

Untersuchungen zur Pathogenität von  
*Helicobacter hepaticus*:  
genomische und funktionelle Aspekte

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

vorgelegt von  
Torsten Sterzenbach  
aus Herbolzheim

Würzburg, 2006

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Außer dem Titel Diplom-Biotechnologe (Univ.) habe ich bisher keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den..... Torsten Sterzenbach .....

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum .....

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kreft .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Das Genus <i>Helicobacter</i></b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 <i>Helicobacter hepaticus</i></b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Nomenklatur, Morphologie und Besiedlung .....	7
1.2.2 Mit <i>H. hepaticus</i> assoziierte Pathologie .....	8
1.2.2.1 Pathologie in der Leber und den Gallenwegen .....	8
1.2.2.2 <i>Helicobacter hepaticus</i> und chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	9
1.2.2.2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	9
1.2.2.2.2 <i>H. hepaticus</i> als Modellorganismus für die Untersuchung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Mausmodell .....	11
1.2.3 Diagnose von <i>Helicobacter hepaticus</i> .....	13
1.2.4 Pathogenitätsfaktoren von <i>H. hepaticus</i> .....	13
1.2.4.1 Cytolethales ausdehnendes Toxin („Cytolethal Distending Toxin CDT“) .....	14
1.2.4.2 Urease .....	15
1.2.4.3 Weitere beschriebene Pathogenitätsfaktoren von <i>H. hepaticus</i> .....	15
1.2.5 TypIV-Sekretionssysteme .....	16
1.2.6 Aufbau von TypIV-Sekretionssystemen .....	17
1.2.7 Enterohepatische <i>Helicobacter</i> -Arten und humane Erkrankungen .....	19
1.2.7.1 Korrelation von enterohepatischen <i>Helicobacter</i> -Arten mit Erkrankungen der Leber und der Galle .....	19
1.2.7.2 Korrelation von enterohepatischen <i>Helicobacter</i> -Arten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) .....	21
<b>1.3 Das angeborene Immunsystem</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4 Toll-ähnliche Rezeptoren</b> .....	<b>21</b>
1.4.1.1 Signalweiterleitung der Toll-ähnlichen Rezeptoren .....	23
1.4.2 Nod-Rezeptoren .....	24
1.4.3 <i>H. pylori</i> und das angeborene Immunsystem .....	25
1.4.4 Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem .....	26
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1 Geräte</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2 Chemikalien</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3 Enzyme, Liganden, Antikörper und Kits</b> .....	<b>31</b>

<b>2.4</b>	<b>Standards .....</b>	<b>32</b>
<b>2.5</b>	<b>Bakterienstämme .....</b>	<b>32</b>
2.5.1	<i>H. hepaticus</i> .....	32
2.5.2	<i>Escherichia coli</i> .....	33
<b>2.6</b>	<b>Medien .....</b>	<b>33</b>
2.6.1	Feste Medien .....	33
2.6.2	Flüssigmedien .....	33
<b>2.7</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Anzucht von <i>H. hepaticus</i> und <i>E. coli</i> .....</b>	<b>38</b>
3.1.1	Anzucht auf festen Medien .....	38
3.1.1.1	<i>H. hepaticus</i> .....	38
3.1.1.2	<i>E. coli</i> .....	38
3.1.2	Anzucht in Flüssigmedien .....	38
3.1.2.1	<i>H. hepaticus</i> .....	38
3.1.2.2	<i>E. coli</i> .....	39
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>39</b>
3.2.1	Koinkubation von Zellen mit <i>H. hepaticus</i> und Einzelliganden .....	39
3.2.2	Immunfluoreszenz .....	40
3.2.3	Hochdurchsatzadhärenzassay .....	41
3.2.4	Bestimmung der Adhärenz durch Ausplattieren .....	42
3.2.5	Cytotoxizitätsassay .....	42
<b>3.3</b>	<b>Isolierung von DNA .....</b>	<b>43</b>
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	43
3.3.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>H. hepaticus</i> .....	43
<b>3.4</b>	<b>RNA-Aufreinigung .....</b>	<b>44</b>
3.4.1	RNA-Aufreinigung aus eukaryontischen Zellen .....	44
3.4.2	RNA-Aufreinigung aus <i>H. hepaticus</i> .....	44
<b>3.5</b>	<b>Polymerasenkettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>44</b>
3.5.1	Standard-PCR .....	44
3.5.2	Sequenzierung von DNA .....	45
3.5.3	Semiquantitative reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) von eukaryontischer RNA .....	46
<b>3.6</b>	<b>Microarray-Hybridisierung mit genomischer DNA .....</b>	<b>46</b>
3.6.1	Markieren der genomischen DNA mit Cy-Farbstoffen .....	47
3.6.2	Hybridisierung auf dem <i>H. hepaticus</i> -Gesamtgenommicroarray .....	48
3.6.3	Scannen und bioinformatische Auswertung der Microarrays .....	48

<b>3.7</b>	<b>Microarray-Analysen von eukaryontischer RNA</b> .....	<b>49</b>
3.7.1	Markieren von cDNA mit Cy-Farbstoffen .....	49
3.7.2	Hybridisierung der markierten cDNA auf einem MWG 10k Mausarray.....	50
3.7.3	Bioinformatische Auswertung der hybridisierten MWG 10k Mausarrays .....	50
<b>3.8</b>	<b>Klonierungen</b> .....	<b>50</b>
3.8.1	Restriktionsverdau von DNA.....	50
3.8.2	Aufreinigung der DNA nach einem Restriktionsverdau .....	51
3.8.3	Dephosphorylierung.....	51
3.8.4	Ligation von DNA.....	51
3.8.5	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	51
3.8.6	Transformation zur Herstellung von Mutanten in <i>H. hepaticus</i> .....	51
<b>3.9</b>	<b>Lipopolysaccharide (LPS)</b> .....	<b>52</b>
3.9.1	Aufreinigung von LPS .....	52
3.9.2	Nachweis von LPS durch ein silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel .....	53
<b>3.10</b>	<b>Proteinanalyse-Techniken</b> .....	<b>53</b>
3.10.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	53
<b>3.11</b>	<b>Proteinkonzentrationsbestimmung</b> .....	<b>55</b>
3.11.1	Proteinkonzentrationsbestimmung durch ELISA .....	55
3.11.2	Gesamtproteinbestimmung durch BCA .....	55
3.11.3	Herstellung von Lysaten .....	55
<b>3.12</b>	<b>Herstellung eines Antiserums gegen <i>H. hepaticus</i></b> .....	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Annotation des Genoms von <i>H. hepaticus</i> ATCC 51449</b> .....	<b>57</b>
4.1.1	Allgemeine Daten zum Genom von <i>H. hepaticus</i> ATCC 51449 .....	57
4.1.2	Ureaseproduktion und Nickelaufnahme.....	59
4.1.3	Motilität und Chemotaxis .....	60
4.1.4	Toxine, Adhäsine und Proteine der äußeren Membran .....	60
4.1.5	Transkriptionelle Regulatoren und phasenvariable Gene.....	61
4.1.6	Restriktions-Modifikationssysteme, natürliche Kompetenz und TypIV-Sekretionssysteme .....	62
4.1.7	Metabolismus von <i>H. hepaticus</i> .....	63
4.1.8	Molekulare Charakterisierung der mutmaßlichen Pathogenitätsinsel HHG11.....	63
<b>4.2</b>	<b>Diversität von <i>H. hepaticus</i></b> .....	<b>65</b>
4.2.1	Sequenzdiversität von <i>H. hepaticus</i> .....	65
4.2.2	Genomische Diversität von <i>H. hepaticus</i> .....	66
4.2.3	Die HHG11-Insel ist eine Pathogenitätsinsel von <i>H. hepaticus</i> .....	70

4.2.3.1	Mäuse mit einer persistenten natürlichen Infektion mit HHGI1-positiven Stämmen weisen eine stärkere Pathologie auf als Mäuse mit HHGI1-negativen Stämmen.	70
4.2.3.2	Insel-positive und negative <i>H. hepaticus</i> -Stämme führen zu einer unterschiedlich starken Hepatitis im Mausmodell.....	71
4.2.4	Konstruktion von Mutanten in der HHGI1-Pathogenitätsinsel .....	73
4.2.4.1	Konstruktion der Mutante I1.....	73
4.2.4.2	Konstruktion der Mutanten in den <i>virB4</i> - und <i>icmF</i> -homologen Genen der HHGI1-Insel .....	74
<b>4.3</b>	<b>Aufbau von Zellkulturmodellen für die <i>H. hepaticus</i>-Infektion .....</b>	<b>76</b>
4.3.1	In dieser Arbeit verwendete Zelllinien .....	76
4.3.2	Charakterisierung von Zelllinien in Bezug auf Liganden für Mustererkennungsrezeptoren.....	77
4.3.3	Expression von Mustererkennungsrezeptoren und Proteinen der Signaltransduktion in murinen Zelllinien .....	81
4.3.4	Interaktion der murinen Zelllinien mit <i>H. hepaticus</i> .....	82
4.3.4.1	Adhärenz von <i>H. hepaticus</i> an murine Zelllinien .....	82
4.3.4.1.1	Bestimmung der Adhärenz durch eine Hochdurchsatzuntersuchung.....	82
4.3.4.1.2	Bestimmung der Adhärenz durch Immunfluoreszenzmikroskopie.....	83
4.3.4.2	Cytotoxischer Einfluss von <i>H. hepaticus</i> auf murine Zelllinien .....	84
4.3.4.3	Intestinale epitheliale Mauszellen reagieren nur leicht auf <i>H. hepaticus</i> , während Hepatozyten und Makrophagen stark auf <i>H. hepaticus</i> reagieren.....	86
4.3.4.3.1	Einfluss von Interferon- $\gamma$ auf die Stimulierbarkeit von J774-Makrophagen.....	87
4.3.4.3.2	Einfluss von Proteinase, Lysozym und Polymyxin B auf die <i>H. hepaticus</i> -abhängige proinflammatorische Antwort .....	88
4.3.4.3.3	Einfluss von Inhibitoren auf die Induktion der proinflammatorischen Antwort in Makrophagen und Hepatozyten.....	90
<b>4.4</b>	<b>Immunsuppression durch <i>H. hepaticus</i> .....</b>	<b>91</b>
4.4.1	<i>H. hepaticus</i> hemmt die durch <i>E. coli</i> -LPS induzierte proinflammatorische Antwort in m-IC <sub>cl2</sub> -Zellen .....	92
4.4.1.1	Inhibition der Induktion von <i>E. coli</i> -LPS durch <i>H. hepaticus</i> -LPS in m-IC <sub>cl2</sub> -Zellen... ..	95
4.4.1.1.1	Aufreinigung von <i>H. hepaticus</i> -LPS.....	95
4.4.1.1.2	LPS ist ein verantwortlicher Faktor für die Hemmung der durch <i>E. coli</i> -LPS induzierten proinflammatorischen Antwort.....	96
4.4.1.2	Hemmung der durch <i>E. coli</i> induzierten proinflammatorischen Antwort durch <i>H. hepaticus</i> in m-IC <sub>cl2</sub> -Zellen.....	97

4.4.1.3	Einfluss von Inhibitoren auf die Induktion der proinflammatorischen Antwort in Darmzellen.....	98
4.4.1.4	Hemmung der Toleranzentwicklung durch <i>H. hepaticus</i> in m-IC <sub>cl2</sub> -Zellen.....	99
4.4.1.5	Analyse des transkriptionellen Profils in m-IC <sub>cl2</sub> -Zellen.....	100
4.4.2	Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch <i>H. hepaticus</i> in anderen Zelllinien.....	102
4.4.2.1	Inhibition proinflammatorischer Reaktionen durch <i>H. hepaticus</i> -LPS in der murinen Hepatozyten-Zelllinie NCTC Klon 1469.....	102
4.4.2.2	Inhibition der proinflammatorischen Antwort durch <i>H. hepaticus</i> -LPS in der murinen Makrophagenzelllinie J774 .....	104
4.4.2.3	Inhibition proinflammatorischer Reaktionen in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2 .....	106
4.4.3	Einfluss von Glycosphingolipiden auf die Inhibition in m-IC <sub>cl2</sub> und Caco2-Zellen.....	107
4.4.4	Einfluss von Mausserum auf die Inhibition in m-IC <sub>cl2</sub> und Caco2-Zellen.....	108
<b>4.5</b>	<b>Analyse der durch <i>H. hepaticus</i> ausgelösten globalen Genregulation in der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 und der Makrophagenzelllinie J774 durch Microarrays .....</b>	<b>110</b>
4.5.1	Ergebnisse der Microarrayexperimente.....	110
4.5.2	Überprüfung der Ergebnisse der Microarray-Analysen durch semiquantitative RT-PCRs .....	119
<b>4.6</b>	<b>Einfluss der HHGI1-Insel auf die proinflammatorische Antwort in Hepatozyten und Makrophagen.....</b>	<b>122</b>
4.6.1	Modulation der Immunantwort in Makrophagen und Hepatozyten durch verschiedene <i>H. hepaticus</i> -Stämme und -Mutanten.....	122
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>127</b>
<b>5.1</b>	<b>Annotation des Genoms von <i>H. hepaticus</i> ATCC 51449 und der Vergleich mit den sequenzierten Genomen von <i>H. pylori</i> und <i>C. jejuni</i> .....</b>	<b>128</b>
<b>5.2</b>	<b>Diversität von <i>H. hepaticus</i>.....</b>	<b>130</b>
<b>5.3</b>	<b>Die Pathogenitätsinsel HHGI1 .....</b>	<b>131</b>
5.3.1	Molekulare Charakterisierung der HHGI1-Insel.....	132
5.3.2	<i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Charakterisierung der HHGI1-Insel .....	134
<b>5.4</b>	<b>Untersuchung der durch <i>H. hepaticus</i> ausgelösten proinflammatorischen Antwort in Zellkulturmodellen .....</b>	<b>135</b>
5.4.1	Allgemeine Wirtsantwort von murinen intestinalen Epithelzellen, Hepatozyten und Makrophagen auf eine Koinkubation mit <i>H. hepaticus</i> .....	136
5.4.2	Untersuchung der durch <i>H. hepaticus</i> ausgelösten globalen Wirtsantwort in murinen Zelllinien und der Vergleich mit anderen Microarraystudien.....	139

<b>5.5</b>	<b><i>H. hepaticus</i> führt zu einer Inhibition der proinflammatorischen Antwort in intestinalen Epithelzellen.....</b>	<b>146</b>
<b>5.6</b>	<b>Mögliche Bedeutung der Immunsuppression durch <i>H. hepaticus</i> für die Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen .....</b>	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>177</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>177</b>
<b>7.2</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>179</b>
<b>7.3</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>180</b>



### Zusammenfassung

*Helicobacter hepaticus* stellt den Prototyp der enterohepatischen *Helicobacter* dar und führt zu einer persistenten Infektion von Mäusen. In immundefizienten Tieren kann er eine chronische Entzündung des Darmtraktes auslösen, welche den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, ähnelt. Deshalb wird *H. hepaticus* bevorzugt als Modellorganismus zur Untersuchung der immunologischen Ursachen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Tiermodell eingesetzt. Ebenfalls kann eine Infektion mit *H. hepaticus* in suszeptiblen Mäusestämmen (z.B. Balb/c, C3H/An) zu Entzündungen der Leber und Gallengänge führen, welche sich bis zu einer Hepatitis und Leberkarzinomen ausweiten können. In den meisten Studien wurde *H. hepaticus* bisher aber hauptsächlich als Auslöser dieser Erkrankungen eingesetzt, während die bakterielle Seite kaum betrachtet wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer Kooperation mit MWG Biotech, GeneData und dem Massachusetts Institute of Technology (MIT) die Gesamtgenomsequenz des *H. hepaticus* Referenzstammes ATCC 51449 bestimmt und annotiert. Das Genom hat eine Größe von 1.799.146 bp und kodiert für 1.875 Proteine. Die globale Ähnlichkeit des Genoms von *H. hepaticus* ist etwa gleich groß zu den sequenzierten Genomen von *H. pylori* und *C. jejuni*. Es fehlen *H. hepaticus* aber die meisten Virulenzfaktoren von *H. pylori* wie Adhäsine (SabA, BabA, AlpA), VacA und die meisten Proteine der *cag*-Pathogenitätsinsel, während Homologe zu Pathogenitätsfaktoren von *C. jejuni* wie CDT und Peb1 vorhanden sind.

Das Genom von *H. hepaticus* enthält neben vielen kleineren genomischen Inseln eine Genominsel mit einer Größe von 71 kb, welche als HHGI1 benannt wurde. Sie kodiert mutmaßlich für ein TypIV-Sekretionssystem und enthält weitere Virulenzfaktoren. In Microarray-basierten Gesamtgenomvergleichen konnte gezeigt werden, dass die Insel in sieben von 13 untersuchten Stämmen großteils oder komplett fehlt. Während Mäuse, aus denen HHGI1-positive Stämme isoliert wurden, pathologische Veränderungen der Leber aufwiesen, wies keine von den Mäusen, aus denen HHGI1-negative Stämme isoliert wurden, Auffälligkeiten in der Leber oder dem Gallentrukt auf. In einem Tiermodell wurde in Kooperation mit dem MIT gezeigt, dass zwei Insel-negative Stämme zu einer geringeren Besiedlung und einer schwächeren Entzündung der Leber als der Insel-positive Referenzstamm ATCC 51449 führen. Durch die Genomvergleiche konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene *H. hepaticus*-Stämme trotz einer niedrigen Sequenzvariabilität eine hohe Variation des Genomgehalts aufweisen und dass neben der HHGI1-Insel weitere kleinere Inseln in einzelnen Stämmen fehlen. Es wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals verschiedene isogene Mutanten von *H. hepaticus* in der HHGI1-Insel hergestellt, die *in vitro* eine verringerte Immunstimulation in Makrophagen zeigten. Der Mechanismus dieser Immunsuppression

konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden, sie werden jedoch derzeit in Mausmodellen weiter auf ihre krankheitsauslösenden Eigenschaften untersucht.

Da bisher keine gut charakterisierten Zellkulturmodelle für die *in vitro*-Untersuchung von *H. hepaticus* vorlagen, wurden solche im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Dazu wurden die intestinale murine epitheliale Zelllinie m-IC<sub>cl2</sub>, welche das primäre Habitat von *H. hepaticus* (Krypten im Dünndarm) imitiert, die murine Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469, welche ein mögliches sekundäres Habitat (Lebercanaliculi) imitiert und die murine Makrophagenzelllinie J774 benutzt. Während J774 und NCTC Klon 1469 durch die meisten Liganden für Mustererkennungsrezeptoren stimuliert werden konnten, reagierten m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen substantiell nur auf den TLR4-Liganden *E. coli*-LPS. Dementsprechend induzierte *H. hepaticus* in J774 und NCTC Klon 1469 eine starke proinflammatorische Antwort, während m-IC<sub>cl2</sub> trotz guter Adhärenz nur schwach von *H. hepaticus* stimuliert wurde. Es wurde gezeigt, dass LPS und Flagelline von *H. hepaticus* nur eine geringe immunstimulatorische Wirkung besitzen, während Lipoproteine und vermutlich auch Peptidoglykan die wichtigsten PAMPs von *H. hepaticus* darstellen. Durch die Analyse der durch *H. hepaticus* ausgelösten globalen Genregulation in J774 und NCTC Klon 1469 wurde nachgewiesen, dass *H. hepaticus* nicht primär über NF- $\kappa$ B, sondern über MAP-Kinasen eine proinflammatorische Antwort auslöst. Außerdem wurde gezeigt, dass *H. hepaticus* untypisch für extrazelluläre Bakterien eher eine Wirtsantwort auslöst, welche der durch intrazelluläre Bakterien ähnelt. In diesen Modellen führten HHGI1-negative Stämme oder Mutanten der HHGI1-Insel zu einer leicht verringerten proinflammatorischen Antwort. Dies spiegelte sich auch in der transkriptionellen Regulation von Schlüsselfaktoren der angeborenen Immunantwort wie TLR2, IL-12, NOD2 oder Tollip wieder.

In m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen führte eine Koinkubation mit lebenden *H. hepaticus* oder Lysaten zu einer verringerten durch *E. coli*-LPS ausgelösten Induktion von MIP-2. Darauf basierend wurde gezeigt, dass LPS von *H. hepaticus* einen wesentlichen Faktor für diese Inhibierung der proinflammatorischen Antwort darstellt, nicht jedoch die HHGI-1-Insel oder andere vermutete Virulenzfaktoren. Zumindest auf mRNA-Ebene wurde durch *H. hepaticus* auch die Induktion anderer Cytokine wie TNF- $\alpha$  oder MIP-1 $\alpha$  gehemmt. Eine primäre Koinkubation von m-IC<sub>cl2</sub> mit *E. coli*-LPS führte zu einer Toleranzinduktion gegenüber einer zweiten Stimulation. Diese Toleranzinduktion wurde durch eine Inkubation mit *H. hepaticus* ebenfalls gehemmt. Die Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus*-LPS konnte auch in NCTC Klon 1469 und unter serumfreien Bedingungen für die durch *S. typhimurium*-Flagellin induzierte IL-8 Sekretion in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2 nachgewiesen werden. Damit war diese Hemmung weder zellspezifisch noch spezifisch für die TLR4-abhängige Stimulation. Basierend auf dieser Arbeit wurde ein Modell für die Entstehung einer chronischen Entzündung im Intestinaltrakt entwickelt, welches

Erklärungsansätze für die Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung im Menschen liefern könnte.

### Summary

*H. hepaticus* is the prototype species of the enterohepatic group of *Helicobacter* species and leads to a persistent infection in mice. It is able to cause a chronic inflammation of the intestinal tract in immuno-deficient mice that resembles the common human inflammatory bowel diseases Crohn's disease und ulcerative colitis. Therefore *H. hepaticus* is widely used as a model organism to study the possible immunological causes underlying the development of inflammatory bowel disease in the animal model. *H. hepaticus* can also lead to diseases in the liver and biliary tract of susceptible mouse strains (e.g. Balb/c, C3H/An) such as hepatitis and even liver cancer. But in most studies *H. hepaticus* was mainly used to trigger these diseases, while only little attention was paid to the bacterial determinants of pathogenesis.

In this work the complete genome sequence of the *H. hepaticus* reference strain ATCC 51449 was determined and annotated in cooperation with GeneData, MWG Biotech and the Massachusetts Institute of Technology (MIT). The genome has a size of 1,799,146 bp and codes for 1,875 proteins. Generally the average similarity of the genome is about equal to the sequenced genomes of *H. pylori* and *C. jejuni*. But *H. hepaticus* misses most of the virulence factors of *H. pylori* such as adhesins (e.g. SabA, BabA, or AlpA), the vacuolating cytotoxin VacA and most genes of the *cag* pathogenicity island. On the other hand it possesses many orthologs of *C. jejuni* virulence factors like the cytolethal distending toxin CDT or the adhesion factor Peb1.

In addition to several smaller genomic islands, the genome of *H. hepaticus* contains a large 71 kb genomic island, which we called HHGI1. It presumably codes for a type IV secretion system and several additional virulence factors. By a microarray-based genome comparison study, we could show that this island was missing in seven out of 13 isolates. While only mice that harbored an island positive strain showed signs of liver disease, not a single mouse with an island negative strain showed any pathological changes of the liver or the biliary tract. In cooperation with the MIT, it was shown in an animal model that two island negative strains led to a reduced colonization and weaker inflammation of the liver compared to the island positive reference strain ATCC 51449. By the genome comparisons, it was also shown that despite low sequence variability the genome contents of different *H. hepaticus* isolates can differ widely and that smaller islands are either present or absent in different strains. In the framework of these investigations, several isogenic *H. hepaticus* mutants in the HHGI1 island were constructed. These mutants showed in comparison to the wild type a deficiency to activate macrophages, but the exact mechanism could not be identified so far.

The isogenic mutants are currently further tested in animal models for their disease-eliciting potential.

Because no well-characterized cell culture model was yet available for the *in vitro* examination of *H. hepaticus*-associated pathogenesis, such models were established in this dissertation. Therefore the murine intestinal epithelial cell line m-IC<sub>cl2</sub> which resembles the primary habitat of *H. hepaticus* in the mouse caecum, the murine hepatocyte cell line NCTC clone 1469 which imitates one possible secondary habitat (mouse liver canaliculi) and the murine macrophage cell line J774 were used. While a wide range of ligands for pattern recognition receptors were able to stimulate NCTC clone 1469 and J774, m-IC<sub>cl2</sub> cells only reacted substantially to the TLR4 ligand *E. coli* LPS. Accordingly, infection with *H. hepaticus* led to a strong proinflammatory response in J774 und NCTC clone 1469, while m-IC<sub>cl2</sub> cells were only weakly stimulated by *H. hepaticus* despite good adherence. It was shown that *H. hepaticus* LPS and flagellins are only weak stimulators of the innate immune system while, as the results suggested, the proinflammatory response was mainly induced by lipoproteins and probably also by peptidoglycans of *H. hepaticus*. By analyzing the global gene regulation in J774 and NCTC clone 1469 after coincubation with *H. hepaticus*, it was established that the proinflammatory response is not mainly dependent on NF- $\kappa$ B but on MAP kinases. Also, the global response of the cells resembled more those induced by intracellular than extracellular pathogens. In these model systems, HHGI1-negative strains or mutants in the HHGI1 island led to a weaker proinflammatory response than HHGI1-containing strains. This was also in concordance with a different regulation pattern of different factors like TLR2, IL-12, NOD2 or Tollip.

In m-IC<sub>cl2</sub> cells, after coincubation with live *H. hepaticus* or lysates, a reduced secretion of MIP-2 after stimulation with *E. coli* LPS was observed. It was shown that *H. hepaticus* LPS is one important factor for this inhibition of LPS-induced MIP-2 secretion, but not the HHGI-1 island nor other presumed *H. hepaticus* virulence factors. On the mRNA level, the induction of other cytokines like TNF- $\alpha$  or MIP-1 $\alpha$  was also reduced by *H. hepaticus*. We could show, that, as described in other cells before, a primary coincubation with *E. coli* LPS leads to a tolerance against a second stimulation round. This tolerance development was inhibited by *H. hepaticus*. Inhibition of the proinflammatory response by *H. hepaticus* LPS was also obtained with NCTC clone 1469 cells. When using the human intestinal epithelial carcinoma cell line Caco2, *S. typhimurium* flagellin triggered IL-8 secretion was almost completely reduced under serum-free conditions, while no inhibition was found under serum-containing conditions. Therefore, this inhibitory effect was neither cell-specific nor specific for induction via TLR4. Based on this work, a model for the development of a chronic inflammation of the intestinal tract could be established, which may offer possible explanations for the development of inflammatory bowel diseases in humans.

## 1 Einleitung

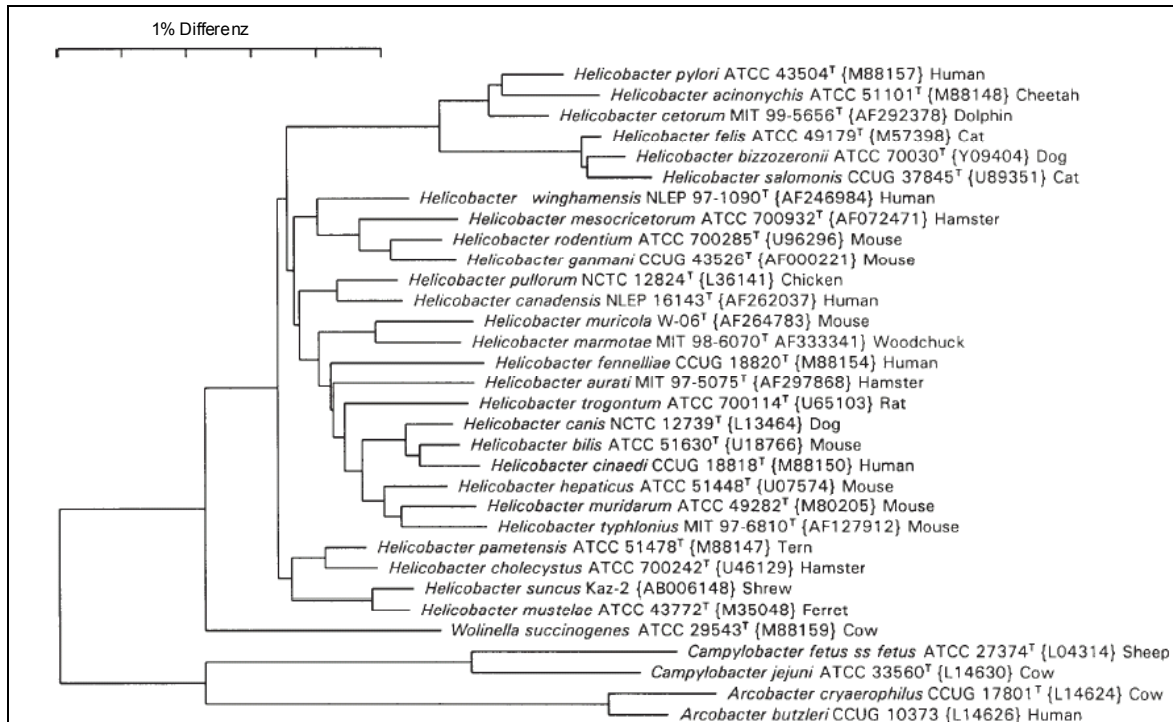
### 1.1 Das Genus *Helicobacter*

Obwohl der Magen aufgrund seines pH-Wertes von 1-2 als sehr lebensfeindlich gilt, wurden schon 1906 Bakterien im menschlichen Magen entdeckt und mit Magengeschwüren in Verbindung gebracht. Dies geriet jedoch in Vergessenheit und wurde erst 1982 wiederentdeckt, als Marshall und Warren in histologischen Schnitten der antralen Mukosa des Magens spiralförmig gewundene Bakterien fanden (Warren und Marshall, 1983, Marshall und Warren, 1984). Diese neue bakterielle Spezies wurde zunächst aufgrund morphologischer Kriterien dem Genus *Campylobacter* zugeordnet und deshalb zuerst *Campylobacter pyloridis* und dann *Campylobacter pylori* genannt. Später zeigte sich aufgrund der Homologie der 16S-rDNA und zahlreicher anderer phänotypischer Kriterien, dass diese Spezies einem neuen Genus zugeordnet werden musste. Damit stellte dieses Bakterium den ersten Vertreter des neuen Genus *Helicobacter* dar und wurde umbenannt in *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989). Schon bald wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *H. pylori* zu einer chronischen Gastritis führt, welche in etwa 10-20% der Fälle zu einem schweren Krankheitsbild führt. Dabei können sich MALT-Lymphome und Karzinome des Magens und Zwölffingerdarms entwickeln (Parsonnet *et al.*, 1991). Die Infektionsrate mit *H. pylori* beträgt in Entwicklungsländern bis zu 95%, während sie in Industrienationen durch verbesserte hygienische Bedingungen und Eradikation auf etwa 20% gesunken ist (Suerbaum und Michetti, 2002).

1992 wurde eine ungewöhnlich hohe Rate an Lebertumoren in Kontrolltieren von Mauskolonien am US National Cancer Institute festgestellt (Ward *et al.*, 1994a). Nach intensiver Suche nach dem auslösenden Agens wurde ein neuartiges Bakterium, *Helicobacter hepaticus*, isoliert und für die Erkrankung der Versuchstiere verantwortlich gemacht (Fox *et al.*, 1994). Damit wurde innerhalb der Gattung *Helicobacter* neben den gastrischen *Helicobacter*-Arten eine zweite Gruppe, die enterohepatischen *Helicobacter*, identifiziert. In der Folge wurden immer mehr *Helicobacter*-Arten aus Mensch und Tier isoliert. Bis heute sind mindestens 26 benannte gastrische oder enterohepatische *Helicobacter*-Arten bekannt (Abb. 1 und Tab. 1, Whary und Fox, 2004).

**Tab. 1. Übersicht über benannte *Helicobacter*-Arten (verändert aus Whary & Fox, 2004).** Es sind jeweils die Wirte angegeben, welche nachweislich natürlich infiziert werden können. Außerdem ist jeweils das primär besiedelte Organ und falls vorhanden das sekundär besiedelte Organ angegeben.

<b>Taxon</b>	<b>Bekannt(e)r Wirt(e)</b>	<b>Primäre Besiedlung</b>	<b>Sekundäre Besiedlung</b>
<i>H. acinonychis</i>	Gepard, Tiger	Magen	
<i>H. aurati</i>	Hamster	Magen, Intestinaltrakt	
<i>H. bilis</i>	Maus, Hund, Katze, Gerbil, Mensch	Intestinaltrakt	Leber, Gallenblase
<i>H. bizzozeronii</i>	Mensch, Katze, Hund, Gepard, Primaten, Ratten	Magen	
<i>H. bovis</i>	Rind	Magen	
<i>H. canadensis</i>	Mensch, Wildgänse	Intestinaltrakt	
<i>H. canis</i>	Mensch, Katze, Hund	Intestinaltrakt	Leber
<i>H. cetorum</i>	Delphin, Wal	Magen	
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	Gallenblase	
<i>H. cinaedi</i>	Mensch, Hamster, Makak, Hund	Intestinaltrakt	Leber, Blut, Gehirn, Gelenke
<i>H. felis</i>	Katze, Hund, Mensch	Magen	
<i>H. fennelliae</i>	Mensch	Intestinaltrakt	
<i>H. ganmani</i>	Maus	Intestinaltrakt	
<i>H. hepaticus</i>	Maus	Intestinaltrakt	Leber, Gallengang
<i>H. marmotae</i>	Murmeltier, Katze	Intestinaltrakt	Leber
<i>H. mesocricetorum</i>	Hamster	Intestinaltrakt	
<i>H. muricola</i>	Koreanische Wildmäuse	Intestinaltrakt	
<i>H. muridarum</i>	Maus, Ratte	Intestinaltrakt	Magen
<i>H. mustelae</i>	Frettchen, Nerz	Magen	
<i>H. pametensis</i>	Wildvögel, Schwein	Intestinaltrakt	
<i>H. pullorum</i>	Mensch, Huhn	Intestinaltrakt	Leber
<i>H. pylori</i>	Mensch, Primaten	Magen	
<i>H. rappini</i>	Mensch, Katze, Hund, Maus, Schaf, Schwein	Intestinaltrakt	Leber, Blut
<i>H. rodentium</i>	Maus, Ratte	Intestinaltrakt	
<i>H. salomonis</i>	Hund	Magen	
<i>H. suis</i>	Schwein	Magen	
<i>H. suncus</i>	Mochusspitzmaus	Magen	
<i>H. trogontum</i>	Ratte	Intestinaltrakt	
<i>H. typhlonius</i>	Maus, Ratte	Intestinaltrakt	
<i>H. winghamensis</i>	Mensch	Intestinaltrakt	



**Abb. 1. Benannte *Helicobacter*-Arten und ihre Verwandtschaft untereinander (aus Whary & Fox, 2004).**

Im Folgenden soll näher auf das in dieser Arbeit untersuchte Bakterium *Helicobacter hepaticus* eingegangen werden.

## 1.2 *Helicobacter hepaticus*

### 1.2.1 Nomenklatur, Morphologie und Besiedlung

*H. hepaticus* ist ein Gram-negatives Bakterium aus der Familie der  $\epsilon$ -Proteobakterien und gehört zu den enterohepatischen *Helicobacter*-Arten. *H. hepaticus* ist ein spiralförmiges Bakterium mit einer Länge von 1,5 bis 5  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0,2 bis 0,3  $\mu\text{m}$ . Es bildet an jedem Pol je ein einzelnes Flagellum aus, welches von einer Membranhülle ummantelt ist, und es besitzt keine periplasmatischen Fasern (Abb. 2).



**Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. hepaticus* (aus Solnick & Schauer, 2001).** (A und B) *H. hepaticus* ist spiralförmig gewunden, besitzt zwei bipolare Flagellen und keine periplasmatischen Fasern. (C) Eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Leberschnittes zeigt *H. hepaticus* in den Gallengängen.

Die Anzucht von *H. hepaticus* erfolgt auf Blutagarplatten, welche mit 10% Blut von Säugetieren supplementiert werden, wobei meist Blut von Pferden oder Schafen verwendet

wird. Zur Unterdrückung des Wachstums von anderen Bakterien oder Pilzen werden meist die Antibiotika Trimethoprim, Vancomycin, Polymyxin B und Amphotericin B zugegeben. Die Anzucht erfolgt unter mikroaerophilen Bedingungen.

*H. hepaticus* besiedelt primär das Kryptenepithelium des Caecums und Kolons von Mäusen. Sekundär kann *H. hepaticus* dann auch die Gallengänge und die Leber besiedeln.

## **1.2.2 Mit *H. hepaticus* assoziierte Pathologie**

### **1.2.2.1 Pathologie in der Leber und den Gallenwegen**

*H. hepaticus* wurde erstmals beschrieben, als am US National Cancer Institute eine ungewöhnlich hohe Zahl an Lebertumoren bei Kontrolltieren in Mauskolonien festgestellt wurde (Fox *et al.*, 1994, Ward *et al.*, 1994a). Bei bestimmten Stämmen (A/JCr, C3H/An, SJL/NCr, Balb/c, An/NCr, SCID/NCr) konnten mit einer hohen Prävalenz Leberläsionen festgestellt werden. Die Erkrankung konnte durch eine Lebersuspension einer erkrankten vier Wochen alten A/JCr-Maus auf gesunde Tiere übertragen werden. Durch eine Silberfärbung wurden spiralförmige Bakterien in den Gallengängen und zwischen den Krypten des Caecums und Kolons identifiziert. Diese Bakterien konnten *in vitro* unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert werden. Nach Inokulation dieser *in vitro* angezüchteten Bakterien in gesunde A/JCr-Mäuse entwickelten diese ebenfalls Leberläsionen. Dies erfüllte die Koch'schen Postulate und *H. hepaticus* konnte damit als auslösendes Agens für diese Erkrankungen bestätigt werden. Wie später festgestellt wurde, sind auch viele Zuchtanlagen kommerzieller Vertreiber von Mäusen mit *H. hepaticus* kontaminiert (Shames *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung einer Hepatitis und Hyperplasie alters-, stamm und geschlechtsabhängig ist (Ward *et al.*, 1994b). In männlichen A/JCr-Mäusen treten die ersten Anzeichen einer Nekrose der Leber in der Regel nach etwa vier Wochen auf und nach vier bis acht Monaten entwickeln sie eine Hyperplasie der Gallengänge. Dabei wandern immer mehr inflammatorische Zellen wie Lymphozyten und Plasmazellen in die Leber ein. Nach acht Monaten verstärkt sich die Hyperplasie der Gallengänge einhergehend mit einer postnekrotischen Zirrhose und Cholangitis. Nach über einem Jahr entwickeln sich präneoplastische hepatozelluläre Foci und Lebertumore. In männlichen A/JCr-Mäusen bildet sich in etwa 80% der Tiere nach sechs bis zehn Monaten eine Hepatitis aus, während weibliche Tiere nur zu etwa 15% erkranken. Der Schweregrad der sich entwickelnden Hepatitis ist in männlichen Tieren ebenfalls viel größer (Fox *et al.*, 1996a). In männlichen als auch weiblichen C57BL/6NCr-Mäusen bildete sich in keinem einzigen Fall eine Hepatitis aus. Bakterien werden in erkrankten Tieren in der Leber hauptsächlich in den Gallengängen zwischen Hepatozyten nahe Nekrose und Entzündungsherden gefunden. Sowohl an die Entzündungsherde selber als auch an Hepatozyten kolonisieren keine lebenden Bakterien.



Es konnte gezeigt werden, dass C57L/J-Mäuse, welche mit enterohepatischen *Helicobacter*-Arten, besonders *H. hepaticus* und *H. bilis* infiziert sind und eine lithogene Diät erhalten, eine deutlich erhöhte Rate an Gallensteinen entwickeln (Maurer *et al.*, 2005). Demgegenüber führt eine Besiedlung mit *H. pylori* zu keiner erhöhten Rate an Gallensteinen, was vermuten lässt, dass diese Eigenschaft spezifisch für enterohepatische *Helicobacter* ist (Maurer *et al.*, 2006).

### **1.2.2.2 *Helicobacter hepaticus* und chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

#### **1.2.2.2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Die beiden Krankheiten Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU), zusammengefasst unter dem Namen chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), stellen eine der häufigsten chronischen Krankheiten des Menschen dar. Beide Krankheiten treten in Industrieländern bei etwa 10-200 Fällen pro 100.000 Einwohner auf (Bouma und Strober, 2003) und führen zu einer chronischen Entzündung des Darms. Während sich bei Morbus Crohn die Entzündung meist auf den gesamten Darm mit dazwischenliegenden gesunden Abschnitten erstreckt, beschränkt sich bei Colitis Ulcerosa die Entzündung auf das Rectum und das Kolon. Im Gegensatz zu Morbus Crohn ist bei Colitis Ulcerosa nicht die gesamte Darmwand, sondern nur die Mukosa und Submukosa betroffen. Bei beiden Erkrankungen geht mit der Entzündung eine massive Infiltration der betroffenen Gebiete mit Makrophagen und Granulozyten einher. Sie führen zu Durchfall, starken Schmerzen und Fisteln, Abszessen und einer Verengung des Darms, was besonders bei Colitis Ulcerosa bis hin zu einem toxischen Megakolon führen kann. Außerdem besteht eine erhöhte Gefahr der Entwicklung von Darmkrebs (Podolsky, 2002). Beide Erkrankungen sind gekennzeichnet durch eine zu starke Immunantwort, welche bei Morbus Crohn eher eine  $T_H1$ -Antwort und bei Colitis Ulcerosa eher eine  $T_H2$ -Antwort darstellt (Bouma und Strober, 2003). Ein weiterer Unterschied zwischen CU und MC ist ein starker Anstieg an IgG1-Antikörpern bei CU und ein starker Anstieg an IgG2-Antikörpern bei MC (Kett *et al.*, 1987). Lange Zeit galten chronisch entzündliche Darmerkrankungen als Autoimmunerkrankungen, ausgelöst durch Antikörper, welche Epitope von Zellen des Darms erkennen. Es wurden zwar in MC- und CU-Patienten autoreaktive Antikörper gefunden, diese sind aber wenig spezifisch und treten auch bei anderen Erkrankungen auf. Ein bedeutender erster Marker für eine beginnende CED ist eine erhöhte Infiltration der intestinalen Mukosa sowohl durch T- und B-Lymphozyten als auch durch Monozyten und Makrophagen. Diese zeigen einen aktivierten Phänotyp, gekennzeichnet durch eine erhöhte Menge der Marker 4F2, CD71 und eine erhöhte IL-2-Sekretion und Expression des IL-2-Rezeptors (Matsuura *et al.*, 1993). Außerdem werden Lymphozyten besonders von MC-Patienten durch Antigene von intestinalen und anderen Bakterien zu einer erhöhten Proliferation angeregt (Fiocchi *et al.*, 1981). Es zeigt sich ebenfalls eine

Veränderung der epithelialen Zellen des Darmtraktes bei einer aktiven MC oder CU. Diese sezernieren eine erhöhte Menge an proinflammatorischen Cytokinen, koloniestimulierenden Faktoren und TNF- $\alpha$  und exprimieren verstärkt Aktivierungsmarker (z.B. 4F2-Antigen, Transferrinrezeptor oder den akuten lymphoblastischen Leukämiereseptor, Jung *et al.*, 1995). Außerdem zeigen sie eine verringerte Fähigkeit, die Bildung von regulatorischen T-Zellen anzuregen (Mayer und Eisenhardt, 1990).

Während bei einer akuten MC eine erhöhte Menge an Interferon- $\gamma$  und IL-12 und eine erhöhte Reaktivität von T-Zellen auf IL-2 gefunden wird, führt eine aktive CU zu erhöhten Konzentrationen an IL-4. Beide Erkrankungen gehen mit erhöhten IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6-Konzentrationen einher (Reimund *et al.*, 1996). Sowohl bei CU als auch MC treten Schübe mit dazwischenliegenden Phasen mit einer geringen Symptomatik auf. Während Schüben werden erhöhte Mengen an TGF- $\beta$  vorgefunden, während in Ruhephasen die Menge an TGF- $\beta$  auf den Wert von gesunden Menschen zurückfällt und deutlich weniger TGF- $\alpha$  als in Kontrollpersonen vorgefunden wird (Babyatsky *et al.*, 1996). Weitere wichtige Marker für eine CED sind erhöhte Expressionsraten von *cox2* und *icam1* (Koizumi *et al.*, 1992).

Es sind mehrere genetische Faktoren bekannt, welche zu einer erhöhten Anfälligkeit für chronisch entzündliche Darmerkrankungen führen. Am häufigsten treten dabei Mutationen in NOD2 auf, welche zu einem bis zu 40-fach erhöhten Risiko der Entwicklung von Morbus Crohn führen (Kobayashi *et al.*, 2005, Ogura *et al.*, 2001a). Aber auch Mutationen der Toll-ähnlichen Rezeptoren TLR4 und TLR5 scheinen zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine CED zu führen. Die Bedeutung von TLR4 für CU- oder MC-Erkrankungen ist noch nicht gänzlich geklärt, aber Tierexperimente lassen darauf schließen, dass TLR4 eine zentrale Bedeutung für die Pathogenese von CED innewohnt (Fukata *et al.*, 2005). Auch beim Menschen wurden einige Allele mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer CED assoziiert (Franchimont *et al.*, 2004, Gazouli *et al.*, 2005, Oostenbrug *et al.*, 2005, Torok *et al.*, 2004), wobei andere Studien dem aber widersprechen (Arnott *et al.*, 2004, Lakatos *et al.*, 2005). Eine besonders wichtige Funktion in der CED-Entstehung scheint aber TLR5, welches Flagelline erkennt, zu haben. MC-Patienten weisen einen signifikant erhöhten Antikörpertiter gegen das Flagellenepitop cBir1 auf (Targan *et al.*, 2005). cBir1 ist ein Flagellin mit höchster Homologie zu Flagellen der Genera *Butyrivibrio*, *Rosburia*, *Thermotoga* und *Clostridium*. Es wurde festgestellt, dass auch in einem Mausmodell einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung eine erhöhte Serologie gegen dieses Flagellin nachgewiesen werden kann (Lodes *et al.*, 2004). Der Transfer von cBir1-spezifischen T-Zellen in gesunde Mäuse löst in diesen ebenfalls eine chronische Kolitis aus. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass MC-Patienten eine erhöhte Anzahl an IgG- und IgA-Antikörpern gegen Epitope von Flagellinen enterischer Bakterien besitzen (Gewirtz *et al.*, 2006). Die Expression eines

dominant-negativen TLR5-Allels schützte in einem Mausmodell gegen MC und führte zu einer signifikant verringerten Konzentration an Flagellin-spezifischen IgG- und IgA-Antikörpern (Sitaraman *et al.*, 2005). Daher spielen TLR5 und Flagelline eine bedeutende Rolle in der Entstehung von MC. Inwieweit TLR5 und Flagelline auch wichtig für die Entstehung von CU sind, muss noch weiter geklärt werden. Weitere wichtige Marker für eine erhöhte Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen scheinen Varianten im Gen für das Cytokin CCL20 (eher für CU, Lee *et al.*, 2005) und die Loci IBD2 (auf Chromosom 12, Uthoff *et al.*, 2002) und IBD4 (auf Chromosom 14, Vermeire *et al.*, 2004) zu sein.

Obwohl die genaue Rolle der intestinalen Mikroflora bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen noch nicht vollends bekannt ist, scheint eine fehlende Toleranzentwicklung gegenüber der intestinalen Mikroflora der entscheidende Auslöser für die Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu sein. Manche Bakterien-spezies fördern dabei eher die Entstehung einer CED, während andere eine chronische Entzündung des Darms eher hemmen. In Morbus Crohn-Patienten werden häufig erhöhte Mengen an *Enterobakterien* und *Bacteroides vulgatus* gefunden. Auf der anderen Seite findet man häufig verringerte Mengen an *Lactobacillen* und *Bifidobakterien* (Marteau *et al.*, 2004). Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine Koinfektion von *H. hepaticus* mit *Lactobacillen* zu einer geringeren Entzündung gegenüber einer alleinigen Infektion mit *H. hepaticus* führt (Pena *et al.*, 2005).

#### **1.2.2.2.2 *H. hepaticus* als Modellorganismus für die Untersuchung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Mausmodell**

*H. hepaticus* wurde zuerst in Verbindung mit Erkrankungen der Leber entdeckt. Es wurde aber schon bald darauf festgestellt, dass *H. hepaticus* primär das Kolon und das Caecum besiedelt und die Leber und Gallengänge nur das sekundäre Habitat darstellen (Ward *et al.*, 1994b, Ward *et al.*, 1994a). Während *H. hepaticus* aus dem Caecum und Kolon von fast allen infizierten A/JCr-Mausmännchen und mit Einschränkungen auch aus Weibchen isoliert werden kann, können nur aus 20-60% der Männchen Kulturen von *H. hepaticus* aus der Leber gewonnen werden. Proben aus der Leber von Weibchen sind sogar erst nach 9-12 Monaten positiv für *H. hepaticus* (Fox *et al.*, 1996a).

In *H. hepaticus*-infizierten Wildtypmäusen bilden sich im Intestinaltrakt nur geringfügige Entzündungen aus. In A/JCr-Mäusen entsteht ein Jahr nach der Infektion eine leichte Typhlitis, welche jedoch nicht signifikant stärker als in uninfizierten Kontrolltieren ist (Whary *et al.*, 1998). In *H. hepaticus*-infizierten, ansonsten keimfreien Swiss Webster-Mäusen wird nach 8-24 Monaten eine leichte Colitis einhergehend mit lymphoiden Aggregaten und Follikeln in der Mukosa vorgefunden (Fox *et al.*, 1996b). In den meisten Tieren tritt eine epitheliale Zellhyperplasie im Caecum und der Mukosa des Kolons auf.

Ebenfalls kann eine erhöhte Anzahl von Peyerschen Platten im Kolon beobachtet werden. Insgesamt gesehen sind die Symptome von *H. hepaticus*-infizierten Wildtypmäusen im Intestinaltrakt jedoch nur gering.

Immundefiziente Mäuse entwickeln dagegen eine Entzündung, welche den beim Menschen vorkommenden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa ähnelt. In SCID/NCr-Mäusen bildet sich eine mittelschwere Typhlitis und leichte Colitis aus (Li *et al.*, 1998, Russell *et al.*, 1995). Es kann eine verdickte Mukosa und eine Einwanderung von Makrophagen und Neutrophilen festgestellt werden. Es bildet sich ebenfalls besonders bei älteren Tieren eine mittelschwere bis schwere Hyperplasie im Caecum und eine leichte Hyperplasie im Kolon aus. In manchen Tieren entwickelt sich auch ein rektaler Prolaps (Ward *et al.*, 1996). Eine vergleichbare Entzündung des Darms tritt auch bei *H. hepaticus*-infizierten IL-10 defizienten C57BL/6-Mäusen auf, welche sich in einer mittelschweren Entzündung des Caecums und einer leichten Entzündung des Kolons äußert (Kullberg *et al.*, 1998). Dies geht einher mit einer Einwanderung von Lymphozyten, Neutrophilen und Makrophagen in die Lamina Propria. Die Entzündung basiert vermutlich auf einer T<sub>H</sub>1-Antwort, da sie mit einer verstärkten Sekretion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Stickstoffmonoxyd (NO) einhergeht. Die Stärke der Entzündung kann durch neutralisierende Antikörper gegen IFN- $\gamma$  oder IL-12 verringert werden, da dadurch die Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen unterdrückt wird. Ebenso entwickelt sich in IL-10-/- Il-12-Doppelmutanten ähnlich wie in Wildtyptieren keine Entzündung (Kullberg *et al.*, 2001). Eine Behandlung von *H. hepaticus*-infizierten Il-10 KO-Mäusen mit einem anti-IL-12 Antikörper führt zu einer verringerten Anzahl an T<sub>H</sub>1-Zellen, welche durch eine hohe IFN- $\gamma$ -Produktion gekennzeichnet sind. Ebenso nimmt die Expression der proinflammatorischen Cytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und iNOS ab. Die Symptomatik der chronisch entzündlichen Darmerkrankung kann durch Rekonstitution von SCID/NCr-Mäusen mit CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Inokulation mit *H. hepaticus* verstärkt werden (Cahill *et al.*, 1997). Die Schwere der Entzündung des Kolons ist signifikant stärker, wenn die Tiere sowohl mit *H. hepaticus* infiziert als auch mit CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen rekonstituiert werden verglichen mit dem Vorhandensein von nur einem der beiden Faktoren. Jeder der beiden Einzelfaktoren führt jedoch auch schon zu einer Entzündung, während unbehandelte und uninfizierte Mäuse keine Symptome zeigen. RAG KO-Mäuse, welche keine T-Zellen mehr ausbilden, entwickeln nach Infektion mit *H. hepaticus* nur eine geringfügige Colitis. Falls sie jedoch mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von *H. hepaticus*-infizierten IL-10 KO-Mäusen rekonstituiert werden, entwickelt sich eine starke Entzündung des Darms (Kullberg *et al.*, 2002). Diese Entzündung kann durch gleichzeitige Zugabe von CD45 RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von infizierten Wildtypmäusen unterdrückt werden. Dieser Effekt tritt nicht ein, wenn CD45 RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen transferiert werden. Der gleiche schützende Effekt durch CD45 RB<sup>low</sup>-Zellen tritt auch bei infizierten IL-10 KO-Mäusen auf. Da dieser Effekt nur durch CD45

RB<sup>low</sup>-Zellen von infizierten WT-Mäusen, jedoch nicht von uninfizierten WT-Mäusen auftritt, spricht vieles dafür, dass diese Subpopulation von CD45 RB<sup>low</sup> T-Zellen regulatorische Zellen darstellen, welche eine Entzündung als Reaktion auf ein Pathogen hemmen. Eine Koinfektion von *H. hepaticus* mit probiotischen *Lactobacillen* führt in IL-10 KO-Mäusen zu einer verringerten Entzündung des Kolons und einer verringerten Sekretion der proinflammatorischen Cytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Pena *et al.*, 2005). Dies stimmt mit Studien überein, die zeigten, dass Patienten mit einer aktiven Colitis Ulcerosa einen verringerten Anteil an *Lactobacillen* in ihrer bakteriellen Darmflora enthalten (Fabia *et al.*, 1993), wobei dies jedoch nicht in allen Studien bestätigt wurde (Seksik *et al.*, 2003). Die Verabreichung von *Lactobazillen* führte in einer Studie bei Kindern mit Morbus Crohn zu einer signifikanten Verbesserung der Symptomatik (Gupta *et al.*, 2000).

### 1.2.3 Diagnose von *Helicobacter hepaticus*

*Helicobacter hepaticus* kann durch eine Kultur aus der Leber oder dem Intestinaltrakt angezchtet werden. Durch Passage mittels Filtration mit einem Porendurchmesser von 0,45  $\mu\text{m}$  kann *H. hepaticus* angereichert und auf Selektivplatten mit den Antibiotika Trimethoprim, Vancomycin und Polymyxin B weiter selektioniert werden (Fox *et al.*, 1994, Fox *et al.*, 1996a). Da die Isolation von *H. hepaticus* zeitaufwändig ist und zu falsch negativen Resultaten führen kann, werden zur schnellen Diagnose häufig PCR-Methoden angewandt. Dazu werden meist Primer verwendet, welche spezifisch für die 16s-rDNA von *H. hepaticus* sind. Das Rohmaterial für die PCR wird meist aus dem Stuhl der Mäuse gewonnen (Shames *et al.*, 1995, Riley *et al.*, 1996). Für einen spezifischen Nachweis von *H. hepaticus* werden häufig auch Primer zur Amplifikation der Gene für die Urease-Untereinheiten UreA und UreB verwendet (Shen *et al.*, 1998). Dadurch wird auch eine quantitative Bestimmung der Anzahl von *H. hepaticus* mittels Echtzeit-PCR möglich. Dazu werden Primer, welche spezifisch an das UreaseB-Gen von *H. hepaticus* binden, verwendet. Die Sensitivität liegt bei 20 fg chromosomaler *H. hepaticus*-DNA, was einer Kopienzahl der genomischen DNA von etwa 14 entspricht (Ge *et al.*, 2001).

*H. hepaticus* konnte durch Behandlung mit 0,185 mg/Tag Metronidazol, 0,185 mg/Tag Wismut und entweder 1,5 mg/Tag Amoxicillin oder Tetracyclin erfolgreich aus infizierten Tieren eradiziert werden (Foltz *et al.*, 1995).

### 1.2.4 Pathogenitätsfaktoren von *H. hepaticus*

*H. hepaticus* wurde bisher meist als Modellorganismus für die Erforschung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bakteriell ausgelöster Hepatitis und Leberkarzinomen im Tiermodell benutzt. Daher sind bisher nur relativ wenig Pathogenitätsfaktoren von *H. hepaticus* experimentell erforscht. In diesem Abschnitt wird auf Pathogenitätsfaktoren von *H.*

*hepaticus* eingegangen, für welche bisher eine Funktion in der Pathogenese nachgewiesen wurde. Mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren, die noch nicht unabhängig von dieser Arbeit beschrieben wurden, werden im Abschnitt „Ergebnisse“ und in der Diskussion im Rahmen der Annotation des Genoms von *H. hepaticus* ATCC 51449 beschrieben und diskutiert. Dabei konnten trotz Ähnlichkeit einiger Virulenzfaktoren die wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori* wie die meisten Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel oder *VacA* nicht im Genom von *H. hepaticus* gefunden werden.

#### **1.2.4.1 Cytoletales ausdehnendes Toxin („Cytolethal Distending Toxin CDT“)**

*H. hepaticus* enthält ein Cluster von drei Genen mit Homologie zu CdtA, CdtB und CdtC, welche für die drei Untereinheiten des Toxins CDT („Cytolethal Distending Toxin“) kodieren. Dieses kommt in zahlreichen pathogenen Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi* und *Helicobacter pullorum* vor (De Rycke und Oswald, 2001). *H. hepaticus* CDT führt ebenso wie CDT anderer bakterieller Spezies in Zellkulturzellen zu einem Stop in der G<sub>2</sub>-Phase während der Mitose. Dies führt zu einem erhöhten Anteil an Zellen mit einem verdoppelten DNA-Gehalt, was mit einer Vergrößerung des Zellkerns und der gesamten Zelle durch eine Umlagerung von Aktin einhergeht (Young *et al.*, 2000). Für die *in vivo*-Aktivität von CDT wird die Expression aller drei Untereinheiten benötigt. Wenn man CdtB jedoch in Zellen injiziert, ist dieses voll aktiv (Lara-Tejero und Galan, 2000). CdtA und CdtC dienen demnach vermutlich der Translokation von CdtB in die Zielzelle. CdtB besitzt eine TypI-Deoxyribonuklease-ähnliche Aktivität. Durch diese DNase-Aktivität wird vermutlich die DNA geschädigt und dadurch über Aktivierung von Reparatur- und Kontrollmechanismen die Zellteilung während der G<sub>2</sub>-Phase gestoppt (Lara-Tejero und Galan, 2000) Diese DNaseI-Aktivität wurde für CdtB von *H. hepaticus* kürzlich nachgewiesen (Avenaud *et al.*, 2004). CDT-defiziente Mutanten führen verglichen mit dem Wildtypstamm zu einer verringerten Entzündung in IL-10-KO C57BL/6-Mäusen bei vergleichbarer Kolonisationsdichte. Ebenfalls ist eine Entzündung nach Kolonisation durch CDT-defiziente Mutanten, falls überhaupt vorhanden, nur in der Mukosa nachweisbar, während der Wildtyp auch zu einer submukosalen Entzündung führt (Young *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass CdtB-defiziente Mutanten Outbred Swiss Webster-Mäuse nur noch transient besiedeln können. Acht Wochen nach der Infektion war noch eine weitgehend gleich starke Besiedlung des Caecums und Kolons nachzuweisen, während nach 16 Wochen nur noch eine Besiedlung durch Wildtypbakterien nachgewiesen werden konnte. Dagegen war in Mäusen, welche mit einer Mutante in *cdtB* infiziert wurden, nach 16 Wochen keine Besiedlung durch *H. hepaticus* mehr nachweisbar (Ge *et al.*, 2005). Dies spricht dafür, dass die Aktivität des CDT einen wichtigen

Pathogenitätsfaktor von *H. hepaticus* mit einer bedeutenden Rolle in der Kolonisation und der Entwicklung einer Entzündung im Intestinaltrakt der Maus darstellt.

#### **1.2.4.2 Urease**

Alle gastrischen und viele enterohepatischen *Helicobacter*-Arten (unter ihnen auch *H. hepaticus*) besitzen einen Gencluster, der für das Enzym Urease kodiert. Der Cluster besteht aus zwei Genen, die für die beiden Untereinheiten der Urease, UreA und UreB, kodieren und fünf Genen, die für die für die korrekte Funktion der Urease notwendigen akzessorischen Proteine UreEFGHI kodieren. Das funktionelle Urease-Protein besteht aus je sechs Untereinheiten der Proteine UreA und UreB sowie zwei Nickelatomen. Für den Nickeltransport kodiert *H. hepaticus* in entgegengesetzter Orientierung zum Urease-Cluster Homologe zu dem aus *E. coli* bekanntem Nickeltransportsystem NikABCDE (Navarro *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu besitzen *H. pylori* oder *C. jejuni* dieses Nickeltransportsystem nicht, jedoch dafür die für den Nickeltransport notwendigen Gene NixA, HspA und HspN (Mobley, 2001).

In *H. pylori* wurde nachgewiesen, dass Urease für die Kolonisation notwendig ist, indem es durch die Spaltung von Harnstoff den lokalen pH-Wert erhöht und dadurch ein Überleben während der Passage durch das saure Milieu des Magens ermöglicht (Weeks *et al.*, 2000). Dabei wird durch Harnstoffkanäle, gebildet aus UreI, bei einem pH kleiner 6,5 Harnstoff in die Zelle gepumpt. Bei der Spaltung des Harnstoffs im Zytoplasma des Bakteriums werden Ammoniumionen freigesetzt, welche aus der Zelle diffundieren und den pH-Wert dadurch lokal erhöhen.

Urease scheint auch in *H. hepaticus* essentiell für die Kolonisation zu sein (D. B. Schauer, persönliche Mitteilung), wobei Urease in *H. hepaticus* keine erhöhte Säuretoleranz vermittelt (Belzer *et al.*, 2005). Die genaue Funktion der Urease in enterohepatischen *Helicobacter spp.* ist nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Medium mit erhöhtem Nickelgehalt eine erhöhte Expression der Urease in *H. hepaticus* erfolgt (Belzer *et al.*, 2005, Mehta *et al.*, 2005). Sie könnte eine essentielle Rolle im Stickstoffstoffwechsel spielen, da Urease Harnstoff in Ammonium und Bikarbonat spaltet. Für *H. pylori* wurde eine cytotoxische Rolle gegenüber gastrischen Epithelzellen durch die Bildung von Ammoniumhydroxid nachgewiesen (Smoot *et al.*, 1990). Urease könnte bei *H. hepaticus* eine ähnliche Rolle gegenüber intestinalen Epithelzellen oder Hepatozyten spielen.

#### **1.2.4.3 Weitere beschriebene Pathogenitätsfaktoren von *H. hepaticus***

Wie schon zuvor beschrieben, führt *H. hepaticus* in spezifisch pathogenfreien IL-10-defizienten Mäusen zu einer T<sub>H</sub>1-assoziierten Kolitis (Kullberg *et al.*, 1998, Kullberg *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass diese Immunantwort durch spezifisch

gegen Antigene von *H. hepaticus* gerichtete CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen vermittelt wird (Kullberg *et al.*, 2003). Mit *H. hepaticus* infizierte C57BL/10 RAG2 KO-Mäuse, welche keine T-Zellen mehr besitzen, entwickeln nur eine Kolitis, wenn ihnen gegen *H. hepaticus* gerichtete CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen transferiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass Proteine der äußeren Membran von *H. hepaticus* am stärksten antigen wirken und dass das flagelläre Hakenprotein FlgE eines der Hauptantigene darstellt.

Das Enzym Hydrogenase von *H. hepaticus* spielt eine wichtige Rolle in der Aufnahme und Verwertung von molekularem Wasserstoff, da dieses durch die Hydrogenase zur Energiegewinnung oxidiert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass Hydrogenase-defiziente Mutanten von *H. hepaticus* H<sub>2</sub> nicht mehr verwerten können und deshalb in einer wasserstoffreichen Atmosphäre einen Wachstumsnachteil haben. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Hydrogenase-defiziente Bakterien A/JCr-Mäuse zwar ähnlich effizient wie der Wildtyp besiedeln können, aber zu einer geringeren Entzündung der Leber führen (Mehta *et al.*, 2005). Dies entspricht auch der Bedeutung der Hydrogenase in *H. pylori*. Obwohl das Gen für die Hydrogenase konstitutiv exprimiert wird, führt die Anwesenheit von molekularem Wasserstoff zu einer mindestens zehnfach stärkeren Expression der Hydrogenase. Außerdem kolonisieren Hydrogenase-defiziente *H. pylori* den Magen deutlich schlechter als Wildtypstämme (Olson und Maier, 2002). Dies ist im Gegensatz zu *H. hepaticus*, bei dem Hydrogenase-defiziente Mutanten gleich gut kolonisieren können, aber zu einer signifikant verringerten Pathologie in der Leber führen. Dies spricht dafür, dass molekularer Wasserstoff sowohl für enterohepatische als auch gastrische *Helicobacter* eine wichtige Energiequelle darstellt.

### 1.2.5 TypIV-Sekretionssysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Pathogenitätsinsel im Genom von *H. hepaticus* identifiziert, welche für ein TypIV-Sekretionssystem (T4SS) kodiert (siehe Teile „Ergebnisse“ und „Diskussion“). Daher soll nun ein kurzer Überblick über TypIV-Sekretionssysteme erfolgen.

1953 beschrieben Cavalli *et al.* mit dem Konjugationsapparat des F-Plasmids den ersten Vertreter der heute als TypIV-Sekretionssysteme bezeichneten Gruppe von Proteinsekretionssystemen (Cavalli *et al.*, 1953). TypIV-Sekretionssysteme können drei verschiedene Funktionen haben (Konjugation, Austausch von DNA mit der Umwelt, Übertragung von DNA oder Proteinen mit eukaryontischen Zellen). Bei der Konjugation wird DNA direkt zwischen zwei Vertretern der gleichen Spezies übertragen. Dies dient der Erhöhung der genetischen Plastizität und erhöht die Fitness des Bakteriums z.B. durch Übertragen von konjugativen Plasmiden, welche eine Antibiotikaresistenz tragen. Die zweite Funktion ist die Aufnahme oder Abgabe von DNA. Dies dient ebenfalls dem genetischen Austausch. Dazu



gehören z.B. das ComB-System von *H. pylori* und das Cjp/VirB-System von *C. jejuni* (Bacon *et al.*, 2002, Hofreuter *et al.*, 2000). Die dritte Funktion von T4SS ist die direkte Übertragung von Proteinen und/oder DNA in eukaryontische Zielzellen.

**Tab. 2. Auswahl an T4SS und durch sie ausgelöste Krankheiten (aus Cascales & Christie, 2003).** Es ist die mit dem jeweiligen Bakterium assoziierte Krankheit oder die Funktion des T4SS angegeben.

Bakterienspezies	T4SS	Funktion bzw. assoziierte Krankheit	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	VirB	Gallen	Lawley <i>et al.</i> , 2003
<i>Helicobacter pylori</i>	Cag	Gastritis	Censini <i>et al.</i> , 1997
<i>Bordetella pertussis</i>	Ptl	Keuchhusten	Burns <i>et al.</i> , 2003
<i>Legionella pneumophila</i>	Dot/Icm	Legionärskrankheit	Vogal <i>et al.</i> , 1998
<i>Brucella spp.</i>	VirB	Brucellose	Boschirrolu <i>et al.</i> , 2002
<i>Rickettsia prowazekii</i>		Epidemisches Fleckfieber	Andersson <i>et al.</i> , 1998
<i>Bartonella spp.</i>	VirB	Angiomatosis	Schulein <i>et al.</i> , 2002
<i>Actinobacillus</i>	MagB	Periodontitis	Novak <i>et al.</i> , 2001
<i>Ehrlichia spp</i>	VirB	Ehrlichiose	Ohashi <i>et al.</i> , 2002
<i>Wolbachia spp.</i>	VirB	Wurmerkrankungen	Masui <i>et al.</i> , 2000
<i>Xylella fastidiosa</i>	VirB	Pierce Krankheit	Bhattacharyya <i>et al.</i> , 2002
<i>Coxiella burnetii</i>	Dot/Icm	Q-Fieber	Zusmann <i>et al.</i> , 2003
<i>Escherichia coli</i> F Plasmid	Tra	Genetischer Austausch	Lawley <i>et al.</i> , 2003
<i>Escherichia coli</i> RP4	Trb	Genetischer Austausch	Baron <i>et al.</i> , 2002
<i>Shigella</i> Collb-P9	Tr	Genetischer Austausch	Baron <i>et al.</i> , 2002
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	VirB	Genetischer Austausch	Lawley <i>et al.</i> , 2003
<i>Legionella pneumophila</i>	Dot/Icm	Genetischer Austausch	Vogal <i>et al.</i> , 1998
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cjp/VirB	DNA-Aufnahme	Bacon <i>et al.</i> , 2000
<i>Helicobacter pylori</i>	ComB	DNA-Aufnahme	Hofreuter <i>et al.</i> , 2000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tra	DNA-Aufnahme	Dillard <i>et al.</i> , 2001

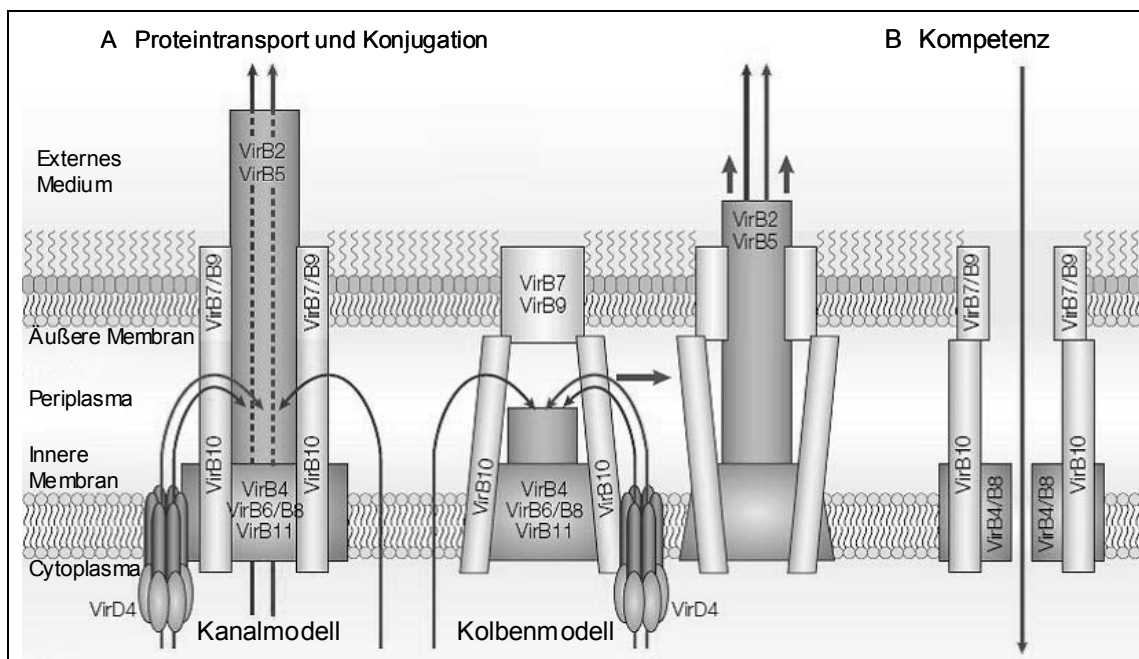
### 1.2.6 Aufbau von TypIV-Sekretionssystemen

Obwohl sich der genaue Aufbau der T4SS verschiedener Spezies unterscheidet, bestehen T4SS prinzipiell aus drei strukturellen Einheiten: einem Kopplungsproteinmultimerkomplex, einem transmembranären Proteinkomplex und dem Transferpilus.

Der Kopplungsproteinmultimerkomplex dient dazu, das durch das T4SS zu translozierende Proteine zu binden und an den transmembranären Proteinkomplex weiterzugeben. Dieser besteht aus Proteinen, welchen einen Kanal durch die innere und äußere Membran bilden. Dies sind bei dem VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens*, dem am besten untersuchten T4SS, VirB6, VirB8 und VirB10 (Kanal durch die innere Membran) und VirB4 und VirB11 (Kanal durch die äußere Membran). Zusätzlich besteht der transmembranäre Proteinkomplex aus zwei ATPasen, VirB4 und VirB11. Diese liefern vermutlich die Energie für den Transfer des Substrates durch den transmembranären Komplex. Der Ti-Pilus von *Agrobacterium tumefaciens* besteht aus VirB2 und den akzessorischen Proteinen VirB5 und VirB7.

**Tab. 3. Komponenten eines T4SS.** IM: innere Membran, OM: äußere Membran, TPK: transmembranärer Proteinkomplex

Vir-Protein	Lokalisation	mutmaßliche Funktion
<b>Kopplungsprotein</b>		
VirD4	IM	Bindung und Weitergabe des zu translozierenden Proteins an den TPK
<b>Kanaluntereinheiten</b>		
VirB6	IM	Kanaluntereinheit
VirB8	IM	Verbindung zwischen den beiden Kanaluntereinheiten in der IM und OM
VirB10	IM	Verbindung zwischen den beiden Kanaluntereinheiten in der IM und OM
VirB3	OM	
VirB7	OM	Stabilisiert VirB9 durch Disulphidbindungen
VirB9	OM	Pore durch OM
<b>Energiegewinnung</b>		
VirB4	IM	ATPase
VirB11	IM	ATPase
<b>Periplasmatische Faktoren</b>		
VirB1	Periplasma	Kanalzusammenbau
VirJ	Periplasma	Periplasmatisches Chaperon
<b>Pilus</b>		
VirB2	IM, exozellulär	Pilusuntereinheit
VirB5	Periplasma, exozellulär	Pilusuntereinheit, Chaperon
VirB7	OM, Exozellulär	Piluszusammenbau



**Abb. 3. Modell von TypIV-Sekretionssystemen (modifiziert aus Cascales & Christie, 2003).**

Für die Translokation des Zielproteins gibt es zwei Modelle, das Kanalmodell und das Kolbenmodell. In dem Kanalmodell wird angenommen, dass das zu übertragende Protein abhängig oder unabhängig vom Kopplungsfaktor in das Innere eines durch die Vir-Proteine gebildeten Kanals gelangt, durch den es durch die innere und äußere Membran transportiert wird. In dem Kolbenmodell wird das Protein zuerst durch den Kopplungsfaktor durch die innere Membran an die Spitze einer pilusartigen Struktur im Periplasma transportiert. Durch eine kolbenartige Bewegung dehnt sich dieser Pilus aus und transloziert das zu übertragende Protein durch die äußere Membran.

### **1.2.7 Enterohepatische *Helicobacter*-Arten und humane Erkrankungen**

Obwohl *Helicobacter hepaticus* kein Humanpathogen ist, konnten in mehreren Studien *Helicobacter*-Arten mit Erkrankungen der Leber oder Entzündungen des Intestinaltraktes im Menschen korreliert werden.

