

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Interaktion des Cag-TypIV-Sekretionssystems von *Helicobacter pylori* mit
 β 1-Integrin zur Untersuchung des Translokationsmechanismus des
Cytotoxin-assoziierten Antigens (CagA)

Claudia S. U. Ertl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl
2. Univ.-Prof. Dr. R. Haas (Ludwig-Maximilians-Universität,
München)

Diese Dissertation wurde am 10.11.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 07.03.2012 angenommen.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

(Unterschrift)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Haas angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind oder werden veröffentlicht unter folgenden Titeln:

Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, Ertl C, Weiss E, Kapp U, Rohde M, Pirch T, Jung K, Retta SF, Terradot L, Fischer W, and Haas R (2009)

Helicobacter pylori type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGDindependent manner. *PLoS Pathog*, **5**, e1000684.

Ertl C, Jimenez-Soto LF and Rainer Haas

Mapping of CagA, Cagl and CagY protein binding regions to distinct domains of the beta1 integrin extracellular part

In Vorbereitung

Belogolova E*, Bauer B*, Asakura H, Pompaiah M*, Brinkmann V, Ertl C, Bartfeld S, Nechitaylo T, Haas R, Machuy N, Salama N, Churin Y and Meyer T

Helicobacter pylori HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor

In Vorbereitung

Weitere Publikationen, die nicht in dieser Arbeit enthalten sind:

Jimenez-Soto LF, Rohrer S, Jain U, Ertl C, Sewald X and Haas R

Effects of cholesterol on *Helicobacter pylori* growth and virulence properties *in vitro*.

Helicobacter

In Druck

Ertl C, Lukowski R, Sigl K, Schlossmann J, Hofmann F, Wegener JW. (2011)

Kinetics of relaxation by cGMP/cGKI signaling in fundus smooth muscle. *Eur J Pharmacol*.

16;670(1):266-71.

* Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	_____	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	_____	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	_____	IX
TABELLENVERZEICHNIS	_____	XI
<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1.	Entdeckung und Epidemiologie von <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2.	Pathogenese <i>H. pylori</i>-assoziierter Erkrankungen	2
1.3.	Pathogenitätsfaktoren von <i>H. pylori</i>	4
1.3.1	Vermittlung der Adhäsion von <i>H. pylori</i> an Epithelzellen	5
1.3.2	Das vakuolisierende Cytotoxin VacA und die Immunantwort des Wirts	7
1.3.3	Die <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel	8
1.3.3.1	Auswirkungen des Cag-TypIV-Sekretionssystems auf die eukaryotische Zelle	9
1.3.3.2	Die Bedeutung von CagA in der eukaryotischen Zelle	10
1.4.	Typ IV Sekretionssysteme in <i>H. pylori</i>	13
1.4.1	Das Cag-TypIV-Sekretionssystem	14
1.4.1.1	Strukturelle Anordnung der Proteine des Cag-TypIV-Sekretionssystems	15
1.4.1.2	CagA als Substrat für das Cag-TypIV-Sekretionssystem	17
1.4.1.3	Mechanismen der Translokation von CagA über die eukaryotische Membran	18
1.5.	Ziele dieser Arbeit	20
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>21</u>
2.1.	Material	21
2.1.1	Bakterienstämme	21
2.1.1.1	Bakterienstämme von <i>Escherichia coli</i>	21
2.1.1.2	Bakterienstämme von <i>Helicobacter pylori</i>	21
2.1.2	Hefestämme	22
2.1.2.1	Hefestämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.1.3	Zelllinien	24
2.1.4	Plasmide und Vektoren	24
2.1.5	Oligonukleotide	27
2.1.6	Antikörper	30
2.1.6.1	Primäre Antikörper	30

2.1.6.2	Sekundäre Antikörper _____	31
2.1.7	Nährmedien _____	32
2.1.7.1	Nährmedien für Bakterien _____	32
2.1.8	Hemmstoffe und Medienzusätze _____	33
2.1.9	Zellkulturmedien und –puffer _____	33
2.1.10	Enzyme und Proteine _____	34
2.1.11	Molekulargewichtsmarker _____	35
2.1.12	Chemikalien und Reagenzien _____	35
2.1.13	Kommerziell erwerbbaare Kits _____	36
2.1.14	Hilfsmittel _____	36
2.1.15	Apparaturen und Geräte _____	37
2.2.	Methoden _____	38
2.2.1	Mikrobiologische Methoden _____	38
2.2.1.1	Arbeiten mit Bakterien _____	38
2.2.1.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i> _____	38
2.2.1.1.2	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Helicobacter pylori</i> _____	38
2.2.1.1.3	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien _____	39
2.2.1.1.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (Hanahan et al., 1983) _____	39
2.2.1.1.5	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (Sambrook et al., 1989) _____	39
2.2.1.1.6	Transformation von <i>E. coli</i> TOP10 _____	40
2.2.1.1.7	Transformation von <i>H. pylori</i> _____	40
2.2.1.1.8	Elektroporation von <i>H. pylori</i> modifiziert nach Segal und Tompkins (Segal and Tompkins, 1993) _____	40
2.2.1.1.9	Konjugation von Plasmiden zwischen <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i> _____	41
2.2.1.1.10	Immunfluoreszenzfärbung mit <i>H. pylori</i> _____	41
2.2.1.1.11	Isolierung von Membranvesikeln von <i>H. pylori</i> _____	42
2.2.1.2	Arbeiten mit Hefen _____	42
2.2.1.2.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	42
2.2.1.2.2	Bestimmung der optischen Dichte von Hefen _____	43
2.2.1.2.3	Herstellung kompetenter Hefen _____	43
2.2.1.2.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> _____	43
2.2.1.2.5	Herstellung diploider Hefestämme nach Uetz (Uetz et al., 2006) _____	43
2.2.1.2.6	Protein-Interaktionstest in <i>S. cerevisiae</i> nach Busler (Busler et al., 2006) _____	44
2.2.2	Genetische und molekularbiologische Methoden _____	45
2.2.2.1	Isolierung von DNS _____	45
2.2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> nach Holmes und Quigley (Holmes and Quigley, 1981) _____	45
2.2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit _____	45
2.2.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>H. pylori</i> _____	45
2.2.2.1.4	Isolierung chromosomaler DNS aus <i>H. pylori</i> _____	46
2.2.2.2	Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNS nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) _____	46

2.2.2.3	Extraktion von DNS aus Agarosegelen	46
2.2.2.4	Aufreinigung von DNS aus enzymatischen Reaktionen	47
2.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.2.6	Kolonie-PCR nach Sambrook (Sambrook et al., 1989)	48
2.2.2.7	Restriktion von dsDNS	48
2.2.2.8	Dephosphorylierung	49
2.2.2.9	Ligation	49
2.2.2.10	DNS-Sequenzierung	49
2.2.2.11	Rekombinatorische Klonierung nach Gateway®-Technologie	49
2.2.2.11.1	„nested“-PCR	50
2.2.2.11.2	BPClonase™-Reaktion	52
2.2.2.11.3	LRClonase™-Reaktion	52
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	52
2.2.3.1	Herstellung bakterieller Zelllysate	52
2.2.3.2	Lyse von Zellmaterial zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts	53
2.2.3.3	Lyse von <i>H. pylori</i> für Proteinpräzipitationen	53
2.2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	53
2.2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.2.3.6	Detektion von Proteinen im Polyacrylamidgel	54
2.2.3.7	Western Blot	54
2.2.3.7.1	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	54
2.2.3.7.2	Detektion von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern	55
2.2.3.7.3	Entfernung von Immunkomplexen von PVDF-Membranen	55
2.2.3.8	Produktion und Aufreinigung von <i>His-Tag</i> markierten Proteinen	56
2.2.3.9	Proteinpräzipitation mit magnetischen Kügelchen	57
2.2.4	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	57
2.2.4.1	Kultivierung adhärenter Zellen	57
2.2.4.2	Kultivierung nicht-adhärenter Zellen	58
2.2.4.3	Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen zu dHL-60 Zellen	58
2.2.4.4	Kryokonservierung von Zellen	58
2.2.4.5	Auftauen von Zellen	58
2.2.4.6	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer	59
2.2.4.7	Transfektion von HEK-293 Zellen	59
2.2.4.8	Isolierung peripherer Blutmonozyten (PBLC) aus humanem Blut	59
2.2.4.9	Infektionsexperimente mit <i>H. pylori</i> : <i>Phosphotyrosin Assay</i>	60
2.2.4.10	Inhibition der CagA-Translokation während Infektionsexperimenten mit <i>H. pylori</i>	60
2.2.4.11	Bindung von <i>His-Tag</i> markierten Proteinen an Zellen	61
2.2.4.12	Bestimmung adhärenter <i>H. pylori</i> auf AGS Zellen	62
2.2.4.13	<i>Renilla Luciferase Assay</i>	62
2.2.5	Statistische Auswertung	63

3	<u>ERGEBNISSE</u>	64
3.1.	Etablierung eines <i>Yeast Two Hybrid Assays</i> zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen von CagA, CagY und CagI mit den Domänen des β1-Integrins	64
3.1.1	Klonierung der β 1-Integrindomänen in <i>Yeast Two Hybrid</i> -Vektoren	65
3.1.2	Paarung haploider Hefezellen zur Gewinnung diploider Hefen	66
3.1.3	Wachstumstests zur Untersuchung der Interaktion von β 1 Integrindomänen mit CagA, CagI und CagY	68
3.1.4	Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktionen aus dem <i>Yeast Two Hybrid Assay</i> durch den <i>Renilla Luciferase Assay</i>	71
3.1.5	Verifizierung der Bindungsstellen von CagA, CagI und CagY innerhalb des β 1-Integrins	75
3.2.	Identifizierung der Bindungsregion des CagA-Proteins für das β1-Integrin	78
3.2.1	Eingrenzung des N-terminalen Bereichs von CagA	78
3.2.2	Auswirkungen der potenziellen CagA - β 1-Integrin Binderegion auf die Infektion von AGS Zellen mit <i>H. pylori</i>	83
3.2.3	Effekt von His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ auf die Bindung des 9EG7 Antikörpers an β 1-Integrine	88
3.3.	Untersuchungen zu möglichen CagA-Translokationsmechanismen, die unabhängig vom Cag-TypIV-Sekretionssystem sind	90
3.3.1	Lokalisierung von CagA auf der Oberfläche von Cag-TypIV-Sekretionssystem-defekten Mutanten	91
3.3.2	Nachweis von CagA in Membranvesikeln	93
3.3.2.1	Untersuchung des Potenzials zur CagA-Translokation durch Membranvesikel	93
3.3.3	Untersuchung möglicher CagA-Translokationsmechanismen hinsichtlich der CagA-Prozessierung	96
3.4.	Untersuchungen zur Beteiligung von HopQ an der CagA-Translokation	98
3.4.1	Herstellung der <i>hopQ</i> -Deletionsmutanten im Stamm P12	99
3.4.2	Untersuchung der CagA-Translokationseffizienz von <i>H. pylori</i> P12 Δ <i>hopQ</i>	101
3.4.2.1	Die Effizienz der CagA Translokation ist abhängig von der Expression des <i>hopQ</i> -Gens	102
3.4.2.1.1	Charakterisierung einer <i>hopQ</i> -vermittelten Adhärenz in Abhängigkeit von β 1-Integrin an der Zelloberfläche	103
3.4.2.1.2	Untersuchungen zur Beteiligung weiterer Adhäsine von <i>H. pylori</i> P12 an der CagA-Translokation	104

3.4.2.2	Die Komplementation des <i>hopQ</i> -Gens rekonstituiert die Effizienz der CagA-Translokation in P12 Δ <i>hopQ</i> _____	109
3.4.2.2.1	Klonierung von <i>hopQ</i> in den <i>E. coli</i> / <i>H. pylori</i> Shuttle-Vektor pIB6 _____	110
3.4.2.2.2	Expression des Gens HA- <i>hopQ</i> in den <i>H. pylori</i> Stämmen P76 und P12 Δ <i>hopQ</i> _____	112
3.4.2.2.3	CagA Translokationsverhalten der komplementierten <i>H. pylori</i> -Stämme P12 Δ <i>hopQ</i> [<i>hopQ</i>] _____	113
4	<u>DISKUSSION</u> _____	115
4.1.	Integrine als Rezeptoren für pathogene Mikroorganismen _____	115
4.1.1	CagAn, CagYc und CagI nutzen unterschiedliche Domänen des β 1-Integrins zur Bindung _____	116
4.1.1.1	CagA-Translokation durch molekulare Konformationsänderung des β 1-Integrins? ____	119
4.1.1.1.1	Weitere mögliche Modelle zum CagA-Translokationsmechanismus _____	122
4.1.2	His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ hemmt die CagA-Translokation in einem kompetitiven Mechanismus _____	123
4.2.	Alternative Mechanismen für die CagA-Translokation _____	125
4.2.1	Membranvesikel als Transportmittel für CagA in die Wirtszelle? _____	126
4.2.2	Die Translokation von prozessiertem CagA ist abhängig vom Cag-T4SS ____	127
4.3.	Die Bedeutung äußerer Membranproteine an der <i>H. pylori</i>-Pathogenese _____	128
4.3.1	Äußere Membranproteine sind in die CagA-Translokation involviert _____	129
4.3.1.1	Mehrere äußere Membranproteine potenzieren das CagA-Translokationspotenzial ____	130
4.3.2	Signaltransduktion durch äußere Membranproteine zur Rekrutierung von β 1-Integrinen? _____	132
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> _____	135
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u> _____	137

