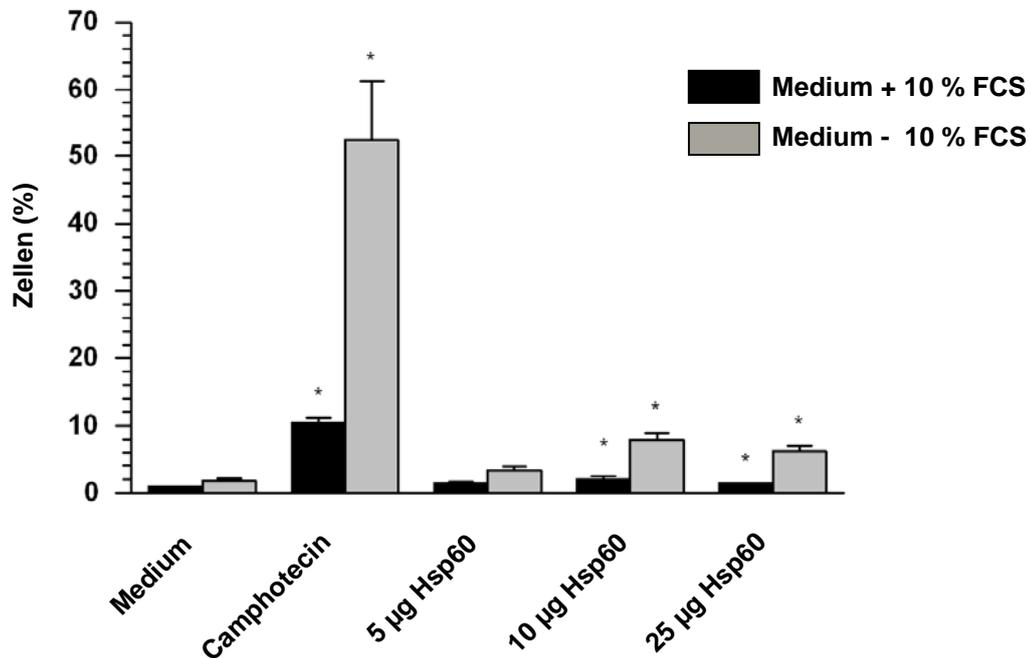
Die Hsp60-induzierte Apoptose stieg von 180 % bei 5 µg auf 316 % bei 10 µg bis auf 495 % bei 20 µg nativen Hsp60 an. Bei 40 µg Hsp60 lag die Apoptoserate bei 288 %.

#### 3.5. FCS-Zusatz im Zellkulturmedium hemmt die Hsp60-induzierte Apoptose

Um die Hsp60-induzierte Apoptose mit einer weiteren Methode nachzuweisen, wurden die mit Hsp60 inkubierten Zellen nach einer 24stündigen Inkubation mit der Tunel-Methode immunhistologisch nach DNA-Strangbrüchen hin untersucht. Zusätzlich wurde der Fragestellung nachgegangen, inwieweit das im RPMI 1640 Zellkulturmedium enthaltene 10 % FCS die Hsp60-induzierte Apoptose beeinflusst (Abb. 9).



**Abb. 9: Immunhistochemische Darstellung der Hsp60-induzierten Apoptose in AGS-Zellen mittels Tunel.** AGS-Zellen wurden für 24 Std. ohne Hsp60 (A) oder mit 5 µg (B), 10 µg (C), 25 µg Hsp60 (D) in FCS defizienten Medium inkubiert. Die von Hsp60 in den Zellen induzierten DNA-Strangbrüche wurden mit der Tunel-Methode immunhistologisch detektiert.



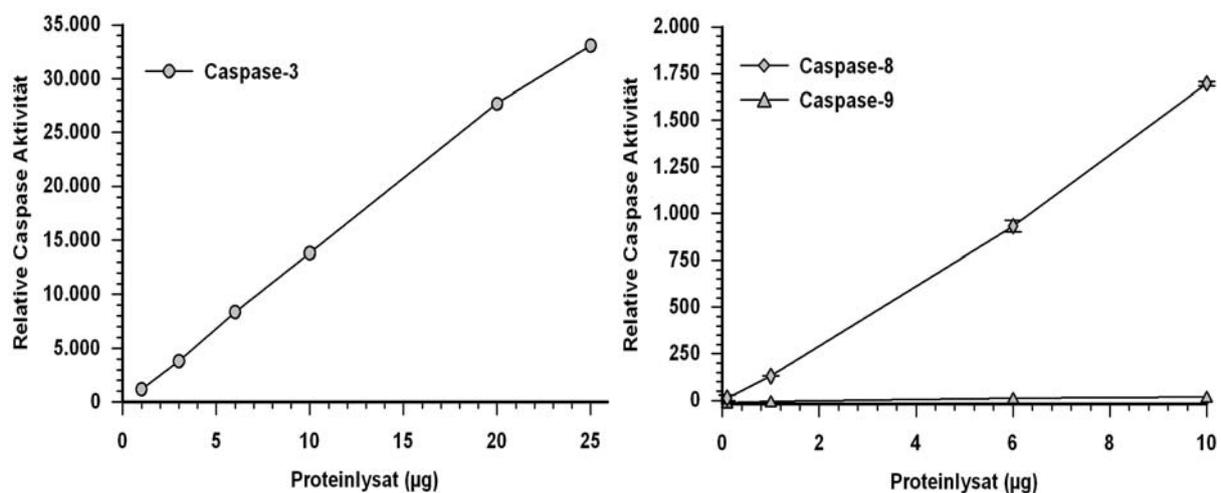
**Abb. 10: FCS beeinflusst die Hsp60 induzierte Apoptose.** AGS-Zellen wurden für 24 Std. mit Camptothecin (Positivkontrolle) bzw. 5 - 25 µg Hsp60 in RPMI 1640 Zellkulturmedium mit und ohne 10 % FCS inkubiert. Die Auswertung der apoptotischen Zellen erfolgte immunhistologisch mittels Tunel-Färbung. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM mit \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen.

Mit der Tunel Methode konnte die Hsp60-induzierte Apoptose bestätigt werden, auch wenn nach dieser Methode mit 10 µg nativen Hsp60 die meisten apoptotischen Zellen detektiert wurden (Abb. 10).

In Gegenwart von 10 % FCS im RPMI 1640 Zellkulturmedium stieg die Apoptose bei 5 µg auf 1,5 %, bei 10 µg auf 2,0 % und bei 25 µg nativen Hsp60 auf 1,4 %. Die Verwendung von FCS defizienten RPMI 1640 Zellkulturmedium verstärkte die Hsp60-induzierte Apoptose im Vergleich zum mit 10 % FCS supplementierten Zellkulturmedium in AGS-Zellen. Die Apoptose stieg in Abwesenheit von FCS bei 5 µg nativen Hsp60 auf 3,3 %, bei 10 µg auf 7,8 % und bei 25 µg auf 6,2 % an, währenddessen von den Kontrollzellen nur 1,8 % immunhistologisch im Tunel positiv waren.

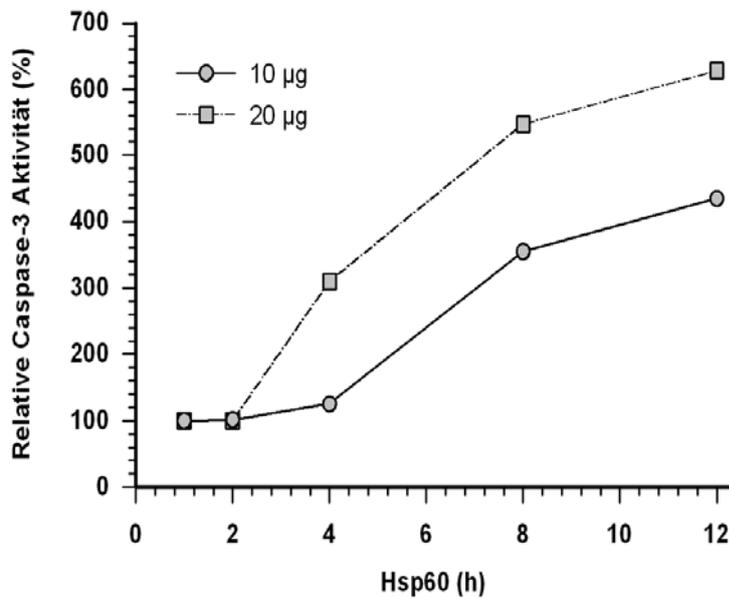
### 3.6. Hsp60 Inkubation von AGS-Zellen aktiviert Caspase-3

Die Messung der Aktivität von Effektorcaspase-3 ist ein Nachweis für Zell-Apoptose. Durch die Aktivitätsmessung der Initiatorcaspasen-8 und -9 kann zudem eine Aussage über den induzierten Apoptose-Typ getroffen werden. Bevor die Aktivität der Caspasen über die Zeit gemessen wurde, wurde zuerst der lineare Aktivitätsbereich der Caspasen-3, -8 und -9 bestimmt (Abb. 11).



**Abb. 10: Aktivierung von Caspase-3, -8 und -9 durch ansteigende Proteinmengen aus AGS-Zellen.** Die AGS-Zellen wurden über 24 Std. mit 10 µg Hsp60 inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Versuchen mit \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle

Die Messung des Proteinlysats von mit 10 µg nativen Hsp60 für 24 Std. inkubierten AGS-Zellen zeigte für Caspase-3 einen linearen Bereich von 1 - 25 µg. Für Caspase-8 lag dieser bei 0,1 - 10 µg. Für die Caspase-9 konnte hingegen keine proteolytische Aktivität in einem Konzentrationsbereich von 1 - 25 µg des Proteinlysats detektiert werden.



**Abb. 11: Hsp60 induziert konzentrationsabhängig die Caspase-3 Aktivität.** AGS-Zellen wurden ohne (Kontrolle) und mit 10 und 20 µg nativen Hsp60 für bis zu 12 Std. inkubiert. Die Caspase-3 Aktivität wurde bestimmt durch Abzug der gemessenen Caspase-3 Aktivität der Kontrolle von den mit Hsp60 inkubierten Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Um den durch Hsp60-induzierten Typ der Apoptose zu bestimmen, wurde die zeitliche Aktivierung der Caspasen gemessen. Dazu wurde die Caspase-Aktivität der Caspase-3 mit 5 µg Proteinlysate und für Caspase-8 mit 10 µg Proteinlysate gemessen.

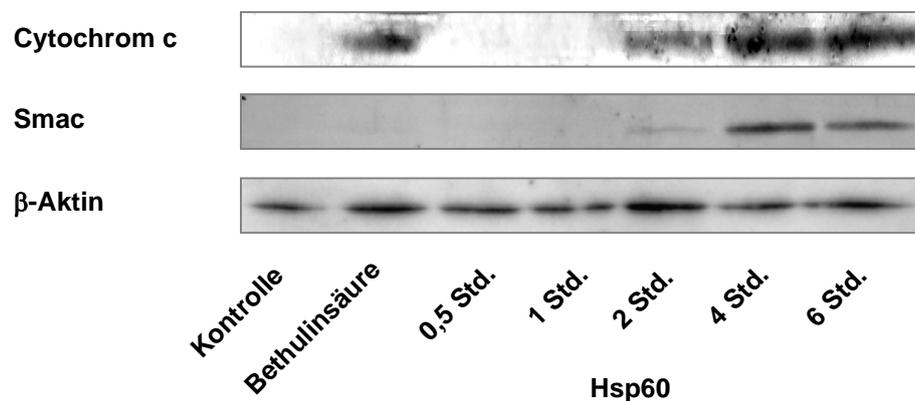
Die zeitliche Aktivierung der Caspase-3 durch Inkubation der AGS Zellen mit 10 µg nativen Hsp60 stieg nach 4 h auf 125 % bzw. bei 20 µg auf 309 %, um nach 12 Std. bei 10 µg einem Plateau von ~ 435 % bzw. bei 20 µg auf 629 % sich anzunähern (Abb. 12). Die Messung der Aktivität von Caspase-8 und -9 zeigte keine Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen.

Für die Bestätigung der Ergebnisse zu Caspase-8 und -9 wurde mittels der Western Blot Methode der Frage nachgegangen, ob es zu einer Prozessierung der Procaspasen zu den aktiven Caspasen kommt. Bei einer Beladung der Gelfaschen mit 50 µg Proteinlysate konnte keine Prozessierung der Caspasen durch die Detektion von 10 kDa bzw. 20 kDa Banden,

prozessierten p10 und p20 Fragmente, festgestellt werden. Bei einer Zeitkinetik von mit *H. pylori* inkubierten AGS-Zellen konnte im Western Blot die Prozessierung der Procaspasen-8 und -9 zu den aktiven Caspasen detektiert werden.

#### 3.7. Hsp60 induziert in isolierten Mitochondrien Cytochrom c und Smac Freisetzung

Die Mitochondrien nehmen im Apoptoseweg Typ II eine zentrale Funktion ein. Um einen möglichen Einfluss von Hsp60 auf die Mitochondrien direkt zu testen, wurden Mitochondrien aus AGS-Zellen isoliert und mit nativen Hsp60 inkubiert.

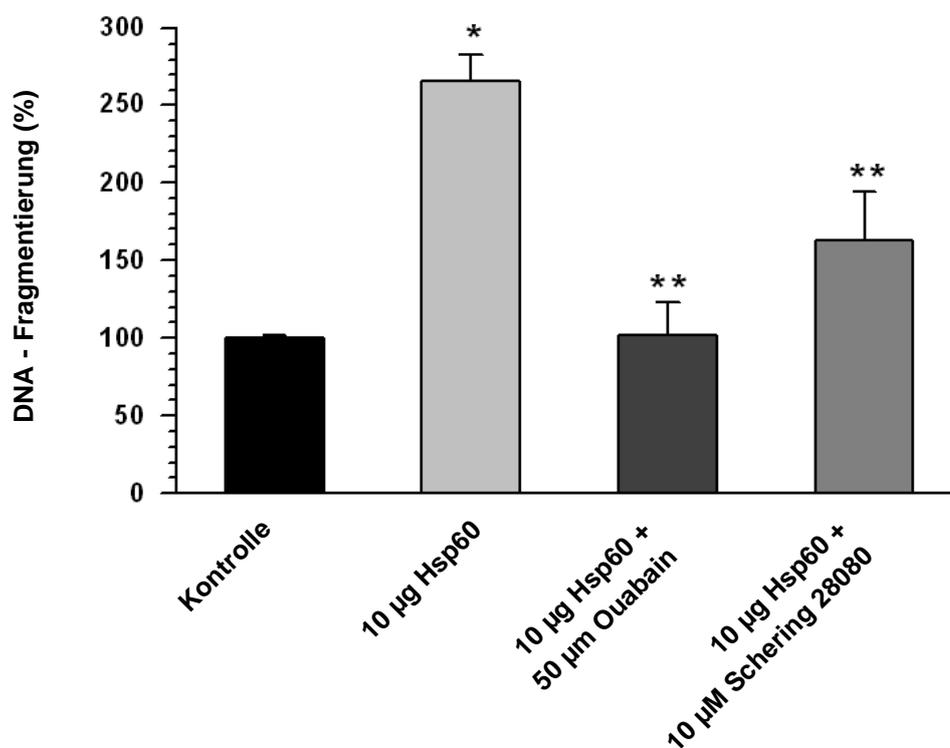


**Abb. 12: Hsp60 induziert die Freisetzung von Cytochrom c und Smac aus Mitochondrien.** Isolierte Mitochondrien wurden mit RPMI 1640 Zellkulturmedium (Negativkontrolle), Bethulinsäure (Positivkontrolle) bzw. mit 10 µg Hsp60 für 0,5 - 6 Std inkubiert. Die Proteindetektion erfolgte über Western Blot.

Die Inkubation von isolierten nativen Hsp60 mit isolierten Mitochondrien aus AGS-Zellen führte nach 2 Std. zur ersten Freisetzung von Cytochrom c und Smac aus den Mitochondrien. Nach 4 Std. wurde keine weitere Steigerung der freigesetzten Cytochrom c und Smac beobachtet (Abb. 13).

### 3.8. Ouabain hemmt die Hsp60-induzierte Apoptose

Durch Koinkubation von nativen Hsp60 mit Ouabain (einem selektiven Hemmstoff der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) und SCH28080 (einme selektiven Hemmstoff der  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase) sollte der mögliche Einfluss der ATPase von Hsp60 auf die Hsp60-induzierte Apoptose in AGS-Zellen aufgezeigt werden. Hierfür wurden 10  $\mu\text{g}$  natives Hsp60 alleine, und mit 50  $\mu\text{M}$  Ouabain bzw. 10  $\mu\text{M}$  SCH28080 für 24 Std. mit AGS-Zellen koinkubiert (Abb. 14).