#### **1.2.7.1 Korrelation von enterohepatischen *Helicobacter*-Arten mit Erkrankungen der Leber und der Galle**

Schon 1998 konnte in Patienten aus Chile mit einer chronischen Cholezystitis DNA von enterohepatischen *Helicobacter spp.* nachgewiesen werden (Fox *et al.*, 1998). Dabei wurde aus einer Gruppe von 23 Patienten *Helicobacter*-DNA aus 13 Proben aus der Galle und aus sieben Proben aus dem Gallenblasengewebe nachgewiesen. Es handelte sich dabei um DNA von *H. bilis*, *H. pullorum* und *H. rappini*. Obwohl keine erfolgreiche Kultivierung der Bakterien gelang, was durch das Einfrieren der Proben erklärt wurde, sprach dies für eine Rolle von *Helicobacter*-Arten in einer chronischen Cholezystitis.

In einer weiteren Studie wurde aus sechs von 20 Proben aus dem Lebergewebe chinesischer Patienten mit Leberzellkarzinomen 16S-rDNA von *Helicobacter sp.* mit höchster Homologie zu *H. pylori* nachgewiesen. Aus Lebergewebe von 16 Kontrollpatienten konnte dagegen in keinem einzigen Fall *Helicobacter*-DNA amplifiziert werden (Huang *et al.*, 2004). Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer Studie mit französischen Patienten erhalten. Während bei 8 Patienten mit Lebertumoren DNA mit höchster Homologie zu *H. pylori* aus Lebergewebe nachgewiesen werden konnte, wurde nur bei einem von 8 Patienten ohne Leberkrebs *Helicobacter*-DNA aus Lebergewebe nachgewiesen werden (Avenaudo *et al.*, 2000). In einer Studie mit koreanischen Patienten wurde ebenfalls bei 8 von 20 Patienten mit einem Leberzellkarzinom *Helicobacter*-DNA mit höchster Homologie zu *H. pylori* nachgewiesen, während bei Kontrollpatienten keine *Helicobacter*-DNA aus Lebergewebe amplifiziert werden konnte (Huang *et al.*, 2004).

In einer japanischen Studie konnte ebenfalls *Helicobacter*-DNA aus Gewebe der Leber oder der Galle in 10 von 19 Patienten mit Leber oder Gallenblasenkrebs isoliert

werden, während in einer Kontrollgruppe nur 3 von 19 Proben positiv für *Helicobacter* waren. Die Homologie der 16S-rDNA war in diesen Fällen am höchsten zu *H. bilis* und *H. hepaticus*, während sie nur in einem Fall am höchsten zu *H. pylori* war (Fukuda *et al.*, 2002).

In drei Studien wurde das Serum von Patienten mit chronischen Leberschäden und von gesunden Kontrollpatienten auf Antikörper gegen verschiedene *Helicobacter*-Arten untersucht (Ananieva *et al.*, 2002, Nilsson *et al.*, 2000, Vorobjova *et al.*, 2006). In einer Studie mit Patienten aus Malmö konnten bei 12 von 144 Patienten Antikörper gegen Zelloberflächenantigene von *H. hepaticus* festgestellt werden. Diese Patienten litten alle unter einer alkoholbedingten Schädigung der Leber. In der anderen Studie mit Patienten aus Estland war die Antikörperantwort auf Zelloberflächenproteine der enterohepatischen *Helicobacter*-Arten *H. pullorum*, *H. bilis* und *H. hepaticus* in gesunden Kontrollpatienten höher als in Patienten mit chronischen Leberschäden. In einer dritten Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten aus Estland mit chronischen Erkrankungen der Leber mit Ausnahme von durch eine Autoimmunität ausgelöster Hepatitis im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine erhöhte Seroprävalenz gegenüber *H. hepaticus* und *H. bilis* haben.

In einer weiteren Studie konnte aus der Leber von Kindern mit Leberschädigungen in mehreren Fällen *H. ganmani* (19 von 61 Proben) amplifiziert werden, während dieser Organismus aus keiner einzigen Kontrollprobe amplifiziert werden konnte. Besonders oft wurde *H. ganmani* in Leberproben von Kindern mit Steatohepatitis, Autoimmunhepatitis, neonataler Hepatitis und einer primären sklerosierenden Cholangitis nachgewiesen (Tolia *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann man daraus den Schluss ziehen, dass enterohepatische *Helicobacter* eine Rolle bei der Ausbildung von humanen Erkrankungen der Leber besitzen könnten. Da die Entwicklung von Leberzirrhosen, Hepatitis oder Karzinomen der Leber multifaktorielle Ursachen haben und andere Umstände als Infektionen mit enterohepatischen *Helicobacter* sicherlich eine wichtigere Rolle in der Krankheitsentwicklung spielen (virale Erkrankungen, genetische Prädispositionen, Lebenswandel), kann nicht in allen Studien eine Infektion mit enterohepatischen *Helicobacter spp.* nachgewiesen werden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass enterohepatische *Helicobacter* bevorzugt in die Leber oder Gallengänge einwandern, wenn diese aus anderen Ursachen schon vorgeschädigt sind. Aber die zunehmende Anzahl an Studien, welche eine Verbindung enterohepatischer *Helicobacter* mit verschiedensten Erkrankungen der Leber und der Galle nachweisen, machen es wahrscheinlich, dass diese einen entscheidenden Faktor für eine pathologische Erkrankung der Leber darstellen.

### **1.2.7.2 Korrelation von enterohepatischen *Helicobacter*-Arten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)**

In einer wachsenden Anzahl an Studien wurde in den letzten Jahren ein Zusammenhang zwischen den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis Ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) und Infektionen mit enterohepatischen *Helicobacter* gefunden.

In einer Studie mit CU und MC-Patienten wurden in 12% der MC-Patienten und 17% der CU-Patienten enterohepatische *Helicobacter* nachgewiesen, während dies nur bei 4% der gesunden Kontrollpatienten der Fall war. Andererseits waren 61% der Kontrollpatienten positiv für *H. pylori*, während dies nur für 32% der MC und 28% der CU-Patienten der Fall war (Bohr *et al.*, 2004). Die 16S-rDNA der nachgewiesenen enterohepatischen *Helicobacter* hatte dabei die höchste Homologie zu der 16S-rDNA von *H. fennelliae* und *H. pullorum*. Die verringerte Prävalenz für *H. pylori* bei CED-Patienten könnte mit immunmodulatorischen Mechanismen oder einer Konkurrenzsituation mit enterohepatischen *Helicobacter* erklärt werden. Dieser Zusammenhang wurde in einer zweiten britischen Studie mit CED-Patienten bestätigt (Bell *et al.*, 2003). Andere Studien lassen jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Besiedlung mit enterohepatischen *Helicobacter* oder *H. pylori* und CED erkennen (Duggan *et al.*, 1998, Oliveira *et al.*, 2004, Piodi *et al.*, 2003).

## **1.3 Das angeborene Immunsystem**

Die Immunantwort in Vertebraten kann in die angeborene und die erworbene Immunität aufgeteilt werden, wobei beide Teile der Immunantwort eng miteinander verzahnt sind und aufeinander einwirken. Die erworbene Immunität dient der spezifischen Erkennung von Pathogenen durch Antikörper und T-Zell-Rezeptoren. Das angeborene Immunsystem dient dagegen einer sofortigen Abwehr von Pathogenen, bevor das erworbene Immunsystem eingreift. Dabei werden bestimmte bakterielle und virale Erkennungsmotive („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs) durch spezifische Rezeptoren erkannt.

## **1.4 Toll-ähnliche Rezeptoren**

Die wichtigste Klasse dieser Rezeptoren sind die sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren („Toll-like receptors“; TLRs). Der Prototyp dieser Rezeptorfamilie ist Toll, welcher in Insekten zuerst wegen seiner Rolle in der Kontrolle der Entwicklung der dorsoventralen Polarität in der Embryogenese entdeckt wurde (Hashimoto *et al.*, 1988). Später wurde jedoch gezeigt, dass Toll auch eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen Pilzinfektionen in Insekten spielt (Lemaitre *et al.*, 1996). Durch Homologiesuche konnten in Wirbeltieren mindestens 11 Homologe zu Toll gefunden werden, für welche gezeigt wurde, dass sie Rezeptoren für das Erkennen von PAMPs sind (Tab. 4).

Tab. 4. Übersicht über Mustererkennungsrezeptoren in Wirbeltieren und ihre Liganden.

TLR	Ligand	Herkunft des Liganden	Referenz
TLR1	Triacylierte Lipopeptide	Bakterien	Takeuchi <i>et al.</i> , 2002
TLR2	Lipoproteine/ Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure	Bakterien Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien	Aliprantis <i>et al.</i> , 1999 Takeuchi <i>et al.</i> , 1999 Schwadner <i>et al.</i> , 1999
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren	Alexopoulo <i>et al.</i> , 2001
TLR4	Lipopolysaccharide	Gram-negative Bakterien	Poltorak <i>et al.</i> , 1998
TLR5	Flagellin	Bakterien	Hayashi <i>et al.</i> , 2001
TLR6	Diacylierte Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	Mycoplasmen Gram-positive Bakterien Pilze	Takeuchi <i>et al.</i> , 2001 Schwadner <i>et al.</i> , 1999 Ozinsky <i>et al.</i> , 2000
TLR7	Einzelsträngige RNA	Viren	Hemmi <i>et al.</i> , 2002
TLR8	Einzelsträngige RNA	Viren	Heil <i>et al.</i> , 2004
TLR9	CpG-enthaltende DNA	Bakterien und Viren	Hemmi <i>et al.</i> , 2004
TLR10	unbekannt	unbekannt	-
TLR11	unbekannt	Uropathogene Bakterien	Zhang <i>et al.</i> , 2004
NOD1	$\gamma$ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure	Bakterien	Inohara <i>et al.</i> , 1999
NOD2	MurNAc-L-Ala-d-isoGln	Bakterien	Ogura <i>et al.</i> , 2001

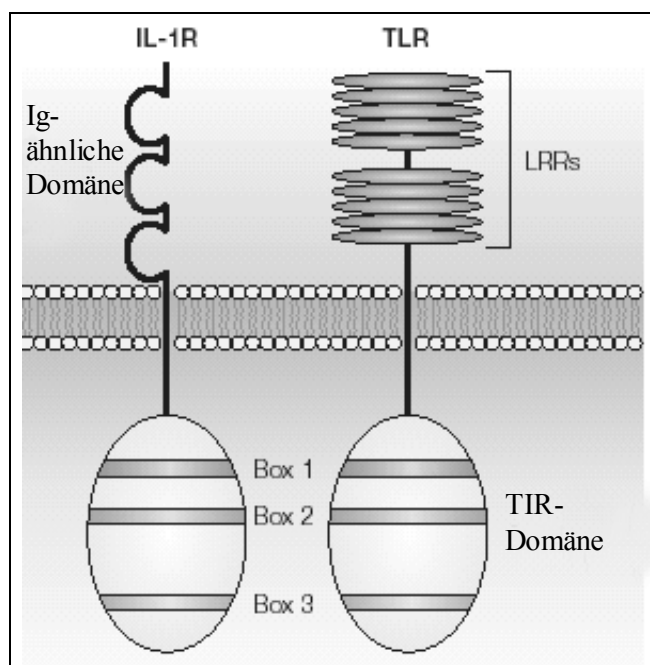


Abb. 4. Struktur von Toll-ähnlichen Rezeptoren (aus Akira & Takeda, 2004). Toll-ähnliche Rezeptoren bestehen aus einer cytoplasmatischen TIR-Domäne, welche aus drei homologen Boxen besteht und einer extrazellulären Domäne bestehend aus Tandemwiederholungen von Leucinreichen Regionen. Die extrazelluläre Domäne des Interleukin-1-Rezeptors besteht dagegen aus drei immunglobulinähnlichen Regionen.

#### 1.4.1.1 Signalweiterleitung der Toll-ähnlichen Rezeptoren

Wenn Toll-ähnliche Rezeptoren einen passenden Liganden binden, bilden sie ein Homo- oder Heterodimer, was zu einer Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domäne führt (Akira *et al.*, 2004). Dies führt zur Aktivierung von mehreren möglichen Signalkaskaden. Die wichtigsten sind der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige Signalkaskadeweg. Dabei werden für die maximale Aktivierung einiger TLRs Kofaktoren benötigt, wie zum Beispiel MD2 und CD14 für die Aktivierung von TLR4 durch Lipopolysaccharide.

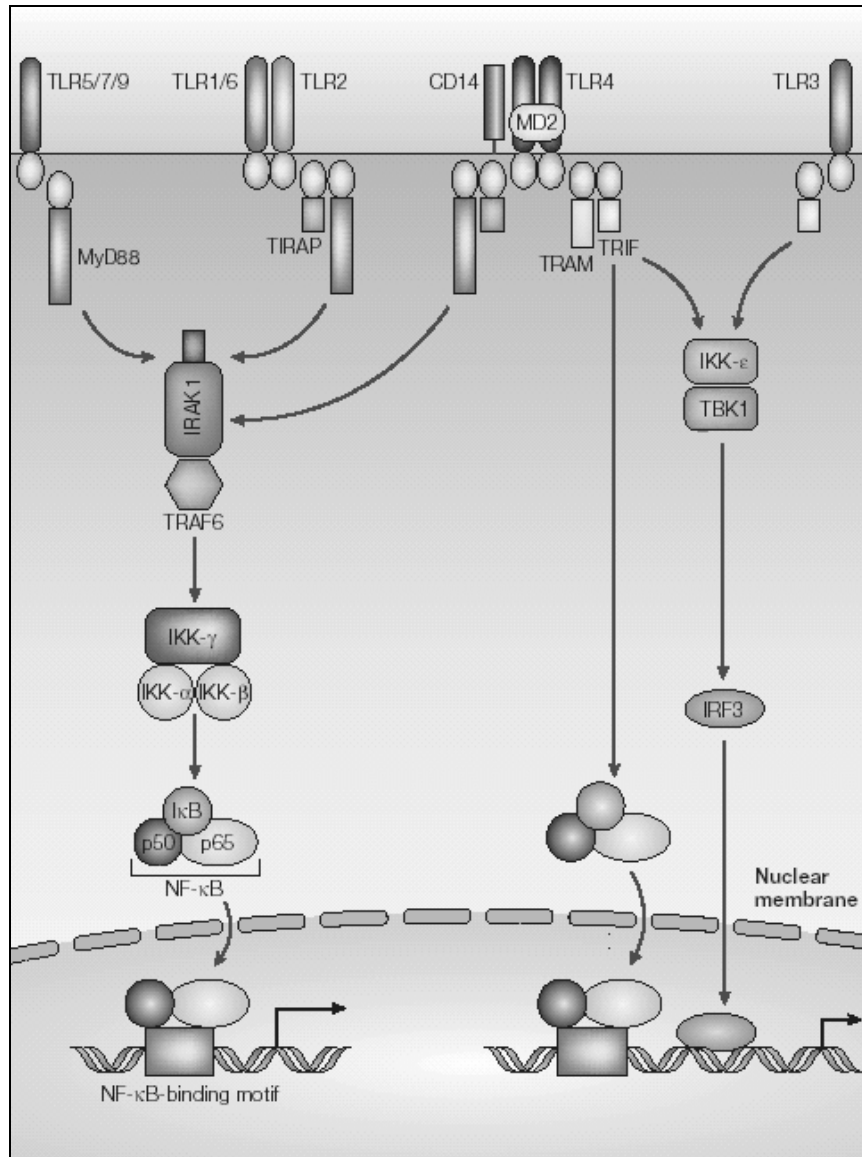
Der MyD88-abhängige Weg wird von TLR1, TLR2, TLR5, TLR6, TLR7 und TLR9 benutzt, während TLR3 den MyD88-unabhängigen Weg benutzt. TLR4 benutzt sowohl den MyD88-abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Weg.

Beim MyD88-abhängigen Weg führt die Bindung und Dimerisierung des Toll-ähnlichen Rezeptors zur Assoziation mit MyD88, welches wiederum IRAK1 und IRAK4 (IL-1 receptor associated kinase 1 und 4) rekrutiert. IRAK4 wird von IRAK1 phosphoryliert, was zur Bindung von TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor associated factor 6) führt. IRAK4 und TRAF6 lösen sich von dem Rezeptorkomplex und formen an der Plasmamembran einen neuen Komplex mit TAK1 (Transforming growth factor  $\beta$  activated kinase 1), TAB1 (TAK1 binding protein 1) und TAB2. TAB2 und TAK1 werden phosphoryliert, wodurch IRAK1 degradiert wird und der restliche Komplex ins Cytosol einwandert. Dort assoziiert er mit den Ubiquitinligasen UBC13 (Ubiquitin-conjugating enzyme 13) und UEV1A (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1). Dies führt zur Ubiquitinylierung von TRAF6, wodurch TAK1 sowohl MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen als auch den IKK-Komplex (inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B-kinase), welcher aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  besteht, phosphoryliert. Der IKK-Komplex phosphoryliert dann I $\kappa$ B, was zu dessen Ubiquitinylierung und anschließender Degradation führt. Dadurch kann der NF- $\kappa$ B-Komplex in den Zellkern einwandern, was zur Expression von dessen Zielgenen führt. Dies sind unter anderem proinflammatorische Gene wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 oder MIP-2.

Die Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren besteht aus insgesamt 5 Untereinheiten (RelA, RelB, cREL, p50 und p52), die als Homo- oder Heterodimere assoziiert sind. Im inaktiven Zustand werden diese von Inhibitoren von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) im Cytosol zurückgehalten. Falls I $\kappa$ B jedoch durch den IKK (I $\kappa$ B-Kinase)-Komplex phosphoryliert wird, wird dieses degradiert und der NF- $\kappa$ B-Komplex kann in den Zellkern einwandern. Um maximal aktiv zu werden, müssen die Untereinheiten der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktorenfamilie jedoch durch Phosphorylierung weiter modifiziert werden. So führt zum Beispiel IL-1 und TNF $\alpha$  unabhängig von der Phosphorylierung und der Degradation von I $\kappa$ B zu einer Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65. Dies führt zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von p65.

Beim MyD88-unabhängigen Weg bindet dagegen TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$ ) an die TIR-Domäne des aktivierten Rezeptors. Für TLR4

muss neben TRIF auch noch das zweite Adaptermolekül TRAM (TRIF-related adaptor molecule) an den Rezeptor binden. Dies führt zur Aktivierung von IKK- $\epsilon$  und TBK1 (TRAF-family-member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase 1). Diese wiederum aktivieren den Transkriptionsfaktor IRF3 (IFN- $\beta$  regulatory factor 3), was zur Expression von proinflammatorischen Genen wie IFN- $\beta$  führt.



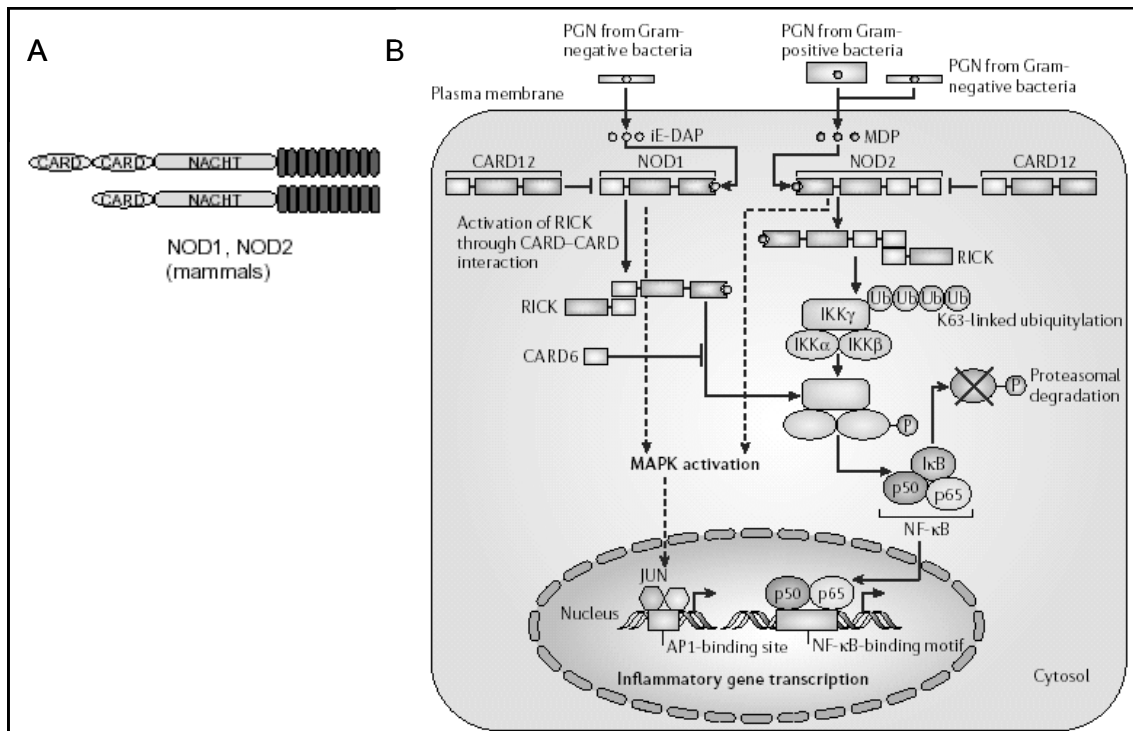
**Abb. 5. Schematische Darstellung der MyD88-abhängigen und -unabhängigen Signalkaskade (aus Akira & Takeda, 2004).** Genaueres zur Signalweiterleitung ist im Haupttext beschrieben.

#### 1.4.2 Nod-Rezeptoren

Eine zweite wichtige Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren stellen NOD-Proteine dar, von denen NOD1 und NOD2 bisher am besten charakterisiert sind. NOD-Proteine bestehen aus einer (NOD2) oder zwei (NOD1) CARD-Domänen, einer zentralen NACHT-Domäne und ähnlich wie TLRs aus C-terminalen leucinreichen Motiven (Abb. 6 A). Im Gegensatz zu Toll-ähnlichen Rezeptoren sind NOD-Proteine jedoch nicht membranär gebunden, sondern liegen



frei im Cytoplasma vor. Sie erkennen die Peptidoglykanabbauprodukte  $\gamma$ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (NOD1) und MurNAc-L-Ala-d-isoGln (NOD2). Die Bindung der Liganden an die NOD-Rezeptoren führt zur Bindung an RICK (receptor interacting serine/threonine kinase) über die CARD-Domänen (Abb. 6 B). Dies führt zur Polyubiquitinylierung von IKK $\gamma$ . Dadurch wird IKK $\gamma$  abgebaut und zunächst IKK $\beta$  und dann I $\kappa$ B phosphoryliert. Dadurch wird I $\kappa$ B abgebaut und der NF- $\kappa$ B-Komplex kann in den Zellkern einwandern. Dort werden dann NF- $\kappa$ B-abhängige Zielgene transkribiert. Ebenfalls werden durch NOD-Rezeptoren über noch nicht vollständig aufgeklärte Wege auch MAP-Kinasen wie JNK, ERK oder p38 aktiviert. Die alleinige Aktivierung von NOD-Rezeptoren führt aber meist nur zu einer schwachen proinflammatorischen Antwort. Sie wirken jedoch synergistisch mit der Aktivierung von Toll-ähnlichen Rezeptoren, wodurch die Stärke der proinflammatorischen Antwort deutlich verstärkt wird.



**Abb. 6. Struktur und Signalweiterleitung von NOD-Proteinen.** (A) Struktur von NOD1 (aus Murray, 2005). (B) Signalweiterleitung durch NOD-Proteine (aus Strober *et al.*, 2006). Genaueres zur Struktur und zur Signalweiterleitung ist im Haupttext beschrieben.

### 1.4.3 *H. pylori* und das angeborene Immunsystem

Vor der hier vorgestellten Arbeit war noch ziemlich wenig über den Zusammenhang zwischen *H. hepaticus* und dem angeborenen Immunsystem bekannt. Deshalb soll nun kurz auf den Einfluss von *H. pylori* auf das angeborene Immunsystem eingegangen werden. *H. pylori* besiedelt die Mukosa des Magens, wo es zu einer chronischen Gastritis führt. Dabei hat es aber Wege gefunden, das Immunsystem derart zu manipulieren, dass es seinen Wirt

langfristig kolonisieren kann (Portnoy, 2005). Die Infektion mit *H. pylori* führt zu einer basolateralen Umverteilung von TLR5 und TLR9 in gastrischen Epithelzellen (Schmausser *et al.*, 2004a). Diese reagieren meist kaum auf TLR4-Liganden, und außerdem zeigen LPS, Flagellen und genomische DNA von *H. pylori* nur eine geringe immunstimulatorische Wirkung (Backhed *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2003). Möglicherweise bindet LPS von *H. pylori* nicht an TLR4, sondern an alternative Rezeptoren wie TLR2 oder DC-SIGN und führt weniger zu einer Aktivierung, sondern zu einer Hemmung der proinflammatorischen Antwort (Bergman *et al.*, 2004, Lepper *et al.*, 2005, Smith, Jr. *et al.*, 2003). Entscheidend für die durch *H. pylori* ausgelöste Immunantwort scheinen TLR2 und NOD-Rezeptoren zu sein. In einem *in vitro*-Zellkulturmodell wurde gezeigt, dass lebende *H. pylori* die Zellen hauptsächlich über TLR2 stimuliert (Mandell *et al.*, 2004). Welches die genauen immunstimulatorischen Komponenten von *H. pylori* sind, ist noch unbekannt, aber das Genom von *H. pylori* kodiert für eine hohe Anzahl an Lipoproteinen (Alm *et al.*, 1999, Tomb *et al.*, 1997). Ein heißer Kandidat scheint aber das Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) zu sein (Takenaka *et al.*, 2004). In gastrischen Epithelzellen führen nur *cag*-positive *H. pylori*-Stämme zu einer IL-8-Sekretion. Es wurde gezeigt, dass diese Aktivierung von IL-8 durch den *cag*-Insel-abhängigen Transport von Muramyltripeptiden und die Bindung an NOD1 erfolgt (Viala *et al.*, 2004).

Während gastrische Epithelzellen nur schwach durch *H. pylori* aktiviert werden, löst *H. pylori* in Makrophagen eine starke Immunantwort aus (Basak *et al.*, 2005, Hansen *et al.*, 2002, Maeda *et al.*, 2001). Diese ist unabhängig von der *cag*-Insel, während LPS trotz seiner geringen Aktivität ein wichtiger Stimulator von Makrophagen ist (Bliss, Jr. *et al.*, 1998, Maeda *et al.*, 2001). Andere wichtige Induktoren scheinen auch die Urease (Hansen *et al.*, 2002) und das neutrophilenaktivierende Protein Nap zu sein (Nishioka *et al.*, 2003). Um eine zu starke Immunantwort zu unterbinden, führt *H. pylori* zu einer verringerten Expression der Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 (Schmausser *et al.*, 2004b).

#### **1.4.4 Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem**

Lange Zeit wurde das angeborene und das adaptive Immunsystem isoliert betrachtet. Neuere Erkenntnisse zeigen aber, dass diese beiden Zweige des Immunsystems eng miteinander verknüpft sind. Das angeborene Immunsystem dient einer schnellen Antwort auf eindringende Pathogene. Wie schon dargestellt, werden dabei konservierte „Muster“ (Moleküle) der Pathogene oder auch von kommensalen Mikroorganismen durch Mustererkennungsrezeptoren erkannt. Die Antwort der angeborenen Immunantwort wird hauptsächlich durch Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen, Eosinophile und dendritische Zellen vermittelt. Das angeborene Immunsystem erkennt dagegen jeweils ganz spezifische Moleküle (Protein epitope etc.) jedes einzelnen Pathogens. Dies wird hauptsächlich durch B-Zellen (humorale Immunantwort), cytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen; zelluläre Immunantwort)

und  $T_H$ -Zellen ( $CD4^+$  T-Zellen; T-Helferzellen) vermittelt.  $T_H$ -Zellen können weiterhin in  $T_H1$ -Zellen (sekretieren hauptsächlich Interferon- $\gamma$ , TNF- $\beta$  und IL-12, stimulieren Makrophagen und cytotoxische T-Zellen und aktivieren dadurch die zelluläre Immunantwort),  $T_H2$ -Zellen (sekretieren hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-13, stimulieren B-Zellen und aktivieren dadurch die humorale Immunantwort) und  $T_{reg}$ -Zellen (regulatorische T-Zellen, welche die Aktivität des adaptiven Immunsystems hemmen) unterteilt werden (Mosmann und Coffman, 1989, Sakaguchi *et al.*, 2001).

Entscheidend für die Verknüpfung des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind dendritische Zellen. Diese liegen vor ihrer Aktivierung in einer unaktivierten Form vor. Kontakt mit Liganden für Mustererkennungsrezeptoren und verschiedenen Cytokinen führt zu deren Reifung (Chain, 2003). Dies führt zur Bestückung von MHC (major histocompatibility complex) Klasse 1- und Klasse 2-Molekülen mit Antigenen, welche  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert werden. Zusammen mit kostimulatorischen Signalen führt dies zu deren Aktivierung. Für die Polarisierung von  $CD4^+$  T-Zellen in  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_{reg}$ -Zellen sind die Kostimulatoren entscheidend. PAMPs und dendritische Zellen stimulierende Cytokine können vereinfacht in drei Klassen unterteilt werden. Typ 1-Pamps und -Cytokine (TLR3-, TLR7- und zum Teil TLR4-Liganden, IFN- $\gamma$  und IFN- $\alpha$ ) führen zur Sekretion von IL-12 und IL-27 und daher zur  $T_H1$ -Polarisierung, während Typ 2-PAMPs und Cytokine (Rezeptoren zur Erkennung von Parasiten, CCR2-Liganden, Histamine und andere) zu einer Sekretion von CCL2 und daher zur  $T_H2$ -Polarisierung führen. Regulatorische PAMPs und Cytokine (TLR2- und teilweise TLR4-Liganden, IL-10 und TGF- $\beta$ ) führen zu einer weiteren IL-10- und TGF- $\beta$ -Sekretion von dendritischen Zellen und daher zur Ausbildung von regulatorischen T-Zellen (Netea *et al.*, 2005a). Dabei ist diese Einteilung jedoch nicht strikt. So kann LPS zu einer  $T_H1$ -Antwort oder zur Ausbildung regulatorischer T-Zellen führen. Vereinfacht kann jedoch gesagt werden, dass Viren und intrazelluläre Bakterien eher zu einer  $T_H1$ -Antwort und extrazelluläre Bakterien und Parasiten eher zu einer  $T_H2$ -Antwort führen. Entscheidend für eine zielgerichtete Immunantwort sind Homing-Rezeptoren (Campbell und Butcher, 2002). Diese führen zu einer Migration der T-Zellen zu dem Ort, an dem der entsprechende Stimulus zum ersten Mal aufgetreten ist. So führen z.B. CCR9 und  $\alpha_4\beta_7$  zu einer Migration in den Darmtrakt und CLA (cutaneous lymphocyte antigen) führt zu einer Migration in die Haut.

Vereinfacht kann abschließend gesagt werden, dass das angeborene Immunsystem für eine schnelle Immunantwort und die Polarisierung der adaptiven Immunantwort zuständig ist. Das adaptive Immunsystem ist dagegen für eine zielgerichtete Immunantwort zuständig. Das Verhältnis von  $T_H1$ ,  $T_H2$  und regulatorischen T-Zellen entscheidet über die Stärke und Dauer der Immunantwort.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

*H. hepaticus* stellt einen wichtigen Modellorganismus für die Untersuchung der Entstehung von Krebs und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Tiermodell dar. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich jedoch weitgehend auf die Wirtsseite, während *H. hepaticus* hauptsächlich als Hilfsmittel für die Entstehung einer Kolitis oder von Leberläsionen benutzt wurde. Dagegen war bisher über Pathogenitätsfaktoren von *H. hepaticus*, welche Auslöser für die Entstehung dieser Erkrankungen sind, nur wenig bekannt.

Ein Ziel dieser Arbeit war das Auffinden und Charakterisieren neuer Pathogenitätsfaktoren anhand der Gesamtgenomsequenz von *H. hepaticus*. Darauf basierend sollten Mutanten verschiedener ausgewählter Gene konstruiert werden. Die Etablierung von Zellkulturmodellen für *in vitro*-Untersuchungen ermöglichte es, die Interaktion von *H. hepaticus* mit Zellen, die denen ähneln, mit denen *H. hepaticus* im Wirt in Kontakt kommt, näher zu charakterisieren. Dies diente sowohl der *in vitro*-Charakterisierung der Mutanten als auch dem Erlangen eines besseren Verständnisses der Wechselwirkung von *H. hepaticus* mit Zellen seines natürlichen Habitats.

In einer Kooperation mit dem MIT, MWG Biotech und GeneData wurde schon vor Beginn dieser Arbeit die Gesamtgenomsequenz des *H. hepaticus*-Referenzstammes ATCC 51449 bestimmt. Dieses sollte annotiert werden, um daraus unter anderem Rückschlüsse auf neue Pathogenitätsfaktoren zu gewinnen. Es ist für das nah verwandte Bakterium *H. pylori* bekannt, dass dieses eine sehr hohe genomische und Sequenzvariabilität besitzt, welche essentiell für dessen Fähigkeit zur persistenten Kolonisation des menschlichen Magens und Pathogenität ist. Es stellte sich deshalb die Frage, ob *H. hepaticus* eine ähnliche Variabilität aufweist, welche durch Multilocussequenzanalysen und Microarray-basierte Vergleiche beantwortet wurde. Dabei zeigte sich, dass *H. hepaticus* eine 70 kb große genomische Insel besitzt, welche mit der durch *H. hepaticus* ausgelösten Pathologie assoziiert ist. Daher sollte diese in *in vivo*- und *in vitro*-Modellen näher charakterisiert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit waren Methoden zur gezielten Manipulation des Genoms von *H. hepaticus* noch wenig etabliert. Deshalb mussten zuerst neue Methoden etabliert und verfeinert werden. Dies konnte dann für die Konstruktion von Mutanten in der HHGI1-Insel und weiterer ausgewählter Gene angewandt werden.

Für die *in vitro*-Charakterisierung von *H. hepaticus* waren noch keine gut etablierten Zellkultursysteme vorhanden. Deshalb wurden Zelllinien ausgesucht, die den Zellen, mit denen *H. hepaticus* im Wirt interagiert, möglichst ähnlich sein sollten. Diese mussten zunächst näher charakterisiert werden, da ein genaues Verständnis der Interaktion von Zellen mit isolierten Einzelfaktoren essentiell für die weitere Arbeit mit komplexen Systemen ist. Dazu wurden die Zellen mit aufgereinigten Einzelfaktoren koinkubiert. Darauf basierend konnte die Interaktion von *H. hepaticus* mit diesen Zellen näher charakterisiert werden. Dazu

sollte die Adhärenz und Cytotoxizität von *H. hepaticus* auf die Zellen und dann die durch *H. hepaticus* ausgelöste Wirtsantwort betrachtet werden. Dazu wurden sowohl ausgewählte Cytokine als Marker für eine inflammatorische Antwort als auch die globale Genregulation mit Hilfe von Microarrays untersucht. Diese neu etablierten *in vitro*-Modelle konnten dann für weitere Untersuchungen benutzt werden. Dabei sollte ein Hauptaugenmerk auf die Modulation der Wirtsantwort durch die HHG11-Insel gelegt werden.

Einen der wichtigsten Liganden für Toll-ähnliche Rezeptoren stellt LPS dar. Deshalb war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, LPS von *H. hepaticus* näher zu charakterisieren. Dazu wurde LPS von mehreren *H. hepaticus*-Stämmen aufgereinigt, dessen Interaktion mit den verschiedenen Zelllinien anschließend betrachtet wurde. Basierend auf den bis dahin erhaltenen Daten konnte dann die Modulation der Wirtsantwort durch *H. hepaticus* untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass *H. hepaticus* die Wirtsantwort auf *E. coli*-LPS und *S. typhimurium*-Flagellin hemmen kann. Dieser inhibitorische Effekt sollte näher charakterisiert werden.

Die Kombination der durch verschiedene Ansätze erhaltenen Daten erlaubt es, ein detaillierteres Verständnis der Interaktion eines Bakteriums mit seinem Wirt zu entwickeln. Deshalb war es das Hauptziel dieser Arbeit, durch Kombination der verschiedenen Herangehensweisen ein Modell für die persistente Besiedlung und die durch *H. hepaticus* ausgelöste Pathologie besonders im Hinblick auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu entwickeln.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Anaerobentöpfe	Oxoid, Wesel
Brutschränke	KB 500 (Heraeus, Hanau), Scholzenschrank (Scholzen Microbiology Systems, Wittenbach, Schweiz)
Elektrophoresekammern	BioRad, München; Biometra, Göttingen
Elektroporationsgerät	Gene Pulser (BioRad, München)
Fluoreszenz-Scanner	GMS 418 confocal laser scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
Filme	Hyperfilm™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Gel-Dokumentationssystem	MidiDoc (Herolab, Wiesloch)
Hybridisierungskammern für Microarrays	CMT-Hybridisierungskammern (Corning, NY, USA)
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop Olympus BX40 (Olympus, Hamburg) Konfokalmikroskop (Leica, Bensheim)
pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim; Omnilab, Gehrden
Schüttelinkubatoren	EB SM30, Aufsatz TH30 (Hartenstein GmbH, Würzburg)
Semidry-Blotter	Keutz, Reiskirchen
Sequenzierapparatur	ABI Prism Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt) ABI 3130xl (Applied Biosystems)
Spannungsgeräte	BioRad, München
Speed Vac	SC110A (Savant, New York, USA)
Spektralphotometer	GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Thermocycler	T3 (Biometra, Göttingen)
Ultraschall-Sonifikator	Sonifier Cell Disruptor B15, Branson G. (Heinemann, Schwäbisch Gmünd)
UV Crosslinker	Stratalinker 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)
Vortexer	REAX control (Heidolph, Kehlheim)
Waagen	Feinwaage Scaltech SB50 (Hartenstein, Würzburg)
Zentrifugen	5417R (Eppendorf, Hamburg) Biofuge <i>Fresco</i> (Heraeus, Hanau) RC-5B (Sorvall, Hanau) Sigma 3K20 (Sigma, Steinheim) Optima™ TLI-100-Ultrazentrifuge (Beckman, München)

### 2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom höchsten käuflichen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und Roche (ehemals Boehringer; Mannheim) bezogen.

## 2.3 Enzyme, Liganden, Antikörper und Kits

### Enzyme:

DNA-Polymerasen	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe; Amersham Pharmacia, Freiburg; Roche/Boehringer, Mannheim
DNaseI, RNase frei	Roche, Mannheim
alkalische Phosphatase CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lysozym	Sigma, Steinheim
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen, Karlsruhe; NEB, Bad Schwalbach
Reverse Transkriptase SuperScriptII	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseH <sup>-</sup>	
RnaseA	Sigma, Steinheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim; NEB, Bad Schwalbach
T7-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

### Liganden und Inhibitoren:

<i>E. coli</i> -LPS	List Biological Laboratories; San Diego
<i>S. typhimurium</i> -Flagellin	Zur Verfügung gestellt von Shin-Ichi Aizawa
Pam3Cys-SK <sub>4</sub>	EMC Microcollections; Tübingen
Phorbolmyristataacetat	Sigma, Steinheim
GMDP	Calbiochem, Darmstadt
NF-κBi SN50, SB203580	Calbiochem, Darmstadt
U0126	Promega, Mannheim
SB202190	Sigma, Steinheim
SP600125	AG Scientific, Göttingen
Wheat Germ Agglutinin-Texas Red	Molecular Probes, Karlsruhe
Phalloidin-Texas Red	Molecular Probes, Karlsruhe
TNF-α, IL-1β	R&D Systems, Wiesbaden
Mausserum	Serotec, Düsseldorf

### Antikörper:

Kaninchen anti Maus MIP-2	Abcam, Cambridge MA
Kaninchen anti Maus MIP2-Biotin	Abcam, Cambridge MA
Pox-Ziege anti Kaninchen IgG	Molecular Probes, Karlsruhe
Alexa Fluor <sup>488</sup> -Ziege anti Kaninchen IgG	Molecular Probes, Karlsruhe

### Kits:

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Genomic-tip 100/G	Qiagen, Hilden
Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit	Molecular Probes, Karlsruhe
BioPrime DNA Labelling System	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.4 Standards

### DNA-Längenstandards:

1 Kb Plus DNA Ladder                      Invitrogen, Karlsruhe  
 1 Kb DNA Ladder                              NEB, Bad Schwalbach

### RNA-Längenstandards:

RNA Ladder (0,5 – 9 kb)                      NEB, Bad Schwalbach

## 2.5 Bakterienstämme

### 2.5.1 *H. hepaticus*

**Tab. 5. *H. hepaticus* Wildtypstämme.** Alle Stämme wurden von James G. Fox (MIT, Cambridge MA) erhalten.

Stamm	Herkunftsland	Mausstamm	Herkunftsgewebe	Pathologie der Maus
ATCC 51448	USA	SCID/NCR, männlich	Leber	Multifokale Hepatitis
ATCC 51449	USA	SCID/NCR, männlich	Leber	Multifokale Hepatitis
ATCC 51450	USA	SCID/NCR, männlich	Leber	Multifokale Hepatitis
94-2114	USA	DB A/2, weiblich, 4 Wochen	Caecum	Keine sichtbaren Erkrankungen
94-2138	USA	Nacktmaus, Swiss-Hintergrund, weiblich, 1 Jahr	Caecum	Leichte Typhlitis
94-2423	USA	C57/BL, weiblich, 4 Wochen	Caecum	Keine sichtbaren Erkrankungen
94-508	USA	Stamm unbekannt, männlich, 2 Jahre	Caecum	Keine sichtbaren Erkrankungen
94-739	USA	SCID/NCR, männlich, 7 Monate	unbekannt	Multifokale Läsionen, Entzündung und Nekrose der Leber
95-1552	USA	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt
95-225	USA	Swiss-Maus, NIH, männlich	Caecum	Keine sichtbaren Erkrankungen
95-557	USA	A/J, männlich, 3 Monate	Caecum	Multifokale Hepatitis
96-284	Deutschland	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt
96-1809	Niederlande	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt



Tab. 6. In dieser Arbeit hergestellte bzw. verwendete Mutanten

Name der Mutante	ORF-Nummer	Annotation	Resistenz der Mutante	Herkunft
I1 <sup>-</sup>	HH250- HH268	Teil der HHG11- Pathogenitätsinsel	Chloramphenicol	Diese Arbeit
IcmF <sup>-</sup>	HH252	Homolog zu <i>virB10</i> und <i>icmF</i> von <i>V. cholerae</i> und <i>Y. pestis</i>	Chloramphenicol	Diese Arbeit
VirB4 <sup>-</sup>	HH260	Homolog zu <i>virB4</i>	Chloramphenicol	Diese Arbeit
HhcpA <sup>-</sup>	HH1222	Cystein-reiches Protein	Chloramphenicol	Diese Arbeit
CdtB <sup>-</sup>	HH1447	Cytolethal distending toxin	Chloramphenicol	David B. Schauer (MIT, Cambridge MA)
FlaA1 <sup>-</sup>	HH1364	Eines von zwei FlaA- Genen	Chloramphenicol	David B. Schauer (MIT, Cambridge MA)
FliA <sup>-</sup>	HH1146	δ28-Regulator	Chloramphenicol	Diese Arbeit

## 2.5.2 Escherichia coli

Tab. 7. In dieser Arbeit für Klonierungen verwendete *E. coli*-Stämme.

Escherichia coli-Stamm	Genotyp	Referenz
MC 1061	F <sup>-</sup> , <i>araD139 Δ(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL (Strr) hsdR2 (rKm+) mcrA mcrB1</i>	Casadabab and Cohen, 1980
DH5α	F <sup>-</sup> , <i>endA1, recA1, hsdR17, Δ(lacZYA-argF)U169, thi-1, supE44, gyrA96, relA1</i>	Hanahan, 1983
ER2566	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>fhuA2[lon], ompT lacZ::T7 genel gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)11::IS10 R (mcr-73::miniTn10)2 R(zgb-210)::Tn10) 1 (TetS) endA1 [dcm]</i>	New England Biolabs

## 2.6 Medien

### 2.6.1 Feste Medien

Name	Zusammensetzung pro Liter
Blutagar	40 g Blood Agar Base No. 2 (Oxoid), 100 ml defibriniertes Pferdeblut, 10 mg Vancomycin, 3,2 mg Polymyxin B, 5 mg Trimethoprim, 4 mg Amphotericin B
LB-Agar	10 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agarose

### 2.6.2 Flüssigmedien

Name	Zusammensetzung pro Liter
BHI-Medium	37 g Brain-Heart-Infusion-Broth, 2,5 g Hefeextrakt, 10% Pferdeserum, 10 mg Vancomycin, 3,2 mg Polymyxin B, 5 mg Trimethoprim, 4 mg Amphotericin B
LB-Medium	10 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
Einfrüermedium <i>E. coli</i>	-20 °C: 1 x PBS, 50% Glycerin -80 °C: 1 x PBS, 35% Glycerin
Einfrüermedium <i>H. hepaticus</i>	37 g Brain-Heart-Infusion-Broth, 2,5 g Hefeextrakt, 10% Pferdeserum, 10% Glycerin

## 2.7 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech hergestellt.

**Tab. 8. Oligonukleotide für semiquantitative RT-PCRs von eukaryontischen Zellen.**

Amplifiziertes Gen	Genbank-Nummer	Primernamen	Sequenz [5'-3']	Anlagerungstemperatur [°C]	Elongation [sec]	Produktlänge [bp]
<i>gapdh</i>	AK005798	mGAPDH_1	GGGGCCATCCACAGTCTTC	57	60	341
		mGAPDH_2	TCACCATCTTCCAGGAGCG			
<i>scyb2</i> ( <i>mip2</i> )	NM_009140	mMIP2_1	GGTGGGATGTAGCTAGTTCC	57	60	466
		mMIP2_2	TTTGCCTTGACCCTGAAGCC			
<i>il6</i>	NM_031168	mIL6_1	GAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACT	63	60	357
		mIL6_2	ACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC			
<i>il1b</i>	NM_008361	mIl1b_1	GAGCCCATCCTCTGTGACTC	57	60	445
		mIL1b_2	GCTTGTGCTCTGCTTGTGAG			
<i>il10</i>	NM_010548	mIL10_1	AGGACTTTAAGGGTTACTTGGGTT	63	60	446
		mIL10_2	GGAGAGAGGTACAAACGAGTTT			
<i>il12b</i>	NM_008352	mIL12bp40_1	TGACACGCCTGAAGAAGATG	53	60	550
		mIL12bp40_2	TGGTTTGATGATGTCCCTGA			
<i>scya2</i> ( <i>mcp1</i> )	NM_011333	mMCP1_1	GGAAAAATGGATCCACACCTTGC	61	60	582
		mMCP1_2	TCTTCTCCACCACCATGCAG			
<i>scya3</i> ( <i>mip1a</i> )	NM_011337	mMIP1 $\alpha$ _1	GAAGAGTCCCTCGATGTGGCTA	63	60	561
		mMIP1 $\alpha$ _2	CCCTTTTCTGTTCTGCTGACAAG			
<i>tnf<math>\alpha</math></i>	NM_013693	mTNF $\alpha$ _1	CCAGACCCTCACACTCAGAT	55	60	213
		mTNF $\alpha$ _2	TGTCCCTTGAAGAGAACCTG			
<i>tlr2</i>	NM_011905	mTLR2_1	AGCTCTTTGGCTCTT	47	60	959
		mTLR2_2	AGAACTGGGGGATATGC			
<i>tlr4</i>	NM_021297	mTLR4_1	GCATGGCTTACACCACCTCT	55	60	997
		mTLR4_2	GTGCTGAAAATCCAGGTGCT			
<i>tlr5</i>	NM_016928	mTLR5_3	AACATATCCACCGAAGACTG	55	60	495
		mTLR5_4	GAGAATGCTCTTGAGGTCAG			
<i>nod1</i>	NM_172729	mNOD1_1	ACAACCTCAATGACTATGGC	53	60	558
		mNOD1_2	GTAGCGTCTGGTTCACTCTC			
<i>nod2</i>	NM_145857	mNOD2_1	TCTTCAACAACAAACTCACG	51	60	321
		mNOD2_2	GTGACTTGTTCTTCTCCAGC			
<i>tollip</i>	NM_023764	nTollip_1	GACGAGTGGTATAGCCTGAG	51	60	380
		mTollip_2	TAGGACTCTTCACCCATTTG			
<i>cd14</i>	NM_009841	mCD14_1	CTGATCTCAGCCCTCTGTCC	57	60	454
		mCD14_2	GCAAAGCCAGAGTTCCTGAC			
<i>traf6</i>	NM_009424	mTraf6_1	AGATCCAGGGCTACGATGTG	57	60	365
		mTraf6_2	CTGGCACTTCTGGAAAGGAC			

<i>lbp</i>	NM_008489	mLBP_1	TTTAATCGGAATCACCGCTC	53	60	502
		mLBP_2	ATATGCCGACTTTGGATTCCG			

**Tab. 9. Oligonukleotide für die Herstellung und Kontrolle von Mutanten in *H. hepaticus*.** Großgeschriebene Sequenzabschnitte sind homolog zu Sequenzen im Genom von *H. hepaticus* ATCC 51449, unterstrichene Sequenzabschnitte weisen die angegebene Restriktionsschnittstelle auf.

Name	Sequenz (5'-3')	Anlagerungstemperatur [°C]	Restriktionsschnittstelle	Verwendung
hep1P1fw	<u>cg</u> gggtaccTGTGGCTCATAAGGAGATCG	55	KpnI	Deletion der ORFs HH250-HH268 der HHG11-Insel
hep1P1rv	gga <u>ag</u> atctATACCATTATACCAAGCGACC	55	BglII	
hep1P2fw	gga <u>ag</u> atctTAACAGGAGTGGTAACACGG	55	BglII	
hep1P2rv	<u>cg</u> gggtaccAGCAGGTGCATTGCCATTCC	57	KpnI	
HH_ICMF_1	<u>ccc</u> ggtaccTATCGGAAGCAATCTCAATGC	55	BamHI	Deletion von HH252 ( <i>icmF</i> - und <i>virB10</i> -Homolog)
HH_ICMF_2	<u>ccc</u> ggtaccTGCTATATCGGAGGGTATGG	55	BamHI	
HH_ICMF_3	ggg <u>ag</u> atctCTTGGATTCTTGTTAATGCGC	55	BglII	
HH_ICMF_4	ggg <u>ag</u> atctCACCTGCTCAAATACAGGC	55	BglII	
HHVirB4_1	<u>ccc</u> ggtaccTATCTGTAAGGCGATTAAGCC	55	BamHI	Deletion von HH260 ( <i>virB4</i> -Homolog)
HHVirB4_2	<u>ccc</u> ggtaccCTTCTAGTGGTGGCAGTGG	55	BamHI	
HHVirB4_3	ggg <u>ag</u> atctCAATCCTGTTTGATAAGGTCC	55	BglII	
HHVirB4_4	ggg <u>ag</u> atctTAAGCCACTACCTAGAATTCC	55	BglII	
HhFliA-1	ttagg <u>at</u> ccGGATTGACATTTTCCATTACC	53	BamHI	Deletion von HH1146 ( <i>fliA</i> )
HhFliA-2	tatg <u>at</u> ccTCTATATCAGCAGTATCGC	49	BamHI	
HhFliA-3	aatag <u>at</u> ctCAAGCATTGCTCCATTCACTCG	61	BglII	
HhFliA-4	ataag <u>at</u> ctGTCCTTTCTCGTGCTAATCG	55	BglII	
pcat-1	aacagctatgaccatgattacg	57	-	Amplifikation der Chloramphenicol-Resistenzkassette
pcat-2	agagg <u>at</u> ccgatatcgcatgcctgcagag	57	BamHI	
cat_fw	atcatgccgtttgtgacggc	57	-	Überprüfen der Insertionsrichtung
cat_rv	gacattcccattcgttcacc	55	-	
FlaA_intern	GACCTTGGTTCTGTATCTGG	55	-	Bestimmung des mutierten <i>fliA</i> -Genes
FlaA_repeat1	GTGATAAGTCTAGCAAGTGC	53	-	
FlaA_repeat2	CTTGAAGAGGAGGAATACCC	55	-	

Tab. 10. Oligonukleotide für die Multilocussequenzanalyse.

ORF-Nummer	Genname	Oligonukleotidname	Sequenz [5' 3']	Anlagerungstemperatur [°C]	Sequenzlänge [bp]
HH0427	<i>atpa</i>	hh_atpa_fw	CTGATGAAAGTGCCAGTAGG	57	802
		hh_atpa_rv	AATCCCACGTTAATGGCAGG		
HH0108	<i>efp</i>	hh_efp_fw	GGAGCGTATATGGCAATTGG	53	566
		hh_efp_rv	GACTTTTTCAAGATATTCGCCTG		
HH1242	<i>muty</i>	hh_muty_fw	AGAGTATATCTTCCGTGGCG	55	551
		hh_muty_rv	AGTTCTGGAGTGATTTGCC		
HH1848	<i>ppa</i>	hh_ppa_fw	GTAGAATCTTTTGGTATAATCGC	57	664
		hh_ppa_rv	ATACGCACTGCAATTTGCC		
HH0002	<i>trpc</i>	hh_trpc_fw	GCTCTTCACCATCAGCTGG	55	633
		hh_trpc_rv	TTGCCAAGTGTGAAAGCGTG		
HH0409	<i>urei</i>	hh_urei_fw	CACACCCATTGAAGTGAATCC	57	719
		hh_urei_rv	GTCATACCAAGCTATTTGCAC		
HH1539	<i>yphc</i>	hh_yphc_fw	ATTTGCAAGGGGTTTTAAGCG	55	762
		hh_yphc_rv	TTGCCTACATTTACGCGTCC		

Tab. 11. Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation einzelner Gene von *H. hepaticus* zur Überprüfung der Microarrayergebnisse der Stammvergleiche.

ORF-Nummer	Oligonukleotidname	Sequenz [5' 3']	Anlagerungstemperatur [°C]	Größe des Produktes [bp]
HH0043	HH43_1	TTTCATCTGGCACACCTTCC	55	803
	HH43_2	GCGATAGGGGTATTCCACG		
HH0082	HH82_1	GGAGCTTCTCTTGTATGCC	57	461
	HH82_2	TACAACCCTGCATTTTGCACC		
HH0212	HH212_1	ACGCAGATTCTAAAGATGCG	55	402
	HH212_2	CCTGTTTGATCTGCTACCC		
HH0232	HH232_1	CTAAATGGCTCATCAACCGC	55	515
	HH232_2	ATCAAGTGCGCCAATTGTGC		
HH0236	HH236_1	ATCACTTAGATTGACATAGAGC	55	499
	HH236_2	ATAATCCAAACAATGCAACTCG		

Material

---

HH0246	HH246_1	GTTACTATAGAGGACGAGCG	55	568
	HH246_2	TTAGGAGCAGCTACCATAGC		
HH0251	HH251_1	GATTTTACACTTGACCTTGCC	55	524
	HH251_2	TGCTCTTGATGATTGAGGGC		
HH0261	HH261_1	CCTTCAAATCAATGTAGTGGG	55	510
	HH261_1	TATCCTACAAGTTATCGTGCC		
HH0269	HH269_1	GGCTTCAGTAACTCTATTGCC	55	485
	HH269_2	CGTGCCATAGATTCTTACCC		
HH0281	HH281_1	TTCTTTAAGCCGTGATTCTGTG	55	460
	HH281_2	TAACAAAAGCGGTGATTGAGG		
HH0284	HH284_1	TTGGGTGGTTTGCTAAAGCC	53	186
	HH284_2	TTTGTTTTATTGGCTATTGTGC		
HH0291	HH291_1	ATCGCTCACTTGAATTGTTGC	55	773
	HH291_2	TACAATCCAAGTAATCCTGCC		
HH0298	HH298_1	GTGTTTGATTAACCTATCCC	55	504
	HH298_2	AAAGAACGGATAACTCATCGC		
HH0303	HH303_1	TCCTAATGCCTCACATTGCC	55	366
	HH303_2	CACAAAGTCATTTGTTGTGCC		
HH0382	HH382_1	AGACTTAAGCTTACTTGGTGC	55	612
	HH382_2	AGACTTAAGCTTACTTGGTGC		
HH0389	HH389_1	CAGGACTACTTTTGCTAACCC	55	541
	HH389_2	GGTTGATGATGAAGTAGGTCG		
HH1039	HH1039_1	CAAGGAGAGTTGATAGAGGC	55	869
	HH1039_2	AACATCTGGGTGTTGTTGGG		
HH1048	HH1048_1	GCCACTATTGCCACAGCG	55	521
	HH1048_2	ATCTATCCGCAATGGCAGGG		
HH1061	HH1061_1	TATGGGAAGAAGACCAGTGG	55	546
	HH1061_2	GGTGAGTTTTAACCTGCGG		
HH1302	HH1302_1	GTTTGCAGGAGTAACTTGGG	55	791
	HH1302_2	CTCTCCCCATTGTTCAAGCG		
HH1420	HH1420_1	ATTTTCCCGCAGGAAAGGGC	55	698
	HH1420_1	AATTGCGGAATTATGTTGCC		
HH1432	HH1432_1	TCATATCTTAGAAGCAAGCGG	55	400
	HH1432_2	ACAATGCGTTTGACTTCGGC		
HH1471	HH1471_1	TTATCGCCACATTGACACTGC	55	624
	HH1471_2	AATGTGAAATCCACCTGCGC		
HH1841	HH1841_1	AATGTCTTGGCATTATGCAGG	55	250
	HH1841_2	TTTGACATCTCCGAAGCAGC		

### **3 Methoden**

#### **3.1 Anzucht von *H. hepaticus* und *E. coli***

##### **3.1.1 Anzucht auf festen Medien**

###### **3.1.1.1 *H. hepaticus***

*H. hepaticus*-Stämme bzw. -Mutanten wurden als Dauerkulturen in Cryoröhrchen bei –80 °C gelagert. Zur Inokulation wurden etwa 100 µl einer angetauten Einfrierkultur auf eine Blutagarplatte mit Zusatz von 4 mg/l Amphotericin B, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim und 3,2 mg/l Polymyxin B aufgetropft. Bei der Kultivierung von Mutanten wurde außerdem 10 mg/l Chloramphenicol zugegeben. Die Platten wurden in einem Anaerobiertopf bei 37 °C unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Die mikroaerophilen Bedingungen wurden erzeugt, indem die Luft durch viermaliges Evakuieren auf –0,2 bar und dem Hinzufügen eines Gasgemisches bis 0,2 bar bestehend aus 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> und 80% N<sub>2</sub> ausgetauscht wurde. Die Bakterien wurden nach ein bis zwei Tagen auf eine neue Platte überimpft, indem etwas Bakterienmaterial mit einer Impföse (Ø 5mm) von der alten Platte abgenommen und auf einer neuen Platte verteilt wurde.

###### **3.1.1.2 *E. coli***

*E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agarplatten (10 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Agarose) unter aeroben Bedingungen bei 37°C in einem Inkubator angezüchtet. Je nach Resistenz wurden zur Selektion Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben: 200 mg/l Ampicillin, 10 mg/l Chloramphenicol. Falls möglich wurde eine „Blau-Weiß“-Selektion durch Zugabe von IPTG und X-Gal durchgeführt.

##### **3.1.2 Anzucht in Flüssigmedien**

###### **3.1.2.1 *H. hepaticus***

Zum Animpfen einer Flüssigkultur von *H. hepaticus* wurden als Ausgangsmaterial Bakterien verwendet, welche für 16-24 h auf einer Blutagarplatte gewachsen waren. Anschließend wurden die Bakterien in 5 ml Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI) mit oder ohne Antibiotikazusatz mit Hilfe eines Wattetupfers eingerieben. Die OD<sub>600</sub> dieser Vorkultur wurde durch ein Photometer (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt und daraus die Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,05-0,07 angeimpft. Die Kultur erfolgte in sterilen Erlenmeyerkolben in einem Anaerobiertopf unter mikroaerophilen Bedingungen wie unter Punkt 3.1.1.1 beschrieben bei 37 °C in einem Schüttelinkubator.

### 3.1.2.2 *E. coli*

Die Flüssigkultur von *E. coli* erfolgte in LB-Medium mit oder ohne Antibiotikazusatz. Die Suspension wurde je nach Kulturmenge in Reagenzglasröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 37 °C in einem Schüttelinkubator für 16-24 h inkubiert.

## 3.2 Zellkultur

Die Zellen wurden zur Anzucht aus einer Einfrierkultur aufgetaut und das komplette Aliquot in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben, in welches 20 ml Medium wie in Tab. 12 beschrieben vorgelegt wurde. Die Zellen wurden in einem Inkubator unter 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 bis 4 Tagen wurden die Zellen in eine neue Kulturschale überimpft. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend von der Kulturschale abgelöst. Dies geschah mit Hilfe von Trypsin-EDTA (Invitrogen) oder durch Abschaben der Zellen. Beim Ablösen mit Trypsin wurden 2-5 ml Trypsin-EDTA zu den Zellen zugegeben und die Kulturschale für etwa 5 min im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurden etwa 5 ml Medium zum Inaktivieren des Trypsins zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren eine homogene Zellsuspension hergestellt. 5-10% dieser Zellsuspension wurde in eine neue Kulturschale gegeben, in welche je nach Größe der Kulturschale 7-35 ml Medium vorgelegt wurde.

**Tab. 12. Anzuchtbedingungen der verwendeten Zelllinien.**

Zelllinie	Ablösmethode	Medium	Ursprung
J774	Trypsin	D-MEM + 10% FCS	Murine Makrophagen von einer Balb/C-Maus
NCTC Klon 1469	Abschaben	NCTC 138 + 10% FCS	Hepatozytenzelllinie von einer C3H/An-Maus
m-IC <sub>cl2</sub>	Trypsin	D-MEM/HAMs F12 mit Zusätzen <sup>#</sup>	Caecumcrypten von einer L-PK/ TAG1-Maus
Hepa 1c1c7	Trypsin	α-MEM + 10% FCS	Hepatozytenzelllinie von einer C57L-Maus
Caco2	Trypsin	D-MEM + 10% FCS	Humane Kolonepithelzelllinie aus einem Adenokarzinom

<sup>#</sup>Zusätze für m-IC<sub>cl2</sub>: 5 µg/ml Insulin, 50 nM Dexamethason, 60 nM Selenium, 5 µg/ml Transferrin, 1 nM Triiodothyronin, 10 ng/ml EGF, 20 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 2% FCS, 0,224% D-Glukose.

### 3.2.1 Koinkubation von Zellen mit *H. hepaticus* und Einzelliganden

Die Zellen wurden in einer geeigneten Konzentration ausgesät. Dazu wurden für J774, m-IC<sub>cl2</sub> und Caco2 in 6-well-Platten 10<sup>5</sup>, in 24-well-Platten 10<sup>6</sup> und in 96-well-Platten 2x10<sup>4</sup> Zellen ausgesät. Für NCTC Klon 1469 wurde jeweils die doppelte Menge ausgesät. Die Zellen wurden von der Zellkulturschale abgelöst und anschließend durch Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium gelöst. Anschließend wurde die Zelldichte mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt und berechnet, welches Volumen dieser Zellsuspension der gewünschten Zellzahl entspricht.

Diese Menge wurde in die einzelnen Wells der Platten gegeben, in welche zuvor 1 ml (24-well-Platte), 4 ml (6-well-Platte) oder 100  $\mu$ l (96-well-Platte) Medium vorgelegt wurden.

Die Koinkubation erfolgte für J774 und NCTC Klon 1469 meist am nächsten Tag in der exponentiellen Wachstumsphase, während m-IC<sub>cl2</sub> und Caco2 fünf bis acht Tage bis zur Ausbildung eines Monolayers inkubiert wurden. Bei einer Koinkubation mit lebenden Bakterien wurden diese, falls nicht anders angegeben, ein Tag auf einer Blutagarplatte inkubiert und dann in PBS oder Medium eingerieben. Anschließend wurde die Bakteriendichte bestimmt, indem die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen wurde. Dabei entspricht einer optischen Dichte von 1 eine Bakteriendichte von  $10^9$  Bakterien pro Milliliter. Anschließend wurde errechnet, wie viel Volumen benötigt wird, um die Zellen mit der in dem Experiment vorgesehenen Bakterienzahl zu infizieren. Diese Menge wurde zu den Zellen zugegeben, nachdem die Zellen zuvor dreimal mit Medium gewaschen wurden. Die Bakterien wurden sedimentiert, indem die Zellkulturplatten bei 200 g für 3 Minuten zentrifugiert wurden.

Für die Koinkubation mit Einzelfaktoren oder Lysaten wurden die Zellen analog vorbehandelt und dann mit der jeweils vorgesehenen Menge an Substrat koinkubiert. Für Inhibitionsversuche wurde das inhibierende Agens (lebende *H. hepaticus* oder *H. hepaticus*-Lysat oder -LPS), falls nicht anders angegeben, 30 Minuten vor dem stimulierenden Agens auf die Zellen gegeben und während der Koinkubation beibehalten.

Nach der in dem Experiment vorgesehenen Zeit wurden die Zellen und/oder das Medium abgeerntet. Dazu wurde das Medium in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten bei 18.000 g zentrifugiert, um noch vorhandene Bakterien- oder Zellreste zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung weggefroren. Die Zellen wurden gewonnen, indem sie zuerst einmal mit Medium gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden 1 Minute bei 18.000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung weggefroren.

### **3.2.2 Immunfluoreszenz**

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben in 24-Well-Platten auf mit  $3\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$  Rattenschwanzkollagen beschichteten runden 12 mm Deckgläschen ausgesät. Die Infektion mit den Bakterien erfolgte ebenfalls wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Nach der experimentell vorgesehenen Koinkubationszeit wurden nichtadhärente Bakterien durch dreimaliges Waschen mit 1 ml PBS entfernt und eine Immunfärbung nach folgendem Protokoll durchgeführt:



## Methoden

---

Fixieren	2% Paraformaldehyd in PBS oder 0,1 M KPO <sub>4</sub> pH 7,0	mindestens 2 h
Waschen	PBS	3-mal
Permeabilisieren	0,1% Saponin in PBS	15 Minuten
Waschen	PBS	3-mal
Abblocken	Blockpuffer (1% Pferdeserum, 1% BSA in PBS)	30 Minuten
1. Antikörper	<i>H. hepaticus</i> -Antiserum 1:1.000 in Blockpuffer	1 h
Waschen	PBS	3-mal
2. Antikörper	Ziege anti Kaninchen IgG gekoppelt mit Alexa-Fluor <sup>488</sup> (Molecular Probes) 1:5.000 in Blockpuffer	1 h
Waschen	PBS	3-mal
Aktinanfärbung	Texas-Red-X-Phalloidin 1:1.000 in Blockpuffer	30 Minuten
<b>oder</b>		
Glykananfärbung	Weizenkeimagglutinin 1:1.000 in Blockpuffer	30 Minuten
Waschen	PBS	3-mal
DNA-Anfärbung	DAPI 1:5.000 in PBS	15 Minuten
Waschen	PBS	3-mal

Danach wurden die Präparate mit MOWIOL-488 mit 2,5% Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) auf Objektträgern montiert und nach dem Trocknen mit Klarsichtnagellack abgedichtet.

### 3.2.3 Hochdurchsatzadhärenzassay

Die Zellen wurden wie in Punkt 3.2.1 beschrieben in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit *H. hepaticus* infiziert. Nach der vorgesehenen Koinkubationszeit wurden nichtadhärente Bakterien durch vorsichtiges dreimaliges Waschen mit 200 µl PBS entfernt und die adhären-ten Bakterien nach folgendem Protokoll angefärbt:

Fixieren	2% Paraformaldehyd in 0,1 M KPO <sub>4</sub> pH 7,0	mindestens 2 h
Waschen	Waschpuffer (0,05% TWEEN-20 in PBS pH 7,0)	3-mal
Blocken	Blockpuffer (10% FCS in PBS pH 7,0)	1 h
Waschen	Waschpuffer	3-mal
1. Antikörper	<i>H. hepaticus</i> Antiserum 1:500 in Blockpuffer	1 h
Waschen	Waschpuffer	5-mal

2. Antikörper	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase gekoppelt 1:10.000 in Blockpuffer	1 h
Waschen	Waschpuffer	7-mal
Anfärben	100 µl TMB-Substrat	30 Minuten

Die Reaktion wurde mit 50 µl 1 M Phosphorsäure abgestoppt und die Platte in einem Multiskan Multiwell-Spektrometer bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm eingelesen.

### 3.2.4 Bestimmung der Adhärenz durch Ausplattieren

Die Zellen wurden wie in Punkt 3.2.1 beschrieben in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit *H. hepaticus* infiziert. Nach der vorgesehenen Koinkubationszeit wurden nichtadhärente Bakterien durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit den adhärennten Bakterien durch Abschaben abgeerntet. Ein Teil der Probe wurde zur Bestimmung der Zelldichte in einer Zählkammer benutzt und der Rest wurde mit 0,1% Saponin für 15 Minuten lysiert. Das Lysat mit den Bakterien wurde in geeigneter Verdünnung auf Blutagarplatten ausplattiert und wie in Punkt 3.1.1.1 beschrieben für 3-5 Tage bis zum Erscheinen von Einzelkolonien kultiviert. Die Kolonien wurden ausgezählt und die Anzahl an Bakterien pro Zelle berechnet.

### 3.2.5 Cytotoxizitätsassay

Die Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten wie in Punkt 3.2.1 beschrieben ausgesät und mit *H. hepaticus* infiziert. Nach der experimentell vorgesehenen Koinkubationsdauer wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und der Anteil an physiologisch nicht mehr aktiven Zellen mit dem Live/Dead Viability /Cytotoxicity Kit von Molecular Probes bestimmt. Dafür wurden 4 µM Calcein-AM und 2 µM Ethidiumhomodimer 1 zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Für 30 Minuten in 70% Methanol fixierte Zellen wurden als Kontrolle für komplett abgetötete Zellen benutzt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 538 nm ( $F_{530}$ ) beziehungsweise einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 650 nm ( $F_{645}$ ) bestimmt. Der Anteil an lebenden Zellen wurde nach der Formel  $(F_{530} \text{ Probe} - F_{530} \text{ min}) / (F_{530} \text{ max} - F_{530} \text{ min})$  berechnet, wobei  $F_{530} \text{ Probe}$  den Wert der behandelten Zellen,  $F_{530} \text{ max}$  den Wert unbehandelter Zellen, welche nur mit Calcein-AM und  $F_{530} \text{ min}$  den Wert unbehandelter Zellen, welche nur mit Ethidiumhomodimer-1 markiert wurden, darstellt. Der Anteil toter Zellen wurde nach der Formel  $(F_{645} \text{ Probe} - F_{645} \text{ min}) / (F_{645} \text{ max} - F_{645} \text{ min})$ , wobei  $F_{645} \text{ Probe}$  für den Wert der behandelten Zellen,  $F_{645} \text{ max}$  für den Wert mit Ethidiumhomodimer-1 markierter abgetöteter Zellen und  $F_{645} \text{ min}$  für den Wert mit Calcein-AM markierter abgetöteter Zellen steht.

### **3.3 Isolierung von DNA**

#### **3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Präparation kleinerer Mengen wurde eine Minipräparation durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur bei 18.000 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und in 100 µl Lösung 1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 100 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl eiskalter Lösung 2 (0,2 N NaOH; 1% SDS) zugegeben, gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat; 11,5% Essigsäure) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen durch Invertieren weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine, Lipide und chromosomale DNA wurden 5 Minuten bei 18.000 g abzentrifugiert. Aus dem Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthält, wurden noch vorhandene Proteine durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion extrahiert. Dazu wurde der Überstand mit einer Volumeneinheit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und anschließend für 5 min bei 18.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit 2 Volumen Ethanol (reinst, 96% [v/v]) gefällt. Nach Zentrifugation bei 18.000 g und 4 °C für 30 Minuten wurde der Überstand abgegossen und die DNA nochmals mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 18.000 g und 4 °C für 5 min wurde der Überstand abgegossen, das Pellet im Vakuum getrocknet und die DNA in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 10 µg/ml RNase gelöst.

Zur Präparation von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab wurden die Bakterien aus einer 50 ml Übernachtskultur für 15 Minuten bei 5.000 g und 4°C pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde daraus mit dem Qiagen® Plasmid Midi-Kit isoliert und in TE-Puffer (pH 7,5) gelöst.

#### **3.3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. hepaticus***

Zur Gewinnung kleinerer Mengen von chromosomaler DNA wurde das DNAeasy Tissue Kit von Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte aus dem Zellrasen von maximal einer halben Blutagarplatte. Die Bakterien wurden in physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) eingerieben und für 5 Minuten bei 18.000 g abzentrifugiert. Die weitere Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurde das Qiagen Genomic Tip100-Kit verwendet. Dazu wurde der Zellrasen von etwa 2 Platten in physiologische Kochsalzlösung eingerieben und für 15 Minuten bei 5.000 g abzentrifugiert. Die weitere Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Qualität durch Auftrennung der DNA auf einem 0,8% Agarosegel überprüft.

### **3.4 RNA-Aufreinigung**

#### **3.4.1 RNA-Aufreinigung aus eukaryontischen Zellen**

Zur Aufreinigung von RNA aus Zellkulturzellen wurden Zellpellets verwendet, welche wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben gewonnen wurden. Die Zellen wurden durch RNase-freie Glaskügelchen (Lysing Matrix D, Qbiogene, Illkirch, Frankreich) in einem „Bead-Beater“ (FP120, Savant, New York, USA) aufgeschlossen und die Gesamt-RNA durch ein modifiziertes Protokoll mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Dazu wurden die Zellen in 750 µl RLT+β-Mercaptoethanol resuspendiert und in den Zellaufschlussröhrchen im „Bead-Beater“ aufgeschlossen (45 sec bei Stärke 6,5). Die Röhrchen wurden für 2 min bei 18.000 g zentrifugiert und der Überstand (etwa 700 µl) mit 700 µl 70% Ethanol versetzt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy-Kit nach Herstellerangaben. Die RNA wurde mit 2 mal 45 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Noch vorhandene genomische DNA wurde mit DNaseI verdaut (Roche, 10 U/µl). Die eluierte RNA wurde dazu mit 10 µl 10 x DNaseI-Puffer (1 M Na-Acetat, 50 mM MgSO<sub>4</sub> pH 5,0) und 2 µl DNaseI gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde durch eine PCR mit den Primern mGAPDH\_1 und mGAPDH\_2 kontrolliert. Die RNA wurde mit dem RNeasy-Kit nach Herstellerangaben nochmals aufgereinigt und mit 30-100 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Integrität der RNA wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt.

#### **3.4.2 RNA-Aufreinigung aus *H. hepaticus***

Die Aufreinigung der RNA war identisch zur Aufreinigung aus eukaryontischen Zellen abgesehen von folgenden Modifikationen: Maximal  $1 \times 10^{10}$  Zellen wurden in RLT+β-Mercaptoethanol aufgenommen und mit Lysing Matrix B-Röhrchen (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) in einem Bead-Beater (FP120, Savant, New York, USA) für 45 sec bei Stärke 6,5 aufgeschlossen. Die weitere Aufreinigung und Behandlung der RNA erfolgte wie unter Punkt 3.4.1 beschrieben.