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A	Ampere
α	anti
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^R	Ampicillinresistenz
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
aTC	anhydro-Tetracyclin
ATP	Adenosintriphosphat
BB	engl.: „ <i>brucella broth</i> “; Brucella Medium
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
<i>cag</i>	engl.: „ <i>cytotoxin-associated gene</i> “
CamR	Chloramphenicolresistenz
CD	engl.: „ <i>cluster of differentiation</i> “ Oberflächenmarker
CFU	engl.: „ <i>colony-forming units</i> “
CMC	1-cyclohexyl-3(2-morpholinoethyl)carbodiimidmetho-p-toluensulfonat
C-Terminus	Carboxyterminaler Bereich der DNA bzw. eines Proteins
Δ	Delta (Deletion)
D	Aspartat
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat-Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL-Lösung	„ <i>enhanced chemiluminescence</i> “-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl.: „ <i>epidermal growth factor</i> “ (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK	engl.: „ <i>extracellular signal-regulated kinases</i> “
Erm ^R	Erythromycinresistenz
<i>et al.</i>	lat.: „ <i>et alii</i> “ (und andere)
F	Farad
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FAK	engl.: „ <i>focal adhesion kinase</i> “
FCS	engl.: „ <i>fetal calf serum</i> “; Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiacyanate
g	Gramm
(x)g	x- faches der Erdbeschleunigung

G	Glycin
G	Guanin
GFP	engl.: „ <i>green fluorescent protein</i> “
h	Stunde
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthio- β -galactosid
ITGB1	β 1 Integrin
JAM	engl.: „ <i>junctional adhesion molecule</i> “
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol/l)
m	milli (10^{-3})
MAPK	„ <i>mitogen-activated protein kinase</i> “
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfon Säure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	engl.: „ <i>multiplicity of infection</i> “
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminaler Teil eines Proteins
OD	Optische Dichte
OMP	engl.: „ <i>outer membrane protein</i> “
OMV	engl.: „ <i>outer membrane vesicle</i> “
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphatgepufferte NaCl- Lösung
PBLC	Periphere Blutmonozyten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
PMN	polymorphonukleäre Neutrophile
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PSI	engl.: „ <i>plexin-semaphorin integrin</i> “
P-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	engl.: „ <i>rounds per minute</i> “; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

SHP-2	Proteintyrosinphosphatase
Src	Tyrosinkinase
<i>spp.</i>	<i>sub species</i>
Str ^R	Streptomycinresistenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
TM	Schmelztemperatur
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
(w/v)	Gewichtsanteil
WT	Wildtyp
(w/w)	Gewichtsprozent
ZO-1	Zonula Occludens 1 (Gerüstprotein)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Übersicht über <i>H. pylori</i> -induzierte Erkrankungen des Magens:	3
Abb. 1.2: Phylogenetische Einteilung der äußeren Membranproteine von <i>H. pylori</i> :	7
Abb. 1.3: Modell der CagA-abhängigen Auswirkungen auf eukaryotische Zellsignalwege:	12
Abb. 1.4: Modell des VirB/D4 Systems von <i>A. tumefaciens</i> :	14
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel von <i>H. pylori</i> Stamm 26695:	15
Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Aufbaus des Cag-T4SS von <i>H. pylori</i> :	17
Abb. 3.1: Rekombinatorische Klonierung der β 1-Integrindomänen und Fusion an die Gal4-DNS-Aktivierungsdomäne:	66
Abb. 3.2: Generierung diploider Hefestämme mit Hilfe des „ <i>mating</i> “ und Selektion auf Doppelsektivmedium:	67
Abb. 3.3: Bestimmung der Interaktion zwischen β 1-Integrindomänen und CagA, CagI und CagY aufgrund von Wachstumstests:	69
Abb. 3.4: Kontrolle der Produktion und Funktionalität der fusionierten Cag-Proteine und β 1-Integrindomänen in HEK-293 Zellen:	73
Abb. 3.5: <i>Renilla Luciferase Assay</i> zur quantitativen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen aus dem <i>Yeast Two Hybrid Assay</i> :	74
Abb. 3.6: Kopplung der rekombinant produzierten β 1-Integrindomänen an magnetische Kügelchen:	75
Abb. 3.7: Präzipitation von Proteinen aus <i>H. pylori</i> P12-Lysaten mittels magnetischer Kügelchen, die mit den Integrindomänen β -tail bzw. <i>I-like</i> gekoppelt sind:	76
Abb. 3.8: Test auf Präzipitation von CagY aus <i>H. pylori</i> Lysaten mittels magnetischer Kügelchen, die mit den Integrindomänen β -tail bzw. <i>I-like</i> gekoppelt sind:	77
Abb. 3.9: Klonierung von CagA-Fragmenten und Fusion an die Gal4-DNS-Bindedomäne:	79
Abb. 3.10: Interaktionstest der Fragmente der N-terminalen Hälfte von CagA mit der β -tail-Domäne des β 1-Integrins:	80
Abb. 3.11: Klonierung von CagA-Fragmenten und Fusion an die Gal4-DNS-Bindedomäne:	82
Abb. 3.12: Interaktionstest der verkürzten CagA-Fragmente des Aminosäurebereichs 303 bis 404 mit der β -tail-Domäne des β 1-Integrins:	83
Abb. 3.13: Nachweis von aufgereinigtem His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ :	84
Abb. 3.14: Nachweis der Bindung von His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ an die Oberfläche von AGS Zellen:	85
Abb. 3.15: Bindung von His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ an GE11 und GE11 β :	86
Abb. 3.16: Effekt von His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ auf die Translokation von nativem CagA in AGS Zellen:	87
Abb. 3.17: Effekt von GST-Invasin auf die Translokation von nativem CagA in AGS Zellen:	88
Abb. 3.18: Bindung des Antikörper 9EG7 an AGS Zellen in An- und Abwesenheit von 2mM MnCl ₂ bzw. His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ :	89
Abb. 3.19: Oberflächenlokalisierung von CagA:	92
Abb. 3.20: Lokalisierung und Nachweis von CagA in Membranvesikeln:	93
Abb. 3.21: <i>Phosphotyrosin Assay</i> mit isolierten Membranvesikeln und lebenden <i>H. pylori</i> P12:	95
Abb. 3.22: Prozessierung und Phosphorylierung von CagA in den Zelllinien AGS, dHL60 und PBLC's:	97
Abb. 3.23: Graphische Darstellung der Deletion des <i>hopQ</i> -Gens:	100
Abb. 3.24: Bestätigung der Deletion von <i>hopQ</i> :	101
Abb. 3.25: Einfluss der <i>hopQ</i> -Genexpression auf die CagA-Translokation in AGS Zellen:	102

Abb 3.26: Adhärenzversuche mit den Stämmen <i>H. pylori</i> P12 München und <i>H. pylori</i> P12 Δ hopQ München an GE11 β und GE11 Zellen: _____	104
Abb. 3.27: Vergleich der produzierten Menge an Adhäsinen in <i>H. pylori</i> P12 München und Berlin: _____	105
Abb. 3.28: Bestätigung der <i>sabB1</i> - und <i>sabB2</i> -Loci im Chromosom von <i>H. pylori</i> P12 München und Berlin: _____	106
Abb. 3.29: Sequenzvergleich der Signalsequenzen von <i>sabB1</i> und <i>sabB2</i> in den Varianten <i>H. pylori</i> P12 München und Berlin: _____	107
Abb. 3.30: Adhärenzversuche mit den Stämmen <i>H. pylori</i> P12 Berlin und München, sowie den entsprechenden <i>hopQ</i> -Deletionsmutanten: _____	109
Abb. 3.31: Kontrolle der Komplementation des Gens <i>hopQ</i> der <i>H. pylori</i> Stämme P12 Δ hopQ München und Berlin: _____	111
Abb. 3.32: Kontrolle der Genexpression von HA- <i>hopQ</i> vom Plasmid pCE40: _____	112
Abb. 3.33: <i>Phosphotyrosin</i> Assays von AGS Zellen zur Kontrolle der Komplementation der CagA-Translokation der <i>hopQ</i> -Deletionsmutanten: _____	113
Abb. 4.1: Domänen des Integrins und die möglichen Aktivierungszustände: _____	119
Abb. 4.2: Modell der CagA-Translokation aufgrund einer Konformationsänderung des Integrins: _____	122
Abb. 4.3: Hypothetisches Modell der CagA-Translokation unter Einbeziehung der <i>I-like</i> Ligandenbindungsdomäne des β 1-Integrins: _____	123
Abb. 4.4: Modell der kompetitiven Inhibition der CagA-Translokation durch His-CagA ₃₀₃₋₄₀₄ : _____	125

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: <i>Escherichia coli</i> -Stämme	21
Tab. 2.2: <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme	21
Tab. 2.3: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	22
Tab. 2.4: eukaryotische Zelllinien	24
Tab. 2.5: Plasmide und Vektoren	24
Tab. 2.6: Oligonukleotide	27
Tab. 2.7: primäre Antikörper	30
Tab. 2.8: sekundäre Antikörper	31
Tab. 2.9: Nährmedien	32
Tab. 2.10: Hemmstoffe und Medienzusätze	33
Tab. 2.11: Zellkulturmedien	34
Tab. 2.12: Zellkulturzusätze und Puffer	34
Tab. 2.13: Enzyme und Proteine mit der jeweiligen Bezugsquelle	34
Tab. 2.14: Molekulargewichtsmarker	35
Tab. 2.15: Kommerziell erwerbbaare Kits	36
Tab. 2.16: PCR-Protokoll	48
Tab. 2.17: Protokoll „nested“-PCR Stufe I	51
Tab. 2.18: Protokoll der „nested“-PCR Stufe II	52
Tab. 3.1: Aminosäurebereiche von CagA, CagI und CagY, die mit dem extrazellulären Teil des β 1-Integrin interagieren	64
Tab. 3.2: Aminosäurebereiche des β 1-Integrins, die zur Untersuchung ihrer jeweiligen Interaktion mit CagA, CagY und CagI verwendet wurden	65

1 EINLEITUNG

1.1. Entdeckung und Epidemiologie von *Helicobacter pylori*

Bereits im Jahr 1923 wurde durch Georg Ernst Konjetzny ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Magengeschwüren und einer bakteriellen Besiedelung des Magens hergestellt (Konjetzny, 1923). Dies widersprach der gängigen Meinung, dass der Magen aufgrund seines sauren Milieus steril sei. Da zu dieser Zeit eine *in vitro* Isolierung von Mikroorganismen aus dem Magen nicht gelang, hielt sich diese Ansicht noch mehrere Jahre. Erst im Jahr 1984 gelang es Barry Marshall und Robin Warren das Bakterium *Helicobacter pylori* aus der Magenmukosa von Patienten mit chronischer Gastritis zu isolieren und zu kultivieren. Sie beschrieben die isolierten Bakterien als „*unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis*“ (Marshall and Warren, 1984). Mit einem Selbstversuch schaffte Barry Marshall es letztlich die Koch'schen Postulate zu erfüllen, indem er eine Suspension von *H. pylori* zu sich nahm und daraufhin die Symptome einer aktiven Gastritis entwickelte (Marshall et al., 1985). Die Entdeckung eines Bakteriums, das Magengeschwüre, chronische atrophische Gastritis und sogar Magenkarzinome hervorruft, revolutionierte die bisherige Vorstellung dieser Krankheitsbilder, die bis dahin auf äußere Faktoren, wie Stress und ungesunde Ernährung zurückgeführt wurden. Im Jahr 1994 stufte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *H. pylori* schließlich in die Stufe I der definierten Kanzerogene ein und 2005 erhielten Barry Marshall und Robin Warren für ihre Entdeckung den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Das Gram-negative, spiralförmige, polar begeißelte Bakterium *H. pylori* wird in die Klasse der ϵ -Proteobakterien eingestuft. Eine Infektion mit *H. pylori* betrifft heute ca. 50% der Weltbevölkerung und ist damit eine der häufigsten chronischen, bakteriellen Infektionen (Suerbaum and Michetti, 2002). Der menschliche Magen ist dabei eine neuartige ökologische Nische und der einzige bekannte Lebensraum für *H. pylori*, was dieses Bakterium von anderen Humanpathogenen, wie beispielsweise *Salmonella typhimurium* unterscheidet. Die Kolonisierung des menschlichen Magens durch *H. pylori* reicht dabei schon mindestens 60 000 Jahre zurück. *H. pylori* verbreitete sich von Afrika aus und ist heute als Pathogen auf der ganzen Welt zu finden (Covacci et al., 1999; Falush et al., 2003; Linz et al., 2007; Suerbaum and Josenhans, 2007). Aus epidemiologischen Studien geht hervor, dass die Prävalenz der Infektion in Zusammenhang mit sozioökonomischen und geographischen Faktoren steht (Malaty and Graham, 1994). So liegt die Rate der Infektionen in Entwicklungsländern bei ca. 70-90%, dagegen in Industrieländern nur bei ca. 20-50% (Dunn et al., 1997). Die genaue Übertragung von *H. pylori* konnte bisher noch nicht im Detail

geklärt werden, findet aber vermutlich in der frühen Kindheit von der Mutter auf das Kind statt (Dunn et al., 1997). Diese These wird zudem von der Tatsache untermauert, dass innerhalb von Familien genetisch gleiche Stämme von *H. pylori* isoliert werden konnten. Dies wiederum weist auf eine oral-orale bzw. fäkal-orale Übertragung hin (Drumm, 1990; Elitsur et al., 1999). Unbehandeltes Wasser, sowie mit Abwasser kontaminierte Lebensmittel könnten besonders für die Entwicklungsländer eine Rolle bei *H. pylori*-Infektionen spielen, da die verbesserten Hygienebedingungen in den Industrieländern seit Mitte des 19. Jahrhunderts zu einer deutlichen Abnahme der Infektionen durch *H. pylori* geführt haben.