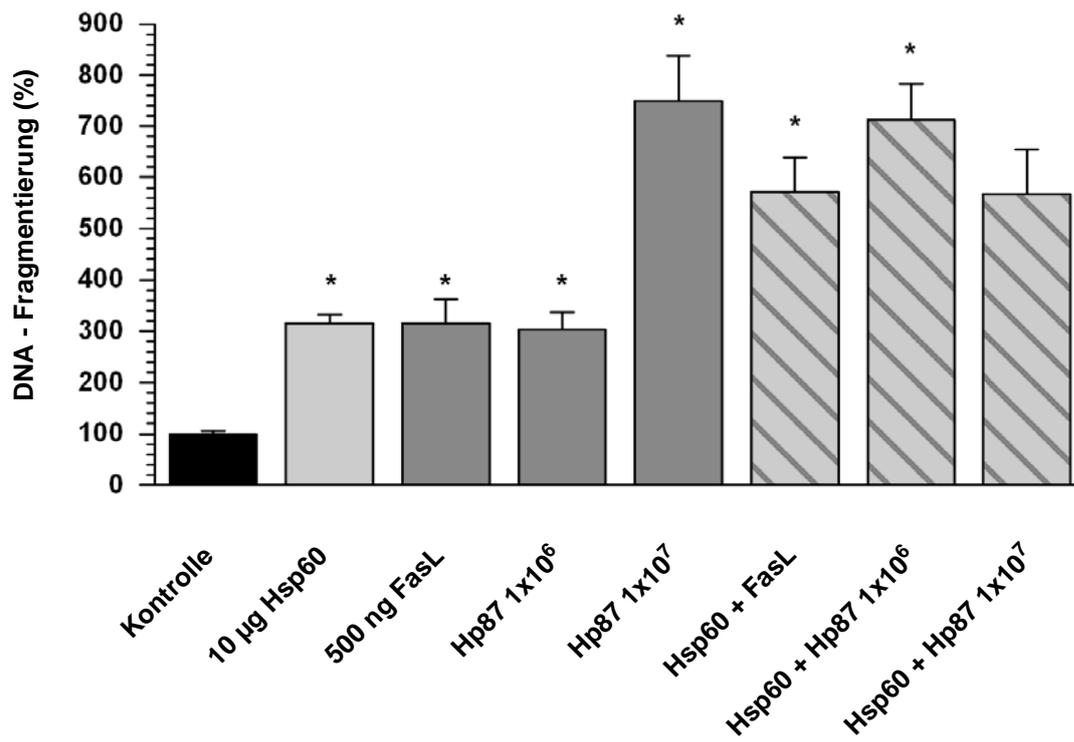
**Abb. 13: Ouabain und SCH28080 hemmen die durch Hsp60 induzierte Apoptose in AGS-Zellen.** Die Koinkubation von 10  $\mu\text{g}$  Hsp60 mit 50  $\mu\text{M}$  Ouabain bzw. 10  $\mu\text{M}$  Schering 28080. Gemessen wurde die DNA-Fragmentierung in den für 24 Std. inkubierten AGS-Zellen mittels Histon Elisa. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE aus drei unabhängigen Versuchen mit \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle bzw. \*\* =  $p < 0,05$  gegenüber Hsp60

Die

Die im Proteinlysat gemessene Caspase-3 Aktivität von mit nativen Hsp60 und Ouabain für 24 Std. koinkubierten AGS-Zellen zeigte, dass die von 10  $\mu\text{g}$  Hsp60 induzierte Caspase-3 Aktivität mit 50 mM Ouabain in AGS-Zellen von 207 % auf 34 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt wurde (Abb. 14).

### 3.9. Kofaktoren erhöhen die Hsp60 vermittelten Apoptose

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die Kofaktoren FasL und Hp87 die Hsp60 induzierte Apoptose beeinflussen. Dafür wurden 10 µg natives Hsp60 mit 500 ng FasL,  $5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Hp87-Keime für 24 Std. koinkubiert.



**Abb. 14: Additive Erhöhung der Hsp60 induzierten Apoptose durch FasL und  $1 \times 10^6$  *H. pylori* Keime.** AGS-Zellen wurden für 24 Std. mit Hsp60 und 500 ng FasL,  $1 \times 10^6$  oder  $1 \times 10^7$  *H. pylori* Keimen koinkubiert. Die Apoptose wurde mittels Histon Elisa gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle

Die Messung der Apoptose mittels Histon Elisa zeigte für natives Hsp60 ( $p < 0,0001$ ), FasL ( $p < 0,001$ ) und  $5 \times 10^6$  Hp87 ( $p < 0,0001$ ) eine signifikante Erhöhung der Apoptose auf ca. 300 %. Hp87 ( $1 \times 10^7$  Keime) verursachte einen max. Anstieg der Apoptose auf 700 % ( $p < 0,001$ ).

Die Koinkubation von nativen Hsp60 mit den Kofaktoren Fas und  $5 \times 10^6$  *H. pylori* Keimen führte zu einer additiven Erhöhung der Apoptose auf 580 % bzw. 690 %. Die Koinkubation von nativen Hsp60 mit  $1 \times 10^7$  *H. pylori* Keimen bewirkte hingegen keine weitere Zunahme der Apoptose (Abb. 15).

#### 3.10. Effekte von Kofaktoren auf die Hsp60 vermittelte Apoptose in AGS Zellen

Im Folgenden sollte der Einfluss von den Kofaktoren Fas und Hp87-Keimen auf die Hsp60 induzierte Apoptose sowie den Zellzyklus untersucht werden. Dazu wurden die AGS-Zellen mit 10 µg nativen Hsp60 und dem jeweiligen Kofaktor für 24 Stunden koinkubiert. Nach der Färbung mit Propidiumjodid wurden die Zellen nach Ihren Zellzyklusphasen sowie der Anteil von den in Apoptose befindenen Zellen mittels FACS quantifiziert.

<u>Zell-Inkubation</u>	<u>SubG1-Phase (%)</u>
Kontrolle	2,3 ± 0,5
10 µg Hsp60	4,6 ± 0,6*
1 µg FasL	4,6 ± 0,4*
$5 \times 10^6$ Hp87	6,7 ± 0,1*
$1 \times 10^7$ Hp87	6,0 ± 0,3*
10 µg Hsp60 + 1 µg FasL	6,6 ± 1,1*
10 µg Hsp60 + $5 \times 10^6$ Hp87	5,9 ± 1,1*
10 µg Hsp60 + $1 \times 10^7$ Hp87	10,1 ± 2,0*

**Tab. 3: Einfluß von FasL und *H. pylori* auf die Hsp60 induzierte Apoptose.** AGS-Zellen wurden für 24 Std. mit Hsp60 und FasL oder *H. pylori* koinkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen durch Messung der SubG1 Fraktion mittels FACS. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle

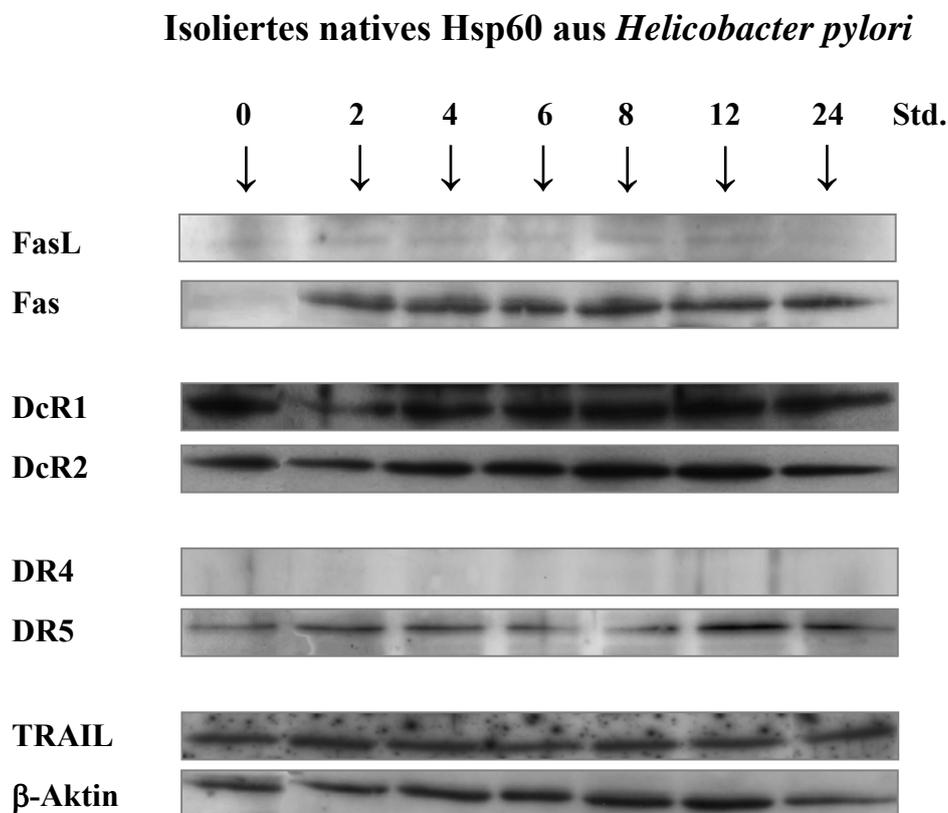
Die FACS-Messungen zeigten eine signifikante Erhöhung der in der SubG1-Phase enthaltenen apoptotischen Zellen um das zwei bis dreifache bei den mit nativen Hsp60 bzw. den Kofaktoren inkubierten AGS-Zellen von 2,3 % (Kontrolle) auf 4,6 - 6,7 %. Bei der Koinkubation von nativen Hsp60 mit FasL fand sich eine schwache additive Erhöhung der apoptotischen Zellen. Die Koinkubation von nativen Hsp60 mit zwei verschiedenen Konzentrationen von *H. pylori*-Keimen zeigte dagegen ein zweideutiges Ergebnis. Die Koinkubation von nativen Hsp60 mit  $5 \times 10^6$  Hp87-Keimen bewirkte keine signifikante Veränderung des Anteils der AGS-Zellen an der SubG1-Phase. Dagegen erhöhte sich der Anteil der AGS-Zellen an der SubG1-Phase additiv ( $0,05 < p$ ) gegenüber den Einzelwerten, wenn die AGS-Zellen mit Hsp60 und  $1 \times 10^7$  Hp87-Keimen inkubiert wurden (Tab. 3).

In der G2/M-Phase wurden bei den mit AGS-Zellen inkubierten Kofaktoren keine signifikanten Unterschiede gemessen.

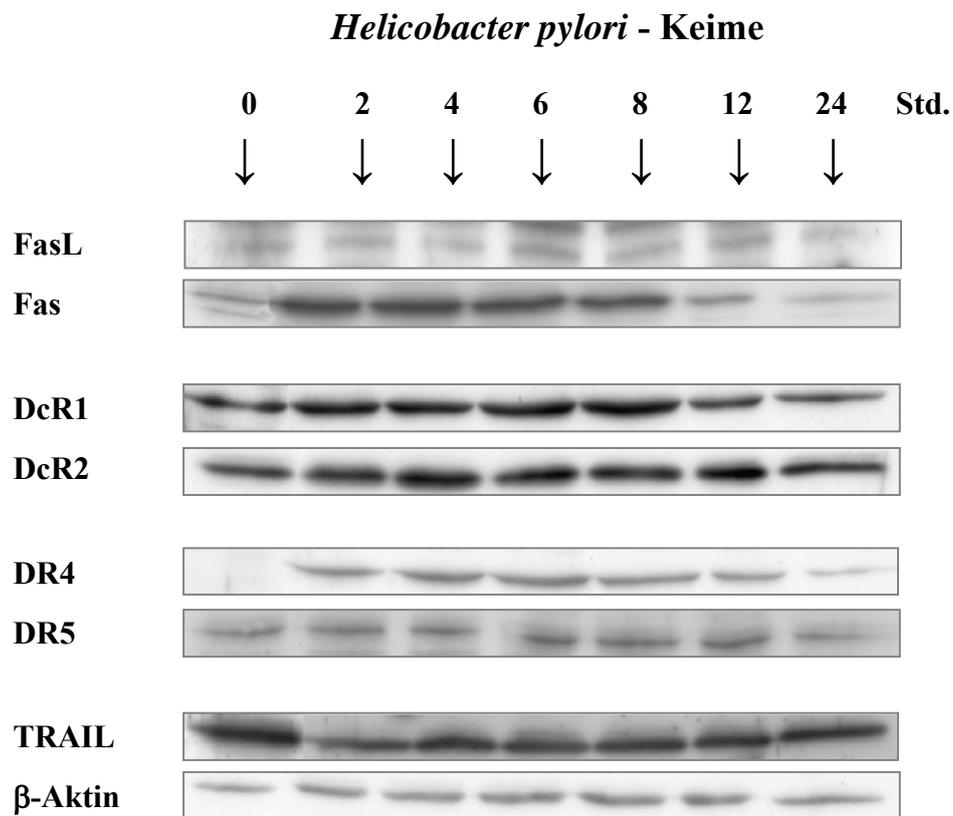
Zusätzlich wurden AGS Zellen auch mit Harnstoff oder Ammoniak einzeln oder zusammen mit nativen Hsp60 inkubiert. Auf die Hsp60 induzierte Apoptose hatten diese beiden Kofaktoren aber keinen Einfluss.

### 3.11. Hsp60 Regulierung von TRAIL und Fas Rezeptoren

Als nächstes wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von nativen Hsp60 auf die Expressierung von TRAIL, TRAIL-Rezeptoren, Fas und Fas-Ligand im Vergleich zu *H. pylori* untersucht. Dazu wurden die AGS-Zellen 0 - 24 Stunden mit 10 µg nativen Hsp60 oder Hp87-Keimen in Abwesenheit von FCS inkubiert.



**Abb. 15: Expression von FasL, FasR, DcR1, DcR2, DR4, DR5 und TRAIL Expression in mit Hsp60 inkubierten Zellen.** AGS-Zellen wurden für 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Std. mit 10 µg Hsp60 inkubiert. Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Ergebnisse sind aus zwei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 16: Expression von FasL, FasR, DcR1, DcR2, DR4, DR5 und TRAIL Expression in mit *H. pylori* inkubierten Zellen.** AGS-Zellen wurden für 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Std. mit  $1 \cdot 10^7$  *H. pylori*-Keimen inkubiert. Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Ergebnisse sind aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Expression der TRAIL-Rezeptoren DcR1, DcR2, DR5 und TRAIL wurden während der Inkubationszeit durch native Hsp60 oder Hp87 nicht beeinflusst. Der TRAIL-Rezeptor DR4 wurde mit Hp87 mit nativem Hsp60 hochreguliert. Die Expression des Fas-Rezeptors wurde 2 Std. nach Inkubationsbeginn mit nativen Hsp60 und Hp87-Keimen hochreguliert, aber nach 8 Std. zeigte sich im Gegensatz zu isolierten nativem Hsp60, dass die mit *H. pylori* inkubierten Zellen die Expression von Fas wieder herunterreguliert. (Abb. 16 + 17).

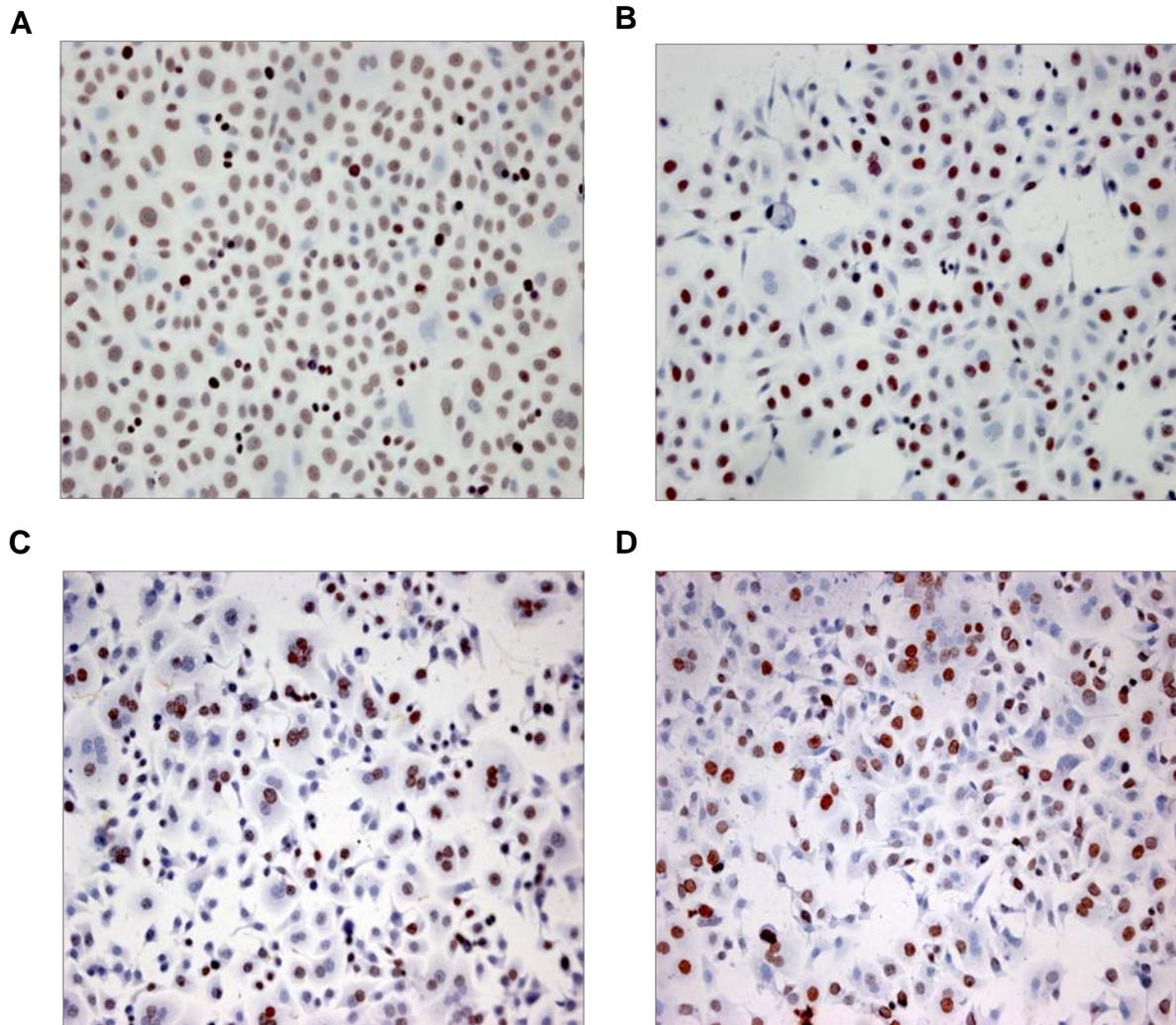
#### 3.12. Hsp60-induzierte Hemmung der Zellproliferation von AGS-Zellen

AGS-Zellen wurden mit nativem Hsp60 und dem Basenanalogen BrdU koinkubiert, um einen möglichen Einfluss von Hsp60 auf die Zellproliferation nachzuweisen. Die proliferierten Zellen ließen sich dabei von den nicht proliferierten ungefärbten Zellen durch die immunhistologische violette Markierung des inkorporierten BrdU im Zellkern leicht unterscheiden. Zusätzlich wurde neben dem Einfluss von Hsp60 auch der Effekt von dem im RPMI 1640 Zellkulturmedium enthaltenden 10 % FCS auf die Zellproliferation untersucht (Tab. 4 + Abb. 17).