### **3.5 Polymerasenkettenreaktion (PCR)**

#### **3.5.1 Standard-PCR**

Für eine Standard-PCR wurde als Template etwa 10 ng chromosomale DNA beziehungsweise etwa 1 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Primerkonzentration lag bei 0,2 pmol/µl und die Hybridisierungstemperatur wurde nach folgender Formel berechnet wurde:  $[2x(A+T)+4x(G+C)]-5$ . Bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen für die beiden Primer wurde im Allgemeinen die niedrigere Temperatur verwendet. Als Elongationszeit wurde eine Minute pro 1 kb Produktlänge verwendet. Meist wurde die Pharmacia-*Taq*-DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) benutzt. Auf Eis wurden folgende Komponenten beispielhaft für eine PCR mit 50 µl Reaktionsvolumen zusammengefügt:

10 x PCR-Puffer	5 µl
1,25 mM dNTPs	8 µl
Primer 1 (4 µM)	2,5 µl
Primer 2 (4 µM)	2,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 45 µl
DNA-Matrize	5 µl

In einem Thermocycler (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde die Reaktion folgenden Zyklen unterworfen:

5 min bei 94 °C

1 min bei 94 °C

1 min bei x °C (abhängig von der Schmelztemperatur der Primer)

x min bei 72 °C (abhängig von der Länge des gewünschten Produkts)

7 min bei 72 °C

} 30 Zyklen

Die PCR-Reaktionen wurden gelelektrophoretisch überprüft und, falls notwendig, die Stringenz durch Erhöhen der Annealingtemperatur oder Verkürzen der Elongationszeit erhöht. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte durch QiaQuick-Spin-Säulen (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

### 3.5.2 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung wurde ungefähr 100 ng PCR-Produkt, welches mit dem Qiagen PCR-Purification-Kit aufgereinigt wurde oder 400 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 7,5 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben und 0,5 µl des Sequenzier-Primers (4 pmol/µl) dazupipettiert. Die Sequenzierung wurde im DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie auf einem ABI-Sequenzierer nach der Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Es wurde das „Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet, jedoch nur mit 25% der vorgeschriebenen Reaktionsvolumina.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas 1.45 visualisiert und die Auswertung erfolgte für die meisten Anwendungen mit den Programmen EditSeq, MapDraw und MegAlign aus der Lasergene-Sequenzanalyse-Software (DNASStar, Madison, Wisconsin, USA).

Für die Analyse von umfangreicheren Sequenzdatensätzen wurde die STADEN-Software über einen UNIX-Server am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin verwendet. Die Qualität der Sequenzen wurde mit dem PEARL-Script QualityClip beurteilt und die Sequenzen in die Dateiformate \*.exp und \*.scg umgewandelt. Zusammengehörende Sequenzen wurden in einer neuen Datei zusammengefasst (\*.explist) und mit dem

Programm GAP4 ein Contig erzeugt. Bearbeitete Sequenzen wurden in dem gcg-Format abgespeichert und in das Programm SeqLab eingeladen. Mit diesem Programm konnten unter anderem multiple Sequenzvergleiche und Übersetzungen der DNA-Sequenz in eine Proteinsequenz durchgeführt werden.

### 3.5.3 Semiquantitative reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) von eukaryontischer RNA

Eine semiquantitative RT-PCR unterteilt sich in zwei Schritte: Umschreiben von mRNA in cDNA und eine PCR von dieser cDNA. Im Gegensatz zu einer quantitativen PCR (z.B. mit Lightcycler oder Taqman) kann man mit einer semiquantitativen RT-PCR die Änderung der Transkriptmenge eines Genes qualitativ beurteilen, jedoch nicht exakt quantifizieren.

Zur Umschreibung von eukaryontischer mRNA in cDNA wurden als Primer Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Nukleotide verwendet, welche sich spezifisch an den poly-A-Schwanz von eukaryontischer mRNA anlagern.

#### cDNA-Synthese:

Oligo(dT) <sub>12-18</sub> -Primer (0,5 µg/µl, Invitrogen)	1 µl
Gesamt-RNA	1 µg
ddH <sub>2</sub> O	ad 11 µl
10 min, 65°C (Denaturierung)	
10 min, RT (Anlagerung der Primer an die mRNA)	
5 x RT-Puffer (Invitrogen)	4 µl
0,1 M DTT (Invitrogen)	2 µl
dNTPs (1,25 mM)	1 µl
RNase-Out (Invitrogen)	1 µl
Superscript II (200 U, Invitrogen)	1 µl
2h, 42°C (Reverse Transkription der mRNA)	
15 min, 75°C (Inaktivierung des Enzyms)	
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Von dieser cDNA wurden 2,5 µl für eine Standard-PCR eingesetzt (siehe Punkt 3.5.3). Die Zyklenzahl wurde dabei so gewählt, dass die Produktmenge noch im linearen Bereich in Anhängigkeit der Ausgangsmenge liegt, jedoch schon mittels Agarosegelelektrophorese detektierbar ist.

### 3.6 Microarray-Hybridisierung mit genomischer DNA

13 *H. hepaticus*-Stämme wurden auf ihre genomische Zusammensetzung untersucht. Dazu wurde eine kompetitive Hybridisierung auf einem MWG *H. hepaticus* array<sup>®</sup> (MWG Biotech) durchgeführt. Es wurde jeweils 3B1 als Referenzstamm gegen einen zu testenden unbe-

kannten Stamm hybridisiert. Auf diesem Slide sind 50 Basenpaare lange Oligonukleotide aufgebracht, welche die Detektierung von 1863 von 1875 offenen Leserahmen von *H. hepaticus* ATCC 51449 ermöglichen.

### 3.6.1 Markieren der genomischen DNA mit Cy-Farbstoffen

Die genomische DNA, welche über eine genomische TIP-100-Säule aufgereinigt wurde (siehe Punkt 3.3.2), wurde mit dem BioPrime DNA Labeling System (Invitrogen) mit Aminoallyl-dUTP markiert:

#### Aminoallyl-Markierung der genomischen DNA:

genomische DNA	1 µg
Random Primer	20 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 44 µl

5 min, 99 °C (Denaturieren der DNA)

5 min auf Eis (Anlagern der Random Primer an die DNA)

dNTP-Mix	5 µl
(0,5 mM dGTP, dATP und dCTP, 0,3 mM dTTP, 0,2 mM Aminoallyl-dUTP)	
Klenow-Fragment	1 µl

1h, 37 °C (Amplifikation der DNA und Einbau von Aminoallyl-dUTP in die Amplifikate)

Stop-Lösung	5 µl
-------------	------

Die Reaktionslösung wurde anschließend mit dem PCR-Aufreinigungssystem (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben mit folgenden Ausnahmen: Für die Waschschrte wurde anstelle des PE-Puffers ein eigens hergestellter Waschpuffer verwendet (5 mM Phosphatpuffer, pH 8,0, 80% Ethanol) und eluiert wurde mit zweimal 30 µl Phosphat-Elutionspuffer (4 mM Phosphatpuffer, pH 8,5). Die markierte DNA wurde in einer Speed-Vac getrocknet und anschließend mit Cy-Farbstoffen markiert. Dabei wurde die DNA des Referenzstamm (3B1) entweder mit Cy<sub>3</sub> oder Cy<sub>5</sub> und die DNA des zu testenden Stammes entsprechend mit dem anderen Cy-Farbstoff markiert.

Die getrocknete DNA wurde in 4,5 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit 62,5 µg Cy-Farbstoffen (Amersham) gelöst in 4,5 µl Natriumbikarbonat pH 9,0 gemischt. Die Reaktion wurde für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 4,5 µl 4 M Hydroxylamin gequentscht und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit dem PCR-Aufreinigungssystem (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt, wobei die Elution mit zweimal 30 µl ddH<sub>2</sub>O erfolgte. Nachdem die zusammengehörigen Cy<sub>3</sub> und Cy<sub>5</sub>-markierten Proben vereinigt wurden, wurde 1 µl Hefe-tRNA (1 µg/µl) zugegeben und die Probe in einer Speed-Vac getrocknet. Die Probe wurde anschließend bis zur Hybridisierung bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt.

### **3.6.2 Hybridisierung auf dem *H. hepaticus*-Gesamtgenommicroarray**

Vor der Hybridisierung wurde der Slide für 1 h bei 42 °C abgeblockt (4 x SSC, 0,1% SDS, 1% BSA) und anschließend fünfmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Der Slide wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 200 g in einem 50 ml Röhrchen getrocknet.

Die vorbereiteten Proben wurden in 25 µl Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 6 x SSC, 0,5% SDS, 50 mM Natriumphosphat pH 8,0, 5 x Denhardts-Lösung) gelöst und für 2 min bei 99°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben luftblasenfrei auf die mit Oligonukleotiden gespottete Fläche aufgebracht und mit einem staubfreien Deckgläschen bedeckt. Die Arrays wurden in einer feuchten Hybridisierungskammer (Corning Microarray Technology, USA) für 16-20 h bei 42 °C inkubiert. Abschließend wurden die Slides vier Waschschritten zu je fünf Minuten unterzogen (2 x SSC, 0,1% SDS; 1 x SSC, 0,1% SDS; 2 x 0,5 x SSC) und anschließend durch Zentrifugation bei 200 g für 5 min in einem 50 ml Röhrchen getrocknet. Die Slides wurden bis zur weiteren Auswertung lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **3.6.3 Scannen und bioinformatische Auswertung der Microarrays**

Die hybridisierten und gewaschenen Slides wurden mit einem konfokalen Epifluoreszenz-Laserscanner (Affymetrix 418 Array Scanner, Affymetrix, Ca, USA) eingelesen. Die maximale Auflösung dieses Scanners beträgt 10 µm und er verfügt über einen 532 nm (Cy<sub>3</sub>)- und 635 nm (Cy<sub>5</sub>)-Laser. Um unterschiedlich starke Hybridisierungssignale erfassen zu können, wurden beide Kanälen bei mehreren Laserintensitäten eingescannt. Die Bilder wurden im TIFF-Format abgespeichert.

Zur Analyse der Bilder wurde das Programm ImaGene 5.5 (BioDiscovery, USA) mit folgenden Einstellungen verwendet: Segmentation Method Fixed Circle; Signal Low 0,65; Signal High 0,95; Background Low 0,05; Background High 0,95; Background Buffer 3,0; Background Width 3,0; Empty Spots Threshold 3,0.

Die dabei erzeugten Rohdaten wurden abgespeichert und mit dem Programm MAVI 2.3 (MWG Biotech AG, Ebersberg) weiter analysiert. Die Normalisierung erfolgte mittels einer LOWESS-Normalisierung für kompetitive Hybridisierungen. Die weitere Analyse der Signalratios erfolgte mit MS Excel. Spots mit einer zu niedrigen Intensität wurden, falls diese nicht schon automatisch durch IMAGENE automatisch erkannt wurden, manuell ausgefiltert. Dabei wurden alle Spots nicht gewertet, bei denen die Summe aus der Cy<sub>3</sub>- und Cy<sub>5</sub>-Gesamtintensität unter 200 lag.

Zur Festlegung des Cut-Offs für fehlende Gene wurde das Programm GACK (Genomotyping Analysis by Charlie Kim, Stanford University, CA, USA, Kim *et al.*, 2002) benutzt. Die in der bisherigen Auswertung erhaltenen Signalratios wurden in logarithmische Werte zur Basis zwei umgewandelt und in das GACK-Programm geladen. Es wurden



folgende Einstellungen verwendet: Data Histogramm Bin Size 0,10; No Smoothing; Peak Modeling Normal Curve; Graded Output.

### 3.7 Microarray-Analysen von eukaryontischer RNA

Zur Untersuchung der Genregulation von eukaryontischen Zellen nach Infektion mit *H. hepaticus* wurden die MWG 10k Mausarrays A und B Slides (MWG Biotech, Ebersberg) verwendet. RNA, welche aus zwei verschiedenen Bedingungen gewonnen wurde, wurde mit Cy<sub>3</sub> beziehungsweise Cy<sub>5</sub> markiert und kompetitiv auf dem Microarray hybridisiert.

#### 3.7.1 Markieren von cDNA mit Cy-Farbstoffen

Um die RNA mit Cy-Farbstoffen zu markieren, wurde die RNA zuerst durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei erfolgte der direkte Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe Cy<sub>5</sub>-dCTP oder Cy<sub>3</sub>-dCTP (Amersham Pharmacia, Freiburg). Es wurde als Ausgangsmaterial 50-100 µg RNA verwendet. Die Markierung erfolgte nach folgendem leicht modifizierten Protokoll von MWG Biotech:

##### cDNA-Synthese und Fluoreszenzmarkierung:

RNA	50-100 µg
Poly-dT <sub>15-18</sub> -Primer (0,5 µg/µl)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20,5 µl
10 min, 65 °C (Denaturierung)	
10 min, RT (Primer-Anlagerung)	
10 min, Eis (Primer-Anlagerung)	
Hinzufügen von:	
5 x SuperScript-Puffer (Invitrogen)	8 µl
0,1 M DTT	4 µl
dNTP-mix (5 mM dATP, dTTP, dGTP, 2 mM dCTP)	1 µl
Cy <sub>3</sub> - bzw. Cy <sub>5</sub> -dCTP (0,5 mM; Amersham)	4 µl
RNAse-Out (RNAse-Inhibitor, Invitrogen)	1 µl
SuperScript II (200 U, Invitrogen)	1,5 µl
1 h, 42 °C (cDNA-Synthese)	
Hinzufügen von:	
SuperScript II (200 U, Invitrogen)	1 µl
1 h, 42 °C (weitere cDNA-Synthese)	
Hinzufügen von:	
1 M NaOH	10 µl
10 min, 65 °C (alkalische Lyse der RNA)	

1 M HCL (Neutralisation)

10 µl

Die Proben wurden anschließend mit PCR-Aufreinigungskolonnen (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit zweimal 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die beiden zusammengehörigen Proben wurden vereinigt, in einer Speed-Vac getrocknet und bei –20 °C im Dunkeln bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

### **3.7.2 Hybridisierung der markierten cDNA auf einem MWG 10k Mausarray**

Die Vorbehandlung der Slides, die Hybridisierung mit der Probe und die Nachbehandlung der Slides erfolgte Analog der Hybridisierung von markierter genomischer DNA auf dem *H. hepaticus*-Gesamtgenommicroarray (siehe Punkt 3.6.2).

### **3.7.3 Bioinformatische Auswertung der hybridisierten MWG 10k Mausarrays**

Die Auswertung erfolgte analog zu Punkt 3.6.3, außer das die finale Auswertung mit dem GACK-Programm wegfiel. Teilweise wurden die Daten mit dem Programm „GoMiner“ weiteranalysiert (Zeeberg *et al.*, 2003). Dazu wurden nach der bioinformatischen Analyse der Microarrays die als induziert und reprimiert identifizierten Gene in Microsoft Excel in eine Liste eingefügt und mit einem Wert von +1 oder –1 als induziert oder reprimiert markiert. Parallel dazu wurde eine Gesamtgenliste erstellt. Die Zuordnung der Gene erfolgte anhand einer Gene Ontology Datenbank. Die weiteren Analysen wurden nach Benutzungsanweisungen des Programms durchgeführt ([http://discover.nci.nih.gov/gominer/gominer\\_quick\\_start.pdf](http://discover.nci.nih.gov/gominer/gominer_quick_start.pdf)).

Clusteranalysen erfolgten mit dem BRB Arraytool (<http://linus.nci.nih.gov/BRBArrayTools.html>) in MS Excel. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Handbuchs zum Programm ([ftp://linus.nci.nih.gov/pub/techreport/Manual\\_v3\\_4\\_0\\_beta\\_1.pdf](ftp://linus.nci.nih.gov/pub/techreport/Manual_v3_4_0_beta_1.pdf)).

## **3.8 Klonierungen**

### **3.8.1 Restriktionsverdau von DNA**

Um PCR-Produkte oder Vektoren einem Restriktionsverdau zu unterziehen, wurde eine bestimmte Menge DNA mit dem gewünschten Restriktionsenzym (von NEB oder Invitrogen) und dem vom Hersteller vorgesehenen Puffer bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Bei Mehrfachverdau wurde der Puffer gewählt, der für beide Enzyme die maximale Effizienz ergibt. Die Menge an Restriktionsenzym wurde so gewählt, dass die Menge an Enzym 10% des Probenvolumens (entspricht 5% Glycerin) nicht überschreitet, da die DNA ansonsten unter Umständen unspezifisch von dem Restriktionsenzym verdaut werden kann (sogenannter Star-Effekt).

### **3.8.2 Aufreinigung der DNA nach einem Restriktionsverdau**

Der komplette Verdau wurde auf einem einprozentigem Agarosegel aufgetragen und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit einem Gelpurifikationskit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **3.8.3 Dephosphorylierung**

Falls ein Vektor nur von einem Enzym verdaut wurde, wurden die endständigen Phosphatreste mit alkaliner Phosphatase abgespalten, da der Vektor ansonsten bei der anschließenden Ligation mit sich selbst ligieren kann. Dazu wurden 40 µl des verdauten Plasmids mit 1 µl One-for-all-Puffer (OPA), 2 µl 1:20 verdünnter CIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase) und 7 µl H<sub>2</sub>O gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 85 °C inaktiviert.

### **3.8.4 Ligation von DNA**

Das mit passenden Restriktionsenzymen verdaute Plasmid und das Insert wurden im Verhältnis 1:3 in einem Reaktionsvolumen von 10 µl zusammengeführt und 2 µl 10 x Quick-Ligation-Puffer und 1 µl Quick-Ligase (NEB, Beverly, MA, USA) dazugegeben. Die Reaktion wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bis zur Transformation in einen *E. coli*-Stamm bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.8.5 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Nach der Ligation wurde *E. coli* mit dem Ligationsansatz transformiert, um anschließend einen Stamm mit dem gewünschten Plasmid unter Selektionsdruck mit einem Antibiotikum zu isolieren. Dabei ist auf dem Plasmid ein Resistenzgen für das verwendete Antibiotikum enthalten, welches jedoch von einem einzelnen Bakterium nur exprimiert werden kann, falls es ein mit einem Insert ligiertes Plasmid enthält. Dazu wurden 10 µl Ligationsansatz mit den angetauten kompetenten Bakterien gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem zweiminütigen Hitzeschock bei 42 °C unterzogen und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Es wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und die Suspension unter Schütteln für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in zwei Verdünnungsschritten auf LB-Agarplatten mit dem gewünschten Selektivantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

### **3.8.6 Transformation zur Herstellung von Mutanten in *H. hepaticus***

Um eine Mutagenese in *H. hepaticus* durchzuführen, wurde eine Kasette konstruiert, welche das Gen für die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) von *Campylobacter coli*

enthält. Dieses verleiht eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol. Flankierend an die CAT-Kassette wurde auf beiden Seiten eine Sequenz kloniert, welche Homolog zu der flankierenden Region des Bereiches ist, in welchen die CAT-Kassette über homologe Rekombination in das Genom von *Helicobacter hepaticus* integrieren soll.

Kompetente Bakterien wurden aus Bakterien hergestellt, welche auf zwei bis drei Blutplatten für 24 h angezogen wurden. Das gesamte Bakterienmaterial wurde in 10 ml Elektroporationspuffer (10% Glycerol in ddH<sub>2</sub>O) eingerieben und bei 5.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut in 10 ml Elektroporationspuffer aufgenommen und nochmals bei 5.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und das Pellet in 0,5-1 ml Elektroporationspuffer (abhängig von der Größe des Pellets) aufgenommen.

Für die Elektroporation wurde 10-25 µg Plasmid-DNA eingesetzt, welche in einer Speed-Vac auf ein Volumen von 10 µl aufkonzentriert wurde. Die DNA wurde mit einem Dialyse-Filter entsalzt. 80 µl der Bakteriensuspension wurden mit 10 µl DNA gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Suspension in eine Elektroporationsküvette (Spaltenbreite 0,1 cm; Biorad) gegeben und in einem Elektroporationsgerät einer Elektroporation mit folgenden Einstellungen unterzogen: Kapazität 25 µF, Spannung 2,5 kV, Widerstand 2.000 Ohm. Die resultierende Zeitkonstante sollte zwischen 4 und 4,5 Sekunden liegen. 500 µl SOC-Medium wurden zu dem elektroporierten Bakterienmaterial gegeben und komplett auf einer Blutagarplatte ohne Selektivantibiotikum ausgestrichen. Nach einer Bebrütung von 24 h wurde das gesamte Bakterienmaterial auf einer Blutagarplatte mit Chloramphenicol ausgestrichen und 3-5 Tage bis zum Erscheinen von Einzelkolonien inkubiert. Die Einzelkolonien wurden auf einer größeren Fläche subkultiviert und nach Erhalten von ausreichend Bakterienmaterial wurden die Bakterien weggefroren und etwas Material für eine Quia-Amp abgenommen (siehe Punkt 3.3.2). Die isolierte genomische DNA wurde durch PCRs mit den jeweils für die erste PCR verwendeten Primern und durch Kombination dieser Primer mit den Primern CAT-fw und CAT-rv und Sequenzierung auf den korrekten Einbau der Chloramphenicol-Kassette überprüft.

### **3.9 Lipopolysaccharide (LPS)**

#### **3.9.1 Aufreinigung von LPS**

Bakterien von 5-25 Platten wurden in 5 ml PBS aufgenommen und bei 10.000 g für 5 min abzentrifugiert (Hynes *et al.*, 2004). Das Pellet wurde in 1-5 ml pyrogenfreiem Wasser gelöst (abhängig von der Menge an Bakterien) und auf 68 °C erhitzt. Das gleiche Volumen 68 °C warmes Phenol wurde dazugegeben und unter mehrmaligem Mischen für 15 min bei 68 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde das Phenol-Wasser-Gemisch für 15 min bei 3.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und zur Phenolphase wurde

nochmals das gleiche Volumen Wasser zugegeben. Die Mischung wurde wiederum 15 min bei 68 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 3.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit der vorherigen wässrigen Phase vereinigt und für 24 h gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde in einer Speed-Vac eingetrocknet, in 100-1000 µl Tris-HCl pH 7,5 versetzt mit 100 µg/ml DNaseI und 100 µg/ml RNaseI gelöst und für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µg/ml Proteinase K zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 h bei 65 °C inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch erneut in einer Speed-Vac eingetrocknet und anschließend in 500 µl bis 2,5 ml 0,2 M NaCl aufgenommen und mit der doppelten Menge 2% Cetavlon gelöst in 0,2 M NaCl versetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 10 Volumen eiskaltem absolutem Ethanol gemischt. Das Gemisch wurde für 30 min bei 4 °C inkubiert und dann bei 20.000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, welches das reine LPS darstellt, in einem geeigneten Volumen Wasser gelöst. Das gelöste LPS wurde 24 h gegen 0,2 M NaCl und danach 2 mal 24 h gegen Wasser dialysiert.

### **3.9.2 Nachweis von LPS durch ein silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel**

Das aufgereinigte LPS wurde auf einem 14% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Punkt 3.10.1) und durch eine Silberfärbung nachgewiesen:

- Fixierung: 40% Ethanol, 5% Essigsäure ü.N.
- Oxidierung: 0,7% Periodsäure, 40% Ethanol, 5% Essigsäure für 5 min
- Waschen: dreimal 20 min in Wasser
- Färben: 6,7% Silbernitrat, 1,3% Ammoniak, 0,017 N Natronlauge für 10 min
- Waschen: dreimal 20 min in Wasser
- Entwickeln: 50 mg/ml Zitronensäure, 0,02% Formaldehyd für ungefähr 5-10 min
- Abstoppen: Waschen in Wasser

## **3.10 Proteinanalyse-Techniken**

### **3.10.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zum Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine analytische SDS-PAGE in Minigelkammern von Biorad mit einer Gelgröße von 100 x 50 x 1 mm durchgeführt. Zuerst wurde das Trenngel (10-14% je nach Proteingröße) bis etwa 2 cm unter dem oberen Rand der Platten gegossen und mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Wasser abgeschüttet, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in die Laufkammer eingespannt, vollständig mit Laufpuffer bedeckt und der Kamm entfernt.

Die Proben wurden mit 5 x Ladepuffer verdünnt und 5 min bei 99 °C denaturiert. Nach dem Laden der Proben erfolgte der Lauf bei 15 mA pro Gel, bis die Lauffront fast den unteren Rand des Gels erreicht hat. Anschließend wurde das Gel entweder für einen Western-Blot verwendet oder mit SimplyBlue-SafeStain (Invitrogen) nach Herstellerangaben gefärbt und in Cellophan, welches zuvor in Packing Solution eingeweicht wurde, getrocknet.

Zusammensetzung des Trenngels mit unterschiedlichen Konzentrationen:

	10%	12%	14%	16%
30% Acrylamid (Roth) [ml]	1,6	1,8	2,2	2,5
2M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	1,2	1,2	1,2	1,2
ddH <sub>2</sub> O [ml]	1,9	1,7	1,3	1,0
10% SDS [µl]	112,5	112,5	112,5	112,5
10% [w/v] Ammoniumpersulfat (APS) [µl]	15	15	15	15
TEMED [µl]	12,5	12,5	12,5	12,5

Zusammensetzung des Sammelgels mit unterschiedlichen Konzentrationen:

	3%	5%
30% Acrylamid (Roth) [ml]	0,25	0,4
0,5M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	0,625	0,625
DdH <sub>2</sub> O [ml]	1,575	1,4
10% SDS [µl]	25	25
10% [w/v] Ammoniumpersulfat (APS) [µl]	15	15
TEMED [µl]	10	10

<b>10 x Laufpuffer:</b>	Tris	30 g (0,25 M)
	Glycin	141 g (1,88 M)
	SDS	1% (w/v)
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml; pH 8,6
<b>5 x Probenpuffer:</b>	Tris-HCl pH 6,8	50 mM
	SDS	2% [w/v]
	2-Mercaptoethanol	5% [w/v]
	Bromphenolblau	0,005% [w/v]
	Glycerol	10% [w/v]
<b>Einpacklösung:</b>	Ethanol	50%
	Glycerol	3%

### **3.11 Proteinkonzentrationsbestimmung**

#### **3.11.1 Proteinkonzentrationsbestimmung durch ELISA**

Die Konzentration einiger Cytokine in Zellkulturüberständen von Zellen wurde durch einen ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) bestimmt. Die Überstände wurden nach einer definierten Zeitspanne abgenommen und bei –20 °C oder –80 °C eingefroren (siehe Punkt 3.2).

Die IL-6-Konzentration wurde mit einem Kit zur Detektion von murinem IL-6 (BD Bioscience) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden, falls notwendig, soweit verdünnt, dass sie im linearen Bereich der Messung lagen. Humanes IL-8 wurde analog dazu mit einem Kit zur Detektion von humanem IL-8 (BD Bioscience) bestimmt.

Die Durchführung der Bestimmung der MIP-2-Konzentration im Überstand erfolgte analog der IL-6-Bestimmung mit folgenden Modifikationen. Als primärer Antikörper wurde ein Antikörper gegen murines MIP-2 (Acris monoclonal goat anti mouse MIP-2 antibody, PP1082P2) mit einer Konzentration von 250 ng/ml verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Antikörper gegen murines MIP-2 (Acris biotinylated monoclonal goat anti mouse MIP-2 antibody, PP1082B2) mit einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet. Zur Konjugation mit HRP („horse radish peroxidase“) wurde ein HRP-Konjugat von Ebioscience (18-4100-51) verwendet, welches 1:1.000 verdünnt wurde. Die weitere Durchführung erfolgte analog der Angaben des IL-6-Kits.

#### **3.11.2 Gesamtproteinbestimmung durch BCA**

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Probe wurde das BCA-Kit von Pierce benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die Proben geeignet verdünnt wurden.

#### **3.11.3 Herstellung von Lysaten**

Die Bakterien wurden von Platten, welche 20-48 h (*H. hepaticus*, *H. pylori*, *H. bilis*) oder 12-16 h (*E. coli*) inkubiert wurden in PBS pH 7,4 abgeerntet. Die Suspension wurde für 3 Minuten bei Stärke 7 beschallt und die Proteinkonzentration durch den BCA-Test (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt.

### **3.12 Herstellung eines Antiserums gegen *H. hepaticus***

Zur Detektion von intakten *H. hepaticus* wurde ein Antiserum gegen die Oberflächenstruktur von *H. hepaticus* hergestellt. Die Bakterien wurden von einer zwei Tage inkubierten Platte aufgenommen und dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien über Nacht in 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer pH 7,0 bei 4 °C fixiert. Die Bakterien wurden nochmals dreimal in PBS gewaschen und bis zur Injektion bei 4 °C aufbewahrt. Pro Injektion

wurden  $1 \times 10^8$  Bakterien verwendet. Die Immunisierung wurde von Eurogentec (Belgien) mit zwei Kaninchen nach dem Standardprotokoll (siehe Herstellerangaben) durchgeführt. Die Präimmunseren von fünf Kaninchen wurden gegen *H. hepaticus* und mehrere Zelllinien in einem Western-Blot getestet und die zwei Kaninchen ausgewählt, deren Serum am wenigsten Kreuzhybridisierung zeigte.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Annotation des Genoms von *H. hepaticus* ATCC 51449

Die Kenntnis der Genomsequenz eines Organismus stellt eine unabdingbare Voraussetzung für das Verständnis der Physiologie und Pathogenese dar. Erst dadurch wird eine gezielte Mutagenese einzelner Gene zur Erforschung deren Funktion möglich. Der Vergleich mehrerer Genome macht es möglich, neue Pathogenitätsfaktoren und die Anpassung verschiedener Bakterien an ihre jeweilige Nische zu untersuchen.

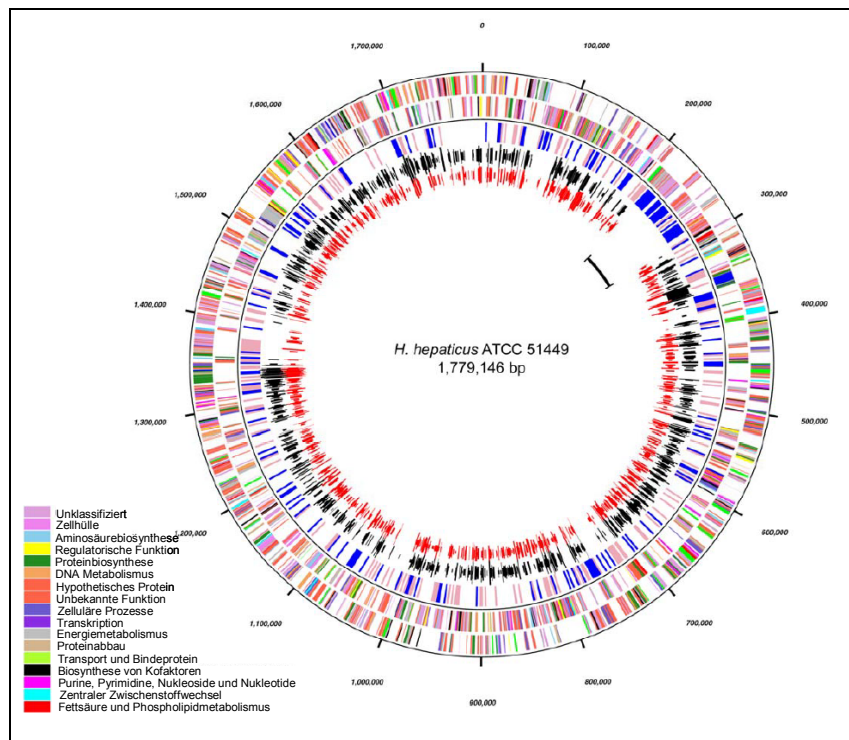
In einer Kooperation mit MWG Biotech wurde daher das Genom des *H. hepaticus*-Stammes ATCC 51449, welches mit dem Stamm *H. hepaticus* 3B1 identisch ist, sequenziert. Dazu wurden aus mehreren durch die Shotgun-Methode erzeugten genomischen Bibliotheken mit einer Insertgröße zwischen 700 und 3.000 bp insgesamt 22.034 DNA-Sequenzen erzeugt. Dies umfasst eine 9,7-fache Abdeckung des Genoms. Nach dem Anordnen der Sequenzen wurden Lücken im Genom durch Vektorette-PCRs und kombinatorische PCRs geschlossen. Offene Leserahmen wurden durch die Programme GLIMMER2 und Flip (N. Brossard, <ftp://megasun.bch.umontreal.ca/pub/flip/flip.tar.Z>), Ribosomenbindestellen mit RBS\_finder (B. E. Suzek, <http://www.tigr.org/software/>) und tRNA-Gene mit tRNAscan-SE (Lowe und Eddy. 1997) vorhergesagt. Die Annotation der einzelnen Gene erfolgte durch eine vorgeschaltete automatische Annotation durch das FASTA-Paket (Pearson, 2000) und InterProScan (EBI, Cambridge, UK). Eine funktionelle Analyse erfolgte durch das Programm GeneData PhyloSopher™ 3.5 (GeneData AG, Basel). Alle nicht eindeutigen Gene wurden anschließend manuell nachannotiert.

#### 4.1.1 Allgemeine Daten zum Genom von *H. hepaticus* ATCC 51449

Das Genom von *H. hepaticus* ATCC 51449 hat eine Größe von 1.799.146 bp mit einem G/C-Gehalt von 35,9% (Tab. 13 und Abb. 7). Dies ist etwas größer als die Genome der beiden sequenzierten *H. pylori* Stämme 26695 und J99 (1,64 und 1,67 Mbp) und von *C. jejuni* NCTC 11168 (1,64 Mbp). Von den 1.875 vorhergesagten Proteinen konnte für 713 (38,0%) eine Funktion mit relativ hoher Sicherheit vorhergesagt werden, 573 Proteine (35,9%) hatten Homologie zu konservierten hypothetischen Proteinen, von denen bei 309 Indizien für eine Funktion bestanden, während für 364 keine Funktion vorhergesagt werden konnte. Für 489 Proteine konnte keine Homologie zu anderen Proteinen in Datenbanken gefunden werden. 938 beziehungsweise 941 Proteine von *H. hepaticus* hatten Homologie zu Proteinen in *H. pylori* 26695 und J99 und 953 Proteine hatten Homologie zu Proteinen in *C. jejuni* NCTC 11168. Von diesen Proteinen hatten 821 Homologie zu Proteinen in beiden Genomen, während 109 nur Homologie zu Proteinen in *H. pylori* und 130 nur Homologie zu Proteinen in *C. jejuni* hatten.

**Tab. 13. Zusammenfassende Tabelle der Eigenschaften des Genoms von *H. hepaticus* ATCC 51449 und ein Vergleich mit den Eigenschaften der Genome von *H. pylori* J99 und 26695 und *C. jejuni* NCTC 11168.**

Stamm	<i>H. hepaticus</i> ATCC 51449	<i>H. pylori</i> 26695	<i>H. pylori</i> J99	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168
Gesamtgröße	1.799.146 bp	1.667.867 bp	1.643.941 bp	1.641.481 bp
G/C-Gehalt	35,9%	38,8 %	39,9%	30,5%
Offene Leserahmen	1.875	1.590	1.495	1.654
Durchschnittliche Genlänge	1082 bp	954 bp	998 bp	948 bp
Dichte an kodierenden Sequenzen	93,0%	91,0%	90,8%	94,3%
Proteine mit Funktionszuordnung	1.022	895	874	1.242
Ribosomale RNA	1 x 16S - 23S – 5S	2 x 16S- 23S – 3 x 5S	2 x 16S- 23S – 5S	3 x 16S- 23S – 5S
tRNA	37 (7 Cluster, 15 Einzelgene)	36 (6 Cluster, 18 Einzelgene)	36 (6 Cluster, 15 Einzelgene)	44 (10 Cluster, 8 Einzelgene)
Phasenvariable Gene	17 beobachtet, 33 vorhergesagt	14 beobachtet, 12 vorhergesagt	9 beobachtet, 16 vorhergesagt	23 beobachtet, 9 vorhergesagt

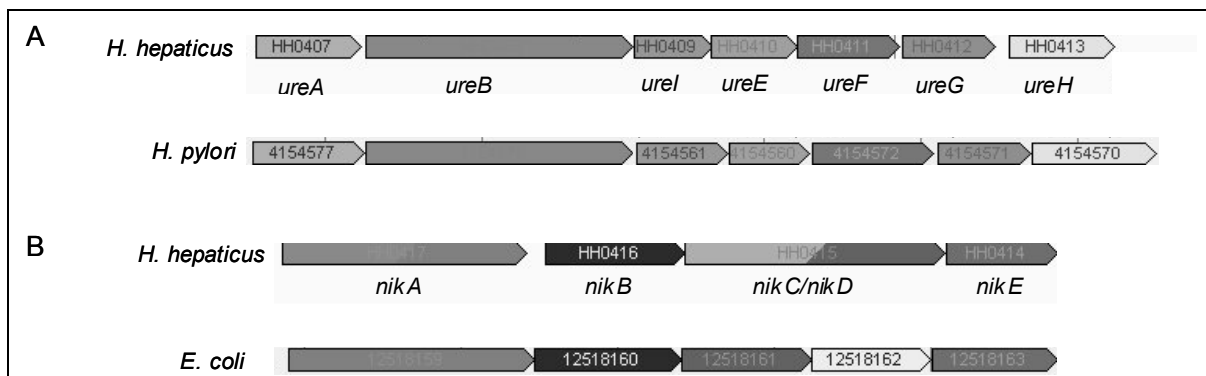


**Abb. 7. Zirkuläre Darstellung des Genoms von *H. hepaticus* ATCC 51449.** Von außen nach innen stellen die einzelnen Ringe dar: 1. und 2. Ring, Positionen von offenen Leserahmen in und gegen die Uhrzeigerrichtung (die Bedeutung der einzelnen Farben ist in der Farbtabelle dargestellt); 3. Ring, Regionen des Genoms mit einem G/C-Gehalt mehr als 5% höher (pink) oder niedriger (blau) als der Rest des Genoms; 4. und 5. Ring, Orthologe zu *H. pylori* bzw. *C. jejuni* (die Länge der Linien ist proportional zum Prozentsatz der Homologie auf Aminosäureebene); 6. Ring, Position der HHG11-Genominsel.

Im Durchschnitt betrug die Homologie auf Aminosäureebene 60,0% zwischen den Proteinen von *H. hepaticus* und dessen Orthologe in *H. pylori* und 54,3% zu dessen Orthologe in *C. jejuni*. Dabei gab es bei den Proteinen, die in allen drei Genomen vorhanden sind, jedoch auch viele mit höherer Homologie zu *C. jejuni* als zu *H. pylori* (z. B. das Ferredoxin FrxA oder Proteine für den Biotin-Metabolismus wie BioA, BioC und BioF). Es gab jedoch auch viele Proteine mit höherer Homologie zu *H. pylori* als zu *C. jejuni* (zum Beispiel viele Proteine des Flagellenapparats und für Chemotaxis wie FlaA, FlaB, FlgK, FliS oder CheV).

#### 4.1.2 Ureaseproduktion und Nickelaufnahme

*H. hepaticus* produziert zwar ähnlich wie *H. pylori* große Ureasemengen, aber die genaue Rolle der Urease in *H. hepaticus* ist noch nicht wirklich bekannt. Das Genom von *H. hepaticus* kodiert für einen identischen Ureasecluster wie *H. pylori* (*ureABIFGH*, Abb. 8 A). Im Gegensatz zu *H. pylori* und *C. jejuni* besitzt *H. hepaticus* stromabwärts des Ureaseclusters einen in der umgekehrten Richtung transkribierten Cluster mit Homologie zu Genen von *E. coli* für den Nickeltransport (*nikAB(C+D)E*, Abb. 8 B). Dafür sind Gene, welche für die Nickelaufnahme in *H. pylori* verantwortlich sind, im Genom von *H. hepaticus* nicht vorhanden (*nixA*, *hspA*, *hpn*).



**Abb. 8. Schematische Darstellung des Urease-Clusters und des Nickelaufnahmesystems von *H. hepaticus*.** (A) Der Ureasecluster von *H. hepaticus* und im Vergleich dazu von *H. pylori* J99 ist schematisch dargestellt. (B) Das in umgekehrter Richtung zum Ureasecluster kodierte Nickelaufnahmesystem von *H. hepaticus* und im Vergleich dazu von *E. coli* ist schematisch dargestellt. Homologe Gene sind jeweils mit der gleichen Farbe dargestellt.

Die Urease ist essentiell für die Kolonisation von *H. pylori*, da sie die Passage durch das saure Milieu des Magens ermöglicht (Weeks *et al.*, 2000, siehe Einleitung Abschnitt 1.2.4.2). Unveröffentlichte Daten sprechen dafür, dass die Urease auch essentiell für die Kolonisation von *H. hepaticus* ist (D. B. Schauer, persönliche Mitteilung), wobei sie aber *in vitro* keine erhöhte Säuretoleranz vermittelt (Belzer *et al.*, 2005). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie vielleicht *in vivo* doch eine Säuretoleranz während der Passage durch den Magen vermittelt. Möglicherweise ist die Urease auch essentiell für den

Stickstoffstoffwechsel oder die Cytotoxizität von *H. hepaticus* durch die Bildung von Ammoniumhydroxid.

#### 4.1.3 Motilität und Chemotaxis

Motilität ist ein entscheidender Kolonisations- und Pathogenitätsfaktor von Bakterien. Für *H. pylori* wurde im Tiermodell gezeigt, dass ohne funktionelle Flagellen eine Kolonisation nicht möglich ist (Eaton *et al.*, 1996). Auch während einer persistierenden Infektion werden Flagellen benötigt, um ein Ausschwemmen in den sauren Mageninhalt zu verhindern (Hazell *et al.*, 1986).

Das Flagellensystem von *H. hepaticus* ist sehr ähnlich zu dem Flagellensystem von *H. pylori*. Es gibt zwei Flagellentypen FlaA und FlaB unter der Kontrolle des  $\sigma^{28}$ - beziehungsweise des  $\sigma^{54}$ -Promotors. Dabei kodiert *H. hepaticus* für zwei Kopien von *flaA*, welche inklusive des Promotors eine vollkommen identische Sequenz aufweisen. Es wurde überprüft, dass diese Duplikation in 13 uns zur Verfügung stehenden *H. hepaticus* Stämmen vorhanden ist. Die Bedeutung dieser Duplikation ist noch unbekannt, wobei die Inaktivierung eines der beiden *flaA*-Gene die Motilität und Flagellenbiosynthese nicht beeinträchtigt (unveröffentlichte Daten).

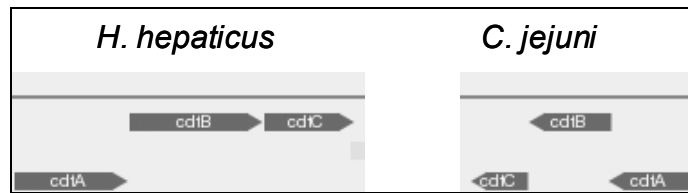
Ebenfalls entscheidend für die Kolonisation ist Chemotaxis. Dadurch wird die gezielte Besiedlung einer spezifischen Nische möglich. *H. pylori* besitzt nur vier Chemosensorproteine (TlpA, TlpB, TlpC, TlpD), was deutlich weniger als bei den meisten anderen Bakterien ist. Dies hängt vermutlich mit der relativ eingeschränkten Nische des menschlichen Magens zusammen.

*H. hepaticus* besitzt neun vorhergesagte Chemosensorproteine, was im Vergleich zu den 4 vorhergesagten Chemosensorproteinen in *H. pylori* deutlich höher ist. Im Unterschied zu *H. pylori*, aber wie die meisten anderen motilen Bakterien besitzt *H. hepaticus* *cheR/cheB*-Gene, welche für eine Methyltransferase und Methylesterase kodieren. Nur HH1088 besitzt eine vollständige Konsensussequenz des Methylierungsmotives (EQVAAS; Konsensussequenz: GlxGlxXXA-S/T). Alle anderen Chemosensoren von *H. hepaticus* besitzen jedoch mehrere Glx-Glx-Motive, denen unterschiedliche Aminosäuren folgen. Untersuchungen in anderen Bakterien haben gezeigt, dass solche Motive mit einer niedrigeren Effizienz ebenfalls als Methylierungsmotiv erkannt werden können.

#### 4.1.4 Toxine, Adhäsine und Proteine der äußeren Membran

*H. hepaticus* besitzt einen Cluster von Genen (*cdtABC*), welche für ein Zytotoxin kodieren („Cytolethal Distending Toxin CDT“, Abb. 9). CDT führt zum Zellzyklusstopp, Chromatinfragmentierung und kann zur Apoptose durch eine Typl-Deoxyribonuklease-ähnliche Aktivität führen. Es konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass CDT für die Langzeitkolonisation von

*H. hepaticus* in Swiss Webster-Mäusen essentiell ist (Ge *et al.*, 2005, im Detail in der Einleitung Abschnitt 1.2.4.1 beschrieben).



**Abb. 9. Schematische Darstellung des CDT-Clusters in den Genomen von *H. hepaticus* ATCC 51449 und *C. jejuni* NCTC 11168.**

*H. pylori* kodiert für das Zytotoxin VacA, welches zu einem ähnlichen Phänotyp wie das CDT-Toxin führt und einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellt (Cover und Blaser, 1992). Es führt in mukosalen Epithelzellen zu einer Vakuolisierung (Garner und Cover, 1996). Im Genom von *H. hepaticus* konnte jedoch kein Homolog zu *vacA* gefunden werden.

Proteine der äußeren Membran („outer membran proteins“ OMPs) spielen eine wichtige Rolle für die Adhäsion an Wirtszellen. So wurde gezeigt, dass die OMPs BabA, SabA und AlpA wichtige Adhäsine von *H. pylori* darstellen (Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004, Mahdavi *et al.*, 2002, Odenbreit *et al.*, 1999). *H. hepaticus* kodiert für 11 Proteine mit Homologie zu OMPs von *H. pylori*. Die OMPs von *H. pylori* können in zwei Unterklassen eingeteilt werden, die Hop-Proteine mit der N-terminalen Schnittstelle AEX[D,N]G und die Hor-Proteine. Keines der OMPs von *H. hepaticus* besitzt die typische Schnittstelle der Hop-Proteine von *H. pylori*. Wenn man ein Alignment der OMPs von *H. hepaticus* mit den OMPs von *H. pylori* und ausgewählten Porinen von *E. coli* durchführt, zeigt sich, dass fünf Proteine von *H. hepaticus* eng mit Porinen von *E. coli* verwandt sind. Die anderen OMPs von *H. hepaticus* bilden mehrere distinkte Cluster, welche die höchste Ähnlichkeit zu HorG von *H. pylori* aufweisen. Überraschenderweise weisen die OMPs von *H. hepaticus* kaum Ähnlichkeit zu den OMPs von *C. jejuni* auf.

*C. jejuni* besitzt drei Proteine, von denen gezeigt wurde, dass sie eine Rolle in der Adhärenz an epitheliale Zellen spielen, Peb1, CadF und JlpA (Jin *et al.*, 2001, Konkel *et al.*, 1997, Pei *et al.*, 1998). *H. hepaticus* besitzt ein Gen (HH1481) mit hoher Homologie zu *peb1* (72% auf Aminosäureebene), während dieses Gen im Genom von *H. pylori* nicht vorhanden ist. Weder *H. hepaticus* noch *H. pylori* besitzen ein Homolog zu *cadF* und *jlpA*.

#### 4.1.5 Transkriptionelle Regulatoren und phasenvariable Gene

*H. hepaticus* besitzt ähnlich wie *H. pylori* nur wenige transkriptionelle Regulatoren (die Sigma-Faktoren  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{54}$ ,  $\sigma^{28}$ , der flagelläre anti-Sigma-Faktor FlgM und der transkriptionelle Aktivator FlgR). Dafür besitzt *H. hepaticus* ähnlich wie *H. pylori* (Tomb *et al.*, 1997, Alm *et al.*, 1999) und *C. jejuni* (Parkhill *et al.*, 2000) phasenvariable Gene. Dies sind Gene mit langen

homo- oder dipolymerischen Abschnitten. Dadurch können sich bei der Replikation durch falsche Paarung der komplementären DNA-Stränge leicht Fehler einschleichen, wodurch sich die Länge dieser homo- oder dipolymerischen Abschnitte ändert. Dies kann dann durch Einfügen oder Aufheben von Stopkodons zu verlängerten oder verkürzten Proteinen und damit zu einem „Einschalten“ oder „Ausschalten“ dieser Gene führen.

Bei der Sequenzierung des Genoms von *H. hepaticus* konnten an 36 verschiedenen Positionen, wovon 17 in kodierenden Regionen lagen, unterschiedliche Längen von poly-C- oder poly-G-Abschnitten in unterschiedlichen Shotgun-Klonen festgestellt werden. Da dies für eine hohe Phasenvariabilität von *H. hepaticus* spricht, wurde nach weiteren Abschnitten im Genom gesucht, welche in kodierenden Regionen lange homo- oder dipolymerische Abschnitte aufweisen. Dabei konnten 33 weitere Gene mit mutmaßlicher Phasenvariabilität gefunden werden. Unter den phasenvariablen Genen waren auch mehrere, welche für Fukosyltransferasen oder Glykosyltransferasen kodieren (drei beobachtete und fünf vorhergesagte). Diese Gene spielen eine Rolle in der LPS-Modifikation. Daher könnte die Phasenvariabilität dieser Gene einem Ausweichen des Immunsystems des Wirts durch veränderte Oberflächenstrukturen dienen.

#### **4.1.6 Restriktions-Modifikationssysteme, natürliche Kompetenz und TypIV-Sekretionssysteme**

Während *H. pylori* sehr viele Restriktions-Modifikationssysteme (RM-Systeme) besitzt, kodiert *H. hepaticus* nur für zwei komplette RM-Systeme.

*H. hepaticus* besitzt keine Orthologe zu dem TypIV-Sekretionssystem *comB*, welches hauptsächlich für die sehr hohe natürliche Kompetenz von *H. pylori* verantwortlich ist. Trotzdem weist *H. hepaticus* ebenfalls natürliche Kompetenz, wenn auch sehr viel schlechter als *H. pylori*, auf. *H. hepaticus* besitzt vermutlich kein TypIV-Sekretionssystem für die DNA-Aufnahme. Das Genom von *H. hepaticus* besitzt aber vier Pilin-ähnliche Gene (HH1115-1117 und HH1285), welche möglicherweise eine Funktion in der DNA-Aufnahme haben könnten.

Den vermutlich wichtigsten Pathogenitätsfaktor von *H. pylori* stellt die *cag*-Pathogenitätsinsel dar. Diese ist nicht in allen *H. pylori*-Isolaten vorhanden, korreliert aber mit der Schwere der durch *H. pylori* ausgelösten Erkrankungen (Covacci *et al.*, 1997). Die Insel kodiert für ein TypIV-Sekretionssystem, welches das Effektorprotein CagA in epitheliale Wirtszellen der gastrischen Mukosa transloziert. Dort führt CagA zu einer Umlagerung des Zytoskeletts („Hummingbird“-Phänotyp). Unabhängig von CagA führt die *cag*-Pathogenitätsinsel zu einer Induktion des Chemokins IL-8. Dies erfolgt durch eine von der *cag*-Insel-abhängigen Übertragung von Peptidoglykanabbauprodukten in die Wirtszelle, wo eine proinflammatorische Antwort durch Bindung an den Mustererkennungsrezeptor NOD1 erfolgt

(Viala *et al*, 2004). Im Genom von *H. hepaticus* konnten keine Homologe zu Komponenten der *cag*-Pathogenitätsinsel außer einem TypIV-Sekretionssystem auf der HHGI1-Insel gefunden werden (siehe Abschnitt 4.1.8).

#### 4.1.7 Metabolismus von *H. hepaticus*

Obwohl die metabolischen Fähigkeiten von *H. hepaticus* ziemlich ähnlich zu *H. pylori* und *C. jejuni* sind, gibt es doch einige wichtige Unterschiede. Im Gegensatz zu *H. pylori* kodiert das Genom von *H. hepaticus* für zwei Dehydrogenasen (NDH-1 und NDH-2) und für zwei terminale Oxidasen (Cytochrom bd und Cytochrom cbb<sub>3</sub>). *H. pylori* kodiert dagegen nur für eine NDH-1 Dehydrogenase und für Cytochrom cbb<sub>3</sub> als terminale Oxidase.

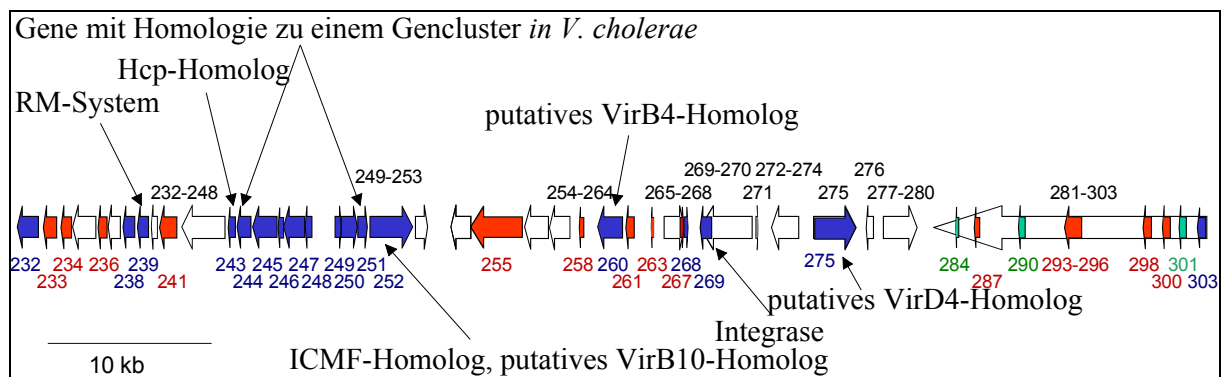
Die Genome von allen drei Organismen kodieren für alle Enzyme des Tricarboxylsäurezweiges des Citratzyklus, während nur *C. jejuni* alle Enzyme des Dicarboxylsäurezweiges des Citratzyklus besitzt. *H. hepaticus* fehlen jedoch drei Enzyme für den oxidativen Zweig des Citratzyklus. Dies könnte bedeuten, dass *H. hepaticus* entweder einen gespaltenen Zyklus besitzt, in dem dieser Teil in die reduktive Richtung arbeitet oder dass die fehlenden Enzyme des oxidativen Teiles des Citratzyklus durch andere Enzyme ersetzt sind ( $\alpha$ -Ketoglutarat:Ferrodoxin Oxidoreduktase, Fumaratreduktase, Succinyl-CoA-Acetoacetyl-CoA-Transferase (SCOT) und Malat:Quinon-Oxidoreduktase). Da das Genom von *H. hepaticus* nicht für SCOT kodiert, jedoch für eine Malatdehydrogenase, spricht vieles dafür, dass der Dicarboxylsäurezyklus von *H. hepaticus* in der reduktiven Richtung arbeitet.

#### 4.1.8 Molekulare Charakterisierung der mutmaßlichen Pathogenitätsinsel HHGI1

Genomische Inseln stellen häufig wichtige Virulenzfaktoren von Bakterien dar. Diese nennt man dann Pathogenitätsinseln. Sie entstehen meist durch Aufnahme von genomischen Abschnitten aus anderen Organismen. Daher weisen sie häufig einen gegenüber dem Wirtsorganismus veränderten G/C-Gehalt, Gene für Integrasen und flankierende direkte Sequenzwiederholungen auf. In vielen Fällen sind sie benachbart zu Genen für tRNAs, da diese bevorzugte Insertionsstellen für genomische Inseln sind. Im Genom von *H. hepaticus* konnten einige Abschnitte gefunden werden, welche möglicherweise genomische Inseln darstellen. Am auffälligsten war aber ein Kandidat für eine genomische Insel, welche HHGI1 (*H. hepaticus* genomische Insel 1) benannt wurde.

Die genomische Insel HHGI1 hat eine Größe von 71 kb und umfasst 70 offene Leserahmen (HH0233-HH0302, Abb. 10). Der G/C-Gehalt der HHGI1-Insel ist 2,7% niedriger als der G/C-Gehalt des restlichen Genoms (33,2% im Vergleich zu 35,9%). Die Insel ist nicht, wie es bei vielen Pathogenitätsinseln der Fall ist, direkt zu einem Gen für eine tRNA benachbart, kodiert jedoch für eine P4-ähnliche Integrase (HH0269). Sie enthält auch keine größeren direkten, flankierenden Repeats, welche öfter assoziiert mit genomischen Inseln

auftreten. Diese entstehen in der Regel bei der Integration der Insel in das Genom des Wirtsorganismus. Die HHGI1-Insel enthält dagegen mehrere kürzere Repeats, welche bis zu 1.007 bp perfekter Homologie aufweisen. Außerdem enthält die Insel zwei Kopien eines Repeats von 330 bp. Einer davon ist an der 5'-Grenze der HHGI1-Insel, welcher auch den Deletionspunkt im Stamm 96-1809 darstellt (wie später beschrieben). Daher stammen die Stämme mit einer deletierten HHGI1-Insel vermutlich durch eine oder mehrere Runden von Deletionen und/ oder Umordnungen von Stämmen ab, welche ursprünglich eine komplette HHGI1-Insel hatten.



**Abb. 10. Schematische Darstellung der HHGI1-Insel.** Die HHGI1-Insel ist schematisch durch Blockpfeile dargestellt, wobei aufeinanderfolgende Gene mit der selben Transkriptionsrichtung als ein Block dargestellt sind. Grüne Pfeile stellen Gene, welche für Proteine mit einem wahrscheinlichen Leaderpeptid kodieren und rote Pfeile Gene, welche für wahrscheinlich membrangebundene Proteine kodieren, dar. Blaue Pfeile stellen Gene dar, denen nach Sequenzanalyse eine wahrscheinliche Funktion zugeteilt werden konnte. Die mutmaßlichen Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind in der Abbildung dargestellt.

Die meisten Gene auf der Insel kodieren für Proteine mit einer unbekanntenen Funktion. Es konnten jedoch 4 Gene gefunden werden, welche Homologie zu Komponenten von TypIV-Sekretionssystemen aufweisen. Diese sind mit Angabe der prozentual gleichen und ähnlichen Aminosäuren auf Proteinebene HH0249 zu *virB7* (9% und 19%), HH0252 zu *virB10* (7% und 13 %), HH0275 zu *virD4* (11% und 24%) und HH0260 zu *virB4* (12% und 29%). Dabei wies HH0252 auch eine signifikante Homologie zu dem *icmF*-Gen von *V. cholerae* und *L. pneumophila* auf (18% gleiche und 36% ähnliche Aminosäuren). IcmF ist ein Protein, von dem gezeigt werden konnte, dass es eine Rolle in der Abtötung von Makrophagen und der bakteriellen Konjugation spielt (Das *et al.*, 2002). Obwohl die anderen Komponenten eines TypIV-Sekretionssystems nicht eindeutig identifiziert werden konnten, spricht daher vieles dafür, dass die HHGI1-Insel für ein TypIV-Sekretionssystem kodiert.

Des Weiteren hatte HH0243 eine hohe Homologie zu *hcp* von *V. cholerae*. *Hcp* kodiert für ein Protein, welches bei *V. cholerae* mit Hämolyisin koreguliert wird (Williams *et al.*, 1996). HH0243-HH0252 haben Homologie zu dem IcmF-assoziierten Cluster von homologen Proteinen („IcmF associated homologous proteins IAHP“, Das und Chaudhuri, 2003). Dieser



Gencluster wurde zuvor hauptsächlich in pathogenen oder kommensalen gram-negativen Proteobakterien, welche intensiven Kontakt mit den Zellen ihres Wirtsorganismus pflegen, gefunden (unter anderem *V. cholerae*, *S. typhimurium*, *Y. pestis*, uropathogenen *E. coli* und *P. aeruginosa*). Der IAHP-Cluster kodiert großteils für hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion. Alle Bakterien, welche den IAHP-Cluster enthalten, kodieren jedoch für ein Homolog zu IcmF von *L. pneumophila*. Außerdem enthält der IAHP-Cluster ein Gen, welches für ein Protein mit einer Clp-Signatur und ein Gen, welches für einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen transkriptionellen Regulator kodiert.

Die HHG11-Insel kodiert auch für ein Restriktions-Modifikationssystem (HH0238 und HH0239). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorhandenseins eines mutmaßlichen TypIV-Sekretionssystems und von Genen, die nach Voraussage für membranständige oder sekretierte, mit Virulenz assoziierte Proteine kodieren, dafür spricht, dass die HHG11-Insel eine Pathogenitätsinsel von *H. hepaticus* ist.

#### 4.2 Diversität von *H. hepaticus*

*H. pylori* gehört zu den bakteriellen Spezies mit der höchsten Diversität und Variabilität. Dies ist wichtig für seine Kolonisationsfähigkeit und Pathogenität. Deshalb wurde untersucht, ob *H. hepaticus* eine ähnlich hohe Diversität aufweist.

##### 4.2.1 Sequenzdiversität von *H. hepaticus*

Zuerst wurde die Sequenzdiversität von 13 *H. hepaticus*-Stämmen durch eine Multilocussequenzanalyse bestimmt. Dazu wurden Sequenzabschnitte aus sieben „Housekeeping“-Genen durch eine PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (Tab. 14). Die Sequenzen, welche für die verschiedenen Stämme erhalten wurden, wurden über ein multiples Alignment verglichen.

**Tab. 14. Für die Multilocussequenzanalyse untersuchte Gene.**

ORF-Nummer	Gen	Bezeichnung
HH0427	<i>atpA</i>	ATP-Synthase, $\alpha$ -Untereinheit
HH0108	<i>efp</i>	Translationselongationsfaktor P
HH1242	<i>mutY</i>	A/G-spezifische Adeninglykosylase
HH1848	<i>ppa</i>	Anorganische Pyrophosphatase
HH0002	<i>trpC</i>	Phosphoribosylanthranalitisomerase
HH0409	<i>ureI</i>	Ureaseakzessorisches Protein I
HH1539	<i>yphC</i>	GTP-bindendes Protein

Während 5 Stämme in allen untersuchten Sequenzen identisch zum Referenzstamm ATCC 51449 waren, zeigten die anderen 7 Stämme Sequenzunterschiede in einem oder mehreren Genen (Tab. 15). Diese Stämme konnten in insgesamt fünf verschiedene

Sequenztypen unterteilt werden. Dabei waren die sequenzierten Abschnitte der Gene *efp* und *atpA* bei allen Stämmen identisch, während *ppa* das variabelste Gen war, da dessen Sequenz sich in allen Stämmen unterschied, welche nicht zum Sequenztyp 1 gehören. Es wurden ebenfalls RAPD-PCRs durchgeführt. Dabei konnten die Stämme in insgesamt sieben Klassen entsprechend ihrem Bandenmuster eingeteilt werden. Insgesamt gesehen war die Sequenzdiversität relativ gering im Vergleich zu *H. pylori*, wobei sie etwa im Bereich von *C. jejuni* lag.

**Tab. 15. Zusammenfassung der Ergebnisse der Multilocussequenzanalyse und der RAPD-PCRs.** Es ist für jedes einzelne sequenzierte Gen und zusammenfassend für alle Sequenzen der Sequenztyp der einzelnen Stämme angegeben. Ebenfalls sind die Ergebnisse der RAPD-PCRs durch Zahlen angegeben, wobei eine gleiche Zahl für ein identisches Bandenmuster steht.

Stamm	<i>atpA</i>	<i>efp</i>	<i>mutY</i>	<i>ppa</i>	<i>trpC</i>	<i>urel</i>	<i>yphC</i>	Sequenz- typ	RAPD- PCR
ATCC 51448	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATCC 51449	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ATCC 51450	1	1	1	1	1	1	1	1	1
94-739	1	1	1	1	1	1	1	1	1
95-225	1	1	1	1	1	1	1	1	1
95-557	1	1	1	1	1	1	1	1	1
94-2114	1	1	1	2	1	1	1	2	1
94-2424	1	1	1	2	1	1	1	2	2
94-2138	1	1	1	3	1	2	1	3	3
95-1552	1	1	1	3	1	2	1	3	4
94-508	1	1	2	4	2	3	2	4	5
96-284	1	1	2	4	2	3	2	4	6
96-1809	1	1	1	3	3	4	3	5	7

#### 4.2.2 Genomische Diversität von *H. hepaticus*

Anschließend wurde die genomische Diversität der 13 *H. hepaticus*-Stämme durch einen Microarray-basierten Ansatz bestimmt. Dafür wurde der *H. hepaticus* Array von MWG Biotech benutzt. Auf diesem sind spezifische 50-mer Oligonukleotide für 1863 von 1875 Genen von *H. hepaticus* ATCC 51449 aufgetragen. Die genomische DNA des Referenzstammes ATCC 51449 wurde über eine Polymerasenkettenreaktion mit Cy3 oder Cy5 und die DNA eines anderen Teststammes entsprechend mit dem anderen Farbstoff markiert. Die beiden markierten DNAs wurden gemischt und kompetitiv auf dem Microarray hybridisiert. Nach dem Einlesen des Arrays durch einen Fluoreszenzscanner wurden die Rohdaten mit dem Programm MAVI („Microarray Valuation Imp“, MWG Biotech) normalisiert. Dabei werden die Gesamtintensitäten der beiden Fluoreszenzfarbstoffe angeglichen. Die fehlenden Gene wurden durch das Programm GACK („Genotyping Analysis by Charlie Kim“, Kim *et al.*, 2002), welches einen dynamischen Cut-Off verwendet, bestimmt. Dazu wird eine optimale Gaußverteilung der normalisierten Verhältnisse der Intensitäten von Cy3 und Cy5 für den Fall,

dass alle Gene des Referenzstammes auch in dem Teststamm vorhanden sind, angenommen. Dann wird berechnet, welche Verhältnisse der Intensitäten außerhalb dieser Gaußkurve liegen. Dadurch kann eine prozentuale Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins oder Fehlens eines Genes in dem Teststamm berechnet werden.

Für die fünf Stämme, welche zum gleichen Sequenztyp wie ATCC 51449 gehören, konnten keine oder nur sehr wenige Gene als fehlend detektiert werden. Durch spezifische PCRs konnte nachgewiesen werden, dass die wenigen in diesen Stämmen durch die Microarrayanalyse als fehlend detektierten Gene allesamt doch vorhanden sind. Es scheint daher, dass diese Stämme alle Subklone des sequenzierten Stammes ATCC 51449 sind.

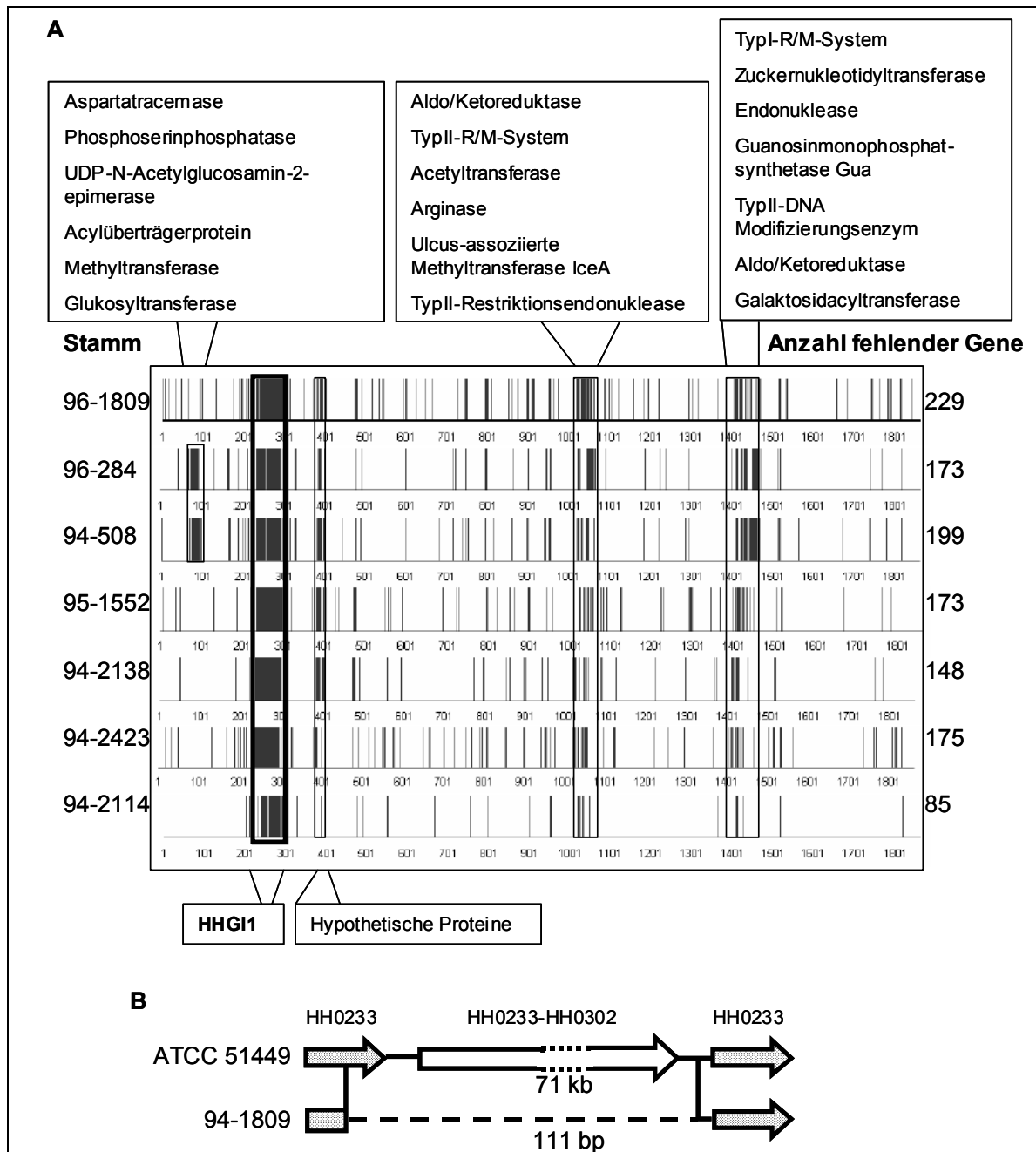
Den anderen Stämmen fehlten dagegen zwischen 85 (Stamm 94-2114) und 229 Gene (Stamm 96-284, Abb. 11 A). Einzelnen Stämmen fehlten mehrere genomische Inseln mit Genen, für die eine Funktion vorhergesagt werden konnte. Den Stämmen 96-284 und 94-508 fehlte eine größere Insel von HH0074 bis HH0088. Diese Insel kodiert unter anderem für eine Aspartatracemase, eine Phosphoserinphosphatase, eine UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase, ein Acylüberträgerprotein und eine Methyltransferase. Es gab zwei weitere Inseln, die in den meisten Stämmen zu einem mehr oder weniger großen Teil deletiert sind. Die erste Insel kodiert unter anderem für eine Aldo/Ketoreduktase, ein TypII-Restriktions/Modifikationssystem, eine Acetyltransferase, für die Ulcus-assoziierte Methyltransferase IceA und für Arginase. Die zweite größere Insel umfasst ein TypI-Restriktions/Modifikationssystem, eine Zuckernukleotidyl-Transferase, eine Endonuklease, die Guanosinmonophosphatsynthetase Gua und ein TypII-DNA-Modifizierungsenzym.

Am auffälligsten war aber, dass allen Stämmen die HHGI1-Insel komplett oder großteils fehlt. Das Fehlen der kompletten oder eines Großteils der Insel wurde durch Empty-Site-PCRs verifiziert. Dazu wurden Primer benutzt, welche in den flankierenden Genen HHH0232 und HH0303 binden. Falls die HHGI1-Insel vorhanden ist, erhält man aufgrund des zu großen Abstands der Primerbindestellen kein PCR-Produkt, während man beim Fehlen der kompletten oder eines Großteils der Insel dementsprechend ein PCR-Produkt erhält. Dadurch konnte gezeigt werden, dass dem Stamm 96-1809 die komplette HHGI1-Insel fehlt, während bei den anderen Stämmen noch Teile der Insel vorhanden sind (Tab. 16). Für ein Teil der Gene der HHGI1-Insel und weiterer variabler Gene wurde durch PCRs überprüft, ob die Gene tatsächlich nicht in dem Genom der entsprechenden Stämme vorhanden sind. Dabei konnten die Ergebnisse der Microarrayanalyse weitgehend bestätigt werden. Nur in wenigen Fällen konnten keine PCR-Produkte für Gene, welche laut Microarray vorhanden sein sollten, erhalten werden. Dies könnte an der Ungenauigkeit der Microarray-basierten Methode oder an Sequenzvariabilität der entsprechenden Stämme liegen, so dass einer oder beide der für die PCR benutzten Primer nicht mehr binden können.

Tab. 16. Ergebnisse der Kontroll-PCRs für ausgewählte Gene der HHG11-Insel und anderer Inseln.