1.2. Pathogenese *H. pylori*-assoziierter Erkrankungen

H. pylori hat eine sehr lange Co-Evolution mit seinem Wirt, dem Menschen durchlaufen, weshalb das Bakterium auch als Kommensale betrachtet werden kann (Dorer et al., 2009). Eine Infektion mit *H. pylori* könnte möglicherweise einen Selektionsvorteil für den Menschen darstellen, da die Kolonisierung sich auch positiv auf den Wirt auswirken kann. Studien haben kürzlich gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Erkrankungen, wie Speiseröhrenkrebs und Reflux-Ösophagitis (*gastroesophageal reflux disease*, GERD) und dem Rückgang von *H. pylori*-Infektionen besteht (Anderson et al., 2008; Atherton, 2006).

Dennoch kann eine Besiedelung des menschlichen Magens durch *H. pylori* zu erheblichen gesundheitlichen Schäden führen. Obwohl die Magenschleimhaut sehr gut vor dem Eindringen von Bakterien geschützt ist, gelingt es *H. pylori* aufgrund verschiedener Virulenzfaktoren das saure Milieu des Magens sowie die viskose Magenmukosa zu durchdringen und im Mukus angehaftet sehr lange im Wirt zu persistieren. Eine Infektion mit *H. pylori* besteht daher meist über mehrere Jahrzehnte oder sogar lebenslang (Parsonnet, 1998) und führt zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut (chronische Gastritis). Betroffen sind die Regionen Corpus und Antrum des Magens, wobei der Ort der Infektion eine Rolle für die Entwicklung der Folgekrankheiten spielt (s. Abb. 1.1). Bei einem Großteil aller Infektionen verläuft die Entzündungsreaktion zwar symptomlos, aber in 15 bis 20% der Fälle führt sie zur Entwicklung von chronischer atrophischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren, Magenkarzinomen oder dem „*mucosa associated lymphoid tissue*“ (MALT)-Lymphom (Atherton, 2006). Eine Gastritis im Antrum erhöht das Risiko eines Zwölffingerdarmgeschwürs aufgrund vermehrter Säureproduktion, die auch die Säurekonzentration im ersten Abschnitt des Duodenums erhöht (s. Abb. 1.1 (a)). Das Risiko an einem Magengeschwür oder –karzinom zu erkranken erhöht sich dagegen bei Patienten mit einer Corpus-dominierten Gastritis, die sich zu einer atrophischen Gastritis entwickeln kann (s. Abb. 1.1 (b)). Dies geht einher mit der Zerstörung von Säure-sekretierenden

Parietalzellen und Mukus-produzierenden Zellen (Amieva and El-Omar, 2008; Rubin, 1997). Als Folge kann es zu einer intestinalen Metaplasie kommen, was als Vorstufe des Adenokarzinoms gilt (Blok et al., 1997; Correa, 1997; Peek and Blaser, 2002).

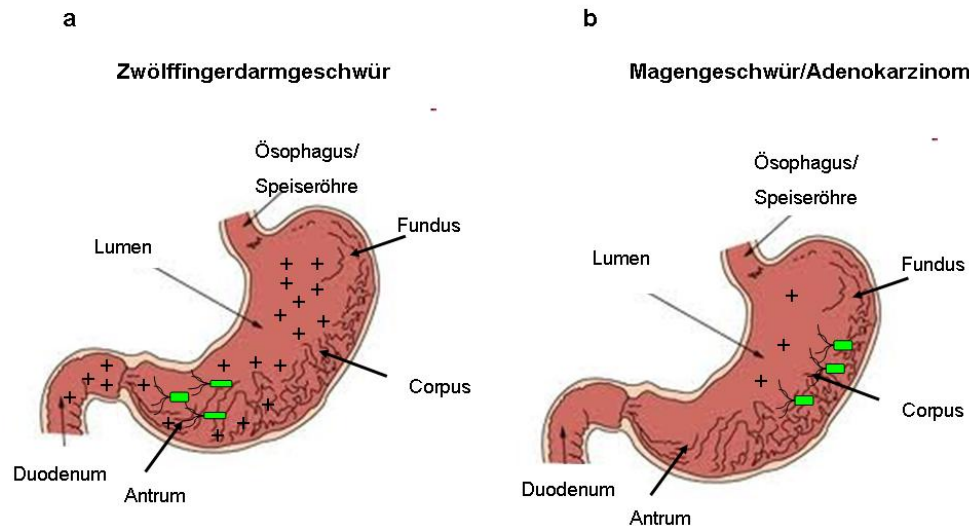


Abb. 1.1: Übersicht über *H. pylori*-induzierte Erkrankungen des Magens:

(a) Die Besiedelung des Antrums durch *H. pylori* (dargestellt in grün) führt zu einer starken Entzündung und erhöhten Säuresekretion, die auch die Säurekonzentration im Duodenum erhöht.

(b) Die Besiedelung des Corpus durch *H. pylori* (dargestellt in grün) verringert die Säuresekretion und führt zu atrophischer Gastritis, Magengeschwür und Adenokarzinomen

(nach Dorer et al., 2009).

Heute wird davon ausgegangen, dass 5,5% aller Krebsfälle auf *H. pylori* zurückzuführen sind. Krebsbedingten Todesfällen liegt weltweit als zweithäufigste Ursache das Magenkarzinom zu Grunde, an dessen Entstehung *H. pylori* als größter Risikofaktor beteiligt ist.

Ein weiteres Krankheitsbild wird durch die Infiltration von lymphatischem Gewebe, wie Lymphozyten und Plasmazellen in die Magenmukosa hervorgerufen. Dies geschieht durch den Verlust des schützenden Mukus und der Epithelzellschicht und kann so zu einem malignem MALT-Lymphom werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Entstehung des MALT-Lymphoms und *H. pylori*, ergibt sich daraus, dass bei 72 bis 98% dieser Patienten nach erfolgreicher Eradikation von *H. pylori* das MALT-Lymphom abklingt (Parsonnet et al., 1994; Wotherspoon, 1998).

1.3. Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer der beschriebenen Folgeerkrankungen durch eine *H. pylori*-Infektion variiert sowohl aufgrund bakterieller Virulenzfaktoren, sowie aufgrund genetischer Prädisposition des Wirts. Die Eigenschaften der menschlichen Immunantwort spielen beispielsweise für die Stärke der Entzündungsreaktion eine Rolle. So können Polymorphismen im Gen des Zytokins Interleukin-1 β (IL-1 β) zu einer vergleichsweise starken, durch *H. pylori* induzierten IL-1 β Produktion führen, womit das Risiko einer atrophischen Gastritis deutlich ansteigt (El-Omar et al., 2000).

Aufgrund der Kombination der produzierten Virulenzfaktoren und genetischen Variabilitäten zwischen den verschiedenen *H. pylori*-Stämmen verläuft nicht jede *H. pylori*-Infektion gleich bzw. mit dem gleichem Risiko für Folgeerkrankungen. Die erfolgreiche Anpassung an die ökologische Nische und damit das Überleben im sauren Milieu des Magens ist dabei von grundlegender Bedeutung. Um den sauren pH-Wert von ca. 1,4 im Magen zu überstehen (Teyssen et al., 1995), produziert *H. pylori* das zytosolische, Ni²⁺-haltige Enzym Urease (Stingl and De Reuse, 2005), welches einen essentiellen Kolonisierungsfaktor darstellt (Eaton et al., 1991). Unter bestimmten Kulturbedingungen kann diese Urease sogar 10% des Gesamtproteins im Bakterium ausmachen (Bauerfeind et al., 1997). Bestehend aus den zwei Untereinheiten UreA und UreB (Labigne et al., 1991) wird bei sinkendem pH-Wert durch einen protonengesteuerten Kanal Harnstoff aus der Umgebung aufgenommen und in Ammoniak und Hydrogencarbonat gespalten (Weeks et al., 2000). Die Protonierung des entstandenen Ammoniaks führt zur Pufferung des Zytoplasmas und Periplasmas von *H. pylori* (Marshall et al., 1990). Es wird eine zytotoxische Wirkung des entstandenen Ammoniums diskutiert, die zu Epithelzellschäden führen könnte (Sommi et al., 1996). Auch die Induktion von Apoptose, sowie der Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten wird mit der Ureaseaktivität in Verbindung gebracht (Harris et al., 1996).

Das eigentliche Habitat von *H. pylori* ist aber nicht das Magenlumen, sondern die Bicarbonat-gepufferte Magenmukosa. *H. pylori* kann nur kurzfristig niedrige pH-Werte (pH < 4) überleben (Sachs et al., 2003), weshalb eine schnelle Orientierung und Bewegung zur Magenmukosa für die erfolgreiche Kolonisierung nötig ist. Auch in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Motilität der Bakterien essentiell für die Kolonisierung des Magens ist (Eaton et al., 1992). Die helikale Form sowie zwei bis sechs unipolar lokalisierte Flagellen ermöglichen *H. pylori* seine Beweglichkeit. Die Flagellen bestehen aus den Flagellinen FlaA und FlaB und sind zum Schutz vor Säure von einer membranartigen Hülle überzogen (Geis et al., 1993). Aufgrund des pH-Gradienten der Mukusschicht, der vom Lumen (pH=2) zur Epithelzellschicht (pH=7) verläuft orientiert sich *H. pylori* chemotaktisch zu seinem Habitat (Schreiber et al., 2004).

1.3.1 Vermittlung der Adhäsion von *H. pylori* an Epithelzellen

Die Adhäsion von pathogenen Bakterien an die Zielzelle im Wirt ist meistens der erste Schritt bei einer Infektion. Adhäsine sind bakterielle Faktoren, die durch Bindung an Rezeptoren eine Anheftung an die Wirtszelle ermöglichen und somit von grundlegender Bedeutung für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes sind. Im Fall von *H. pylori* ist die Adhäsion an das Magenepithel besonders wichtig, da die Peristaltik des Magens sowie die Mukuserneuerung zum Abtransport der Bakterien führen würden.

Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung werden Adhäsine allgemein in die Gruppen der Polysaccharid-Adhäsine und Polypeptid-Adhäsine eingeteilt. Polysaccharid-Adhäsine kommen als Bestandteile der bakteriellen Zellmembran und -wand, oder der Kapsel vor. Das Polysaccharid-Adhäsin PIA bildet beispielsweise einen wichtigen Faktor der Biofilmmatrix von *Staphylococcus epidermidis*, wobei seine genaue Funktion als interzelluläres Adhäsin noch unklar ist. Auch das Lipopolysaccharid (LPS) zählt in diese Gruppe und trägt durch seine Wirkung als Endotoxin entscheidend zur Pathogenese Gram-negativer Bakterien bei. Auch *H. pylori* enthält LPS in der äußeren Membran, welches allerdings wegen einer modifizierten Lipid-A Komponente eine etwa 500-fach schwächere Endotoxizität verglichen mit dem anderer Gram-negativer Bakterien aufweist. Aufgrund der Ähnlichkeit des O-Antigens in *H. pylori*-LPS zu den menschlichen Blutgruppenantigenen Lewis^X und Lewis^Y, dient dieses strukturelle Mimikry wahrscheinlich vielmehr dem Schutz des Bakteriums vor dem Immunsystem (Sheu et al., 2010).