	<b>Kontrolle (%)</b>	<b>10 µg Hsp60 (%)</b>
<b>Medium + 10 % FCS</b>	<b>91,4 ± 2,3</b>	<b>73,8 ± 5,1*</b>
<b>Medium - 10 % FCS</b>	<b>80,3 ± 0,9</b>	<b>75,3 ± 1,0</b>

**Tab. 4: Einfluß von Hsp60 +/- FCS auf die Zellproliferation von AGS-Zellen.** AGS-Zellen wurden für 24 Std. mit Hsp60 inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM mit \* = p < 0,05 gegenüber der Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen.

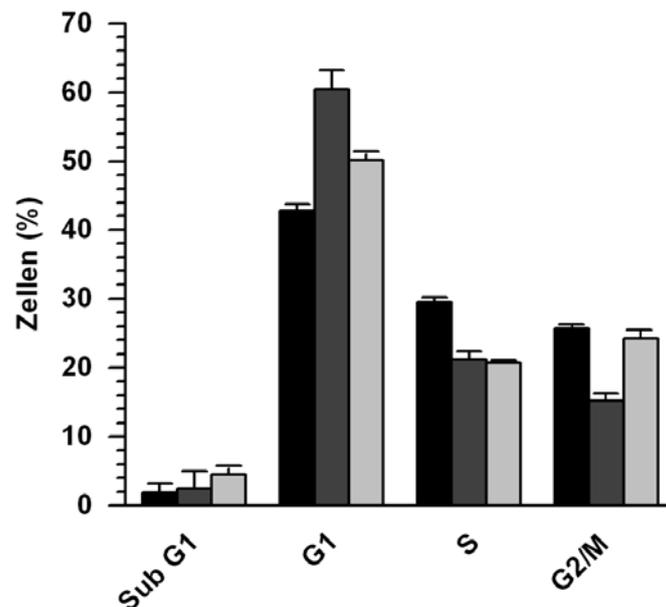
Die quantitative Auswertung der immunhistologisch positiv detektierten AGS-Zellen zeigte, dass 10 µg natives Hsp60 die Anzahl der proliferierten AGS-Zellen von 91,4 % auf 73,8 % in mit 10 % FCS supplementierten RPMI 1640 Zellkulturmedium signifikant senkte. Eine verringerte Zellproliferation von 80,3 % zeigten AGS-Zellen, wenn 10 % FCS im Zellkulturmedium fehlten. Eine zusätzliche signifikante Verringerung der Hsp60 induzierten Zellproliferationshemmung konnte durch das im Zellkulturmedium fehlende FCS nicht weiter beobachtet werden (Tab. 4).



**Abb. 17: FCS und Hsp60 hemmen die Zellproliferation von AGS-Zellen.** AGS-Zellen wurden für 24 Std. ohne 10 % FCS-Zusatz mit 10  $\mu$ g Hsp60 (B) oder ohne Hsp60 (A) in der Gegenwart von BrdU inkubiert. Das gleiche erfolgte mit 10  $\mu$ g Hsp60 (D) oder ohne Hsp60 (C) mit 10 % FCS haltigem RPMI 1640 Zellkulturmedium. Die Quantifizierung der BrdU markierten Zellen erfolgte immunhistologisch am Mikroskop.

### 3.13. Einfluss von Hsp60 auf den Zellzyklus

Hierfür wurden die AGS-Zellen mit 20 µg und 40 µg natives Hsp60 in Abwesenheit von FCS für 12 Std. inkubiert.

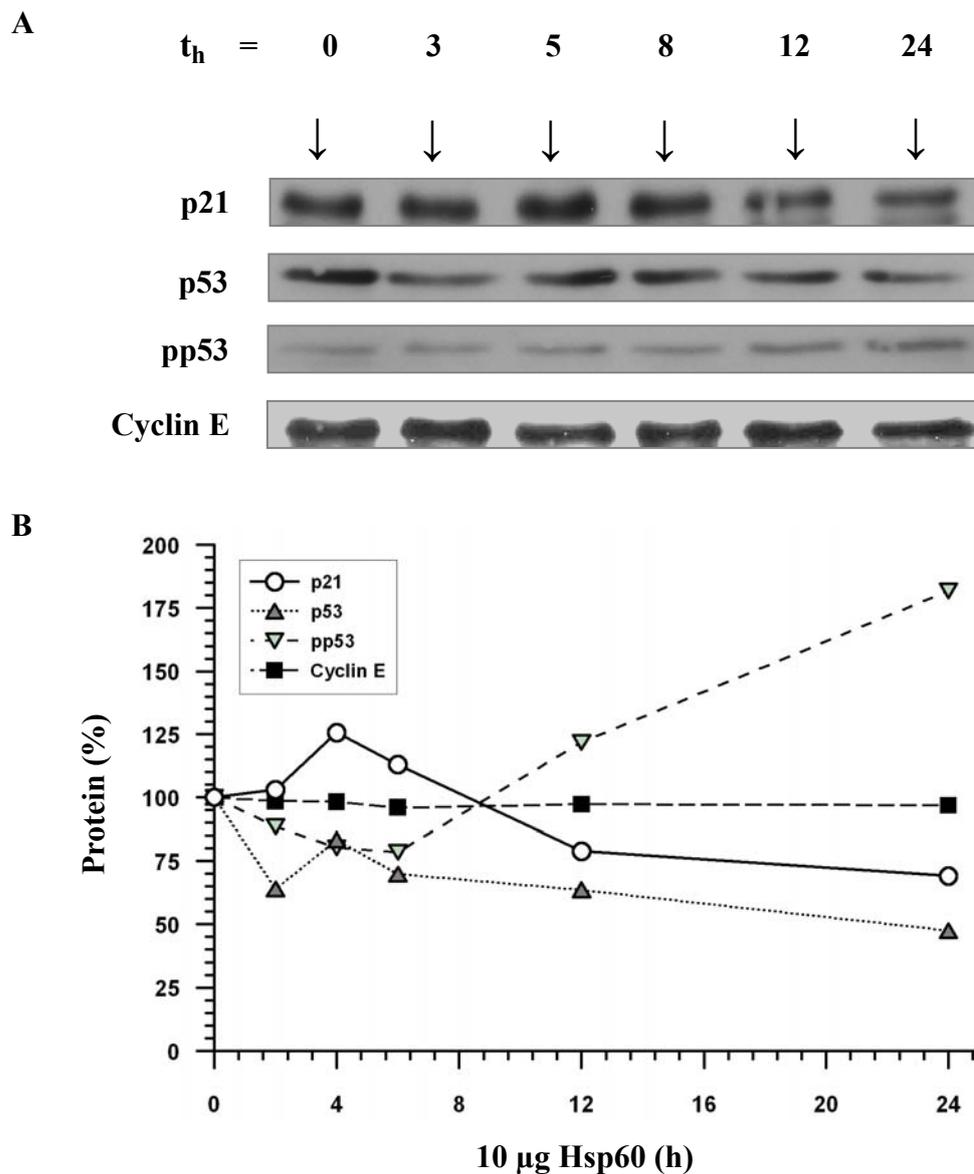


**Abb. 18: Hsp60 induziert Apoptose und einen Zellarrest in der G1-Phase.** AGS-Zellen wurden für 12 Std. mit 20 µg bzw. 40 µg Hsp60 in RPMI 1640 Zellkulturmedium ohne 10 % FCS-Zusatz inkubiert. Nach Propidiumjodid-Färbung wurden die Zellen mittels FACS-Analyse nach den Zellzyklus-Phasen quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SE aus zwei unabhängigen Versuchen.

Durch die Inkubation mit nativem Hsp60 über 12 Std. zeigte sich ein Anstieg der Zellen in der Sub-G1-Phase von 1,9 % (Kontrolle) auf 2,5 % bei 20 µg bzw. 4,5 % bei 40 µg Hsp60. Dies war assoziiert mit einem G1-Arrest (43 % der Zellen in der Kontrolle, 60,5 % bei 20 µg bzw. 50,2 % bei 40 µg nativem Hsp60). Die Anzahl der Zellen in der S-Phase ging von 30 % auf ca. 20 % zurück. In der G2/M-Phase fand nur für die mit 20 µg nativen Hsp60 inkubierten Zellen eine Verringerung von 25 % auf 15 % statt.

## 3.14. Hsp60 beeinflusst die Expression von p21, p53, pp53

Um die mit einem G1-Arrest einhergehende Veränderung der Signaltransduktion durch Hsp60 zu untersuchen, wurde die Expression von p21, p53, pp53 und CyclinE im Proteinlysate der AGS-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 3, 5, 8, 10 und 24 Std.) der nativen Hsp60 Inkubation mittels Western Blot untersucht (Abb. 20 A, B).



**Abb. 19: Hsp60 verändert die Expression von p21, p53 und pp53.** AGS-Zellen wurden mit 10 µg Hsp60 für 3, 5, 8, 12 und 24 Std. inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot detektiert (A). Die Auswertung des Western Blots erfolgte durch densitometrische Analyse der Banden (B).

Die densitometrische Auswertung der im Western Blot detektierten Proteinbanden zeigte für das p21 Protein nach 5 Std. eine kurzfristige Erhöhung auf 125 %. Im weiteren Verlauf fiel das p21 Protein im Proteinlysate nach 12 Std. auf 80 % und nach 24 Std. auf 69 % des Ausgangswertes. Das p53 Protein zeigte nach 3 Std. eine deutliche Erniedrigung auf 63,9 %. Nach 5 Std. kam es zu einem zwischenzeitlichen Anstieg auf 83,4 %, fiel dann aber kontinuierlich bis auf 47,5 % nach 24 Std. des Ausgangswertes. Das phosphorylierte p53 (pp53) fiel innerhalb der ersten 8 Std. der Hsp60 Inkubation in den AGS-Zellen zunächst bis auf 78,6 %, um letztlich bis auf 181,8 % anzusteigen. Während der 24 stündigen Inkubation mit nativem Hsp60 blieb das mittels Western Blot detektierte CyclinE in den AGS-Zellen konstant exprimiert. Das CyclinE diente zugleich als Standardabgleich der für die im Western Blot eingesetzten Proteinmengen.

## **4. Diskussion**

### **4.1. *Helicobacter pylori* und Apoptose**

Untersuchungen bei Patienten mit einer *H. pylori* Infektion zeigten eine erhöhte Apoptoserate der Magenepithelzellen. Weshalb es zu einem Anstieg der Apoptoserate kommt, wurde in mehreren *in vivo* und *in vitro* Studien untersucht. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass sowohl bakterielle Faktoren als auch die an der Immunantwort beteiligten Immunzellen Magenepithelzellen zur Apoptose induzieren.

Eine Reihe bakterieller Enzyme von *H. pylori*, wie Neuraminidase, Fukosidase (Dwarakanath *et al.* 1995), Phospholipase (Dorrell *et al.* 1999), Alkohol-Dehydrogenase (Roine *et al.* 1992) und auch Metalloproteinase (Windle und Kelleher 1997) zerstören die Phospholipidschicht der Magenepithelzellen und degradieren dadurch die Magenschleimhaut. Smoot (1997) vermutete, dass diese Zellschäden auf den Zelltod der Apoptose basieren.

An der Adhäsion von *H. pylori* an die Magenepithelzellen sind auf der bakteriellen Seite die SMasen und auf zellulärer Seite das Phospholipid Phosphatidylethanolamin, die Glycolipide Gangliotetraosylceramid Gg3 und Gg4 sowie das Sulfogalactosylceramid (SGC) beteiligt (Huesca *et al.* 1993, 1996, Tseng *et al.* 2004). Tseng *et al.* (2004) zeigten, dass die bakterielle SMase die Apoptoserate von Magenepithelzellen durch die Aktivierung von ERK und JNK erhöht. Die Hemmung von ERK und JNK durch Inhibitoren zeigte, dass nur der JNK-Inhibitor die SMase-vermittelte Apoptose hemmte.

Ein weiterer bakterieller Faktor, der die Magenepithelzellen zur Apoptose induziert, ist die Urease. Durch die Bindung an die MHC-II-Rezeptoren induziert die Urease die Magenepithelzellen zur Apoptose. AGS-Zellen werden von der Urease aber nicht zur Apoptose induziert, da diese Zellen kein MHC-II exprimieren (Fan *et al.* 2000). Desweiteren

produziert die Urease Ammoniak, das im Magensaft von Infizierten bis zu einer Konzentration von 30 mM vorkommt (Trieblich et al. 1992). Messungen der Caspase-3 Aktivität in der Magenepithelzelllinie GSM06 zeigten, dass eine ansteigende Ammoniak-Konzentration von 10 - 30 mM mit einer ansteigenden Caspase-3 Aktivität einhergeht. Dieser Effekt konnte durch die Erhöhung des pH-Wertes zusätzlich gesteigert werden (Suzuki et al. 2002). Igarashi et al. (2001) beobachteten dagegen keine erhöhte Apoptoserate von MKN-45 Magenepithelzellen in Gegenwart von *H.pylori* und 30 mM Ammoniak. In deren Studien stieg die Apoptoserate erst durch die Koinkubation von Urease und Ammoniak mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  um ein Vielfaches an. Deswegen vermuteten sie, dass das Ammoniak die Zytokin-induzierte Apoptose beschleunigt.

Ein anderer bakterieller Faktor ist das LPS von *H. pylori*. Kawahara et al. (2001) wiesen für das *H. pylori* eigene LPS einen stimulierenden Einfluss auf die Caspase-8 nach. Die LPS-induzierte Apoptose brachten sie zudem mit dem PAI-Status von *H. pylori* in Zusammenhang, da nur das LPS von PAI-positiven *H. pylori* Bakterien zur Apoptose-Induktion fähig war (Kawahara et al. 2001).

Für die Apoptose-Induktion der Magenepithelzellen sind auch die in der bakteriellen Pathogenitätsinsel (PAI) kodierten Gene des vakuolisierenden Zytotoxins VacA und des zytotoxinassoziierten Antigens CagA verantwortlich. Le'Negrata et al. (2001) zeigten, dass die Vac<sup>+</sup>/PAI<sup>+</sup> nicht aber die Vac<sup>-</sup>/PAI<sup>-</sup> *H. pylori*-Keime über den Fas-abhängigen Signalweg die Caspase 8 und 3 aktivieren. Zudem beobachteten sie bei dem Vac<sup>-</sup>/PAI<sup>-</sup> *H. pylori*-Stamm eine verzögerte Aktivierung von p38, weswegen sie vermuteten, dass die SAP-Kinase eine Schlüsselrolle bei der Kontrollierung der Vac<sup>+</sup>/PAI<sup>+</sup> *H. pylori*-Stamm induzierten Apoptose spielt. Kuck et al. (2001) induzierten in ihren Studien mit VacA-immunpräzipitierten *H. pylori*-Lysat oder mit rekombinanten VacA die AGS-Zellen zur Apoptose. Zu der VacA zugeschriebenen Vakuolenbildung kam es beim rekombinanten VacA allerdings nicht. Andere

Studien zur VacA-vermittelten Apoptose zeigten, dass die Aktivierung der Caspase-3 mit dem aus den Mitochondrien freigesetzten Cytochrom c im Zusammenhang steht (Galmiche et al. 2000).

An den Magenepithelzellen adhärierte *H.pylori*-Bakterien bilden einen Cag Typ IV-Sekretionssystem, durch den neben CagA vermutlich weitere bakterielle Faktoren in das Zytosol der Magenepithelzellen transloziert werden. Dort wird das CagA phosphoryliert und verursacht Veränderungen am Zytosklett. Ob durch die Zytosklett-Veränderungen Magenepithelzellen zur Apoptose induziert werden, ist unbekannt. Welches der translozierten Proteine die NFκB aktivierte Transkription der proapoptotischen Genen induziert, ist ebenfalls unklar (Gupta et al. 2001). Die NFκB-vermittelte Apoptose war durch PPARgamma hemmbar.

Bei einer *H. pylori*-Infektion wandern Immunzellen in die Magenschleimhaut ein. Von den Neutrophilen produzierte reaktive Sauerstoffradikale (ROS) zerstören wahrscheinlich die Magenschleimhaut. Die von *H. pylori* stimulierten Th1 Zellen sezernieren Zytokinen wie TNF-α, IFN-γ oder IL-2. Diese Zytokine stimulieren in den Magen Zellen das Fas-System, wodurch es zur Aktivierung der Caspase-3 und -8 und somit zum Anstieg der Apoptoserate kommt. Desweiteren kommt es durch diese Zytokine zum Expressionsanstieg von MHCII, an die *H.pylori* direkt bindet und dadurch die Magenepithelzellen zur Apoptose induzieren kann (Fan et al. 2000).

In den Neutrophilen katalysiert die Myeloperoxidase die Chloridoxidation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu HClO, welches mit dem NH<sub>4</sub><sup>+</sup> von *H. pylori* zu NH<sub>3</sub>Cl reagiert. Das NH<sub>3</sub>Cl ist sehr toxisch, da es aufgrund des niedrigen Molekulargewichts und der Lipophilie sehr leicht die Zellmembranen durchquert (Olivares et al. 2005). *In vitro* Studien zur Toxizität von NH<sub>3</sub>Cl zeigten, dass es höhere Apoptoseraten als NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oder HClO bei Magen Zellen verursacht (Suzuki et al. 1997). Die Untersuchung von den T-Zellen in der Magenschleimhaut von

*H. pylori*-Infizierten zeigte, dass diese eine erhöhte mRNA-Expression an Fas aufweisen. Da es in den *H. pylori* inkubierten Magenepithelzellen auch zu einem zellulären Anstieg der proapoptotischen Proteine Fas und FasL kommt (Martin et al. 2004, Rudi et al. 1998), besteht die Möglichkeit, dass T-Zellen die Magenzellen bzw. die Magenzellen sich gegenseitig, durch das Fas/FasL-System zur Apoptose induzieren (Rudi et al. 1998; Olivares et al. 2005).