Stamm	96-1809	96-284	94-508	95-1552	94-2138	94-2423	94-2114
Empty-Site	2,7 kb	8 kb	8 kb	9 kb	9 kb	12 kb	neg
Sequenztyp	5	4	4	3	3	2	2
HH0232	pos (-0,3)	pos (0,1)	pos (-0,1)	pos (-0,3)	pos (-0,1)	pos (-0,2)	pos (0,3)
HH0236	neg (2,0)	neg (3,4)	neg (2,8)	neg (2,9)	neg 3,4)	pos (-0,2)	pos (0,1)
HH0246	<b>neg (0,0)</b>	<b>neg (0,5)</b>	neg (1,3)	neg (0,5)	neg (1,2)	<b>neg (0,4)</b>	<b>neg (0,5)</b>
HH0251	neg (1,7)	neg (3,4)	neg (3,6)	neg (2,4)	neg (4,0)	neg (2,8)	neg (2,9)
HH0261	neg (2,3)	neg (2,5)	neg (1,4)	neg (3,0)	neg (3,3)	neg (2,9)	neg (2,1)
HH0269	neg (2,4)	neg (3,7)	neg (3,3)	neg (3,0)	neg (3,5)	neg (3,1)	neg(2,5)
HH0281	<b>neg (0,3)</b>	<b>neg (0,7)</b>	neg (2,1)	neg (0,9)	neg (1,6)	neg (0,9)	<b>neg (0,7)</b>
HH0284	neg (2,6)	neg (3,8)	neg (4,0)	neg (3,3)	neg (4,0)	neg (3,4)	neg (2,6)
HH0291	<b>neg (0,3)</b>	pos (-0,1)	<b>neg (-0,5)</b>	neg (1,3)	neg (2,2)	<b>neg (-1,1)</b>	neg (0,6)
HH0298	neg (1,9)	pos (-0,3)	pos (-0,4)	<b>pos (1,4)</b>	neg (2,2)	neg (1,3)	neg (1,4)
HH0303	pos (0,1)	pos (-0,1)	pos (-0,5)	pos (-0,3)	pos (-0,2)	pos (-0,2)	pos (0,2)
HH0043	pos (-0,3)	<b>pos (1,0)</b>	pos (-0,2)	<b>pos (0,6)</b>	pos (0,1)	<b>pos (0,8)</b>	pos (0,5)
HH0082	pos (-0,1)	neg (2,4)	neg (2,0)	pos (-0,1)	pos (0,1)	pos (0,0)	pos (0,3)
HH0212	neg (2,0)	neg (2,8)	pos (-0,2)	pos (0,6)	pos (0,1)	<b>pos (0,8)</b>	<b>pos (0,5)</b>
HH0382	neg (1,5)	<b>pos (1,3)</b>	<b>pos (0,8)</b>	<b>pos (0,7)</b>	<b>pos (2,1)</b>	pos (-0,1)	pos (0,2)
HH0389	neg (1,5)	neg (0,9)	neg (1,5)	neg (1,3)	neg (2,1)	neg (1,1)	neg (1,2)
HH1039	neg (1,3)	pos (0,3)	neg (3,0)	neg (2,1)	neg (2,4)	neg (2,7)	neg (2,5)
HH1048	neg (1,6)	pos (-0,5)	pos (-0,3)	pos (-0,1)	pos (-0,2)	pos (-0,3)	pos (-0,5)
HH1061	neg (1,4)	neg (2,1)	pos (-0,2)	neg (1,5)	neg (1,9)	pos (-0,3)	pos (-0,3)
HH1302	pos (-0,3)	pos (-0,5)	pos (-0,4)	neg (1,0)	pos (-0,3)	pos (-0,1)	pos (-0,3)
HH1420	neg (1,5)	neg (2,3)	<b>neg (0,0)</b>	neg (1,4)	neg (3,0)	neg (2,1)	neg (1,9)
HH1432	neg (1,6)	neg (1,3)	neg (1,4)	<b>neg (0,2)</b>	<b>neg (0,3)</b>	pos (0,2)	pos (0,5)
HH1471	neg (1,8)	neg (2,5)	neg (2,1)	pos (0,0)	pos (0,0)	pos (0,0)	pos (-0,4)
HH1841	<b>pos (0,9)</b>	pos (-0,2)	pos (-0,3)	<b>pos (1,4)</b>	pos (0,5)	<b>pos (1,3)</b>	pos (-0,3)

Es wurden ausgewählte Gene der HHG11-Insel und die flankierenden Gene HH0232 und HH0303 mit genspezifischen Primern amplifiziert. Außerdem wurden auch PCRs für weitere Gene kleinerer Inseln durchgeführt. Es ist jeweils angegeben, ob ein PCR-Produkt erhalten wurde (pos) oder nicht (neg). In Klammern ist jeweils das logarithmische Verhältnis zur Basis 2 der normalisierten Intensitäten von hybridisierter, markierter DNA des Teststammes zur DNA des Referenzstammes angegeben. Ebenfalls ist markiert, ob die Ergebnisse der PCR mit den Ergebnissen der Microarrayanalyse nach Analyse mit dem Programm GACK übereinstimmen (schwarze Schrift auf weißem Hintergrund) oder nicht (weiße Schrift auf schwarzem Hintergrund). Des Weiteren ist die Größe des Empty-Site-PCR-Produktes mit Primern, welche in HH0232 und HH0303 binden und der Sequenztyp angegeben.



**Abb. 11. Darstellung der Ergebnisse der vergleichenden Microarrayanalysen.** (A) Auf der x-Achse sind die Nummern der einzelnen Leseraster dargestellt. Schwarze Balken stellen Gene dar, welche im entsprechenden Stamm als Fehlend detektiert wurden. Eine Auswahl der fehlenden Gene ist jeweils in den Kästchen beschrieben. Auf der linken y-Achse steht der jeweils verwendete Stamm und auf der rechten y-Achse steht die Anzahl der laut Microarray-Daten im jeweiligen Stamm fehlenden Gene. (B) Darstellung der Situation um die HHGI1-Insellage im Stamm 96-1809. Die gestrichelte Linie in der Darstellung für den Stamm 96-1809 stellt eine Sequenz dar, die im Stamm ATCC 51449 nicht vorhanden ist. Die Gene HH0233-HH0302 sind durch einen einzelnen unterbrochenen Blockpfeil dargestellt. Verbindungen zwischen den Darstellungen für die beiden Stämme stellen Punkte dar, ab welcher die Sequenz der beiden abweicht beziehungsweise wieder identisch ist.

Ebenfalls konnte nur in wenigen Fällen der überprüften Gene ein PCR-Produkt für ein Gen, welches laut Microarray fehlen sollte, erhalten werden. In den Stämmen, bei denen die HHGI1-Insellage nicht komplett deletiert ist, sind vor allem noch Teile am Anfang und Ende der

Insel enthalten. Dagegen ist der zentrale Bereich, welcher auch die identifizierten Komponenten des postulierten TypIV-Sekretionssystems enthält, bis auf wenige Ausnahmen komplett deletiert.

Die Insel enthält mehrere längere Tandemwiederholungen bis zu einer Länge von 1.007 bp mit 100%-iger Übereinstimmung der Sequenz. Darunter befindet sich auch eine zweifache Wiederholung von 330 bp, von der sich eine direkt am 5'-Ende der Insel befindet. Diese stellt auch die Deletionsstelle der HHGI1-Insel in dem Stamm 96-1809 dar (Abb. 11 B).

#### **4.2.3 Die HHGI1-Insel ist eine Pathogenitätsinsel von *H. hepaticus***

Die molekulare Charakterisierung der HHGI1-Insel sprach dafür, dass diese eine Pathogenitätsinsel von *H. hepaticus* darstellt (siehe Abschnitt 4.1.8). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie nicht in allen *H. hepaticus*-Isolaten vorhanden ist. Deshalb sollte nun weiter untersucht werden, ob dies in *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen untermauert werden kann.

##### **4.2.3.1 Mäuse mit einer persistenten natürlichen Infektion mit HHGI1-positiven Stämmen weisen eine stärkere Pathologie auf als Mäuse mit HHGI1-negativen Stämmen**

Da einigen *H. hepaticus*-Stämmen die HHGI1-Insel entweder größtenteils oder komplett fehlte, wurde die Pathologie der Mäuse, aus denen die Stämme ursprünglich isoliert wurden, betrachtet. Da die *H. hepaticus*-Stämme aus Routinequarantäneisolierungen stammten, waren die Daten leider nicht für alle Stämme komplett.

Es fällt jedoch auf, dass 5 von 6 Mäusen, aus denen *H. hepaticus*-Stämme mit einer kompletten HHGI1-Insel isoliert wurden, eine multifokale Hepatitis aufwiesen (Tab. 17). Dagegen wies von den Mäusen, aus denen Stämme isoliert wurden, denen die HHGI1-Insel teilweise oder komplett fehlte, keine einzige Anzeichen von Krankheitssymptomen in der Leber auf. Nur eine einzige Maus hatte eine leichte Typhlitis. Dabei war jedoch nur für 4 von 7 Mäusen die Pathologie bekannt. Trotzdem stellen diese Daten ein weiteres Indiz dafür dar, dass die genomische Insel HHGI1 eine Rolle in der Pathologie von *H. hepaticus* spielt.

Es muss natürlich darauf hingewiesen werden, dass die *H. hepaticus*-Stämme keine isogenen Mutanten darstellen und sich auch anderweitig voneinander unterscheiden. Trotzdem war das Fehlen eines Großteils der HHGI1-Insel der einzige komplett gemeinsame Faktor und war daher Anlass, diese Stämme im Mausmodell weiter zu untersuchen.

**Tab. 17. Zusammenfassung der Pathologie der Mäuse, aus denen die verwendeten *H. hepaticus*-Stämme isoliert wurden.**

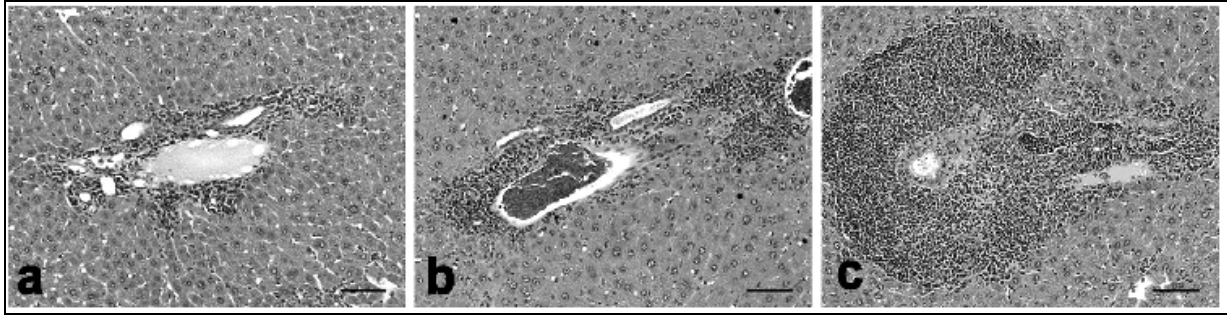
Stamm	Herkunftsland	Mausstamm	Herkunftsgewebe	Pathologie	Sequenztyp	HHGI1
ATCC 51448	USA	SCID/NCr, männlich	Leber	Multifokale Hepatitis	1	+
ATCC 51449	USA	SCID/NCr, männlich	Leber	Multifokale Hepatitis	1	+
ATCC 51450	USA	SCID/NCr, männlich	Leber	Multifokale Hepatitis	1	+
94-739	USA	SCID/NCr, männlich, 7 Monate	Unbekannt	Multifokale Hepatitis, Lebernekrose, Leberentzündung	1	+
95-225	USA	Swiss, männlich	Caecum	Keine sichtbaren Erkrankungen	1	+
95-557	USA	A/J, männlich, 3 Monate	Caecum	Multifokale Hepatitis	1	+
94-2114	USA	DB A/2, weiblich, 4 Wochen	Unbekannt	Keine sichtbaren Erkrankungen	2	-
94-2423	USA	C57Bl, weiblich, 4 Wochen	Caecum	Keine sichtbaren Erkrankungen	2	-
95-1552	USA	unbekannt	Unbekannt	Unbekannt	3	-
94-2138	USA	Nacktmaus, weiblich, 1 Jahr	Caecum	Leichte Typhlitis	3	-
94-508	USA	Stamm unbekannt, männlich, 2 Jahre	Caecum	Keine sichtbaren Erkrankungen	4	-
96-284	Deutschland	unbekannt	Unbekannt	Unbekannt	4	-
96-1809	Niederlande	unbekannt	Unbekannt	Unbekannt	5	-

#### **4.2.3.2 Insel-positive und negative *H. hepaticus*-Stämme führen zu einer unterschiedlich starken Hepatitis im Mausmodell**

Da die Pathologien der Mäuse, aus denen HHGI1-positive und negative Stämme isoliert wurden, eine Rolle der HHGI1-Insel in der Pathogenese von *H. hepaticus* untermauerten, wurden der HHGI1-positive Stamm 3B1 und die beiden HHGI1-negativen Stämme 96-1809 (=HhNet) und 96-284 (=HhG) im Mausmodell eingesetzt. Diese Experimente wurden in einer Kooperation am MIT (Cambridge, Massachusetts) in der Gruppe von James G. Fox durchgeführt. Dabei wurden männliche und weibliche A/JCr-Mäuse mit den verschiedenen *H. hepaticus*-Stämmen infiziert, nach 3 oder 6 Monaten getötet und die Pathologie in der Leber evaluiert. Dabei zeigte sich, dass eine Infektion mit *H. hepaticus* 3B1 zu einer stärkeren Kolonisation führt als die Infektion mit HhNet oder HhG (Abb. 12 A). Nach 6 Monaten konnte ein stärkerer Grad einer Hepatitis in der Leber nach Infektion mit 3B1 als nach Infektion mit







**Abb. 13. Pathologie der Leber von A/JCr-Mäusen nach 6-monatiger Infektion mit *H. hepaticus*.** (A) Leichte mononukleare Hepatitis nach Infektion mit HhNet. (B) Leichte Entzündung in der Leber nach Infektion mit HhG. (C) Starke Entzündung mit Bildung von Lymphomfollikeln, Transmigration des Gallenganges und einer erhöhten Anzahl an Leukozyten nach Infektion mit 3B1.

#### 4.2.4 Konstruktion von Mutanten in der HHGI1-Pathogenitätsinsel

Die bisherigen Ergebnisse, welche mit *H. hepaticus*-Stämmen gewonnen wurde, denen die HHGI1-Pathogenitätsinsel fehlt, sprachen dafür, dass diese eine Rolle in der Pathogenität von *H. hepaticus* spielt. Deshalb sollten isogene Mutanten von ausgewählten Genen beziehungsweise von größeren Bereichen in der HHGI1-Insel konstruiert werden.

##### 4.2.4.1 Konstruktion der Mutante I1

Es wurde eine Knockoutmutante der Gene HH0250 bis HH0268, welche in der HHGI1-Insel liegen, in dem sequenzierten Stamm ATCC 51449 hergestellt. Dieser Bereich wurde ausgewählt, da er zwei der vier identifizierten Gene, welche für Proteine mit Homologie zu Vir-Proteinen kodieren, nämlich VirB10 und VirB4, enthält. Außerdem fehlen die Gene dieses Teils der Insel großteils in allen Stämmen mit einer nicht komplett deletierten HHGI1-Insel. Dies sprach dafür, dass diesem Teil der HHGI1-Insel eine erhöhte Bedeutung für die HHGI1-abhängig durch *H. hepaticus* ausgelöste Pathologie innewohnt.

Für die Herstellung einer Insertionsmutante wurden zuerst jeweils 5' und 3' von dem zu deletierenden Bereich etwa 2.000 bp mit dem Primern hep1P1fw und hep1P1rv beziehungsweise hep1P2fw und hep1P2rv amplifiziert und anschließend mit BglII geschnitten (Abb. 14). Die Produkte der Restriktionsverdau wurden ligiert und das Ligationsprodukt mit KpnI geschnitten. Nach dem Restriktionsverdau wurde das Produkt in einen mit KpnI-geschnittenen pUC18-Vektor kloniert. Das entstandene Plasmid wurde mit BglII geschnitten, dephosphoryliert und mit der BamH1-geschnittenen Cat-Kassette ( $Cm^R$ ) ligiert. Das hiermit erhaltene Plasmid wurde durch Elektroporation in 3B1 transformiert, woraus sich durch homologe Rekombination eine Mutante ergab, in der die Gene HH0250 bis HH0268 durch die CAT-Kassette aus *C. coli* ersetzt waren. Die Mutante wurde durch Empty-Site PCRs mit den Primern hep1P1fw und hep1P2rv überprüft. Im Wildtypstamm erhält man dabei kein PCR-Produkt, da das Amplifikat mit 26.169 bp zu lang war. Für die Mutante erhält man dagegen ein PCR-Produkt mit einer Länge von 4.900 bp. Außerdem wurden PCRs zur

Amplifikation der Gene HH0251 (HH251\_1 und HH251\_2), HH0255 (HH255\_1 und HH255\_2) und HH0261 (HH261\_1 und HH261\_2) durchgeführt. Wie erwartet, erhielt man Amplifikate für diese PCRs, wenn genomische DNA des Wildstammes eingesetzt wurde. Wenn jedoch genomische DNA der Mutante eingesetzt wurde, erhielt man kein Amplifikat, da diese Gene in der Mutante deletiert sind.

Die Mutante wurde mikroskopisch auf Veränderungen in der Morphologie untersucht. Es zeigte sich jedoch keine morphologische Veränderung gegenüber dem Wildtypstamm. Ebenfalls zeigte sich kein Unterschied in der Wachstumsrate.

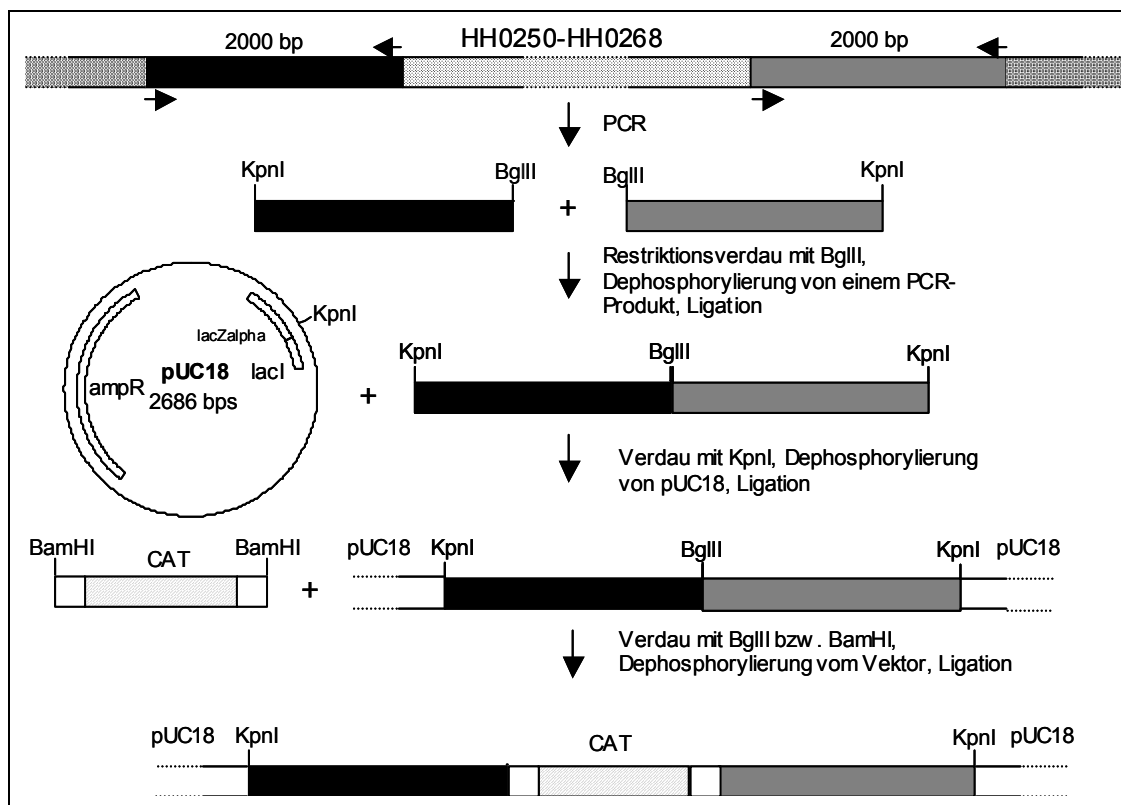


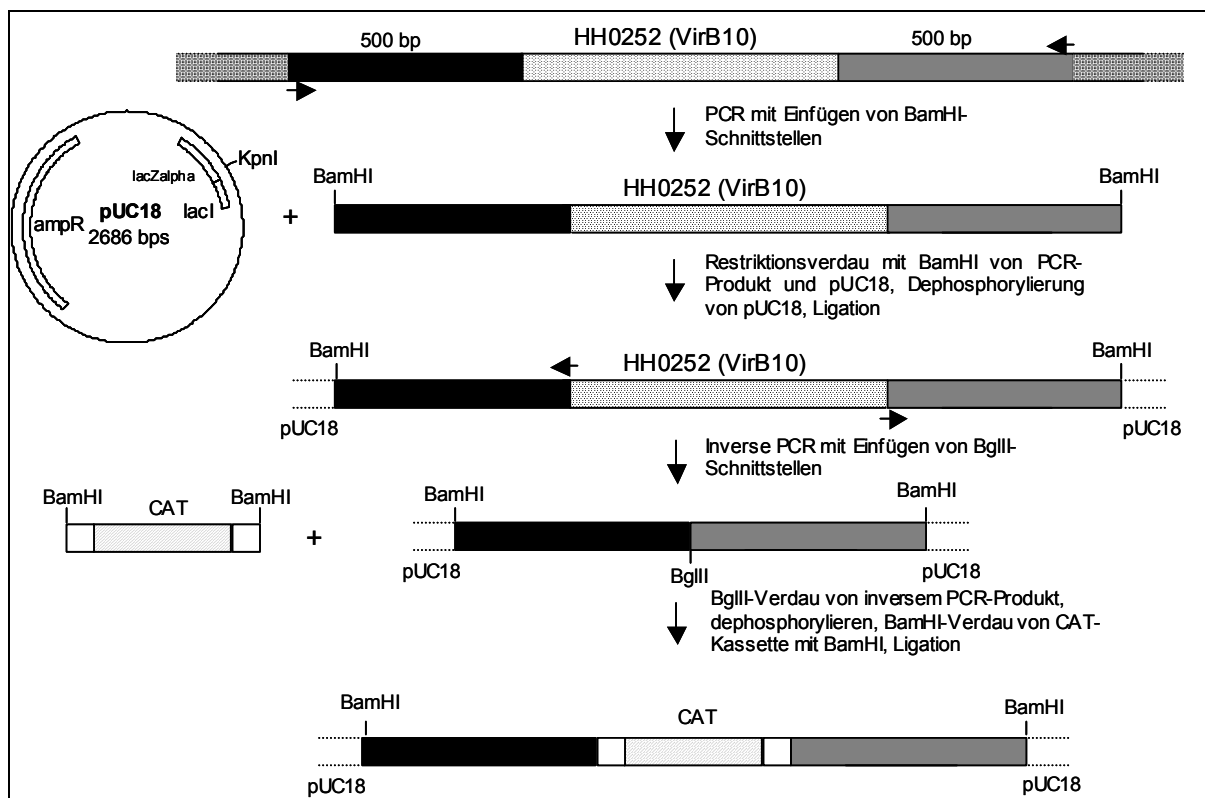
Abb. 14. Schema der Konstruktion der I1-Mutante.

#### 4.2.4.2 Konstruktion der Mutanten in den *virB4*- und *icmF*-homologen Genen der HHGI1-Insel

Neben der I1-Mutante wurden auch Mutanten in HH0252, welches Homologie zu *virB10* und *icmF* aufweist und HH0260, welches Homologie zu *virB4* aufweist, konstruiert. Diese Gene wurden ausgewählt, weil sie sehr wahrscheinlich Komponenten des postulierten TypIV-Sekretionssystems der HHGI1-Insel sind. Für die Mutagenese von HH0252 wurde zuerst das Gen selber und etwa 500 bp 5' und 3' des Gens mit den Primern HH\_IcmF\_1 und HH\_IcmF\_2 amplifiziert (Abb. 15). Das Amplifikat wurde in die BamHI-Schnittstelle von pUC18 kloniert. Von dem erhaltenen Plasmid wurde eine inverse PCR mit den Primern HH\_IcmF\_3 und HH\_IcmF\_4 durchgeführt, durch welche ein Großteil des Gens HH0252

deletiert wurde. Das Amplifikat wurde mit BglII verdaut und die mit BamHI verdaute CAT-Kassette aus *C. coli* wurde hineinkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde dann zur Mutagenese von *H. hepaticus* 3B1 verwendet. Die erhaltene Mutante wurde kontrolliert, indem eine PCR mit den Primern HH\_IcmF\_1 und HH\_IcmF\_2 durchgeführt wurde. Dies ergab für den Wildstamm ein Produkt von 4.681 bp, während man für die Mutante eine Größe von etwa 2.250 bp erhielt.

Die Mutante in dem Gen HH0260, welches für ein Protein mit Homologie zu *virB4* kodiert, wurde auf dem gleichen Weg wie die Mutante in HH0252 hergestellt. In diesem Fall wurde jedoch nur ein kleiner Teil von 126 bp in dem Gen deletiert und die CAT-Kassette in diese Deletion hineinkloniert. Es wurden ebenfalls etwa 500 bp 5' und 3' der Insertionsstelle der CAT-Kassette amplifiziert. Die erste PCR wurde mit den Primern HH\_VirB4\_1 und HH\_VirB4\_2 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in die BamHI-Schnittstelle des pUC18-Vektors kloniert. Von diesem neuen Vektor wurde eine inverse PCR mit den Primern HH\_VirB4\_3 und HH\_VirB4\_4 durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit BglII verdaut und in die mit BamHI-verdaute CAT-Kassette hineinkloniert. Dieser Vektor wurde zur Transformation von *H. hepaticus* 3B1 durch Elektroporation benutzt. Die erhaltenen Klone wurden durch eine PCR mit den Primern HH\_VirB4\_1 und HH\_VirB4\_2 überprüft. Dabei erhielt man für den Wildstamm ein Produkt von 1.295 bp, während man für die Mutante ein Produkt von 2.100 bp erhielt.



**Abb. 15. Schema der Konstruktion der Mutante in dem Gen HH0252 (*virB10*).** Die Mutante in dem Gen HH0260 (*virB4*) wurde analog dazu konstruiert.

Beide Mutanten wurden mikroskopisch untersucht. Dabei zeigten sich jedoch wie erwartet keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zum Wildstamm. Ebenfalls zeigten sich wie bei der I1-Mutante keine Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit.

#### **4.3 Aufbau von Zellkulturmodellen für die *H. hepaticus*-Infektion**

Da *H. hepaticus* bisher meist in *in vivo*-Modellen benutzt wurde, existierte noch kein vernünftiges Modell für die Untersuchung von *H. hepaticus in vitro*. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit geeignete Zellkulturmodelle für *H. hepaticus* entwickelt. Die Zellen wurden dabei näher charakterisiert und deren Wechselwirkung mit *H. hepaticus* untersucht. Dieses Modell wurde benutzt, um die durch *H. hepaticus* ausgelöste proinflammatorische Antwort näher zu charakterisieren, als Ergänzung zu *in vivo*-Untersuchungen der HHGI1-Insel, und um immunsuppressive Eigenschaften von *H. hepaticus* näher zu charakterisieren.

##### **4.3.1 In dieser Arbeit verwendete Zelllinien**

Für die Untersuchung von *H. hepaticus* mit Zellen des natürlichen Habitats wurde die murine immortalisierte intestinale Epithelzelllinie m-IC<sub>c2</sub> verwendet. Diese Zelllinie wurde aus dem Kryptenepithelium des Dünndarms einer L-PK/TAG1-Maus isoliert (Bens *et al.*, 1996). Sie enthält keine Mutationen außer den viralen Onkogenen SV40-large und small T-antigenen unter der Kontrolle des Promotors der Pyruvatkinase, welche die Proliferation der Zellen anregen. Somit stellt diese Zelllinie keine Krebszelllinie dar. In Kultur bildet sie eine laterale und baso-laterale Seite und kryptenähnliche Strukturen aus. Außerdem weist sie u.a. auch eine für intestinale Epithelzellen typische Enzymproduktion auf. Da *H. hepaticus* sekundär auch in die Leber des Wirtsorganismus einwandern kann, wurde mit der Zelllinie NCTC Klon 1469 eine Hepatozytenzelllinie verwendet. Diese Zelllinie stammt aus dem Epithelium der Leber einer C3H/An-Maus, welche empfänglich für eine durch *H. hepaticus* ausgelöste pathologische Erkrankung der Leber ist (Nakagawa *et al.*, 1995, Mendenhall *et al.*, 1984). Es wurde ursprünglich auch die Zelllinie Hepa-1c1c7 benutzt, welche von einer C57L-Maus stammt (Merchant *et al.*, 1992). C57L-Mäuse entwickeln nach Infektion mit *H. hepaticus* keine Erkrankungen der Leber. Da *H. hepaticus* nur eine geringe Adhärenz an diese Zelllinie zeigte, wurden Experimente mit dieser Zelllinie aber nicht weiterverfolgt und werden in dieser Arbeit nicht dargestellt. Des Weiteren wurde mit Caco2 eine humane Adenokarzinomzelllinie aus dem Kolon verwendet (Trainer *et al.*, 1988). Um die Interaktion von *H. hepaticus* mit Zellen des Immunsystems zu untersuchen, wurde die murine Makrophagenzelllinie J774 verwendet, welche aus einer weiblichen Balb/c-Maus stammt (Ralph und Nakoinz, 1977).

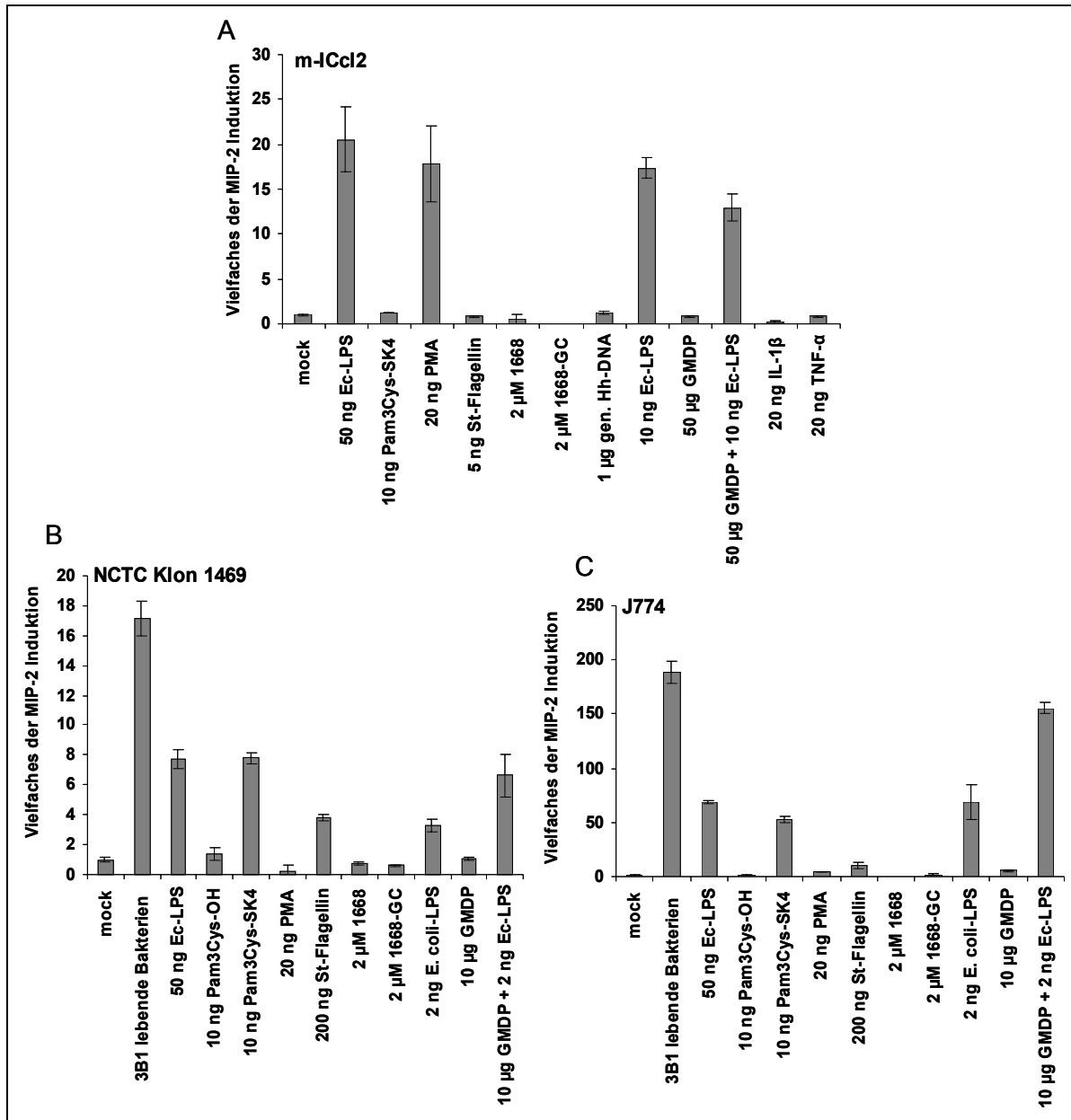
#### 4.3.2 Charakterisierung von Zelllinien in Bezug auf Liganden für Mustererkennungsrezeptoren

Eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen spielt die Erkennung und Aktivierung der Zellen durch PAMPs. Deshalb wurden die Zellen mit bekannten Liganden von einigen Mustererkennungsrezeptoren koinkubiert. Dazu wurden folgende Liganden benutzt: Pam3Cys-SK<sub>4</sub> (TLR2-Ligand) und das inaktive Pam3Cys-OH, *E. coli*-LPS (TLR4-Ligand), *S. typhimurium*-Flagellin (TLR5-Ligand), das Oligonukleotid CpG-ODN 1668 (TLR9-Ligand) und das inaktive Kontrollnukleotid 1668-GC und N-Acetyl-D-Glucosaminy-( $\beta$  1,4)-N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamine (GMDP; NOD2-Ligand). Des Weiteren wurden als Stimulus die Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie der unspezifischere Stimulus Phorbolmyristataacetat (PMA) verwendet. Dieser führt zu einer ähnlichen Aktivierung von Zellen wie Liganden von Toll-ähnlichen Rezeptoren durch Aktivierung der Proteinkinase C. Außerdem wurden die Zellen mit *H. hepaticus* und genomischer DNA von *H. hepaticus* koinkubiert.

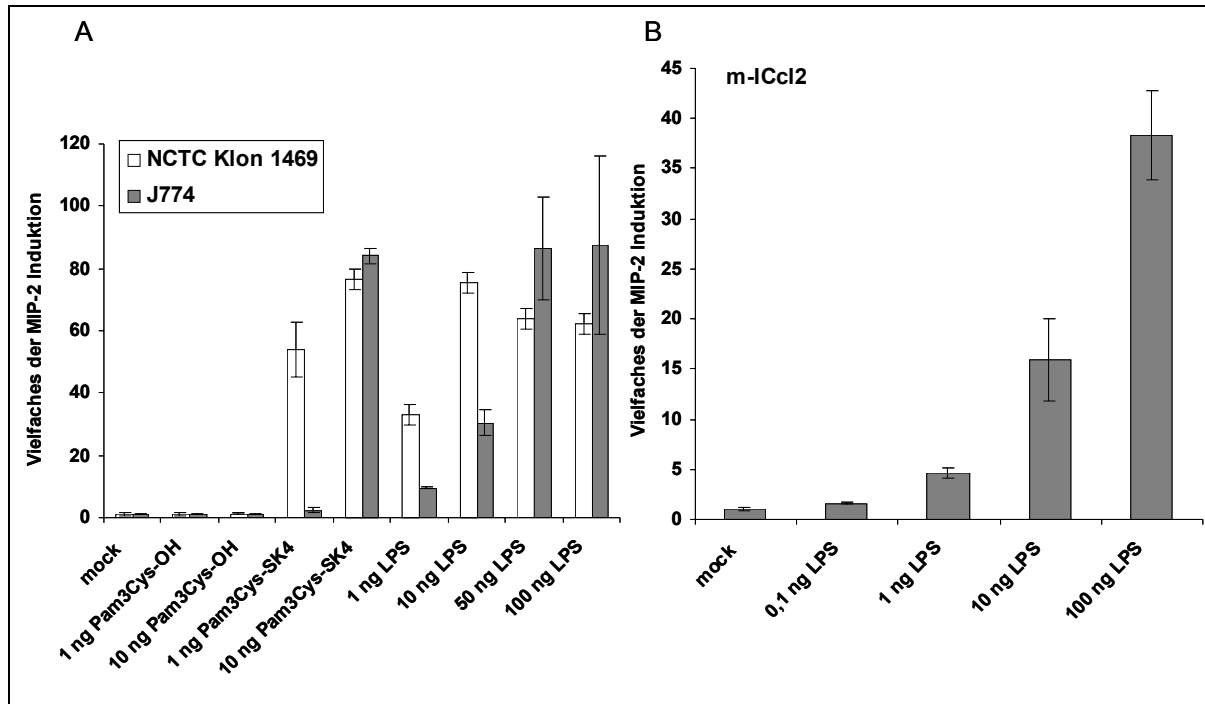
Als Marker für die Induktion einer proinflammatorischen Antwort wurde das Cytokin MIP-2 verwendet. Eine starke Induktion der Expression von MIP-2 erfolgte sowohl bei der Makrophagenzelllinie J774 als auch bei der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 durch Pam3Cys-SK<sub>4</sub> (TLR2-Ligand), *E. coli*-LPS (TLR4-Ligand) und *S. typhimurium*-FliC (TLR5-Ligand, Abb. 16). Beide Zelllinien wurden durch das synthetische Oligonukleotid CpG-ODN 1668, ein TLR9-Ligand, nicht induziert. PMA führte ebenfalls nur zu einer geringen Induktion von NCTC Klon 1469 und J774. Der synthetische NOD2-Ligand GMDP induzierte beide Zelllinien kaum, wenn er alleine angewandt wird. In Kombination mit *E. coli*-LPS erhielt man dagegen eine verstärkte Induktion von MIP-2 im Vergleich zur alleinigen Anwendung von *E. coli*-LPS. Dabei wurde die maximale Stimulierung durch *E. coli*-LPS und Pam3Cys-SK<sub>4</sub> bei der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 im Vergleich zur Makrophagenzelllinie J774 schon durch niedrigere Konzentrationen erreicht (Abb. 17 A). Dies war deutlich bei der Induktion mit *E. coli*-LPS zu erkennen. Bei den Hepatozyten erfolgte die maximale Induktion schon mit 10 ng LPS, während bei den Makrophagen erst mit 50 ng LPS ein Sättigungsniveau erreicht wurde. Ebenfalls wurden die Makrophagen erst mit 10 ng Pam3Cys-SK<sub>4</sub> deutlich induziert, während im Falle der Hepatozyten schon mit 1 ng eine deutliche Stimulation erreicht wurde.

Nach Koinkubation mit *E. coli*-LPS oder Pam3Cys-SK<sub>4</sub> erhielt man in den Hepatozyten und Makrophagen nach 2 h zum ersten Mal eine deutlich nachweisbar erhöhte Menge an MIP-2 (Abb. 18). Die Konzentration an MIP-2 stieg dann bis zu einer Koinkubationszeit von 24 h an. Ebenfalls eine starke Aktivierung erhielt man, wenn man die Zellen mit *H. hepaticus* koinkubiert. Dabei erhielt man nach Koinkubation mit lebenden *H. hepaticus* als auch nach Koinkubation mit Lysaten von *H. hepaticus* eine ähnlich starke Aktivierung (ausführlicher behandelt in Abschnitt 4.3.4.3)

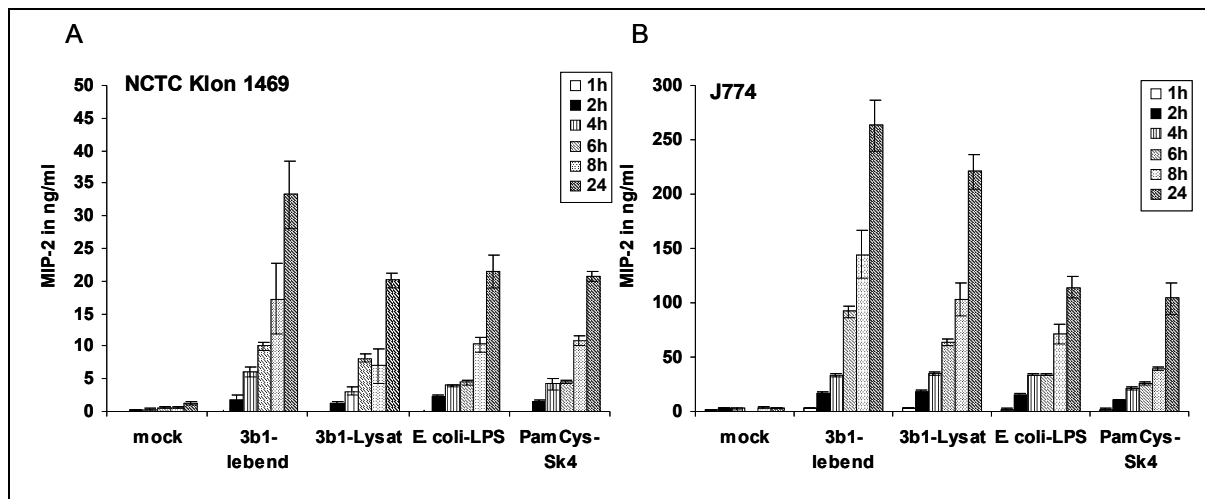
Die gleichen Ergebnisse erhielt man auch, wenn man anstelle von MIP-2 die Konzentration von IL-6 bestimmt, wobei IL-6 erst deutlich später exprimiert wurde (nicht gezeigt). Erst nach etwa 6 h war IL-6 deutlich im Überstand nachzuweisen. Außerdem waren die Konzentrationen auch deutlich niedriger als bei der Messung von MIP-2 und es war keine basale Induktion in unbehandelten Zellen festzustellen.



**Abb. 16. Stimulierbarkeit von murinen Zelllinien durch Liganden von Mustererkennungsrezeptoren.** Die intestinale Epithelzelllinie m-IC<sub>cl2</sub> (A), die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 (B) und die Makrophagenzelllinie J774 (C) wurden mit den folgenden Liganden von Mustererkennungsrezeptoren für 4 h (m-IC<sub>cl2</sub>) beziehungsweise für 6 h (NCTC Klon 1469 und J774) kokubiert: *E. coli*-LPS, Pam3Cys-SK<sub>4</sub>, *S. typhimurium*-FlIC, Oligonukleotid 1668 und das Kontrolloligonukleotid 1668-GC, genomische *H. hepaticus* DNA, GMDP alleine oder zusammen mit *E. coli*-LPS, *H. hepaticus* 3B1 mit MOI 50 und den Cytokinen IL-1β und TNF-α. Die Konzentration von MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt.



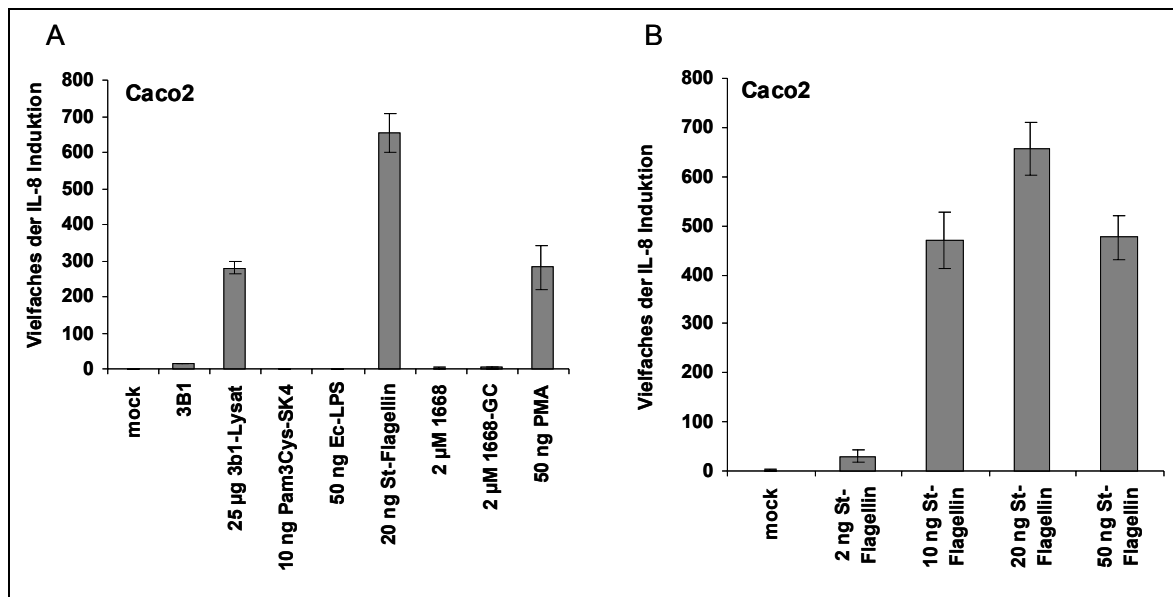
**Abb. 17. Konzentrationsabhängigkeit der MIP-2-Induktion.** (A) NCTC Klon 1469 und J774-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Pam3Cys-SK<sub>4</sub> beziehungsweise dem inaktiven Pam3Cys-OH und verschiedenen Konzentrationen von *E. coli*-LPS für 6 h kokubiert. (B) m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *E. coli*-LPS für 6 h kokubiert. Die Konzentration an MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt.



**Abb. 18. Zeitverlauf der Stimulation von J774 und NCTC Klon 1469.** Die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 (a) und die Makrophagenzelllinie J774 (b) wurden in Standardmedium für 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h mit folgenden Stimulantien kokubiert: lebende 3B1 mit MOI 50, 25 µg 3B1-Lysat, 50 ng *E. coli*-LPS und 50 ng Pam3Cys-SK<sub>4</sub>. Die MIP-2-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde durch ELISA bestimmt.

Die intestinale Epithelzelllinie m-IC<sub>cl2</sub> konnte dagegen nur durch den TLR4-Agonisten *E. coli*-LPS deutlich induziert werden (Abb. 16 A). Für die Induktion der m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen durch *E. coli*-LPS war 1 ng für eine signifikante Stimulation ausreichend, wobei auch mit 100 ng *E. coli*-LPS noch keine Sättigung erreicht wurde (Abb. 17 B). Der TLR2-Agonist Pam3Cys-SK<sub>4</sub>

und der TLR5-Agonist *S. typhimurium*-FliC führten dagegen nur zu einer geringen Induktion dieser Zelllinie. Das Oligonukleotid CpG-ODN 1668, ein TLR9-Ligand, und genomische DNA von *H. hepaticus* führten ebenfalls zu keiner signifikanten Induktion der MIP-2-Konzentration im Überstand gegenüber mock-infizierten Zellen. Auch durch die Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurden die Zellen kaum stimuliert. Der NOD2-Ligand GMDP führte zu keiner Stimulation der Zellen und es konnte auch kein synergistischer Effekt mit *E. coli*-LPS beobachtet werden. Dagegen führte PMA zu einer starken Induktion von MIP-2. Es konnte keine Sekretion der Cytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  nach Induktion in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 19. Induktion von Caco-2 Zellen durch Liganden von Mustererkennungsrezeptoren.** (A) Caco2-Zellen wurden mit *H. hepaticus* 3B1 (MOI 50), 25 µg 3B1-Lysat, 10 ng Pam3Cys-SK<sub>4</sub>, 50 ng *S. typhimurium*-FliC, 2 µM synthetischem mausspezifischem CpG-ODN 1668, seinem Kontrolloligonukleotid 1668-GC und 50 ng PMA für 6 h koinkubiert. (B) Caco2-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *S. typhimurium*-FliC für 6 h koinkubiert. Die Überstände wurden nach Ende der Koinkubation abgerntet und die Konzentration von IL-8 wurde durch einen ELISA bestimmt.

Für die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2 wurde das Cytokin IL-8 anstelle von MIP-2 als Marker einer proinflammatorischen Antwort gemessen. Diese Zelllinie konnte weder durch den TLR4-Liganden *E. coli*-LPS noch durch den TLR2-Liganden Pam3Cys-SK<sub>4</sub> wesentlich induziert werden (Abb. 19 A). Dagegen reagierte diese Zelllinie deutlich auf den TLR5-Liganden *S. typhimurium*-FliC. Um die Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation von Caco2-Zellen mit *S. typhimurium*-Flagellin zu bestimmen, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Flagellin koinkubiert. Dabei erhielt man mit 2 ng Flagellin eine deutliche Stimulation und mit 20 ng wurde eine Sättigung erreicht (Abb. 19 B). Ebenfalls erhielt man eine relativ starke Stimulation nach Koinkubation mit PMA. Im Gegensatz zu der murinen intestinalen Zelllinie m-IC<sub>cl2</sub> wurden Caco2-Zellen auch durch *H. hepaticus* deutlich



stimuliert, wobei die Stimulation durch Lysate deutlich stärker als durch lebende Bakterien war.

**Tab. 18. Übersicht über die Stimulierbarkeit verschiedener Zelllinien durch verschiedene Liganden.** Die relative Stärke der Induktion des Markercytokins MIP-2 (m-IC<sub>cl2</sub>, NCTC Klon 1469, J774) bzw. IL-8 (Caco2) ist durch folgende Bezeichnung angegeben: - keine Induktion, +/- geringfügige Induktion bei hohen Konzentrationen, + leichte Induktion, ++ starke Induktion, +++ sehr starke Induktion, n. b.: nicht bestimmt.

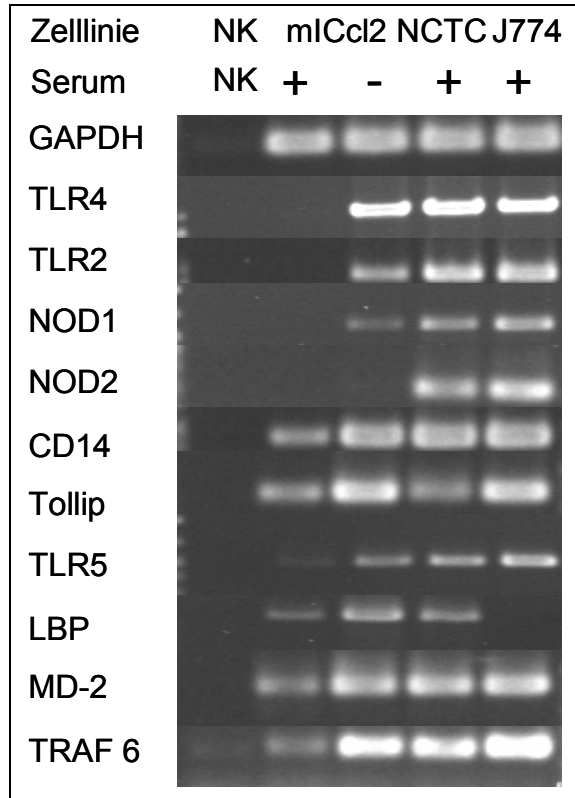
Ligand	m-IC <sub>cl2</sub>	NCTC Klon 1469	J774	Caco2
Pam3Cys-SK <sub>4</sub>	+/-	++	++	-
<i>E. coli</i> -LPS	+++	++	++	-
<i>S. typhimurium</i> -Flagellin	-	++	+	+++
CpG-ODN	-	-	-	n. b.
IL-1 $\beta$	+/-	+/-	+/-	+++
TNF- $\alpha$	+/-	+/-	+/-	+
Phorbolmyristataacetat	+++	+/-	+	++
lebende <i>H. hepaticus</i>	+	+++	+++	+
<i>H. hepaticus</i> -Lysat	+	+++	+++	+++
<i>H. hepaticus</i> -LPS	+	++	++	-

#### 4.3.3 Expression von Mustererkennungsrezeptoren und Proteinen der Signaltransduktion in murinen Zelllinien

Um einen Einblick in die Verfügbarkeit von Mustererkennungsrezeptoren und Proteinen, welche eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen, zu erhalten, wurden PCRs von cDNAs aus Gesamt-RNA (RT-PCR) von unbehandelten Kontrollzellen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 als auch die Makrophagenzelllinie J774 die Toll-ähnlichen Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR5 exprimieren. Die TLR4-Korezeptoren CD14, LPS-Bindeprotein (LBP) und MD-2 als auch TRAF6, ein wichtiger Regulator des TLR-Signalweges und der negative Regulator Tollip wurden ebenfalls exprimiert. Des Weiteren wurden auch die Nod-Rezeptoren NOD1 und NOD2 exprimiert.

In der murinen Intestinalzelllinie m-IC<sub>cl2</sub> wurden dagegen unter serumhaltigen Bedingungen weder TLR2, TLR5 noch NOD1 und NOD2 exprimiert. Dies korrelierte mit der nicht erfolgenden Stimulierung dieser Zellen durch den TLR2-Liganden Pam3Cys-SK<sub>4</sub> und den TLR5-Liganden *S. typhimurium*-Flagellin. Ebenfalls konnte in dieser Zelllinie im Gegensatz zu NCTC Klon 1469 und J774 kein synergistischer Effekt zwischen dem NOD2-Liganden GMDP und dem TLR4-Liganden *E. coli*-LPS gefunden werden, was mit der nicht vorhandenen Expression von NOD2 in dieser Zelllinie erklärt werden konnte. Dagegen wurden die Korezeptoren von TLR4 (CD14, LBP und MD-2) allesamt exprimiert. Ebenfalls wurden TRAF6 und Tollip exprimiert. Wenn die Zellen vor dem Anbau in serumfreiem Medium gehalten wurden, wurden die meisten untersuchten Gene stärker exprimiert.

Besonders für TLR4 war dies deutlich zu sehen. Außerdem konnte in den in serumfreiem Medium gehaltenen Zellen auch eine Expression von NOD1, TLR2 und TLR5 nachgewiesen werden.



**Abb. 20. Expression von Mustererkennungsrezeptoren und wichtigen Proteinen in der Signaltransduktion.** Von unbehandelten Kontrollzellen (im Falle von m-ICCl<sub>2</sub> wurden die Zellen zuvor in Medium mit 2% Serum und serumfreiem Medium inkubiert) wurde Gesamt-RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert. Von dieser cDNA wurden PCRs (jeweils 40 Zyklen) mit genspezifischen Primern durchgeführt.

#### 4.3.4 Interaktion der murinen Zelllinien mit *H. hepaticus*

##### 4.3.4.1 Adhärenz von *H. hepaticus* an murine Zelllinien

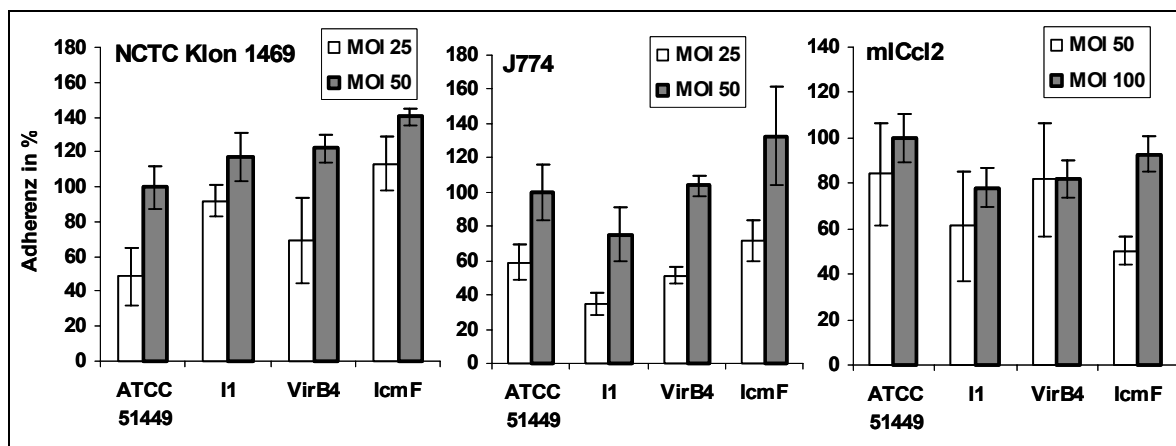
Eine wichtige Rolle für die Interaktion von Bakterien mit Wirtszellen spielt die Adhärenz an die Zellen. Deshalb wurde untersucht, in wieweit *H. hepaticus* an die in dieser Studie verwendeten Zellen adhärert. Dazu wurden sowohl eine Hochdurchsatzuntersuchung in 96-Well-Mikrotiterplatten als auch Immunfluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung der Adhärenz durchgeführt.

##### 4.3.4.1.1 Bestimmung der Adhärenz durch eine Hochdurchsatzuntersuchung

In einem Hochdurchsatzansatz wurde die Adhärenz des Wildtypstammes ATCC 51449, der I1-Mutante und der Einzelmutanten in *virB4* und *icmF* an NCTC Klon 1469, J774 und m-IC<sub>cl2</sub> verglichen. Dazu wurden die Bakterien mit einer MOI von 25, 50 und/oder 100 mit den Zelllinien für 1 h koinkubiert. Anschließend wurden die nichtadhärenten Bakterien abgewa-

schen und die Zellen mit den adhärenen Bakterien mit Paraformaldehyd fixiert. Die Bakterien wurden mit einem *H. hepaticus*-spezifischem Antikörper markiert und mit einem an Avidin-gekoppeltem sekundärem Antikörper angefärbt. Durch eine Farbreaktion wurde schließlich die Menge an adhärenen Bakterien bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Bakterien an alle drei Stämme adhären, da sich in allen drei Fällen eine starke Farbreaktion zeigte (Abb. 21). Trotz kleiner Unterschiede aufgrund experimenteller Schwankungen ergab sich bei allen Zelllinien kein signifikanter Unterschied zwischen der Adhärenz des Wildtypstammes und der Mutanten.



**Abb. 21. Bestimmung der Adhärenz im 96-Well-Mikrotiterplatten.** Die Zelllinien NCTC Klon 1469, J774 und m-IC<sub>cl2</sub> wurden mit *H. hepaticus* ATCC 51449 und den Mutanten I1, *virB4* und *icmF* für 1 h koinkubiert. Nach dem Abwaschen nichtadhärenen Bakterien wurden die Zellen mit den adhärenen Bakterien fixiert und die Bakterien mit einem *H. hepaticus*-spezifischem Antikörper und einem geeigneten Sekundärantikörper, an welchen ein Peroxidaseprotein gekoppelt ist, markiert und durch einen Farbttest nachgewiesen. Die Adhärenz des Referenzstammes ATCC 51449 bei der höheren MOI wurde dabei auf 100% gesetzt und die Adhärenz der Mutanten in Relation dazu angegeben.

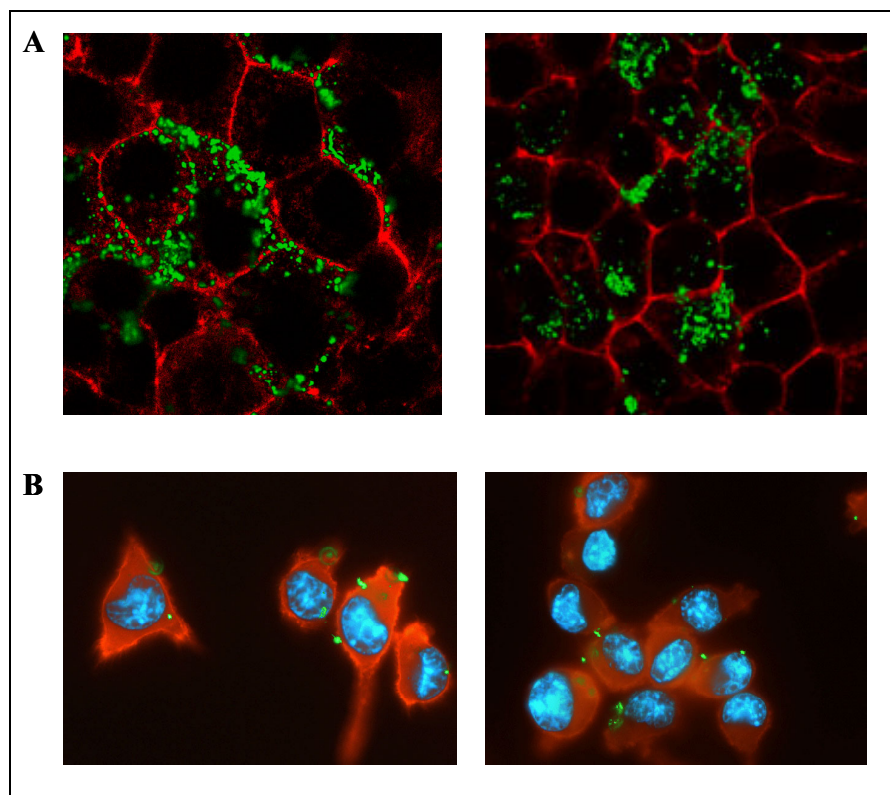
#### 4.3.4.1.2 Bestimmung der Adhärenz durch Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Adhärenz von *H. hepaticus* an die verschiedenen Zelllinien wurde ebenfalls durch Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Dazu wurden die Zellen, welche auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen angezogen wurden, ebenfalls mit *H. hepaticus* koinkubiert und die nichtadhärenen Bakterien nach einer definierten Zeit abgewaschen. Die Bakterien wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen *H. hepaticus* und eines Sekundärantikörpers, welcher mit Alexa-Fluor<sup>488</sup> konjugiert ist, nachgewiesen. Das Cytoskelett wurde durch Weizenkeimagglutinin, welches an den Fluoreszenzfarbstoff Texas Red gekoppelt ist, angefärbt. Die DNA des Zellkerns wurde durch DAPI angefärbt.

Es zeigte sich eine sehr starke Adhärenz an die intestinale Zelllinie m-IC<sub>cl2</sub>. Dabei zeigten sehr viele Bakterien Adhärenz an die Zell-Zell-Verbindungen, während deutlich weniger Zellen direkt an die Zellmembran auf der Oberfläche der Zellen banden. Die Bakterien waren nicht gleichmäßig verteilt, sondern adhärenen an einigen Stellen besser als an anderen. Dabei waren die Zellen gehäuft an einigen Stellen zu finden und waren in

Aggregaten angeordnet. Die Zellen zeigten dabei keine visuell nachweisbaren Veränderungen nach der Infektion mit *H. hepaticus*. Wenn man mikroskopisch auszählt, wie viele Bakterien durchschnittlich pro Zelle binden, kam man auf etwa 5 Bakterien pro Zelle. Durch die Ungleichverteilung der Bakterien täuschte diese Zahl aber darüber hinweg, dass an einige Zellen extrem viele Bakterien banden, während an andere Zellen überhaupt keine Bakterien banden.

Die Adhärenz an J774 war dagegen deutlich schwächer. Nur wenige adhärenente Bakterien konnten pro Zelle nachgewiesen werden. Dabei konnte eine Fraktionierung und Vergrößerung des Zellkerns festgestellt werden, was vermutlich auf den Einfluss von CDT zurückzuführen ist.



**Abb. 22. Immunfluoreszenzmikroskopie für m-IC<sub>cl2</sub> und J774.** m-IC<sub>cl2</sub> (A) und J774 (B) wurden mit *H. hepaticus* ATCC 51449 koinkubiert. Anschließend wurden nichtadhärenente Bakterien abgewaschen und die Zellen mit den adhärenenten Bakterien mit Paraformaldehyd fixiert. Die Bakterien wurden mit einem *H. hepaticus*-spezifischen Antikörper und einem an Alexa-Fluor<sup>488</sup> gekoppelten Zweitantikörper angefärbt. Die Zellwand wurde mit an Texas-Red gekoppeltem Weizenkeimagglutinin und die DNA des Zellkerns mit DAPI angefärbt. Grün: *H. hepaticus*; rot: Glycoproteine; blau: DNA.

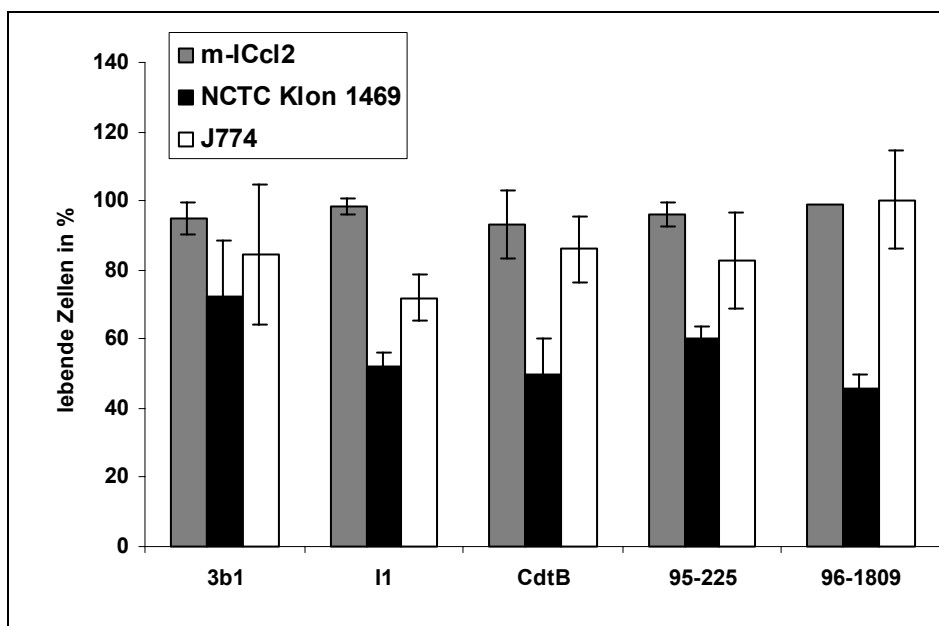
#### 4.3.4.2 Cytotoxischer Einfluss von *H. hepaticus* auf murine Zelllinien

Das Genom von *H. hepaticus* kodiert wie schon dargestellt für das CDT-Toxin. Um den Einfluss der Bakterien im Allgemeinen und CDT im besonderen auf die Überlebensfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurde der cytotoxische Einfluss der Bakterien auf die Zellen betrachtet. Dazu wurde ein Live/Dead-Kit von Molecular Probes verwendet. Die Bakterien

wurden mit den Zellen mit einer MOI von 50 für 24 h koinkubiert und anschließend der Anteil an physiologisch noch aktiven Zellen wie in den Methoden beschrieben bestimmt.

Nach 24 h waren bei der Makrophagenzelllinie J774 noch zwischen 70 und 90% und bei der Hepatozytenzelllinie noch zwischen 50-70% der Zellen physiologisch aktiv (Abb. 23). Dabei ergab sich kein reproduzierbarer signifikanter Unterschied in der Cytotoxizität von *H. hepaticus* zwischen HHGI1-positiven und HHGI1-negativen Stämmen. Ebenfalls zeigte sich keine signifikante Änderung in der Cytotoxizität bei isogenen Mutanten in der HHGI1-Genominsel. Während Kurzzeitinkubationen bis zu 24 h zeigte sich auch keine Veränderung der Cytotoxizität mit Mutanten im *cdtB*-Gen. Dies legt nahe, dass bei Kurzzeitkoinkubationen der Effekt des CDT-Toxins auf die Zellen relativ gering ist.

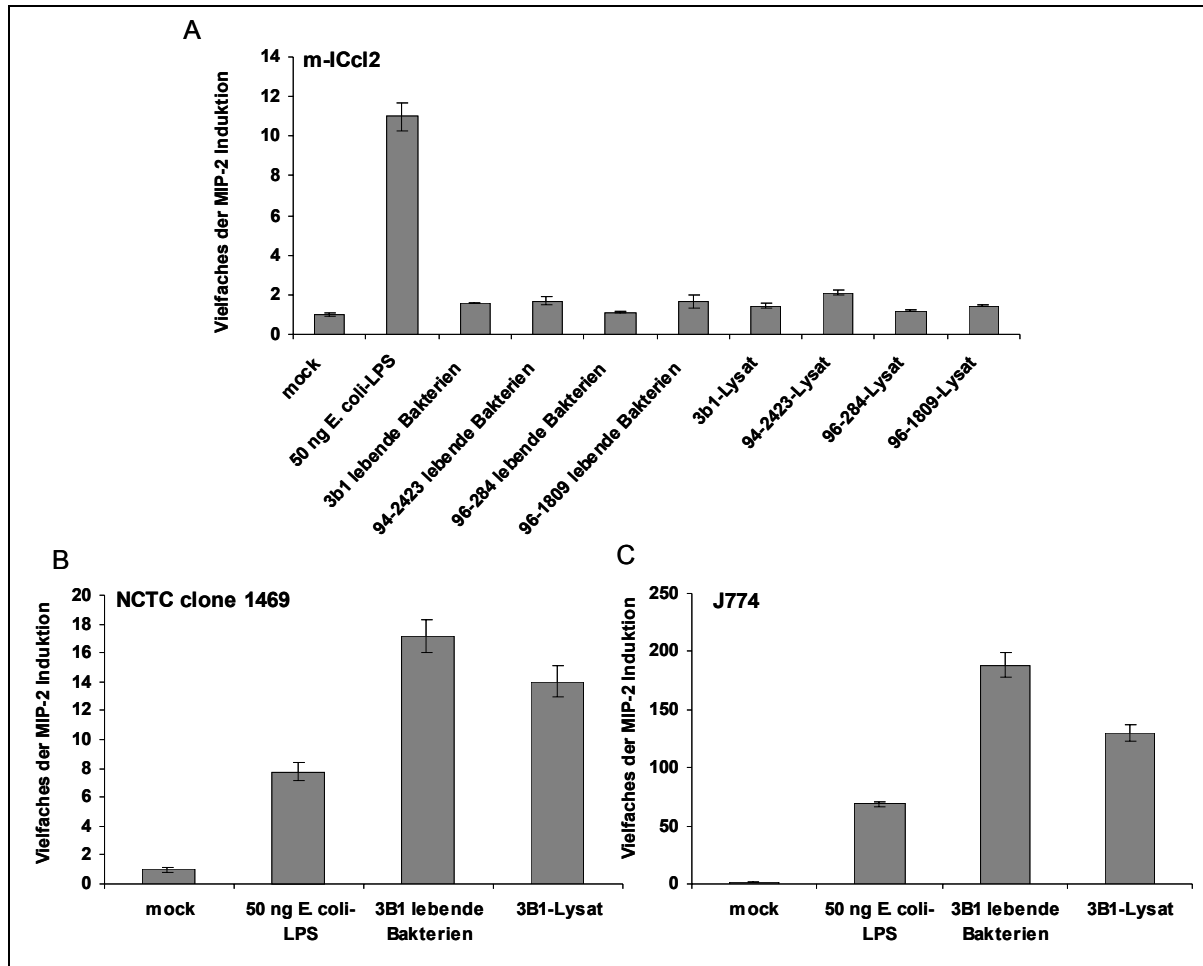
Der Einfluss von *H. hepaticus* auf die physiologische Aktivität der m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen war deutlich geringer als auf die Makrophagen und Hepatozyten. Nach 24 h waren noch fast 100% der Zellen physiologisch aktiv und auch nach 48 h waren noch über 90% der Zellen am Leben. Dies korrelierte auch mit der Beobachtung, dass sich das Aussehen der Zellen nach Koinkubation mit *H. hepaticus* nicht sichtbar verändert.



**Abb. 23. Cytotoxizität von *H. hepaticus*.** *H. hepaticus* 3B1, die I1- und *cdtB*-Mutante, der HHGI1-positive Stamm 95-225 und der HHGI1-negative Stamm 96-1809 wurden mit einer MOI von 50 für 24 h mit den Zelllinien m-IC<sub>cl2</sub>, NCTC Klon 1469 und J774 koinkubiert. Der Prozentsatz an lebenden Zellen wurde durch ein „Live/Dead“-Kit von Molecular Probes wie in den Methoden beschrieben bestimmt.

#### 4.3.4.3 Intestinale epitheliale Mauszellen reagieren nur leicht auf *H. hepaticus*, während Hepatozyten und Makrophagen stark auf *H. hepaticus* reagieren

Nachdem die Stimulation der Zelllinien durch isolierte Liganden von Mustererkennungsrezeptoren untersucht wurde, sollte nun deren Stimulierbarkeit durch *H. hepaticus* gezeigt werden.



**Abb. 24. Stimulierbarkeit muriner Zelllinien durch *H. hepaticus*.** Die intestinale Epithelzelllinie m-IC<sub>cl2</sub> (a), die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 (b) und die Makrophagenzelllinie J774 (c) wurden mit lebenden *H. hepaticus*-Stämmen (MOI 50) oder mit Lysat (25 µg) für 4 h (m-IC<sub>cl2</sub>) beziehungsweise für 6 h (NCTC Klon 1469 und J774) kokkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen zusätzlich mit *E. coli*-LPS kokkubiert. Die Konzentration an MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass die intestinale Epithelzelllinie m-IC<sub>cl2</sub> sowohl durch lebende Bakterien als auch durch Lysate trotz der guten Adhärenz von *H. hepaticus* an diese Zelllinie kaum angeregt wird (Abb. 24 A). Es war durch alle getesteten Stämme nur eine leichte Erhöhung der Sekretion von MIP-2 gegenüber unbehandelten Zellen festzustellen. Es wurden auch Mutanten von *H. hepaticus* getestet, wobei diese ebenso wenig zu einer deutlichen Stimulation der Zellen führten (nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu wurden sowohl die J774-Makrophagen als auch die NCTC Klon 1469-Hepatozyten durch lebende *H. hepaticus* als auch durch Lysate stark aktiviert (Abb. 24

B und C). Dabei wurden die Hepatozyten schon durch niedrigere Infektionsdosen als die Makrophagen maximal stimuliert. Bei den Hepatozyten war die Sättigungsgrenze schon bei einer MOI von 5 erreicht, während bei den Makrophagen selbst bei einer MOI von 100 noch keine Sättigung festzustellen war. Bei beiden Zelllinien war die Sekretion von MIP-2 nach Koinkubation mit *H. hepaticus* 3B1 bei einer MOI von 50 oder 25 µg Lysat nach zwei Stunden nachweisbar, wobei die Menge an nachweisbarem MIP-2 aber bis zu 24 h anstieg (Abb. 18).

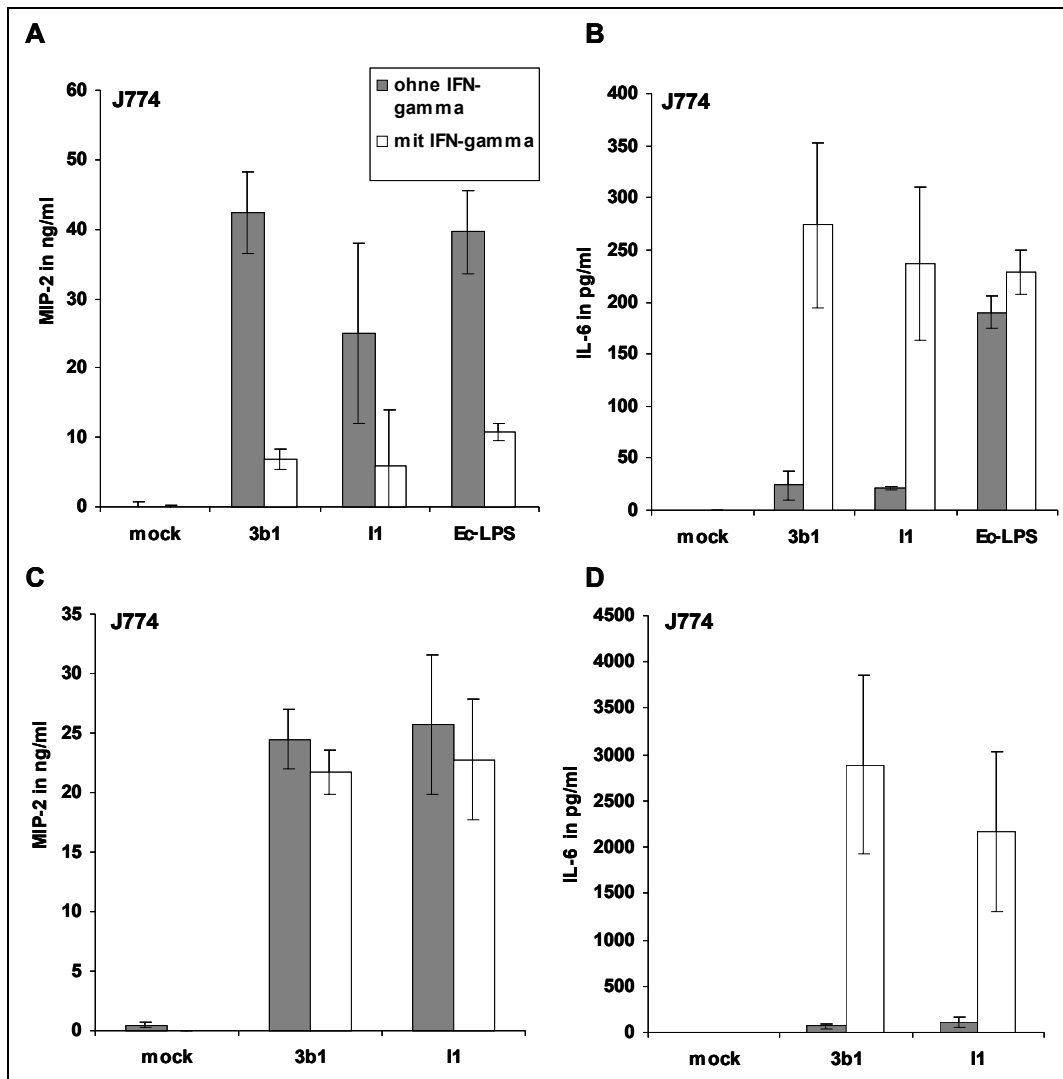
Das gleiche Muster war auch bei der Messung von IL-6 festzustellen. Dabei wurde IL-6 jedoch deutlich später als MIP-2 gebildet. Eine nachweisbare Menge an IL-6 im Überstand war erst nach 4-6 h festzustellen.