Polypeptid-Adhäsine werden zusätzlich in Fimbrien und Nicht-Fimbrien-Adhäsine untergliedert. Fimbrien oder Pili sind heteropolymere filamentöse Strukturen über die Bakterien in der Regel den Erstkontakt zur eukaryotischen Zelle herstellen. Die Nicht-Fimbrien-Adhäsine (NFA) Gram-negativer Bakterien sind integrale Proteine in der äußeren Membran, weshalb sie auch zu den „*outer membrane proteins*“ (OMPs) gezählt werden (Donnenberg, 2000; Merz and So, 2000; Merz et al., 2000; Novak and Tuomanen, 1999). Genomanalysen von *H. pylori* ergaben mehr als 60 Gene für OMPs (Tomb et al., 1997), die aufgrund ihrer Homologiemerkmale phylogenetisch untergliedert werden können (s. Abb. 1.2). Man unterteilt die OMPs von *H. pylori* in sogenannte „*Helicobacter outer membrane proteins*“ (Hops) und „*Hop-related proteins*“ (Hors). Die wichtigsten Adhäsine gehören in die Gruppe der Hops und werden BabA, SabA, AlpA, AlpB und HopZ genannt (s. Abb. 1.2). BabA scheint das dominierende Adhäsine von *H. pylori* zu sein, welches an das fucosylierte Blutgruppenantigen Lewis^b bindet (Boren et al., 1993; Ilver et al., 1998). Bei Magenepithelzellen mit positivem Sekretor-Status ist es das vorherrschende Antigen (Evans and Evans, 2000; Sakamoto et al., 1989). Zusätzlich kommt es auf dem Muzin MUC5AC vor, wodurch eine Adhäsion von *H. pylori* an die Mukusschicht vermittelt wird (Ho et al., 2004;

Van den Brink et al., 2000). Auch SabA erkennt Blutgruppenantigene, wie die sialylierten Glykoproteine s-Lewis^x oder s-Lewis^a, deren Vorkommen besonders in entzündetem Gewebe erhöht ist (Mahdavi et al., 2002; (Ota et al., 1998)). Während einer chronischen Gastritis werden die fucosylierten Lewis-Antigene durch die sialylierten Kohlenhydratstrukturen verdrängt, wodurch die Adhäsion von *H. pylori* an das Magenepithel dann verstärkt über SabA vermittelt wird. Die Rezeptoren für die Adhäsine AlpA, AlpB und HopZ sind noch unklar. Für die homologen Proteine AlpA und AlpB ist eine Beteiligung bei der Vermittlung der Adhäsion von *H. pylori* an Gewebeschnitte gezeigt worden (Odenbreit et al., 1999).

Epidemiologische Studien zeigen, dass das Potenzial der Virulenz unter den verschiedenen *H. pylori*-Isolaten variiert, was auf genetische Unterschiede zwischen den Stämmen zurückzuführen ist. Bisher konnten das vakuolisierende Cytotoxin VacA (vacuolating cytotoxin A) und die Präsenz der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) im *H. pylori*-Chromosom als Virulenzmarker für *H. pylori* identifiziert werden, die eine Klassifizierung von *H. pylori* in hoch virulente Typl-Stämme und schwach virulente TyplI-Stämme ermöglicht. Obwohl alle *H. pylori*-Stämme ein *vacA*-Gen besitzen, stellt es einen der beiden Marker zur Unterscheidung zwischen Typl- und TyplI-Stämmen dar. Dies liegt an Polymorphismen im *vacA*-Gen, die dazu führen, dass innerhalb der N-terminalen Signalsequenz zwischen den Allelen s1 und s2, in der Mittelregion zwischen den Allelen m1 und m2, sowie in einer Zwischenregion zwischen den Allelen i1 und i2 differenziert werden kann (Atherton et al., 1995; Rhead et al., 2007). Die Ausbildung schwerer Magengeschwüre und Adenokarzinome ist dabei mit Typl-Stämmen (s1/m1-VacA) und weniger mit TyplI-Stämmen (s1/m2-VacA) assoziiert. Genomische Studien haben gezeigt, dass es auch andere potenzielle Marker für den Grad der Virulenz von *H. pylori* geben könnte. Beispielsweise konnte eine Koevolution zwischen der Anwesenheit von Virulenzmarkern sowie zehn weiteren Genen festgestellt werden, worunter auch die *babA*- und *hopQ*-Gene fallen (Salama et al., 2000).

Das äußere Membranprotein HopQ gehört phylogenetisch ebenfalls in die Adhäsinfamilie von *H. pylori* (s. Abb. 1.2), wobei seine Funktionen im Wesentlichen noch unklar sind. Eine genauere Analyse des *hopQ*-Gens zeigte, dass es in zwei verschiedenen Allelen vorkommt, wovon Allel I signifikant häufiger in den Typl-Stämmen von *H. pylori* gefunden wird (Cao and Cover, 2002). Aufgrund dessen wird eine Beziehung zwischen der Expression des Allels I für *hopQ* und dem Auftreten der schweren Folgeerkrankungen einer *H. pylori*-Infektion vermutet.

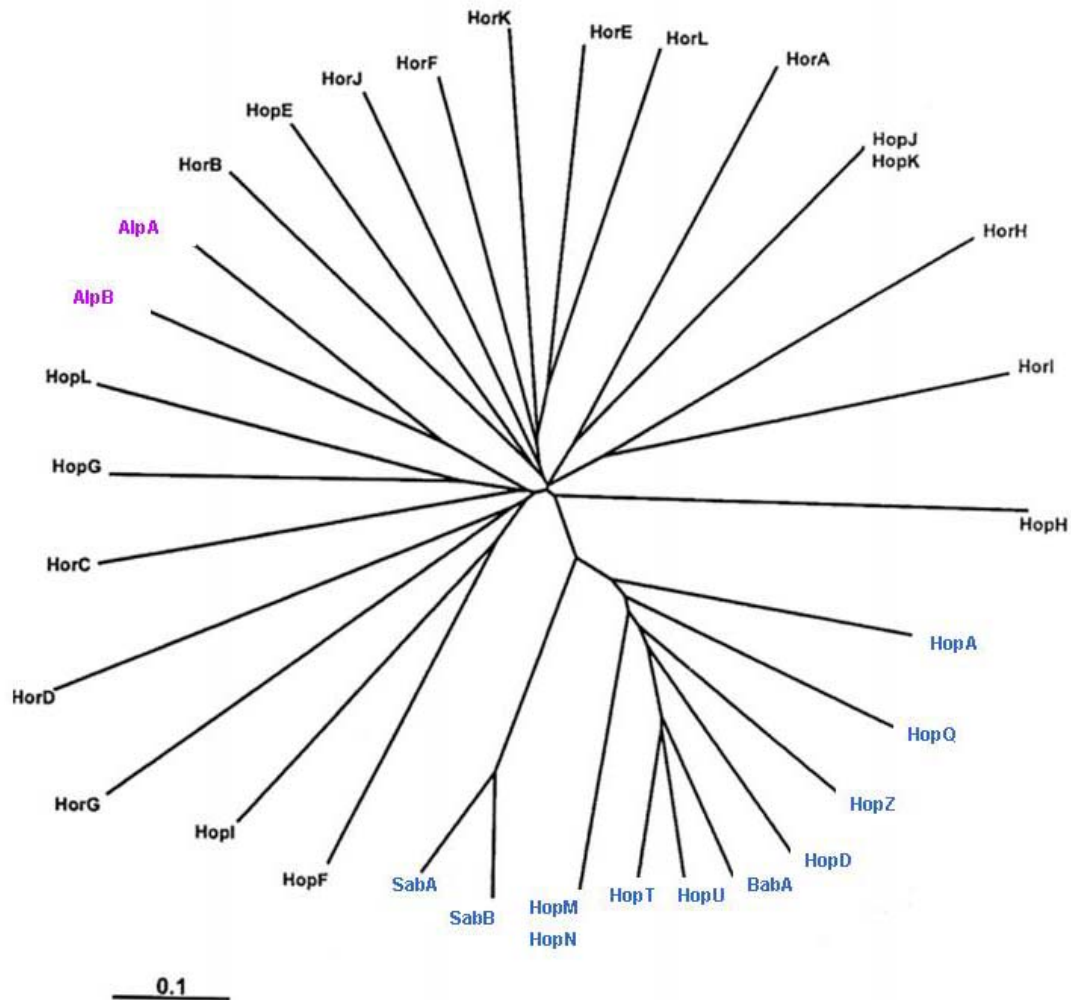


Abb. 1.2: Phylogenetische Einteilung der äußeren Membranproteine von *H. pylori*:

Die Mitglieder der Adhäsins-Familie sind in blau dargestellt. Die Homologen AlpA und AlpB (in lila dargestellt) gehören phylogenetisch nicht in die Adhäsins-Familie. Es konnten aber bereits adhäsive Eigenschaften für diese Proteine nachgewiesen werden (nach(Alm et al., 1999).

1.3.2 Das vakuolisierende Cytotoxin VacA und die Immunantwort des Wirts

Das vakuolisierende Cytotoxin VacA induziert die Bildung saurer zytoplasmatischer Vakuolen in Wirtszellen (Cover and Blaser, 1992). Das von *H. pylori* produzierte 140 kDa große Cytotoxin VacA wird Sec-abhängig über die innere Membran und anschließend mit Hilfe der C-terminalen Autotransporter-Domäne über die äußere Membran sekretiert. Das reife Protein mit einer Größe von 88 kDa entsteht nach Abspaltung der Autotransporter-Domäne und wird in die Umgebung abgegeben oder verbleibt an der Bakterienoberfläche (Cover et al., 1994; Nguyen et al., 2001; Schmitt and Haas, 1994).

Die charakteristische blumenförmige Struktur des VacA entsteht durch die Oligomerisierung des reifen Toxins zu hexameren Ringen, wobei schließlich zwei hexamere Ringe einen hochmolekularen dodekameren Komplex bilden (Lupetti et al., 1996). Das reife VacA-Toxin kann proteolytisch in zwei Fragmente (p37 (37 kDa) und p55 (55 kDa)) mit unterschiedlichen Funktionen gespalten werden (Burrioni et al., 1998; Telford et al., 1994). Die Ausbildung einer Membranpore und der Vakuolen wird dabei auf die Aktivität des p37-Fragments zurückgeführt (Vinion-Dubiel et al., 1999), die Rezeptorerkennung und -bindung sowie die Oligomerisierung des Toxins dagegen auf die des p55-Fragments (Ji et al., 2000; Pagliaccia et al., 1998). Es handelt sich bei VacA dennoch nicht um ein typisches AB-Toxin, da die beiden Teilfragmente nicht unabhängig voneinander sind.

Rezeptoren für VacA auf Epithelzellen sind die Tyrosinphosphatasen RPTP α und RPTP β (Yahiro et al., 1999; Yahiro et al., 2003), auf T-Lymphozyten konnte dagegen die CD18 Untereinheit des β 2-Integrins identifiziert werden (Sewald et al., 2008). Als multifunktionelles Toxin (Cover and Blanke, 2005) hat VacA nach Rezeptorbindung mehrere Auswirkungen auf die Wirtszelle. Neben der Vakuolisierung, die zur Entdeckung des Toxins führte, beeinträchtigt VacA zusätzlich den Vesikeltransport innerhalb der Epithelzellen (Satin et al., 1997) und deren Proliferation (Ricci et al., 1996). Auch die Induktion von Apoptose wird auf die Aktivität von VacA zurückgeführt (Cover et al., 2003; Kuck et al., 2001). Des Weiteren wird ein Einfluss von VacA auf das Immunsystem beschrieben. Dabei spielt die Störung der Antigenprozessierung und -präsentation (Molinari et al., 1998) eine Rolle. Die Inhibition der Phagosomenreifung in Makrophagen, die *H. pylori* aufgenommen haben (Zheng and Jones, 2003), verhindert die weitere Ausbildung von Phago-Lysosomen in der Zelle und somit das Eliminieren der Bakterien (Allen et al., 2000). Es kommt dagegen zur Bildung eines anormalen Zellkompartiments, welches als Megasom bezeichnet wird und nur abgeschwächte lysierende Eigenschaften besitzt. Zusätzlich kommt es durch eine herabregulierte Interleukin-2 (IL-2)-Expression zum Ausbleiben der T-Zell-Aktivierung (Boncristiano et al., 2003; Gebert et al., 2003; Sundrud et al., 2004).

1.3.3 Die *cag*-Pathogenitätsinsel

Wie die Expression eines aktiven VacA Toxins, ist die Präsenz der 37 kb großen *cag*-PAI im *H. pylori*-Chromosom ein Marker zur Eingliederung von *H. pylori* in die Gruppe der TypI-Stämme und stellt somit einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor dar. Diese Pathogenitätsinsel kodiert das Cag-TypIV-Sekretionssystem (Cag-T4SS), welches starke Homologien zum VirB/D4-T4SS von *Agrobacterium tumefaciens* aufweist. Vermittelt über dieses Sekretionssystem, wird das ebenfalls auf der *cag*-PAI kodierte Cytotoxin CagA (*cytotoxin-associated gene A*) in die eukaryotische Zelle transloziert (Backert et al., 2000;

Censini et al., 1996; Odenbreit, 2000). Es handelt sich dabei um ein ~130 kDa großes Protein und ist das bisher einzige beschriebene Substrat des Cag-T4SS.

Bakterien nutzen eine Vielzahl an Sekretionssystemen für den Transfer von Makromolekülen über die Membran (Juhas et al., 2008). Man unterscheidet sie in sechs verschiedene Gruppen: TypI bis TypVI-Sekretionssysteme (Henderson et al., 2004; Mougous et al., 2006; Thanassi and Hultgren, 2000).