In wieweit der Kontakt von *H. pylori* mit den Magenepithelzellen auch die Expression von den TRAIL-Rezeptoren beeinflusst, wird kontrovers diskutiert. Western Blot-Untersuchungen zeigten, dass diese Proteine in der humanen Magenmukosa, in Magenepithelzellen und in verschiedenen Tumor-Zelllinien exprimiert werden. Die Inkubation von *H. pylori* mit AGS oder Jurkat-Zellen führte zu einem Anstieg von TRAIL und dessen proapoptotischen Rezeptor TRAIL-R1 (Martin et al. 2004). Ledig et al. (2004) bestätigten die Hochregulierung von TRAIL-R1 und zeigten ausserdem, dass *H. pylori* keinen Einfluss auf die Expression des Rezeptor TRAIL-R2 ausübt. Zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen Neu et al. (2005), als sie die Expression der Rezeptoren TRAIL R1-R4 in humanen Magenbiopsien untersuchten. Dort waren die proapoptotischen Rezeptoren TRAIL-R1 und R2 herunterreguliert und die antiapoptotischen Rezeptoren TRAIL-R3 und R4 hochreguliert. Unsere Studien mit AGS-Zellen zeigten, dass *H. pylori* den TRAIL Rezeptor R1 in den AGS-Zellen hochreguliert, wie es von Martin et al. (2002) und Ledig et al. (2004) beschrieben wurde.

Welcher Apoptoseweg bei einer Infektion mit *H. pylori* zum Zelltod der Magenepithelzellen führt, kann nicht ohne weiteres genannt werden. Denn während einer Infektion spielen, neben den verschiedenen *H. pylori*-Stämmen und deren bakteriellen Faktoren, auch die Immunzellen eine wichtige Rolle. Der von *H. pylori* ausgelöste Apoptoseweg beruht aber vermutlich hauptsächlich auf der Typ-II Apoptose, wie die Ergebnisse von Maeda et al. (2002) und Potthof et al. (2002) zeigten. Die Magenepithelzellen, die durch das hochregulierte Fas/FasL-System von aktivierten Immunzellen oder anderen Magenepithelzellen zur

Apoptose induziert werden, beruht vermutlich dagegen auf dem Apoptose Typ-I.

### 4.2. Rekombinant hergestelltes *H. pylori*-Hsp60

Das Hsp60 aus *H. pylori* wurde kloniert, da rekombinantes Protein bei der Durchführung von Experimenten einige Vorteile gegenüber dem nativen Protein bietet. Zum Einen, lässt es sich schneller und leichter in grösseren Mengen anreichern, was zudem mit geringeren experimentellen Kosten verbunden ist. Zum Anderen, sollten mit dem rekombinanten Hsp60 die Ergebnisse von dem nativen Hsp60 zur Apoptose-Induzierung bestätigt werden.

Das rekombinante Hsp60-Protein wurde schneller und leichter in grösseren Mengen aus *E. coli* als das native Hsp60 aus *H. pylori* aufgereinigt. Die Inkubation von dem rekombinanten Hsp60 mit AGS-Zellen zeigte, dass es nicht die Zellen zur Apoptose induzierte. Um herauszufinden, woran dies liegen könnte, wurden in verschiedenen Versuchen das rekombinante mit dem nativen Hsp60 verglichen. Der Western Blot von dem rekombinanten Hsp60 Protein wies insgesamt drei Banden - ca. 60 kDa, 55 kDa und 35 kDa - auf. Das oligohomomere Hsp60 Protein hätte im Western Blot aber nur als eine 60 kDa Bande vorkommen dürfen. Um die native Struktur des rekombinanten mit dem nativen Hsp60 zu vergleichen, wurden beide Proteine in einem nativen Gel miteinander verglichen. Die Auswertung mit Western Blot zeigte, dass nur das rekombinante Hsp60 in das native Gel hinein diffundiert war. Weshalb das native Hsp60 nicht in das Gel hinein diffundierte, lag vermutlich daran, dass es eine andere Oberflächenladung als das rekombinante Hsp60 hatte. Denn bei einer identischen Oberflächenladung hätte der Proteinladepuffer dem nativen Hsp60 dieselbe negative Ladung vermittelt, die das rekombinante Hsp60 Protein in das native Gel hinein diffundieren liess. Eine andere Oberflächenladung beim rekombinanten Hsp60 würde auch erklären, warum es nicht an die Heparin-Säulenmatrix band, mit der das native Hsp60 aus *H. pylori* angereichert wurde.

Um zu klären, ob trotz der veränderten Oberflächenladung das Protein funktionell in Ordnung war, wurde die ATPase Aktivität des rekombinanten mit dem nativen Hsp60 verglichen. In Voruntersuchungen war gezeigt worden, dass bei dem *H. pylori*-Hsp60 Protein eine Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und eine H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nachweisbar ist (Schütz 2003). Der Vergleich der ATPase-Aktivitäten zeigte eine vergleichbare Stimulierbarkeit der ATPase durch Kalium- (2 bzw. 3fache Erhöhung) und Ammonium-Ionen (8 bzw. 10fache Steigerung). Anders verhielt es sich mit den Natrium-Ionen. Die ATPase des rekombinanten Hsp60 Proteins konnte, im Gegensatz zur ATPase des nativen Hsp60 (3fache Steigerung), nicht durch Natrium-Ionen stimuliert werden. Welchen Einfluss die ATPase-Aktivität des Hsp60 auf die vom Sonifikat bzw. Hsp60-induzierte Apoptose hat, zeigten die Koinkubations-Experimente mit den spezifischen ATPase-Inhibitoren Ouabain und Schering 28080 (Schütz 2003). Diese hemmten die vom Sonifikat bzw. nativem Hsp60-induzierte Apoptose in AGS-Zellen. Warum das rekombinante Hsp60 die AGS-Zellen nicht zur Apoptose induzierte, könnte mit der fehlenden Stimulierbarkeit der ATPase durch Natrium-Ionen zusammenhängen.

Andere Gründe für die fehlende Fähigkeit des rekombinanten Hsp60 die AGS-Zellen zur Apoptose zu induzieren, könnte ein Fehler in der Aminosäuresequenz, die Verschiebung des Leserasters, die verwendeten Überexpressions- und Anreicherungsbedingungen oder auch an dem zur Überexpression verwendeten Wirt liegen

Die wiederholte Überprüfung der klonierten Hsp60-Sequenz zeigte keinen Unterschied zur Wildtyp-Sequenz. Eine Verschiebung des Leserasters konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da zum Einen dies aus den Sequenzierungsdaten nicht ersichtlich war, zum Anderen, weil bei diesem hoch konservierten Protein eine Verschiebung des Leserasters schnell zu einem Stop-Codon und damit zu einem verkürzten Protein geführt hätte. Die Sequenzierungsdaten der klonierten Hsp60-Sequenz stimmen mit den publizierten Aminosäuresequenzen von Macchia et al. (1993) und Suerbaum et al. (1994) überein.

Das verwendete Plasmid enthielt für die Bindung der 30S Ribosomen-Untereinheit eine Shine-Dalgarno-Sequenz sowie für eine optimale Translationseffizienz vor dem Startcodon eine Kozak-Sequenz. Die Sequenzüberprüfung zeigte, dass zwischen dem Hsp60 und dem Fusionsprotein kein weiteres Startcodon vorkommt. Dies hätte ein Grund für die Expression von zwei geringfügig unterschiedlich großen Proteinen sein können.

Die unterschiedlich verwendeten Temperaturen und IPTG-Inkubationszeiten zur Überexpression des rekombinanten Hsp60 in den XL-10 Gold bzw. BL-21 *E. coli*-Bakterien, machte das rekombinante Hsp60 nicht potenter AGS-Zellen zur Apoptose zu induzieren. Durch die Verwendung von BL-21 Bakterien konnte eine proteolytische Degradierung des rekombinanten Hsp60 Proteins als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da BL-21 ein proteasendefizienter *E. coli*-Stamm ist. Eine weitere Möglichkeit, wie die zwei zusätzlichen Proteinbanden beim rekombinanten Hsp60 zustande kamen, könnte mit der Anforderung von seltenen tRNAs, während der Translation der *H. pylori* Hsp60-Sequenz in *E. coli*, zusammenhängen. Die nicht Bereitstellung solch seltener tRNAs würdedann zu einem Translationsabbruch und damit zu einem verkürzten Protein führen. Da aber das *E. coli* Bakterium ein Standardwirt für die Überexpression von *H. pylori* Proteine ist, scheidet diese Möglichkeit damit auch aus.

Das Hsp60 Protein wurde als Fusionprotein kloniert, um das überexprimierte Protein leichter spezifisch anreichern zu können. Nach der Überexpression war am N-Terminus des rekombinanten Hsp60 ein 28 kDa GST-Tag angehängt. Der GST-Tag ist durch eine PreScission-Protease spezifische Aminosäure Sequenz mit der Hsp60-Sequenz verbunden. Nach der proteolytischen Abspaltung des GST-Tags ist das N-terminale Ende des Proteins um 8 Aminosäuren verlängert. Andere Gruppen, die Hsp60 aus verschiedenen Organismen klonierten, benutzten ebenfalls einen Tag zur Anreicherung. Die N-Terminale Enden dieser rekombinanten Hsp60 Proteine waren, wie bei uns, auch teilweise um mehrere Aminosäuren länger (Macchia et al. 1993, Brocchieri und Karlin 2000). Eine funktionelle Einschränkung

für das jeweils am N- und C-Terminus um 8 Aminosäuren verlängerte rekombinante Protein sollte dies deshalb nicht bedeuten.

Ein weiterer Grund für die fehlende Apoptose-Induktion des Proteins könnte die Anhäufung von rekombinanten Hsp60 Proteinen in *inclusion bodies* von *E. coli* Bakterien sein. Wie es zur Bildung von *inclusion bodies* kommt, ist nicht genau bekannt. Eine Hypothese ist, dass die nach innen gerichteten hydrophoben Außenbereiche von nativen Proteinen bei den Faltungsintermediaten teilweise nach außen gerichtet sind. Bei extrem hohen lokalen Proteinkonzentrationen treten während der Überexpression dann diese Faltungsintermediate miteinander in Kontakt, was die Bildung von *inclusion bodies* initiieren könnte (Prouty und Goldberg 1972, Prouty et al. 1975, Mogk et al. 2001).

Für *inclusion bodies* als Grund könnte sprechen, dass das Hsp60 in *E. coli* vielleicht nicht seine vollständige native Konformation erlangte und die ATPase daher aus Gründen der Konformation nicht durch Natrium-Ionen induzierbar war. Das rekombinante Hsp60 band zudem nicht an die Heparin-Säulenmatrix, mit dem das aus *H. pylori* isolierte native Hsp60 aufgereinigt wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Unterschied in der Konformation zwischen dem rekombinanten und dem nativen Hsp60 vorliegt.

Ob dieser mögliche Unterschied in der Konformation aber auf *inclusion bodies* zurückzuführen ist, bleibt zu bezweifeln. In *inclusion bodies* sammeln sich Proteine mit einer vollständig fehlenden oder mit einer teilweise vollständigen nativen Konformation an. Unsere Ergebnisse zum rekombinanten Hsp60 zeigten aber, dass dessen Konformation von humanen Hsp60 Antikörpern erkannt wird, und dass die ATPase mit  $K^+$ - und  $NH_4^+$ -Ionen ähnlich gut, wie die ATPase des nativen Hsp60, stimulierbar war. Da die an der ATPase-Funktion beteiligten Aminosäuren über die gesamte Aminosäuresequenz des Hsp60 Proteins verteilt sind (Brocchieri und Karlin 2000), sollte eine funktionelle ATPase nur vorliegen, wenn auch das Protein in seiner vollständigen nativen Konformation vorliegt.

Die Ergebnisse zum rekombinanten Hsp60, dass es nicht an die Heparinsäule band, mit der das native Hsp60 angereichert wurde, es im Gegensatz zum nativen Hsp60 in das native Gel hinein diffundierte, sowie die Stimulierbarkeit der ATPase durch  $K^+$ - und  $NH_4^+$ -Ionen, lassen vermuten, dass es in seiner nativen Konformation vorlag. Die fehlende Eigenschaft des rekombinanten Hsp60, AGS-Zellen zur Apoptose zu induzieren, könnte vielleicht daran liegen, dass zytosolische Komponenten an das überexprimierte Hsp60 in den *E. coli*-Bakterien gebunden hatten. Diese zytosolischen Komponenten könnten einerseits, die für die Apoptose-Induktion notwendige  $Na^+/K^+$ -ATPase hemmen, andererseits, zu einer Veränderung der Oberflächenladung führen, so dass es nicht mehr an die Heparin-Säule binden konnte.

### 4.3. *H. pylori*-Hsp60 induzierte Effekte

Unsere Ergebnisse mit *H. pylori* isolierten nativen Hsp60 zeigten, dass Hsp60 die Zellen der humane Mageneithelzelllinie AGS zur Apoptose induzieren kann. Der proapoptotische Effekt von Hsp60 erfolgte durch eine erhöhte Caspase-3 Aktivität bei unveränderten Caspase-8 und -9 Aktivitäten. Die gemessene Caspase-3 Aktivität stieg dabei in den AGS-Zellen konzentrationsabhängig bis zu 20  $\mu$ g natives Hsp60 pro mL an. Die Hsp60-induzierte Apoptose beruht auf der ATPase Aktivität des Hsp60 und konnte durch die spezifischen ATPase Hemmer Quabain und Schering 28080 vollständig bzw. teilweise wieder gehemmt werden. Die Koinkubation von Hsp60 mit Fas oder *H. pylori* führte zu einer additiven Erhöhung der Apoptose. Desweiteren induzierte Hsp60 die AGS-Zellen zur Expression von Fas. Das Expressionsmuster von FasL, TRAIL und den TRAIL-Rezeptoren R1-R4 beeinflusste Hsp60 hingegen nicht. Im Verlauf der Hsp60-Inkubation stieg die pp53 Menge als Signal von DNA-Schäden in den AGS-Zellen an, während die p53 Menge abnahm. Die Inkubation von Hsp60 mit isolierten Mitochondrien führte zur Freisetzung der proapoptotischen Proteine Cytochrom c und Smac/Diablo. Die FACS und Western Blot Analysen zum Einfluss von Hsp60 auf den Zellzyklus zeigten, dass Hsp60 die

Zellproliferation hemmt und die AGS-Zellen mittels p21 zum G1-Zellzyklusarrest induzierte.

### 4.4. *H. pylori*-Hsp60 induziert Signalwege der Apoptose und Zellproliferation

Hoch konservierte Hitzeschockproteine spielen eine wichtige Rolle beim Schutz vor dem Zelltod durch Protein- und Zellschäden. Hitzeschockproteine sind beispielweise bei der Todesrezeptor-Dimerisierung, der Rekrutierung von Caspase/Procaspase zu Rezeptorkomplexen wie auch bei der Prozessierung von Procaspasen involviert (Sreedhar und Csermely, 2004). Die bisher publizierten Daten zur Beteiligung von Hitzeschockproteinen bei der Apoptose zeigten, dass Hitzeschockproteine eher eine antiapoptotische als eine proapoptotische Funktion haben (Mehlen et al. 1996, Gabai et al. 1998, Jäättelä et al. 1998, Beere 2005). In der Regel wird aber eine erhöhte Hitzeschockprotein-Expression mit einem erhöhten Widerstand vor dem Zelltod in Verbindung gebracht.

Studien zur Lokalisierung von *H. pylori*-Hsp60 zeigten, dass *H. pylori* Hsp60 und Urease sezerniert und die beiden Proteine auf der Membran von *H. pylori* sowie auf den Magenzellen vorkommen (Engstrand et al. 1997, Cao et al. 1998, Kamiya et al. 1998, Phadnis et al. 1996). Dunn et al. (1997) zeigten in histologischen Schnitten, dass *H. pylori* und dessen Hsp60 auch intrazellulär in Magenepithelzellen vorkommen. Neuere Video-Mikroskopieversuche zur intrazellulären Lokalisation von *H. pylori* zeigten, dass der Keim intrazellulär lebend in Vesikeln vorkommt und die Zellen auch wieder verlässt (Amieva et al. 2002). Wie das von den *H. pylori*-Bakterien sezernierte Hsp60 die AGS-Zellen zur Apoptose induziert, ist unbekannt. Neben der Induzierung von apoptotischen Signalketten durch Bindung an Rezeptoren der äußeren Zellmembran könnte das Hsp60 vielleicht auch aufgrund seiner Proteinstruktur mittels des FlipFlop-Mechanismus in die Zelle gelangen. Eine Analyse der Proteinstruktur zeigte, dass das Hsp60 zwei potenzielle Transmembran-Domänen enthält (Dziewanowska et al. 2000). Bisher wurde für ein Protein aber noch nie solch ein

FlipFlop-Mechanismus nachgewiesen. Seit neustem wird für das Hsp60 auch die Funktion eines intrazellulären Transportproteins diskutiert, wie Ergebnisse mit T-Lymphozyten (Khan et al. 1998) und dem Pilz *Histoplasma capsulatum* zeigen (Gacser et al. 2006).