#### **4.3.4.3.1 Einfluss von Interferon- $\gamma$ auf die Stimulierbarkeit von J774-Makrophagen**

Makrophagen liegen in der *in vivo*-Situation normalerweise erst in einem nicht aktivierten Zustand vor. Eine Möglichkeit, Makrophagen zu aktivieren, ist die Zugabe von Interferon- $\gamma$ . Deshalb wurde untersucht, ob sich die Stimulierbarkeit der J774-Makrophagen nach Präinkubation mit murinem Interferon- $\gamma$  ändert. Dazu wurden 30 Minuten vor Beginn der Koinkubation mit dem stimulierenden Agens 10 ng/ml Interferon- $\gamma$  in das Medium zugegeben.

Interferon- $\gamma$  selbst führt weder zu einer Induktion von MIP-2 noch IL-6. Bei der Koinkubation mit *H. hepaticus* zeigte sich aber, dass die Auswirkung auf die Menge an gebildetem MIP-2 und IL-6 komplett gegensätzlich ist (Abb. 25). Die Konzentration an MIP-2 war nach Koinkubation mit *H. hepaticus* 3B1 oder der I1-Mutante nach 7 h deutlich geringer, wenn Interferon- $\gamma$  in das Medium zugesetzt wurde. Nach 24 h Koinkubation hatte sich die MIP-2-Konzentration dagegen unabhängig von der Zugabe von Interferon- $\gamma$  weitgehend angeglichen. Interferon- $\gamma$  schien daher die Geschwindigkeit oder Stärke der Induktion von MIP-2 durch *H. hepaticus* zu hemmen. Bei der Koinkubation für 7 h wurde ebenfalls noch 50 ng *E. coli*-LPS zugegeben. Dabei fand man ebenso wie bei der Koinkubation mit *H. hepaticus* eine geringere Menge an MIP-2, wenn zusätzliches Interferon- $\gamma$  in das Medium zugesetzt wurde.

Dagegen wurde IL-6 nach externer Zugabe von murinem Interferon- $\gamma$  deutlich stärker durch *H. hepaticus* induziert. Sowohl nach 7 als auch nach 24 h ist die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Koinkubation mit *H. hepaticus* 3B1 oder der I1-Mutante ohne Zugabe von externem IFN- $\gamma$  sehr gering. Wenn jedoch IFN- $\gamma$  vor der Koinkubation zugegeben wurde, fand man nach 7 h eine etwa 50-fach und nach 16 h sogar eine etwa 100-fach höhere Menge an IL-6. *E. coli*-LPS induzierte die Makrophagen dagegen auch ohne Zugabe von IFN- $\gamma$  relativ stark. Die gemessene IL-6-Konzentration wurde nach 7-stündiger Koinkubation mit 50 ng *E. coli*-LPS durch Zugabe von IFN- $\gamma$  nur geringfügig gegenüber Kontrollzellen ohne Interferon- $\gamma$ -Zugabe erhöht.



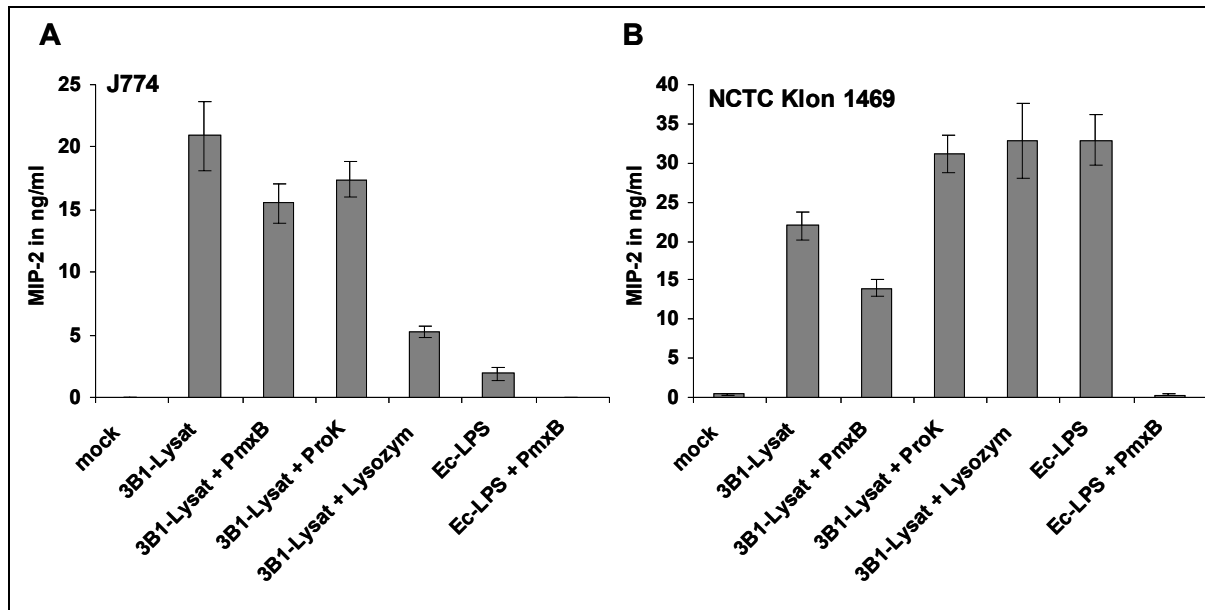
**Abb. 25. Einfluss von Interferon- $\gamma$  auf die Stimulierbarkeit von J774-Makrophagen.** J774-Makrophagen wurden für 7 h (A und B) oder 16 h (C und D) mit *H. hepaticus* 3B1 und der I1-Mutante mit einer MOI von 50 kokultiviert. Für den 7 h-Wert wurden ebenfalls noch 50 ng *E. coli*-LPS eingesetzt. Falls IFN- $\gamma$  zugesetzt wurde, wurde dieses mit einer Konzentration von 10 ng/ml 30 Minuten vor Beginn der Kokultivierung in das Medium zugegeben. Anschließend wurde die Konzentration von MIP-2 (A und C) oder IL-6 (B und D) im Überstand durch einen ELISA bestimmt.

#### 4.3.4.3.2 Einfluss von Proteinase, Lysozym und Polymyxin B auf die *H. hepaticus*-abhängige proinflammatorische Antwort

Da Lipoproteine und Peptidoglykan bedeutende Liganden für Mustererkennungsrezeptoren sind, wurden Lysate von *H. hepaticus* mit Proteinase K und Lysozym verdaut. Proteinase K ist eine endolytische Protease, welche Peptidbindungen an der Carboxylseite von aliphatischen, aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren spaltet (Ebeling *et al.*, 1974). Lysozym spaltet Peptidoglykan in N-Acetyl-D-Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin. Die Lysate wurden für 1 h bei 37 °C mit 200  $\mu$ g/ml Proteinase K bzw. 1 mg/ml Lysozym vorinkubiert. Anschließend wurden Proteinase K und Lysozym für 15 min bei 75 °C inaktiviert. J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten wurden dann für 16 h mit 25  $\mu$ g der behandelten und unbehandelten Lysate kokultiviert. Dabei zeigte sich, dass die Proteinase-



behandlung kaum einen Einfluss auf die MIP-2-Induktion hat. In den Makrophagen führte das Proteinase K-behandelte Lysat zu einer in etwa gleichstarken und in den Hepatozyten zu einer leicht erhöhten MIP-2-Induktion gegenüber unbehandeltem Lysat. Lysozym-behandeltes Lysat führte in den Hepatozyten ebenfalls zu einer leicht verstärkten MIP-2-Sekretion. In den Makrophagen war die MIP-2-Induktion dagegen um etwa 75% reduziert, wenn Lysozym-behandeltes Lysat eingesetzt wurde.



**Abb. 26. Einfluss von Lipoproteinen und Peptidoglykan auf die *H. hepaticus*-abhängige proinflammatorische Antwort.** Je 25 µg Lysat von *H. hepaticus* 3B1 wurde für 1 h bei 37 °C mit 200 µg/ml Proteinase K oder 1 mg/ml Lysozym verdaut. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 75 °C inaktiviert. Ebenso wurden 25 µg 3B1-Lysat bzw. 50 ng *E. coli*-LPS für 1 h bei 37 °C mit 100 µg/ml Polymyxin B behandelt. Anschließend wurden J774- (A) und NCTC Klon 1469-Zellen (B) für 16 h mit je 25 µg behandeltem oder unbehandeltem 3B1-Lysat koinkubiert. Für die Koinkubation der mit Polymyxin B-behandelten Proben wurde während der Koinkubation 1 µg/ml Polymyxin B in das Zellkulturmedium zugegeben. Die Konzentration an MIP-2 im Zellkulturüberstand wurde anschließend durch einen ELISA bestimmt.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Polymyxin B auf die Stimulierbarkeit der Zelllinien durch *H. hepaticus*-Lysat untersucht. Polymyxin B bindet an Lipopolysaccharide und führt dadurch zu deren Inaktivierung (Evans *et al.*, 1999, Morrison und Kline, 1977). Es ist jedoch bekannt, dass *H. pylori*-LPS kaum durch Polymyxin B gehemmt wird (Matsuyama *et al.*, 2001). Lysat von *H. hepaticus* 3B1 und zur Kontrolle reines *E. coli*-LPS wurden für 1 h mit 100 µg/ml Polymyxin B vorinkubiert. Anschließend wurden 25 µg behandeltes oder unbehandeltes Lysat oder 50 ng *E. coli*-LPS für 16 h mit den Makrophagen oder Hepatozyten koinkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung von *E. coli*-LPS mit Polymyxin B die MIP-2-Induktion in beiden Zelllinien praktisch komplett inhibiert. Dagegen wurde die MIP-2-Induktion durch *H. hepaticus*-Lysat durch Polymyxin B nur geringfügig beeinflusst. Da jedoch noch nicht bekannt ist, in wieweit *H. hepaticus*-LPS durch Polymyxin

B inhibiert werden kann, kann aus diesen Ergebnissen nicht geschlossen werden, ob die Zellen nur wenig durch *H. hepaticus*-LPS stimuliert werden oder ob dieses nicht in der Lage ist, die Stimulation durch *H. hepaticus*-LPS zu hemmen.

#### **4.3.4.3.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Induktion der proinflammatorischen Antwort in Makrophagen und Hepatozyten**

Um aufzuklären, über welche Signalwege *H. hepaticus* bzw. verschiedene PAMPs die proinflammatorische Antwort in den benutzten Zelllinien induziert, wurden spezifische Inhibitoren für die drei MAP-Kinasen p38 (SB202190), JNK (SP600125) und ERK (U0125) benutzt. Des Weiteren wurde SB203580 benutzt, welcher sowohl die MAP-Kinase p38 als auch die Kinase Rck inhibiert. Um die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus zu unterbinden, wurde der Inhibitor NF $\kappa$ Bi SN50 benutzt.

Zuerst wurde untersucht, in wieweit sich die Stärke der proinflammatorischen Antwort ausgelöst durch eine Koinkubation mit *H. hepaticus* in der Makrophagenzelllinie J774 und der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 ändert, wenn einzelne Komponenten der Signalkaskaden spezifisch inhibiert werden. Als Marker dafür wurden die Cytokine MIP-2 und IL-6 benutzt. Die Inhibitoren wurden jeweils 30 min vor der Zugabe des Stimulus zugegeben und die Koinkubation erfolgte dann für 16 h.

Die alleinige Inkubation der Zelllinien mit den fünf benutzten Inhibitoren führte sowohl bei den Makrophagen als auch bei den Hepatozyten zu keiner signifikanten Änderung der basalen MIP-2- und IL-6-Sekretion. Wenn die Zellen mit *H. hepaticus* induziert wurden, zeigte sich bei Inhibierung der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus durch den Inhibitor NF $\kappa$ Bi SN50 bei beiden Zelllinien nur eine leichte Veränderung in der Stärke der proinflammatorischen Antwort. Im Falle der Makrophagen war die MIP-2- bzw. IL-6-Induktion sogar etwas erhöht gegenüber Zellen, welche nur durch *H. hepaticus* ohne Inhibitoren induziert wurden. In beiden Zelllinien wurde die Induktion der MIP-2- oder IL-6-Sekretion durch *H. hepaticus* stark reduziert, wenn Inhibitoren für die MAP-Kinasen p38 (SB202190) oder ERK (U0125) eingesetzt wurden. Dabei war die Reduktion in beiden Zelllinien durch den p38-Inhibitor stärker als durch den ERK-Inhibitor. Die IL-6-Induktion wurde durch den p38-Inhibitor in beiden Zelllinien praktisch vollständig gehemmt. Die Inhibition der JNK-Kinase durch den spezifischen Inhibitor SP600125 führte dagegen nur im Falle der Hepatozyten zu einer signifikanten Verringerung der IL-6- oder MIP-2-Induktion.

Zusammenfassend scheint die Induktion der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus* in beiden Zelllinien eher von MAP-Kinasen als von NF- $\kappa$ B anhängig zu sein. Dabei bestehen synergistische Effekte zwischen den verschiedenen MAP-Kinasen, da die Inhibition verschiedener MAP-Kinase zu einer weitgehend kompletten Inhibition der MIP-2- bzw. IL-6-Sekretion führte. Es wurde ebenfalls untersucht, in wieweit sich die durch *E. coli*-LPS induzierte MIP-2- und IL-6-Sekretion in den beiden Zelllinien ändert, wenn der p38-

Inhibitor SB202190 oder der unspezifischere p38 und Rick-Inhibitor SB203580 zugesetzt werden. Im Falle der Makrophagen war praktisch kein MIP-2 mehr messbar, wenn *E. coli*-LPS zusammen mit einem der beiden Inhibitoren mit den Zellen koinkubiert wurde. Das gleiche war prinzipiell auch bei der Messung von IL-6 der Fall, obwohl hierbei bei Inhibierung mit dem p38/Rick-Inhibitor SB203580 noch eine geringe Restmenge an IL-6 messbar war.

Die Antwort der Hepatozyten nach Induktion mit *E. coli*-LPS wurde dagegen weniger stark durch die beiden Inhibitoren gehemmt. Während die IL-6-Induktion durch die spezifische Inhibierung der MAP-Kinase p38 durch SB202190 fast vollständig gehemmt wurde, wurde die MIP-2 Sekretion nur um etwa 1/3 reduziert. Die Inhibition von p38 und Rick durch den Inhibitor SB203580 führte dagegen bei Stimulierung der Hepatozyten mit *E. coli*-LPS sogar zu einer starken Erhöhung der MIP-2 (+35%) und IL-6 (+173%) Sekretion.

**Tab. 19. Hemmung der durch *H. hepaticus* ausgelösten proinflammatorischen Antwort durch spezifische Inhibitoren.** J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten wurden mit *H. hepaticus* 3B1 (MOI 50) oder 50 ng *E. coli*-LPS alleine oder in Anwesenheit von Inhibitoren für verschiedene MAP-Kinasen oder NF- $\kappa$ B für 16 h koinkubiert. Die Konzentration an MIP-2 und IL-6 im Zellkulturüberstand wurde durch einen ELISA bestimmt und die Veränderung der Konzentrationen in Anwesenheit der Inhibitoren wurde berechnet. n.b.= nicht bestimmt.

Inhibitor	SB203580	SB202190	SP600125	U0125	NF- $\kappa$ Bi
<b>J774 mit <i>H. hepaticus</i> 3B1</b>					
MIP-2	-90%	-82%	-23%	-81%	+26%
IL-6	-95%	-100%	-21%	-70%	+43%
<b>J774 mit <i>E. coli</i>-LPS</b>					
MIP-2	-98%	-100%	n.b.	n.b.	n.b.
IL-6	-91%	-99%	n.b.	n.b.	n.b.
<b>NCTC Klon 1469 mit <i>H. hepaticus</i> 3B1</b>					
MIP-2	-5%	-76%	-82%	-59%	-32%
IL-6	-40%	-100%	-95%	-91%	-13%
<b>NCTC Klon 1469 mit <i>E. coli</i>-LPS</b>					
MIP-2	+35%	-33%	n.b.	n.b.	n.b.
IL-6	+173%	-100%	n.b.	n.b.	n.b.

#### 4.4 Immunsuppression durch *H. hepaticus*

Eine Einschränkung der Immunantwort durch ein Bakterium ist ein entscheidender Faktor für eine persistierende Infektion. Andernfalls würde eine andauernde Entzündungsreaktion ein Überleben in der jeweiligen Nische nicht ermöglichen. Neben der Entwicklung von Strukturen, welche durch den Wirtsorganismus nicht erkannt werden können, hemmen viele Bakterien auch aktiv die Immunantwort ihres Wirtes. *H. hepaticus* führte trotz guter Adhärenz zu einer nur schwachen Stimulierung der intestinalen Epithelzelllinie m-IC<sub>cl2</sub>, welche am stärksten den Zellen ähnelt, mit denen *H. hepaticus* während einer persistierenden Infektion in Kontakt kommt. Daher wurde näher untersucht, ob *H. hepaticus* diese Zellen nur kaum stimuliert oder aktiv deren Immunantwort hemmen kann.

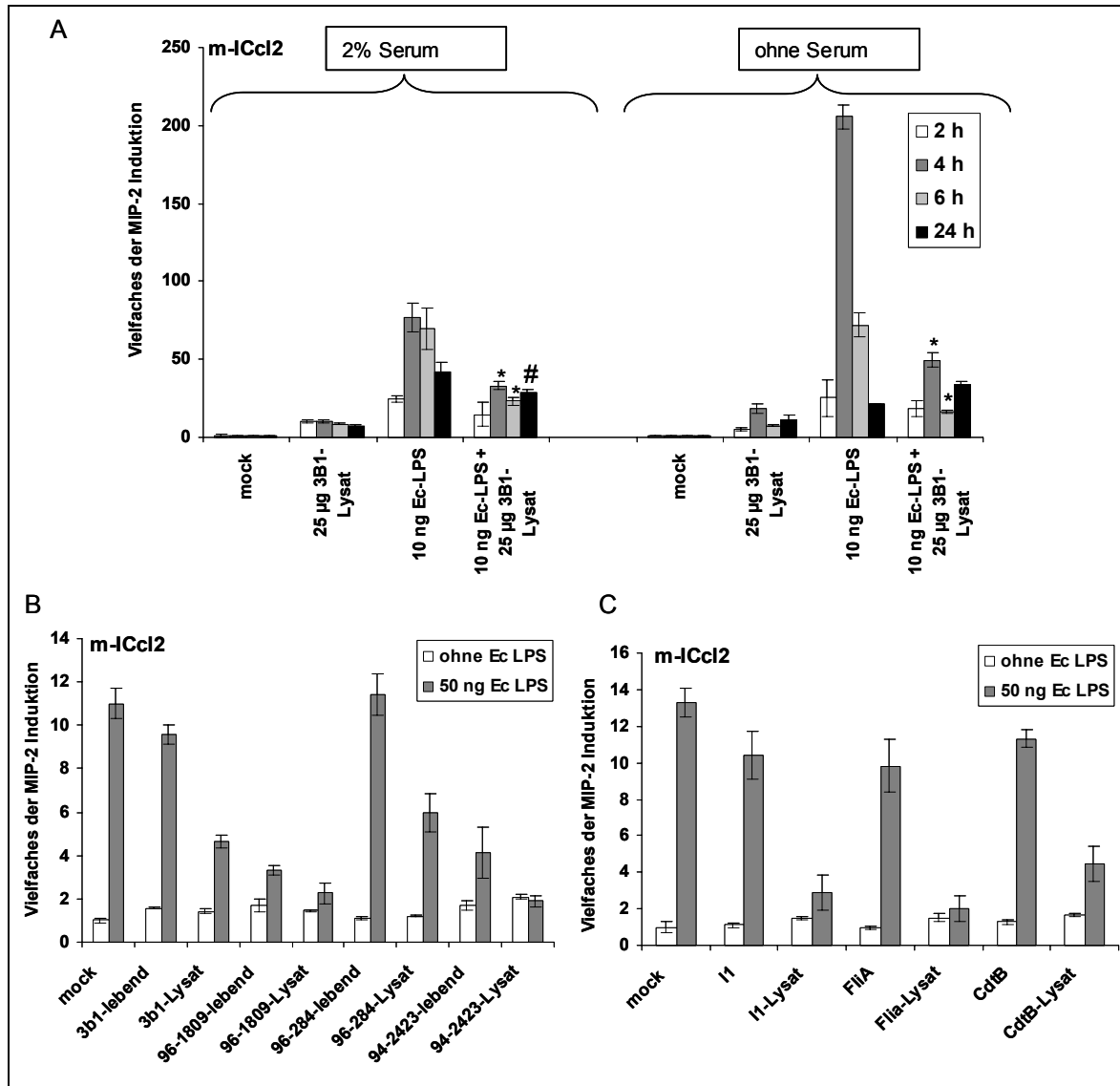
#### 4.4.1 *H. hepaticus* hemmt die durch *E. coli*-LPS induzierte proinflammatorische Antwort in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen

Um den Einfluss von *H. hepaticus* auf die Stimulierbarkeit von m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen durch *E. coli*-LPS zu untersuchen, wurde die Induktion der MIP-2-Sekretion durch *E. coli*-LPS alleine oder in Kombination mit lebenden *H. hepaticus* bzw. *H. hepaticus*-Lysat untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Induktion der durch *E. coli*-LPS ausgelösten MIP-2-Sekretion geringer ist, wenn das *E. coli*-LPS mit lebenden *H. hepaticus* bzw. Lysat von *H. hepaticus* kombiniert wird (Abb. 27 A). Die Inhibition war dabei bei den getesteten Zeitpunkten am stärksten nach 4 und 6 h. Nach 2 h war noch kaum eine Verringerung der MIP-2-Sekretion durch *H. hepaticus*-Lysat festzustellen, wobei die Induktion zu diesem Zeitpunkt auch noch ziemlich gering war. Nach 24 h hatten sich die Werte der durch *E. coli*-LPS ausgelösten MIP-2-Induktion mit und ohne *H. hepaticus*-Lysat dagegen weitgehend angeglichen, wobei die Induktion gegenüber unstimulierten Zellen auch nur noch gering war.

Es wurde des Weiteren untersucht, ob die Inhibition in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen abhängig von löslichen Faktoren im für die Kultivierung der Zellen verwendeten fötalem Kälberserum ist. Die m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden durch *E. coli*-LPS nach 4 h etwas stärker in serumfreiem Medium als in serumhaltigem Medium induziert. Die gemessene Menge an MIP-2 nach 4-stündiger Koinkubation mit *E. coli*-LPS in serumfreiem Medium war etwa 2- bis 3-mal höher als unter serumhaltigen Bedingungen. Nach 6 h war die Induktion durch *E. coli*-LPS in serumhaltigem und serumfreiem Medium dagegen fast identisch und nach 24 h war die noch vorhandene MIP-2-Induktion in serumhaltigem Medium größer als in serumfreiem Medium. Wenn man nun *E. coli*-LPS mit *H. hepaticus*-Lysat unter serumfreien Bedingungen kombinierte, erhielt man eine etwa gleichstarke Verringerung der MIP-2-Sekretion im Vergleich zur Koinkubation in serumhaltigem Medium. Dies zeigte, dass sowohl die Induktion von m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen durch *E. coli*-LPS als auch die Verringerung der Induktion durch *H. hepaticus*-Lysat weitgehend unabhängig von löslichen Faktoren im Serum war.

Die Inhibition war weitgehend unabhängig vom verwendeten *H. hepaticus*-Stamm (Abb. 27 B). Lysate von allen getesteten Stämme führten nach 4 h Koinkubation zu einer Inhibition der LPS-induzierten proinflammatorischen Antwort. Die Inhibition durch den Stamm 96-284 war zwar etwas geringer und die Inhibition durch den Stamm 94-2423 etwas größer im Vergleich zur Inhibition durch 3B1-Lysat, wobei die Unterschiede aber in beiden Fällen nicht signifikant waren. Lebende Bakterien von den Stämmen 3B1 und 96-284 führten im Gegensatz zu lebenden Bakterien von 96-1809 und 94-2423 zu kaum einer Inhibition, wobei dies vermutlich auf Unterschiede im Wachstum zurückzuführen war. Es gab auch keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der Inhibition bei Verwendung von Lysaten von verschiedenen Mutanten (Abb. 27 C). Alle verwendeten Mutanten führten bei der Verwendung von Lysaten zu einer weitgehend gleichstarken Inhibition wie der Wildtypstamm. Die

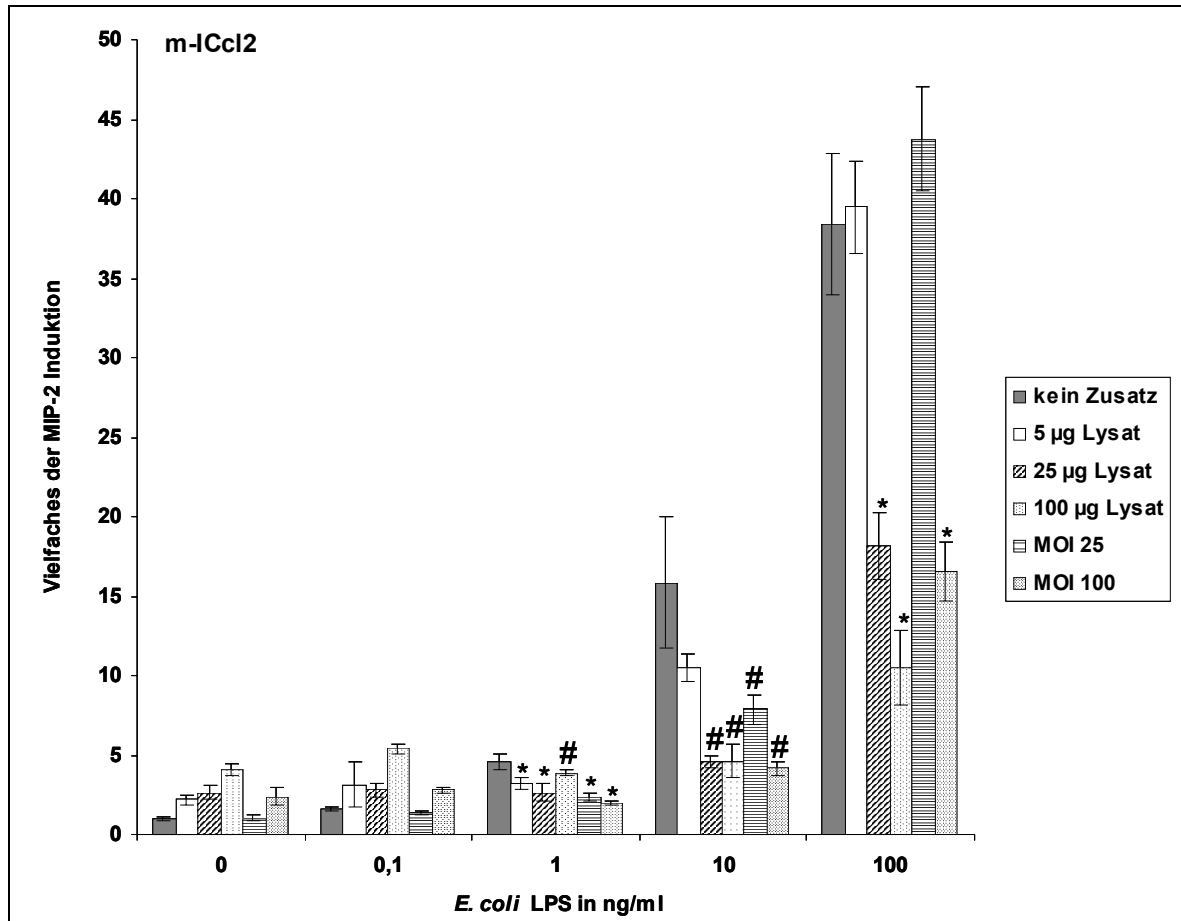
Inhibition ist daher wohl unabhängig von Komponenten der HHGI1-Pathogenitätsinsel, vom CDT-Toxin und von funktionellen Flagellen. Wenn lebende Bakterien von den verschiedenen Mutanten für die Inhibierung eingesetzt wurden, erhielt man dagegen kaum eine Verringerung der durch *E. coli*-LPS ausgelösten MIP-2 Sekretion. Dies ist wohl ebenfalls wieder auf Unterschiede in den Wachstumsbedingungen zurückzuführen.



**Abb. 27. Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus*-Lysat.** (A) m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden für 2 h, 4 h, 6 h und 24 h mit 10 ng *E. coli*-LPS alleine oder in Kombination mit 25 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat koinkubiert. Die Koinkubation erfolgte dabei in Medium mit 2% FCS oder in serumfreiem Medium. (B) und (C) m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden für 4 h mit verschiedenen Stämmen (B) oder Mutanten (C) von lebenden *H. hepaticus* (MOI 50) oder Lysat von *H. hepaticus* (25 µg) alleine oder in Kombination mit 50 ng *E. coli*-LPS koinkubiert. Die Koinkubation erfolgte dabei in Standardmedium mit 2% FCS. Die Konzentration an MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt. Ein Stern gibt einen p-Wert < 0,1 und eine Raute einen p-Wert < 0,5 an.

Der Grad der Inhibierung war dabei abhängig von der Menge an eingesetztem *H. hepaticus*-Lysat bzw. der MOI an lebenden Bakterien. Des Weiteren war die Stärke der Inhi-

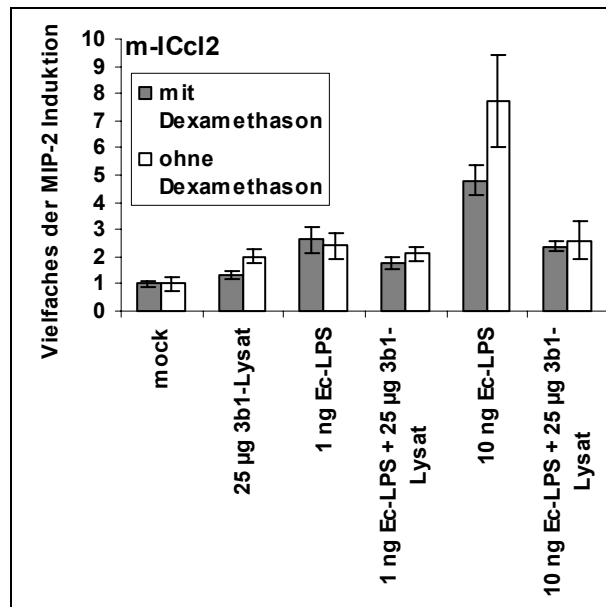
bierung bei einer niedrigeren Konzentration an eingesetztem *E. coli*-LPS stärker (Abb. 28). Dies zeigt, dass Komponenten von *H. hepaticus* die über den TLR4-Rezeptor erfolgende Induktion der MIP-2-Sekretion durch *E. coli*-LPS herunterregulieren können. Die Stärke dieser Inhibition ist dabei abhängig vom Verhältnis der Menge an eingesetztem *E. coli*-LPS zu der eingesetzten Menge an *H. hepaticus*-Bakterien bzw. -Lysat.



**Abb. 28. Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus*-Lysat.** m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an *E. coli*-LPS für 4 h alleine oder kombiniert mit 5, 25 oder 100 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat bzw. mit lebenden *H. hepaticus* 3B1 mit einer MOI von 25 oder 100 koinkubiert. Die Konzentration an MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt. Die Signifikanz der Inhibition wurde durch einen einseitigen t-Test mit unterschiedlichen Varianzen bestimmt. Ein Stern gibt einen p-Wert < 0,1 und eine Raute einen p-Wert < 0,5 an.

Im Standardmedium zur Kultivierung der mIC<sub>cl2</sub>-Zellen ist das Glukokortikoid Dexamethason enthalten. Es wurde kürzlich beschrieben, dass Glukokortikoide die TLR-abhängige Induktion einiger Gene hemmen (Ogawa *et al.*, 2005). Nach 6 h Koinkubation der m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen mit *E. coli*-LPS in Dexamethason-freiem Medium zeigte sich jedoch nur eine geringfügige Veränderung der Menge an MIP-2 im Zellkulturüberstand (Abb. 29). Während die Stärke der Induktion durch 1 ng *E. coli*-LPS in beiden Fällen gleich blieb, war die Induktion durch 10 ng LPS in Dexamethason-freiem Medium etwas höher als in

Dexamethason-haltigem Medium. Ebenfalls war die basale Sekretion von MIP-2 in uninduzierten Zellen etwas geringer ohne Dexamethason. Die Inhibition der MIP-2-Sekretion durch *H. hepaticus* war unabhängig von dem Vorhandensein von Dexamethason, obwohl die Inhibition nach Induktion durch 1 ng *E. coli*-LPS aufgrund der geringen Menge an sekretiertem MIP-2 nicht mehr nachweisbar war.



**Abb. 29. Einfluss von Dexamethason auf die Stimulierbarkeit von m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen.** m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden für 6 h mit 1 oder 10 ng *E. coli*-LPS alleine oder zusammen mit 25 µg 3B1-Lysat kokubiert. Die Kokubation erfolgte dabei in Standardmedium mit Dexamethason oder in Dexamethason-freiem Medium. Die Menge an MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt.

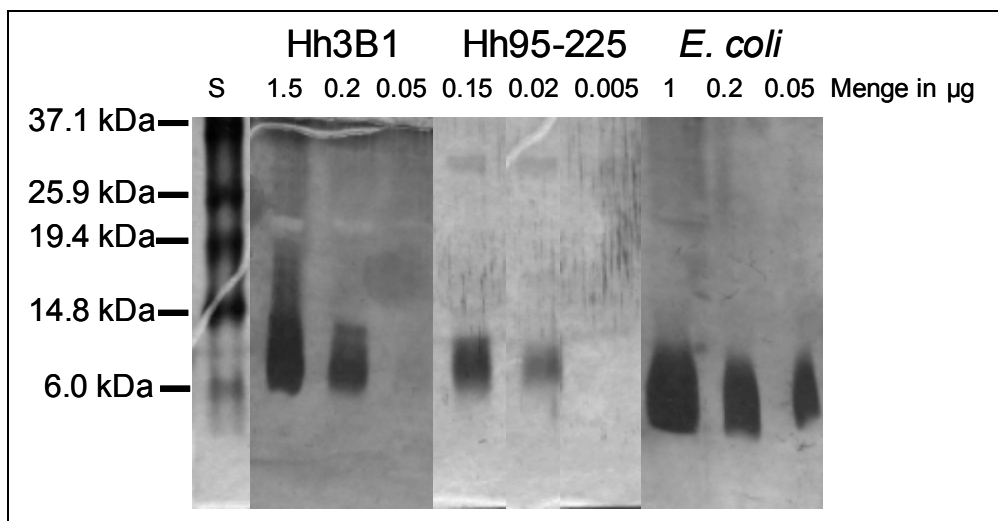
#### 4.4.1.1 Inhibition der Induktion von *E. coli*-LPS durch *H. hepaticus*-LPS in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen

Nach dem Nachweis der Inhibition der durch *E. coli*-LPS induzierten MIP-2-Induktion durch lebende *H. hepaticus* oder Lysat, stellte sich nun die Frage, welcher Faktor und auf welchem Wege *H. hepaticus* die proinflammatorische Antwort der m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen hemmt. Es war zuvor schon bekannt, dass LPS von *Treponema spp.* und *Porphyromonas gingivalis* die *E. coli*-LPS vermittelte proinflammatorische Antwort herunterregulieren kann (Coats *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2006). Daher sollte die Frage untersucht werden, ob LPS von *H. hepaticus* für die beobachtete Inhibition der durch *E. coli*-LPS induzierten proinflammatorischen Antwort in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen verantwortlich ist.

##### 4.4.1.1.1 Aufreinigung von *H. hepaticus*-LPS

Um den Einfluss von *H. hepaticus*-LPS zu untersuchen, wurde dieses aus den beiden *H. hepaticus*-Stämmen 3B1 und 95-225 durch eine heiße Phenol-Wasserextraktion isoliert wie es auch zuvor schon für *H. pylori* beschrieben war (Mills *et al.*, 1992, Westphal und Jann, 1965). Daran anschließend wurden noch vorhandene Verunreinigungen durch Proteine, RNA

und DNA durch Proteinase-, RNase- und DNase-Verdauung beseitigt. Das aufgereinigte LPS wurde durch Dialyse gegen Wasser in ein neutrales wässriges Medium überführt. Die Reinheit des LPS wurde durch Auftrennung des gereinigten LPS durch ein Polyacrylamidgel und anschließende Silberfärbung überprüft. Wie in Abb. 30 zu sehen ist, konnte das LPS mit sehr hoher Reinheit gewonnen werden, da keine kontaminierenden Banden durch Proteine detektiert werden konnten. Die Konzentration wurde mit Hilfe von mitgelaufenem *E. coli*-LPS mit einer definierten Konzentration abgeschätzt. Die Konzentration des LPS des *H. hepaticus*-Stammes 3B1 betrug etwa 0,3 µg/µl und des Stammes 95-225 etwa 20 ng/µl.



**Abb. 30. Aufreinigung von LPS von *H. hepaticus*.** LPS wurde aus den *H. hepaticus*-Stämmen 3B1 und 95-225 wie in den Methoden beschrieben aufgereinigt. Verschiedene Mengen des LPS wurden auf einem 14%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung angefärbt. Um eine Abschätzung der Menge an LPS zu ermöglichen, wurden parallel auch verschiedene Mengen an kommerziellem LPS von *E. coli* O111 aufgetragen.

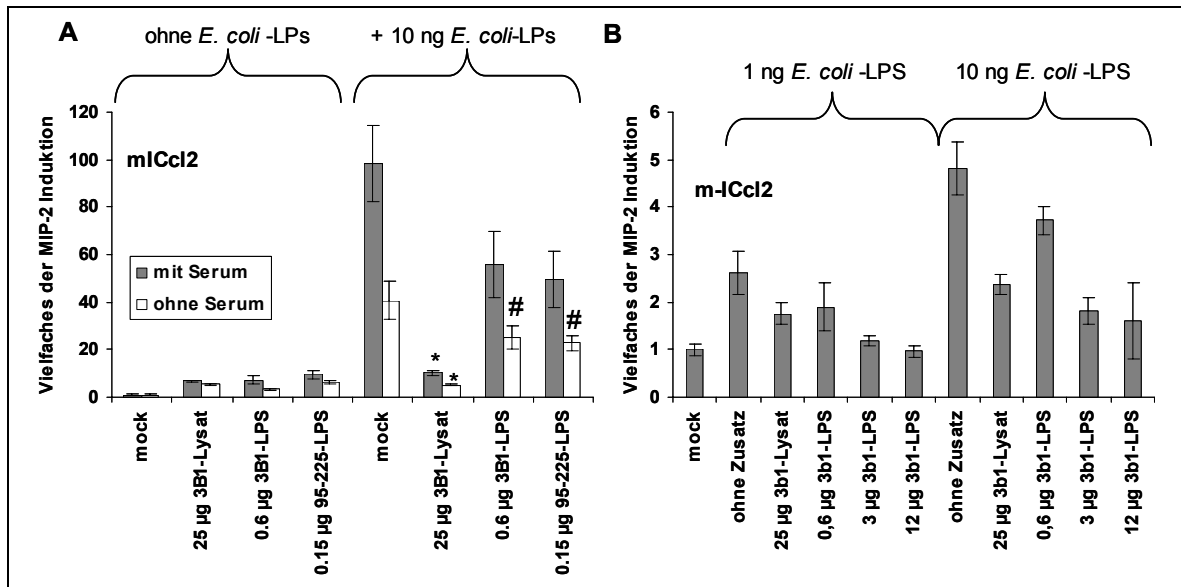
#### 4.4.1.1.2 LPS ist ein verantwortlicher Faktor für die Hemmung der durch *E. coli*-LPS induzierten proinflammatorischen Antwort

Um herauszufinden, ob LPS von *H. hepaticus* in der Lage ist, die proinflammatorische Antwort in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen ähnlich wie Lysat oder lebende Bakterien herunterzuregulieren, wurde dieses ebenfalls alleine oder zusammen mit *E. coli*-LPS für Koinkubationen mit m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen eingesetzt.

Wie in Abb. 31 A zu sehen ist, führte die Koinkubation der m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen mit *H. hepaticus*-LPS der Stämme 3B1 und 95-225 nach 6 h nur zu einer geringen Induktion der MIP-2-Sekretion, welche vergleichbar mit der Koinkubation mit *H. hepaticus*-Lysat war. Wenn die Zellen mit 10 ng *E. coli*-LPS stimuliert wurden, erhielt man eine starke Induktion von MIP-2. Wenn das LPS von *E. coli* jedoch mit LPS von *H. hepaticus* kombiniert wurde, führte dies zu einer deutlichen Verringerung der MIP-2-Sekretion. Die Inhibition war dabei in serumfreiem Medium etwas stärker als in serumhaltigem. Analog zur Hemmung der MIP-2-Sekretion durch *H. hepaticus*-Lysat sah man auch bei der Hemmung mit *H. hepaticus*-LPS



eine Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 31 B). Größere Mengen von *H. hepaticus*-LPS führten sowohl beim Einsatz von 1 ng als auch 10 ng *E. coli*-LPS zu einer stärkeren Hemmung der MIP-2-Sekretion. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit isoliertem LPS von *H. hepaticus* eine ähnliche Inhibition erreicht wird wie mit lebenden *H. hepaticus* oder *H. hepaticus*-Lysat. Daher ist LPS zumindest eine der Komponenten von *H. hepaticus*, die für die Inhibierung der proinflammatorischen Antwort in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen verantwortlich ist.

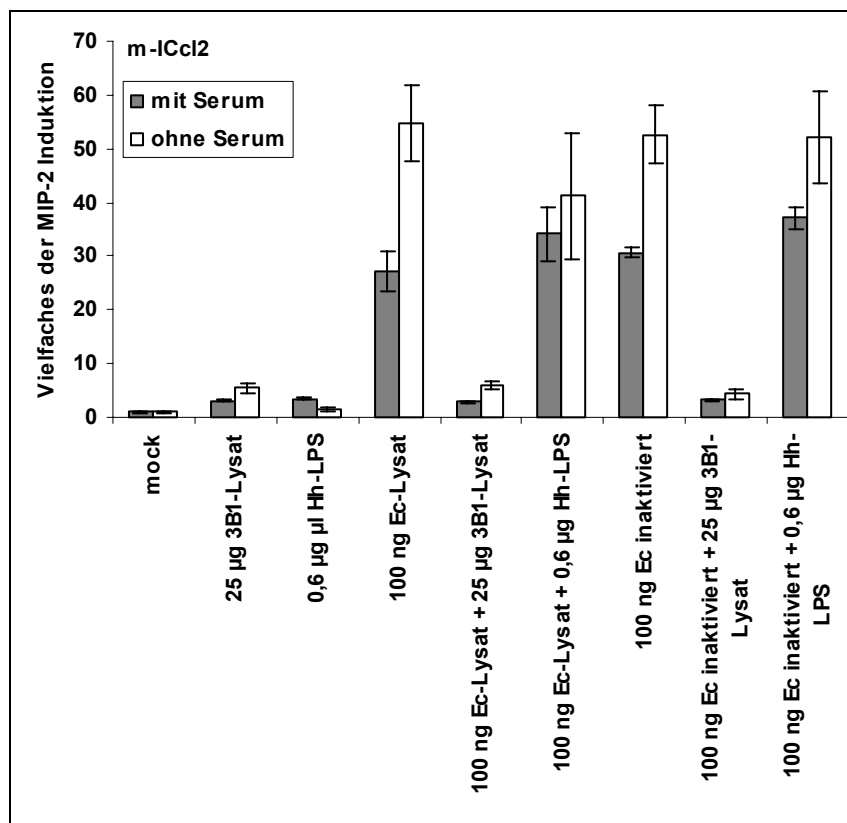


**Abb. 31. Hemmung der proinflammatorischen Antwort in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen durch *H. hepaticus*-LPS.** (A) m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden entweder alleine oder mit 10 ng *E. coli*-LPS zusammen mit 0,6 µg *H. hepaticus* 3B1 oder 0,15 µg *H. hepaticus* 95-225-LPS für 6 h koinkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit 25 µg 3B1-Lysat koinkubiert. Die Koinkubationen erfolgten in serumhaltigem oder serumfreiem Medium. (B) m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden mit 1 ng oder 10 ng *E. coli*-LPS zusammen mit 0,6 µg, 3 µg oder 12 µg *H. hepaticus* 3B1-LPS für 6 h in serumhaltigem Medium koinkubiert. Die Konzentration an MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt. Die Signifikanz der Inhibition wurde durch einen einseitigen t-Test mit unterschiedlichen Varianzen bestimmt. Ein Stern gibt einen p-Wert < 0,1 und eine Raute einen p-Wert < 0,5 an.

#### 4.4.1.2 Hemmung der durch *E. coli* induzierten proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus* in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen

Da *H. hepaticus* laut den bisherigen Ergebnissen in der Lage zu sein schien, die durch *E. coli*-LPS ausgelöste proinflammatorische Antwort in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen zu hemmen, stellte sich nun die Frage, ob dies auch für Gesamtpräparationen von *E. coli* möglich ist. Deshalb wurden sowohl Lysate als auch hitzeinaktivierte Präparationen von dem *E. coli*-Stamm MC1061 hergestellt. Diese wurden für die Koinkubation mit m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen benutzt. Die Zellen wurden sowohl mit 100 ng *E. coli*-Lysat als auch mit 100 ng hitzeinaktivierten *E. coli* koinkubiert. Parallel dazu wurden Zellen mit einer Mischung aus *E. coli*-Lysat oder hitzeinaktivierten Bakterien zusammen mit 25 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat oder 0,6 µg LPS koinkubiert. Nach 6-stündiger Koinkubation führte das Lysat von *H. hepaticus* sowohl in serumhaltigem als auch

in serumfreiem Medium zu einer starken Hemmung der durch *E. coli* induzierten MIP-2-Sekretion (Abb. 32). Diese Ergebnisse waren damit vergleichbar zu den vorherigen Ergebnissen, bei denen die Stimulation mit gereinigtem *E. coli*-LPS erfolgte. Das LPS von *H. hepaticus* führte dagegen zu praktisch keiner Hemmung der MIP-2-Sekretion. Dies lag vermutlich an einer zu starken Induktion der proinflammatorischen Antwort durch die Gesamtpräparationen von *E. coli*. Trotzdem scheint *H. hepaticus* damit nicht nur in der Lage zu sein, die proinflammatorische Antwort der Zellen auf gereinigtes *E. coli*-LPS, sondern auch auf Gesamtpräparationen der Bakterien zu hemmen.



**Abb. 32. Hemmung der durch *E. coli* ausgelösten proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus* in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen.** m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden entweder alleine oder zusammen mit 25 µg *H. hepaticus*-Lysat oder 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS mit 100 ng *E. coli* MC1061-Lysat oder hitzeinaktivierten Bakterien für 6 h in Medium mit 2% FCS oder in serumfreiem Medium koinkubiert. Anschließend wurde die Konzentration an MIP-2 im Überstand durch einen ELISA bestimmt.

#### 4.4.1.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Induktion der proinflammatorischen Antwort in Darmzellen

Bisher war zwar bekannt, dass *H. hepaticus* die proinflammatorische Antwort in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen hemmt. Es stellte sich aber die Frage, welche Transkriptionsfaktoren dafür entscheidend sind. Daher wurde ein spezifischer Inhibitor für die Translokation von NF-κB und Inhibitoren der Aktivität der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK verwendet.

Die Inhibition von NF-κB durch den Inhibitor SN50 führte nur zu einer geringen Reduktion der durch *E. coli*-LPS ausgelösten MIP-2-Sekretion (Tab. 20). Dagegen führte die Inhibition durch den p38- und den ERK-Inhibitor zu einer jeweils etwa 60%-igen Reduktion der MIP-2-Sekretion. Wenn man die MAP-Kinase JNK hemmt, führte dies dagegen zu einem deutlichen Anstieg der MIP-2-Sekretion.

In der Kombination von *E. coli*-LPS mit *H. hepaticus*-Lysat war die Reduktion der MIP-2-Sekretion dagegen deutlich höher, wenn man den NF-κB-Inhibitor einsetzt als bei *E. coli*-LPS alleine. Dagegen war sowohl die Inhibition der MIP-2-Sekretion durch den p38- und den ERK-Inhibitor als auch der Anstieg der MIP-2-Sekretion durch den JNK-Inhibitor bei der Kombination von *E. coli*-LPS mit *H. hepaticus*-Lysat höher als beim Einsatz von *E. coli*-LPS alleine. Dies führte demnach zu einer stärkeren Verringerung der MIP-2-Sekretion durch *H. hepaticus*-Lysat bei der Hemmung von NF-κB im Vergleich zu Zellen, bei denen kein Inhibitor eingesetzt wurde. Demgegenüber war der inhibitorische Effekt von *H. hepaticus*-Lysat geringer, wenn man eine der drei MAP-Kinasen p38, JNK oder ERK durch spezifische Inhibitoren hemmt. Dies sprach dafür, dass die Hemmung eher über MAP-Kinasen als über NF-κB läuft.

**Tab. 20. Einfluss von spezifischen Inhibitoren auf m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen.**

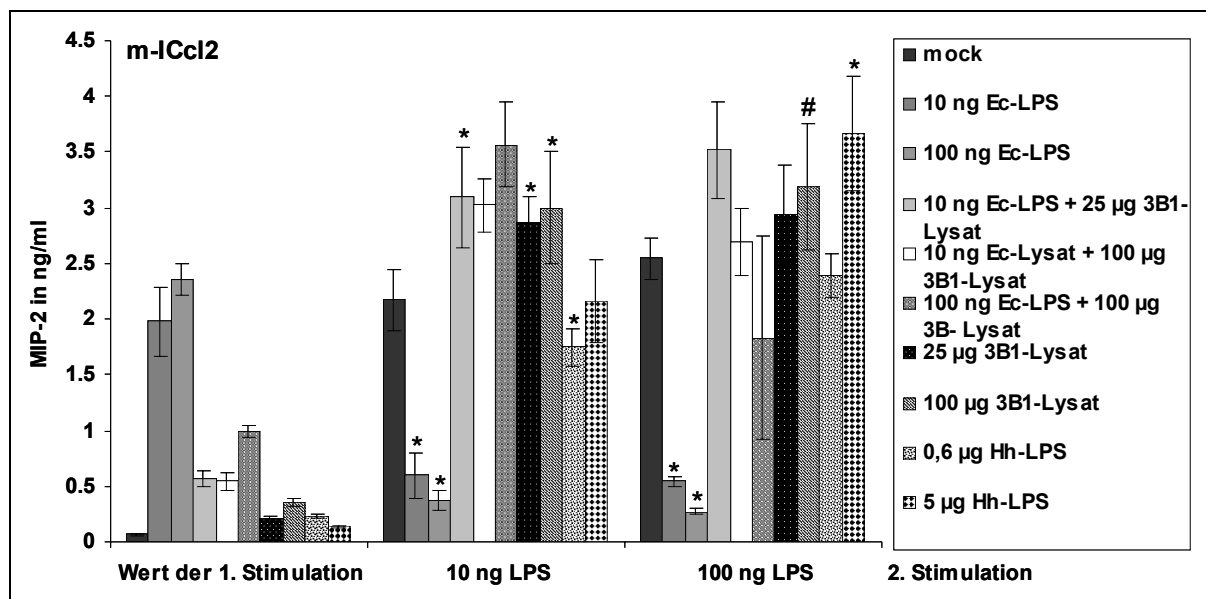
	ohne Inhibitor	SB202190 (p38)	SP600125 (JNK)	U0125 (ERK)	NF-κBi SN50
<i>E. coli</i> -LPS	-	-56%	+43%	-60%	-18%
<i>E. coli</i> -LPS+ <i>H. hepaticus</i> -Lysate	-	-47%	+89%	-41%	-44%
<i>E. coli</i> -LPS + <i>H. hepaticus</i> -Lysate gegen <i>E. coli</i> -LPS	-37%	-24%	-18%	-10%	-57%

m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden für 4 h mit 50 ng *E. coli*-LPS alleine oder zusammen mit 25 µg *H. hepaticus*-Lysat kokubiert. Diese Experimente wurden ohne Inhibitor oder mit den spezifischen Inhibitoren SB202190, SP600125, U0125 und Nf-κBi SN50 durchgeführt. Dabei wurden die Inhibitoren 30 Minuten vor Beginn der Kokubation mit einer Konzentration von 10 µM zugesetzt. Die Konzentration an MIP-2 in den Überständen wurde bestimmt. Es wurde dann die prozentuale Hemmung der MIP-2-Sekretion durch die jeweiligen Inhibitoren berechnet, wobei die Induktion durch *E. coli*-LPS und *E. coli*-LPS kombiniert mit *H. hepaticus*-Lysat auf 100% gesetzt wurde. Es wurde auch die Hemmung durch *H. hepaticus*-Lysat auf die *E. coli*-LPS induzierte MIP-2-Sekretion mit und ohne Inhibitoren berechnet, wobei dafür die Induktion durch *E. coli*-LPS unter der jeweiligen Bedingung auf 100% gesetzt wurde.

#### 4.4.1.4 Hemmung der Toleranzentwicklung durch *H. hepaticus* in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen

Es wurde schon zuvor beschrieben, dass m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen nach einer ersten Stimulation mit *E. coli*-LPS eine Toleranz gegenüber einer zweiten Stimulation entwickeln (Hornef *et al.*, 2002). Deshalb stellte sich die Frage, ob *H. hepaticus* möglicherweise diese Toleranzentwicklung ebenfalls hemmt. Um diese Frage zu klären, wurden m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen zuerst für 6 h mit *E. coli*-LPS, Präparationen von *H. hepaticus* und Kombinationen kokubiert. Nach Ende der Kokubationszeit wurden die Zellen gewaschen, um die zugegebenen Faktoren aus dem Medium zu entfernen. 12 h später wurden die Zellen in einer zweiten Stimulationsrunde nochmals mit 10 ng oder 100 ng *E. coli*-LPS für 6 h kokubiert. Dabei zeigte sich wie zuvor

beschrieben eine deutliche Toleranzentwicklung gegenüber *E. coli*-LPS. Wenn das *E. coli*-LPS bei der ersten Stimulation mit Lysat von *H. hepaticus* gemischt wurde, fand jedoch keine Toleranzentwicklung mehr statt. Die MIP-2-Konzentrationen nach der 2. Stimulation mit *E. coli*-LPS waren im Gegenteil tendenziell sogar gegenüber Zellen, welche bei der 1. Stimulation mock-infiziert wurden, erhöht, wenn die 1. Stimulation mit Lysat alleine oder in Kombination mit *E. coli*-LPS oder zu einem geringeren Teil mit *H. hepaticus*-LPS erfolgte. Dies zeigt, dass *H. hepaticus* nicht nur die proinflammatorische Antwort auf *E. coli*-LPS hemmt, sondern auch die Toleranzentwicklung der Zellen verhindert.



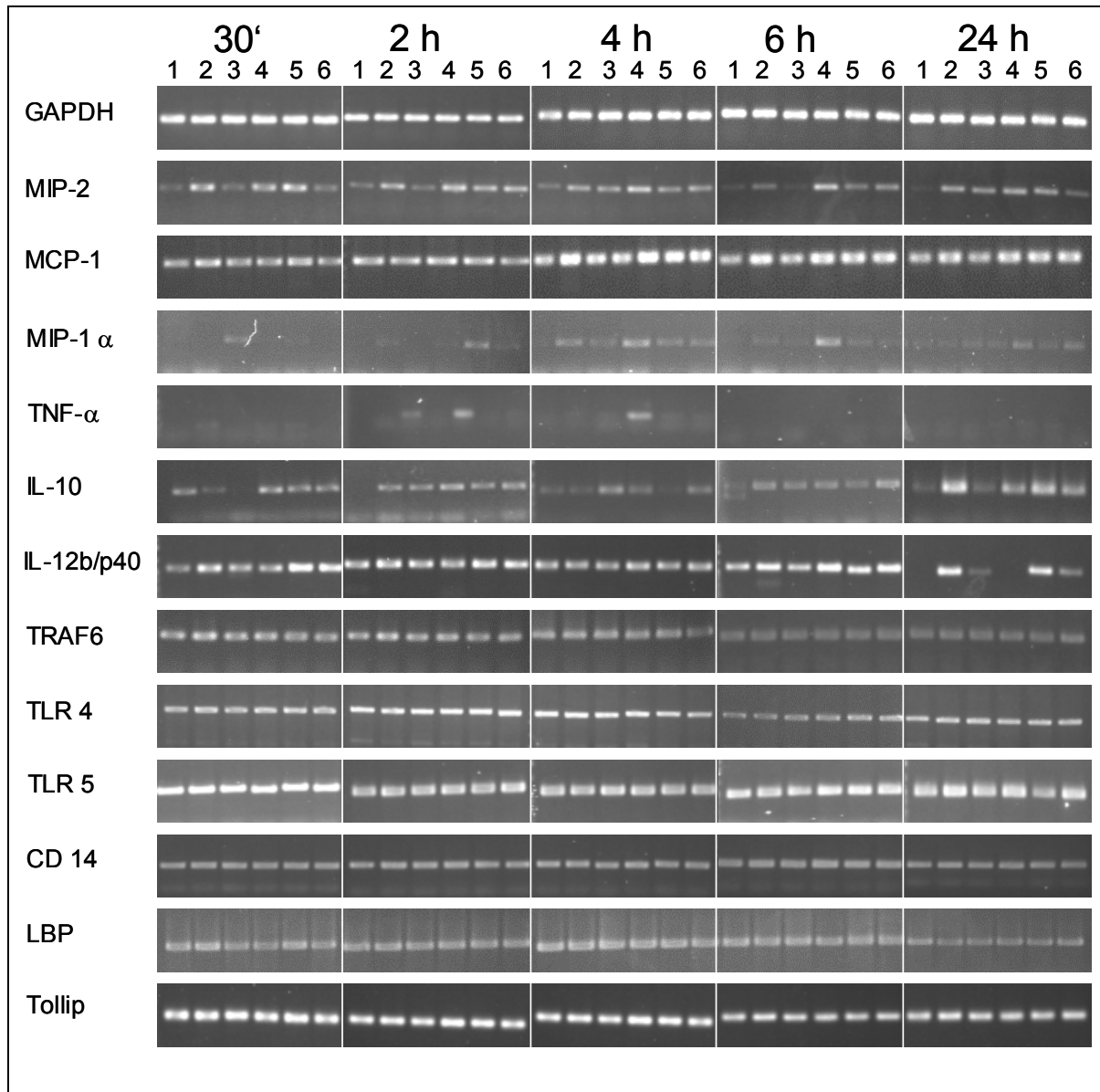
**Abb. 33. Hemmung der Toleranzentwicklung in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen.** m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden zuerst für 6 h in serumhaltigem Medium mit den folgenden Faktoren kokubiert: mock-Infektion, 10 ng *E. coli*-LPS, 100 ng *E. coli*-LPS, 10 ng *E. coli*-LPS und 25 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat, 10 ng *E. coli*-LPS und 100 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat, 100 ng *E. coli*-LPS und 100 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat, 25 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat, 100 µg *H. hepaticus* 3B1-Lysat, 0,6 µg *H. hepaticus* 3B1-LPS, 5 µg *H. hepaticus* 3B1-LPS. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Zellen gewaschen. 12 h später erfolgte eine zweite 6-stündige Stimulation mit 10 ng oder 100 ng *E. coli*-LPS. Die Überstände wurden ebenfalls wieder abgenommen. Die MIP-2-Konzentration in den Überständen wurde anschließend durch einen ELISA bestimmt. Die erste Datenreihe gibt dabei jeweils die MIP-2-Konzentration nach der ersten Stimulationsrunde an und danach sind in der zweiten und dritten Datenreihe die Konzentrationen nach der zweiten Stimulation durch 10 ng oder 100 ng *E. coli*-LPS angegeben. Ein Stern gibt einen p-Wert < 0,1 und eine Raute einen p-Wert < 0,5 an.

#### 4.4.1.5 Analyse des transkriptionellen Profils in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen

Die Resultate, welche für die Proteinsekretion von MIP-2 erhalten wurden, wurden durch die Bestimmung der Transkriptmenge von verschiedenen Cytokinen verifiziert. Es wurden Zellen mit Kombinationen von *E. coli*-LPS, *H. hepaticus*-Lysat und *H. hepaticus*-LPS für verschiedenen lange Zeiten kokubiert (Abb. 34).

Wie erwartet, war die Transkriptmenge von MIP-2 in Zellen, welche mit *E. coli*-LPS kokubiert wurden, erhöht und damit verglichen verringert, wenn das *E. coli*-LPS mit *H.*

*hepaticus*-Lysat oder -LPS kombiniert wurde. Man erhielt auch eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge, wenn die Zellen mit Lysat von *H. hepaticus*, nicht jedoch, wenn sie mit LPS von *H. hepaticus* koinkubiert wurden. Das Transkript von MIP-2 war schon nach 30 Minuten hochreguliert, verringerte sich jedoch mit der Zeit wieder.



**Abb. 34. Analyse des transkriptionellen Profils in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen.** m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden mock-infiziert (1) oder koinkubiert mit 50 µg 3B1-Lysat (2), 1,5 µg 3B1-LPS (3), 100 ng *E. coli*-LPS (4), 100 ng *E. coli*-LPS und 50 µg 3B1-Lysat (5) oder 100 ng *E. coli*-LPS und 1,5 µg 3B1-LPS (6). Die Koinkubationen erfolgten in serumfreiem Medium für 30 min, 2 h, 4 h, 6 h oder 24 h. Anschließend wurden die Zellen abgeerntet und Gesamt-RNA daraus gewonnen. Aus der aufgereinigten RNA wurde cDNA synthetisiert und diese wurde für semiquantitative RT-PCRs mit genspezifischen Primern eingesetzt.

Ab 4 h Koinkubationszeit waren auch die Transkripte für Mip-1 und MIP-1α in Zellen, welche mit *E. coli*-LPS koinkubiert wurden, gegenüber mock-infizierten Zellen hochreguliert. Dagegen war die Transkriptmenge für beide Cytokine geringer, wenn die Zellen mit *E. coli*-

LPS kombiniert mit *H. hepaticus*-Lysat oder -LPS kokubiert wurden. Obwohl auf Proteinebene kein TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden konnte, war das Transkript für TNF- $\alpha$  nach 4 h und 6 h in Zellen, welche mit *E. coli*-LPS alleine, nicht jedoch in Kombination mit *H. hepaticus*-Lysat oder -LPS kokubiert wurden, nachweisbar. Da die Transkriptmenge sehr gering war, lag die Menge an TNF- $\alpha$  auf Proteinebene vermutlich unter der Detektionsschwelle des verwendeten ELISAs.

Das Transkript für die p40-Untereinheit von IL-12b/p40 war nach 24 h in mock-infizierten und mit *E. coli*-LPS infizierten Zellen herunterreguliert. Dagegen fand keine Herunterregulation in Zellen, welche mit *H. hepaticus*-Lysat kokubiert wurden, statt. Auch die Kokubation mit *H. hepaticus*-LPS führte zu einer verringerten Herunterregulation von IL-12b/p40. Dies könnte ebenfalls für eine verringerte Toleranzentwicklung sprechen, da IL-12 ein wichtiges proinflammatorisches Cytokin darstellt.

Es wurde auch die Transkriptmenge von einigen Rezeptoren und Proteinen, welche eine wichtige Rolle in den TLR-abhängigen Signalkaskaden spielen, untersucht. Dabei zeigte sich jedoch in allen untersuchten Fällen keine differentielle Regulation (TLR4, TLR5, CD14, MD-2, LBP, TRAF6 und Tollip).

#### **4.4.2 Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus* in anderen Zelllinien**

Um die Frage zu beantworten, ob die Hemmung der proinflammatorischen Antwort spezifisch für m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen ist oder ob dies auch bei anderen Zelllinien auftritt, wurden analoge Experimente wie für die m-IC<sub>cl2</sub>-Zelllinie auch mit der murinen Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469, der murinen Makrophagenzelllinie J774 und der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2 durchgeführt.

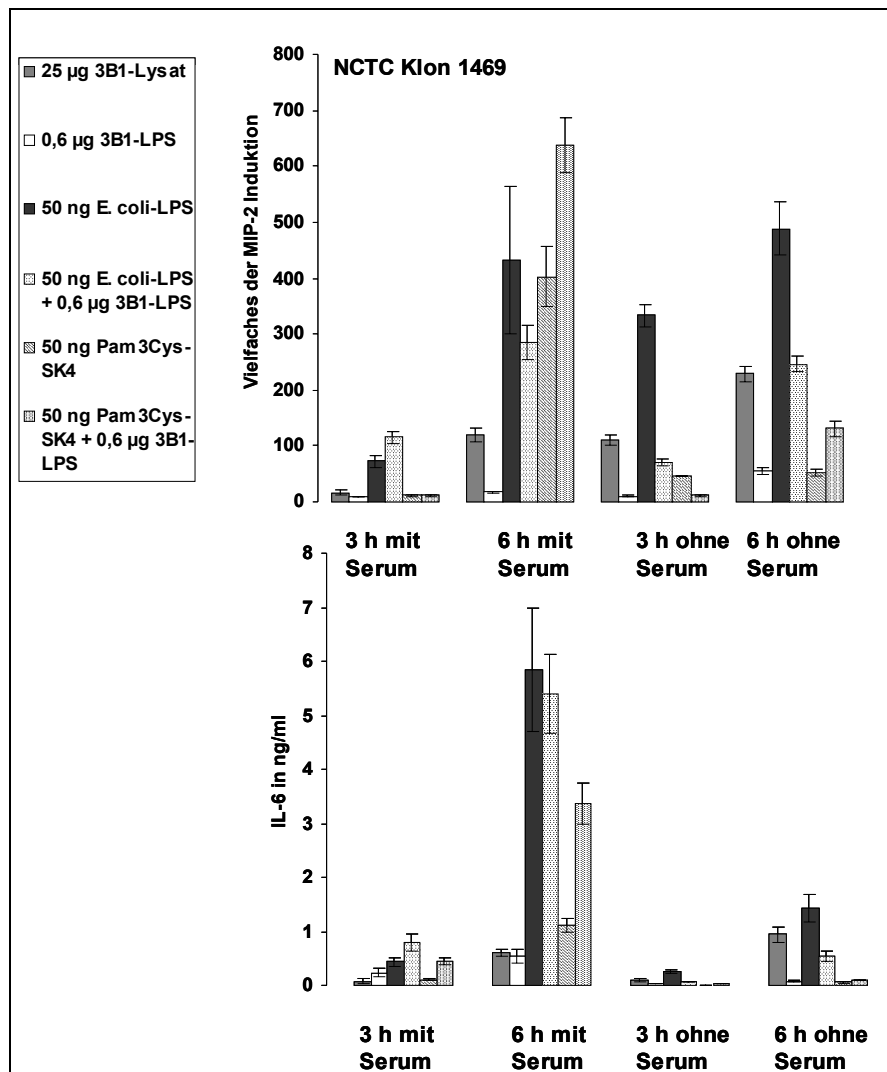
##### **4.4.2.1 Inhibition proinflammatorischer Reaktionen durch *H. hepaticus*-LPS in der murinen Hepatozyten-Zelllinie NCTC Klon 1469**

Um festzustellen, ob die proinflammatorische Antwort in der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 ebenfalls gehemmt werden kann, wurde diese ebenfalls mit *H. hepaticus*-LPS alleine oder zusammen mit Liganden von Mustererkennungsrezeptoren kokubiert. In dieser Zelllinie wurde neben der Induktion des Cytokins MIP-2 auch die Induktion des Interleukins IL-6 bestimmt.

Es wurde zuerst getestet, inwiefern NCTC Klon 1469 durch aufgereinigtes LPS von *H. hepaticus* stimuliert wird. Das LPS von *H. hepaticus* führte sowohl in serumfreiem als auch in serumhaltigem Medium zu einer deutlichen Induktion von MIP-2, wobei diese Induktion aber deutlich schwächer als mit Lysat von *H. hepaticus* war (Abb. 35). Dagegen führte LPS von *H. hepaticus* in serumhaltigem Medium zu einer vergleichbar starken Induktion von IL-6

wie Lysat von *H. hepaticus*, während in serumfreiem Medium die Induktion von IL-6 durch *H. hepaticus*-LPS sehr viel schwächer war.

Die Stimulation durch 10 ng *E. coli*-LPS führte zu einer starken Sekretion von IL-6 als auch MIP-2, wobei die Konzentration von MIP-2 in serumhaltigem und in serumfreiem Medium nach 6 h in etwa gleich hoch war. Die Induktion von MIP-2 in serumfreiem Medium erfolgte dabei schneller als in serumhaltigem Medium, da die MIP-2-Konzentration nach Induktion durch *E. coli*-LPS in serumfreiem Medium nach 3 h deutlich höher als in serumhaltigem Medium war. IL-6 wurde dagegen sowohl nach 3 h als auch nach 6 h in serumhaltigem Medium durch *E. coli*-LPS deutlich stärker als in serumfreiem Medium induziert.



**Abb. 35. Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus*-LPS in der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469.** Die Zellen wurden entweder nur mit 10 ng *E. coli*-LPS bzw. 10 ng Pam3Cys-SK<sub>4</sub> oder kombiniert mit 0,6 µg 3B1-LPS koinkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Kombination mit 25 µg 3B1-Lysat. Die Koinkubation erfolgte in Medium mit 10% FCS oder in serumfreiem Medium für 3 h und 6 h. Die Konzentration an MIP-2 und IL-6 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt.

Die Koinkubation mit dem synthetischen TLR2-Liganden Pam3Cys-SK<sub>4</sub> führte ebenfalls zu einer starken Induktion von MIP-2 und IL-6, wobei beide Cytokine etwa 5-mal stärker induziert wurden, wenn die Koinkubation in serumhaltigem Medium erfolgt.

Es sollte nun überprüft werden, inwiefern sich die Kombination von *H. hepaticus*-LPS mit *E. coli*-LPS oder Pam3Cys-SK<sub>4</sub> auf die Induktion von MIP-2 und IL-6 auswirkt. Die Induktion durch 10 ng *E. coli*-LPS zusammen mit 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS führte zu keiner signifikanten Veränderung der MIP-2- und IL-6-Induktion im Vergleich zur alleinigen Induktion durch *E. coli*-LPS, wenn die Experimente in serumhaltigem Medium durchgeführt wurden. Wenn die Koinkubationen jedoch in serumfreiem Medium erfolgten, erhielt man bei der Messung beider Cytokine sowohl nach 3 h als auch nach 6 h eine signifikante Verringerung der im Überstand nachweisbaren Konzentration, wenn *E. coli*-LPS mit *H. hepaticus*-LPS kombiniert wurde gegenüber Zellen, welche nur mit *E. coli*-LPS stimuliert wurden.

Die Kombination von *H. hepaticus*-LPS mit Pam3Cys-SK<sub>4</sub> führte dagegen zu einer eher erhöhten Induktion von MIP-2 und IL-6 nach 6 h im Vergleich zur alleinigen Induktion durch Pam3Cys-SK<sub>4</sub>. Während dies bei der Messung von IL-6 auch nach 3 h der Fall war, war die Induktion von MIP-2 nach 3 h in serumhaltigem Medium in beiden Fällen gleich und in serumfreiem Medium führte die Kombination von Pam3Cys-SK<sub>4</sub> mit *H. hepaticus* nach 3 h zu einer verringerten MIP-2-Sekretion.

#### **4.4.2.2 Inhibition der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus*-LPS in der murinen Makrophagenzelllinie J774**

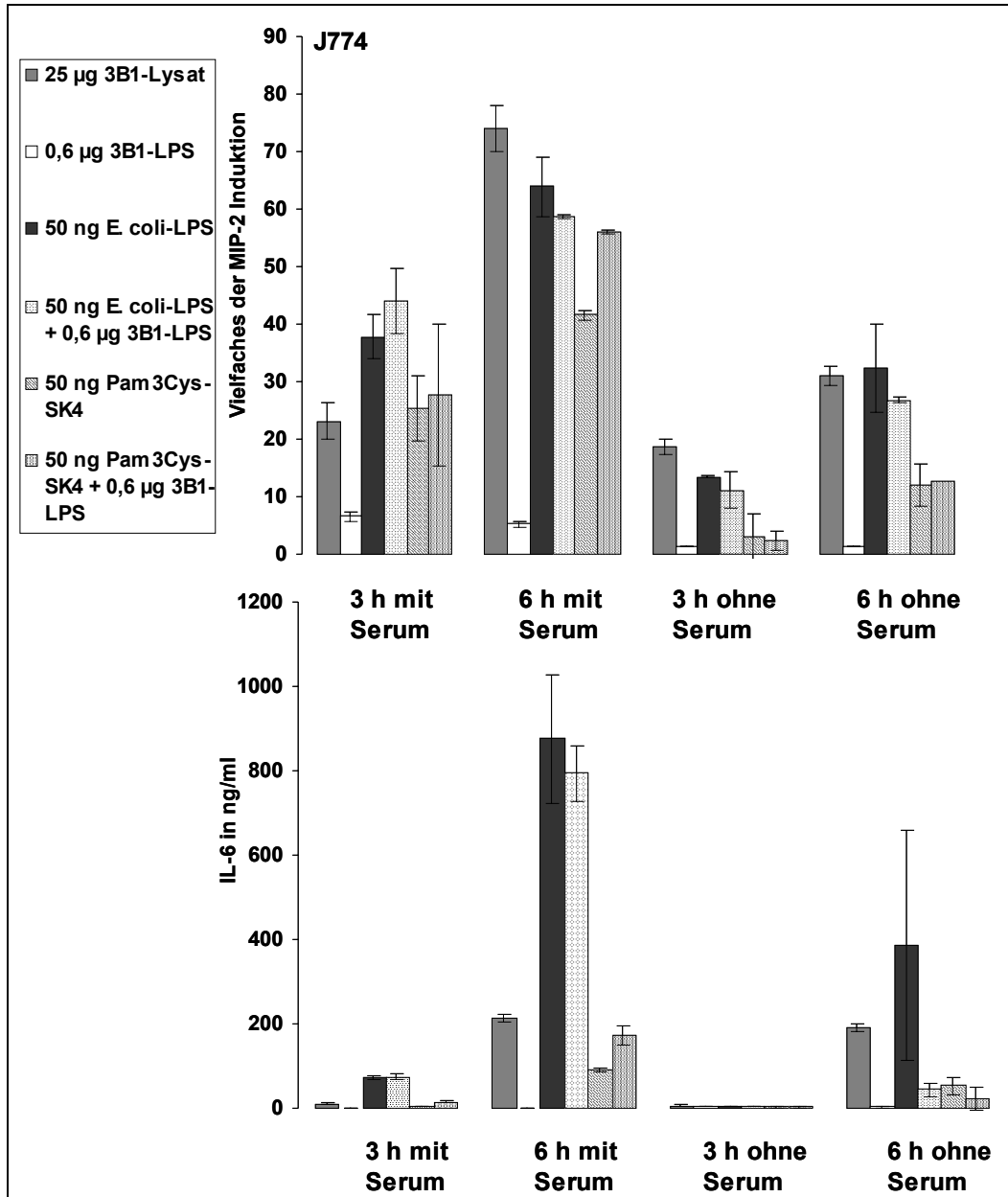
Um den Einfluss von *H. hepaticus*-LPS auf die Stimulierbarkeit der Makrophagenzelllinie J774 zu untersuchen, wurden die gleichen Experimente wie für die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 beschrieben, durchgeführt. Während diese Zelllinie durch Lysat von *H. hepaticus* sowohl in serumhaltigem als auch in serumfreiem Medium zu einer starken Sekretion von MIP-2 und IL-6 angeregt wurde, führte *H. hepaticus*-LPS nur zu einer geringen Induktion dieser Cytokine (Abb. 36). Während MIP-2 durch *H. hepaticus*-LPS noch deutlich induziert wurde, war praktisch überhaupt keine Induktion von IL-6 feststellbar. Sowohl die Koinkubation mit 50 ng *E. coli*-LPS als auch mit 50 ng Pam3Cys-SK<sub>4</sub> führte zu einer starken Induktion von MIP-2 und IL-6, wobei Pam3Cys-SK<sub>4</sub> genauso wie in NCTC Klon 1469-Zellen in serumfreiem Medium deutlich weniger stark stimulierte als in serumhaltigem Medium.