Bei den TypIV-Sekretionssystemen (T4SS) handelt es sich um sehr komplexe, hochmolekulare Maschinen, die sich von anderen bakteriellen Sekretionssystemen besonders aufgrund ihrer Fähigkeit sowohl Proteine als auch DNS zu transportieren, unterscheiden (Juhas et al., 2008). Aufgrund ihrer Substrate ergeben sich drei verschiedene Gruppen von T4SS. In die erste Gruppe werden T4SS, die dem Transport von DNS dienen eingegliedert. Der Austausch von DNS bzw. Nukleoproteinkomplexen zwischen verschiedenen Zellen beruht auf der evolutionären Verwandtschaft der T4SS mit bakteriellen Konjugations-Apparaten (Cascales and Christie, 2003; Lawley et al., 2003). Der Prototyp der T4SS ist das VirB/D4-Sekretionssystem von *A. tumefaciens*, das den Transfer des Tumor-induzierenden (Ti)-Plasmids in die Pflanzenzelle katalysiert (Cascales and Christie, 2004; Christie et al., 2005; Christie and Cascales, 2005). Die zweite Gruppe umfasst T4SS, die Bakterien dazu befähigen DNS entweder aus dem extrazellulären Milieu aufzunehmen oder in dieses abzugeben. Beispielhaft hierfür sind das ComB-System von *H. pylori* oder das GGI-System von *Neisseria gonorrhoeae* (Hamilton et al., 2005). Eine dritte Gruppe bilden T4SS, die Effektorproteine in fremde Zellen transferieren. Sie werden von vielen pathogenen Bakterien, wie *Bordetella pertusis*, *Legionella pneumophila*, *Brucella spp.*, *Bartonella spp* und auch *H. pylori* genutzt. Im Laufe der Zeit haben sich die verschiedenen T4SS ihren Anforderungen angepasst und erfüllen Aufgaben, wie horizontalen Gentransfer, wodurch eine genomische Plastizität und die Ausbreitung von Antibiotika-Resistenzen, sowie Virulenzgenen innerhalb der Bakterien erreicht werden oder vermitteln Pathogenität, durch Sekretion von Effektorproteinen in eukaryotische Zielzellen.

1.3.3.1 Auswirkungen des Cag-TypIV-Sekretionssystems auf die eukaryotische Zelle

Die vermehrte Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) wird auf einen kontaktabhängigen Mechanismus zurückgeführt, bei dem *H. pylori* ein intaktes Cag-TypIV-Sekretionssystem benötigt (Censini et al., 1996; (Rieder et al., 1997). Wie es dabei zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit zur Stimulierung des pro-inflammatorischen Ges für IL-8 kommt, ist im Detail noch unklar. In einer Arbeit von Fischer et al., konnte gezeigt werden, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen

phosphoryliertem CagA und der Induktion der IL-8-Sekretion in der Wirtszelle zu geben scheint. Der Verlust der CagA-Translokation durch Deletion verschiedener Gene in der *cag*-PAI führte in den meisten Fällen auch zu einem Ausbleiben der IL-8-Sekretion. Dennoch wurden CagA-Translokationsdefiziente Mutanten gefunden, die aber noch eine Induktion von IL-8 auslösen können (Fischer et al., 2001). Nach dem Prinzip der Rezeptor-Hypothese ist die IL-8-Induktion und Sekretion demnach wahrscheinlich durch die Bindung des Cag-TypIV-Sekretionsapparats an die Zelloberfläche vermittelt, die wiederum von der Expression bestimmter Gene der *cag*-PAI abhängt. Neben CagA werden auch Fragmente von Peptidoglykan über das Cag-TypIV-Sekretionssystem in die Zelle übertragen. Die Erkennung des Peptidoglykans Gram-negativer Bakterien durch den intrazellulären Rezeptor Nod1 aktiviert die Produktion von NF- κ B, was die Transkription pro-inflammatorischer Gene stimuliert (Viala et al., 2004). Die Infiltration von polymorphonukleären Zellen und somit eine massive Entzündungsreaktion aufgrund der Infektion mit *H. pylori* sind die Folgen (Segal et al., 1997; Sharma et al., 1995); Fischer et al., 2001).

1.3.3.2 Die Bedeutung von CagA in der eukaryotischen Zelle

Eine Infektion von Epithelzellen mit *H. pylori* führt in einer Zellkultur zur Migration der Zellen und der Ausbildung von stark verlängerten Zellausläufern, dem „*hummingbird*“-Phänotyp. Diese Veränderungen der Zellen sind auf die Translokation von CagA zurückzuführen (Segal et al., 1999). Dabei stellt die Interaktion des Cag-TypIV-Sekretionssystems mit Integrinen auf der Zelloberfläche den Kontakt zwischen *H. pylori* und der eukaryotischen Zelle her (Kwok et al., 2007; Jimenez-Soto et al., 2009). Der genaue Mechanismus der Translokation von CagA ist aber noch unklar. Transloziertes CagA ist in der Wirtszelle an der Zytoplasmamembran lokalisiert und wird von Protein-Tyrosin-Kinasen aus der Src-Familie phosphoryliert (s. Abb. 1.3) (Asahi et al., 2000; Higashi et al., 2002; Odenbreit, 2000; Tsutsumi et al., 2003). Im C-terminalen Bereich von CagA finden sich mehrere Sequenzmotive (nummeriert von A bis D) mit den konservierten Aminosäuren EPIYA, welche das Substrat für die Tyrosin-Phosphorylierung darstellen (Higashi et al., 2005; Naito et al., 2006). In Zellen des Immunsystems, wie Phagozyten, kommt es nach Translokation zu einer Spaltung von CagA in ein stabiles 100 kDa Fragment und ein 40 kDa Fragment, das den C-terminalen Teil darstellt und phosphoryliert wird (Odenbreit et al., 2001).

Phosphoryliertes CagA bindet an die SHP2 Tyrosin-Phosphatase, sowie die C-terminale Src Kinase (Csk) und aktiviert dabei deren SH2-Domänen, was zu einer gesteigerten Phosphatase-Aktivität dieser Enzyme führt (Higashi et al., 2002). Die SHP2 Tyrosin-Phosphatase konnte als wichtiges, regulatorisches Protein im Zusammenhang mit

Zellwachstum und –beweglichkeit identifiziert werden (Feng, 1999; Neel et al., 2003). Die Induktion der SHP2 Aktivität löst verschiedene Interferenzen mit anderen zellulären Signalwegen aus, wie der Dephosphorylierung der „*focal adhesion kinase*“ (FAK) und der Aktivierung von ERK (Higashi et al., 2004; Tsutsumi et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die CagA-abhängige Inaktivierung von FAK, eine Tyrosin-Kinase, die am Umsatz von „*focal adhesion spots*“ beteiligt ist zur Induktion des „*hummingbird*“-Phänotyp führt (Tsutsumi et al., 2006). ERK ist ein Protein innerhalb des ERK/MAPK-Signalwegs und ist an Zellwachstum, sowie –differenzierung durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt. Tsutsumi et al. konnten zeigen, dass phosphoryliertes CagA mit ERK interferiert und dadurch Veränderungen in der Zellmorphologie und eine verstärkte Proliferation auslöst (s. Abb. 1.3). Unabhängig vom Phosphorylierungsgrad interagiert CagA auch mit dem Ras/Raf/Mek/ERK-Signalweg, indem es diesen über die Bindung mit dem Adaptorprotein Grb2 stimuliert (s. Abb. 1.3) (Mimuro et al., 2002).

Die verstärkte Kinaseaktivität von Csk durch phosphoryliertes CagA dagegen führt zu einer negativen Rückkopplung der Src–Kinaseaktivität, die wiederum zur Phosphorylierung von CagA in der eukaryotischen Zelle beiträgt (s. Abb. 1.3). Die Komplexbildung von phosphoryliertem CagA und Csk wird deshalb als negatives Rückkopplungselement betrachtet (Tsutsumi et al., 2003).

Weiter wird die Integrität des Epithelzellverbands durch Interaktionen von unphosphoryliertem CagA mit Proteinen der eukaryotischen Zelle beeinträchtigt. Dabei wird durch Rekrutierung des Gerüstproteins ZO-1 und des Transmembranproteins JAM zur Bindungsstelle zwischen *H. pylori* und der Epithelzelle das Öffnen der sogenannten „*tight junctions*“ ausgelöst (s. Abb. 1.3) (Amieva et al., 2003). *In vivo* kommt es so zum Aufbrechen der Barrierefunktion des Magenepithels. Zusätzlich kommt es zum Verlust der apikal-basolateralen Zellpolarität durch die Bindung und Inhibition der Kinase Par1 (Saadat et al., 2007), die zentraler Bestandteil für die Regulation der Zellpolarität ist. Die Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B, sowie von β -Catenin wird ebenfalls auf eine Interaktion mit unphosphoryliertem CagA zurückgeführt (s. Abb. 1.3) (Brandt et al., 2005). NF- κ B reguliert die Sekretion von Interleukin-8 (IL-8) (Aihara et al., 1997; (Sharma et al., 1998) und beeinflusst andere zelluläre Prozesse, wie Apoptose und Zellproliferation (Aihara et al., 1997; Hoffmann and Baltimore, 2006). Die β -Catenin-induzierte Aktivierung Mitose-vermittelnder Gene wird mit der kanzerogenen Wirkung von CagA in Verbindung gebracht (Franco et al., 2005), weshalb CagA auch als bakterielles Onkoprotein bezeichnet wird. Diese Ansicht wird maßgeblich durch Arbeiten von Hatakeyama (Ohnishi et al., 2008) untermauert. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Magenkarzinomen in Mäusen und CagA hergestellt werden. Die ubiquitäre Produktion von CagA in *cagA*-transgenen Mäusen führte zu einer abnormalen Proliferation des Magenepithels und

hämatopoetischer Zellen. Dagegen zeigten Mäuse, die das *cagA*-Gen ohne EPIYA Motive exprimierten keine derartigen Entwicklungen, was die Relevanz des CagA/SHP2-Komplexes in der Entstehung von Magenkarzinomen nochmals verdeutlicht.

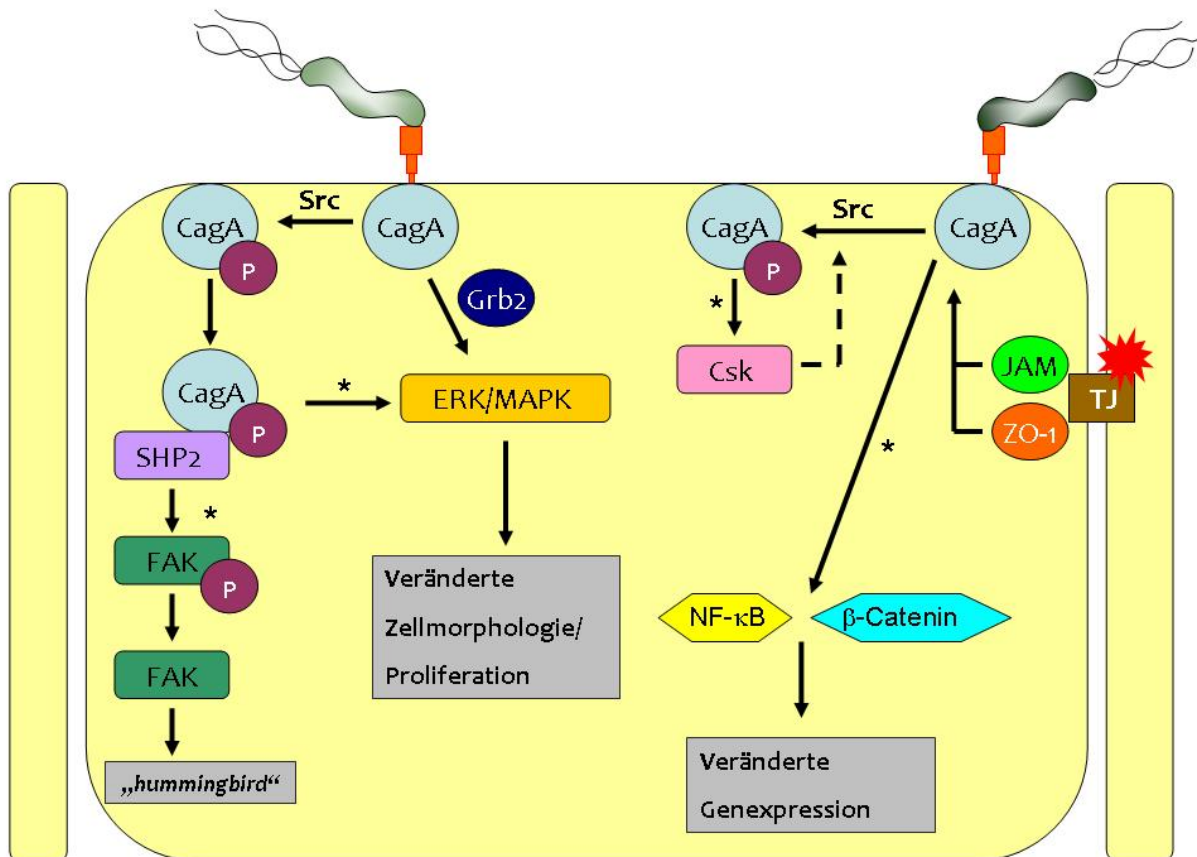


Abb. 1.3: Modell der CagA-abhängigen Auswirkungen auf eukaryotische Zellsignalwege:

CagA wird von *H. pylori* mit Hilfe des Cag-TypIV-Sekretionssystems in die Zelle transloziert und durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert (CagA-P). CagA-P aktiviert einerseits Csk, was wiederum einen negativen Rückkopplungseffekt auf Src-Kinasen hat (markiert durch einen unterbrochenen Pfeil). Andererseits stimuliert CagA-P durch die Bindung und Aktivierung der Phosphatase-Aktivität von SHP2 die Kinase-Aktivität von FAK und aktiviert zusätzlich den ERK/MAPK Signalweg, was zu Veränderungen der Zellmorphologie und -proliferation, sowie deren Motilität führt. Eine Aktivierung des ERK/MAPK Signalweg ist ebenfalls über die Bindung von unphosphoryliertem CagA (CagA) mit Grb2 möglich. Andere Effekte von CagA sind die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und β-Catenin, was eine Aktivierung von Genen für die IL-8 Expression (durch NF-κB), sowie Mitose-vermittelnder Gene (durch β-Catenin) zur Folge hat. Zusätzlich werden durch CagA „tight junctions“ (TJ) im Zellepithelverband aufgrund der Rekrutierung von JAM und ZO-1 zerstört (markiert durch einen roten Stern). Stimulierung der Enzymaktivität durch *angezeigt.