### 4.4.1. *H. pylori*-Hsp60 induziert Caspase-3 vermittelte Apoptose

Bei der Adhäsion von *H. pylori* an die Zellmembranen von Magenepithelien sind Hitzeschockproteine involviert. Die Koinkubation mit einem gegen Hitzeschockproteine gerichteten Antikörper hemmte die Adhäsion von *H. pylori* an die Glyko- und Phospholipide der Magenepithelzellen (Huesca et al. 1993, 1996). Yamaguchi et al. (1998) zeigten in ihren *in vitro* Studien, dass Hsp60 Antikörper die Adhäsion von *H. pylori* an die Sulfoglykolipide der Magenzellen MKN45, MKN28 und KatoIII hemmen. Unsere Untersuchungen mit Hsp60-Antikörper inkubierten *H. pylori*-Sonifikaten zeigten, dass die DNA-Fragmentierung in den AGS-Zellen auf bis zu 60 % reduziert wurde. Um die Hsp60-induzierten Apoptose-Mechanismen weiter im Detail zu untersuchen, wurde natives Hsp60 aus *H. pylori* isoliert. Die Inkubation mit AGS-Zellen zeigte, dass natives Hsp60 bis zu maximal 10 % der AGS-Zellen innerhalb von 24 Std. konzentrationsabhängig zur Apoptose induziert. Zur Bestätigung der Hsp60 vermittelten Apoptose-Induzierung wurden verschiedene Methoden, wie FACS, Immunhistologie oder Caspase-3 Aktivitätsmessung, verwendet. Die Hsp60-induzierte Apoptose wird auf zwei Arten entweder teilweise oder ganz gehemmt. Zum Einen hemmten Serumkomponente die Hsp60-induzierte Apoptose von AGS-Zellen. Das Serumkomponente vermutlich an Hsp60 binden und dadurch die Bindung des Hsp60 an Rezeptoren blockieren, zeigte Vabulas et al. (2001). Sie beobachteten, dass die Serumkomponenten des FCS die Endozytose von *Clamydien*-Hsp60 in die Makrophagen hemmen. Zum Anderen, zeigten Vorversuche mit den spezifischen ATPase Inhibitoren Quabain und Schering 28080, dass die Hsp60-induzierte Apoptose mit der ATPase Aktivität

von Hsp60 zusammenhängt (Schütz 2003).

Die Caspase-Aktivitätsmessungen von den Caspasen-3, -8 und -9 zeigten, dass nur die Caspase-3 enzymatisch aktiv war. Die Detektion im Western Blot bestätigte die gemessenen Caspase-Aktivitäten. Um einen Fehler bei der Detektion im Western Blot auszuschliessen, wurde zur Kontrolle, die von Potthof et al. (2002) beschriebene Prozessierung der Caspase-8 und -9 in *H. pylori* inkubierten AGS-Zellen, mittels Western Blot detektiert.

Wie die Hsp60-induzierte Apoptose mit der aktivierten Caspase-3 und den nicht aktivierten Caspasen-8 und -9 zustande kam, ist offen. Neuere Untersuchungen zeigten, dass p21 an die Procaspase-3 und die Caspase-8 binden kann und dadurch diese Proteine hemmt. Die Hemmung der Procaspase-3 erfolgt durch Bindung an die N-Terminale Sequenz von p21, wodurch die p3 Spaltungsstelle maskiert wird. p15 kann durch die Bindung an p21 dessen hemmenden Effekt auf die Caspasen teilweise wieder aufheben, so dass die Caspasen trotz p21-Bindung enzymatisch aktiviert werden. Wie und wann es zu den Bindungen kommt oder die Hemmung wieder aufgehoben wird, hängt von den posttranslationalen Modifikationen von p15 und p21 ab (Suzuki et al. 1998, Gartel und Tyner 2002). Vielleicht wurde die Aktivierung der Caspase-8 und -9 von anderen Proteinen blockiert, weshalb nur die Caspase-3 aktiviert war. Eine andere Möglichkeit wäre auch, dass das bakterielle Hsp60 von *H. pylori* selbst die Procaspase-3 zur aktiven Caspase-3 prozessiert. Denn humanes Hsp60 kommt im Komplex mit der Procaspase-3 vor und fördert dessen Prozessierung zur Caspase-3 (Samali et al. 1999, Xanthoudakis et al. 1999).

Das bakterielle Hsp60 von *H. pylori* weist zum humanen Hsp60 eine Sequenzhomologie von 72 % auf, wodurch es theoretisch zu verschiedenen Folgen für die Zelle kommen könnte: 1) Das bakterielle Hsp60 könnte als Chaperon aufgrund unterschiedlicher Bindungsaffinitäten die humanen Proteine mit einer geringfügig anderen Affinität binden. 2) Bakteriell Hsp60 bindet andere Proteine als zytosolisches humanes Hsp60. Die Proteinfaltung erfolgt in

Bakterien erst nach der vollständigen Transkription im Gegensatz zu Eukaryonten (Gething 1997). Dadurch könnte theoretisch das bakterielle Hsp60 als Chaperon Proteine binden, die sonst von anderen humanen Chaperonen gebunden werden. Wie das bakterielle Hsp60 von *H. pylori* letztlich als Chaperon auf der Zellmembran oder intrazellulär Proteine beeinflusst, ist unerforscht. Welchen weiteren Effekt neben der Apoptose-Induzierung das Hsp60 von *H. pylori* auf AGS-Zellen hat, wird im folgenden diskutiert.

### 4.4.2. *H. pylori*-Hsp60 induziert AGS-Zellen zur Expression von Fas

Ein Effekt von *H. pylori*-Hsp60 auf AGS-Zellen ist die Induzierung der Fas-Expression, während die Expression von FasL, TRAIL und den TRAIL Rezeptoren R1-R4 sich nicht änderte. In Hsp60-inkubierten AGS-Zellen wurde, im Gegensatz zu den mit *H. pylori* inkubierten AGS-Zellen, die Fas-Expression nach 8 Std. wieder herunter reguliert. Damit ist erstmals für ein bakterielles Hsp60 gezeigt, dass es in einer humanen Magenepithelzelllinie die Fas-Expression induziert. Ob es der einzige bakterielle Faktor von *H. pylori* ist, der während einer Infektion die Expression von Fas induziert, bleibt offen. Es ist aber wahrscheinlich, dass weitere bakterielle Faktoren für die permanente Hochregulierung von Fas während einer *H. pylori*-Infektion von Bedeutung sind. Anders lässt sich die permanente Hochregulierung von Fas nicht erklären. Ausser wenn angenommen wird, dass bei den Hsp60-induzierten Zellen aufgrund des eingeleiteten Apoptose-Programms die Expression von Fas nicht weiter fortgeführt wurde.

### 4.4.3. *H. pylori*-Hsp60 hemmt die Zellproliferation und induziert einen G1-Arrest

Wie der Keim die Proliferation von Magenepithelzellen verändert, wird zurzeit kontrovers diskutiert. Einige beobachteten eine steigende, andere eine sinkende Proliferationsrate in

humanen Magenbiopsien von *H. pylori*-Infizierten (Peek et al. 1997, Fraser et al. 1994, Bechi et al. 1996, Chow et al. 1995). Peek et al. (1997) untersuchte den Einfluss von CagA auf die Fähigkeit zur Apoptose-Induzierung und Proliferationserhöhung. Seine Daten zeigten für die mit CagA Mutanten inkubierten Zellen eine erhöhte Apoptose- und Proliferationsrate. Diesen Effekt schrieb er den in der Cag-PAI kodierten Proteinen, die über den TNF- $\alpha$  Signaltransduktionsweg NF- $\kappa$ B und Cox-2 hochregulieren können, zu (Munzenmaier et al. 1997, Glocker et al. 1998, Romano et al. 1998). In verschiedenen Tiermodell-Studien wurde ebenfalls eine erhöhte Zellproliferationsrate beobachtet (Yu et al. 1995, Fox et al. 1996, Wang et al. 1998). In zwei Studien vermuteten die Gruppen aufgrund der erhöhten Apoptoserate, dass die Proliferationszunahme eine Reaktion auf die *H. pylori* induzierte Apoptose der Magenepithelzellen zur Wiederherstellung der Zellhomöostase ist (Jones et al. 1997, Wang et al. 1998).

Eine *in vitro* Hemmung der Zellproliferation durch *H. pylori* wurde in anderen Studien nachgewiesen (Chang et al. 1993, Knipp et al. 1996, Ricci et al. 1996). Knipp et al. (1993, 1996) beobachteten *in vitro*, dass *H. pylori*-Extrakt die Zellproliferation von AGS, KATO III, Hep-2 Zellen und Monozyten hemmt. Eine erniedrigte Zellproliferation verbunden mit einer erhöhten Apoptoserate beobachteten Wagner et al. (1997) in ihren *H. pylori*-Studien mit HM02 und HS746T Zellen. Dabei waren die Mindestkonzentrationen von *H. pylori* zur Induzierung der Proliferationshemmung und für die Apoptose-Induzierung ähnlich. Die Autoren folgerten daraus, dass diese beiden Effekte auf einen gemeinsamen Mechanismus beruhen.

Unsere Ergebnisse zum Einfluss von Hsp60 auf die Zellproliferation, wie auch die zuvor erwähnte Hsp60-induzierte Apoptose stimmen mit den Ergebnissen von Wagner et al. (1997) zu *H. pylori* überein. Das für unsere Versuche verwendete Hsp60 wurde aus einem von Wagner et al. isolierten Hp87-Stamm aufgereinigt. Das aus Hp87 isolierte native Hsp60 hemmte die Zellproliferation und erhöhte die Apoptoserate von AGS-Zellen.

Die FACS-Analyse von mit Hsp60 inkubierten AGS-Zellen zeigte, dass Hsp60 die AGS-Zellen nach 12 Stunden zu einem G1-Arrest induzierte. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von De Luca et al. (2003), die den Einfluss von *H. pylori*-Hsp60 und CagA auf die Zellproliferation von AGS-Zellen untersuchten. Diese Gruppe überexprimierte *H.pylori*-Hsp60 und CagA einzeln oder zusammen in AGS-Zellen. Die Überexpression von *H. pylori*-Hsp60 oder CagA verdoppelte, und die Koexpression beider Proteine verfünffachte die Zellproliferation. Die unterschiedlichen Ergebnissen zur Hsp60-induzierten Zellproliferation könnten auf verschiedenen Gründen basieren. Einerseits könnte extrazellulär an die Zellmembran gebundenes *H. pylori*-Hsp60 andere Signaltransduktionswege als intrazellulär exprimiertes *H.pylori*-Hsp60 aktivieren. Andererseits, kommt in AGS-Zellen überexprimiertes *H. pylori*-Hsp60 vermutlich in einer sehr viel höheren Konzentration vor, als es bei der *H. pylori*-Hsp60-Inkubation mit AGS-Zellen der Fall sein dürfte. Die intrazelluläre „Überflutung“ mit klonierten *H.pylori*-Hsp60 könnte daher einen anderen Effekt bewirken, als wenn das Protein in niedrigeren Mengen in den AGS-Zellen vorkommt.

Die Inkubation mit *H. pylori* induziert Zellen zu einem G1-Arrest (Shirin et al. 1999, Ahmed et al. 2000). Chiou et al. (2003) beobachteten in ihren *in vitro* Versuchen neben dem G1-Arrest auch einen G2/M-Arrest. Die Untersuchung des für den Übergang benötigten cdc2 Kinase-p34<sup>cdc2</sup>-Cyclin B Komplexes zeigte eine *H. pylori*-induzierte Hemmung der am Komplex beteiligten Proteine p34<sup>cdc2</sup>, Cyclin B1 und cdc25C.

Neben der Funktion von p21 durch Bindung an Apoptose-exekutierende Proteine diese zu hemmen, induziert p21 auch Zellen zum G1-Arrest. Für einen reversiblen G1-Arrest ist zuerst eine steigende und danach eine sinkende p21 Konzentration bezeichnend (Roninson 2003). In unseren Studien detektierten wir 3 - 5 Std. nach Inkubationsbeginn in den mit *H. pylori* inkubierten AGS-Zellen eine erhöhte Menge an p21. Danach fiel die p21 Menge kontinuierlich bis auf 70 % des Ausgangswertes. Die gesunkene p21 Konzentration könnte

zudem mit der auf die Hälfte gesunkene p53 Konzentration in Übereinstimmung gebracht werden, wenn angenommen wird, dass nur eine p53 abhängige und keine zusätzliche p53 unabhängige p21-Expression vorliegt.

#### 4.4.4. *H. pylori*-Hsp60 beeinflusst p21, p53 und pp53

Der Transkriptionsfaktor p53 induziert über 150 Gene, die vor allem eine Funktion in der Apoptose und beim Zellzyklusarrest besitzen (Appella und Anderson 2001). Wie es zum p53-induzierten Zellzyklusarrest kommt, ist im weitesten aufgeklärt. Damit Zellen nicht in die S-Phase des Zellzyklus eintreten, induziert p53 die Expression von p21, wodurch es zum G1-Zellarrest kommt. Der G2/M-Zellarrest wird hingegen durch die von p53 induzierbaren Gene GADD45 und 14-3-3 $\sigma$  kontrolliert (Benchimol 2001). Aktiviert wird p53 durch zelläußere und zellinnere Stresssignale. Studien zeigen, dass p53 an mindestens 18 Positionen Stresssignal-spezifisch posttranslational modifiziert werden kann (Appella und Anderson 2001). Die posttranslationale Phosphorylierung am Serin 15 von p53 kann zum Beispiel spezifisch nach Art des Stresssignals entweder durch DNA-PK, ATM oder ATR erfolgen. Die Aufklärung der genauen Mechanismen wie p53 die Zelle entweder zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose induziert, ist immer noch einer der am intensivsten erforschten Forschungszweige.

Studien zum Einfluss von *H. pylori* auf die Expression von p53 und p21 kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In Inkubationsstudien von *H. pylori* mit AGS-Zellen beobachteten Peek et al. (1999) keine signifikanten Veränderungen bei der Expression von p53, p21 und MDM2. Unger et al. (2003) konnte dagegen in Biopsien vom Antrum, in Gegenwart einer intestinalen Metaplasie, einen Anstieg von p53 und der Apoptoserate nachweisen. Zusätzlich wurden in humanen Biopsien mit einer Metaplasie auch eine erhöhte Zellproliferation nachgewiesen (Zhang et al. 2001).

Dass der p53-Signalweg wahrscheinlich nur einer von mehreren Signaltransduktionswegen ist, wie die Zellproliferation gehemmt und die Zellen zur Apoptose induziert werden, zeigten die Studien von Zhang et al. (2002). Sie beobachteten unabhängig vom p53 Status der Zellen eine *H. pylori*-induzierte Apoptose, wobei die p53 Wildtyp-Zellen die höchste Apoptoserate aufwiesen. Außerdem zeigten ihre Studien mit den *H. pylori*-Stämmen *cagA*<sup>+</sup>/*vacA*<sup>+</sup> und *cagA*<sup>-</sup>/*vacA*<sup>-</sup> keine Unterschiede bei der Hemmung der Zellproliferation und der Apoptoseinduktion. Nur bei den gemischten Stämmen konnten sie einen Effekt auf den Zellzyklus nachweisen.

Während der Inkubation mit nativen Hsp60 sank die p53 Menge in den AGS-Zellen. Kurze Zeit nach der Infektion kam es während der p53-Erniedrigung zu einem zwischenzeitlichen Anstieg von p53, der mit einer kurzen Erhöhung von p21 zusammen fiel. Vermutlich handelt es sich dabei um die p53-induzierte Hochregulierung von p21 zur Einleitung des im FACS detektierten G1-Arrestes. Die erhöhte p53-Menge könnte auch mit der erstmals erhöhten Caspase-3 Aktivität zu diesem Zeitpunkt zusammenhängen.

Kurosawa et al. (2002) untersuchte im Gegensatz zu allen anderen Studien neben p53 auch den Anteil des phosphorylierten Ser<sup>15</sup> beim p53 (pp53<sup>S15</sup>), dessen Menge in Zellen mit DNA-Schäden ansteigt. Nach einer Inkubation von 30 min. bzw. 60 min. von mit in Wasser aufgenommenen *H. pylori*-Bakterien detektierten sie einen Anstieg von pp53<sup>S15</sup> in den AGS-Zellen. Auf mRNA-Ebene war zudem zwischenzeitlich p21 hochreguliert.

Die Menge an pp53<sup>S15</sup> sank nach dem Inkubationsbeginn mit dem nativen Hsp60 zuerst in den AGS-Zellen und stieg dann beinahe bis auf das Doppelte vom Anfangsniveau. Die Hsp60 induzierte Apoptose in unseren Studien lässt sich in Verbindung mit der ansteigenden pp53<sup>S15</sup> Menge bringen, da pp53<sup>S15</sup> eine Apoptose-Induzierung durch DNA-Schaden signalisiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass p53 als Reaktion auf einen DNA-Schaden direkt die Transkription der Effektorcaspasen-6 aktiviert und dadurch vermutlich die Reizschwelle zur

Apoptose-Induktion senkt (MacLachlan und El-Deiry, 2002). Wenn auf der Effektorcaspasen-Ebene die Caspase-6 und nachfolgend die Caspase-3 aktiviert würde, könnte die Apoptose ohne die aktivierten Caspasen-8 oder -9 erfolgen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb während der Hsp60-induzierten Apoptose in AGS-Zellen keine Caspase-8 oder -9 Aktivität gemessen wurde.

### 4.4.5. Rolle von Hsp60 bei der Permeabilisierung von Mitochondrien

Die Mitochondrien besitzen eine Schlüsselrolle bei der Einleitung der intrinsischen Apoptose. Als Folge von zellulärem Stress, DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren oder auch der Verlust von Zellkontakten zu Nachbarzellen wird die Membran von Mitochondrien permeabilisiert und damit die intrinsische Apoptose eingeleitet. Bislang ist von Bax und Bak bekannt, dass diese Proteine durch Bildung äusserer Membranporen die Mitochondrienmembran permeabilisieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass auch zytosolisches p53 dazu fähig ist. p53 kommt gebunden an Bcl-xL auf der Mitochondrienmembran vor. Im Nukleus lokalisiertes p53 induziert die Expression von PUMA, welches dann p53 aus dem Mitochondrienmembran gebundenen Bcl-xL/p53-Komplex freisetzt. Das freigesetzte p53 leitet darauf die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran ein (Chipuk et al. 2005). Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung verschiedener apoptotischer Faktoren, wie z.B. Cytochrom c, Smac/Diablo und Procaspase-3-Hsp60 Komplexe (Lucken-Ardjomande und Martinou 2005).