Die Kombination von *H. hepaticus*-LPS mit *E. coli*-LPS führte zu praktisch keiner Änderung der MIP-2-Induktion. In serumhaltigem Medium war auch keine Änderung der IL-6-Induktion durch *H. hepaticus*-LPS festzustellen, während es nach 6 h zu einer Verringerung der Induktion führt, wobei diese aber nicht statistisch signifikant war.

Die Kombination von *H. hepaticus*-LPS mit Pam3Cys-SK<sub>4</sub> führte ebenfalls zu einer gleich starken, teilweise auch etwas stärkeren Induktion von MIP-2 und IL-6 als Pam3Cys-



SK<sub>4</sub> alleine. Nur unter serumfreien Bedingungen nach 6 h Koinkubation erhielt man wie bei der Kombination mit *E. coli*-LPS eine geringe, statistisch nicht signifikante Verringerung der IL-6-Induktion.

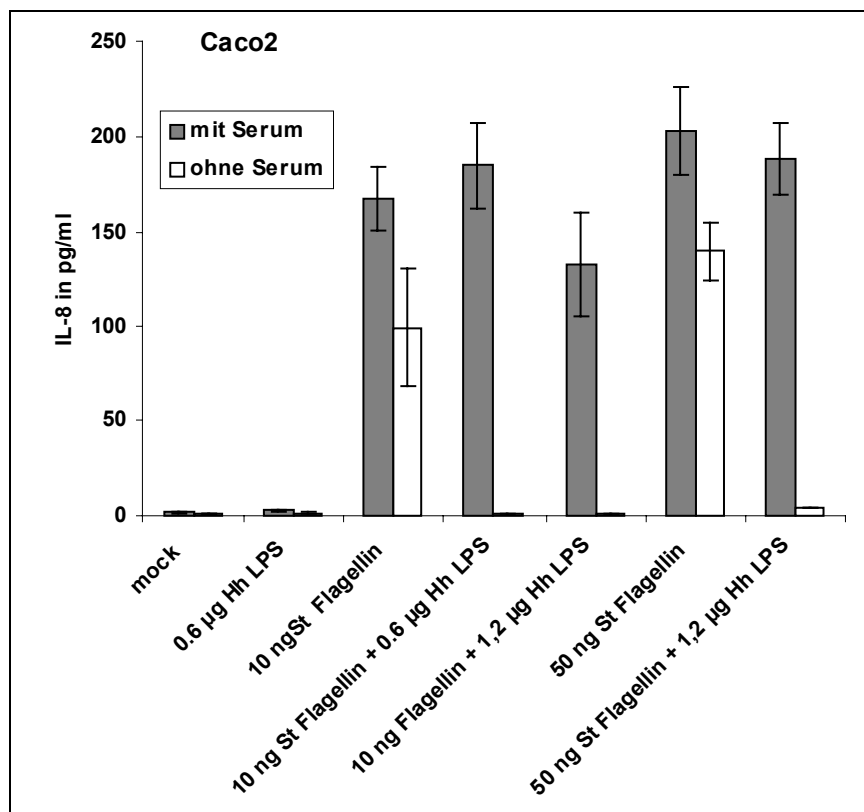


**Abb. 36.** Einfluss von *H. hepaticus*-LPS auf die proinflammatorische Antwort in der Makrophagenzelllinie J774. Die Zellen wurden entweder nur mit 50 ng *E. coli*-LPS oder 50 ng Pam3Cys-SK<sub>4</sub> oder kombiniert mit 0,6 µg 3B1-LPS koinkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Koinkubation mit 25 µg 3B1-Lysat. Die Koinkubationen erfolgten in Medium mit 10% FCS oder in serumfreiem Medium für 3 h und 6 h. Die Konzentration an MIP-2 und IL-6 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt.

#### 4.4.2.3 Inhibition proinflammatorischer Reaktionen in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2

Da es relativ wenige etablierte murine intestinale Epithelzelllinien gibt, wurde als weitere intestinale Epithelzelllinie die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2 benutzt. Als Marker für eine proinflammatorische Antwort wurde anstelle von MIP-2 das Chemokin IL-8 verwendet.

Wie in Punkt 4.3.2 gezeigt, konnten Caco2-Zellen von den getesteten Liganden für Mustererkennungsrezeptoren nur durch *S. typhimurium*-Flagellin induziert werden. Sie reagierten jedoch nicht auf Pam3Cys-SK<sub>4</sub> und *E. coli*-LPS.

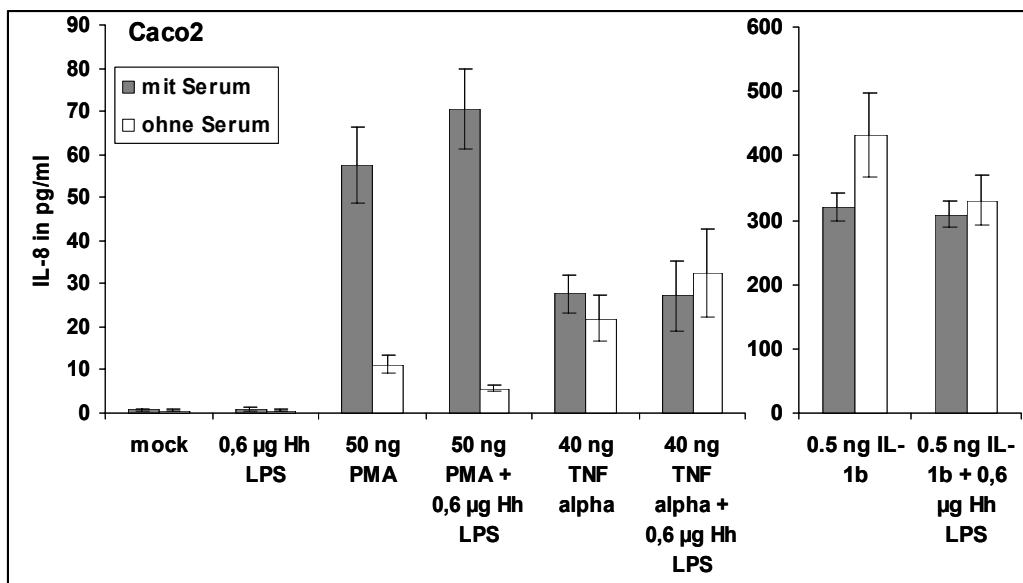


**Abb. 37. Hemmung der Flagellin-induzierten proinflammatorischen Antwort in Caco-2 Zellen durch *H. hepaticus*-LPS.** Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2 wurde mit 10 oder 50 ng *S. typhimurium*-FliC alleine oder in Kombination mit 0,6 oder 1,2 µg *H. hepaticus* 3B1-LPS für 6 h koinkubiert. Die Koinkubationen erfolgten dabei in Medium mit 10% FCS oder in serumfreiem Medium. Die Konzentration an IL-8 im Zellkulturüberstand wurde durch einen ELISA bestimmt.

Anschließend wurde untersucht, wie sich die Kombination von *S. typhimurium*-Flagellin und *H. hepaticus*-LPS auf die IL-8-Induktion auswirkt. Da die Hemmung durch *H. hepaticus*-LPS in der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 besser unter serumfreien als unter serumhaltigen Bedingungen funktionierte, wurden für die Caco2-Zellen ebenfalls beide Möglichkeiten ausprobiert. Unter serumhaltigen Bedingungen ergab sich kaum eine Auswirkung durch *H. hepaticus*-LPS (Abb. 37). Die Koinkubation von *S. typhimurium*-Flagellin alleine oder zusammen mit *H. hepaticus*-LPS führte zu einer praktisch gleich starken Induktion von IL-8. Unter serumfreien Bedingungen führte dagegen die Koinkubation

von *H. hepaticus*-LPS zusammen mit *S. typhimurium*-Flagellin zu einer fast vollständigen Hemmung der IL-8-Induktion. Während bei der Koinkubation mit 10 ng *S. typhimurium*-Flagellin zusammen mit 0,6 oder 1,2 µg *H. hepaticus*-LPS die IL-8-Sekretion komplett gehemmt war, konnte bei der Kombination von 50 ng *S. typhimurium*-Flagellin mit 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS noch eine geringe Restinduktion von IL-8 festgestellt werden.

Anschließend wurde getestet, ob auch die über andere Signalwege erfolgende IL-8-Induktion durch IL-1β, TNF-α und Phorbolmyristatacetat durch *H. hepaticus*-LPS gehemmt werden kann (Abb. 38). Dabei ergaben sich wie im Falle des *S. typhimurium*-Flagellins keine Unterschiede bei der Koinkubation mit einem Faktor alleine oder bei der gleichzeitigen Kostimulation durch *H. hepaticus*-LPS, wenn die Experimente in Medium mit 10% FCS durchgeführt wurden. Bei der Durchführung der Experimente in serumfreiem Medium ergab sich für alle drei Faktoren jedoch ebenfalls keine signifikante Reduktion der IL-8-Menge. Für Phorbolmyristatacetat konnte eine leichte Reduktion der IL-8-Stimulation durch *H. hepaticus*-LPS gefunden werden, welche jedoch weit geringer als bei der Stimulation durch *S. typhimurium*-Flagellin ausfiel und nicht signifikant war.

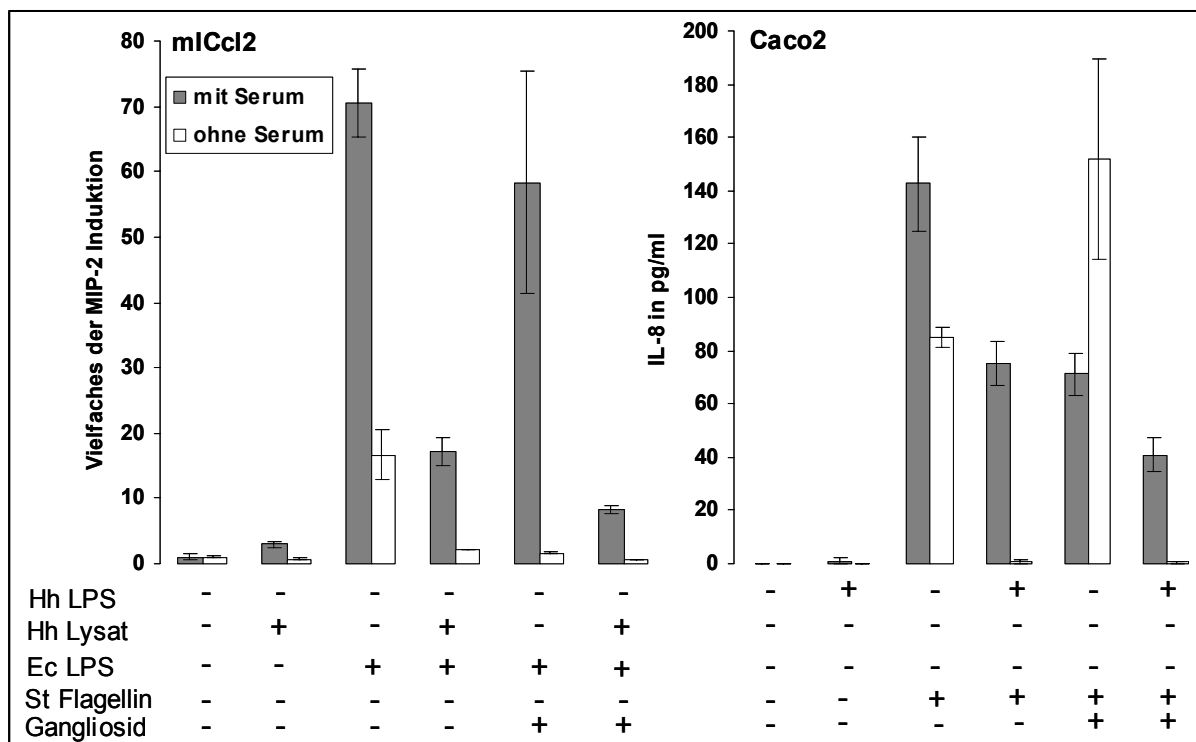


**Abb. 38. Einfluss von *H. hepaticus*-LPS auf die IL-8-Induktion durch PMA, TNF-α und IL-1β in Caco-2 Zellen.** Caco2-Zellen wurden mit 50 ng PMA, 40 ng TNF-α oder 0,5 ng IL-1β alleine oder zusammen mit 0,6 µg *H. hepaticus* 3B1-LPS in serumhaltigem oder serumfreiem Medium für 6 h koinkubiert. Die Konzentration an IL-8 im Zellkulturüberstand wurde durch einen ELISA bestimmt.

#### 4.4.3 Einfluss von Glycosphingolipiden auf die Inhibition in m-IC<sub>cl2</sub> und Caco2-Zellen

Es wurde gezeigt, dass membrangebundene Glycosphingolipide die Stärke der TLR-abhängigen Antwort hemmen können (West *et al.*, 2005). Deshalb wurde untersucht, ob *H. hepaticus* durch die Bindung an Glycosphingolipide die proinflammatorische Antwort in den verschiedenen Zelllinien herunterreguliert. Wie erwartet, war die Induktion von MIP-2 durch

*E. coli*-LPS in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen und die IL-8-Induktion durch *S. typhimurium*-Flagellin in Caco2-Zellen mit der Ausnahme von Experimenten in serumfreiem Medium verringert, wenn 1 µg Glycosphingolipide zugesetzt wurden (Abb. 39). Wenn jedoch das *E. coli*-LPS zusammen mit Lysat von *H. hepaticus* 3B1 kombiniert wurde, erhielt man in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen unabhängig von der gleichzeitigen Zugabe von Glycosphingolipiden die gleiche Hemmung gegenüber der alleinigen Stimulierung mit *E. coli*-LPS. Das gleiche galt auch für die Kombination von *S. typhimurium*-Flagellin mit *H. hepaticus*-LPS bei der Koinkubation mit Caco2-Zellen unter serumfreien Bedingungen. Daher scheint die Anwesenheit von Glycosphingolipiden keinen Einfluss auf die Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus*-Lysat oder -LPS zu haben.

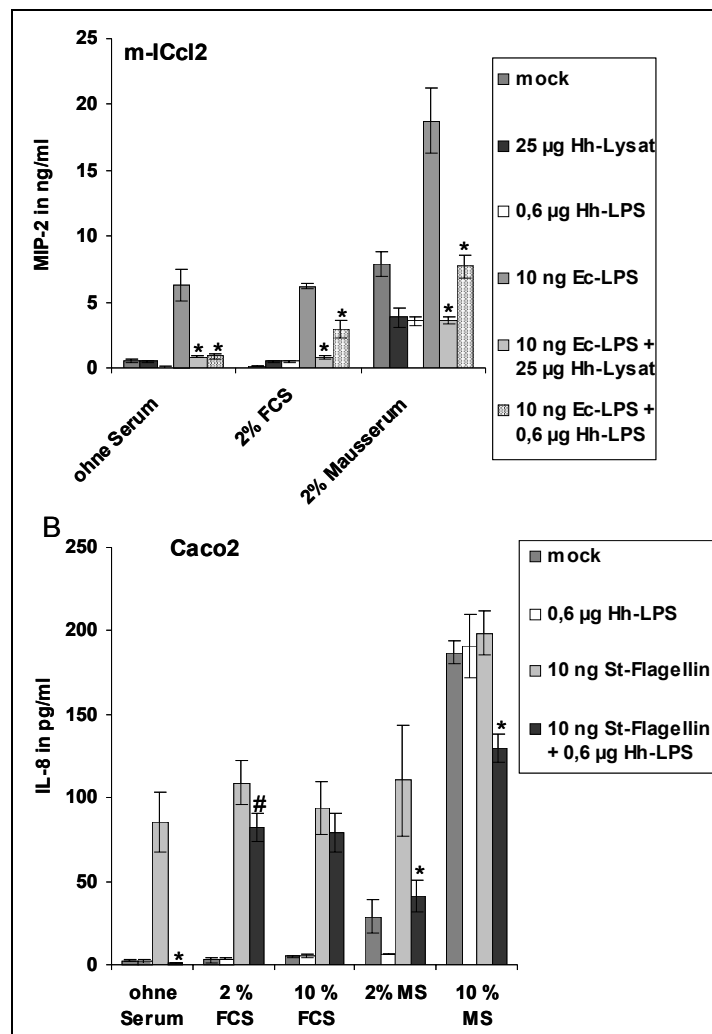


**Abb. 39. Einfluss von Glycosphingolipiden auf die Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus*-Lysat oder -LPS.** m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden mit 10 ng *E. coli*-LPS alleine oder zusammen mit 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS und/oder 1 µg Gangliosiden (Glycosphingolipiden) für 6 h koinkubiert. Caco2-Zellen wurden mit 10 ng *S. typhimurium*-Flagellin alleine oder zusammen mit 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS und/oder 1 µg Gangliosiden für 6 h koinkubiert. Die Koinkubationen erfolgten jeweils in serumhaltigem oder serumfreiem Medium. Für die Überstände der m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurde die Konzentration an MIP-2 und für die Caco2-Zellen die Konzentration an IL-8 durch einen ELISA bestimmt.

#### 4.4.4 Einfluss von Mausserum auf die Inhibition in m-IC<sub>cl2</sub> und Caco2-Zellen

Die bisherigen Experimente wurden alle in Medium mit fötalem Kälberserum durchgeführt (außer Experimente in serumfreiem Medium). Da *H. hepaticus* aber ein Mauspathogen und daher an Mäuse adaptiert ist, wurden auch Experimente unter Verwendung von Mausserum

durchgeführt. Die Anwesenheit von murinen anstelle von bovinen Serumkomponenten könnte die Wechselwirkung mit Rezeptoren der Zelle modulieren.



**Abb. 40. Einfluss von Mausserum auf die Hemmung durch *H. hepaticus*-Lysat oder LPS.** (A) m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurden für 6 h mit 10 ng *E. coli*-LPS alleine oder zusammen mit 25 µg *H. hepaticus*-Lysat oder 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS koinkubiert. Die Koinkubationen erfolgten in serumfreiem Medium oder in Medium mit 2% fötalem Kälberserum oder 2% murinem Serum. Die Konzentration an MIP-2 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt. (B) Caco2-Zellen wurden mit 10 ng *S. typhimurium*-Flagellin alleine oder zusammen mit 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS für 6 h koinkubiert. Die Koinkubation erfolgte in serumfreiem Medium, in Medium mit 2% oder 10% fötalem Kälberserum oder in Medium mit 2% oder 10% murinem Serum. Die Konzentration an IL-8 im Überstand wurde durch einen ELISA bestimmt. Ein Stern gibt einen p-Wert < 0,1 und eine Raute einen p-Wert < 0,5 an (jeweils bezogen auf eine Koinkubation mit *S. typhimurium*-Flagellin oder *E. coli*-LPS mit oder ohne *H. hepaticus*-LPS).

Leider war das verwendete Serum nicht frei von stimulierenden Agenzien, da mock-infizierte Zellen schon eine deutlich erhöhte Sekretion von MIP-2 im Falle von m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen (Abb. 40 A) und IL-8 im Falle von Caco2-Zellen aufwiesen (Abb. 40 B). Bei Verwendung der m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen gab es keinen Unterschied zwischen der Verwendung von fötalem Kälberserum oder murinem Serum, da in beiden verwendeten Medien 25 µg *H. hepaticus*

3B1-Lysat zu einer etwa gleich starken Hemmung der durch *E. coli*-LPS stimulierten MIP-2-Sekretion führten. Man muss dabei beachten, dass die Zellen in Medium mit murinem Serum aufgrund der Kontamination des Serums schon deutlich erhöhte Werte nach Stimulation mit *E. coli*-LPS gegenüber Zellen in Medium mit 2% fötalem Kälberserum oder in serumfreiem Medium aufwiesen. *H. hepaticus*-Lysat oder -LPS konnten dabei auch die Induktion durch das verwendete Mausserum hemmen.

Bei den Caco2-Zellen führte *H. hepaticus*-LPS wie schon zuvor beschrieben zu einer fast kompletten Inhibierung der durch *S. typhimurium*-Flagellin stimulierten IL-8-Sekretion, wenn serumfreies Medium verwendet wird, während in Medium mit 2% oder 10% fötalem Kälberserum praktisch keine Hemmung festzustellen war. Unter Verwendung von 2% oder 10% murinem Serum war dagegen noch eine deutliche Hemmung durch *H. hepaticus*-LPS festzustellen, wenn diese auch nicht so stark wie in serumfreiem Medium war. In Medium mit 10% Mausserum war die IL-8-Sekretion von Zellen, welche gemeinsam mit 10 ng *S. typhimurium*-Flagellin und 0,6 µg *H. hepaticus*-LPS stimuliert wurden, geringer als in mock-infizierten Zellen. Außerdem hemmte bei Verwendung von 2% Mausserum *H. hepaticus*-LPS ebenfalls die durch das Mausserum ausgelöste erhöhte basale IL-8-Induktion. Dies zeigte, dass *H. hepaticus*-LPS auch die Induktion von IL-8 durch kontaminierende Stimulantien in dem verwendeten Mausserum hemmen kann. Es scheint daher so zu sein, dass noch unbekannte Komponenten in dem fötalen Kälberserum für den Verlust der inhibitorischen Wirkung in Medium mit fötalem Kälberserum verantwortlich waren. Ein Teil der inhibitorischen Wirkung von *H. hepaticus*-LPS blieb in Medium mit murinem Serum dagegen noch bestehen.

#### **4.5 Analyse der durch *H. hepaticus* ausgelösten globalen Genregulation in der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 und der Makrophagenzelllinie J774 durch Microarrays**

Es wurde zuvor gezeigt, dass *H. hepaticus* eine gute Adhärenz an die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 und die Makrophagenzelllinie J774 zeigt und eine starke Induktion der proinflammatorischen Cytokine MIP-2 und IL-6 auslöst. Daher sollte nun das transkriptionelle Profil der beiden Zelllinien als Antwort auf die Koinkubation mit *H. hepaticus* untersucht werden, um einen genaueren Einblick in die durch *H. hepaticus* ausgelöste proinflammatorische Antwort zu erhalten.

##### **4.5.1 Ergebnisse der Microarrayexperimente**

Dazu wurden die Maus 10k A- und B-Microarrays der Firma MWG Biotech benutzt. Diese enthalten spezifische Oligonukleotide für je 9984 annotierte Gene und ESTs aus der Maus. Es wurden zuerst Experimente durchgeführt, bei denen mock-infizierte Zellen mit 3B1-

infizierten Zellen verglichen wurden. Dazu wurde die Makrophagenzelllinie J774 für 2 h mit 3B1 koinkubiert und anschließend wurden die infizierten Zellen genauso wie mock-infizierte Kontrollzellen abgeerntet und daraus Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde in cDNA mit Poly-dT-Oligonukleotiden umgewandelt. Dabei wurden bei der Synthesereaktion mit Cy3 oder Cy5 markierte dUTPs eingesetzt, welche dadurch in die cDNA eingebaut wurden. Die mit Cy3 und Cy5 markierten cDNAs wurden gemischt und für 16-20 h auf dem Array hybridisiert. Anschließend wurde der Array gewaschen und dann mit einem Fluoreszenzscanner eingelesen. Die eingelesenen Bilder wurden mit Hilfe des Programms Imagene ausgewertet und die Rohdaten für Scans mit verschiedenen Intensitäten wurden mit dem Programm MAVI (MWG Biotech) zusammengestellt und normalisiert. Für die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 wurden die gleichen Experimente durchgeführt, wobei die Koinkubationszeit hier jedoch 4 h betrug.

Für J774-Makrophagen, welche für 2 h mit *H. hepaticus* 3B1 infiziert wurden, kamen insgesamt 1171 Gene als reprimiert heraus. Dabei wurden alle Gene nicht gewertet, deren Spot von Imagene entweder als leerer Spot erkannt oder manuell aufgrund von Verschmutzungen markiert wurden. Demgegenüber kamen 1187 Gene als induziert heraus. In der Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469, welche für 4 h mit *H. hepaticus* 3B1 infiziert wurde, waren 869 Gene reprimiert und 815 Gene induziert. Davon waren insgesamt 246 Gene in beiden Zelllinien gegenüber mock-infizierten Zellen induziert und 147 Gene reprimiert. Eine Übersicht über eine Auswahl an regulierten Genen ist in Tab. 21 dargestellt.

**Tab. 21. Auswahl an regulierten Genen.** In der ersten Spalte ist das Genprodukt und in der zweiten Spalte eine kurze Funktionsangabe angegeben. In der dritten und vierten Spalte sind die Verhältnisse der Expressionsraten in *H. hepaticus* 3B1-infizierten zu mock-infizierten Zellen angegeben.

Genprodukt	Funktion	Verhältnis J774	Verhältnis NCTC Klon 1469
<b>Cytokine und Interleukine</b>			
MIP-2	Chemokin	11,0	27,7
Mip-1α/ MIP-1β/ MIP-1γ	Cytokin	34,6/12,3/ 2,7	35,9/22,6/ 2,8
Monocyte chemo-attractant protein 1	Cytokin	7,4	33,5
Monocyte chemo-attractant protein 3	Cytokin	2,5	5,3
TNF-α	Cytokin	21,3	0,4
IL-1α/ IL-1β	Interleukin 1	1,1/0,9	3,3/59,8
IL-1ra	IL-1 Rezeptorantagonist	2,6	1,6
IL-6	Interleukin 6	0,5	4,8
IL-12bp40	Interleukin 12bp40	1,2	2,8
macrophage migration inhibitory factor	Cytokin	4,4	1,1

<b>Rezeptoren</b>			
Il1r1	Typ I Interleukin 1 Rezeptor	2,6	0,9
Il4ra	Interleukin 4 Rezeptor $\alpha$	1,4	2,1
Il6ra	Interleukin 6 Rezeptor $\alpha$	3,9	1,2
TLR2/ TLR4/ TLR5	Toll-ähnliche Rezeptoren für Lipoproteine, LPS und Flagelline	5,1/0,62/4,9	2,1/0,2/0,5
Tnfrsf1b/ Tnfrsf5/ Tnfrsf6	TNF-Rezeptorsuperfamilie	5,4/3,2/ 8,9	3,1/1,0/ 2,0
CD14	Korezeptor von TLR4	9,5	2,4
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül	7,2	1,5
<b>Gene mit einer Funktion in der Signalweiterleitung</b>			
TRAF1/ TRAF6	TNF-Rezeptorassoziierte Faktoren, Funktion in der TLR/IL-1 $\beta$ -Signalweiterleitung	5,1/0,3	8,0/1,3
NF- $\kappa$ Bia/ NF- $\kappa$ Bia	Negative Regulatoren von NF- $\kappa$ B	13,8/2,6	3,6/3,6
<b>Transkriptionsfaktoren</b>			
NF- $\kappa$ B1/ NF- $\kappa$ B2/ c-REL/ RelA/RelB	Untereinheiten von NF- $\kappa$ B	2,2/2,6/ 2,7/ 1,9/3,0	0,9/2,2/ 1,7/ 2,2/2,6
JunB/ Fos1	AP-1 Transkriptionsfaktoren	4,8/2,2	1,1/0,9
C-myc	Transkriptionsfaktor mit Funktionen im Zellwachstum, in der Zelldifferenzierung und in der Tumorbildung	2,8	0,7
<b>Apoptose</b>			
Mcl1	Anti-apoptotischer Faktor der B <sub>cl2</sub> -Familie	5,7	0,9
Bcl2a1a/ Bcl2a1b	Anti-apoptotischer Faktor der B <sub>cl2</sub> -Familie	4,7/5,6	1,4/1,9
<b>Sonstige Gene mit einer Funktion in der Entzündungsauslösung oder in der Tumorigenese</b>			
Cathepsin 6	Rolle in chronischen Entzündungen und in der Tumorbildung	8,9	1,7
Glycoprotein 49B	Funktion in der LPS-induzierten Entzündungsentwicklung	6,2	1,0

Die regulierten Gene wurden weiter mit dem Programm GoMiner ausgewertet (Zeeberg *et al.*, 2003). Dieses Programm teilt die Gene in verschiedene Kategorien entsprechend ihrer Funktion ein und berechnet darauf basierend, welche Kategorien eine überdurchschnittlich hohe Zahl an induzierten oder reprimierten Genen aufweisen. Dabei zeigte sich, dass nur wenige Kategorien in beiden Zelllinien statistisch überrepräsentiert viele induzierte oder reprimierte Gene aufweisen (Tab. 22). Gene für den Export aus dem Nukleus und für die Regulation des Zellzyklus waren in beiden Zelllinien überrepräsentiert reprimiert, während viele Gene für die Cytokinproduktion in beiden Zelllinien induziert waren. Dagegen gab es viele Kategorien, die in einer Zelllinie überrepräsentiert viele induzierte und in der anderen reprimierte Gene aufwiesen. In den Hepatozyten waren Gene für die Signalweiterleitung, Membranproteine und die extrazelluläre Matrix eher induziert, während sie in den Makrophagen eher reprimiert waren. Dagegen waren in den Makrophagen Gene, welche allgemein für den Metabolismus und physiologische Prozesse zuständig sind, eher induziert



und in den Hepatozyten reprimiert. Dasselbe gilt für Gene, welche allgemein für Apoptose und die Regulation von Caspasen zuständig sind.

**Tab. 22. Auswahl an regulierten Kategorien in Hepatozyten und Makrophagen.** Durch das Programm GoMiner wurden Kategorien, welche überdurchschnittlich viele induzierte oder reprimierte Gene enthalten bestimmt. Der p-Wert gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, dass in der entsprechenden Kategorie hoch- oder herunterregulierte Gene doch nicht überrepräsentiert sind.

Beschreibung	Gesamtanzahl	J774			NCTC Klon 1469		
		Gesamt (p-Wert)	Induziert (p-Wert)	Reprimiert (p-Wert)	Gesamt (p-Wert)	Induziert (p-Wert)	Reprimiert p-Wert)
<b>In beiden Zelllinien reprimiert</b>							
Protein-Nukleus-Export	9	6 (0,01)	3 (0,11)	3 (0,04)	3 (0,06)	0 (1)	3 (0,01)
Positive Regulation der Axonbildung	4	3 (0,04)	0 (1)	3 (0,003)	2 (0,06)	0 (1)	2 (0,02)
Regulation des Zellzykluses	254	61 (0,29)	30 (0,83)	31 (0,04)	45 (0,0002)	17 (0,12)	28 (0,003)
<b>In beiden Zelllinien induziert</b>							
Cytokinproduktion	35	11 (0,14)	9 (0,04)	2 (0,83)	5 (0,30)	5 (0,03)	0 (1)
<b>In J774 reprimiert, in NCTC Klon 1469 induziert</b>							
Signalweiterleitung	1342	292 (0,76)	149 (0,10)	143 (0,004)	148 (0,22)	91 (0,0004)	57 (0,99)
Membran	2473	582 (0,05)	342 (0,40)	240 (0,02)	252 (0,69)	139 (0,02)	113 (0,10)
Extrazelluläre Matrix	258	67 (0,10)	30 (0,86)	37 (0,002)	37 (0,03)	21 (0,02)	16 (0,35)
<b>in J774 induziert, in NCTC Klon 1469 reprimiert</b>							
Wasserstofftransport	54	22 (0,002)	19 (0,0001)	3 (0,86)	7 (0,3)	0 (1)	7 (0,03)
Regulation von Caspasenaktivität	18	8 (0,03)	6 (0,03)	2 (0,48)	5 (0,03)	1 (0,60)	4 (0,02)
Aktivierung von Caspasen	18	8 (0,03)	6 (0,03)	2 (0,48)	5 (0,03)	1 (0,60)	4 (0,02)
Apoptose	29	11 (0,04)	9 (0,01)	2 (0,74)	6 (0,07)	1 (0,77)	5 (0,02)
Nukleinsäuremetabolismus	1416	344 (0,03)	246 (0,03)	128 (0,36)	140 (0,78)	48 (1)	92 (0,04)
Physiologische Prozesse	4947	1125 (0,15)	701 (0,02)	424 (0,85)	528 (0,12)	236 (0,84)	292 (0,006)
Metabolismus	3255	758 (0,05)	491 (0,0005)	267 (0,905)	344 (0,36)	142 (0,98)	202 (0,01)

Ein Großteil an regulierten Genen gehörte dabei zu einem Satz an Genen, welche kürzlich als allgemeine regulierte Gene der Wirtsseite auf Pathogene beschrieben wurden (Jenner und Young, 2005). Eine Auswahl der Gene ist in Tab. 23 dargestellt.

**Tab. 23. Übersicht über regulierte Gene, welche zu den allgemein regulierten Genen der Wirtseite als Antwort auf Pathogene gehören.** In der ersten Spalte ist die Bezeichnung des Genes angegeben. In der dritten und vierten Spalte sind die Verhältnisse der Expressionsraten von *H. hepaticus* 3B1-infizierten zu mock-infizierten Zellen angegeben.

Genprodukt	Regulation in J774	Regulation in NCTC Klon 1469
<b>In beiden Zelllinien induziert</b>		
TNF receptor-associated factor 1	2,2	8,1
Activating transcription factor 3	2,5	2,8
RelB	3,0	2,6
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	3,2	3,2
Integrin 5 $\alpha$	3,3	2,5
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	4,9	3,1
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	12,4	5,5
MIP-2	11,0	27,7
MIP-1 $\alpha$	34,6	35,9
MIP-1 $\beta$	12,3	22,6
Nf- $\kappa$ B $\alpha$	13,8	3,6
Nf- $\kappa$ B $\beta$	2,6	3,6
<b>Nur in J774 induziert</b>		
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	2,0	1,1
Activating transcription factor 4	2,3	0,5
Interleukin 1 receptor antagonist	2,5	1,6
Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	2,4	1,3
Syndecan 4	2,6	1,1
Lamin 3 $\beta$	2,6	1,7
Neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	2,6	1,0
Dual specificity phosphatase 2	4,4	1,1
Acid phosphatase 2, lysosomal	2,6	1,6
Neutrophil cytosolic factor 2	2,7	1,2
Stromal interaction molecule 1	2,9	1,7
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	2,9	1,9
CD53 antigen	2,9	1,1
BCL2-associated athanogene	2,9	0,5
C-Rel	2,7	1,7
Tumor necrosis factor	4,9	0,4
Mcl1	21,3	0,9
<b>Nur in NCTC Klon 1469 induziert</b>		
Interleukin 6	0,5	4,8
Solute carrier family 7, member 5	0,6	2,1
Chemokine (C-C motif) ligand 17	0,8	3,6
Interleukin 1 $\beta$	0,9	59,8
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	0,9	2,6
Laminin 2 $\gamma$	0,9	3,0
Phosphatidic acid phosphatase type 2B	1,2	3,5
Matrix metalloproteinase 7	1,3	2,0
Apolipoprotein B	1,3	2,4
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	1,4	2,0

## Ergebnisse

Colony stimulating factor 3	1,4	35,4
GTP cyclohydrolase 1	1,5	2,2
Glycerol kinase	1,5	2,1
Superoxide dismutase 2, mitochondrial	1,5	2,3
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1,6	2,5
Immediate early response 3	1,7	2,5
IL-12b	1,8	2,8
RelA	1,9	2,2
<b>In beiden Zelllinien reprimiert</b>		
Signal transducer and activator of transcription 4	0,1	0,4
Transducin-like enhancer of split 1	0,4	0,4
Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific	0,4	0,5
Monoglyceride lipase	0,4	0,4
<b>Nur in J774 reprimiert</b>		
Cyclin A1	0,1	1,1
Insulin-like growth factor binding protein 6	0,1	1,8
Dual specificity phosphatase 6	0,2	0,9
Interleukin 7 receptor	0,2	1,3
ATPase, H+/K+ exchanging, alpha polypeptide	0,2	0,9
Mcp-2	0,3	0,8
TNF receptor-associated factor 6	0,3	1,3
Transforming growth factor $\alpha$	0,3	1,4
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	0,5	0,8
Cathepsin S	0,5	0,7
Somatostatin receptor 2	0,5	0,7
Ras homolog gene family, member B	0,5	0,8
<b>Nur in NCTC Klon 1469 reprimiert</b>		
Signal transducer and activator of transcription 1	1,0	0,5
Epithelial membrane protein 3	1,2	0,4
Phosphoglycerate mutase 1	1,2	0,4
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	0,9	0,4
Insulin-like growth factor binding protein 4	0,9	0,5
Pleckstrin	1,7	0,5
Epithelial membrane protein 1	0,9	0,5
CD59	0,8	0,4
Cytoskeleton-associated protein 4	1,4	0,5
Activating transcription factor 4	2,3	0,5
BCL2-associated athanogene	2,9	0,5

In einer Studie von 2004 wurden Gene bestimmt, welche in primären Knochenmarksmakrophagen („bone marrow derived macrophages“; BMDM) von C57BL/6-Mäusen nach Koinkubation mit 10 ng/ml *E. coli*-LPS differentiell reguliert werden (Bjorkbacka *et al.*, 2004). Da in dieser Studie ein ähnlicher Zelltyp benutzt wurde und LPS einen der wichtigsten TLR-Liganden darstellte, wurde die durch *H. hepaticus* ausgelöste Genregulation mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen. Die Induktion über *E. coli*-LPS bot außerdem den Vorteil, dass dadurch sowohl der MyD88-abhängige als auch -unabhängige Weg

stimuliert werden. Für diese Studie wurde das Operon *Mus musculus* ver. 1.1 probe set (Qiagen) benutzt. Deshalb konnten nicht alle in dieser Studie geprüften Gene den Experimenten mit den MWG *Mus musculus* A- und B-Arrays zugeordnet werden. Von 1207 durch Koinkubation mit LPS induzierten Genen konnten 745 zugeordnet werden und von 1075 reprimierten Genen konnten 618 zugeordnet werden.

Von den 745 zugeordneten induzierten Genen waren 76 (6,3%) ebenfalls in J774-Makrophagen, 79 (6,5 %) in NCTC Klon 1469 Hepatozyten und 24 (3,2%) in beiden Zelllinien durch *H. hepaticus* induziert. Demgegenüber waren von den 618 zuordnungsbaeren reprimierten Genen 61 (9,9%) in J774-Makrophagen, 19 (3,1%) in NCTC Klon 1469-Hepatozyten und 2 (0,3%) in beiden Zelllinien durch *H. hepaticus* reprimiert (Tab. 24). Damit überschritten sich diese Ergebnisse nur relativ gering. Es wäre zu erwarten gewesen, dass zumindest mit den J774-Makrophagen eine größere Übereinstimmung gefunden worden wäre, da bei den Experimenten mit dem *E. coli*-LPS und den Knochenmarksmakrophagen die Koinkubationszeit ebenfalls 2 h betrug und damit der Zelltyp und die Koinkubationszeit übereinstimmten. In Tab. 25 sind diejenigen Gene dargestellt, welche sowohl in den BMDM durch *E. coli*-LPS als auch in J774 und NCTC Klon 1469 durch *H. hepaticus* reguliert wurden. In der Studie wurden die regulierten Gene durch Microarrays mit BMDMs von MyD88-defizienten Mäusen in MyD88-abhängige und -unabhängige Gene eingeteilt. In Tab. 25 sind daher die regulierten Gene ebenfalls in MyD88-abhängige und unabhängige Gene eingeteilt.

**Tab. 24. Vergleich von LPS-regulierten Genen in BMDM und durch *H. hepaticus* regulierten Genen in J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten.**

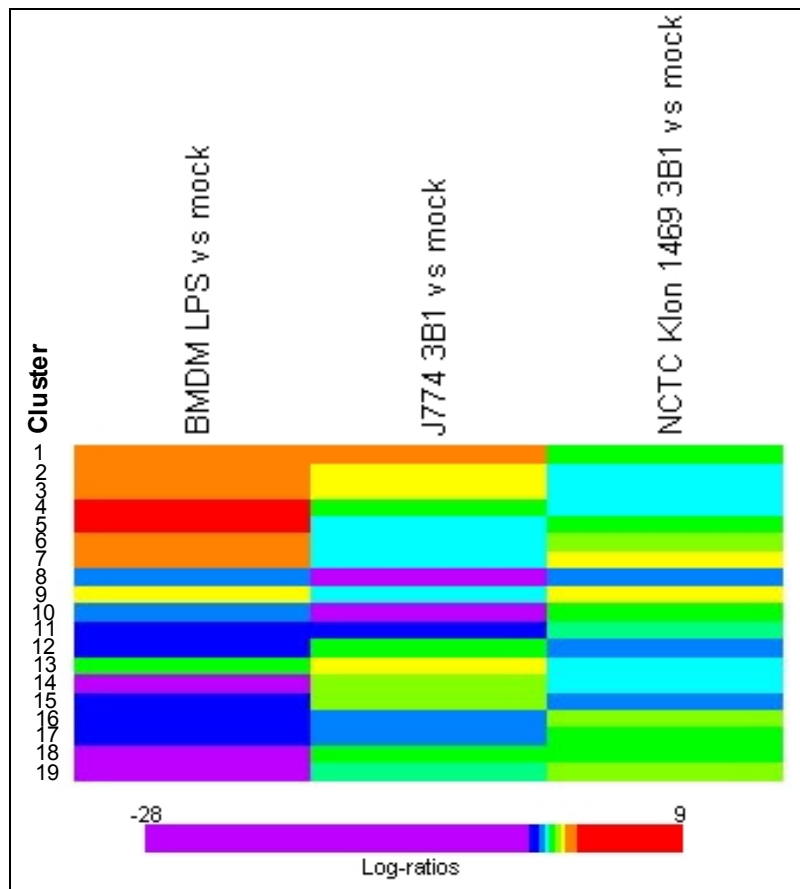
	<b>Induziert</b>	<b>Reprimiert</b>
<b><i>E. coli</i>-LPS in BMDM</b>	1207	1075
<b>Davon zugeordnet</b>	745	618
<b>Reguliert in J774 durch <i>H. hepaticus</i></b>	76	61
<b>In %</b>	6,3	9,9
<b>Reguliert in NCTC Klon 1469 durch <i>H. hepaticus</i></b>	79	19
<b>In %</b>	6,5	3,1
<b>In beiden Zelllinien reguliert</b>	24	2
<b>In %</b>	3,2	0,3

**Tab. 25. Auswahl an MyD88-abhängigen und unabhängigen Genen, welche durch *E. coli*-LPS und *H. hepaticus* reguliert wurden.** In der ersten Spalte ist der Genname und in der zweiten Spalte das entsprechende Protein bzw. die Funktion angegeben. In der dritten Spalte ist die Induktion in BMDMs durch *E. coli*-LPs im Vergleich zur basalen Induktion angegeben. In der vierten und fünften Spalte sind die Verhältnisse der Expressionsraten von *H. hepaticus* 3B1-infizierten zu mock-infizierten Zellen angegeben.

Gen	Beschreibung	LPS	J774	NCTC 1469	Klon
<b>MyD88-abhängig</b>					
<i>ccl2</i>	Mcp-1	15,1	7,4	33,5	
<i>cxcl2</i>	MIP-2	36,4	11,0	27,7	
<i>ccl4</i>	MIP-1 $\beta$	46,6	12,3	22,6	
<i>ccl3</i>	MIP-1 $\alpha$	30,6	34,6	35,9	
<b>MyD-88-unabhängig</b>					
<i>sod2</i>	Superoxyddismutase	8,5	2,4	2,3	
<i>tnfrsf1b</i>	TNF-Rezeptorsuperfamilie, Mitglied 1B	3,1	4,7	3,1	
<i>tlr2</i>	TLR2	6,8	4,5	2,1	
<i>traf1</i>	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 1	10,0	2,2	8,1	
<i>bcl3</i>	B-cell Leukämie/ Lymphoma 3	4,2	2,3	2,7	
<i>nfkbia</i>	Inhibitor von NF- $\kappa$ B	3,5	13,6	3,7	
<i>nfk2</i>	p49-Untereinheit von NF- $\kappa$ B	6,5	2,6	2,2	
<i>ccl9</i>	MIP-1 $\gamma$	2,9	2,7	2,8	
<i>relb</i>	RelB-Untereinheit von NF- $\kappa$ B	5,1	3,0	2,6	
<i>tnfrsf5</i>	TNF-Rezeptorsuperfamilie, Mitglied 5	4,9	3,2	3,1	
<i>itga5</i>	Integrin 5 $\alpha$	2,7	3,3	2,5	
<i>gpr84</i>	G-Protein gekoppelter Rezeptor 84	15,4	3,6	6,7	
<i>odc</i>	Ornithindecaboxylase	2,2	4,5	2,6	
<i>irg1</i>	Immunresponsive Gen1	32,7	6,0	5,1	
<i>clecsf9</i>	c-Typ Lektin, Superfamilienmitglied 9	16,8	17,5	2,6	
<b>Nicht zuordnungsbar</b>					
<i>ler3</i>	Immediate early response gene 3	2,8	2,0	2,5	
<i>ptgs2</i>	Prostaglandinendoperoxydsynthase 2	431,9	9,1	5,5	
<i>1810029b16rik</i>	Riken-cDNA1810029b16	4,2	2,0	2,7	
<i>birc2</i>	Apoptosisinhibitor 2	3,4	2,6	2,1	
<i>nfkbia</i>	Inhibitor von NF- $\kappa$ B	5,0	2,6	3,5	

Die in den Knochenmarksmakrophagen durch *E. coli*-LPS regulierten Gene wurden einer Clusteranalyse gegen die durch *H. hepaticus* in J774 und NCTC Klon 1469 regulierten Gene unterzogen. Die Analysen wurden mit dem BRB-Array Tool Version 3.4 durchgeführt (Baar *et al.*, 2003). Dabei konnte bestätigt werden, dass sowohl in den J774-Makrophagen als auch in den BMDM apoptotische und anti-apoptotische Gene vermehrt hochreguliert werden, während sich in den Hepatozyten praktisch keine Änderung dieser Gene ergibt (Abb. 41 und Tab. 26; Cluster 2 und 3). Dagegen waren insgesamt gesehen mehr Cytokine in den Hepatozyten als in den Makrophagen hochreguliert. Diese waren zum Teil auch in den

BMDM hochreguliert (Cluster 6 und 7). Es gab jedoch auch Cytokine, welche nur in den Hepatozyten, nicht aber in den Makrophagen hochreguliert wurden (Cluster 10). Den größten Cluster umfassten Gene, welche sehr stark in den BMDM und weniger stark in den Makrophagen hochreguliert, aber in den Hepatozyten praktisch gar nicht reguliert wurden (Cluster 4). Insgesamt konnte man aus der Clusteranalyse schließen, dass sich die durch *E. coli*-LPS in BMDMs induzierte Antwort stark von der durch *H. hepaticus* induzierten Antwort in J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten unterscheidet. Ebenfalls unterscheidet sich auch die Antwort auf die Koinkubation mit *H. hepaticus* deutlich in den beiden Zelllinien.



**Abb. 41. Clusteranalyse von in Knochenmarksmakrophagen regulierten Genen gegen durch *H. hepaticus* 3B1 regulierte Gene in J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten**

**Tab. 26. Auswahl an Genen der einzelnen Cluster (siehe Abb. 41).**

Cluster	Ausgewählte Gene
1	<i>clecsf9, cxcl16, btg1, junB, mapk6</i>
2	<i>plcd, birc2, ifng, bcl2a1a, bcl2a1b, tnfrsf6, bcl10</i>
3	<i>rela, ier2, tlr2, fosl1, tnf, clecsf5,</i>
4	<i>il1rn, cmkbr5, gp38, il10ra, myd88, stat5a, ccl27, birc3, bcl2l11, fos, rel, relb, il13ra2, nfkb2, ccl5, cd52, ccl24, ptgs2, nfkbie, cmkbr1, cxcl10, il10, cx3cl1</i>
5	<i>il4, il1a, btg2, cmkbr3, fgf14, fgf22, cmkbr3, egr2, il15,</i>
6	<i>bcl3, il15ea, il12b, tlr1, fgf9, nfkbib, ccl17, ccl4,</i>
7	<i>cmkbr7, cxcl2, il1b, ier3, il6, cxcl11, ccl9,</i>
8	-
9	<i>mapkapk2, ccl7, fgf7</i>
10	<i>ccl2, ccl8</i>
11	<i>saa3, csf3</i>
12	<i>Nfkbia, tnfrsf1b</i>
13	<i>tlr4</i>
14	<i>tnfrsf1a</i>
15	<i>cts8, pcdh8, tgfb3, jun, tgfb1, cxcr4</i>
16	<i>il21r, il6ra, cd28</i>
17	<i>tcl1b2, pcdh10</i>
18	-
19	<i>cd19, tnfrsf10, casp9, tnfrsf8, cd2, rab9</i>
20	<i>fgf2, casp7, fgf15, saa4, cdh5, tcl1, il7, bcl2l2</i>

#### 4.5.2 Überprüfung der Ergebnisse der Microarray-Analysen durch semiquantitative RT-PCRs

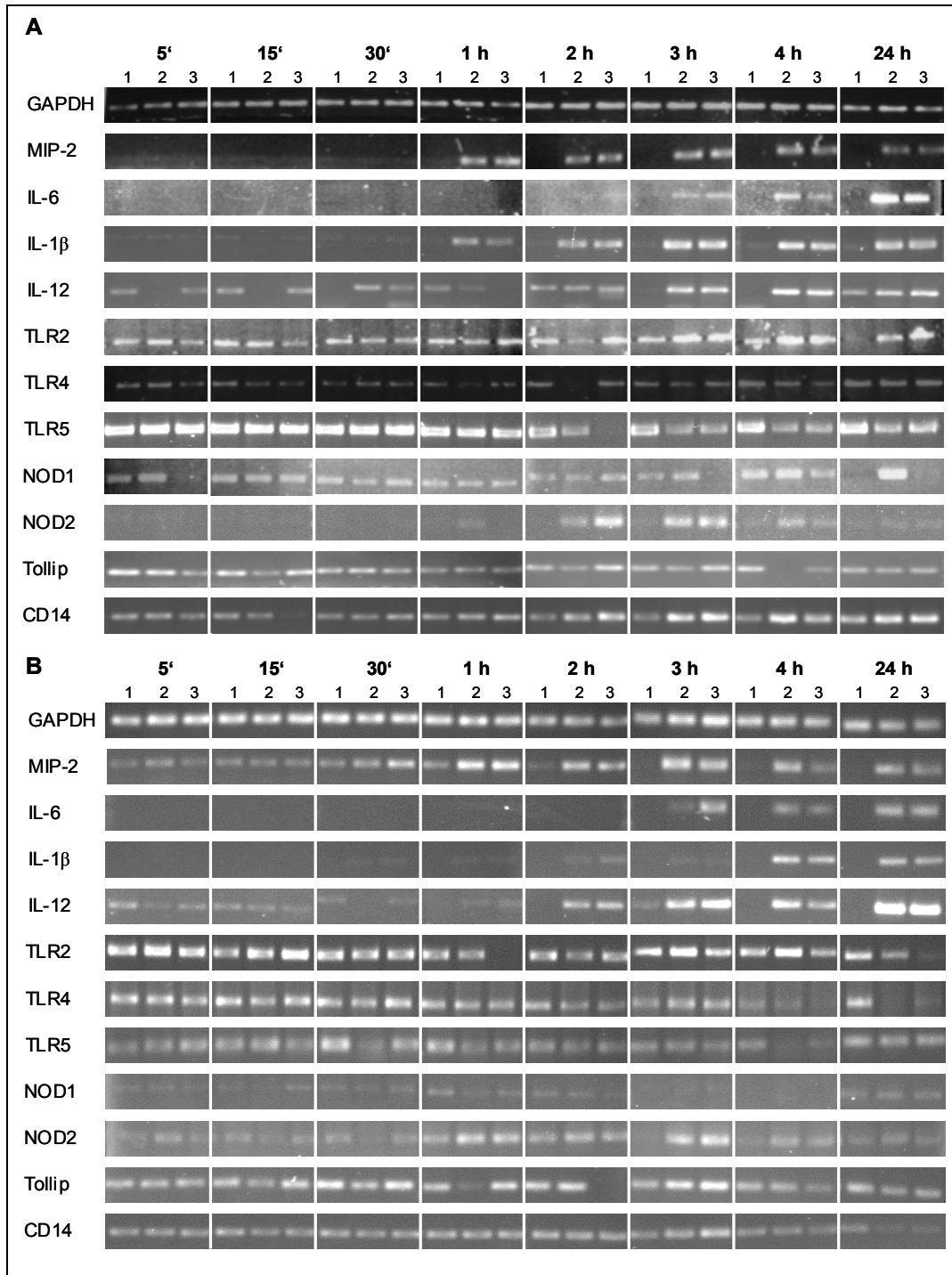
Zur Überprüfung der Microarrayresultate wurden semiquantitative RT-PCRs durchgeführt. Dazu wurden J774-Makrophagen und die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 mock-infiziert oder mit 3B1 oder der I1-Mutante mit einer MOI von 50 koinkubiert. Nach einer Koinkubationsdauer von 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h und 24 h wurden die Zellen abgeerntet und Gesamt-RNA daraus isoliert. Diese wurde für die Synthese von cDNA über Poly-dT-Oligonukleotide eingesetzt und mit der daraus erhaltenen cDNA wurden genspezifische semiquantitative RT-PCRs durchgeführt (Abb. 42).

Es war festzustellen, dass das in den vorherigen Versuchen als Markerprotein eingesetzte Cytokin MIP-2 in beiden Zelllinien sowohl nach Koinkubation mit dem Wildtypstamm als auch mit der I1-Mutante nach 1 h erstmals deutlich induziert erschien. MIP-2 blieb über die gesamten 24 h induziert, wobei sich die Stärke der Induktion aber mit der Zeit abschwächte. Eine Induktion des ebenfalls in einigen Experimenten als Marker eingesetzten Cytokins IL-6 war dagegen erst nach 3 h festzustellen. Dies korrelierte auch mit den Messungen auf Proteinebene, bei denen eine erhöhte MIP-2-Konzentration deutlich früher als eine erhöhte IL-6-Konzentration eintrat. Man konnte ebenfalls in beiden Zelllinien eine Induktion der Cytokine IL-1 $\beta$  und IL-12 zu späteren Zeitpunkten beobachten. Für die

Microarrayexperimente wurden die Makrophagen 2 h mit 3B1 koinkubiert, während die Koinkubationszeit für die Hepatozyten 4 h betrug. Dies erklärt, dass IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-12 in den Microarrayexperimenten nur in den Hepatozyten als induziert erschien, nicht jedoch in den Makrophagen, da diese Cytokine alle erst zu späteren Zeitpunkten induziert wurden.

Die Toll-ähnlichen Rezeptoren TLR2, TLR4 und TLR5 waren alle auf transkriptioneller Ebene nachweisbar. Dabei zeigte sich jedoch, dass TLR4 und TLR5 zu späteren Zeitpunkten reprimiert wurden. Zu frühen Zeitpunkten waren beide Rezeptoren in beiden Zelllinien deutlich exprimiert. Zu späteren Zeitpunkten wurden sie jedoch in beiden Zelllinien reprimiert, wobei TLR4 stärker in den Hepatozyten und TLR5 stärker in den Makrophagen reprimiert wurde. TLR2 war dagegen in Kontrollmakrophagen nur schwach exprimiert. Es wurde aber nach Koinkubation mit *H. hepaticus* zu späteren Zeitpunkten deutlich induziert. Auch in den Hepatozyten zeigte sich zuerst eine Induktion nach 3-4 h, wobei TLR2 in dieser Zelllinie aber nach 24 h wieder reprimiert wurde. Es zeigte sich ebenfalls, dass die Induktion stärker und die anschließende Repression schwächer in Zellen, die mit 3B1, verglichen mit Zellen, die mit der I1-Mutante infiziert wurden, war. Ebenfalls in beiden Zelllinien exprimiert wurde der TLR-Antagonist Tollip, wobei das Transkript in beiden Zelllinien nach Koinkubation mit *H. hepaticus* tendenziell mit der Zeit leicht reprimiert wurde. Interessanterweise wurde Tollip jedoch in beiden Zelllinien, wenn auch stärker ausgeprägt in den Makrophagen, stärker durch 3B1 als durch die Inselmutante reprimiert. Der Rezeptor für Peptidoglykanaubbauprodukte NOD2 wurde in beiden Zelllinien nach 2 bis 3 h kurzzeitig ebenfalls induziert, wobei er danach aber wieder auf das Expressionslevel von mock-infizierten Zellen zurückfiel. Dabei konnte man feststellen, dass NOD2 in beiden Zelllinien stärker induziert wurde, wenn die Zellen mit der I1-Mutante koinkubiert wurden.





**Abb. 42. Expressionsprofil von Makrophagen und Hepatozyten nach Koinkubation mit *H. hepaticus*.** J774-Makrophagen (A) und NCTC Klon 1469-Hepatozyten (B) wurden für verschieden lange Koinkubationszeiten mit *H. hepaticus* 3B1 und der I1-Mutante mit einer MOI von 50 koinkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeerntet, Gesamt-RNA daraus isoliert und cDNA aus der Gesamt-RNA synthetisiert. Die cDNA wurde für semiquantitative RT-PCRs mit genspezifischen Primern eingesetzt. Spur 1: mock-infiziert; Spur 2: 3B1-infiziert; Spur 3: I1-infiziert.

#### **4.6 Einfluss der HHG11-Insel auf die proinflammatorische Antwort in Hepatozyten und Makrophagen**

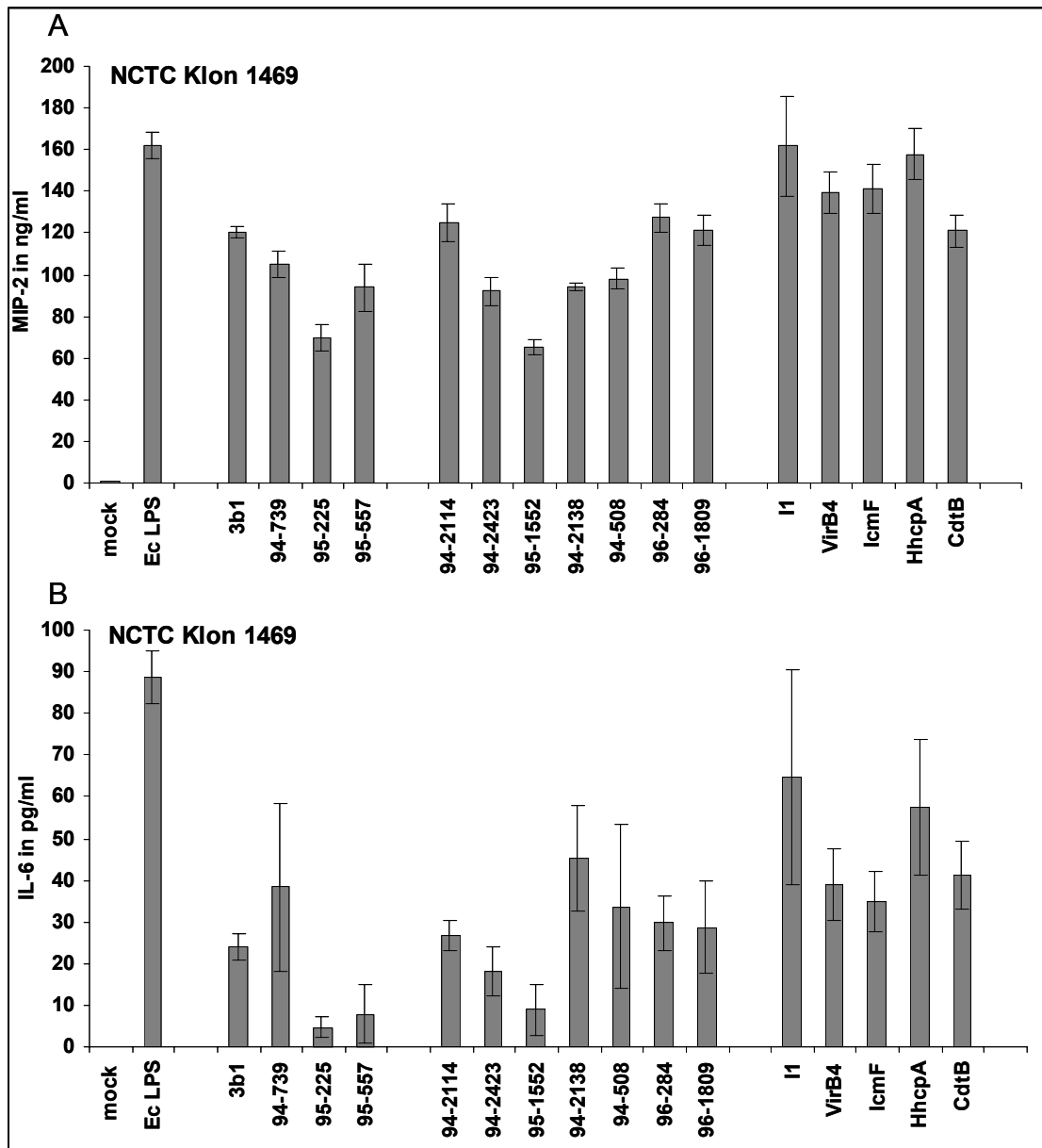
Die Ergebnisse der molekularen Charakterisierung und der Mausexperimente zeigten, dass die HHG11-Insel mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine Pathogenitätsinsel von *H. hepaticus* darstellt. Die Entwicklung von geeigneten Zellkulturmodellen, welche detailliert charakterisiert wurden, ergab nun die Möglichkeit, die Modulation der Immunantwort durch die HHG11-Insel in *in vitro*-Modellen näher zu untersuchen.

##### **4.6.1 Modulation der Immunantwort in Makrophagen und Hepatozyten durch verschiedene *H. hepaticus*-Stämme und -Mutanten**

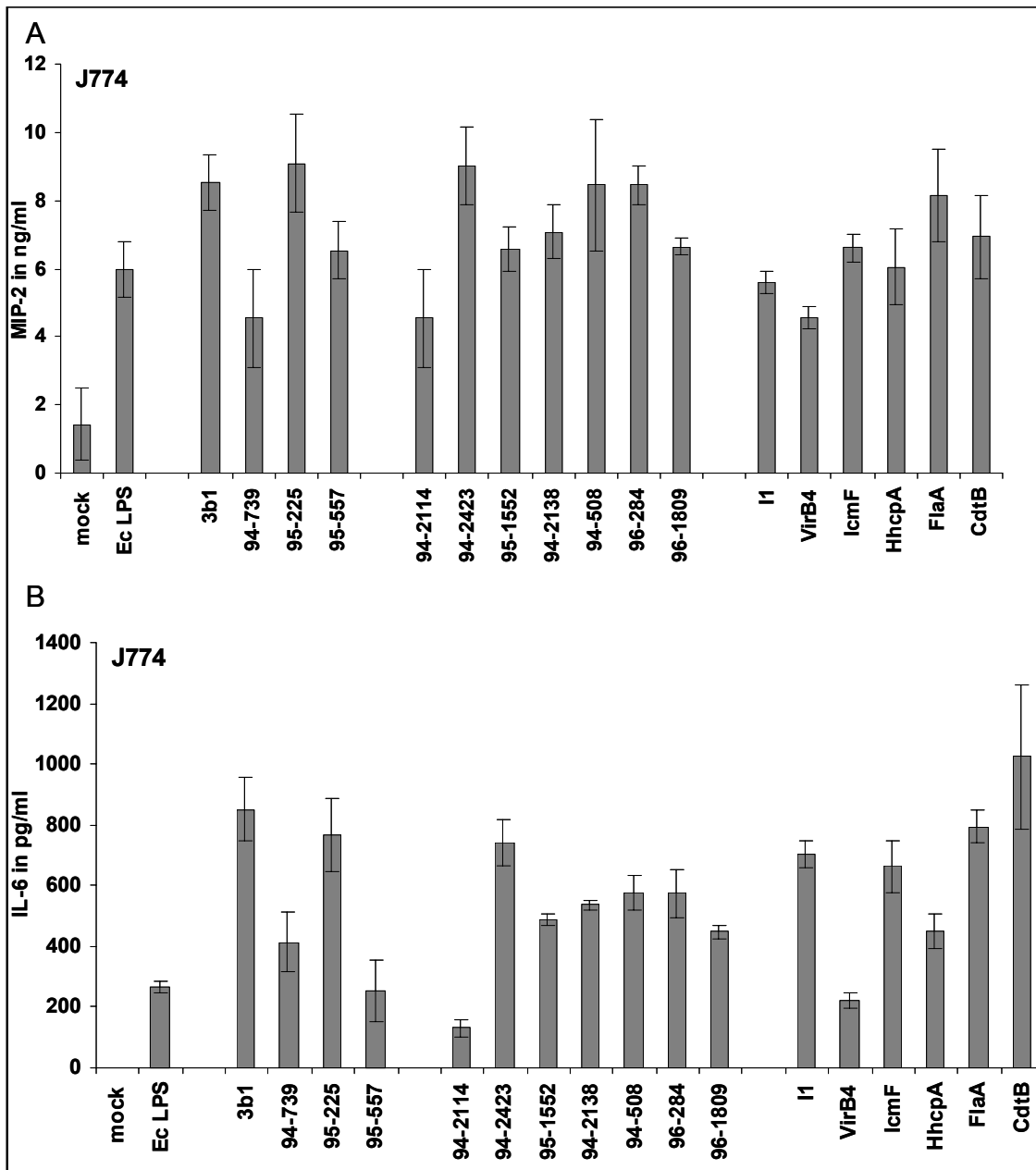
Da sich auf transkriptioneller Ebene Unterschiede in der Expression einiger Gene zwischen Zellen, welche mit 3B1 und der I1-Mutante infiziert wurden, gezeigt hatten, interessierte nun die Frage, ob es Unterschiede in der Sekretion der als Marker verwendeten Cytokine MIP-2 und IL-6 nach der Koinkubation mit verschiedenen *H. hepaticus*-Stämmen und -Mutanten gibt. Dazu wurden J774- und NCTC Klon 1469-Zellen mit den uns zur Verfügung stehenden *H. hepaticus*-Stämmen und -Mutanten mit einer MOI von 50 für 6 h koinkubiert.

Für die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 ergab sich dabei kein reproduzierbarer Unterschied bei der Stimulation mit verschiedenen Stämmen (Abb. 43). Es gab zwar Unterschiede in der Konzentration an MIP-2 und IL-6, diese verteilten sich jedoch nicht auf einen konstanten Unterschied zwischen HHG11-positiven und negativen Stämmen. Auch wenn die Zellen mit verschiedenen Mutanten koinkubiert wurden, ergaben sich tendenziell eher leicht höhere Werte als bei der Koinkubation mit 3B1, wobei diese Unterschiede jedoch nicht signifikant waren und für alle Mutanten auftraten.

Bei der Koinkubation der Makrophagenzelllinie J774 mit den verschiedenen *H. hepaticus*-Stämmen erhielt man bei der Messung von MIP-2 ebenfalls keine reproduzierbaren Unterschiede (Abb. 44). Bei der Messung von IL-6 waren dagegen die Werte nach der Koinkubation mit HHG11-negativen Stämmen bis auf den Stamm 94-2423 allesamt leicht, aber signifikant verringert. Bei der Koinkubation mit HHG11-positiven Stämmen waren die Werte jedoch für die Stämme 94-739 und 95-557 ebenfalls verringert. Bei der Koinkubation mit den Mutanten erhielt man eine stark verringerte IL-6- und MIP-2-Sekretion bei der Koinkubation mit der *virB4*-Mutante, aber die Induktion der beiden Cytokine war nach Koinkubation mit der I1- und *icmF*-Mutante ebenfalls signifikant verringert. Ebenfalls verringert war die Sekretion beider Cytokine nach Koinkubation mit der *hhcpA*-Mutante, während es nach Koinkubation mit der Mutante in *cdtB* (kein intaktes CDT-Toxin) und der Kontrollmutante *flaA1* (eines der beiden *flaA*-Gene ist ausgeschaltet) keine Unterschiede gab.



**Abb. 43. Modulation der Immunantwort in NCTC Klon 1469-Hepatozyten durch verschiedene *H. hepaticus*-Stämme und -Mutanten.** Die murine Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 wurde mit HHG11-positiven *H. hepaticus*-Stämmen (3B1, 94-739, 95-225 und 95-557), teilweise (94-2114, 94-2423, 95-1552, 95-508 und 96-284) oder vollständig HHG11-negativen *H. hepaticus*-Stämmen (96-1809) oder mit Mutanten in 3B1 (I1, *virB4*<sup>-</sup>, *icmF*<sup>-</sup>, *hhcpA*<sup>-</sup> und *cdtB*<sup>-</sup>) für 6 h mit einer MOI von 50 koinkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit 50 ng *E. coli*-LPS koinkubiert. Die Konzentration an MIP-2 (A) und IL-6 (B) in den Zellkulturüberständen wurde anschließend durch einen ELISA bestimmt.



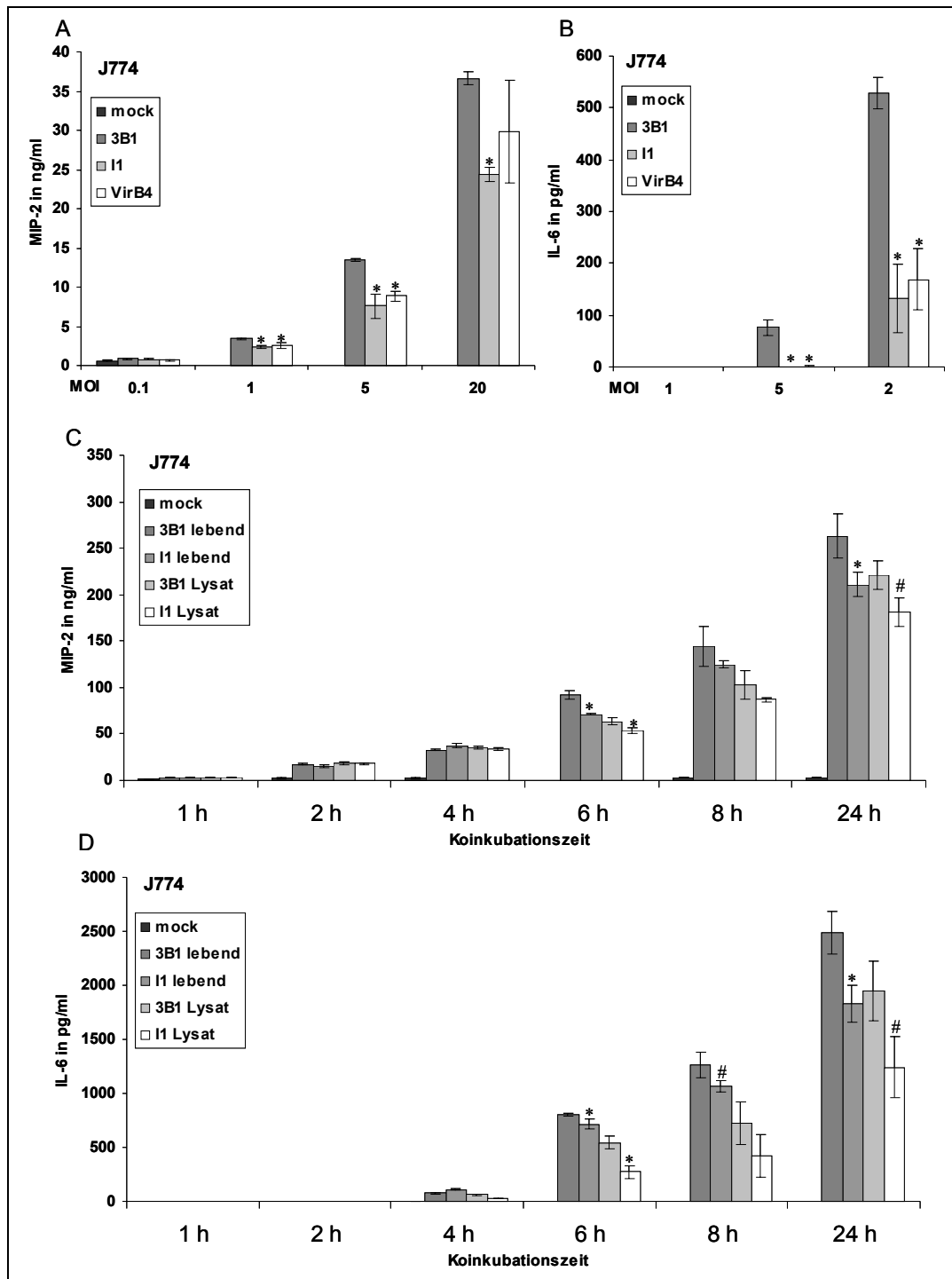
**Abb. 44. Modulation der Immunantwort in J774-Makrophagen durch verschiedene *H. hepaticus*-Stämme und -Mutanten.** Die murine Makrophagenzelllinie J774 wurde mit HHG11-positiven *H. hepaticus*-Stämmen (3B1, 94-739, 95-225 und 95-557), teilweise (94-2114, 94-2423, 95-1552, 95-508 und 96-284) oder vollständig HHG11-negativen *H. hepaticus*-Stämmen (96-1809) oder mit Mutanten in 3B1 (I1, *virB4*, *icmF*, *hhcpA*, *flaA* und *cdtB*) für 6 h mit einer MOI von 50 kokkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit 50 ng *E. coli*-LPS kokkubiert. Die Konzentration an MIP-2 (A) und IL-6 (B) in den Zellkulturüberständen wurde anschließend durch einen ELISA bestimmt.

Da sich bei der Makrophagenzelllinie J774 eine verringerte Induktion der Zellen durch Mutanten in der HHG11-Insel andeutete, wurden diese Zellen nochmals mit verschiedenen Infektionsdosen kokkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Zellen ab einer MOI von 1 eine signifikante Induktion von MIP-2 zeigen (Abb. 45 A). Wenn man die Zellen mit der I1- oder *virB4*-Mutante anstatt 3B1 kokkubiert, erhielt man sowohl bei einer Infektionsdosis von 1, 5

und 20 eine signifikant verringerte MIP-2-Sekretion. Dasselbe galt auch bei der Messung von IL-6. Wenn man die Zellen mit 3B1 koinkubierte, erhielt man bei einer Infektionsdosis von 5 erstmals eine signifikante Induktion von IL-6. Dagegen war diese Dosis nicht ausreichend für eine Induktion durch die I1- oder *virB4*-Mutante. Auch bei einer Infektionsdosis von 20 war die IL-6-Induktion durch die Mutanten deutlich niedriger als durch den Wildstamm.