1.4. Typ IV Sekretionssysteme in *H. pylori*

In *H. pylori* konnten bisher vier verschiedene T4SS aller Gruppen identifiziert werden, wozu auch das Cag-T4SS gehört (s. Kapitel 4.1.). Ein weiteres T4SS in *H. pylori* ist das bereits erwähnte ComB-System, welches der Aufnahme von DNS aus der Umgebung dient und *H. pylori* so zu seiner natürlichen Kompetenz verhilft (Hofreuter et al., 2001; Hofreuter et al., 1998). Die Sequenzierung des Genoms von Stamm *H. pylori* P12 führte zur Identifizierung von drei Plastizitätsregionen (PZ), wovon PZ1 und PZ3 Gene für T4SS-Komponenten kodieren (Fischer et al., 2010; Kersulyte et al., 2009; Kersulyte et al., 2003). Die genaue Funktion dieser T4SS, *Tfs3* und *Tfs4*, ist aber noch unklar.

Strukturell besteht der Apparat eines T4SS aus zwölf Proteinen (VirB1 bis VirB11, sowie VirD4), deren Nomenklatur sich von dem von *A. tumefaciens* ableitet. Beim Aufbau eines T4SS entstehen drei miteinander verbundene Einheiten: ein inner-membranärer Komplex mit drei zytoplasmatischen ATPasen, ein Translokationskanal, der die innere und äußere Zellmembran durchspannt, sowie eine Pilusstruktur auf der Oberfläche (s. Abb. 1.4).

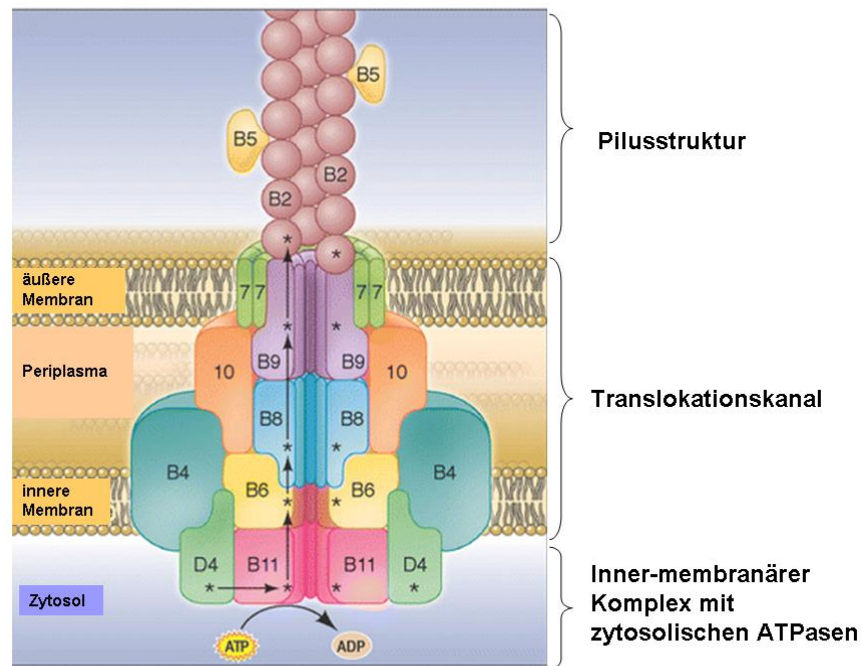


Abb. 1.4: Modell des VirB/D4 Systems von *A. tumefaciens*:

Der Apparat des T4SS besteht aus zwölf Proteinen (VirB1-11; VirD4). Das Substrat wird mit Hilfe des Translokationskanals, bestehend aus den Proteinen VirB6-10 über die innere und äußere Membran entlang der durch Pfeile angezeigten Richtung transportiert. Die Sterne zeigen an, welche Proteine des T4SS mit dem transportierten Substrat interagieren. Die energetische Versorgung wird durch die ATPasen VirB4 (angezeigt in dunkelblau), VirB11 (angezeigt in pink), und VirD4 (angezeigt in dunkelgrün) gewährleistet. Auf der Oberfläche bilden die Proteine VirB2 (angezeigt in braun) und VirB5 (angezeigt in orange) die Pilusstruktur (nach (McCullen and Binns, 2006)).

1.4.1 Das Cag-TypIV-Sekretionssystem

Das auf der *cag*-PAI kodierte Cag-T4SS wurde ursprünglich durch Sequenzanalysen der stromaufwärts des *cagA*-Gens gelegenen Regionen entdeckt. In diesem Bereich kodierte Proteine zeigten Sequenzhomologien zu den Proteinen des VirB/D4-Sekretionssystem von *A. tumefaciens* und eine essentielle Beteiligung an der Induktion der IL-8-Sekretion durch die Wirtszelle (Akopyants et al., 1998; Censini et al., 1996). Die *cag*-PAI liegt in den meisten Stämmen zwischen den Genen *hp0519* und *hp0549* inseriert und wird jeweils rechts und links von *inverted repeats* flankiert (s. Abb. 1.5). Trotz der evolutionären Verwandtschaft des Cag-Systems zu anderen T4SS, zeigen nur die Proteine CagE (VirB4), CagX (VirB9), CagY (VirB10), Cag α (VirB11) signifikante Homologien zum prototypischen VirB/D4-T4SS. Auch werden durch die *cag*-PAI ~ 27 Gene kodiert, obwohl ursprüngliche T4SS aus zwölf Proteinen aufgebaut sind. Diese zusätzlichen Genprodukte sind einzigartig für *H. pylori* und

bis heute in keinem anderen T4SS auffindbar. Die Komponenten des Cag-T4SS werden ihrer Funktionalität nach in die Klassen Apparatsproteine, welche sowohl für die IL-8-Induktion, als auch CagA-Translokation nötig sind und Translokationsfaktoren, die für die CagA-Translokation aber nicht für die IL-8-Induktion gebraucht werden unterteilt (s. Abb. 1.5). Zusätzlich konnten Komponenten identifiziert werden, die entweder Phänotyp-unterstützende Eigenschaften besitzen, oder ohne Funktion sind (s. Abb. 1.5) (Fischer et al., 2001). Transkriptomanalysen haben aber ergeben, dass diese Gene in Operonen exprimiert werden, was auf eine Funktionalität dieser Genprodukte für das Cag-T4SS hinweist (Boonjakuakul et al., 2005; Sharma et al., 2010). Unter den 14 essentiellen Apparatskomponenten befinden sich alle Proteine des Cag-Systems mit Sequenzhomologien zum VirB/D4-System.

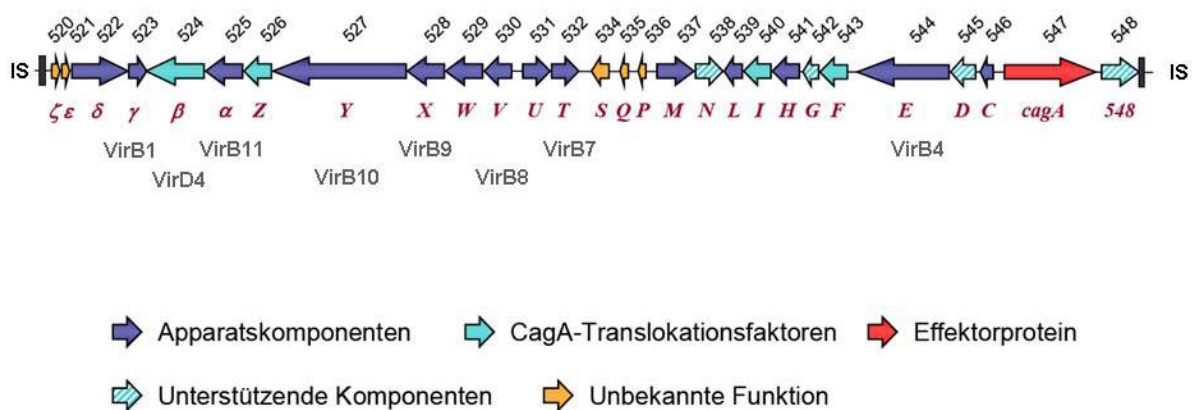


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der *cag*-Pathogenitätsinsel von *H. pylori* Stamm 26695:

Alle Gene der Pathogenitätsinsel sind in Pfeilform entsprechend ihrer Orientierung im Leserahmen dargestellt. Es existieren verschiedene Nomenklaturen für die Gene der *cag*-PAI: eine durchlaufende Nummerierung nach (Tomb et al., 1997) (oberhalb der Pfeile zu sehen), eine Unterscheidung durch Buchstaben des lateinischen und griechischen Alphabets nach Censini et al., 1996 (in lila unterhalb der Pfeile zu sehen). Die Gene kodierend für Homologe zum VirB/D4-System sind ebenfalls unterhalb der entsprechenden Pfeile angezeigt (in schwarz). Flankiert wird die *cag*-PAI durch *inverted repeats* (I).

1.4.1.1 Strukturelle Anordnung der Proteine des Cag-TypIV-Sekretionssystems

Die Untersuchung des pKM101-T4SS lieferte kürzlich kryo-elektronenmikroskopische (EM) Einsichten in den Aufbau des dazugehörigen Translokationskanals. Der gefundene Komplex besteht aus 14 Monomeren der VirB-Homologen VirB7, VirB9 und VirB10, (Chandran et al., 2009; Fronzes et al., 2009). Ein ähnlicher Aufbau wird auch für das Cag-T4SS vermutet, obwohl es sich hierbei um eine komplexere Struktur, als beim pKM101-T4SS handelt. Es konnte gezeigt werden, dass CagX (VirB9) und CagT (VirB7) einen

Komplex bilden, der aber zusätzlich CagM und Cag δ beinhaltet (s. Abb. 1.6), wobei diesen Proteinen eine Beteiligung bei der Oligomerisierung der Translokationskanal-bildenden Proteine beigemessen wird (Kutter et al., 2008; Pinto-Santini and Salama, 2009). Auch für CagY (VirB10) konnte eine direkte Interaktion mit CagX gezeigt werden (Kutter et al., 2008) und unterstützt somit das Modell eines Translokationskanals bestehend aus CagX, CagT und CagY.

Die räumliche Anordnung der Proteine des T4SS wird für das VirB/D4-System von *A. tumefaciens* durch den „*nucleating factor*“ VirB8 (Judd et al., 2005), sowie die lytische Transglykosylase VirB1 determiniert (Alvarez-Martinez and Christie, 2009). Eine ähnliche Funktion wird im Cag-System der lytischen Transglykosylase Cag γ (Zahlr et al., 2005) und dem bitopischen Protein CagV, mit Eigenschaften des VirB8 (Buhrdorf et al., 2003) zugeschrieben. Die Pore in der inneren Membran des Cag-Systems wird wahrscheinlich durch die polytopischen Proteine CagW, CagU und CagH gebildet (s. Abb. 1.6) (Kutter et al., 2008). Für die Energetisierung des Substrattransports werden im Cag-System die zytosolischen ATPasen CagE (VirB4) und Cag α (VirB11) genutzt. Die Ausbildung der Pilusstruktur auf der Oberfläche von *H. pylori* entsteht durch Oligomerisierung der Pilin-Untereinheit CagC (Andrzejewska et al., 2006). Zusätzlich zu CagC konnten auf der Oberfläche der Pilusstrukturen CagY, CagL und das Effektorprotein CagA lokalisiert werden (s. Abb. 1.6) (Rohde et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Alle diese Proteine sind an der Bindung des Cag-T4SS an den eukaryotischen Rezeptor β 1-Integrin beteiligt (Jimenez-Soto et al., 2009; Kwok et al., 2007).

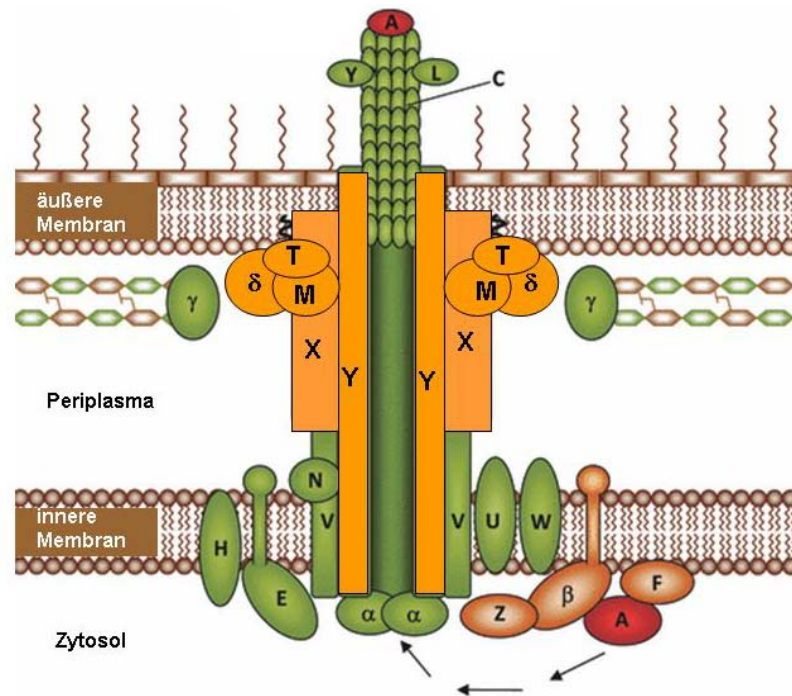


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Aufbaus des Cag-T4SS von *H. pylori*:

Dargestellt sind die Genprodukte der *cag*-PAI, wie sie in ihrer wahrscheinlichsten räumlichen Anordnung das Cag-T4SS bilden. Übereinander liegend dargestellte Proteine deuten auf Protein-Protein-Interaktion zwischen den entsprechenden Cag-Proteinen hin.