Bei Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion wurden in Magenbiopsien, wie auch in *in vitro* Experimenten, eine gesteigerte Bak-Expression beobachtet (Chen et al. 1997). Des Weiteren wurde eine Hochregulierung des proapoptotischen Bax und eine Herunterregulierung des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins in *H. pylori* positiven Patienten gezeigt (Konturek et al. 1999). Der von *H. pylori* verursachte zelluläre Stress induzierte die Mitochondrien zur

Cytochrom c Freisetzung (Maeda et al. 2002). Mit der induzierten Apoptose wurden neben Fas und TNF- $\alpha$  auch p53 aktiviert (Ahmed et al. 2000). Eine weitere Funktion von p53 liegt in der Transkriptionshemmung von Cox-2, welches die Bildung von freien Radikalen (*reactive oxidative species* (ROS) und NO $\cdot$ ) fördert, die wiederum Mitochondrien zur Cytochrom c Freisetzung stimulieren können.

Um den Einfluss von intrazellulär vorkommenden *H.pylori*-Hsp60 auf Mitochondrien zu untersuchen, wurde natives Hsp60 mit isolierten Mitochondrien aus AGS-Zellen inkubiert. Die beobachtete Cytochrom c und Smac/Diablo Freisetzung zeigt die potenzielle Fähigkeit von ins Zytosol gelangtem *H.pylori*-Hsp60 die Mitochondrien zur Einleitung der intrinsischen Apoptose zu induzieren. Damit stellt das Hsp60 von *H.pylori* einen neuen bakteriellen Faktor dar, wie die Magenepithelzellen durch *H.pylori* zur Apoptose induziert werden könnten.

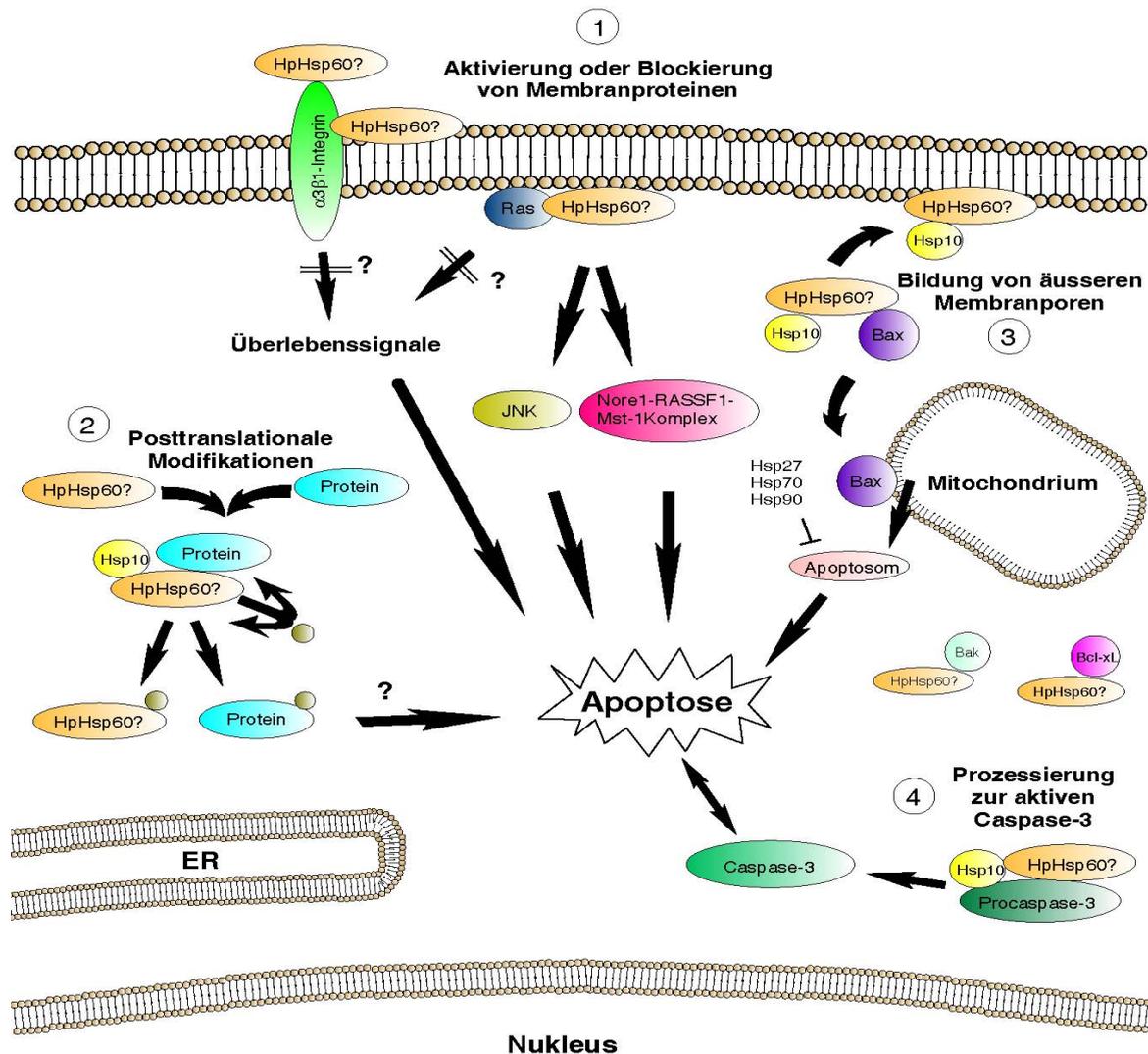
### 4.5. Einfluss von Hsp60 auf die zellulären Signaltransduktionswege

Hitzeschockproteine spielen eine komplexe Rolle beim Zelltod. Häufig besitzen Hitzeschockproteine aber eine antiapoptotische Funktion. Die Überexpression von Hsp27, Hsp70, Hsp72 und Hsp90 schützt die Zellen in der Regel vor Apoptose (Mehlen et al. 1996, Gabai et al. 1998, Jäättelä et al. 1998). Zeitliche Veränderungen bei der Hsp60 und Hsp105 Expression stehen mit dem Zelltod in Verbindung, wie Untersuchungen zur Regulierung des Keimzellverlustes bei *Cynomolgus*-Affen zeigten. Es wird daher vermutet, dass diese beiden Hitzeschockproteine in Schlüsselprozesse der Apoptose von Keimzellen involviert sind (Zhang et al. 2005).

Über die Rolle von Hsp60 und seinem Cochaperon Hsp10 beim programmierten Zelltod in eukaryontischen Zellen ist wenig bekannt. Der Hauptteil an Hsp60 kommt mit 80 - 85 % in den Mitochondrien und der restliche Teil im Zytosol vor (Soltys and Gupta 1996). Im Zytosol und den Mitochondrien von Jurkat Zellen wurde Hsp60 im Komplex mit der Procaspase-3

gefunden. Weitere Studien mit diesem Komplex zeigten, dass Hsp60 die Prozessierung der Procaspase-3 zur aktiven Caspase-3 beschleunigt (Samali et al. 1999, Xanthoudakis et al. 1999). Im Zytosol normaler Herzmonozyten liegt Hsp60 im Komplex mit den proapoptotischen Proteinen Bax oder Bak vor (Kirchhof et al. 2002). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Shan et al. (2003) in ihren Studien, in denen sie ebenfalls Hsp60 im Komplex mit Bax nachwies. Zudem fanden sie auch das antiapoptotische Bcl-x<sub>L</sub> im Komplex mit dem Hsp60. Gupta und Knowlton (2005) zeigten in ihren Studien, dass Hypoxia oder die intrazelluläre Abnahme von ATP um 10 % zur Dissoziation von Bax von dem zytosolischen Bax-Hsp60 Komplex führt. Das Bax translozierte zu den Mitochondrien und stimulierte die Cytochrom c Freisetzung. Das freie Hsp60 translozierte dagegen zur Plasmamembran (Gupta und Knowlton 2005), wo es wahrscheinlich die Resistenz der Zellmembran vor Immunlyse erhöht (Feng et al. 2002, Sapozhnikov et al. 2002). Die Gesamtmenge an Hsp60 blieb während der Apoptose in der Zelle gleich. Das eine Überexpression von Hsp60 die Kardiozyten vor Apoptose schützt (Lin et al. 2001), könnte demnach auf der Bindung von nicht komplexierten proapoptotischen Proteinen basieren.

Welche Funktion das bakterielle Hsp60 von *H. pylori* im Zytosol humaner Zellen einnimmt, kann nur vermutet werden. Es könnte beispielsweise an Proteine im Zytosol, an Lipide und Proteine der inneren Zellmembran, wie auch der äußeren Mitochondrien- oder Kernmembran binden, an die das humane Hsp60 bindet. Dadurch könnte eine Konkurrenz-Situation, zwischen dem bakteriellen *H. pylori*-Hsp60 und dem humanen Hsp60, bei der Bindung von Lipiden und Proteinen entstehen. Humanes Hsp60 wurde im Komplex mit dem Ras-Protein (de Gunzburg et al. 1989, Ikawa und Weinberg 1992) und den Proteinen des A- und L-Aminosäure Transportsystems (Jones et al. 1994, Woodlock et al. 1997) nachgewiesen. Diese Entdeckungen führten dazu, dass dem Hsp60 auch eine Funktion in der Signaltransduktion und beim Aminosäuretransport zugeschrieben wird. Desweiteren enthält Hsp60 mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen. Phosphoryliert wird Hsp60 von der Proteinkinase A (Khan et al. 1998). Außerdem reguliert Hsp60 die Aktivität der Src Tyrosin-Kinase durch Konformationsänderungen (Abdel-Ghany et al. 1990).



**Abb. 20: Potenzielle Wege von *H. pylori*-Hsp60 die Magenzellen zur Apoptose zu induzieren.** Humanes Hsp60 ist in den Zellen an verschiedene pro- und antiapoptotische Proteine assoziiert. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie könnte anstelle des humanen Hsp60 das *H. pylori*-Hsp60 (*HpHsp60?*) an diese Proteine binden. *H. pylori*-Hsp60 bindet die humanen Proteine wahrscheinlich nicht mit der gleichen Affinität. Die Folge könnte eine beschleunigte Aktivierung, Hemmung oder Blockierung von den pro- oder antiapoptotischen Signalwegen dieser Proteine sein. **1 Aktivierung oder Blockierung von Membranproteinen:** Rekombinantes humanes Hsp60 bindet als Ligand den  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrinrezeptor. Extrazellulär an den  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrinrezeptor assoziiertes humanes Hsp60 verändert nach der Bindung eines Rezeptorliganden die Konformation des Rezeptors. An Ras assoziiertes Hsp60 beeinflusst vielleicht die von Ras induzierbaren pro- und antiapoptotischen Signaltransduktionswege. **2 Posttranslationale Modifikationen:** Humanes Hsp60 reguliert die Aktivität der Src Tyrosin-Kinase durch Konformationsänderungen. Die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert humanes Hsp60 und verändert damit den Signalzustand bzw. die Funktion des Hitzeschockproteins. Humanes Hsp60 verhindert die Polyubiquitinierung und somit die Degradierung des  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrinrezeptors. **3 Bildung von äusseren Membranporen:** Die Dissoziation von Hsp60 vom Bax führt zur Bax-induzierten Permeabilisierung von Mitochondrien. Das Hsp60 transloziert zur Zellmembran. **4 Prozessierung zur aktiven Caspase-3:** Das humane Hsp60 beschleunigt die Prozessierung der Procaspase-3 zur aktiven Caspase-3.

Auf der Zellmembran ist Hsp60 an den  $\alpha3\beta1$ -Integrinrezeptor assoziiert. Der  $\beta1$ -Integrinrezeptor ist unter anderem in die Übermittlung von extrazellulären Überlebenssignalen in die Zelle involviert. Die Hemmung der Oberflächenexpression von humanen Hsp60 verhinderte die Aktivierung des  $\alpha3\beta1$ -Integrinrezeptors durch den *Insulin-like growth factor 1* (IGF1). Das Hsp60 vermittelt vermutlich daher die Aktivierung des  $\alpha3\beta1$ -Integrinrezeptors durch Konformationsänderungen. Für das an den  $\alpha3\beta1$ -Integrinrezeptor assoziierten Hsp60 wurde ausserdem eine elementare Funktion bei der Internalisierung des an den  $\alpha3\beta1$ -Integrinrezeptor gebundenen *Staphylococcus aureus* in die Zelle nachgewiesen (Dziewanowska et al. 2000). Kürzlich wurde für das an den Integrinrezeptor assoziierte Hsp60 eine neue Funktion vermutet. Das Hsp60 soll demnach in die posttranslationale Modifikation des Integrinrezeptor involviert sein, indem es die Polyubiquitinierung und somit die Degradierung des Proteins verhindert (Shan et al. 2003). Versuche mit exogenen rekombinanten Hsp60 zeigten, dass dessen Bindung an den  $\alpha3\beta1$ -Integrinrezeptor zur Aktivierung des Rezeptors führte (Barazi et al. 2002). Die Blockade des  $\beta1$ -Integrinrezeptors bei Inselzellen führte zur Hemmung der Zelladhäsion und zu einem Anstieg der Apoptoserate (Wang et al. 2005). Wenn *H. pylori*-Hsp60 gleichfalls wie humanes Hsp60 an alle diese Proteine bindet, könnte *H. pylori*-Hsp60 pro- oder antiapoptotischen Signaltransduktionsketten hemmen oder auslösen.

Die bakteriellen Homologe aus *E. coli* GroEL und GroES werden meistens nur mit dem Überleben der Bakterien in Verbindung gebracht. Ein aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isoliertes GroEL ähnliches Protein wirkte auf HaCaT-Epithelzellen bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  antiapoptotisch, aber ab einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  war es für die Zellen toxisch (Goulhen et al. 1998). Das könnte ein Hinweis für eine konzentrationsabhängige Wirkung vom prokaryontischen Hsp60 auf die Apoptoseregulierung von humanen Zellen darstellen.

Welche Hitzeschockproteine und im besonderen Hsp60 bzw. bakterielles Hsp60 beim

programmierten Zelltod von humanen Zellen eine Rolle spielen, ist ein sehr junger Forschungszweig, an dem die Forschungsgemeinschaft langsam immer mehr Interesse zeigt. Die bisher publizierten Ergebnisse zu Hsp60 zeigen eine indirekte bzw. direkte Beteiligung von Hsp60 an der Apoptose. Unsere mit dem aus *H. pylori* aufgereinigten Hsp60-Eluat erhaltenen Ergebnisse zeigen erstmals, dass bakterielles Hsp60 von *H. pylori* fähig ist, humane AGS-Zellen zur Apoptose zu induzieren. Der Einfluss von *H. pylori*-Hsp60 auf die Expression von p21 und p53, die eine Schlüsselrolle in den Signaltransduktionsketten der Zellproliferation und des programmierten Zelltod einnehmen, auf den Anstieg von pp53 aufgrund von DNA-Schäden, wie auch die zeitlich spätere Aktivierung der Caspase-3, deutet wahrscheinlich auf eine sehr komplexe Involvierung von *H. pylori*-Hsp60 in eine oder mehrerer Signaltransduktionsketten hin, die letztlich die Zellen zur Apoptose induzieren.

### 5. Literaturverzeichnis

Abdel-Ghany M., el-Gendy K., Zhang S. and Racker E. (1990), Control of src kinase activity by activators, inhibitors, and substrate chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7061-5.

Adams J.M. and Cory S. (1998), The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381): 1322-6.

Ahmed A., Smoot D., Littleton G., Tackey R., Walters C.S., Kashanchi F., Allen C.R. and Ashktorab H. (2000), *Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression. *Microbes Infect* 2(10): 1159-69.

Amieva M.R., Salama N.R., Tompkins L.S. and Falkow S. (2002), *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol* 4(10): 677-90.

Anderton S.M., van der Zee R. and Goodacre J.A. (1993), Inflammation activates self hsp60-specific T cells. *Eur J Immunol* 23(1): 33-8.

Appella E. and Anderson C.W. (2001), Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268(10): 2764-72.

Aras R.A., Fischer W., Perez-Perez G.I., Crosatti M., Ando T., Haas R. and Blaser M.J. (2003), Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med* 198(9): 1349-60.

Ashkenazi A. and Dixit V.M. (1998), Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281(5381): 1305-8.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Barazi H.O., Zhou L., Templeton N.S., Krutzsch H.C. and Roberts D.D. (2002), Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of alpha 3 beta 1 integrin activation. *Cancer Res* 62(5): 1541-8.

Baxmann D. (2004), Aufreinigung des Apoptose induzierenden Faktors von *Helicobacter pylori* mittels Affinitätschromatographie. Naturwiss. Diplomarbeit, Universität Hannover

Bechi P., Balzi M., Becciolini A., Maugeri A., Raggi C.C., Amorosi A. and Dei R. (1996), *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 91(2): 271-6.

Becker J. and Craig E.A. (1994), Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219(1-2): 11-23.

Beere H.M. (2005), Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 115(10): 2633-9.

Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T., Tailor P., Morimoto R.I., Cohen G.M. and Green D.R. (2000), Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2(8): 469-75.

Benchimol S. (2001), p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ* 8(11): 1049-51.

Berridge M.J., Lipp P. and Bootman M.D. (2000), Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 287(5458): 1604-5.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Bizzozero G (1893) Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehung ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. Arch. Mikr. Anat. 42:82-152

Boatright K.M., Renatus M., Scott F.L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I.M., Ricci J.E., Edris W.A., Sutherlin D.P., Green D.R. and Salvesen G.S. (2003), A unified model for apical caspase activation. Mol Cell 11(2): 529-41.

Boatright K.M. and Salvesen G.S. (2003), Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 15(6): 725-31.

Boettcher G. (1874) Zur Genese des perforierenden Magengeschwürs. Dorpater Med Z 5:148

Borner C. (2003), The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immunol 39(11): 615-47.

Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D.C., Joachimiak A., Horwich A.L. and Sigler P.B. (1994), The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. Nature 371(6498): 578-86.