Es wurde ebenfalls eine Koinkubation von J774 mit lebenden Zellen (Infektionsdosis von 50) und Lysaten (25 µg Gesamtprotein) von 3B1 und der I1-Mutante für verschieden lange Zeitpunkte durchgeführt (Abb. 45 B). Dabei ergab sich erstmals eine deutliche Induktion von MIP-2 nach 2 h und von IL-6 nach 4 h. Nach 6 h erhielt man dabei eine zumeist signifikant verringerte Induktion von IL-6 und MIP-2 durch die Inselmutante verglichen mit Zellen, welche mit dem Wildstamm koinkubiert wurden. Überraschenderweise erhielt man auch eine leicht verringerte MIP-2- und IL-6-Induktion durch Lysate der I1-Mutante verglichen mit der Induktion durch Lysate von 3B1. Möglicherweise kommt von zusätzlich stimulierenden Proteinen (z.B. Lipoproteine), für welche die HHGI1-Insel unabhängig von dem TypIV-Sekretionssystem ebenfalls kodiert.

Dies deutet darauf hin, dass die Inselmutante in Makrophagen zwar nicht zu einer kompletten, aber zu einer verringerten Induktion von MIP-2 und IL-6 verglichen mit dem Wildstamm führt. Dabei war dieser Effekt am stärksten bei niedrigen Infektionsdosen und mittleren Koinkubationszeiten von 6 bis 8 h ausgeprägt.



**Abb. 45. Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der MIP-2- und IL-6-Induktion durch *H. hepaticus* 3B1 und Mutanten in der murinen Makrophagenzelllinie J774.** (A und B) J774 Makrophagen wurden mit *H. hepaticus* 3B1 und der I1- und *virB4*-Mutante für 6 h mit einer MOI von 0,1, 1, 5 und 20 koinkubiert. (C und D) J774 Makrophagen wurden mit 3B1 und der I1-Mutante (jeweils lebende Bakterien mit einer MOI von 50 oder 25 µg Lysat) für 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h koinkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der Cytokine MIP-2 und IL-6 im Überstand durch einen ELISA bestimmt. Die Signifikanz wurde durch einen einseitigen t-test bestimmt. Ein Stern gibt einen p-Wert < 0,01 und eine Raute einen p-Wert < 0,5 an.

## 5 Diskussion

Die beiden Krankheiten Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, zusammengefasst unter dem Namen chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des Menschen. Beide Krankheiten treten in Industrieländern in etwa 10-200 Fällen pro 100.000 Einwohnern auf und führen zu schwerwiegenden Erkrankungen mit einer hohen Einschränkung der Lebensqualität (Hanauer, 2006). Obwohl viele Faktoren wie genetische Prädispositionen und der Lebenswandel wie ungesunde Ernährung, wenig Bewegung und Rauchen als Risikofaktoren für die Entwicklung einer CED gelten, sind die genauen Ursachen noch nicht im Detail bekannt. Man weiß jedoch, dass eine CED letztendlich eine Überreaktion des Immunsystems gegen die normalen Bestandteile des Darms und dabei insbesondere gegen die intestinale Mikroflora darstellt. Deshalb ist es besonders von Interesse, die genauen Ursachen der Entstehung einer CED und neue Therapiemöglichkeiten dagegen im Tiermodell zu untersuchen. Dafür haben sich enterohepatische *Helicobacter* und besonders *H. hepaticus* als geeignetes Hilfsmittel erwiesen, da sie im Mausmodell zu Entzündungen des Darms führen, welche sehr große Ähnlichkeiten zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen, besonders zu Morbus Crohn, aufweisen (Cahill *et al.*, 1997, Ward *et al.*, 1996).

Des Weiteren führt eine Infektion mit *H. hepaticus* im Tiermodell in suszeptiblen Mausstämmen zu Entzündungen der Leber und hepatozellulären Tumoren. Obwohl beim Menschen eine chronische Hepatitis und Tumore in der Leber neben genetischen Prädispositionen und dem Lebenswandel hauptsächlich mit Infektionen des Hepatitis B- und C-Virus assoziiert sind (Mast *et al.*, 1999), gibt es immer mehr Anzeichen, dass bakterielle Infektionen, insbesondere mit enterohepatischen *Helicobacter*-Spezies, auch beim Menschen zu einer pathologischen Erkrankung der Leber führen können (Leong und Sung, 2002 und Einleitung Abschnitt 1.2.7.1).

Deshalb stellen enterohepatische *Helicobacter* und insbesondere *H. hepaticus* ein wichtiges Mittel zur Erforschung der Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bakteriell induzierten Erkrankungen der Leber dar. Bisher war jedoch noch relativ wenig über die bakterielle Seite bekannt, da *H. hepaticus* meist nur als auslösender Faktor für die Erkrankungen benutzt wurde. Dagegen wurden die bakteriellen Faktoren, welche ursächlich für die Auslösung der Erkrankungen sind, bisher kaum erforscht.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das in Zusammenarbeit mit MWG Biotech sequenzierte Genom von *H. hepaticus* ATCC 51449 annotiert und versucht, neue Pathogenitätsfaktoren zu finden, welche ursächlich für die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und hepatozellulären Karzinomen sind. Des Weiteren wurde die Rolle der mutmaßlichen Pathogenitätsinsel HHG11 in der durch *H. hepaticus* ausgelösten

Pathogenese untersucht. Bisher war noch relativ wenig über die spezifisch durch *H. hepaticus* ausgelöste inflammatorische Antwort in Zellkulturmodellen mit Zellen unterschiedlicher Herkunft bekannt. Daher wurde sowohl die globale Genregulation als auch die Sekretion ausgewählter Cytokine als Antwort auf eine Koinkubation mit *H. hepaticus* in Zellkulturmodellen analysiert. Darauf basierend wurden neue, detailliert charakterisierte Zellkulturmodelle für die *in vitro*-Analyse der Interaktion von *H. hepaticus* mit Zellen in der Zellkultur entwickelt. Letztlich wurde in einem *in vitro*-Modell die Grundlage der fehlenden Toleranzentwicklung von intestinalen Epithelzellen, was vermutlich eine Hauptursache für die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist, charakterisiert und versucht, ein Modell dafür aufzustellen.

### **5.1 Annotation des Genoms von *H. hepaticus* ATCC 51449 und der Vergleich mit den sequenzierten Genomen von *H. pylori* und *C. jejuni***

Zu Beginn dieser Arbeit waren aus der Gruppe der  $\epsilon$ -Proteobakterien die Genome der beiden *H. pylori*-Stämme J99 und 26695 (Alm *et al.*, 1999, Tomb *et al.*, 1997) und des *C. jejuni*-Stamms NCTC 11168 (Parkhill *et al.*, 2000) bekannt. Seitdem sind aus der Gruppe der  $\epsilon$ -Proteobakterien noch eine Gesamtgenomsequenz von *Wolinella succinogenes* (Baar *et al.*, 2003) und 4 weitere *Campylobacter*-Gesamtgenomsequenzen von *C. jejuni* RM1221, *C. lari* RM2100, *C. coli* RM2228 und *C. upsaliensis* RM3195 dazugekommen (Fouts *et al.*, 2005). Außerdem wurden in einer weiteren Arbeit Gene identifiziert, welche in dem *C. jejuni*-Stamm ATCC 43431, aber nicht in dem Stamm NCTC 11168, vorhanden sind (Poly *et al.*, 2005). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Gesamtgenomsequenz des enterohepatischen *H. hepaticus*-Stammes ATCC 51449 (alternativer Name 3B1) in Kooperation mit den Firmen MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland), GeneData (Basel, Schweiz) und der Gruppe von James G. Fox am Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, MA USA) sequenziert und annotiert (Suerbaum *et al.*, 2003, Suerbaum *et al.*, 2004, Josenhans *et al.*, 2004).

Das Genom von *H. hepaticus* ATCC 51449 besitzt etwa gleich viele orthologe Gene in den sequenzierten Genomen von *H. pylori* und *C. jejuni* und die von diesen Genen kodierten Proteine weisen auch eine im Durchschnitt weitgehend gleich große Homologie zu ihren Orthologen auf (Suerbaum *et al.*, 2003 und Ergebnisse Abschnitt 4.1.1). Es gibt aber trotzdem viele Gene, welche nur Orthologe in den Genomen von *H. pylori* oder *C. jejuni* besitzen. Ebenso gibt es viele Gene mit Orthologen in beiden Genomen, welche aber eine deutlich höhere Homologie zu dem Ortholog in einem der beiden Genome aufweisen. Zum Beispiel haben Gene für den Biotinmetabolismus oder für Ferredoxin eine deutlich höhere Homologie zu ihren Orthologen im Genom von *C. jejuni*, während insbesondere Gene für Komponenten des Flagellenapparats oder des Chemotaxissystems eine deutlich höhere Homologie zu ihren Orthologen im Genom von *H. pylori* aufweisen. Einerseits ist *H.*



*hepaticus* entwicklungsgeschichtlich vermutlich näher mit *H. pylori* verwandt, obwohl es eine neue Studie gibt, laut der enterohepatische *Helicobacter* spp. möglicherweise näher mit *W. succinogenes* und *Helicobacter* spp. ohne Flagellenhülle als mit gastrischen *Helicobacter* spp. verwandt sind (Dewhirst *et al.*, 2005). Andererseits besiedeln *H. hepaticus* und *C. jejuni* beide den Darmtrakt, so dass eine starke Selektion der Proteineigenschaften hin zu verbesserten Eigenschaften im jeweiligen Habitat zu vermuten ist. Deshalb sollten besonders Gene, welche wichtig für die Besiedlung und das Überleben im Darm sind, einer verstärkten Selektion hin zu ähnlichen Eigenschaften wie bei *C. jejuni* und anderen enterischen Bakterien unterliegen. Auch erwartet man aufgrund des gleichen Habitats einen verstärkten Austausch von Genen oder Genominseln zwischen verschiedenen enterischen Bakterien. Dies zeigt sich besonders gut bei Faktoren, welche essentiell für die Besiedlung und Pathologie des jeweiligen Bakteriums sind. Obwohl sowohl *H. pylori* als auch *H. hepaticus* einen Gencluster besitzen, welcher für die verschiedenen Untereinheiten der Urease kodiert und auch ein funktionelles Enzym bilden, scheint die grundsätzliche Funktion der Vermittlung von Säuretoleranz, welche für die Kolonisation von *H. pylori* essentiell ist, in *H. hepaticus* verloren gegangen zu sein (Belzer *et al.*, 2005). Auch ist in vielen anderen enterohepatischen *Helicobacter*-Spezies der Urease-Cluster nicht vorhanden (z.B. *H. rodentium*, *H. pullorum* und *H. fennelliae*). Des Weiteren fehlen sowohl *H. hepaticus* als auch *C. jejuni* die bekanntesten Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* wie die *cag*-Pathogenitätsinsel und das vakuolisierende Cytotoxin VacA. Demgegenüber besitzt *H. hepaticus* ebenso wie *C. jejuni* einen Gencluster, welcher für das CDT-Toxin kodiert. Während viele enterohepatische *Helicobacter* und auch andere enterische Bakterien CDT besitzen, ist es in allen daraufhin untersuchten gastrischen *Helicobacter* spp. grundsätzlich nicht vorhanden. Es stellt aber sowohl für *H. hepaticus* als auch *C. jejuni* einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar, da CDT-defiziente Mutanten von *H. hepaticus* zu einer verringerten Entzündung des Intestinaltraktes von Mäusen führen und diese zum Teil auch nicht mehr dauerhaft kolonisieren können (Ge *et al.*, 2005, Young *et al.*, 2004). Ebenso führen Mutanten im *cdtB*-Gen in *C. jejuni* in *NF-κB*-defizienten Mäusen im Gegensatz zum Wildtyp zu keiner Gastroenteritis (Fox *et al.*, 2004). Da *H. hepaticus* im Gegensatz zu *C. jejuni* seinen Wirt persistent besiedelt, könnte CDT dadurch auch zu der Karzinogenese durch die chronische Störung des Zellzyklus beitragen. Ebenso besitzt *H. hepaticus* mit *peb1* (HH1841) ein Gen, welches für ein Protein mit hoher Homologie zu dem Adhäsion Peptid *Peb1* von *C. jejuni* kodiert. Ansonsten weisen Proteine, welche bei *H. hepaticus* vermutlich in der äußeren Membran lokalisiert sind, aber mehr Ähnlichkeit zu OMPs von *H. pylori* auf.

Im Vergleich der Chemosensoren und Signaltransduktionssysteme spiegelt sich die relativ eingeschränkte Nische des Magens gegenüber der komplexeren Nische des Darmtraktes wieder. Während *H. hepaticus* und *C. jejuni* 9 bzw. 10 Chemosensorproteine

besitzen, kodiert das Genom von *H. pylori* nur für 4 Sensorproteine. Das ebenfalls zu den  $\epsilon$ -Proteobakterien gehörende Bakterium *W. succinogenes* besitzt sogar 31 Chemosensoren. Ebenso besitzt *H. pylori* nur drei komplette Zweikomponentensysteme, während *H. hepaticus* für vier komplette Zweikomponentensysteme und zwei zusätzliche Responseregulatoren und *C. jejuni* für sechs vollständige Zweikomponentensysteme, drei zusätzliche Response-regulatoren und eine zusätzliche Histidinkinase kodiert. *W. succinogenes* besitzt sogar 40 Zweikomponentensysteme. Dies spricht dafür, dass die Komplexität der jeweiligen Nische bestimmend für die Anzahl von Umweltsensoren und deren Regulatoren ist. Der Magen stellt eine relative eingeschränkte und konkurrenzarme Nische dar, so dass *H. pylori* relativ wenig Flexibilität in der Regulation und der Chemotaxis benötigt. Dagegen müssen sich *H. hepaticus* und *C. jejuni* in dem komplexen und konkurrenzreichen Habitat des Intestinaltraktes behaupten. Dass *W. succinogenes* auch frei in der Umwelt vorkommt, ist vermutlich der Grund dafür, dass diese das komplexeste System an Umweltsensoren und Regulatoren besitzen.

Die optimale Anpassung an das jeweilige Habitat zeigt sich auch an den respiratorischen Fähigkeiten von *H. pylori*, *H. hepaticus* und *C. jejuni*. Für die Bedingungen und Effizienz der ATP-Synthese sind Oxidasen und Dehydrogenasen entscheidend, da sie Protonen ausschleusen und beim Wiedereintritt durch die Membran durch ATP-Synthasen ATP produziert wird. Dafür besitzt *H. hepaticus* zwei Dehydrogenasen (NDH-1 und NDH-2) und zwei terminale Oxidasen (Cytochrom *bd* und Cytochrom *cbb<sub>3</sub>*). *C. jejuni* besitzt die gleiche Ausstattung, außer das ihnen NDH-2 fehlt, während *H. pylori* nur NDH-1 und Cytochrom *cbb<sub>3</sub>* besitzt. Während *bd*-Oxidasen nur ein Proton pro Elektron transferieren, werden durch die *cbb<sub>3</sub>*-Oxidase in Kombination mit Cytochrom *bc<sub>1</sub>* drei Protonen pro Elektron transferiert. Damit hat sich die Atmungskette von *H. pylori* vermutlich an eine maximale Effizienz angepasst. Dagegen ist die Atmungskette von *C. jejuni* und *H. hepaticus* flexibler, was unter manchen Bedingungen trotz der niedrigeren Effizienz von Vorteil sein könnte (Smith *et al.*, 2000).

## 5.2 Diversität von *H. hepaticus*

*H. pylori* ist von den derzeit bekannten bakteriellen Spezies diejenige mit der größten genetischen Diversität und Variabilität (Falush *et al.*, 2001, Kersulyte *et al.*, 2000, Suerbaum *et al.*, 1998). Deshalb wurde die Frage untersucht, ob *H. hepaticus* ebenfalls eine überdurchschnittlich hohe Diversität aufweist. Dazu wurden Abschnitte von sieben „House-keeping“-Genen von dreizehn *H. hepaticus*-Stämmen sequenziert und verglichen. Dabei zeigte sich, dass die sequenzierten Abschnitte in sieben Stämmen, darunter auch *H. hepaticus* ATCC 51449, vollkommen identisch sind und auch die Sequenzen der anderen sechs Stämme unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Die Diversität war damit im

Vergleich zu *H. pylori* sehr gering und lag etwa in dem Bereich von *C. jejuni*, welches ebenfalls nur eine geringe Sequenzdiversität aufweist (Suerbaum *et al.*, 2001).

Ebenso wurde die genomische Diversität durch einen Microarray-basierten Ansatz verglichen. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die Stämme, welche laut MLST zum gleichen Sequenztyp wie *H. hepaticus* ATCC 51449 gehören, auch keine detektierbaren Unterschiede im Genpool besitzen. Vermutlich sind dies daher Subklone von *H. hepaticus* ATCC 51449, zumal diese Stämme alle im Verlauf der ursprünglichen Untersuchungen am NCI isoliert wurden. Die anderen Stämme zeigten dagegen eine relativ hohe Diversität des Genoms. Den Stämmen fehlten zwischen 85 und 229 Gene des Referenzstammes, wobei bei allen Stämmen die komplette oder ein Großteil der HHG11-Insel nicht mehr vorhanden war (näher diskutiert in Abschnitt 5.3). Die anderen fehlenden Gene lagen in 3B1 ebenfalls größtenteils in genomischen Inseln vor. Dabei fehlten Stämmen, die in der MLST-Analyse dem gleichen Sequenztyp zugeordnet werden konnten, auch weitgehend die gleichen Gene, wobei die Stämme aber nicht vollkommen identisch waren. Dies spricht für eine enge Verwandtschaft der jeweiligen Stammpaare.

Nun stellte sich die Frage, warum die genetische Diversität von *H. hepaticus* so viel niedriger als die von *H. pylori* ist. Dies könnte zum einen damit erklärt werden, dass *H. hepaticus* vermutlich seltener als *H. pylori* in gemischten Infektionen auftritt, da der Darm aufgrund seiner hohen Besiedlungsdichte eine Neuinfektion erschwert. Dadurch kommen seltener verschiedene klonale Isolate im selben Organismus vor, wodurch weniger Austausch durch homologe Rekombination stattfinden kann. Außerdem weist *H. pylori* auch eine höhere natürliche Kompetenz für DNA-Aufnahme auf. Daher ist die Rate an Rekombinationsereignissen in *H. hepaticus in vivo* vermutlich deutlich geringer als in *H. pylori*. Der Hauptgrund für die beobachtete niedrige genomische Diversität von *H. hepaticus* wird aber der Umstand sein, dass alle zur Verfügung stehenden Stämme von Mäusen aus Zuchtkolonien stammen. Vermutlich waren Mäuse, die sich in kommerziellen Zuchtkolonien befinden, schon ursprünglich nur mit wenigen *H. hepaticus*-Stämmen infiziert, welche sich dann durch Weitergabe von Tieren ausgebreitet haben. Dadurch werden die meisten Tiere vermutlich klonale *H. hepaticus*-Isolate von nur wenigen Ausgangsstämmen tragen, wodurch die tatsächliche Diversität von *H. hepaticus* unterschätzt werden würde. Um die tatsächliche Diversität zu erhalten, müsste man Isolate von vielen verschiedenen Wildnagern in die Analysen mit einbeziehen.

### **5.3 Die Pathogenitätsinsel HHG11**

Genomische Inseln sind Abschnitte eines Genoms, welche durch horizontalen Gentransfer aus anderen Spezies in ein Wirtsgenom eingebaut werden. Sie sind häufig sehr instabil und treten daher meist nicht in allen Isolaten einer Spezies auf. Oft kommt es auch vor, dass sie

in Subklonen eines bestimmten Stammes, welcher die genomische Insel ursprünglich besaß, verloren gehen. Häufig tragen diese genomischen Inseln Pathogenitätsfaktoren, welche zu einer erhöhten Virulenz eines Stammes führen. Diese Inseln nennt man dann Pathogenitätsinseln (Dobrindt *et al.*, 2004). Diese sind weit verbreitet und kommen in vielen pathogenen bakteriellen Spezies vor (z.B. LIPI-1 in pathogenen *Listerien* (Vazquez-Boland *et al.*, 2001) und LIPI-2 in *Listeria ivanovii* (Dominguez-Bernal *et al.*, 2006)). Viele Pathogenitätsinseln kodieren für TypIII- (z.B. SPI1- und SPI2-Inseln in *S. typhimurium*, Hansen-Wester und Hensel, 2001) oder TypIV-Sekretionssysteme (z.B. *cag*-Insel in *H. pylori*), durch welche Effektorproteine in die Wirtszelle übertragen werden. Häufig werden durch genomische Inseln abgesehen von Virulenzmerkmalen auch Fitnessvorteile vermittelt. Dazu gehören z.B. Resistenzen gegen mehrere Antibiotika (Boyd *et al.*, 2001, Kuroda *et al.*, 2001), die Synthese von Sekundärmetaboliten (z.B. Polyketide in *Streptomyces coelicolor* und *S. avermitilis* (Metsa-Ketela *et al.*, 2002)) oder Makroliden in *Mycobacterium ulcerans* (Stinear *et al.*, 2004)) oder die Expression von Eisenaufnahmesystemen in pathogenen und nichtpathogenen Enterobakterien (Bach *et al.*, 2000, Carniel *et al.*, 1996).

### 5.3.1 Molekulare Charakterisierung der HHGI1-Insel

Im Genom von *H. hepaticus* konnte eine große genomische Insel identifiziert werden, welche wir HHGI1 genannt haben. Es fehlen ihr zwar einige häufig vorkommende Eigenschaften von genomischen Inseln wie flankierende direkte Repeats und ein direkt benachbartes tRNA-Gen, sie besitzt aber einen signifikant geringeren GC-Gehalt im Vergleich zum Rest des Genoms und kodiert für eine P4-Prophagenähnliche Integrase. Des Weiteren war diese Insel nicht in allen untersuchten Isolaten vorhanden. Diese Eigenschaften machen es sehr wahrscheinlich, dass HHGI1 tatsächlich eine Genominsel von *H. hepaticus* darstellt.

Nun stellte sich die Frage, ob HHGI1 auch eine Pathogenitätsinsel von *H. hepaticus* ist. Dazu wurden zuerst die Gene, welche auf der HHGI1-Insel liegen, genauer betrachtet. Dabei konnten Komponenten eines TypIV-Sekretionssystems identifiziert werden. Mit hoher Sicherheit konnten Gene, welche für Homologe der Vir-Proteine VirB4, VirB7, VirB10 und VirD4 kodieren, gefunden werden. Da die Homologie dieser Proteine zu den auf der HHGI1-Insel kodierten Orthologen aber relativ niedrig ist, ist es wahrscheinlich, dass die anderen Komponenten eines TypIV-Sekretionssystems ebenfalls auf der Insel liegen, aber aufgrund zu geringer Sequenzhomologie nicht identifiziert werden konnten.

Neben dem mutmaßlichen TypIV-Sekretionssystem enthält die Insel einen Cluster von Genen, dessen vorhergesagte Genprodukte als IcmF-assoziierte homologe Proteine (IAHP) beschrieben wurden (Das und Chaudhuri, 2003). Der Cluster umfasst 15 Gene und wurde bisher exklusiv in pathogenen oder symbiontisch lebenden gram-negativen Proteobakterien mit engem Kontakt zu Wirtszellen gefunden (z.B. *V. cholerae*, *L.*

*pneumophila*, *P. aeruginosa*, *Y. pestis*, *S. typhimurium*, *E. coli* u.a.). Es wurde spekuliert, dass dieser Locus eine neuartige Zelloberflächenstruktur unabhängig von TypIII- und TypIV-Sekretionssystemen darstellt, welcher wichtig für den Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszellen ist und eine Rolle in der Pathogenität einiger Bakterien spielen könnte. Nicht in allen Genomen mit dem IAHP-Cluster sind alle Gene vorhanden und einige Gene sind teilweise auch invertiert, aber sie enthalten in allen bisher bekannten Fällen ein Homolog zu *icmf*. Für *L. pneumophila*, wo *icmf* für eine Komponente des Dot/Icm T4SS kodiert, wurde gezeigt, dass es direkt an der Abtötung von Makrophagen beteiligt ist (Purcell und Shuman, 1998). Näher charakterisiert wurde dieser Gencluster anhand des *imp*-Lokus des mit Pflanzen symbiontisch lebenden Bakteriums *Rhizobium leguminosarum* (Bladergroen *et al.*, 2003). Dieses Bakterium führt nur zu einer geringen Ausbildung von Knötchen, während Mutanten in dem *imp*-Lokus besonders bei Erbsen zu einer verstärkten Knötchenbildung führen. Daher scheint der *imp*-Lokus eine Funktion in der Unterdrückung der Knötchenbildung zu besitzen. Obwohl dies ein Pflanzensymbiont ist, könnte der IAHP-Cluster auch bei Tierpathogenen oder -symbionten eine Funktion in der Unterdrückung der Immunantwort haben. Ob der IAHP-Cluster neben dem postulierten T4SS ein weiteres Sekretionssystem darstellt oder ob dieser ein Teil dieses Sekretionssystems ist, kann noch nicht abschließend geklärt werden. Da aber auch das Homolog zu VirB7 zu diesem Locus gehört, gehören zumindest Teile davon vermutlich zu dem auf der HHG11-Insel kodierten Sekretionssystem.

Es konnten außer Komponenten des TypIV-Sekretionssystems keine homologen Gene aus der HHG11-Insel in den beiden sequenzierten *H. pylori*-Stämmen und in *C. jejuni* NCTC 11168 gefunden werden. Interessanterweise besitzt aber das Megaplasmid pCC178 von *C. coli* RM2228 Homologe zu 19 von 70 Genen der HHG11-Insel, welche größtenteils zu dem IAHP-Gencluster gehören. Einige dieser Homologe sind auch in *C. jejuni* RM1221 auf der mutmaßlichen genomischen Insel CJIE3 vorhanden (Fouts *et al.*, 2005). Der Stamm *C. jejuni* ATCC 43431 wurde nicht komplett sequenziert, sondern es wurden über einen Microarray-basierten Ansatz Sequenzabschnitte gesucht, welche nicht in *C. jejuni* NCTC 11168 vorkommen (Poly *et al.*, 2004). 28 Gene des Genoms von *H. hepaticus* ATCC 51449, von denen 16 auf der HHG11-Insel liegen, können im Genom von *C. jejuni* ATCC 43431, aber nicht in NCTC 11168 vorgefunden werden. Die Homologe zu Genen auf der HHG11-Insel gehören ebenfalls größtenteils zu dem IAHP-Gencluster. Die anderen Gene kodieren weitgehend für hypothetische Proteine. Die einzigen Gene mit einer vorhergesagten Funktion sind eine O-Succinylbenzoat-CoA-Ligase und eine 3-Oxoazylreduktase. Dabei sind bis auf eine Ausnahme alle diese Gene in einem oder mehreren untersuchten *H. hepaticus*-Isolaten nicht vorhanden. *C. jejuni* ATCC 43431, *C. jejuni* RM1221 und *C. coli* RM2228 sind virulentere Stämme als *C. jejuni* NCTC 11168. Dies spricht daher dafür, dass die Gene von

*H. hepaticus*, welche in NCTC 11168 fehlen, aber in den anderen *Campylobacter*-Stämmen vorhanden sind, ebenfalls Virulenzfaktoren darstellen könnten.

### 5.3.2 *In vivo*- und *in vitro*-Charakterisierung der HHGI1-Insel

Auf der HHGI1-Insel von *H. hepaticus* konnte bisher kein Effektor identifiziert werden. Ebenso wenig konnten Unterschiede in der Morphologie von Zellen nach Infektion mit HHGI1-positiven und negativen Stämmen oder Mutanten gefunden werden. Zellen, welche mit Mutanten der HHGI1-Insel infiziert wurden, zeigten aber im Vergleich zu mit dem Wildtyp infizierten Zellen eine verringerte MIP-2- und IL-6-Sekretion. Dies war besonders ausgeprägt in J774-Makrophagen bei niedrigen Infektionsdosen, wobei die genauen Ursachen dafür bis jetzt noch nicht bekannt sind. Man konnte aber in J774-Makrophagen nach Koinkubation mit HHGI1-positiven *H. hepaticus*-Stämmen auf transkriptioneller Ebene eine stärkere Herunterregulation von Tollip als nach Infektion mit Mutanten in der HHGI1-Insel finden. Tollip ist ein negativer Regulator der TLR-abhängigen proinflammatorischen Antwort (Zhang und Ghosh, 2002), so dass die Herunterregulation von Tollip zu einer verminderten Hemmung der durch PAMPs von *H. hepaticus* ausgelösten TLR-abhängigen proinflammatorischen Antwort führen könnte. Ob dies jedoch ein direkter Einfluss der HHGI1-Insel oder ein sekundärer Effekt ist, lässt sich im Moment noch nicht beurteilen. Es konnte in den J774-Zellen auch eine verstärkte Expression von Nod1 nach Koinkubation mit HHGI1-positiven Stämmen gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass ähnlich wie bei der *cag*-PAI von *H. pylori* NOD1 und auf bakterieller Seite Peptidoglykanabbauprodukte als Liganden eine Rolle in der Verstärkung der proinflammatorischen Antwort spielen könnten (Viala *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *cag*-negativen Stämmen, welche in Magenepithelzellen fast überhaupt kein IL-8 mehr induzieren, konnte durch HHGI1-negative Stämme aber nur eine leicht verringerte MIP-2- und IL-6-Sekretion auf der Wirtsseite gefunden werden. Sowohl die J774-Makrophagen als auch NCTC Klon 1469-Hepatozyten können durch Liganden von TLR2, TLR4 und TLR5 stimuliert werden und weisen auch Synergismus bei der gleichzeitigen Stimulation durch Liganden von NOD2 und TLR4 auf. Dagegen sind Magenepithelzellen weitgehend unempfindlich gegenüber TLR2- und TLR4-Liganden. Deshalb könnte die nur leicht verringerte Sekretion an einer zu starken Stimulation dieser Zellen durch Faktoren, welche unabhängig von der HHGI1-Insel sind, liegen. Es ist jedoch auch möglich, dass die HHGI1-Insel nicht zusätzlich stimulierend, sondern eher hemmend auf die Immunantwort wirkt.

Bei Betrachtung der Pathologie von Mäusen, aus denen die *H. hepaticus*-Stämme unserer Stammsammlung ursprünglich isoliert wurden, konnte festgestellt werden, dass nur Mäuse, welche mit HHGI1-positiven Stämmen infiziert waren, pathologische Veränderungen der Leber entwickelt hatten. Deshalb wurden in einer Kooperation mit dem MIT A/JCr-Mäuse mit *H. hepaticus* 3B1 (HHGI1-positiv), 96-1809 (=HhNet, HHGI1-negativ) und 96-284 (=HhG,

HHGI1-negativ) infiziert (Boutin *et al.*, 2005). Dabei zeigte sich eine stärkere Kolonisation und Entzündung der Leber nach Infektion mit 3B1 als mit den inseldefizienten Stämmen 96-1809 und 96-284. Eine Limitierung dieser Studie war die Verwendung von Stämmen, welche außer dem Fehlen der HHGI1-Insel noch weitere fehlende Gene gegenüber 3B1 aufweisen. Die meisten Gene sind aber in einem der beiden Stämme vorhanden, nur 54 Gene, welche nicht auf der HHGI1-Insel liegen, sind sowohl in *H. hepaticus* 96-1809 als auch im Stamm 96-284 nicht vorhanden. Daher untermauern diese Ergebnisse eine Rolle der HHGI1-Insel in der durch *H. hepaticus* ausgelösten Entwicklung einer Erkrankung der Leber. Im Moment werden in einer Kooperation in unserer Arbeitsgruppe und am MIT weitere Experimente mit isogenen Mutanten der HHGI1-Insel in einem Kolitismodell durchgeführt. Erste Ergebnisse lassen auf eine verringerte Entzündung und Kolonisation des Caecums und Kolons durch isogene Mutanten der HHGI1-Insel schließen.

Zusammenfassend lässt sich daher der Schluss ziehen, dass die HHGI1-Insel mit hohem Maß an Sicherheit eine Pathogenitätsinsel von *H. hepaticus* ist. Sie hat eine entscheidende Funktion in durch *H. hepaticus* ausgelösten Erkrankungen der Leber. Was die genaue molekulare Wirkungsweise der Insel darstellt, muss noch weiter untersucht werden. Man kann aber davon ausgehen, dass ein auf der Insel kodiertes TypIV- oder TypIV-ähnliches Sekretionssystem eine entscheidende Rolle spielt. Ebenfalls enthält die Insel Homologe zu Genen (IAHP-Cluster), welche zumindest in dem Pflanzensymbionten *Rhizobium leguminosarum* entzündungshemmend wirken (Bladergroen *et al.*, 2003).

Ebenfalls muss noch untersucht werden, ob die Insel auch eine Rolle in der Entwicklung einer durch *H. hepaticus* ausgelösten Kolitis oder nur in der Entwicklung einer Hepatitis und Karzinomen in der Leber spielt.

#### **5.4 Untersuchung der durch *H. hepaticus* ausgelösten proinflammatorischen Antwort in Zellkulturmodellen**

Bisher gab es nur wenige Studien, in denen die Interaktion von *H. hepaticus* mit isolierten Zellen verschiedener Herkunft in Zellkultur untersucht wurde. Fast alle Studien beschränkten sich bisher auf *in vivo*-Untersuchungen, bei denen *H. hepaticus* als Hilfsmittel für die Auslösung einer Kolitis oder von Leberentzündungen bzw. Leberkarzinomen benutzt wurde. Dabei wurde meist nur die Wirtsseite betrachtet. Obwohl meist der immunologische Aspekt betrachtet wurde, ist noch relativ wenig über die direkt durch *H. hepaticus* in verschiedenen Zelltypen ausgelöste Immunantwort bekannt. Deshalb wurden in dieser Arbeit Zellkultursysteme für *H. hepaticus* mit verschiedenen Zelltypen verschiedener Herkunft etabliert. Dabei wurden die Zellen näher charakterisiert und die Wechselwirkung mit *H. hepaticus* mit besonderem Blick auf die durch *H. hepaticus* ausgelöste proinflammatorische Antwort untersucht.

#### 5.4.1 Allgemeine Wirtsantwort von murinen intestinalen Epithelzellen, Hepatozyten und Makrophagen auf eine Koinkubation mit *H. hepaticus*

Da es bisher kein geeignetes Zellkultursystem für die Untersuchung von *H. hepaticus* gab, wurden in dieser Arbeit zuerst murine Zelllinien, welche alle von Maustämmen stammen, die empfänglich für eine durch *H. hepaticus* ausgelöste Erkrankung der Leber sind, näher charakterisiert und deren Wechselwirkung mit *H. hepaticus* untersucht. In den wenigen Studien zu Untersuchungen über *H. hepaticus*, bei denen immortalisierte Zelllinien verwendet wurden, wurden hauptsächlich humane Zelllinien verwendet (Mandell *et al.*, 2004, Young *et al.*, 2004), während nur in wenigen Untersuchungen murine immortalisierte Zelllinien verwendet wurden (Avenaud *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde die murine Makrophagenzelllinie J774 verwendet, welche aus einer Balb/c-Maus isoliert wurde und relativ gut charakterisiert ist (Cheng *et al.*, 1987, Cohly *et al.*, 2001, Martin und Dorf, 1990). Um die Wechselwirkung von *H. hepaticus* mit Epithelzellen seines natürlichen Habitats zu untersuchen, wurde die Zelllinie m-IC<sub>cl2</sub> benutzt, welche von Kryptenzellen aus dem Dünndarm einer L-PK/TAG1-Maus stammt (Bens *et al.*, 1996). Außerdem wurde die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 benutzt, welche aus einer C3H/An-Maus isoliert wurde (Mendenhall *et al.*, 1984, Nakagawa *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde für einige Fragestellungen die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco2 benutzt (Trainer *et al.*, 1988).

Zuerst wurde die Stimulierbarkeit dieser Zelllinien durch Liganden für Mustererkennungsrezeptoren untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Makrophagenzelllinie J774 und die Hepatozytenzelllinie NCTC Klon 1469 durch fast alle getesteten Liganden für Mustererkennungsrezeptoren stimuliert werden konnten. Beide Zelllinien konnten durch Pam3Cys-SK<sub>4</sub> (TLR2-Ligand), *E. coli*-LPS (TLR4-Ligand) und *S. typhimurium*-Flagellin (TLR5-Ligand) induziert werden. Ebenfalls ergab sich ein synergistischer Effekt mit GMDP (NOD2-Ligand). Es konnte auch gezeigt werden, dass NCTC Klon 1469 und J774 TLR2, TLR4, TLR5, Nod1, NOD2 sowie die Korezeptoren CD14, MD2 und LBP exprimieren. Nur durch das stabilisierte Oligonukleotid CpG-ODN 1668 (TLR9-Ligand) konnten beide Zelllinien nicht induziert werden. Dies widerspricht bisher veröffentlichten Studien, laut denen durch CpG-ODN 1668 eigentlich eine proinflammatorische Antwort in J774-Makrophagen ausgelöst werden sollte. Es wurde gezeigt, dass sowohl eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung als auch eine Induktion von IL-6 und MIP-2 durch TLR9-Liganden erfolgt (Anders *et al.*, 2003, Kandimalla *et al.*, 2003). Obwohl für die Zelllinie NCTC Klon 1469 keine publizierten Daten vorliegen, wurde für andere Hepatozytenzelllinien beschrieben, dass diese ebenfalls konstitutiv TLR9 exprimieren und auf CpG-ODN reagieren (Sanchez-Campillo *et al.*, 2004). Wir können uns daher nicht erklären, warum keine Stimulation durch unseren verwendeten TLR9-Liganden erfolgte. Sonst stimmte das Muster der die Zelllinien induzierenden PAMPs aber mit der Literatur



überein. Sowohl Makrophagen als auch Hepatozyten zeigen in allen publizierten Studien ein breites Spektrum an PAMPs, durch die eine proinflammatorische Antwort ausgelöst werden kann (Jones *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2002, Schmitz *et al.*, 2004). Darauf basierend wurde dann untersucht, wie gut diese Zellen durch *H. hepaticus* aktiviert werden können. Dabei zeigte sich, dass in beiden Zelllinien eine starke proinflammatorische Antwort als Reaktion auf eine Koinkubation mit *H. hepaticus* erfolgt. Makrophagen liegen *in vivo* primär in einem inaktiven Zustand vor. Eine Möglichkeit, Makrophagen zu aktivieren, ist die Stimulation mit Interferon- $\gamma$ . Für die J774-Makrophagen zeigte sich, dass IL-6 primär durch *H. hepaticus* nur in sehr geringem Maße induziert wird. Die IL-6-Induktion war jedoch viel stärker, wenn die Zellen durch Interferon- $\gamma$  vorstimuliert wurden. Dagegen wurde die Induktion von MIP-2 durch *H. hepaticus* nach einer Präinkubation mit Interferon- $\gamma$  eher gehemmt. Es wurde für die Makrophagenzelllinie RAW 264.7 gezeigt, dass Interferon- $\gamma$  bei diesen Zellen ebenfalls zu einer Repression der MIP-2-Transkription führt (Kota *et al.*, 2006). Daher war die verringerte MIP-2-Induktion durch *H. hepaticus* in J774-Makrophagen nach Präinkubation durch Interferon- $\gamma$  vermutlich auf den selben Effekt zurückzuführen.

Es stellte sich nun die Frage, welche PAMPs von *H. hepaticus* hauptsächlich für die Stimulation dieser beiden Zelllinien verantwortlich sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Zellen mit lebenden *H. hepaticus* und Lysaten koinkubiert. Außerdem wurden Microarrayanalysen mit den Makrophagen und Hepatozyten durchgeführt.

Obwohl die Makrophagen und Hepatozyten durch den TLR5-Liganden *S. typhimurium* FliC stimuliert werden konnten, ist eine Induktion durch Flagelline von *H. hepaticus* unwahrscheinlich. Für das nahverwandte Bakterium *H. pylori* wurde in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass dessen Flagellen (Gewirtz *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2003) nur eine sehr geringe immunstimulatorische Wirkung besitzen. Auch Flagellen von *H. hepaticus* haben nur eine geringe immunstimulatorische Wirkung (Lee *et al.*, 2003 und unpublizierte Daten von S. K. Lee und C. Josenhans). Ebenfalls ist eine Stimulierung durch genomische DNA von *H. hepaticus* unwahrscheinlich. Für *H. pylori* ist bekannt, dass dessen genomische DNA nur eine geringe immunstimulatorische Wirkung besitzt (Schmausser *et al.*, 2004a). Die genomische DNA von *H. hepaticus* besitzt wie die genomische DNA von *H. pylori* viele A/T-reiche Abschnitte, so dass eine starke TLR9-aktivierende Wirkung der genomischen DNA von *H. hepaticus* ebenfalls unwahrscheinlich ist. Dies stimmt auch mit publizierten Daten überein, laut denen *H. pylori*, *H. hepaticus* und *H. felis* hauptsächlich über TLR2 und zum Teil über TLR4 aktivieren (Mandell *et al.*, 2004).

Die Rolle des LPS von *H. hepaticus* konnte noch nicht gänzlich aufgeklärt werden. Einerseits führte es nur zu einer geringen Aktivierung der murinen intestinalen Epithelzelllinie m-IC<sub>cl2</sub> und zu keiner nachweisbaren Aktivierung der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2, dagegen wurden J774- und NCTC Klon 1469-Zellen zwar deutlich schwächer als durch

andere PAMPs und lebende *H. hepaticus* und *H. hepaticus*-Lysate, aber trotzdem deutlich aktiviert. Einige Untersuchungen lassen darauf schließen, dass LPS von *Helicobacter sp.* über TLR2 wirkt (Lepper *et al.*, 2005, Means *et al.*, 2003, Torok *et al.*, 2005), wobei andere Studien aber wiederum eher darauf schließen lassen, dass *Helicobacter*-LPS doch klassisch an TLR4 bindet (Bliss, Jr. *et al.*, 1998, Mandell *et al.*, 2004). Da m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen durch *H. hepaticus*- und *E. coli*-LPS stimuliert werden konnten, Caco2-Zellen aber auf beide PAMPs nicht reagierten, spricht dies eher für eine Aktivierung über TLR4, zumal beide Zelllinien auch nicht auf den TLR2-Liganden Pam3Cys-SK<sub>4</sub> ansprechen. Eine starke Kontamination des aufgereinigten *H. hepaticus*-LPS durch z.B. Peptidoglykan oder Lipoproteine ist unwahrscheinlich, da auf einem silbergefärbtem Polyacrylamidgel keine kontaminierenden Banden sichtbar waren. Eine geringfügige Kontamination kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Unabhängig davon besitzt LPS von *H. hepaticus* aber nur eine geringe stimulatorische Wirkung, was durch die hier präsentierten Ergebnisse und andere Studien (Hynes *et al.*, 2004) untermauert wird, so dass *H. hepaticus*-LPS mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht das hauptsächlich stimulierende Agens von *H. hepaticus* ist.

Für die Aktivierung der Makrophagen scheint Peptidoglykan eine wichtige Rolle zu spielen. Der Abbau des Peptidoglykans aus *H. hepaticus*-Lysaten durch Lysozym führte zu einer deutlich verringerten Induktion von MIP-2 und IL-6, während dies für Hepatozyten nicht der Fall war. Des Weiteren führte die Inhibition der Kinase Rick durch den Inhibitor SB203580 (auch wenn dieser nicht vollkommen spezifisch ist, sondern auch p38 hemmt) nur in den Makrophagen, nicht aber in den Hepatozyten zu einer fast vollkommenen Hemmung der Induktion durch *H. hepaticus*-Lysate. Rick ist der Hauptmediator der Nod1- und Nod2-vermittelten proinflammatorischen Antwort (Inohara *et al.*, 1999, Kobayashi *et al.*, 2002, Ogura *et al.*, 2001b). Für die Makrophagen wurde gezeigt, dass diese NOD1 und NOD2 nach Koinkubation mit *H. hepaticus* 3B1 hochregulieren und in beiden Zelllinien konnte ein synergistischer Effekt zwischen gereinigten NOD2-Liganden und *E. coli*-LPS gefunden werden. Daher sprechen diese Ergebnisse dafür, dass NOD1- und NOD2-Liganden zumindest bei der Aktivierung der Makrophagen eine entscheidende Funktion besitzen.

NF-κB scheint in beiden Zelllinien nicht der entscheidende Transkriptionsfaktor zu sein. In den Makrophagen führte die Hemmung der Translokation von NF-κB in den Nukleus nach Induktion durch *H. hepaticus* zu einer erhöhten und in den Hepatozyten zu einer nur leicht verringerten MIP-2- und IL-6-Sekretion. Dabei lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass eine Redundanz mit anderen Transkriptionsfaktoren besteht und dadurch die Hemmung von NF-κB zu einer Umlagerung der Immunantwort auf andere Transkriptionsfaktoren führt, so dass NF-κB ohne Einsatz eines Inhibitors doch eine wichtigere Rolle spielt. Dafür würde sprechen, dass in den Makrophagen alle NF-κB-Untereinheiten und in den Hepatozyten alle Untereinheiten außer p105 hochreguliert waren. Ein großer Teil der Antwort

scheint aber über durch MAP-Kinasen aktivierte Transkriptionsfaktoren wie Komponenten des AP-1 (activating protein 1)-Komplexes zu laufen. Von den Untereinheiten des AP-1 (activating protein 1)-Komplexes waren in den Makrophagen JunB und Fra-1 hochreguliert, während in den Hepatozyten keine Komponenten des AP-1-Komplexes nach einer *H. hepaticus*-Infektion hochreguliert waren.

In den Hepatozyten führte die Inhibition von p38 (SB202190), JNK (SP600125) und ERK (U0126 über Hemmung von MEK1/2) zu einer etwa gleich starken Verringerung der MIP-2- und IL-6-Sekretion nach Koinkubation mit *H. hepaticus*. Dagegen schien die Induktion in den Makrophagen eher von den Kinasen p38 und ERK abzuhängen. Die Inhibition von JNK führte dagegen nur zu einer geringen Hemmung der proinflammatorischen Antwort in den Makrophagen. Dies korreliert auch mit der Hochregulation der MAP-Kinasenphosphatase-M (MKP-M), da von dieser gezeigt wurde, dass sie ein negativer Regulator von JNK ist (Matsuguchi *et al.*, 2001). Dagegen wurde in den Hepatozyten MKK7 hochreguliert, welches eine spezifische MAP-Kinasenkinase für die Aktivierung von JNK ist (Davis, 2000).

Bis hierher kann man nun feststellen, dass wahrscheinlich Flagelline, genomische DNA und vermutlich auch LPS von *H. hepaticus* nicht die entscheidenden Faktoren für die Auslösung einer proinflammatorischen Antwort in J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten sind. Für die Induktion der Makrophagen scheint Peptidoglykan über die Aktivierung von NOD-Rezeptoren eine entscheidende Rolle zu spielen, da der Verdau von Peptidoglykan durch Lysozym zu einer stark verringerten Stimulierung durch *H. hepaticus*-Lysat führte. Außerdem wurde die Stimulierung auch deutlich verringert, wenn die Kinase RICK, welche wichtig für die Signalweiterleitung über NOD-Rezeptoren ist, gehemmt wurde. Daneben ist wohl die Aktivierung von TLR2 entscheidend für die Auslösung einer proinflammatorischen Antwort in beiden Zelllinien. In den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten konnte zwar in beiden Zelllinien keine Reduktion, sondern bei den Hepatozyten sogar eine Erhöhung der Induktion von MIP-2 und IL-6 nach Proteaseverdau der Lysate festgestellt werden, aber dies lag vermutlich an einem nicht vollständigen Verdau, so dass Lipopeptide, welche für die Induktion über TLR2 verantwortlich sind, dadurch eher besser zugänglich wurden. Dies würde wie schon erwähnt auch mit den Ergebnissen in humanen TLR2- oder TLR4-defizienten Nierenzellen übereinstimmen, mit denen gezeigt wurde, dass lebende *H. pylori*, *H. hepaticus* und *H. felis* IL-8 über TLR2, aber nicht über TLR4 induzieren (Mandell *et al.*, 2004).

#### **5.4.2 Untersuchung der durch *H. hepaticus* ausgelösten globalen Wirtsantwort in murinen Zelllinien und der Vergleich mit anderen Microarraystudien**

Bisher war noch relativ wenig über die durch *H. hepaticus* ausgelöste globale Wirtsantwort bekannt. Es gab bisher zwei Studien, in denen die Wirtsantwort auf transkriptioneller Ebene

nach Infektion durch *H. hepaticus* mit Microarrays untersucht wurde. In einer Studie wurde die Änderung der Genexpression im Caecum von weiblichen A/JCr-Mäusen nach 1-monatiger und 3-monatiger Infektion mit *H. hepaticus* untersucht (Myles *et al.*, 2003). In einer zweiten Studie wurde die Genregulation in der Leber von männlichen A/JCr-Mäusen nach 3-, 6- und 12-monatiger Infektion mit *H. hepaticus* betrachtet (Boutin *et al.*, 2004). Es gab bisher jedoch noch keine Studien, in denen die globale Genregulation von isolierten Zellen auf eine Infektion mit *H. hepaticus* untersucht wurde. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen einer *H. hepaticus*-Infektion auf J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten auf globaler transkriptioneller Ebene betrachtet. Es konnte, wie in Abschnitt 5.4.1 diskutiert, gezeigt werden, dass diese Zellen durch ein weites Spektrum an Liganden für Mustererkennungsrezeptoren stimuliert werden können. Ebenso exprimierten sie weitgehend alle bekannten Mustererkennungsrezeptoren, welche für das Erkennen von bakteriellen Komponenten eine Rolle spielen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *H. hepaticus* gut an diese Zellen adhärert und bei Kurzzeitinfectionen nur eine geringe Toxizität ausübt. Auch die Auswirkung von CDT auf diese Zellen schien bei Kurzzeitinkubationen relativ gering zu sein.

Ein Vergleich der globalen Genregulation der eukaryontischen Zellen auf transkriptioneller Ebene durch eine Koinkubation mit *H. hepaticus* 3B1 zeigte, dass sich die Antwort der beiden Zelllinien deutlich unterscheidet. In den Makrophagen waren etwas mehr Gene als in den Hepatozyten reguliert, wobei in beiden Zelllinien etwa gleich viele Gene induziert wie reprimiert waren. Wie zu erwarten, waren in beiden Zelllinien viele Gene für die Cytokinproduktion hochreguliert, während überdurchschnittlich viele Gene für die Regulation des Zellzyklus reprimiert waren. In den Makrophagen zeigte sich eine Aktivierung der Zellen, da Gene, welche wichtig für den Metabolismus, physiologische Prozesse oder den Nukleinsäuremetabolismus sind, unter den induzierten Genen überrepräsentiert waren, während Gene für negative Regulatoren (z.B. für die Signaltransduktion, zelluläre und physiologische Prozesse oder dem Zellzyklus) eher reprimiert waren. Die Zellen schienen auch in einen apoptotischen Zustand überzugehen, da viele Gene für Caspasen und andere für die Apoptose wichtige Gene hochreguliert waren. Dies ist vermutlich auf den Einfluß des CDT-Toxins zurückzuführen. In den Hepatozyten waren dagegen Gene für negative Regulatoren überproportional hochreguliert, während überdurchschnittlich viele Gene für den Zellzyklus, den Nukleotidstoffwechsel oder allgemein den Metabolismus reprimiert waren. Dies spricht dafür, dass die Hepatozyten nach Infektion mit *H. hepaticus* im Gegensatz zu den Makrophagen in ihrer Aktivität eher gehemmt werden.

Von Jenner und Young wurde kürzlich ein Set von Genen definiert, welche in Zellen verschiedenster Herkunft (z.B. Makrophagen, dendritische Zellen, Leukozyten, Endothelzellen, Epithelzellen) durch unterschiedliche Pathogene (Bakterien wie *E. coli*, *S. aureus*, *H.*

*pylori* u.a.; Viren wie HIV-1, Epstein-Barr-Virus, Hepatitis B und C-Virus u.a.) induziert oder reprimiert werden (Jenner und Young, 2005). Insgesamt 511 Gene wurden als zu diesem Set zugehörig definiert, wovon für 320 Gene Orthologe auf den von uns verwendeten Microarrays gefunden wurden. Davon waren 82 Gene (53 induziert, 29 reprimiert) in den Makrophagen und 62 Gene (39 induziert, 23 reprimiert) in den Hepatozyten durch *H. hepaticus* reguliert, wobei 22 Gene in beiden Zelllinien reguliert waren. Zu den in beiden Zelllinien regulierten Genen gehörten hauptsächlich Gene, welche für Cytokine kodieren (*ccl3*, *ccl4*, *cxcl2*), Gene für die meisten NF- $\kappa$ B-Untereinheiten und weitere signaltransduktionsassoziierte Gene wie *stat4*, *traf1*, *atf3*, *atf4*, *bcl3*, *tnfrsf1b*, *tnfrsf5* und weitere. In den von uns durchgeführten Microarrayexperimenten wurde jeweils nur ein Zeitpunkt untersucht. Da man erwarten würde, dass einige dieser Gene nicht zu allen Zeitpunkten reguliert sind, zeigt dies, dass ein beträchtlicher Teil der durch *H. hepaticus* regulierten Gene zu diesem Set von Genen gehört.

In primären Knochenmarksmakrophagen von Wildtyp und MyD88-defizienten C57BL/6-Mäusen wurde untersucht, welche Gene nach Koinkubation mit *E. coli*-LPS differentiell reguliert werden (Bjorkbacka *et al.*, 2004). Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf die Frage gelegt, welche Gene MyD88-abhängig und welche MyD88-unabhängig reguliert werden, da die Signalweiterleitung nach Induktion von TLR4 beide Signalwege benützt (Kawai *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Teil der durch *E. coli*-LPS regulierten Gene auch durch *H. hepaticus* in den in dieser Arbeit verwendeten Makrophagen und Hepatozyten reguliert werden (siehe Tab. 24 und Tab. 25). Dabei gehörten diese Gene fast alle zu dem zuvor beschriebenen Set an allgemein durch Pathogene regulierten Genen. Von den in beiden Zelllinien regulierten Genen gehörten nur vier zu den MyD88-abhängigen Genen, während 15 Gene zu den MyD88-unabhängigen Genen gehörten. Die in den BMDM durch *E. coli*-LPS regulierten Gene wurden zu etwa 75% den MyD88-unabhängigen Genen und zu 22% den MyD88-abhängigen Genen zugeordnet. Wenn *H. hepaticus* nicht bzw. kaum über TLR4 stimuliert, sollten nur wenige Gene über den MyD88-unabhängigen Weg stimuliert werden, da die Signalweiterleitung über den MyD88-unabhängigen Weg nur nach Stimulation von TLR3 (Rezeptor für doppelsträngige RNA) und TLR4 erfolgt. Da die Koinkubationszeiten von *H. hepaticus* mit J774-Makrophagen und *E. coli*-LPS mit BMDM jeweils bei 2 h und die Koinkubationszeit von *H. hepaticus* mit NCTC Klon 1469 bei 4 h und damit in einem ähnlichen Bereich lagen, ist der geringe Anteil an gemeinsam regulierten Genen ein weiteres Indiz dafür, dass LPS von *H. hepaticus* nur eine geringe Rolle in der Auslösung einer proinflammatorischen Antwort spielt.

Mit Hilfe der humanen monozytischen Makrophagenzelllinie U937 (Sundstrom und Nilsson, 1976) wurden Gene gesucht, welche vor und nach Stimulierung durch *E. coli*-LPS Untereinheiten von NF- $\kappa$ B binden (Schreiber *et al.*, 2006). Dabei banden 157 Gene vor und

326 Gene nach Stimulierung durch *E. coli*-LPS mindestens eine Untereinheit von NF- $\kappa$ B. Von diesen NF- $\kappa$ B-bindenden Genen konnten Orthologe für 146 Gene auf den in dieser Arbeit benutzten Arrays gefunden werden. Davon waren in den Makrophagen 12 Gene (8%) reprimiert und 22 Gene (15%) induziert. In den Hepatozyten waren ebenfalls 12 Gene (8%) reprimiert, aber nur 14 Gene (10%) induziert. Als Kontrolle wurden in der zitierten Studie auch Gene gesucht, welche den Transkriptionsfaktor E2F4 binden. Dies ergab insgesamt 200 Gene, wovon 62 Gene den von uns benutzten Arrays zugeordnet werden konnten. Davon waren in den Makrophagen 3 Gene (5%) reprimiert und 10 (16%) induziert. In den Hepatozyten waren 7 Gene (11%) reprimiert und 2 Gene (3%) induziert. Dies zeigt, dass nur ein geringer Teil der in den Makrophagen und Hepatozyten induzierten Gene abhängig von NF- $\kappa$ B reguliert werden. Dabei war in den Hepatozyten im Vergleich zu den Makrophagen ein größerer Teil der regulierten Gene im Vergleich zur Kontrolle mit dem Regulator des Zellzyklus E2F4 NF- $\kappa$ B abhängig. Dies untermauert die Theorie, dass MAP-Kinasenabhängige Transkriptionsfaktoren in beiden Zelllinien im Vergleich zu NF- $\kappa$ B eine größere Rolle spielen und dass dies in den Makrophagen noch stärker ausgeprägt ist. Warum dies so ist, kann bis jetzt noch nicht definitiv erklärt werden. Durch Microarrays können jedoch hauptsächlich starke Regulationsereignisse detektiert werden. Möglicherweise gehört ein großer Teil der NF- $\kappa$ B-abhängigen Gene zu Genen, welche aufgrund einer zu geringen Regulation wegen einer zu geringen Sensibilität durch Microarrays nicht erkannt werden.

Wie schon erwähnt, gibt es bis jetzt nur zwei Studien, in denen die *in vivo*-Genregulation durch *H. hepaticus* untersucht wurde (Boutin *et al.*, 2004, Myles *et al.*, 2003). Die Studie von Myles *et al.* erfolgte in einem Typhlitismodell und die Studie von Boutin *et al.* in einem Hepatitismodell. Für beide Studien wurden A/JCr-Mäuse verwendet und die durch *H. hepaticus* ausgelöste differentielle Genregulation wurde unter Verwendung von Gewebe aus dem kompletten Caecum bzw. dem linken Leberlappen untersucht. Wie man in Tab. 27 sehen kann, waren in den Makrophagen besonders zu späteren Zeitpunkten deutlich mehr Gene als in den Hepatozyten identisch wie in den Lebersektionen reguliert. Dagegen waren in den Hepatozyten sehr viele Gene gegensätzlich reguliert (d.h. durch *H. hepaticus* in der Leber induziert und in der Hepatozytenzelllinie reprimiert oder umgekehrt). Ein Vergleich mit dem Typhlitis-Modell von Myles *et al.* zeigt, dass nach einer Infektionsdauer von einem Monat mehr differentiell regulierte Gene aus den Caecumproben auch in den Hepatozyten als in den Makrophagen in der gleichen Richtung reguliert wurden. Nach einer dreimonatigen Infektionsdauer waren dagegen mehr regulierte Gene ebenfalls in den Makrophagen als in den Hepatozyten identisch reguliert. Dies entspricht den erwarteten Ergebnissen, da die primäre Immunantwort eher von Epithelzellen abhängig ist, während nach drei Monaten durch die Infiltration von Immunzellen die adaptive Immunantwort eine größere Rolle spielen sollte. Daher ergibt sich nach einem Monat eine stärkere Überlappung mit der durch *H.*

*hepaticus* in den Hepatozyten ausgelösten Genregulation, während die Ergebnisse nach drei bis zwölf Monaten eher der Regulation in den Makrophagen ähnelte. Insgesamt war die Überlappung der in dieser Arbeit präsentierten Microarrayergebnisse jedoch nur gering mit den publizierten Studien, da diese Langzeituntersuchungen im *in vivo*-Modell sind, während in dieser Arbeit Kurzzeitinfectionen im *in vitro*-Modell mit isolierten Zellkulturlinien durchgeführt wurden.

**Tab. 27. Vergleich der Microarraydaten mit Daten aus anderen Arbeiten, in denen die durch *H. hepaticus* ausgelöste Genregulation untersucht wurde.**

Studie und Infektionsdauer	Reguliert in der Studie	Davon zugeordnet	Reguliert in J774 Identisch/Gegensätzlich	Reguliert in NCTC Klon 1469 Identisch/Gegensätzlich
<b>Myles et al., 2003</b>				
1 Monat	28	21	2 (1)/6 (0)	8 (3)/4 (2)
3 Monate	33	28	7 (6)/3 (1)	5 (3)/7(2)
<b>Boutin et al., 2004</b>				
3 Monate	188	42	10 (7)/5 (1)	6 (3)/10(6)
6 Monate	401	60	17 (13)/ 6 (2)	10 (4)/ 15 (10)
12 Monate	678	103	26 (20)/13 (5)	11 (4)/30 (15)

In der ersten Spalte ist die Infektionsdauer in der jeweiligen Studie angegeben, in der zweiten Spalte die Anzahl an differentiell regulierten Genen und in der dritten Spalte die Anzahl dieser Gene, welche auf den MWG *Mus musculus*-Arrays gefunden werden konnten (in der Publikation von Boutin *et al.* sind nur 153 regulierte Gene namentlich angegeben). In der vierten und fünften Spalte ist die Anzahl dieser Gene, die auch in den J774-Makrophagen oder NCTC Klon 1469-Hepatozyten reguliert sind, angegeben. Dabei ist immer zuerst die Anzahl an Genen mit einem Verhältnis der Expression zwischen *H. hepaticus*-infizierten- zu Mock-infizierten Zellen  $>1,5$  bzw.  $<0,67$  und in Klammer die Anzahl an Genen mit einem Verhältnis  $>2,0$  bzw.  $<0,5$  angegeben. Vor dem Schrägstrich steht die Anzahl differentiell regulierter Gene, welche in die gleiche Richtung wie in den Vergleichsstudien reguliert werden (induziert oder reprimiert) und nach dem Schrägstrich die Anzahl gegensätzlich regulierter Gene.

Von Eskra *et al.* wurden RAW264.7 Makrophagen für 4 h mit dem intrazellulären Bakterium *Brucella abortus* koinkubiert und anschließend die globale Genregulation untersucht (Eskra *et al.*, 2003). Dafür wurde der murine U74A Chip von Affymetrix benutzt, welcher Sonden für etwa 6.000 Gene enthält. RAW264.7-Makrophagen wurden wie J774 aus Balb/c-Mäusen isoliert, so dass diese Zellen sehr gut vergleichbar sind. In dieser Studie waren 69 Gene induziert und 83 Gene reprimiert. Dabei zeigte sich eine überraschend hohe Überlappung mit Genen, welche durch *H. hepaticus* in Makrophagen und Hepatozyten reguliert werden. Von den hochregulierten Genen konnten 51 Gene zugeordnet werden. Davon waren in den Makrophagen 23 deutlich (Ratio  $> 2$ ) und weitere 12 Gene tendenziell (Ratio  $> 1,5$ ) induziert. In den Hepatozyten waren 22 Gene deutlich und weitere 9 Gene tendenziell induziert. Von den reprimierten Genen konnten 66 Gene zugeordnet werden. Davon waren in den Makrophagen 3 Gene deutlich (Ratio  $< 0,5$ ) und weitere 5 Gene tendenziell (Ratio  $< 0,66$ ) reprimiert. In den Hepatozyten waren 6 Gene deutlich und 14 Gene tendenziell reprimiert. Die Übereinstimmung verteilte sich auf alle Kategorien, wobei die

Übereinstimmung der induzierten Gene am besten für Cytokine und für Gene mit einer Funktion in der Apoptose, der Adhäsion, dem Zellzyklus und der Transkription war. Von den reprimierten Genen war die Übereinstimmung am besten für Gene mit einer Funktion in der Transkription und der Signalweiterleitung. Es ist etwas überraschend, dass die Übereinstimmung der durch *B. abortus* in RAW-Makrophagen und durch *H. hepaticus* in den J774-Makrophagen und den Hepatozyten induzierten Gene etwa gleich gut und für die reprimierten Gene sogar besser in den Hepatozyten war. Dies spricht dafür, dass diese regulierten Gene weniger zelltypspezifisch sind, sondern eher generell regulierte Gene darstellen. Auf welchem Wege *B. abortus* eine proinflammatorische Antwort auslöst, ist noch nicht vollends geklärt. Es gibt Studien, welche TLR2 (Giambartolomei *et al.*, 2004), TLR4 (Campos *et al.*, 2004) oder TLR9 (Huang *et al.*, 2005) als Hauptmediatoren der proinflammatorischen Antwort beschreiben. Generell sind sich diese und andere Studien jedoch einig, dass die durch *B. abortus* ausgelöste Immunantwort primär abhängig von MyD88 ist (Weiss *et al.*, 2005). Obwohl *B. abortus* ein intrazelluläres und *H. hepaticus* ein extrazelluläres Bakterium ist, erklärt dies das ähnliche Regulationsmuster, da *H. hepaticus* vermutlich auch eher über MyD88-abhängige Signalwege eine proinflammatorische Antwort auslöst. *B. abortus* führt ähnlich wie *H. hepaticus* zu einer T<sub>H</sub>1-Antwort (Huang *et al.*, 2005). Dies ist im Falle von *H. hepaticus* ungewöhnlich, da im Allgemeinen intrazelluläre Pathogene eher eine T<sub>H</sub>1- und extrazelluläre Pathogene eher eine T<sub>H</sub>2-Antwort auslösen. Das ähnliche Aktivierungsmuster dieser beiden Bakterien könnte aber eine Erklärung dafür liefern. Möglicherweise löst *H. hepaticus* eher eine zelluläre Immunantwort aus, um auf diese Weise von dem Immunsystem nicht direkt erkannt zu werden. Eine gegen Epithelzellen gerichtete Immunantwort könnte eine persistente Besiedlung durch *H. hepaticus* erleichtern, da dadurch die Epithelstruktur gestört wird, und möglicherweise erhöht dies auch die Verfügbarkeit von Nährstoffen. Die hier präsentierten Ergebnisse deuten an, dass für die Erkennung von *H. hepaticus* NOD-Proteine eine wichtige Rolle spielen. Diese sind im Gegensatz zu den meisten TLRs nicht membranassoziiert, sondern liegen frei im Cytosol vor. Sowohl für *Listerien* als auch für *Shigella* wurde gezeigt, dass NOD1 entscheidend für die Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- $\kappa$ B ist (Girardin *et al.*, 2001, Opitz *et al.*, 2006).

J774-Makrophagen wurden für eine Studie benutzt, in der die globale Regulation nach einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* untersucht wurde (Hoffmann *et al.*, 2004). *Yersinia* hemmt nach der Infektion die Wirtsantwort mit Hilfe eines auf einem Virulenzplasmid (pYV) kodierten TypIII-Sekretionssystems (T3SS) und Yop (*Yersinia* outer membran protein)-Proteinen, welche als Effektoren wirken (Cornelis, 1998, Cornelis, 2002). In dieser Studie wurden J774-Makrophagen für 2 h mit einem Wildtypstamm (WA(pYV)) und einem plasmid-freien Stamm (WA-C) koinkubiert. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Microarrayexperimente zeigt, dass



ein großer Prozentsatz der unabhängig vom Vorhandensein des pYV-Virulenzplasmids hochregulierten Gene auch in J774-Makrophagen und NCTC Klon 1469-Hepatozyten nach einer Koinkubation mit *H. hepaticus* induziert wurden (Tab. 28). Dagegen wurden von den Genen, welche entweder nur oder deutlich stärker durch den plasmidlosen *Y. enterocolitica*-Stamm induziert wurden, prozentual deutlich weniger Gene durch *H. hepaticus* in beiden Zelllinien induziert. Dies stellt damit einen interessanten Vergleich dar, da unter den durch *H. hepaticus* induzierten Genen prozentual deutlich weniger Gene enthalten waren, deren Induktion durch das immunsuppressive Plasmid pYV von *Y. enterocolitica* gehemmt werden als Gene, die durch *Y. enterocolitica* unabhängig vom pYV-Plasmid induziert werden. Obwohl das Genom von *H. hepaticus* keine Homologe zu den *yop*-Genen von *Yersinia* enthält, spricht dies dafür, das *H. hepaticus* einen ähnlichen immunsuppressiven Effekt ausübt. Ob dies etwas mit der HHG11-Insel zu tun hat, ist im Moment noch nicht bekannt, wird aber weiter evaluiert werden.

**Tab. 28. Vergleich der Microarraydaten mit Daten aus Experimenten mit *Y. enterocolitica*.**

Reguliert Wildtypstamm	Reguliert ohne p(YV)	Anzahl regulierter Gene	Davon zugeordnet	Reguliert in J774	Reguliert in NCTC Klon 1469
<b>Hoffmann et al., 2004</b>					
↘	↘	10	5	0 (0%)	1 (20%)
↗	↑	2	2	0 (0%)	0 (0%)
↗	↗	24	18	13 (72%)	11 (61%)
↗/→	↑	14	11	2 (18%)	4 (36%)
<b>Sauvonnet et al., 2002</b>					
→	↑	46	31	9 (31%)	11 (35%)
↑	→	27	18	3 (17%)	0 (0%)
↓	→	21	10	0 (0%)	5 (10%)
→	↓	23	13	1 (8%)	4 (31%)

In der ersten Spalte ist durch Pfeile illustriert die Regulation durch *Y. enterocolitica* verglichen mit mock-infizierten Zellen angegeben. In der zweiten Spalte ist die Regulation durch *Y. enterocolitica* ohne das Virulenzplasmid pYV schematisch dargestellt. Anschließend folgt die Anzahl der in der jeweiligen Studie regulierten Gene und dann die Anzahl dieser Gene, welche Genen auf den MWG *Mus musculus*-Arrays zugeordnet werden konnten. In den letzten beiden Spalten steht die Anzahl dieser Gene, welche in J774- oder NCTC Klon 1469-Zellen nach Koinkubation mit *H. hepaticus* ebenfalls differentiell reguliert wurden (Ratio *H. hepaticus*- infizierten zu mock-infizierten Zellen >1,5 bzw. <0,67).

Es gibt noch eine zweite Microarray-basierte Studie, in welcher der Einfluss des pYV-Virulenzplasmids von *Y. enterocolitica* durch Microarrays untersucht wurde (Sauvonnet et al., 2002). In dieser Studie wurde die murine Makrophagenzelllinie PU5-1.8, welche aus einem Lymphom einer Balb/c-Maus stammt, benutzt (Ralph und Nakoinz, 1974). Ein Vergleich mit dieser Studie lässt jedoch keine eindeutigen Schlüsse zu. Tendenziell waren von den Genen, die durch den plasmidlosen, aber nicht durch den plasmidhaltigen Stamm induziert werden, mehr Gene durch *H. hepaticus* in den Makrophagen und Hepatozyten induziert als im umgekehrten Fall (Tab. 28). Unter den publizierten Daten dieser Studie waren jedoch keine detaillierten Angaben über Gene, welche durch *Y. enterocolitica* unabhängig vom pYV-

Plasmid differentiell reguliert werden, verfügbar. Dadurch fehlt ein Vergleichswert, wie viel Prozent dieser Gene durch *H. hepaticus* ebenfalls reguliert werden.

Zusammenfassend lassen sich aus diesen Vergleichen folgende Schlüsse ziehen. Die Immunantwort durch *H. hepaticus* wird zumindest nicht überwiegend über TLR4 induziert, da sich nur eine geringfügige Überlappung mit Genen, welche durch *E. coli*-LPS induziert werden, ergibt. NF- $\kappa$ B ist vermutlich auch nicht der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Auslösung einer proinflammatorischen Antwort, da nur wenige regulierte Gene NF- $\kappa$ B-Bindestellen enthalten. Auch gibt es nur eine geringe Überlappung mit Studien, in denen die Genregulation nach Langzeitinfektion durch *H. hepaticus* in Mäusen untersucht wurde. Trotzdem stimmt das Muster der Genregulation der *in vivo*-Studien verglichen mit den in dieser Arbeit präsentierten *in vitro*-Studien nach relativ kurzer Infektionsdauer (um einem Monat) besser mit den Ergebnissen unter Verwendung der Hepatozyten und zu späteren Zeitpunkten besser mit den Ergebnissen unter Verwendung der Makrophagen überein. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass zu Beginn eher eine epitheliale Immunantwort vorherrscht, während zu späteren Zeitpunkten eine Infiltration durch Makrophagen und andere Immunzellen erfolgt, welche dann die Immunantwort bestimmen. Die durch *H. hepaticus* ausgelöste globale Regulation der Transkription weist die größte Ähnlichkeit mit der durch *B. abortus* ausgelösten Genregulation auf. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sowohl *B. abortus* als auch *H. hepaticus* über ähnliche Signalwege induzieren, was ebenfalls bei beiden auch in einer T<sub>H</sub>1-dominanten Immunantwort resultiert. Außerdem wurden beide Studien mit isolierten Makrophagen und kurzen Koinkubationszeiten durchgeführt, wodurch man davon ausgehen kann, dass eher Komponenten des angeborenen als des adaptiven Immunsystems entscheidend sind. Außerdem scheint *H. hepaticus* ähnlich wie *Y. enterocolitica* die Immunantwort zu hemmen, was möglicherweise ebenfalls über ähnliche Wege erfolgt.

### **5.5 *H. hepaticus* führt zu einer Inhibition der proinflammatorischen Antwort in intestinalen Epithelzellen**

In dieser Arbeit wurde ein neues *in vitro*-Zellkulturmodell für Untersuchungen mit *H. hepaticus* entwickelt, welches ein gutes Modell für die *in vivo*-Situation im Tier darstellt. Dazu wurde die immortalisierte epitheliale Kryptenzelllinie m-IC<sub>cl2</sub> benutzt (Bens *et al.*, 1996). Diese Zelllinie zeigt in Kultur viele Eigenschaften von primären epithelialen Zellen wie die Ausbildung von Krypten und die Ausbildung einer lateralen und basolateralen Seite. Intestinale Epithelzellen zeigen in der Regel eine limitierte Stimulierbarkeit durch Liganden von Mustererkennungsrezeptoren. Besonders Liganden von TLR2 und TLR4 können intestinale Epithelzellen meist kaum oder gar nicht stimulieren. m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen zeigten daher auch wie erwartet eine sehr geringe Stimulierbarkeit durch Liganden von TLR2. Ebenfalls konnten sie

nicht durch den TLR5-Liganden *S. typhimurium*-Flagellin stimuliert werden. Für intestinale Epithelzellen eher ungewöhnlich reagierten sie aber sehr gut auf den TLR4-Liganden *E. coli*-LPS. Es konnte gezeigt werden, dass *H. hepaticus* sehr gut und auch relativ spezifisch an die Zell-Zell-Verbindungen von m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen adheriert. Trotzdem zeigte sich eine nur geringe Stimulierbarkeit dieser Zellen durch lebende *H. hepaticus* oder Lysate. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass LPS von verschiedenen *H. hepaticus* Stämmen in den m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen ebenfalls nur eine schwache Induktion des von uns verwendeten Markercytokins MIP-2 auslöst (Die Funktion und Bedeutung des LPS von *H. hepaticus* wurde näher in dem Abschnitt 5.4.1 diskutiert).