Der Translokationskanal (dargestellt in orange) wird aus den Proteinen CagT (VirB7), CagX (VirB9), CagY (VirB10) sowie CagM und Cag δ aufgebaut, wohingegen die Pore der inneren Membran von CagW, CagU und CagH gebildet wird. Die Oberflächenstrukturen des Cag-Systems setzen sich aus den Pilin-Untereinheiten CagC zusammen, die zusätzlich das Effektorprotein CagA (dargestellt in rot), sowie CagY und CagL exponieren. Die räumliche Anordnung der verschiedenen Proteine wird durch Cag γ und CagV unterstützt. Die Orientierung des Transports von CagA wird durch Pfeile angedeutet. Für die Energetisierung des Translokationsprozesses sind die ATPasen CagE und Cag α zuständig. Die Translokationsfaktoren CagZ, CagF und Cag β des Cag-Systems sind in braun dargestellt (nach (Fischer, 2011)).

1.4.1.2 CagA als Substrat für das Cag-TypIV-Sekretionssystem

CagA gilt bisher als einzig bekanntes Substrat für das Cag-T4SS, wodurch sich dieses von vielen anderen bakteriellen T4SS unterscheidet. Der Transfer von CagA über die bakteriellen Membranen ist essentiell mit dem C-terminalen Bereich des Proteins, bestehend aus 20 Aminosäuren verbunden (Hohlfeld et al., 2006), weshalb dieser als Sekretionssignal betrachtet wird. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, dass T4SS-Substrate generell in Abhängigkeit eines C-terminalen Sekretionssignal transferiert werden (Alvarez-Martinez and Christie, 2009). Im Gegensatz zu anderen untersuchten T4SS-Substraten ist die C-terminale Hälfte von CagA, welche sowohl das putative Sekretionssignal als auch die EPIYA Motive enthält, allein nicht ausreichend für eine erfolgreiche Translokation in die Zielzelle (Fischer,

2011). Diese Tatsache deutet somit auf einen komplexeren Translokationsmechanismus hin, der eine Beteiligung der N-terminalen Hälfte von CagA mit einschließt.

Für die Einschleusung von CagA aus dem Zytosol in den Translokationskanal bedarf es eines Proteins, das das Sekretionssignal des CagA-Proteins erkennt. Die essentiellen CagA-Translokationsfaktoren CagF, CagZ und Cag β sind im zytoplasmatischen Teil bzw. in der inneren Membran von *H. pylori* lokalisiert und somit potentielle Kandidaten für die Sekretionssignal-Erkennung von CagA. Immunpräzipitationsexperimente konnten zusätzlich zeigen, dass CagF sehr stark mit einem 100 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Bereich von CagA interagiert (Couturier et al., 2006; Pattis et al., 2007). Eine Beteiligung von ATPasen in Form von Kopplungsproteinen ist in nahezu allen Konjugations- und Proteintranslokations-Systemen essentiell und wird im Cag-System durch die Proteine Cag β und CagZ bewirkt (Busler et al., 2006; Jurik et al., 2010). Strukturvorhersagen von Cag β sagen dem Protein zwei N-terminale Transmembranhelices, sowie einen zytoplasmatischen C-terminalen Bereich voraus. Eine Interaktion des C-terminalen Teils von Cag β mit CagA konnte zusätzlich bestätigt werden (Kutter et al., 2008). Des Weiteren ergaben Deletionen des *cagZ*-Gens eine deutliche Abnahme der CagA-Translokationseffizienz und der *cag β* -Expression, was auf eine stabile Komplexbildung zwischen den Proteinen schließen lässt (Jurik et al., 2010). Diese Daten deuten darauf hin, dass CagF, CagZ und Cag β den Erkennungsrezeptor für die CagA-Translokation bilden (s. Abb. 1.6).

1.4.1.3 Mechanismen der Translokation von CagA über die eukaryotische Membran

Die meisten Effektorproteine von T4SS pathogener Bakterien werden nicht in den Kulturüberstand abgegeben und anschließend über die eukaryotische Membran in die Zielzelle aufgenommen (Cascales und Christie, 2003; (Backert and Meyer, 2006). Es lässt vielmehr vermuten, dass zunächst eine direkte Aktivierung des T4SS durch die Wirtszelle ablaufen muss, bevor das Substrat transferiert werden kann (Backert and Selbach, 2008). Dies kann beispielsweise durch Rezeptorbindung vermittelt werden, was auch ein potenzielles Modell für den Ablauf der Effektorprotein-Translokation in *H. pylori* darstellt. Unterstützt wird diese Theorie zusätzlich durch die Beobachtung, dass das C-terminale Sekretionssignal von CagA allein nicht ausreichend für die vollständige Translokation in die Wirtszelle ist. Zusätzlich konnte in unterschiedlichen Studien gezeigt werden, dass die Bindung des nicht C-terminalen Bereichs von CagA an Komponenten der eukaryotischen Zelle ebenso essentiell für den Transport von CagA über die Wirtszellmembran ist. Als Rezeptoren von CagA konnte das β 1-Integrin identifiziert werden (Jimenez-Soto et al., 2009), sowie Phosphatidylserin in der eukaryotischen Membran (Murata-Kamiya et al.,

2010). Die Komponenten des Cag-T4SS CagY und CagI, sowie CagL wurden zusätzlich zu CagA als Interaktionspartner mit dem β 1-Integrin identifiziert (Jimenez-Soto et al., 2009; Kwok et al., 2007). Dies demonstriert, dass *H. pylori* einen spezifischen, rezeptorabhängigen Mechanismus für den Transport von CagA in die eukaryotische Wirtszelle nutzt. Integrine sind glykosylierte Transmembranproteine, die als heterodimere Rezeptoren auf der eukaryotischen Zelle vorkommen. Sie vermitteln den Kontakt zwischen verschiedenen Zellen und der extrazellulären Matrix, wobei sie Aufgaben wie die Regulation der Zellform, der Migration und des Zellzyklus erfüllen. In der Magenschleimhaut werden sie üblicherweise nicht an der apikalen, dem Magenlumen zugewandten Seite gefunden, sondern vielmehr auf der basolateralen Seite des Magenepithels. *H. pylori* muss somit eine kontrollierte Strategie entwickelt haben, dennoch in Kontakt mit diesen Rezeptoren zu kommen. Eine Beteiligung von *cag*-PAI unabhängigen Faktoren, wie Adhäsinen könnten Signalwege in der Wirtszelle auslösen, die entweder den Zellverband des Magenepithels lockern, oder die Migration von β 1-Integrin an die apikale Seite der Magenepithelzelle hervorrufen und somit einen Zugang für das Cag-T4SS von *H. pylori* an seinen Rezeptor ermöglichen (Kwok et al., 2007; (Wessler and Backert, 2008).

Bisher ist noch nicht geklärt, ob die Pilusstruktur des Cag-T4SS bei der CagA-Translokation eine Röhre bildet, durch die CagA transferiert wird oder, ob diese Strukturen vielmehr zur Kontaktaufnahme des T4SS mit der Wirtszelle dienen. Eine Exposition von CagA an der Oberfläche der Pilusstruktur konnte bestätigt werden (Jimenez-Soto et al., 2009; Kwok et al., 2007, Murata-Kamiya et al., 2010); ob dieser Komplex allerdings eine Art Translokations-Intermediat darstellt, ist weitgehend unklar. Eine Abhängigkeit zwischen CagA-Translokation und der Lokalisierung von CagA auf der Pilusoberfläche wird durch eine Arbeit von Murata-Kamiyata unterstützt, die zeigt, dass eine Interaktion zwischen Phosphatidylserin in der Wirtszellmembran und zwei Argininresten im mittleren Bereich von CagA essentiell für den Transfer von CagA in die eukaryotische Zelle ist (Murata-Kamiya et al., 2010).

Der molekulare Mechanismus des Transports von CagA über die eukaryotische Membran in das Zytosol der Wirtszelle ist noch weitestgehend unklar. Obwohl es bereits einige Daten mit Inhibitoren gibt, die die Phosphorylierung von CagA unterbinden (Jimenez-Soto et al., 2009; Murata-Kamiya et al., 2010) kann heute noch nicht eindeutig gesagt werden, ob der Translokationsprozess von CagA die Bildung einer Pore in der Membran der Zielzelle oder andere zelluläre Prozesse beinhaltet.

1.5. Ziele dieser Arbeit

Die Besiedelung des menschlichen Magens mit *H. pylori* gehört mit einer Prävalenz von 50% zu einer der häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit. Dabei stellt der Magen eine spezielle und neue ökologische Nische für Mikroorganismen dar. Als wichtige Virulenzfaktoren zur Besiedelung des menschlichen Magens zählt neben der Expression von Adhäsinen und VacA auch die Präsenz der *cag*-Pathogenitätsinsel, die für ein T4SS und das translozierte Effektorprotein CagA kodiert. Ein Verständnis des molekularen Mechanismus der CagA-Translokation ist dabei von großer Bedeutung, da dies einen wichtigen Schritt in der Pathogenese von *H. pylori* darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Proteine des Cag-Sekretionsapparat CagI, CagY und CagA hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem extrazellulären Teil des β 1-Integrins genauer untersucht werden. Die an der Rezeptorbindung beteiligten Proteine sollten dabei auf mögliche, spezifische Bindungsregionen innerhalb des extrazellulären Teils des β 1-Integrins untersucht werden, was zum Verständnis des Mechanismus der Übertragung von CagA über die eukaryotische Membran beitragen sollte. Der extrazelluläre Teil der interagierenden β -Untereinheit des β 1-Integrins ist stark in funktionale Domänen gegliedert. Zur Identifizierung möglicher Bindungsregionen für CagI, CagY und CagA im β 1-Integrin sollten mit Hilfe eines *Yeast Two Hybrid Assays* Interaktionen zwischen ausgewählten Domänen der β -Untereinheit des β 1-Integrins mit den Cag-Proteinen gefunden und die Protein-Protein-Interaktion anschließend durch biochemische Methoden bestätigt werden. Des Weiteren sollte die, für die Bindung an das β 1-Integrin verantwortliche Aminosäuresequenz von CagA lokalisiert werden. Durch sukzessive Verkürzungen des CagA-Proteins sollten in einem weiteren *Yeast Two Hybrid Assay* die für die Interaktion nötigen Aminosäuren identifiziert und deren physiologische Funktion während einer Infektion untersucht werden.