Brocchieri L. and Karlin S. (2000), Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. Protein Sci 9(3): 476-86.

Burel C., Mezger V., Pinto M., Rallu M., Trigon S. and Morange M. (1992), Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. Experientia 48(7): 629-34.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Burston, S.G. & Saibil, H.R. (1999). 23. The relationship between chaperonin structure and function. In *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Bukau, B. (ed) pp. 523-553: Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland.

Calam J. (1999), *Helicobacter pylori* modulation of gastric acid. *Yale J Biol Med* 72(2-3): 195-202.

Cao P., McClain M.S., Forsyth M.H. and Cover T.L. (1998), Extracellular release of antigenic proteins by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 66(6): 2984-6.

Cario E., Rosenberg I.M., Brandwein S.L., Beck P.L., Reinecker H.C. and Podolsky D.K. (2000), Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 164(2): 966-72.

Cerretti D.P., Hollingsworth L.T., Kozlosky C.J., Valentine M.B., Shapiro D.N., Morris S.W. and Nelson N. (1994), Molecular characterization of the gene for human interleukin-1 beta converting enzyme (IL1BC). *Genomics* 20(3): 468-73.

Chang D.W., Xing Z., Pan Y., Algeciras-Schimnich A., Barnhart B.C., Yaish-Ohad S., Peter M.E. and Yang X. (2002), c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21(14): 3704-14.

Chang K., Fujiwara Y., Wyle F. and Tarnawski A. (1993), *Helicobacter pylori* toxin inhibits growth and proliferation of cultured gastric cells-Kato III. *J Physiol Pharmacol* 44(1): 17-22.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Chen S., Roseman A.M., Hunter A.S., Wood S.P., Burstn S.G., Ranson N.A., Clarke A.R. and Saibil H.R. (1994), Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature* 371(6494): 261-4.

Chen G., Sordillo E.M., Ramey W.G., Reidy J., Holt P.R., Krajewski S., Reed J.C., Blaser M.J. and Moss S.F. (1997), Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK. *Biochem Biophys Res Commun* 239(2): 626-32.

Chiou C.C., Chan C.C., Kuo Y.P. and Chan E.C. (2003), *Helicobacter pylori* inhibits activity of cdc2 kinase and delays G2/M to G1 progression in gastric adenocarcinoma cell line. *Scand J Gastroenterol* 38(2): 147-52.

Chipuk J.E., Bouchier-Hayes L., Kuwana T., Newmeyer D.D. and Green D.R. (2005), PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309(5741): 1732-5.

Chow K.W., Bank S., Ahn J., Roberts J., Blumstein M. and Kranz V. (1995), *Helicobacter pylori* infection does not increase gastric antrum mucosal cell proliferation. *Am J Gastroenterol* 90(1): 64-6.

Cohen G.M. (1997), Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 ( Pt 1): 1-16.

Councilman, W. (1890). Report on the etiology and prevention of yellow fever. depolarization. *Public Health Bulletin Washington, DC: US Govt. Print. Off.* 2, 151–59.

Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J. and Rappuoli R. (1999), *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284(5418): 1328-33.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Cover T.L., Halter S.A. and Blaser M.J. (1992), Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. *Hum Pathol* 23(9): 1004-10.

Craanen M.E., Dekker W., Blok P., Ferwerda J. and Tytgat G.N. (1992), Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. *Gut* 33(1): 16-20.

Craig E.A. (1993), Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science* 260(5116): 1902-3.

Craig E.A., Weissman J.S. and Horwich A.L. (1994), Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78(3): 365-72.

Danieli M.G., Candela M., Ricciatti A.M., Reginelli R., Danieli G., Cohen I.R. and Gabrielli A. (1992), Antibodies to mycobacterial 65 kDa heat shock protein in systemic sclerosis (scleroderma). *J Autoimmun* 5(4): 443-52.

de Gunzburg J., Riehl R. and Weinberg R.A. (1989), Identification of a protein associated with p21ras by chemical crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(11): 4007-11.

Domek M.J., Netzer P., Prins B., Nguyen T., Liang D., Wyle F.A. and Warner A. (2001), *Helicobacter pylori* induces apoptosis in human epithelial gastric cells by stress activated protein kinase pathway. *Helicobacter* 6(2): 110-5.

Dorrell N., Martino M.C., Stabler R.A., Ward S.J., Zhang Z.W., McColm A.A., Farthing M.J. and Wren B.W. (1999), Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa. *Gastroenterology* 117(5): 1098-104.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Draetta G.F. (1998), 11th European Cell Cycle Conference: April 23-26, 1997, Gardone Riviera (Italy) and Symposium on Cell Cycle Regulation (17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology): August 24-29, 1997, San Francisco, CA. *Biochim Biophys Acta* 1377(1): R11-20.

Drumm B., Perez-Perez G.I., Blaser M.J. and Sherman P.M. (1990), Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 322(6): 359-63.

Dunn B.E., Cohen H. and Blaser M.J. (1997), *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10(4): 720-41.

Dwarakanath A.D., Tsai H.H., Sunderland D., Hart C.A., Figura N., Crabtree J.E. and Rhodes J.M. (1995), The production of neuraminidase and fucosidase by *Helicobacter pylori*: their possible relationship to pathogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 12(3-4): 213-16.

Dziewanowska K., Carson A.R., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W. and Bohach G.A. (2000), Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect Immun* 68(11): 6321-8.

Eaton K.A., Brooks C.L., Morgan D.R. and Krakowka S. (1991), Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 59(7): 2470-5.

Elitsur Y. and Neace C. (1999), Detection of *Helicobacter pylori* organisms by Hp-fast in children. *Dig Dis Sci* 44(6): 1169-72.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Engstrand L., Graham D., Scheynius A., Genta R.M. and El-Zaatari F. (1997), Is the sanctuary where *Helicobacter pylori* avoids antibacterial treatment intracellular?, *Am J Clin Pathol* 108(5): 504-9.

Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L. and Henson P.M. (1992), Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148(7): 2207-16.

Fan X., Gunasena H., Cheng Z., Espejo R., Crowe S.E., Ernst P.B. and Reyes V.E. (2000), *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* 165(4): 1918-24.

Feige U. and Mollenhauer J. (1992), Heat shock proteins. Introduction. *Experientia* 48(7): 621-2.

Feng H., Zeng Y., Graner M.W. and Katsanis E. (2002), Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 100(12): 4108-15.

Fenton W.A., Kashi Y., Furtak K. and Horwich A.L. (1994), Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* 371(6498): 614-9.

Fersht, A.R. (1999). *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. W.H. Freeman and Company: New York, Houndmills, Basingstroke.

Fisch P., Malkovsky M., Kovats S., Sturm E., Braakman E., Klein B.S., Voss S.D., Morrissey L.W., DeMars R., Welch W.J. and et al. (1990), Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250(4985): 1269-73.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Florescu-Zorila S., Shabana A.H., Oboeuf M., Martin N. and Forest N. (2001), H-7 and fetal calf serum (FCS) act synergistically to increase apoptosis in the KB line of human oral carcinoma cells. *Tissue Cell* 33(4): 368-75.

Fox J.G., Li X., Cahill R.J., Andrutis K., Rustgi A.K., Odze R. and Wang T.C. (1996), Hypertrophic gastropathy in *Helicobacter felis*-infected wild-type C57BL/6 mice and p53 hemizygous transgenic mice. *Gastroenterology* 110(1): 155-66.

Fraser A.G., Sim R., Sankey E.A., Dhillon A.P. and Pounder R.E. (1994), Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell proliferation. *Aliment Pharmacol Ther* 8(2): 167-73.

Frydman J., Nimmesgern E., Ohtsuka K. and Hartl F.U. (1994), Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370(6485): 111-7.

Gabai V.L., Meriin A.B., Yaglom J.A., Volloch V.Z. and Sherman M.Y. (1998), Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett* 438(1-2): 1-4.

Gacsar A., Shi L. and Nosanchuk J.D. (2006), Different regulation of surface antigen genes of *Histoplasma capsulatum* during *in vitro* and *in vivo* infections. In: ASM Conferences: Dimorphic Fungal Pathogens. American Society for Microbiology, Washington DC, 40-41

Galea-Lauri J., Latchman D.S. and Katz D.R. (1996), The role of the 90-kDa heat shock protein in cell cycle control and differentiation of the monoblastoid cell line U937. *Exp Cell Res* 226(2): 243-54.

## 5. Literaturverzeichnis

---

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

Gartel A.L. and Tyner A.L. (2002), The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1(8): 639-49.

Georgeopoulos, C. and I. Herskowitz (1971), *Escherichia coli* mutants blocked in lambda DNA synthesis. in: A. D. HERSHEY (Hrsg.): The bacteriophage Lambda. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, S. 553 – 564

Gething M.J. (1997), Protein folding. The difference with prokaryotes. *Nature* 388(6640): 329, 331.

Geis G., Leying H., Suerbaum S. and Opferkuch W. (1990), Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 28(5): 930-2.

Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B., Leying H. and Opferkuch W. (1993), Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 38(5): 371-7.

Giaccia A.J. and Kastan M.B. (1998), The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12(19): 2973-83.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Glocker E., Lange C., Covacci A., Bereswill S., Kist M. and Pahl H.L. (1998), Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappaB activation. *Infect Immun* 66(5): 2346-8.

Goodwin C.S. (1989). *Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. *Lancet* 2(8670):1019-20.

Goulhen F., Hafezi A., Uitto V.J., Hinode D., Nakamura R., Grenier D. and Mayrand D. (1998), Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 66(11): 5307-13.

Graeff-Meeder E.R. de, Rijkers G.T., Voorhorst-Ogink M.M., Kuis W., van der Zee R., van Eden W. and Zegers B.J. (1993), Antibodies to human HSP60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis. *Pediatr Res* 34(4): 424-8.

Gupta S. and Knowlton A.A. (2005), HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med* 9(1): 51-8.

Gupta R.A., Polk D.B., Krishna U., Israel D.A., Yan F., DuBois R.N. and Peek R.M., Jr. (2001), Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses nuclear factor kappa B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 276(33): 31059-66.

Habich C., Baumgart K., Kolb H. and Burkart V. (2002), The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol* 168(2): 569-76.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Hartl F.U. (1996), Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381(6583): 571-9.

Hartl F.U., Hlodan R. and Langer T. (1994), Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem Sci* 19(1): 20-5.

Hazell S.L., Lee A., Brady L. and Hennessy W. (1986), *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 153(4): 658-63.

Hazell S.L, Evans D.J. Jr., Graham DY. (1991) *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol* 137 (1): 57-61.

Hendrix R.W. (1979), Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J Mol Biol* 129(3): 375-92.

Herlyn M., Kath R., Williams N., Valyi-Nagy I. and Rodeck U. (1990), Growth-regulatory factors for normal, premalignant, and malignant human cells in vitro. *Adv Cancer Res* 54: 213-34.

Huesca M., Borgia S., Hoffman P. and Lingwood C.A. (1996), Acidic pH changes receptor binding specificity of *Helicobacter pylori*: a binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. *Infect Immun* 64(7): 2643-8.

Huesca M., Gold B., Sherman P., Lewin P. and Lingwood C. (1993), Therapeutics used to alleviate peptic ulcers inhibit *H. pylori* receptor binding in vitro. *Zentralbl Bakteriol* 280(1-2): 244-52.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

IARC (1994) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 61. WHO, Lyon.

Igarashi M., Kitada Y., Yoshiyama H., Takagi A., Miwa T. and Koga Y. (2001), Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 69(2): 816-21.

Ikawa S. and Weinberg R.A. (1992), An interaction between p21ras and heat shock protein hsp60, a chaperonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6): 2012-6.

Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E. and Tschopp J. (1997), Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388(6638): 190-5.

Jäättelä M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T. and Egeblad M. (1998), Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J* 17(21): 6124-34.

Jones M., Gupta R.S. and Englesberg E. (1994), Enhancement in amount of P1 (hsp60) in mutants of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells exhibiting increases in the A system of amino acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 858-62.

Jones N.L., Shannon P.T., Cutz E., Yeger H. and Sherman P.M. (1997), Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* 151(6): 1695-703.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Kamiya S., Yamaguchi H., Osaki T. and Taguchi H. (1998), A virulence factor of *Helicobacter pylori*: role of heat shock protein in mucosal inflammation after *H. pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 27 Suppl 1: S35-9.

Kaufman R.J. (2002), Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110(10): 1389-98.

Kaufman R.J., Scheuner D., Schroder M., Shen X., Lee K., Liu C.Y. and Arnold S.M. (2002), The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6): 411-21.

Kaufmann S.H.E. and Schoel B. (1994), Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self, p 495-531. *In* R.I. Morimoto, A.Tissieres, G .Georgopoulos, The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1994

Kaufmann S.H. (1992), The cellular immune response to heat shock proteins. *Experientia* 48(7): 640-3.

Kaufmann S.H., Schoel B., Wand-Wurttenberger A., Steinhoff U., Munk M.E. and Koga T. (1990), T-cells, stress proteins, and pathogenesis of mycobacterial infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 155: 125-41.

Kaur I., Voss S.D., Gupta R.S., Schell K., Fisch P. and Sondel P.M. (1993), Human peripheral gamma delta T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* 150(5): 2046-55.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Kawahara T., Kuwano Y., Teshima-Kondo S., Sugiyama T., Kawai T., Nikawa T., Kishi K. and Rokutan K. (2001), Helicobacter pylori lipopolysaccharide from type I, but not type II strains, stimulates apoptosis of cultured gastric mucosal cells. J Med Invest 48(3-4): 167-74.

Kawahara T., Teshima S., Kuwano Y., Oka A., Kishi K. and Rokutan K. (2001), Helicobacter pylori lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281(3): G726-34.

Kerr J.F. (1969), An electron-microscope study of liver cell necrosis due to heliotrine. J Pathol 97(3): 557-62.

Kerr J.F. (1971), Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. J Pathol 105(1): 13-20.

Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26(4): 239-57.

Khan I.U., Wallin R., Gupta R.S. and Kammer G.M. (1998), Protein kinase A-catalyzed phosphorylation of heat shock protein 60 chaperone regulates its attachment to histone 2B in the T lymphocyte plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 95(18): 10425-30.

Kidd M., Lastovica A.J., Atherton J.C. and Louw J.A. (1999), Heterogeneity in the Helicobacter pylori vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa?, Gut 45(4): 499-502.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Kim J.M., Kim J.S., Jung H.C., Song I.S. and Kim C.Y. (2000), Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor alpha and soluble Fas ligands. *Scand J Gastroenterol* 35(1): 40-8.

Kimberley F.C. and Sreaton G.R. (2004), Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 14(5): 359-72.

Kirchhoff S.R., Gupta S. and Knowlton A.A. (2002), Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation* 105(24): 2899-904.

Knipp U., Birkholz S., Kaup W. and Opferkuch W. (1993), Immune suppressive effects of *Helicobacter pylori* on human peripheral blood mononuclear cells. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 182(2): 63-76.

Knipp U., Birkholz S., Kaup W. and Opferkuch W. (1996), Partial characterization of a cell proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 64(9): 3491-6.

Kohda K., Tanaka K., Aiba Y., Yasuda M., Miwa T. and Koga Y. (1999), Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut* 44(4): 456-62.

Konturek P.C., Pierzchalski P., Konturek S.J., Meixner H., Faller G., Kirchner T. and Hahn E.G. (1999), *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans. *Scand J Gastroenterol* 34(4): 375-83.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Kuck D., Kolmerer B., Iking-Konert C., Krammer P.H., Stremmel W. and Rudi J. (2001), Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 69(8): 5080-7.

Kurosawa A., Miwa H., Hirose M., Tsune I., Nagahara A. and Sato N. (2002), Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by *Helicobacter pylori* through increased phosphorylated p53, p21 and Bax expression in endothelial cells. *J Med Microbiol* 51(5): 385-91.

Labigne A., Cussac V. and Courcoux P. (1991), Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 173(6): 1920-31.

Lamb J.R., Bal V., Mendez-Samperio P., Mehlert A., So A., Rothbard J., Jindal S., Young R.A. and Young D.B. (1989), Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1(2): 191-6.

Ledig S., Wagner S., Manns M.P., Beil W. and Athmann C. (2004), Role of the receptor-mediated apoptosis in *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Digestion* 70(3): 178-86.

Lee A., Fox J. and Hazell S. (1993), Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun* 61(5): 1601-10.

Le'Negrate G., Ricci V., Hofman V., Mograbi B., Hofman P. and Rossi B. (2001), Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the *cag* pathogenicity island phenotype. *Infect Immun* 69(8): 5001-9.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Letley D.P., Rhead J.L., Twells R.J., Dove B. and Atherton J.C. (2003), Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 278(29): 26734-41.

Leunk R.D., Johnson P.T., David B.C, Kraft W.G, Morgan D.R. (1988), Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*; 26(2):93-99.

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. and Wang X. (1997), Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-89.

Li S.G., Quayle A.J., Shen Y., Kjeldsen-Kragh J., Oftung F., Gupta R.S., Natvig J.B. and Forre O.T. (1992), Mycobacteria and human heat shock protein-specific cytotoxic T lymphocytes in rheumatoid synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 35(3): 270-81.

Lin K.M., Lin B., Lian I.Y., Mestrlil R., Scheffler I.E. and Dillmann W.H. (2001), Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation* 103(13): 1787-92.

Lindquist S. (1986), The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55: 1151-91.

Liu Q.A. and Hengartner M.O. (1999), The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 887: 92-104.

Lucken-Ardjomande S. and Martinou J.C. (2005), Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J Cell Sci* 118(Pt 3): 473-83.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Macchia G., Massone A., Burroni D., Covacci A., Censini S. and Rappuoli R. (1993), The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases. *Mol Microbiol* 9(3): 645-52.

MacLachlan T.K. and El-Deiry W.S. (2002), Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9492-7.

Maeda S., Yoshida H., Mitsuno Y., Hirata Y., Ogura K., Shiratori Y. and Omata M. (2002), Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Mol Pathol* 55(5): 286-93.

Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori - Von der Grundlage zur Therapie* (Georg Thieme Verlag, Stuttgart).