Nun stellte sich die Frage, ob *H. hepaticus* und im besonderen sein LPS in der Lage ist, die Immunantwort anderer Zellen zu unterdrücken. Um diese Frage zu klären, wurden m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen mit *E. coli*-LPS alleine oder kombiniert mit lebenden *H. hepaticus* bzw. mit Lysat oder LPS von *H. hepaticus* koinkubiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl Lysate und LPS von *H. hepaticus* als auch lebende *H. hepaticus* die durch *E. coli*-LPS ausgelöste MIP-2-Sekretion hemmen. Diese Inhibierung war unabhängig von den bekannten Pathogenitätsfaktoren CDT, der HHG11-Insel und von funktionellen Flagellen. Obwohl die Inhibierung sowohl in serumhaltigem als auch in serumfreiem Medium funktionierte, war sie in serumfreiem Medium stärker. Es wurde darauf basierend auch versucht, die Aktivierung von *S. typhimurium*-FliC in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco2 zu hemmen. Diese Zellen konnten deutlich durch Lysate von *H. hepaticus*, nicht aber durch *H. hepaticus*-LPS stimuliert werden. Bei der gemeinsamen Koinkubation von *H. hepaticus*-LPS mit *S. typhimurium*-Flagellin zeigte sich, dass die IL-8-Sekretion nur in serumfreiem Medium, aber nicht in serumhaltigem Medium fast komplett gehemmt wird. Dies spricht dafür, dass der inhibitorische Effekt von *H. hepaticus*-LPS nicht spezifisch für TLR4 ist, sondern auch die Aktivierung über andere TLRs hemmen kann. Dagegen fand keine Hemmung der durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  ausgelösten IL-8-Induktion statt. Auch konnte die durch Phorbolmyristat-acetat ausgelöste MIP-2 beziehungsweise IL-8 Sekretion in m-IC<sub>cl2</sub> und Caco2-Zellen durch *H. hepaticus*-LPS nicht gehemmt werden. Daher scheint die Hemmung zwar nicht spezifisch für TLR4, aber spezifisch für die Aktivierung über TLRs zu sein, da selbst die Stimulation über IL-1 $\beta$ , welches weitgehend dieselben Adaptoren wie TLRs benutzt, nicht gehemmt werden konnte.

Es stellte sich nun die Frage, warum die *S. typhimurium*-FliC-induzierte IL-8-Sekretion in Caco2-Zellen nur unter serumfreien Bedingungen gehemmt wird, während die Inhibition in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen unabhängig von der Anwesenheit von Serum ist. Möglicherweise enthält das verwendete fötale Kälberserum Komponenten, welche das *H. hepaticus*-LPS binden, so dass es nicht mehr für die Interaktion mit den Zellen zur Verfügung steht. Dafür spricht, dass die IL-8-Induktion in Caco2-Zellen in Anwesenheit von murinem Serum noch teilweise gehemmt

werden konnte. Ein Grund für die noch erfolgende Hemmung in Anwesenheit von FCS in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen könnte sein, dass LPS-bindende Kofaktoren im fötalen Kälberserum wie LPS-Bindeprotein, MD-2 und/oder CD14 das *H. hepaticus*-LPS abfangen. Es könnte sein, dass diese Kofaktoren aus dem Kälberserum mit murinen, aber nicht mit humanen Rezeptoren interagieren können. Ebenfalls könnte es sein, dass Komponenten im Serum, welche *H. hepaticus*-LPS binden, auch *E. coli*-LPS, nicht aber Flagelline binden können und deshalb in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen auch mit Serum ein konstantes Verhältnis aufrechterhalten werden kann, während in Caco2-Zellen in Anwesenheit von FCS zu wenig *H. hepaticus*-LPS für die Interaktion mit den Zellen zur Verfügung steht. Ebenfalls ist noch fraglich, warum die IL-8-Sekretion in Caco2-Zellen durch *H. hepaticus*-LPS fast vollständig gehemmt wurde, während die MIP-2-Sekretion in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen nur teilweise reduziert war. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Signalweiterleitung von TLR5 nur über den MyD88-abhängigen Weg verläuft, während die Signalweiterleitung von TLR4 über den MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Weg verläuft. Möglicherweise hemmt *H. hepaticus*-LPS nur die MyD88-abhängige Signalweiterleitung, wodurch die Signalweiterleitung über TLR5 komplett ausgeschaltet werden würde, während im Falle von TLR4 nur einer der beiden aktivierten Signalwege gehemmt wird. Dabei stellt sich dann aber die Frage, warum *H. hepaticus* keinen Einfluss auf die MIP-2-Induktion durch IL-1 $\beta$  hat. Die Signalweiterleitung nach Induktion des IL-1-Rezeptors ist weitgehend identisch mit der MyD88-abhängigen Signalweiterleitung über TLRs. Möglicherweise greift *H. hepaticus*-LPS indirekt an einem TLR-spezifischen Regulator an. Letztlich kann die Frage, warum die Induktion über IL-1 $\beta$  nicht gehemmt wird, im Moment aber noch nicht beantwortet werden. Für die Hemmung der proinflammatorischen Antwort durch *H. hepaticus* könnten MAP-Kinasen eine wichtige Rolle spielen. In m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen wurde die prozentuelle Hemmung stärker, wenn die Translokation von NF $\kappa$ B durch einen Inhibitor gehemmt wurde, dagegen schwächer, wenn die MAP-Kinasen p38, JNK oder ERK gehemmt wurden. Dies spricht dafür, dass für die Hemmung eher MAP-Kinasen als NF $\kappa$ B entscheidend sind. Möglicherweise erfolgt die Signalweiterleitung über TLR5 in Caco2-Zellen zu einem größeren Anteil über MAP-Kinasen als die Signalweiterleitung über TLR4 in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen. Der Grund für die unterschiedliche Hemmung in verschiedenen Zelllinien muss weiter untersucht werden, da die bisherigen Daten noch keine endgültige Entscheidung über die verschiedenen alternativen Hypothesen ermöglichen.

Da *H. hepaticus*-LPS sowohl die Induktion über TLR4 als auch über TLR5 hemmen kann, scheint es sich um keinen kompetitiven Mechanismus zu handeln. Auf den genauen Mechanismus kann aus den bisherigen Daten noch nicht geschlossen werden, aber wir vermuten, dass *H. hepaticus* an einen alternativen Rezeptor bindet und indirekt die Stimulierung über die Toll-ähnlichen Rezeptoren hemmt. Möglicherweise bindet *H. hepaticus* an lektinhaltige Mustererkennungsrezeptoren. Es wurde für *H. pylori*-LPS gezeigt, dass dieses

an die Mustererkennungsrezeptoren DC-SIGN und Kolektin binden kann (Bergman *et al.*, 2004, Khamri *et al.*, 2005) und das diese möglicherweise die TLR-abhängige Signalweiterleitung hemmen. Ebenfalls könnte *H. hepaticus* an Glycosphingolipide binden und diese dadurch aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass Glycosphingolipide die TLR-abhängige proinflammatorische Antwort hemmen (West *et al.*, 2005). Die hier dargestellten Daten sprechen jedoch nicht für diese These, da extern zugesetzte Glycosphingolipide in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen und Caco2-Zellen zwar die Induktion von MIP-2 bzw. IL-8 hemmten, aber die prozentuelle Hemmung durch *H. hepaticus*-LPS unabhängig von der Zugabe von Glycosphingolipiden war. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendeten gemischten Ganglioside aus dem Gehirn von Rindern *H. hepaticus*-LPS nicht binden können, obwohl diese die Induktion durch *E. coli*-LPS und *S. typhimurium*-Flagellin hemmen konnten.

Unter anderen enterohepatischen und gastrischen *Helicobacter* konnte bisher nur für *H. pylori* gezeigt werden, dass LPS von einigen Stämmen eine die proinflammatorische Antwort hemmende Wirkung besitzt (Lepper *et al.*, 2005). Ebenso konnte für die dentalpathogenen Bakterien *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema socranskii* und *Treponema medium* gezeigt werden, dass deren LPS die TLR4-abhängige Immunantwort hemmen kann. LPS von *P. gingivalis* scheint die Aktivierung über TLR4 durch eine starke kompetitive Bindung des Kofaktors MD-2 zu hemmen (Coats *et al.*, 2005). Dagegen scheint LPS von *T. socranskii* und *T. medium* eher durch LBP/CD14-abhängige Mechanismen zu hemmen (Asai *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2006, Schroder *et al.*, 2000). Ob *H. hepaticus* über ähnliche oder andere Mechanismen hemmt, kann im Moment noch nicht beurteilt werden und muss noch weiter untersucht werden. Die Fähigkeit, auch eine TLR5-Antwort zu hemmen, spricht jedoch für einen alternativen Mechanismus.

*H. hepaticus*, der eine instrinsische Resistenz gegen Polymyxine besitzt, wird bei der Anzucht *in vitro* im Allgemeinen in Anwesenheit von Polymyxin B inkubiert, um das Wachstum eventuell kontaminierender Bakterien zu hemmen. Es gibt trotz der instrinsischen Resistenz die Möglichkeit, dass sich das LPS von *H. hepaticus* bei dieser Art der Anzucht verändert (dies könnte unter Umständen auch unabhängig von Polymyxin der Fall sein). In der Tat konnten wir anhand der Gesamtgenomsequenz identifizieren, dass eine hohe Anzahl an phasenvariablen Genen (siehe Resultate Abschnitt 4.1.5) von *H. hepaticus* gerade an der Biosynthese von LPS beteiligt sind. Dazu gehört auch das Gen für die Phosphoethanolamintransferase (pETN-Transferase), wobei für dieses Gen auch bei der Sequenzierung des Genoms Phasenvariabilität festgestellt werden konnte. Für *H. pylori* wurde kürzlich gezeigt, dass die Resistenz gegenüber dem polykationischen antimikrobiellen Peptid Polymyxin B durch das Ersetzen der 1-Phosphatgruppe des Lipid A des LPS durch einen Phosphoethanolaminrest erfolgt (Tran *et al.*, 2006). Dies erfolgt über einen zweistufigen Prozess

durch die Enzyme Lipid A 1-Phosphatase und pETN-Transferase. Die Resistenz entsteht dabei durch eine Verringerung der negativen Ladung des LPS, wodurch das positiv geladene Polymyxin B schlechter an das LPS binden kann. Um nun den Einfluss von Polymyxin B auf die Struktur und die Eigenschaften von *H. hepaticus*-LPS zu untersuchen, wurde *H. hepaticus* auch auf Polymyxin B-freien Platten angezogen. Es stellte sich heraus, dass Lysate und LPS von diesen Bakterien deutlich weniger in der Lage waren als Lysate oder LPS von *H. hepaticus*, welche auf Platten mit Polymyxin B angezogen wurden, die *E. coli*-LPS induzierte MIP-2-Sekretion in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen zu hemmen (nicht gezeigt). Möglicherweise ist dafür eine Strukturänderung des LPS durch das „Ausschalten“ der pETN-Transferase, wenn die Bakterien auf Polymyxin-freien Platten angezogen werden, verantwortlich. Allerdings konnte bisher bei *H. hepaticus* keine Veränderung der intrinsischen Resistenz gegen Polymyxine beobachtet werden, und auch in unseren ergänzenden Versuchen (nicht gezeigt) blieben die Bakterien auch bei Anzucht in Abwesenheit von Polymyxin resistent gegen das Peptid. Kationische antimikrobielle Peptide ähnlich dem Polymyxin B werden sowohl von eukaryontischen Zellen (z.B. Catelicidine) als auch von einer Vielzahl an Bakterien gebildet. So produziert z.B. *H. pylori* ein Cecropin-ähnliches Peptid, gegenüber dem das Ersetzen der Phosphatgruppe des Lipid A durch ungeladene Reste ebenfalls eine Resistenz vermittelt (Putsep *et al.*, 1999). *In vivo* liegen also vermutlich im Darm meist Bedingungen mit einer hohen Konzentration kationischer antimikrobieller Peptide vor. Es sollte für *H. hepaticus* in der *in-vivo*-Situation daher von Vorteil sein, eine gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden resistente Form des LPS auszubilden, um Abwehrmechanismen der Wirtszellen und antimikrobiellen Peptiden anderer kommensaler Bakterien im Darm zu entgehen. Derzeit wird diese mögliche LPS-Variabilität von *H. hepaticus*, mit der Folge einer möglicherweise unterschiedlichen Beeinflussung der Immunantwort, weiter untersucht. Über die molekularen Mechanismen und die möglichen *in vivo*-Wirkungen dieser postulierten LPS-Variabilität von *H. hepaticus* lässt sich daher zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Schlussfolgerung ziehen, es kann jedoch angenommen werden, dass *H. hepaticus* unter bestimmten Umständen auch *in vivo* ein stark immuninhibitorisches LPS ausbilden kann.

## **5.6 Mögliche Bedeutung der Immunsuppression durch *H. hepaticus* für die Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Die aktuellen Erkenntnisse über die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sprechen dafür, dass diese nicht primär durch eine übersteigerte, sondern durch eine zu schwache Immunantwort ausgelöst werden. Dafür sprechen unter anderem Studien, laut denen Mutationen von NOD2, einem der genetischen Hauptrisikofaktoren für eine Erkrankung an Morbus Crohn, zu einer verringerten Aktivierbarkeit dieses Mustererkennungsrezeptors führen (Kobayashi *et al.*, 2005, Netea *et al.*, 2005b), obwohl es

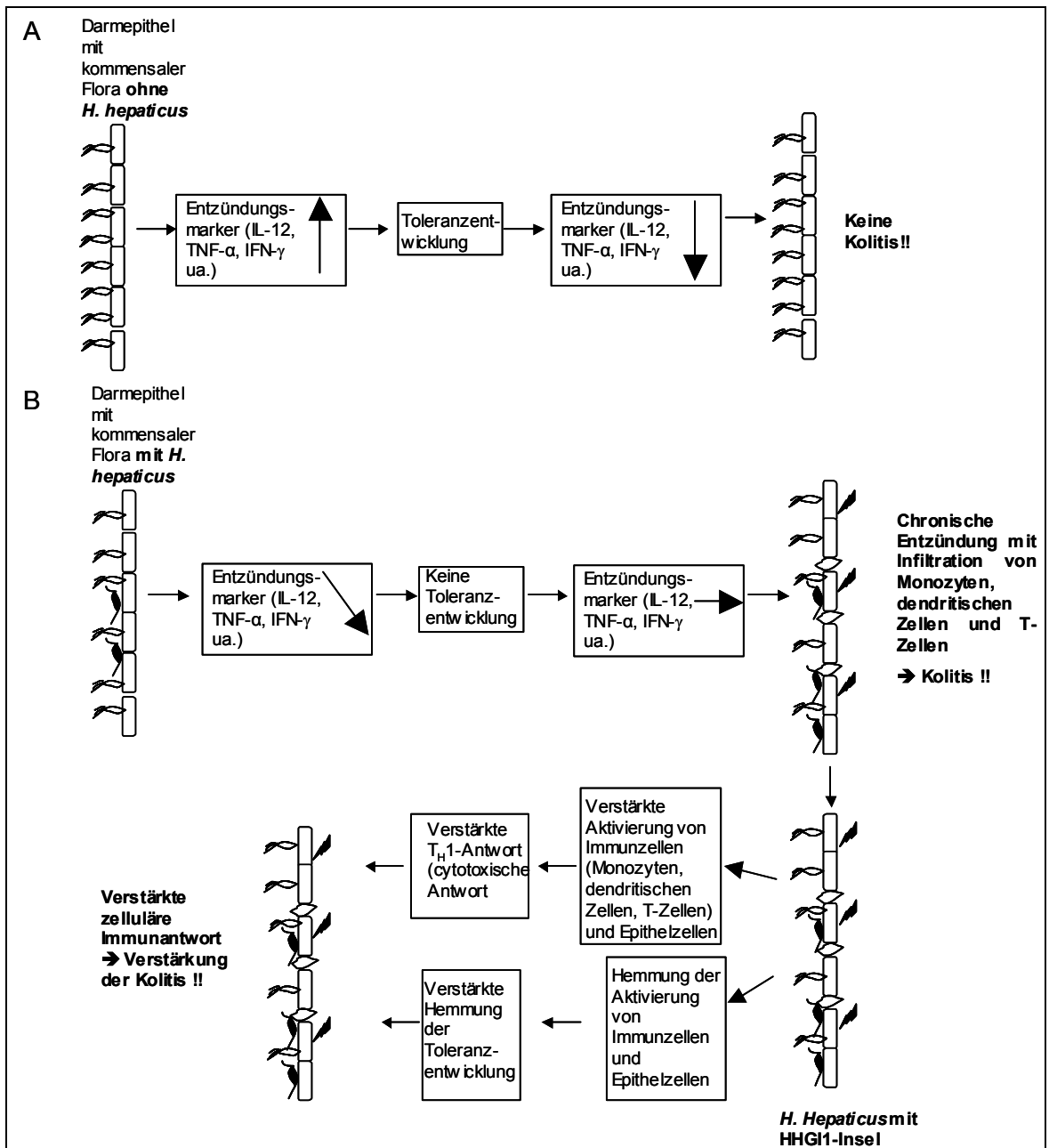
auch anderslautende Studien gibt, die dem widersprechen (Maeda *et al.*, 2005). Ebenfalls spricht auch die Tatsache dafür, dass NF- $\kappa$ B-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung von Kolitis und Typhlokolitis haben (Erdman *et al.*, 2001, Tomczak *et al.*, 2003). Das Erkennen der kommensalen Flora durch Mustererkennungsrezeptoren scheint eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Homöostase des Darmepithels zu spielen (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Dabei dienen die TLRs in diesem Fall nicht nur der Abwehr von Infektionen, sondern auch dem Auslösen von Reparaturmechanismen bei Gewebeerletzungen. Aktuelle Ergebnisse sprechen dafür, dass eine primäre Aktivierung von Zellen über einen gewissen Schwellenwert zu einer Toleranzentwicklung gegenüber weiteren Stimulierungen führen kann (Hanauer, 2006). Dies konnte in unserem Modell bestätigt werden. Eine erste Koinkubation mit *E. coli*-LPS führte zu einer deutlich verringerten Induktion von proinflammatorischen Cytokinen nach einer zweiten Stimulationsrunde. Dagegen wurde diese Toleranzentwicklung komplett gehemmt, wenn die erste Koinkubation aus einer Kombination von *E. coli*-LPS mit *H. hepaticus*-LPS oder Lysat erfolgte. Sowohl *H. hepaticus*-LPS als auch Lysate führten tendenziell sogar eher zu einer leicht erhöhten Stimulierbarkeit gegenüber *E. coli*-LPS. Dies zeigt, dass *H. hepaticus* die Toleranzentwicklung gegenüber aufgereinigten PAMPs in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen hemmt.

In IL-10- oder RAG-defizienten Mäusen, welche keine T-Zellen ausbilden, führt eine *H. hepaticus*-Infektion zu einer CED-ähnlichen Kolitis und in schweren Fällen zu Darmkrebs (Burich *et al.*, 2001, Erdman *et al.*, 2003, Whary und Fox, 2004). Diese Entstehung einer CED geht meist mit erhöhten Konzentrationen der Cytokine IL-12b/p40 und Interferon- $\gamma$  einher (Kullberg *et al.*, 1998, Kullberg *et al.*, 2001). In unserem Modell konnte auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden, dass eine Koinkubation der mIC<sub>cl2</sub>-Zellen mit *H. hepaticus*-Lysat oder -LPS zu einer deutlichen Hochregulation der immunmodulatorischen Cytokine IL-12b/p40 und IL-10 führt, während *E. coli*-LPS die Expression dieser Cytokine eher hemmt.

Obwohl *H. hepaticus* noch nicht aus Menschen isoliert wurde, konnten andere enterohepatische *Helicobacter* aus Menschen isoliert werden. Eine Reihe von Studien spricht dafür, dass eine Infektion des Menschen mit enterohepatischen *Helicobacter spp.* zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer CED führt (Matsukura *et al.*, 2002 und Einleitung Abschnitt 1.2.7.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in m-IC<sub>cl2</sub>-Zellen die Induktion von MIP-2 durch *E. coli*-LPS nicht nur durch *H. hepaticus*-Lysate, sondern auch durch Lysate von verschiedenen *H. pylori*-Stämmen und, wenn auch weniger stark ausgeprägt und nur bei niedrigen Konzentrationen, durch *H. bilis*-Lysat gehemmt wird. Dies spricht dafür, dass nicht nur *H. hepaticus* diese immunmodulatorische Eigenschaft besitzt, sondern dass dies wahrscheinlich eine allgemeine Eigenschaft von *Helicobacter*-Spezies ist.

Diese Ergebnisse können zu einem Modell der durch *H. hepaticus* ausgelösten Kolitisentstehung ausgeweitet werden (Abb. 46). Normalerweise führt die Besiedlung des Intestinaltraktes durch Kommensalen primär zu einer proinflammatorischen Antwort der Epithelzellen des Intestinaltraktes. Daraufhin bilden diese Zellen eine Toleranzreaktion gegen die kommensale Flora aus, so dass nur noch eine sehr schwache Entzündungsreaktion vorliegt. Die Besiedlung mit *H. hepaticus* oder auch anderen kolitisfördernden Bakterien würde dagegen primär zu einer verringerten Immunantwort gegen die intestinale Flora führen. Diese Immunantwort wäre dann aber nicht ausreichend für die Entwicklung einer Toleranzreaktion, so dass eine chronische Entzündungsreaktion ausgelöst durch Zellen des Epitheliums die Folge wäre. Des Weiteren scheint eine Infektion mit *H. hepaticus* zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-12 und IL-10 zu führen. Dies würde damit zu einer verstärkten adaptiven Immunantwort führen, da diese Cytokine die Ausreifung von T-Helferzellen verstärken. Dies würde einerseits zu einer verstärkten T<sub>H</sub>1-Antwort führen, welche eher gegen infizierte Zellen bzw. intrazelluläre Infektionserreger gerichtet ist. Ebenso können dadurch andere Zellen des Immunsystems wie Makrophagen angelockt werden, so dass sich die Entzündung weiter verstärken und zu einer Verletzung des Darmepithels führen würde. Dies könnte dadurch auch zu einem Eindringen von kommensalen Bakterien aus dem Darmlumen in die Darmwand führen, wodurch eine transmurale Entzündung des Darms entsteht. Andererseits ist IL-10 ein antiinflammatorisches Cytokin, welches die Ausbildung von regulatorischen T-Zellen induziert. Dies könnte aber die Entzündung im weiteren Verlauf so weit abschwächen, dass keine Toleranz entwickelt wird. Dies würde auch sicherstellen, dass *H. hepaticus* durch die Immunantwort nicht eradiziert wird, sondern den Darmtrakt weiterhin persistent besiedeln kann. Obwohl die HHG11-Insel an der Hemmung der durch *E. coli*-LPS ausgelösten proinflammatorischen Antwort und der Hemmung der Toleranzentwicklung gegenüber weiteren Stimuli anscheinend nicht direkt beteiligt ist, könnte sie diese Entwicklung noch verstärken. Wie schon dargestellt, kann noch nicht abschließend beurteilt werden, ob sie eher zu einer Verstärkung oder Hemmung der proinflammatorischen Antwort führt. Sie könnte daher einerseits unabhängig von *H. hepaticus*-LPS die Immunantwort primär zusätzlich hemmen, wodurch die Toleranzentwicklung weiter minimiert wird und damit die Störung der Immunantwort weiter zunähme.





**Abb. 46. Modell der durch *H. hepaticus* ausgelösten Kolitisentstehung.** (A) Im Darm mit kommensaler Darmflora ohne *H. hepaticus* entsteht vermutlich primär eine Entzündungsreaktion der Epithelzellen. Dies führt zu einer Toleranzentwicklung, wodurch weniger Entzündungsmarker sekretiert werden. Dadurch würde die Immunantwort gegen die intestinale Flora abgeschwächt, so dass keine Kolitis entsteht. (B) In Anwesenheit von *H. hepaticus* wird vermutlich die Immunantwort primär gehemmt. Dadurch würde die Toleranzentwicklung gegenüber der Kommensalflora abgeschwächt, wodurch eine chronische Entzündung entstehen könnte. Dies würde zu einer Kolitis mit einer verstärkten Infiltration von Immunzellen führen. Die HHG11-Insel würde entweder zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen und Epithelzellen führen, was zu einer verstärkten cytotoxischen Zellantwort führt. Andererseits könnte die HHG11-Insel auch zu einer Hemmung der Aktivierung von Makrophagen und Hepatozyten führen, wodurch die Toleranzentwicklung weiter gehemmt würde. Beide Möglichkeiten würden zu einer verstärkten chronischen Immunantwort und dadurch zu einer Verstärkung der Kolitis führen.

Außerdem könnte sich der Effekt der HHG11-Insel auch eher auf andere Zelltypen wie Makrophagen auswirken. Dies wäre wichtig, da dadurch eine persistente Besiedlung durch das Bakterium erleichtert wird. Dies bestätigte sich auch wie dargestellt in ersten Experimenten im Tiermodell, in dem inselpositive Stämme besser kolonisieren als inselnegative Stämme. Andererseits könnte die Insel die Immunantwort auch weiter verstärken, was dann den Grad der Entzündung potenzieren würde. Beide Möglichkeiten würden letztendlich zu einer Verstärkung der Entzündung des Darmtraktes und dadurch zu einer verstärkten Kolitis führen. Zusätzlich verstärkt werden könnte die Entzündung dann noch durch den cytotoxischen Einfluss von CDT. Wie schon erwähnt führen *cdt*-defiziente Mutanten von *H. hepaticus* gegenüber dem Wildtyp zu einer signifikant verringerten Entzündung des Darms in C57BL/6-Mäusen (Young *et al.*, 2004) und kolonisieren Swiss Webster Mäuse nicht mehr persistent (Ge *et al.*, 2005).

Daher kann man abschließend den Schluss ziehen, dass *H. hepaticus* sehr wahrscheinlich die intestinale Homöostase durch Hemmung der Toleranzentwicklung stört und aktiv durch mehrere Virulenzfaktoren wie die HHG11-Insel, CDT und vermutlich noch weiteren noch nicht genauer untersuchten Pathogenitätsfaktoren eine Entzündung und dadurch eine Kolitis auslösen bzw. verstärken kann.

Diese Arbeit stellt daher einen wichtigen Schritt zum Verständnis der Kollitisentstehung im Tiermodell und im Menschen dar. Sie zeigt, dass *H. hepaticus*, und vermutlich auch andere *Helicobacter*-Arten in ähnlicher Weise, das intestinale Immunsystem über verschiedene Wege moduliert und dadurch zur Entstehung einer übersteigerten Immunantwort im Darm führen kann. Diese Ergebnisse könnten einen wichtigen Ansatz für das genauere Verständnis und neue Ansatzmöglichkeiten für das Verhindern der Entstehung und neuer Therapiemöglichkeiten für chronisch entzündliche Darmerkrankungen liefern.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akira S, Takeda K** (2004), Toll-like receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499-511
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA** (2001), Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3, *Nature* 413: 732–738
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A** (1999), Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor 2, *Science* 285, 736–739
- Alm RA, Ling L.-S.L., Moir D.T., King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B., Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M., Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ** (1999), Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature* 397: 176-180
- Ananieva O, Nilsson I, Vorobjova T, Uibo R, Wadstrom T** (2002), Immune responses to bile-tolerant *helicobacter* species in patients with chronic liver diseases, a randomized population group, and healthy blood donors, *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 9: 1160-1164
- Anders HJ, Banas B, Linde Y, Weller L, Cohen CD, Kretzler M, Martin S, Vielhauer V, Schlondorff D, Grone HJ** (2003), Bacterial CpG-DNA aggravates immune complex glomerulonephritis: role of TLR9-mediated expression of chemokines and chemokine receptors, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 317-326
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A** (2005), Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 9247-9252
- Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'sullivan M, McManus R, Satsangi J** (2004), NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?, *Genes Immun.* 5: 417-425
- Asai Y, Hashimoto M, Ogawa T** (2003), *Treponemal* glycoconjugate inhibits Toll-like receptor ligand-induced cell activation by blocking LPS-binding protein and CD14 functions, *European Journal of Immunology* 33: 3196-3204
- Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vikstrom S, Sjoström R, Linden S, Backstrom A, Lundberg C, Arnqvist A, Mahdavi J, Nilsson UJ, Velapatino B, Gilman RH, Gerhard M, Alarcon T, Lopez-Brea M, Nakazawa T, Fox JG, Correa P, Dominguez-Bello MG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Normark S, Carlstedt I, Oscarson S, Teneberg S, Berg DE, Boren T** (2004), Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin, *Science* 305: 519-522
- Avenaud P, Castroviejo M, Claret S, Rosenbaum J, Megraud F, Menard A** (2004), Expression and activity of the cytolethal distending toxin of *Helicobacter hepaticus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 739-745

- Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac SP, Balabaud C, Megraud F** (2000), Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma, *Cancer* 89: 1431-1439
- Baar C, Eppinger M, Raddatz G, Simon J, Lanz C, Klimmek O, Nandakumar R, Gross R, Rosinus A, Keller H, Jagtap P, Linke B, Meyer F, Lederer H, Schuster SC** (2003), Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 11690-11695
- Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK** (1996), Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 110: 975-984
- Bach S, de Almeida A, Carniel E** (2000), The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*, *FEMS Microbiology Letters* 183: 289-294
- Backhed F, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Y, Nilsson C, Seguin D, Normark S, Buchan AM, Richter-Dahlfors A** (2003), Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4, *J. Infect. Dis.* 187: 829-836
- Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P** (2000), Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176, *Infect. Immun.* 68: 4384–4390
- Bacon DJ, Alm RA, Hu L, Hickey TE, Ewing CP, Batchelor RA, Trust TJ, Guerry P** (2002), DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176, *Infect. Immun.* 70: 6242-6250
- Baron C, O’Callaghan D, Lanka E** (2002), Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes, *Mol. Microbiol.* 43: 1359–1365
- Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Mandal D, Pathak S, Kundu M** (2005), NF-kappaB- and C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1beta release from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-stimulated macrophages, *J. Biol. Chem.* 280: 4279-4288
- Bell SJ, Chisholm SA, Owen RJ, Borriello SP, Kamm MA** (2003), Evaluation of *Helicobacter* species in inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18: 481-486
- Belzer C, Stoof J, Beckwith CS, Kuipers EJ, Kusters JG, van Vliet AH** (2005), Differential regulation of urease activity in *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori*, *Microbiology* 151: 3989-3995
- Bens M, Bogdanova A, Cluzeaud F, Miquerol L, Kerneis S, Kraehenbuhl JP, Kahn A, Pringault E, Vandewalle A** (1996), Transimmortalized mouse intestinal cells (m-IC<sub>c12</sub>) that maintain a crypt phenotype, *Am. J. Physiol* 270: C1666-C1674
- Bergman MP, Engering A, Smits HH, van Vliet SJ, van Bodegraven AA, Wirth HP, Kapsenberg ML, Vandenbroucke-Grauls CM, van Kooyk Y, Appelmek BJ** (2004), *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN, *J. Exp. Med.* 200: 979-990

- Bhattacharyya A, Stilwagen S, Ivanova N, D'Souza M, Bernal A, Lykidis A, Kapatral V, Anderson I, Larsen N, Los T, Reznik G, Selkov E Jr, Walunas TL, Feil H, Feil WS, Purcell A, Lassez JL, Hawkins TL, Haselkorn R, Overbeek R, Predki PF, Kyrpides NC (2002)**, Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12403–12408
- Bjorkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, Ordija CM, Dowley NE, Golenbock DT, Freeman MW (2004)**, The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades, *Physiol. Genomics* 19: 319-330
- Bladergroen MR, Badelt K, Spaik HP (2003)**, Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion, *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 53-64
- Bliss CM, Jr., Golenbock DT, Keates S, Linevsky JK, Kelly CP (1998)**, *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes, *Infect. Immun.* 66: 5357-5363
- Bohr UR, Glasbrenner B, Primus A, Zagoura A, Wex T, Malfertheiner P (2004)**, Identification of enterohepatic *Helicobacter* species in patients suffering from inflammatory bowel disease, *J. Clin. Microbiol.* 42: 2766-2768
- Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevielle C, Lavigne JP, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D (2002)**, Type IV secretion and *Brucella* virulence, *Vet. Microbiol.* 90: 341–348
- Bouma G, Strober W (2003)**, The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Immunol.* 3: 521-533
- Boutin SR, Rogers AB, Shen Z, Fry RC, Love JA, Nambiar PR, Suerbaum S, Fox JG (2004)**, Hepatic temporal gene expression profiling in *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice, *Toxicol. Pathol.* 32: 678-693
- Boutin SR, Shen Z, Rogers AB, Feng Y, Ge Z, Xu S, Sterzenbach T, Josenhans C, Schauer DB, Suerbaum S, Fox JG (2005)**, Different *Helicobacter hepaticus* strains with variable genomic content induce various degrees of hepatitis, *Infect. Immun.* 73: 8449-8452
- Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey MR (2001)**, Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar *Agona*, *J. Bacteriol.* 183: 5725-5732
- Burich A, Hershberg R, Waggle K, Zeng W, Brabb T, Westrich G, Viney JL, Maggio-Price L (2001)**, *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice, *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 281: G764-G778
- Burns, DL (2003)**, Type IV transporters of pathogenic bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 1–6

- Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, Dangler CA, Powrie F, Schauer DB** (1997), Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*, *Infect. Immun.* 65: 3126-3131
- Campbell DJ, Butcher EC** (2002), Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues, *J. Exp. Med.* 195: 135-141
- Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC** (2004), Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice, *Infect. Immun.* 72: 176-186
- Carniel E, Guilvout I, Prentice M** (1996), Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*, *J. Bacteriol.* 178: 6743-6751
- Cascales E, Christie PJ** (2003), The versatile bacterial type IV secretion systems, *Nat. Rev. Immunol.* 1:137-149
- Cavalli LL, Lederberg J, Lederberg EM** (1953), An infective factor controlling sex compatibility in *Bacterium coli*, *J. Gen. Microbiol.* 8: 89-103
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A** (1997), Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14648-14653
- Chain BM** (2003), Current issues in antigen presentation--focus on the dendritic cell, *Immunol. Lett.* 89: 237-241
- Cheng SL, Rifas L, Shen V, Tong B, Pierce G, Deuel T, Peck WA** (1987), J774A.1 macrophage cell line produces PDGF-like and non-PDGF-like growth factors for bone cells, *J. Bone Miner. Res.* 2: 467-474
- Coats SR, Pham TT, Bainbridge BW, Reife RA, Darveau RP** (2005), MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize *Escherichia coli* lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex, *J. Immunol.* 175: 4490-4498
- Coats SR, Reife RA, Bainbridge BW, Pham TT, Darveau RP** (2003), *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells, *Infect. Immun.* 71: 6799-6807
- Cohly H, Stephens J, Markhov A, Angel M, Campbell W, Ndebele K, Jenkins J** (2001), Cell culture conditions affect LPS inducibility of the inflammatory mediators in J774A.1 murine macrophages, *Immunol. Invest* 30: 1-15
- Cornelis GR** (1998), The *Yersinia* Yop virulon, a bacterial system to subvert cells of the primary host defense, *Folia Microbiol. (Praha)* 43: 253-261
- Cornelis GR** (2002), The *Yersinia* Ysc-Yop 'Type III' weaponry, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 742-754
- Covacci A, Falkow S, Berg DE, Rappuoli R** (1997), Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*?, *Trends Microbiol.* 5: 205-208

- Cover TL, Blaser MJ** (1992), Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*, *J. Biol. Chem.* 267: 10570-10575
- Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS** (2006), The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa, *J. Bacteriol.* 188: 2656-2665
- Das S, Chakraborty A, Banerjee R, Chaudhuri K** (2002), Involvement of *in vivo* induced *icmF* gene of *Vibrio cholerae* in motility, adherence to epithelial cells, and conjugation frequency, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 922-928
- Das S, Chaudhuri K** (2003), Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through in silico analysis, *In Silico. Biol.* 3: 287-300
- Davis RJ** (2000), Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell* 103: 239-252
- De Rycke J, Oswald E** (2001), Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation?, *FEMS Microbiology Letters* 203: 141-148
- Dewhirst FE, Shen Z, Scimeca MS, Stokes LN, Boumenna T, Chen T, Paster BJ, Fox JG** (2005), Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics, *J. Bacteriol.* 187: 6106-6118
- Dillard JP, Seifert HS** (2001), A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates, *Mol. Microbiol.* 41: 263-277
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J** (2004), Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms, *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 414-424
- Dominguez-Bernal G, Muller-Altrock S, Gonzalez-Zorn B, Scotti M, Herrmann P, Monzo HJ, Lacharme L, Kreft J, Vazquez-Boland JA** (2006), A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins, *Mol. Microbiol.* 59: 415-432
- Drewinko B, Romsdahl MM, Yang LY, Ahearn MJ, Trujillo JM** (1976), Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line, *Cancer Res.* 36: 467-475
- Drewinko B, Yang LY, Barlogie B, Romsdahl M, Meistrich M, Malahy MA, Giovanella B** (1978), Further biologic characteristics of a human carcinoembryonic antigen-producing colon carcinoma cell line, *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 75-83
- Duggan AE, Usmani I, Neal KR, Logan RF** (1998), Appendectomy, childhood hygiene, *Helicobacter pylori* status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study, *Gut* 43: 494-498
- Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S** (1996), Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes, *Infect. Immun.* 64: 2445-2448

- Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H** (1974), Proteinase K from *Tritirachium album* Limber, *European Journal of Biochemistry* 47: 91-97
- Erdman S, Fox JG, Dangler CA, Feldman D, Horwitz BH** (2001), Typhlocolitis in NF-kappa B-deficient mice, *J. Immunol.* 166: 1443-1447
- Erdman SE, Poutahidis T, Tomczak M, Rogers AB, Cormier K, Plank B, Horwitz BH, Fox JG** (2003), CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice, *Am. J. Pathol.* 162: 691-702
- Eskra L, Mathison A, Splitter G** (2003), Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*, *Infect. Immun.* 71: 1125-1133
- Evans ME, Feola DJ, Rapp RP** (1999), Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria, *Ann. Pharmacother.* 33: 960-967
- Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S** (1993), Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat, *Digestion* 54: 248-255
- Falush D, Kraft C, Correa P, Taylor NS, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S** (2001), Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size and minimal age, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 15056-15061
- Fiocchi C, Battisto JR, Farmer RG** (1981), Studies on isolated gut mucosal lymphocytes in inflammatory bowel disease. Detection of activated T cells and enhanced proliferation to *Staphylococcus aureus* and lipopolysaccharides, *Dig. Dis. Sci.* 26: 728-736
- Foltz CJ, Fox JG, Yan L, Shames B** (1995), Evaluation of antibiotic therapies for eradication of *Helicobacter hepaticus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1292-1294
- Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, Brinkac LM, DeBoy RT, Parker CT, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Sullivan SA, Shetty JU, Ayodeji MA, Shvartsbeyn A, Schatz MC, Badger JH, Fraser CM, Nelson KE** (2005), Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *campylobacter* species, *PLoS. Biol.* 3: e15
- Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, Ericson RL, Lau CN, Correa P, Araya JC, Roa I** (1998), Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis, *Gastroenterology* 114: 755-763
- Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJJ, Gorelick PL, Ward JM** (1994), *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice, *J. Clin. Microbiol.* 32: 1238-1245
- Fox JG, Li X, Yan L, Cahill RJ, Hurley R, Lewis R, Murphy JC** (1996a), Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of *helicobacter*-induced carcinogenesis, *Infect. Immun.* 64: 1548-1558



- Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Taylor NS, Xu S, Horwitz BH, Erdman SE** (2004), Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type *Campylobacter jejuni* but not with *C. jejuni* lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains, *Infect. Immun.* 72: 1116-1125
- Fox JG, Yan L, Shames B, Campbell J, Murphy JC, Li X** (1996b), Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*, *Infect. Immun.* 64: 3673-3681
- Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P** (2004), Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis, *Gut* 53: 987-992
- Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M, Abreu MT** (2005), Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 288: G1055-G1065
- Fukuda K, Kuroki T, Tajima Y, Tsuneoka N, Kitajima T, Matsuzaki S, Furui J, Kanematsu T** (2002), Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology in patients with and without hepatobiliary cancer, *Carcinogenesis* 23: 1927-1931
- Garner JA, Cover TL** (1996), Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells, *Infect. Immun.* 64: 4197-4203
- Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG** (2005), Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population, *World J. Gastroenterol.* 11: 681-685
- Ge Z, Feng Y, Whary MT, Nambiar PR, Xu S, Ng V, Taylor NS, Fox JG** (2005), Cytolethal distending toxin is essential for *Helicobacter hepaticus* colonization in outbred Swiss Webster mice, *Infect. Immun.* 73: 3559-3567
- Ge Z, White DA, Whary MT, Fox JG** (2001), Fluorogenic PCR-based quantitative detection of a murine pathogen, *Helicobacter hepaticus*, *J. Clin. Microbiol.* 39: 2598-2602
- Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH** (2006), Dominant-Negative TLR5 Polymorphism Reduces Adaptive Immune Response to Flagellin and negatively associates with Crohn's Disease, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 290: G1157-1163
- Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM, Jr** (2004), *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity, *J. Infect. Dis.* 189: 1914-1920
- Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA, Philipp MT** (2004), Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*, *J. Immunol.* 173: 4635-4642

- Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ** (2001), CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*, *EMBO Rep.* 2: 736-742
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES** (1989), Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively, *Int.J.Syst.Bacteriol.* 39: 397-405
- Guillemin K, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S** (2002), Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 15136-15141
- Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S** (2000), Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study, *J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr.* 31: 453-457
- Hanauer SB** (2006), Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities, *Inflamm. Bowel Dis.* 12 Suppl 1: S3-S9
- Hansen PS, Petersen SB, Varning K, Nielsen H** (2002), Additive effects of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and proteins in monocyte inflammatory responses, *Scand. J. Gastroenterol.* 37: 765-771
- Hansen-Wester I, Hensel M** (2001), Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems, *Microbes Infect.* 3: 549-559
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV** (1988), The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein, *Cell* 52: 269-279
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A** (2001), The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5, *Nature* 410: 1099-1103
- Hazell SL, Lee A, Brady L, 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: 658-663
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S** (2004), Species-specific recognition of singlestranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8, *Science* 303: 1526-1529
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* 408: 740-745
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S** (2002), Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway, *Nature Immunol.* 3: 196-200

- Hoffmann R, van Erp K, Trulzsch K, Heesemann J** (2004), Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*, *Cell. Microbiol.* 6: 377-390
- Hofreuter D, Odenbreit S, Puls J, Schwan D, Haas R** (2000), Genetic competence in *Helicobacter pylori*: mechanisms and biological implications, *Res. Microbiol.* 151: 487-491
- Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A** (2002), Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells, *J. Exp. Med.* 195: 559-570
- Huang LY, Ishii KJ, Akira S, Aliberti J, Golding B** (2005), T<sub>H</sub>1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9, *J. Immunol.* 175: 3964-3970
- Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, Lander ES, Hacohen N** (2001), The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components, *Science* 294: 870-875
- Huang Y, Fan XG, Wang ZM, Zhou JH, Tian XF, Li N** (2004), Identification of *helicobacter species* in human liver samples from patients with primary hepatocellular carcinoma, *J. Clin. Pathol.* 57: 1273-1277
- Hynes SO, Ferris JA, Szponar B, Wadstrom T, Fox JG, O'Rourke J, Larsson L, Yaquian E, Ljungh A, Clyne M, Andersen LP, Moran AP** (2004), Comparative chemical and biological characterization of the lipopolysaccharides of gastric and enterohepatic *helicobacters*, *Helicobacter.* 9: 313-323
- Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G** (1999), Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB, *J. Biol. Chem.* 274: 14560-14567
- Jenner RG, Young RA** (2005), Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling, *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 281-294
- Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL** (2001), JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells, *Mol. Microbiol.* 39: 1225-1236
- Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ** (2001), Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses, *J. Leukoc. Biol.* 69: 1036-1044
- Josenhans C, Sterzenbach T, Suerbaum S** (2004), Genomanalyse des karzinogenen Bakteriums *Helicobacter hepaticus*: Vergleich mit anderen  $\epsilon$ -Proteobakterien, *Biospektrum* 10: 26-29
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF** (1995), A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion, *J. Clin. Invest* 95: 55-65
- Kandimalla ER, Bhagat L, Zhu FG, Yu D, Cong YP, Wang D, Tang JX, Tang JY, Knetter CF, Lien E, Agrawal S** (2003), A dinucleotide motif in oligonucleotides shows potent immunomodulatory activity and overrides species-specific recognition observed with CpG motif, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 14303-14308

- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S** (2001), Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes, *J. Immunol.* 167: 5887-5894
- Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B, Su W, Pan Z, Garcia C, Hernandez V, Valdez Y, Mistry RS, Gilman RH, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Lopez-Brea M, Balakrish NG, Chowdhury A, Datta S, Shirai M, Nakazawa T, Ally R, Segal I, Wong BC, Lam SK, Olfat FO, Boren T, Engstrand L, Torres O, Schneider R, Thomas JE, Czinn S, Berg DE** (2000), Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations, *J. Bacteriol.* 182: 3210-3218
- Kett K, Rognum TO, Brandtzaeg P** (1987), Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon, *Gastroenterology* 93: 919-924
- Khamri W, Moran AP, Worku ML, Karim QN, Walker MM, Annuk H, Ferris JA, Appelmelk BJ, Eggleton P, Reid KB, Thursz MR** (2005), Variations in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein D, *Infect. Immun.* 73: 7677-7686
- Kim CC, Joyce EA, Chan K, Falkow S** (2002), Improved analytical methods for microarray-based genome-composition analysis, *Genome biology* 3: RESEARCH0065
- Kim SH, Jia W, Parreira VR, Bishop RE, Gyles CL** (2006), Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157:H7 and its association with PmrC, *Microbiology* 152: 657-666
- Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA** (2002), RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems, *Nature* 416: 194-199
- Kobayashi KS, Chamailard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA** (2005), Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract, *Science* 307: 731-734
- Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK** (1992), Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 103: 840-847
- Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE, Jr., Cieplak W, Jr.** (1997), Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*, *Mol. Microbiol.* 24: 953-963
- Kota RS, Rutledge JC, Gohil K, Kumar A, Enelow RI, Ramana CV** (2006), Regulation of gene expression in RAW 264.7 macrophage cell line by interferon-gamma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 1137-1146
- Kullberg MC, Andersen JF, Gorelick PL, Caspar P, Suerbaum S, Fox JG, Cheever AW, Jankovic D, Sher A** (2003), Induction of colitis by a CD4+ T cell clone specific for a bacterial epitope, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 15830-15835

- Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, Sher A** (2002), Bacteria-triggered CD4(+) T Regulatory Cells Suppress *Helicobacter hepaticus*-induced Colitis, *J. Exp. Med.* 196: 505-515
- Kullberg MC, Rothfuchs AG, Jankovic D, Caspar P, Wynn TA, Gorelick PL, Cheever AW, Sher A** (2001), *Helicobacter hepaticus*-induced colitis in interleukin-10-deficient mice: cytokine requirements for the induction and maintenance of intestinal inflammation, *Infect. Immun.* 69: 4232-4241
- Kullberg MC, Ward JM, Gorelick PL, Caspar P, Hieny S, Cheever A, Jankovic D, Sher A** (1998), *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism, *Infect. Immun.* 66: 5157-5166
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K** (2001), Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet* 357: 1225-1240
- Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P** (2005), Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations, *World J. Gastroenterol.* 11: 1489-1495
- Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS** (2003), F factor conjugation is a true type IV secretion system, *FEMS Microbiol. Lett.* 224: 1-15
- Lara-Tejero M, Galan JE** (2000), A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein, *Science* 290: 354-357
- Lee HJ, Choi SC, Lee MH, Oh HM, Choi EY, Choi EJ, Yun KJ, Seo GS, Kim SW, Lee JG, Han WC, Park KI, Jun CD** (2005), Increased expression of MIP-3alpha/CCL20 in peripheral blood mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and its down-regulation by sulfasalazine and glucocorticoid treatment, *Inflamm. Bowel. Dis.* 11: 1070-1079
- Lee SH, Kim KK, Rhyu IC, Koh S, Lee DS, Choi BK** (2006), Phenol/water extract of *Treponema socranskii* subsp. *socranskii* as an antagonist of Toll-like receptor 4 signalling, *Microbiology* 152: 535-546
- Lee SK, Josenhans C** (2005), *Helicobacter pylori* and the innate immune system, *Int. J. Med. Microbiol.* 295: 325-334
- Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa S-I, Suerbaum S, Josenhans C** (2003), *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5, *Microbes Infect.* 5: 1356

- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA** (1996), The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell* 86: 973-983
- Leong RW, Sung JJ** (2002), Review article: *Helicobacter* species and hepatobiliary diseases, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 1037-1045
- Lepper PM, Triantafilou M, Schumann C, Schneider EM, Triantafilou K** (2005), Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4, *Cell. Microbiol.* 7: 519-528
- Li X, Fox JG, Whary MT, Yan L, Shames B, Zhao Z** (1998), SCID/NCr mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus* develop progressive hepatitis, proliferative typhlitis, and colitis, *Infect. Immun.* 66: 5477-5484
- Liu S, Gallo DJ, Green AM, Williams DL, Gong X, Shapiro RA, Gambotto AA, Humphris EL, Vodovotz Y, Billiar TR** (2002), Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide, *Infect. Immun.* 70: 3433-3442
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM** (2004), Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease, *J. Clin. Invest* 113: 1296-1306
- Lowe TM, Eddy SR** (1997), tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence, *Nucleic Acids Res.* 25: 955-964
- Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M** (2001), Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells, *J. Biol. Chem.* 276: 44856-44864
- Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M** (2005), Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing, *Science* 307: 734-738
- Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadstrom T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarstrom L, Boren T** (2002), *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation, *Science* 297: 573-578
- Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, Wang TC, Kurt-Jones EA** (2004), Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4, *Infect. Immun.* 72: 6446-6454
- Marshall BJ, Warren JR** (1984), Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet* 1: 1311-1315

- Marteau P, Lepage P, Mangin I, Suau A, Dore J, Pochart P, Seksik P** (2004), Review article: gut flora and inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 Suppl 4: 18-23
- Martin CA, Dorf ME** (1990), Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774A.1: stimulation requirements and kinetics, *Cell. Immunol.* 128: 555-568
- Mast EE, Alter MJ, Margolis HS** (1999), Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective, *Vaccine* 17: 1730-1733
- Masui S, Sasaki T, Ishikawa H** (2000), Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods, *J. Bacteriol.* 182: 6529-6531
- Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA, Qiu S, Fujimoto Y, Kawasaki A, Foster SJ, Horie Y, Mak TW, Nunez G, Chinnaiyan AM, Fukase K, Inohara N** (2006), Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment *in vivo*, *J. Exp. Med.* 203: 203-213
- Matsuguchi T, Musikacharoen T, Johnson TR, Kraft AS, Yoshikai Y** (2001), A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines, *Mol. Cell Biol.* 21: 6999-7009
- Matsukura N, Yokomuro S, Yamada S, Tajiri T, Sundo T, Hadama T, Kamiya S, Naito Z, Fox JG** (2002), Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract, *Jpn. J. Cancer Res.* 93: 842-847
- Matsuura T, West GA, Youngman KR, Klein JS, Fiocchi C** (1993), Immune activation genes in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 104: 448-458
- Matsuyama N, Kirikae T, Kirikae F, Hashimoto M, Amanot K, Hayashi S, Hirai Y, Kubota T, Nakano M** (2001), Non-standard biological activities of lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori*, *J. Med. Microbiol.* 50: 865-869
- Maurer KJ, Ihrig MM, Rogers AB, Ng V, Bouchard G, Leonard MR, Carey MC, Fox JG** (2005), Identification of cholelithogenic enterohepatic *helicobacter* species and their role in murine cholesterol gallstone formation, *Gastroenterology* 128: 1023-1033
- Maurer KJ, Rogers AB, Ge Z, Wiese AJ, Carey MC, Fox JG** (2006), *Helicobacter pylori* and cholesterol gallstone formation in C57L/J mice: a prospective study, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 290: G175-G182
- Mayer L, Eisenhardt D** (1990), Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease, *J. Clin. Invest* 86: 1255-1260
- Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD** (2003), The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells, *J. Immunol.* 170: 5165-5175

- Mehta NS, Benoit S, Mysore JV, Sousa RS, Maier RJ** (2005), *Helicobacter hepaticus* hydrogenase mutants are deficient in hydrogen-supported amino acid uptake and in causing liver lesions in A/J mice, *Infect. Immun.* 73: 5311-5318
- Mendenhall CL, Chedid A, Kromme C** (1984), Altered proline uptake by mouse liver cells after chronic exposure to ethanol and its metabolites, *Gut* 25: 138-144
- Merchant M, Wang X, Kamps C, Rosengren R, Morrison V, Safe S** (1992), Mechanism of benzo[a]pyrene-induced Cyp1a-1 gene expression in mouse Hepa 1c1c7 cells: role of the nuclear 6 s and 4 s proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* 292: 250-257
- Metsa-Ketela M, Halo L, Munukka E, Hakala J, Mantsala P, Ylihonko K** (2002), Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various streptomyces species, *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4472-4479
- Mills SD, Kurjanczyk LA, Penner JL** (1992), Antigenicity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides, *J. Clin. Microbiol.* 30: 3175-3180
- Mobley HL** (2001), *Helicobacter pylori* urease, in *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*, ed. Achtman M and Suerbaum S, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- Morrison DC, Kline LF** (1977), Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS), *J. Immunol.* 118: 362-368
- Mosmann TR, Coffman RL** (1989), T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173
- Murray PJ** (2005), NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers?, *Curr. Opin. Immunol.* 17: 352-358
- Myles MH, Livingston RS, Livingston BA, Criley JM, Franklin CL** (2003), Analysis of gene expression in ceca of *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice before and after development of typhlitis, *Infect. Immun.* 71: 3885-3893
- Nakagawa I, Suzuki M, Imura N, Naganuma A** (1995), Enhancement of paraquat toxicity by glutathione depletion in mice *in vivo* and *in vitro*, *J. Toxicol. Sci.* 20: 557-564
- Navarro C, Wu LF, Mandrand-Berthelot MA** (1993), The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel, *Mol. Microbiol.* 9: 1181-1191
- Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Werts C, Boneca IG, Jehanno M, van der Meer JW, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Philpott DJ, Dharancy S, Girardin SE** (2005b), The frameshift mutation in Nod2 results in unresponsiveness not only to Nod2- but also Nod1-activating peptidoglycan agonists, *J. Biol. Chem.* 280: 35859-35867
- Netea MG, van der Meer JW, Suttmuller RP, Adema GJ, Kullberg BJ** (2005a), From the T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3991-3996
- Nilsson I, Lindgren S, Eriksson S, Wadstrom T** (2000), Serum antibodies to *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* in patients with chronic liver disease, *Gut* 46: 410-414



- Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Giudice GD, Montecucco C** (2003), The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils, *European Journal of Immunology* 33: 840-849
- Novak KF, Dougherty B, Pelaez M** (2001), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* harbours type IV secretion system genes on a plasmid and in the chromosome, *Microbiology* 147: 3027–3035
- Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R** (2000), Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion, *Science* 287: 1497-1500
- Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R** (1999), Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue, *Mol. Microbiol.* 31: 1537-1548
- Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, Hoffmann A, Subramaniam S, David M, Rosenfeld MG, Glass CK** (2005), Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors, *Cell* 122: 707-721
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH** (2001a), A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* 411: 603-606
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G** (2001b), Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB, *J. Biol. Chem.* 276: 4812-4818
- Ohashi N, Zhi N, Lin Q, Rikihisa Y** (2002), Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents, *Infect. Immun.* 70: 2128–2138
- Oliveira AG, das Gracas Pimenta SM, Rocha GA, Rocha AM, Santos A, Dani R, Marinho FP, Moreira LS, Lourdes Abreu FM, Moura SB, Castro LP, Queiroz DM** (2004), *Helicobacter* species in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis, *J. Clin. Microbiol.* 42: 384-386
- Olson JW, Maier RJ** (2002), Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*, *Science* 298: 1788-1790
- Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, Nolte IM, Oosterom E, van Dullemen HM, van der LK, te Meerman GJ, van der SG, Kleibeuker JH, Jansen PL** (2005), Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease, *Inflamm. Bowel. Dis.* 11: 567-575
- Opitz B, Puschel A, Beermann W, Hocke AC, Forster S, Schmeck B, van L, V, Chakraborty T, Suttorp N, Hippenstiel S** (2006), *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells, *J. Immunol.* 176: 484-490
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A** (2000), The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13766–13771

- Pahl HL** (1999), Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene* 18: 6853-6866
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG** (2000), The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences, *Nature* 403: 665-668
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK** (1991), *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 325: 1127-1131
- Pearson WR** (2000), Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package, *Methods Mol.Biol.* 132: 185-219
- Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang XZ, Kopecko DJ, Bourgeois AL, Fauchere JL, Blaser MJ** (1998), Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice, *Infect. Immun.* 66: 938-943
- Pena JA, Rogers AB, Ge Z, Ng V, Li SY, Fox JG, Versalovic J** (2005), Probiotic *Lactobacillus* spp. diminish *Helicobacter hepaticus*-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice, *Infect. Immun.* 73: 912-920
- Piodi LP, Bardella M, Rocchia C, Cesana BM, Baldassarri A, Quatrini M** (2003), Possible protective effect of 5-aminosalicylic acid on *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease, *J. Clin. Gastroenterol.* 36: 22-25
- Podolsky DK** (2002), Inflammatory bowel disease, *N. Engl. J. Med.* 347: 417-429
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B** (1998), Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene, *Science* 282: 2085–2088
- Poly F, Threadgill D, Stintzi A** (2004), Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons, *J. Bacteriol.* 186: 4781-4795
- Portnoy DA** (2005), Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens, *Curr. Opin. Immunol.* 17: 25-28
- Purcell M, Shuman HA** (1998), The *Legionella pneumophila* *icmGCDJBF* genes are required for killing of human macrophages, *Infect. Immun.* 66: 2245-2255
- Putsep K, Branden CI, Boman HG, Normark S** (1999), Antibacterial peptide from *H. pylori*, *Nature* 398: 671-672
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R** (2004), Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis, *Cell* 118: 229-241

- Ralph P, Nakoinz I** (1974), Lipopolysaccharides inhibit lymphosarcoma cells of bone marrow origin, *Nature* 249: 49-51
- Ralph P, Nakoinz I** (1977), Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture, *Cancer Res.* 37: 546-550
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P, Duclos B** (1996), Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease, *Gut* 39: 684-689
- Riley LK, Franklin CL, Hook RR, Jr., Besch Williford C** (1996), Identification of murine *helicobacters* by PCR and restriction enzyme analyses, *J. Clin. Microbiol.* 34: 942-946
- Russell RJ, Haines DC, Anver MR, Battles JK, Gorelick PL, Blumenauer LL, Gonda MA, Ward JM** (1995), Use of antibiotics to prevent hepatitis and typhlitis in male scid mice spontaneously infected with *Helicobacter hepaticus*, *Lab. Anim. Sci.* 45: 373-378
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T** (2001), Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance, *Immunol. Rev.* 182: 18-32
- Sanchez-Campillo M, Chicano A, Torio A, Martin-Orozco E, Gamiz P, Hernandez-Caselles T, Garcia-Penarrubia P** (2004), Implication of CpG-ODN and reactive oxygen species in the inhibition of intracellular growth of *Salmonella typhimurium* in hepatocytes, *Microbes. Infect.* 6: 813-820
- Sauvonnet N, Pradet-Balade B, Garcia-Sanz JA, Cornelis GR** (2002), Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors, *J. Biol. Chem.* 277: 25133-25142
- Schlumberger MC, Hardt WD** (2005), Triggered phagocytosis by *Salmonella*: bacterial molecular mimicry of RhoGTPase activation/deactivation, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 291: 29-42
- Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Muller-Hermelink HK, Eck M** (2004a), Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection, *Clin. Exp. Immunol.* 136: 521-526
- Schmausser B, Josenhans C, Endrich S, Suerbaum S, Sitaru C, Andrulis M, Brandlein S, Rieckmann P, Muller-Hermelink HK, Eck M** (2004b), Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* infection?, *Infect. Immun.* 72: 6773-6779
- Schmitz F, Mages J, Heit A, Lang R, Wagner H** (2004), Transcriptional activation induced in macrophages by Toll-like receptor (TLR) ligands: from expression profiling to a model of TLR signaling, *European Journal of Immunology* 34: 2863-2873
- Schreiber J, Jenner RG, Murray HL, Gerber GK, Gifford DK, Young RA** (2006), Coordinated binding of NF- $\kappa$ B family members in the response of human cells to lipopolysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*

- Schroder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zahringer U, Gobel UB, Schumann RR** (2000), Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids, *J. Immunol.* 165: 2683-2693
- Schulein R, Dehio C** (2002). The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection, *Mol. Microbiol.* 46: 1053–1067
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ** (1999), Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2, *J. Biol. Chem.* 274: 17406–17409
- Segal ED, Falkow S, Tompkins LS** (1996), *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 1259-1264
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J** (2003), Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon, *Gut* 52: 237-242
- Shames B, Fox JG, Dewhirst F, Yan L, Shen Z, Taylor NS** (1995), Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay, *J. Clin. Microbiol.* 33: 2968-2972
- Shen Z, Schauer DB, Mobley HL, Fox JG** (1998), Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay using the nucleotide sequence of the *Helicobacter hepaticus* urease structural genes *ureAB*, *J. Clin. Microbiol.* 36: 2447-2453
- Sitaraman SV, Klapproth JM, Moore DA, III, Landers C, Targan S, Williams IR, Gewirtz AT** (2005), Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: G403-G406
- Smith MA, Finel M, Korolik V, Mendz GL** (2000), Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*, *Arch. Microbiol.* 174: 1-10
- Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB** (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: 32552-32560
- Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH** (1990), *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells, *Infect. Immun.* 58: 1992-1994
- Solnick JV, Schauer DB** (2001), Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases, *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59-97
- Stinear TP, Mve-Obiang A, Small PL, Frigui W, Pryor MJ, Brosch R, Jenkin GA, Johnson PD, Davies JK, Lee RE, Adusumilli S, Garnier T, Haydock SF, Leadlay PF, Cole ST** (2004), Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 1345-1349

- Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T** (2006), Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2, *Nat. Rev. Immunol.* 6: 9-20
- Suerbaum S, Sterzenbach T, Josenhans C** (2004), Comparative Genome Analysis of *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*, *Nova Acta Leopoldina NF 88* 333: 151-160
- Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droege M, Fartmann B, Fischer H-P, Ge Z, Hörster A, Holland R, Klein K, König J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen Z, Weber J, Frosch M, Fox JG** (2003), The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 7901-7906
- Suerbaum S, Lohrengel M, Sonnevend A, Ruberg F, Kist M** (2001), Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*, *J. Bacteriol.* 183: 2553-2559
- Suerbaum S, Maynard Smith J, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, Achtman M** (1998), Free recombination within *Helicobacter pylori*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 12619-12624
- Suerbaum S, Michetti P** (2002), *Helicobacter pylori* infection, *N. Engl. J. Med.* 347: 1175-1186
- Sundstrom C, Nilsson K** (1976), Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937), *Int. J. Cancer* 17: 565-577
- Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, Lin SN, Toyokawa T, Okada H, Shiratori Y, Oguma K** (2004), *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells, *Microbiology* 150: 3913-3922
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S** (1999), Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive cell wall components, *Immunity* 11: 443-451
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S** (2001), Discrimination of bacterial lipopeptides by Toll-like receptor 6, *Int. Immunol.* 13: 933-940
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S** (2002), Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins, *J. Immunol.* 169: 10-14
- Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, Vasiliauskas E, Elson CO, Hershberg RM** (2005), Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease, *Gastroenterology* 128: 2020-2028
- Taylor NS, Fox JG, Yan L** (1995), In-vitro hepatotoxic factor in *Helicobacter hepaticus*, *H. pylori* and other *Helicobacter* species, *J. Med. Microbiol.* 42: 48-52
- Tolia V, Nilsson HO, Boyer K, Wuerth A, Al Soud WA, Rabah R, Wadstrom T** (2004), Detection of *Helicobacter ganmani*-like 16S rDNA in pediatric liver tissue, *Helicobacter*. 9: 460-468

- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC** (1997), The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature* 388: 539-547
- Tomczak MF, Erdman SE, Poutahidis T, Rogers AB, Holcombe H, Plank B, Fox JG, Horwitz BH** (2003), NF-kappa B is required within the innate immune system to inhibit microflora-induced colitis and expression of IL-12 p40, *J. Immunol.* 171: 1484-1492
- Torok AM, Bouton AH, Goldberg JB** (2005), *Helicobacter pylori* induces interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and -independent pathways, *Infect. Immun.* 73: 1523-1531
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C** (2004), Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis, *Clin. Immunol.* 112: 85-91
- Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M, Anzano M, Rieman D, Hoffstein S, Li DJ** (1988), Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines, *Int. J. Cancer* 41: 287-296
- Tran X, Whittimore JD, Wyrick PB, McGrath SC, Cotter RJ, Trent MS** (2006), The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin, *J. Bact.* 188:4531-4541
- Uthoff SM, Crawford NP, Eichenberger MR, Hamilton CJ, Petras RE, Martin ER, Galandiuk S** (2002), Association of ulcerative colitis with the inflammatory bowel disease susceptibility locus IBD2 in non-Jewish Caucasians and evidence of genetic heterogeneity among racial and ethnic populations with Crohn disease, *Am. J. Med. Genet.* 113: 242-249
- Vazquez-Boland JA, Dominguez-Bernal G, Gonzalez-Zorn B, Kreft J, Goebel W** (2001), Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*, *Microbes. Infect.* 3: 571-584
- Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, Peeters M, Vlietinck R** (2004), Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis, *Gut* 53: 980-986
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL** (2004), Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island, *Nat. Immunol.* 5: 1166-1174
- Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR** (1998), Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*, *Science* 279: 873-876

- Vorobjova T, Nilsson I, Terjajev S, Granholm M, Lyyra M, Porkka T, Prukk T, Salupere R, Maaros HI, Wadstrom T, Uibo R** (2006), Serum antibodies to enterohepatic *Helicobacter spp.* in patients with chronic liver diseases and in a population with high prevalence of *H. pylori* infection, *Dig. Liver Dis.* 38: 171-176
- Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins MJ, Jr., Gorelick PL, Nagashima K, Gonda MA, Gilden RV, Tully JG, Russell RJ, Benveniste RE, Paster BJ, Dewhirst FE, Donovan JC, Anderson LM, Rice JM** (1994a), Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species, *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 1222-1227
- Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE** (1994b), Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*, *Am. J. Pathol.* 145: 959-968
- Ward JM, Anver MR, Haines DC, Melhorn JM, Gorelick P, Yan L, Fox JG** (1996), Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus*, *Lab. Anim. Sci.* 46: 15-20
- Warren JR, Marshall B** (1983), Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* 1: 1273-1275
- Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G** (2000), A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization, *Science* 287: 482-485
- Weiss DS, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A, Moreno E** (2005), MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*, *Infect. Immun.* 73: 5137-5143
- West AP, Dancho BA, Mizel SB** (2005), Gangliosides inhibit flagellin signaling in the absence of an effect on flagellin binding to toll-like receptor 5, *J. Biol. Chem.* 280: 9482-9488
- Westphal O, Jann K** (1965), Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure., *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5: 83-91
- Whary MT, Fox JG** (2004), Natural and experimental *Helicobacter* infections, *Comp. Med.* 54: 128-158
- Whary MT, Morgan TJ, Dangler CA, Gaudes KJ, Taylor NS, Fox JG** (1998), Chronic active hepatitis induced by *Helicobacter hepaticus* in the A/JCr mouse is associated with a T<sub>H</sub>1 cell-mediated immune response, *Infect. Immun.* 66: 3142-3148
- Williams SG, Varcoe LT, Attridge SR, Manning PA** (1996), *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA, *Infect. Immun.* 64: 283-289
- Young VB, Knox KA, Pratt JS, Cortez JS, Mansfield LS, Rogers AB, Fox JG, Schauer DB** (2004), *In vitro* and *in vivo* characterization of *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin mutants, *Infect. Immun.* 72: 2521-2527
- Young VB, Knox KA, Schauer DB** (2000), Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*, *Infect. Immun.* 68: 184-191

- Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, Narasimhan S, Kane DW, Reinhold WC, Lababidi S, Bussey KJ, Riss J, Barrett JC, Weinstein JN** (2003), GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data, *Genome Biol.* 4: R28
- Zhang G, Ghosh S** (2002), Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip, *J. Biol. Chem.* 277: 7059-7065
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S** (2004), A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria, *Science* 303: 1522–1526
- Zhou Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CRH** (2001), Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation, *J. Biol. Chem.* 276: 43111-43121
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand SK, Winans SC** (2000), The bases of crown gall tumorigenesis, *J. Bacteriol.* 182: 3885–3895
- Zusman T, Yerushalmi G, Segal G** (2003), Functional similarities between the *icm/dot* pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.* 71: 3714–3723



## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATCC	Amerikanische Bakterien-Stammsammlung
BHI	Brain-Heart-Infusion-Medium
BMDM	Knochenmarksmakrophagen („ <u>b</u> one <u>m</u> arrow <u>d</u> erived <u>m</u> acrophages“)
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	`copy`-DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
Cm	Chloramphenicol
CU	Colitis Ulcerosa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dd	doppelt destilliert
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	`et alteri` (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
IAHP	„IcmF associated homologous proteins“
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
J	Joule
kB	Kilobasenpaare (1 kB=1000 Bp)
kDa	Kilodalton
KF1B	N-Myristyl-(C14)-γ-D-glutamyl- <i>meso</i> -diaminopimelinsäure
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	molar
m	milli- (10 <sup>-3</sup> ); Meter
MC	Morbus Crohn
μ	mikro- (10 <sup>-6</sup> )
min	Minute
mRNA	`messenger`-RNA
n	nano-(10 <sup>-9</sup> )
GMDP	N-Acetyl-D-Glucosaminyl-(β 1,4)-N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamine
O.D. <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
Ω	Ohm
ORF	offener Leserahmen(`open reading frame`)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAMP	„Pathogen associated molecular pattern“
PCR	Polymerasekettenreaktion (p <u>o</u> lymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PMA	Phorbolmyristatacetat
POX	Peroxidase
pH	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur; reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
sp.	Spezies (sg.)
ssp.	Spezies (pl.)
T3SS	TypIII-Sekretionssystem
T4SS	TypIV-Sekretionssystem
Taq-Polymerase	Termostabile Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TLR	„Toll-like receptor“
U	Unit
u. a.	unter anderem
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs.	`versus`, gegen
v/v	`volume per volume`, Volumenanteile
W	Watt
w/v	`weight per volume`, Gewichts- pro Volumenanteile
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-b-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Torsten Sterzenbach  
Geburtsdatum: 05.12.1976  
Geburtsort: Herbolzheim  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1983-1987: Ferdinand-Ruska-Schule, Grafenhausen  
1987-1996: Städtisches Gymnasium Ettenheim  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

1996-1998: Studium an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau mit der Fachrichtung Biologie/Diplom  
1998: Vordiplom in der Fachrichtung Biologie  
1998-2001: Studium an der Ecole Supérieure de Biotechnologie in Strasbourg, Frankreich mit der Fachrichtung Biotechnologie/ Diplom bzw. Diplôme d'Ingénieur en Biotechnologie  
2001: Diplomarbeit bei New England Biolabs in Beverly MA, USA in der Arbeitsgruppe von Ming-Qun Xu mit dem Thema „Identification of Trp<sup>687</sup> in *Bacillus circulans* chitinase A1 chitin binding domain as the essential residue in binding activity and engineering of an elutable chitin binding domain“  
2001: Verteidigung der Diplomarbeit und Diplomprüfung  
2002-2003: Assoziiertes Mitglied des europäischen Graduiertenkollegs der Universitäten Würzburg und Umeå (Schweden) „Gene Regulation in and by Microbial Pathogens“, koordiniert von Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

### Promotion:

2001-2006: Promotion am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (2001-2003) und am Insitut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover (2003-2006) bei Prof. Dr. Sebastian Suerbaum und PD Dr. Christine Josenhans mit dem Thema „Untersuchungen zur Pathogenität von *Helicobacter hepaticus*: genomische und funktionelle Aspekte“

Würzburg, den.....

Torsten Sterzenbach

.....

### 7.3 Publikationsliste

1. **Ferrandon S, Sterzenbach T, Mersha FB, Xu MQ (2003).** A single surface tryptophan in the chitin-binding domain from *Bacillus circulans* chitinase A1 plays a pivotal role in binding chitin and can be modified to create an elutable affinity tag, *Biochim. Biophys. Acta.* 1621: 31-40.
2. **Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droege M, Fartmann B, Fischer HP, Ge Z, Hörster A, Holland R, Klein K, König J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen Z, Weber J, Frosch M, Fox JG (2003).** The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 7901-7906.
3. **Suerbaum S, Sterzenbach T, Josenhans C (2004).** Comparative Genome Analysis of *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*, *Nova Acta Leopoldina NF* 88 333: 151-160.
4. **Josenhans C, Sterzenbach T, Suerbaum S (2004).** Genomanalyse des karzinogenen Bakteriums *Helicobacter hepaticus*: Vergleich mit anderen  $\epsilon$ -Proteobakterien, *Biospektrum* 10: 26-29.
5. **Boutin SR, Shen Z, Rogers AB, Feng Y, Ge Z, Xu S, Sterzenbach T, Josenhans C, Schauer DB, Suerbaum S, Fox JG (2005).** Different *Helicobacter hepaticus* strains with variable genomic content induce various degrees of hepatitis, *Infect. Immun.* 73: 8449-8452.
6. **Sterzenbach T, Lee SK, Brenneke B, von Goetz F, Schauer DB, Fox JG, Josenhans C, Suerbaum S (2006).** Inhibitory effect of enterohepatic *Helicobacter hepaticus* on innate immune responses of mouse intestinal epithelial cells, *Infect. Immun.*, in Revision.

#### **Anmerkung:**

Publikationen 2-6 wurden im Laufe der Dissertation angefertigt und sind relevant für diese Arbeit.

## Danksagung

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Suerbaum, für die Möglichkeit, eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ich danke besonders für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die immerwährende Unterstützung und Betreuung während dem Fortgang der Arbeit.

Der gleiche Dank gilt PD Dr. Christine Josenhans für die hervorragende Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und Begeisterung für meine Arbeit.

Ich danke Christine Josenhans und Sebastian Suerbaum für die Möglichkeit, ein breites Methodenspektrum und selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten im Laufe meiner Doktorarbeit zu erlernen. Ebenso danke ich für die Möglichkeit, an mehreren nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu können.

Ich bedanke mich auch herzlichst bei Prof. Dr. Jürgen Kreft für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit.

Mein Dank gilt aber auch unseren Kooperationspartnern am MIT, insbesondere Prof. James G. Fox und David B. Schauer, bei MWG Biotech, insbesondere Dr. Bernd Drescher und Dr. Andrea Hörster und bei GeneData, insbesondere Dr. Hans-Peter Fischer und Dr. Jochen König. Ich danke aber auch allen anderen Kooperationspartnern, die hier nicht namentlich aufgeführt sind.

Mein besonderer Dank gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Heli-Arbeitsgruppen in Würzburg und Hannover für die tolle Kollegialität, die tolle Arbeitsatmosphäre und Unterstützung während meiner Arbeit. Genauso möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern in Würzburg und Hannover bedanken.

Schlussendlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meiner Familie für die Ermöglichung meines Studiums und die immerwährende Unterstützung.