Mariani S.M. and Krammer P.H. (1998), Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol* 28(3): 973-82.

Marshall B.J., Royce H., Annear D.I., Goodwin C.S., Pearman J.W., Warren J.R. and Armstrong J.A. (1984), Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett.* 25(98): 83-88.

Marshall B.J. and Warren J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* i:1311-1315

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Martin J.H., Potthoff A., Ledig S., Cornberg M., Jandl O., Manns M.P., Kubicka S., Flemming P., Athmann C., Beil W. and Wagner S. (2004), Effect of *H. pylori* on the expression of TRAIL, FasL and their receptor subtypes in human gastric epithelial cells and their role in apoptosis. *Helicobacter* 9(5): 371-86.

Megraud F. (1989), [Bacteriologic methods for the diagnosis of *Campylobacter pylori*]. *Gastroenterol Clin Biol* 13(1 Pt 1): 31B-36B.

Mehlen P., Schulze-Osthoff K. and Arrigo A.P. (1996), Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* 271(28): 16510-4.

Micheau O., Thome M., Schneider P., Holler N., Tschopp J., Nicholson D.W., Briand C. and Grutter M.G. (2002), The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277(47): 45162-71.

Miehlke S., Kirsch C., Agha-Amiri K., Gunther T., Lehn N., Malfertheiner P., Stolte M., Ehninger G. and Bayerdorffer E. (2000), The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 87(3): 322-7.

Mikolajczyk J., Scott F.L., Krajewski S., Sutherlin D.P. and Salvesen G.S. (2004), Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry* 43(32): 10560-9.

Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M. and Thompson C.B. (1997), Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385(6614): 353-7.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Mogk A., Mayer M.P., und Deuerling E. (2001), Mechanismen der Proteinfaltung - Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit* 3(31):182-92

Mongkolsapaya J., Grimes J.M., Chen N., Xu X.N., Stuart D.I., Jones E.Y. and Screaton G.R. (1999), Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol* 6(11): 1048-53.

Mori N., Wada A., Hirayama T., Parks T.P., Stratowa C. and Yamamoto N. (2000), Activation of intercellular adhesion molecule 1 expression by *Helicobacter pylori* is regulated by NF-kappaB in gastric epithelial cancer cells. *Infect Immun* 68(4): 1806-14.

Morimoto R.I. (1998), Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12(24): 3788-96.

Morishima N., Nakanishi K., Tsuchiya K., Shibata T. and Seiwa E. (2004), Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279(48): 50375-81.

Moss S.F., Calam J., Agarwal B., Wang S. and Holt P.R. (1996), Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 38(4): 498-501.

Moss S.F., Legon S., Bishop A.E., Polak J.M. and Calam J. (1992), Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease. *Lancet* 340(8825): 930-2.

## 5. Literaturverzeichnis

---

Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Meriin A.B., Sherman M.Y., Morimoto R.I. and Massie B. (2000), The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20(19): 7146-59.

Motojima F., Chaudhry C., Fenton W.A., Farr G.W. and Horwich A.L. (2004), Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(42): 15005-12.

Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettlesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.L. and Fesik S.W. (1996), X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381(6580): 335-41.

Multhoff G. and Hightower L.E. (1996), Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones* 1(3): 167-76.

Munzenmaier A., Lange C., Glocker E., Covacci A., Moran A., Bereswill S., Baeuerle P.A., Kist M. and Pahl H.L. (1997), A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 159(12): 6140-7.

Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S. and Dixit V.M. (1998), An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273(5): 2926-30.

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A. and Yuan J. (2000), Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765): 98-103.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Neu B., Rad R., Reindl W., Neuhofer M., Gerhard M., Schepp W. and Prinz C. (2005), Expression of tumor necrosis factor- alpha -related apoptosis-inducing ligand and its proapoptotic receptors is down-regulated during gastric infection with virulent cagA+/vacAs1+ Helicobacter pylori strains. *J Infect Dis* 191(4): 571-8.

Odenbreit S., Puls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W. and Haas R. (2000), Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287(5457): 1497-500.

Parsonnet J., Hansen S., Rodriguez L., Gelb A.B., Warnke R.A., Jellum E., Orentreich N., Vogelman J.H. and Friedman G.D. (1994), Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330(18): 1267-71.

Peek R.M., Jr., Blaser M.J., Mays D.J., Forsyth M.H., Cover T.L., Song S.Y., Krishna U. and Pietenpol J.A. (1999), Helicobacter pylori strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 59(24): 6124-31.

Perez-Perez G.I. (1997), Role of Helicobacter pylori infection in the development of pernicious anemia. *Clin Infect Dis* 25(5): 1020-2.

Phadnis S.H., Parlow M.H., Levy M., Ilver D., Caulkins C.M., Connors J.B. and Dunn B.E. (1996), Surface localization of Helicobacter pylori urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun* 64(3): 905-12.

Potthoff A., Ledig S., Martin J., Jandl O., Cornberg M., Obst B., Beil W., Manns M.P. and Wagner S. (2002), Significance of the caspase family in Helicobacter pylori induced gastric epithelial apoptosis. *Helicobacter* 7(6): 367-77.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Prouty W.F. and Goldberg A.L. (1972), Fate of abnormal proteins in E. coli accumulation in intracellular granules before catabolism. *Nat New Biol* 240(100): 147-50.

Prouty W.F., Karnovsky M.J. and Goldberg A.L. (1975), Degradation of abnormal proteins in Escherichia coli. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs. *J Biol Chem* 250(3): 1112-22.

Rambukkana A., Das P.K., Witkamp L., Yong S., Meinardi M.M. and Bos J.D. (1993), Antibodies to mycobacterial 65-kDa heat shock protein and other immunodominant antigens in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 100(1): 87-92.

Ranson, N.A. & Clarke, A.R. (1999). 22. The ATPase cycle of the GroE molecular chaperones. In *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Bukau, B. (ed) pp. 491-522. Harwood Academic Publishers: Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland.

Reed J.C. (1995), Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 7(6): 541-6.

Ricci V., Ciacci C., Zarrilli R., Sommi P., Tumuru M.K., Del Vecchio Blanco C., Bruni C.B., Cover T.L., Blaser M.J. and Romano M. (1996), Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. *Infect Immun* 64(7): 2829-33.

Ritossa F. (1962). A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in Drosophila. *Experientia* 18: 571-573

## 5. Literaturverzeichnis

---

Rodriguez J. and Lazebnik Y. (1999), Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13(24): 3179-84.

Romano M., Ricci V., Memoli A., Tuccillo C., Di Popolo A., Sommi P., Acquaviva A.M., Del Vecchio Blanco C., Bruni C.B. and Zarrilli R. (1998), *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro. *J Biol Chem* 273(44): 28560-3.

Roninson I.B. (2003), Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 63(11): 2705-15.

Rudi J., Kuck D., Strand S., von Herbay A., Mariani S.M., Krammer P.H., Galle P.R. and Stremmel W. (1998), Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J Clin Invest* 102(8): 1506-14.

Sakahira H., Enari M. and Nagata S. (1998), Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662): 96-9.

Saleh A., Srinivasula S.M., Balkir L., Robbins P.D. and Alnemri E.S. (2000), Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2(8): 476-83.

Salomon H. (1896), Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zbl. Bakt.* 19, 433-442

Samali A., Cai J., Zhivotovsky B., Jones D.P. and Orrenius S. (1999), Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* 18(8): 2040-8.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Sapozhnikov A.M., Baev D.V. and Gusarova G.A. (2002), Involvement of heat shock proteins in the phenomenon of cell protection against apoptosis mediated by inhibitors of plasma membrane chlorine channels. Dokl Biol Sci 384: 206-8.

Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P.H. and Peter M.E. (1999), The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. J Biol Chem 274(3): 1541-8.

Schmidt M., Bucheler U., Kaluza B. and Buchner J. (1994), Correlation between the stability of the GroEL-protein ligand complex and the release mechanism. J Biol Chem 269(45): 27964-72.

Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S. and Peter M.E. (1998), Apoptosis signaling by death receptors. Eur J Biochem 254(3): 439-59.

Schütz, S. (2003), Aufreinigung und Charakterisierung des Apoptose auslösenden Faktors aus *Helicobacter pylori*. Naturwiss. Promotionsschrift, Medizinische Hochschule Hannover

Shtilerman M., Lorimer G.H. and Englander S.W. (1999), Chaperonin function: folding by forced unfolding. Science 284(5415): 822-5.

Scott D.R., Marcus E.A., Weeks D.L., Lee A., Melchers K. and Sachs G. (2000), Expression of the *Helicobacter pylori* ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. Infect Immun 68(2): 470-7.

Shan Y.X., Liu T.J., Su H.F., Samsamshariat A., Mestrlil R. and Wang P.H. (2003), Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. J Mol Cell Cardiol 35(9): 1135-43.

## 5. Literaturverzeichnis

---

Shan Y.X., Yang T.L., Mestril R. and Wang P.H. (2003), Hsp10 and Hsp60 suppress ubiquitination of insulin-like growth factor-1 receptor and augment insulin-like growth factor-1 receptor signaling in cardiac muscle: implications on decreased myocardial protection in diabetic cardiomyopathy. *J Biol Chem* 278(46): 45492-8.

Shinnick T.M. (1991), Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 145-60.

Shirin H., Sordillo E.M., Oh S.H., Yamamoto H., Delohery T., Weinstein I.B. and Moss S.F. (1999), *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res* 59(10): 2277-81.

Siegmund B., Lehr H.A., Fantuzzi G. and Dinarello C.A. (2001), IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13249-54.

Sigler P.B., Xu Z., Rye H.S., Burston S.G., Fenton W.A. and Horwich A.L. (1998), Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem* 67: 581-608.

Smith M.F., Jr., Mitchell A., Li G., Ding S., Fitzmaurice A.M., Ryan K., Crowe S. and Goldberg J.B. (2003), Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278(35): 32552-60.

Smoot D.T. (1997), How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology* 113(6 Suppl): S31-4; discussion S50.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Smoot D.T., Mobley H.L., Chippendale G.R., Lewison J.F. and Resau J.H. (1990), Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. Infect Immun 58(6): 1992-4.

Soltys B.J. and Gupta R.S. (1996), Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. Exp Cell Res 222(1): 16-27.

Stennicke H.R. and Salvesen G.S. (2000), Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. Biochim Biophys Acta 1477(1-2): 299-306.

Sreedhar A.S. and Csermely P. (2004), Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. Pharmacol Ther 101(3): 227-57.

Suerbaum S. and Michetti P. (2002), Helicobacter pylori infection. N Engl J Med 347(15): 1175-86.

Suerbaum S., Thiberge J.M., Kansau I., Ferrero R.L. and Labigne A. (1994), Helicobacter pylori hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. Mol Microbiol 14(5): 959-74.

Suzuki A., Tsutomi Y., Akahane K., Araki T. and Miura M. (1998), Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. Oncogene 17(8): 931-9.

Thome M. and Tschopp J. (2001), Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. Nat Rev Immunol 1(1): 50-8.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Thomenius M.J. and Distelhorst C.W. (2003), Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance. *J Cell Sci* 116(Pt 22): 4493-9.

Tissieres A., Mitchell H.K. and Tracy U.M. (1974), Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84(3): 389-98.

Todd M.J., Viitanen P.V. and Lorimer G.H. (1994), Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* 265(5172): 659-66.

Triebling A.T., Korsten M.A., Dlugosz J.W., Paronetto F. and Lieber C.S. (1991), Severity of *Helicobacter*-induced gastric injury correlates with gastric juice ammonia. *Dig Dis Sci* 36(8): 1089-96.

Tseng H.J., Chan C.C. and Chan E.C. (2004), Sphingomyelinase of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity in AGS gastric epithelial cells via activation of JNK kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 314(2): 513-8.

Tsuda M., Karita M., Mizote T., Morshed M.G., Okita K. and Nakazawa T. (1994), Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6 Suppl 1: S49-52.

Tsuda M., Karita M., Morshed M.G., Okita K. and Nakazawa T. (1994), A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun* 62(8): 3586-9.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Unger Z., Molnar B., Pronai L., Szaleczky E., Zagoni T. and Tulassay Z. (2003), Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in correlation with the presence of intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15(4): 389-93.

Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., da Costa C., Miethke T., Kirschning C.J., Hacker H. and Wagner H. (2001), Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276(33): 31332-9.

van Amsterdam K. and van der Ende A. (2004), Nutrients released by gastric epithelial cells enhance *Helicobacter pylori* growth. *Helicobacter* 9(6): 614-21.

Van Doorn L.J., Figueiredo C., Megraud F., Pena S., Midolo P., Queiroz D.M., Carneiro F., Vanderborcht B., Pegado M.D., Sanna R., De Boer W., Schneeberger P.M., Correa P., Ng E.K., Atherton J., Blaser M.J. and Quint W.G. (1999), Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 116(4): 823-30.

Vanet A. and Labigne A. (1998), Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. *Infect Immun* 66(3): 1023-7.

Wagner S., Beil W., Westermann J., Logan R.P., Bock C.T., Trautwein C., Bleck J.S. and Manns M.P. (1997), Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* 113(6): 1836-47.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Wang R., Li J., Lyte K., Yashpal N.K., Fellows F. and Goodyer C.G. (2005), Role for beta1 integrin and its associated alpha3, alpha5, and alpha6 subunits in development of the human fetal pancreas. *Diabetes* 54(7): 2080-9.

Wang T.C., Goldenring J.R., Dangler C., Ito S., Mueller A., Jeon W.K., Koh T.J. and Fox J.G. (1998), Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology* 114(4): 675-89.

Weber C.H. and Vincenz C. (2001), The death domain superfamily: a tale of two interfaces?, *Trends Biochem Sci* 26(8): 475-81.

Willis S., Day C.L., Hinds M.G. and Huang D.C. (2003), The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 116(Pt 20): 4053-6.

Windle H.J. and Kelleher D. (1997), Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 65(8): 3132-7.

Woodlock T.J., Chen X., Young D.A., Bethlendy G., Lichtman M.A. and Segel G.B. (1997), Association of HSP60-like proteins with the L-system amino acid transporter. *Arch Biochem Biophys* 338(1): 50-6.

Wotherspoon A.C. (1998), *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *Br Med Bull* 54(1): 79-85.

Wyllie A.H., Kerr J.F. and Currie A.R. (1980), Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L. and Dunlop D. (1984), Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142(1): 67-77.

Xanthoudakis S., Roy S., Rasper D., Hennessey T., Aubin Y., Cassady R., Tawa P., Ruel R., Rosen A. and Nicholson D.W. (1999), Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *Embo J* 18(8): 2049-56.

Xu Q., Willeit J., Marosi M., Kleindienst R., Oberhollenzer F., Kiechl S., Stulnig T., Luef G. and Wick G. (1993), Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 341(8840): 255-9.

Yamaguchi H., Osaki T., Kurihara N., Taguchi H. and Kamiya S. (1998), The role of heat shock protein 60 (HSP60) of *Helicobacter pylori* in adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cell. *Kansenshogaku Zasshi* 72(5): 487-92.

Yu J., Russell R.M., Salomon R.N., Murphy J.C., Palley L.S. and Fox J.G. (1995), Effect of *Helicobacter mustelae* infection on ferret gastric epithelial cell proliferation. *Carcinogenesis* 16(8): 1927-31.

Zhang X.S., Lue Y.H., Guo S.H., Yuan J.X., Hu Z.Y., Han C.S., Hikim A.P., Swerdloff R.S., Wang C. and Liu Y.X. (2005), Expression of HSP105 and HSP60 during germ cell apoptosis in the heat-treated testes of adult cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Front Biosci* 10: 3110-21.

## **5. Literaturverzeichnis**

---

Zhang Z., Yuan Y., Gao H., Dong M., Wang L. and Gong Y.H. (2001), Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of H. pylori associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 7(6): 779-82.

Zhang Z.W., Patchett S.E. and Farthing M.J. (2002), Role of Helicobacter pylori and p53 in regulation of gastric epithelial cell cycle phase progression. *Dig Dis Sci* 47(5): 987-95.

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. and Wang X. (1997), Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3): 405-13.

**6. Publikationsliste**

Al-Qaoud K.M., Pearlman E., Hartung T., Klukowski J., Fleischer B. and Hoerauf A. (2000), A new mechanism for IL-5-dependent helminth control: neutrophil accumulation and neutrophil-mediated worm encapsulation in murine filariasis are abolished in the absence of IL-5. *Int Immunol* 12(6): 899-908.

# Lebenslauf

Jan Klukowski, Seumestraße 14, 22089 Hamburg

## Persönliche Daten

Geburtsdatum 9. März 1976  
Geburtsort Hamburg  
Staatsangehörigkeit deutsch

## Schule

1982 – 1986 Grundschule Rathsmühlendamm, Hamburg  
1986 – 1992 Gesamtschule Peter – Petersen, Hamburg  
1992 – 1995 Wirtschaftsgymnasium City Nord, Hamburg

## Studium

1995 – 1998 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
Vordiplom Biochemie  
1998 – 2002 Karl-Ruprecht Universität Heidelberg,  
Diplom Biologie  
2001 – 2002 Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg,  
Arbeitsgemeinschaft PD Dr. Hörauf, Diplomarbeit: Rolle  
der T<sub>H</sub>2 Immunantwort bei einer Infektion mit  
*Plasmodium berghei* unter Verwendung von Knockout  
Mäusen

## Praktika, berufliche Tätigkeiten

1997 – 1998 Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg,  
Arbeitsgemeinschaft PD Dr. Hörauf, Laborpraktikum,  
3 Monate  
1998 Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg,  
Arbeitsgemeinschaft PD Dr. Hörauf, wissenschaftliche  
Hilfskraft, 6 Monate  
2003 Eppendorf AG, Hamburg, Abteilung Zelltechnologie,  
Assistent des Produktmanagers, 6 Monate

Seit 2003

Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung  
Gastroenterologie, Arbeitsgruppe Dr. Athmann,  
Promotionsarbeit: Einfluss des aus *Helicobacter pylori*  
isolierten Hsp60 auf die Apoptose und den Zellzyklus  
von humanen AGS-Zellen