CagL ist eine weitere Cag-Apparatskomponente, die mit dem β 1-Integrin interagiert und als mögliches Adhäsins an der Translokation von CagA beteiligt sein soll (Kwok et al., 2007). Es stellt sich daher die Frage, ob ein Adhäsins-vermittelter Kontakt mit der Wirtszelle zur Funktionalität des Cag-T4SS beiträgt. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es daher, eine mögliche Beteiligung des potenziellen Adhäsins HopQ im Hinblick auf die Effizienz der CagA-Translokation zu untersuchen. Besonders im Hinblick auf die Koevolution des *hopQ*-Allels I mit der *cag*-PAI als Marker zur Eingliederung von *H. pylori* in Typ I-Stämme ist eine funktionelle Bedeutung von HopQ während der CagA-Translokation denkbar. Mit Hilfe von *hopQ* I-Deletionsmutanten sollte die Effizienz der CagA-Translokation und der Adhäsion an die Magenepithelzelllinie AGS untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 Bakterienstämme von *Escherichia coli*

Tab. 2.1: *Escherichia coli*-Stämme

Stamm/Name	Genotyp	Referenz
TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>ΔlacO74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU</i> <i>galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe)	(Grant et al., 1990)
DH5 α	F- Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ-</i> <i>thi-l gyr A96 relA1</i> (Invitrogen, Karlsruhe)	(Hanahan, 1983)
β 2150	<i>thrB1004 pro thi strA hsdS lacZ</i> Δ M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacIq traD36 proA+ proB+</i>) Δ <i>dapA::erm</i> (ErmR) <i>pir</i>	(Dehio and Meyer, 1997)
β 2150[pRK2013]	<i>thrB1004 pro thi strA hsdS lacZ</i> Δ M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacIq traD36 proA+ proB+</i>) Δ <i>dapA::erm</i> (ErmR) <i>pir</i>	(Dehio and Meyer, 1997)
β 2155	<i>thrB1004 pro thi strA hsdS lacZ</i> Δ M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacIq traD36 proA+ proB+</i>) Δ <i>dapA::erm</i> (ErmR) <i>pir::RP4 [::kan</i> (KanR) from SM10]	(Dehio and Meyer, 1997)

2.1.1.2 Bakterienstämme von *Helicobacter pylori*

Tab. 2.2. *Helicobacter pylori*-Stämme

Name	Stamm	Genotyp und Referenz
P12	P12	Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie und Immunologie“ der Universität Hamburg (Schmitt and Haas, 1994)
26695	26695	komplett Genom-sequenzierter Stamm (Tomb et al., 1997)
P1	P1	klinisches Isolat der Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universität Amsterdam (Haas et al., 1993)
P76	P76	P1, Str ^R

P12ΔcagA	P12	Δ cagA::cam ^R (W. Fischer)
P12ΔcagY	P12	Δ cagY::cam ^R (W. Fischer)
P12ΔcagE	P12	Δ cagE::cam ^R (W. Fischer)
P12Δcagl	P12	Δ cagl::cam ^R (W. Fischer)
P12ΔcagL	P12	Δ cagL::cam ^R (W. Fischer)
P12ΔPAI	P12	Δ cagPAI::cam ^R (W. Fischer, Odenbreit et al., 2001)
CE H6	P12	Δ hopQ::cam ^R (Elena Ebelogolova)
CE H7	P12	Δ hopQ::cam ^R (diese Arbeit)
CE H8	P12	Δ hopQ::cam ^R + pCE54 hopQ kan ^R (diese Arbeit)
CE H9	P12	Δ hopQ::cam ^R + pCE54 hopQ kan ^R (diese Arbeit ; Elena Ebelogolova)

2.1.2 Hefestämme

2.1.2.1 Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae*

Tab. 2.3: *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Name	Stamm	Genotyp und Referenz
CE Y1	AH109	Ade-, Leu-, His-, haploid, Mating Typ a + pCE1 (diese Arbeit)
CE Y2	AH109	Ade-, Leu-, His-, haploid, Mating Typ a + pCE2 (diese Arbeit)
CE Y3	AH109	Ade-, Leu-, His-, haploid, Mating Typ a + pCE3 (diese Arbeit)
CE Y4	AH109	Ade-, Leu-, His-, haploid, Mating Typ a + pCE4 (diese Arbeit)
CE Y5	AH109	Ade-, Leu-, His-, haploid, Mating Typ a + pCE5 (diese Arbeit)
CE Y6	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE1; pCE6 (diese Arbeit)
CE Y7	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE1; pCE8 (diese Arbeit)
CE Y8	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE1; pCE7 (diese Arbeit)
CE Y9	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE2; pCE6 (diese Arbeit)
CE Y10	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE2; pCE8 (diese Arbeit)
CE Y11	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE2; pCE7 (diese Arbeit)
CE Y12	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE3; pCE6 (diese Arbeit)
CE Y13	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE3; pCE8 (diese Arbeit)
CE Y14	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE3; pCE7 (diese Arbeit)
CE Y15	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE4; pCE6 (diese Arbeit)
CE Y16	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE4; pCE8 (diese Arbeit)
CE Y17	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE4; pCE7 (diese Arbeit)
CE Y18	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE5; pCE6 (diese Arbeit)

CE Y19	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE5; pCE8 (diese Arbeit)
CE Y20	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE5; pCE7 (diese Arbeit)
CE Y21	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE1; pCE10 (diese Arbeit)
CE Y22	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE2; pCE10 (diese Arbeit)
CE Y23	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE3; pCE10 (diese Arbeit)
CE Y24	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE4; pCE10 (diese Arbeit)
CE Y25	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE5; pCE10 (diese Arbeit)
CE Y31	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE43 (diese Arbeit)
CE Y32	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE44 (diese Arbeit)
CE Y33	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE45 (diese Arbeit)
CE Y34	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE46 (diese Arbeit)
CE Y35	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE47 (diese Arbeit)
CE Y36	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE48 (diese Arbeit)
CE Y37	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE49 (diese Arbeit)
CE Y38	Y187	Ade-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE50 (diese Arbeit)
CE Y40	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE43; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y42	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE44; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y44	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE45; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y46	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE46; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y48	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE47; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y50	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE48; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y52	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE49; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y54	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE50; pGADT7(negativ) (diese Arbeit)
CE Y55	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE43; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y56	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE44; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y57	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE45; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y58	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE46; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y59	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE47; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y60	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE48; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y61	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE49; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y62	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pCE50; pCE5 (diese Arbeit)
CE Y81	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pGADT7(positiv); pGBKT7(positiv) (Stefan Kutter)
CE Y82	AH109 Y187	Ade-, His-, diploid, Typ aa + pGADT7(negativ); pGBKT7(negativ) (Stefan Kutter)
SK Y1	AH109	Ade-, Met-, Leu-, His-, haploid, Mating Typ a für pGADT7 (<i>prey</i>)
SK Y2	Y187	Ade-, Met-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α für pGBKT7 (<i>bait</i>)
SK Y33	Y187	Ade-, Met-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE6 (Stefan Kutter)

SK Y22	Y187	Ade-, Met-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE7 (Stefan Kutter)
SK Y23	Y187	Ade-, Met-, Trp-, His-, haploid, Mating Typ α + pCE8 (Stefan Kutter)

2.1.3 Zelllinien

Tab. 2.4: eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung und Referenz
AGS	Humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739)
HEK-293	Humane primäre embryonale Nierenzellen transformiert durch Adenovirus Typ-5 (Graham et al., 1977)
HL-60	Humane promeolytische Leukämiezellen (Collins et al., 1979)
GE-11	Humane β 1-Integrin-negative embryonale Epithelzell-ähnliche Zellen (Gimond et al., 1999)
GE-11-β1	Humane β 1-Integrin-positive embryonale Epithelzell-ähnliche Zellen (Gimond et al., 1999)

2.1.4 Plasmide und Vektoren

Tab. 2.5: Plasmide und Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pASK IBA43+	Expressionsplasmid unter Kontrolle des Tetracyclinpromotors; f_1 <i>ori</i> , Amp ^R ; MCS zur Expression eines <i>His-Tag</i> fusionierten Gens	IBA BioTAGnology, Göttingen
pDONR™207	Rekombinationsplasmid für die <i>Gateway</i> -Klonierung; <i>ccdB</i> -Kassette und <i>cam</i> ^R zwischen <i>attP1</i> und <i>attP2</i> -Sequenzen für die Rekombination mit <i>attB1</i> und <i>attB2</i> -Sequenzen; pUC <i>ori</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pGADT7	μ <i>ori2</i> , pUC <i>ori</i> , P _{ADH1} , P _{T7} , SV40 NLS, GAL4-AD, T _{ADH1} , LEU2, Amp ^R	Clontech, Kalifornien, USA
pGBKT7	μ <i>ori2</i> , pUC <i>ori</i> , <i>orf1</i> , P _{ADH1} , P _{T7} , GAL4-BD, T _{ADH1&T7} , TRP1, Kan ^R	Clontech, Kalifornien, USA
pRenilla	Rekombinationsplasmid für die <i>Gateway</i> Klonierung; <i>ccdB</i> -Kassette und <i>cam</i> ^R zwischen <i>attP1</i> und <i>attP2</i> -Sequenzen für die Rekombination mit <i>attB1</i> und <i>attB2</i> -Sequenzen; pUC <i>ori</i> , fusioniert die Gensequenz zwischen <i>attP1</i> und <i>attP2</i> an die <i>Renilla</i> Luciferase	Julia Schöpf
pTrex	Rekombinationsplasmid für die <i>Gateway</i> Klonierung; <i>ccdB</i> -Kassette und <i>cam</i> ^R zwischen <i>attP1</i> und <i>attP2</i> -Sequenzen für die Rekombination mit <i>attB1</i> und <i>attB2</i> -Sequenzen; pUC <i>ori</i> , fusioniert die Gensequenz zwischen <i>attP1</i> und <i>attP2</i> an Protein A	Julia Schöpf
pIB6	<i>E. coli</i> - <i>H. pylori</i> Shuttle-Plasmid, Kan ^R ; <i>alpA</i> Promotor-Region in Shuttle-Vektor pHel3; MCS zur Expression von Genen	Iris Barwig
pWS241	<i>H. pylori</i> Shuttle-Plasmid, Kan ^R ; <i>cagA</i> Promotor-Region; <i>H. pylori</i> P12 <i>cagA</i> zwischen <i>SpeI</i> und <i>SalI</i>	Wolfgang Fischer
pCE1	pGADT7 mit der Sequenz für ITGB1 PSI-Domäne zwischen <i>attB1</i> und	diese Arbeit

	<i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	
pCE2	pGADT7 mit der Sequenz für ITGB1 PSI + <i>I-like</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE3	pGADT7 mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE4	pGADT7 mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> + β - <i>tail</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE5	pGADT7 mit der Sequenz für ITGB1 β - <i>tail</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE6	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagA (N-terminal) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE7	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagY (C-terminal) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE8	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagI zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE9	pGADT7 mit der Sequenz für Negativkontrolle zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE10	pGBKT7 mit der Sequenz für Negativkontrolle zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE11	pDONR TM 207 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagA (N-terminal) zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE12	pDONR TM 207 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagY (C-terminal) zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE13	pDONR TM 207 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagI zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE14	pDONR TM 207 mit der Sequenz für ITGB1 PSI-Domäne zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE15	pDONR TM 207 mit der Sequenz für ITGB1 PSI + <i>I-like</i> -Domäne zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE17	pASK IBA43+ mit der Sequenz für ITGB1 β - <i>tail</i> -Domäne in <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pCE18	pASK IBA43+ mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> + β - <i>tail</i> -Domäne in <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pCE19	pASK IBA43+ mit der Sequenz für ITGB1 PSI- <i>I-like</i> -Domäne in <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pCE20	pRenilla mit der für Sequenz für <i>H. pylori</i> CagA (N-terminal) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE21	pRenilla mit der für Sequenz für <i>H. pylori</i> CagY (C-terminal) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE22	pRenilla mit der für Sequenz für <i>H. pylori</i> CagI zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE24	pRenilla mit der Sequenz für ITGB1 PSI-Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE25	pRenilla mit der Sequenz für ITGB1 β - <i>tail</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit

pCE26	pRenilla mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE27	pRenilla mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> + β - <i>tail</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE28	pRenilla mit der für ITGB1 PSI + <i>I-like</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE29	pRenilla mit der <i>ccdB</i> -Kassette und Cam ^R zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE30	pTrex mit der <i>ccdB</i> -Kassette und Cam ^R zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE31	pTrex mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagA (N-terminal) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE32	pTrex mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagY (C-terminal) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE33	pTrex mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> CagI zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE34	pTrex mit der Sequenz für ITGB1 PSI-Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE35	pTrex mit der Sequenz für ITGB1 β - <i>tail</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE36	pTrex mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> + β - <i>tail</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE37	pTrex mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE38	pTrex mit der Sequenz für ITGB1 PSI + <i>I-like</i> -Domäne zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Renilla Luciferase Assay</i>	diese Arbeit
pCE39	pIB6 mit <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i> zwischen <i>Sall</i> und <i>BglII</i>	diese Arbeit
pCE40	pIB6 mit <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i> (N-Terminaler <i>HA-Tag</i>) zwischen <i>Sall</i> und <i>BglII</i>	diese Arbeit
pCE41	pGEMTeasy mit flankierenden Bereichen von <i>hopQ</i> , Cam ^R -Kassette zur Deletion von <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i>	Elena Ebelogolova
pCE42	pIB6 mit <i>H. pylori</i> Tx30a <i>hopQ</i> (N-Terminaler <i>HA-Tag</i>) zwischen <i>Sall</i> und <i>BglII</i>	diese Arbeit
pCE43	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 1-400) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE44	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 1-300) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE45	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 1-200) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE46	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 1-100) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE47	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 200-600) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE48	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 300-600) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE49	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 400-	diese Arbeit

	600) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	
pCE50	pGBKT7 mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 500-600) zwischen <i>attB1</i> und <i>attB2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE51	pASK IBA43+ mit der Sequenz für <i>H. pylori</i> 26695 CagA (kodierend für AS 303-404) in <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i>	diese Arbeit
pCE52	pDONR TM 207 mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE53	pDONR TM 207 mit der Sequenz für ITGB1 EGF <i>repeats</i> + β -tail-Domäne zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit
pCE54	pDONR TM 207 mit der Sequenz für ITGB1 β -tail-Domäne zwischen <i>attL1</i> und <i>attL2</i> für <i>Yeast Two Hybrid Assay</i>	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm, D) bezogen. In Tabelle 2.6 sind die Sequenzen (von 5' nach 3'), der Verwendungszweck, sowie eventuelle Schnittstellen oder andere Modifikationen der Oligonukleotide dargestellt.

Tab. 2.6: Oligonukleotide

Sequenz (5' nach 3'), Verwendungszweck und mögliche Schnittstellen bzw. Modifikationen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck und Referenz
CE5	GAG TTA TTT TAC CAC TCC CT	<i>sense</i> Primer zur Sequenzierung über die MCS von pASK IBA43+
CE6	CCG CAG TAG CGG TAA ACG	<i>antisense</i> Primer zur Sequenzierung über die MCS von pASK IBA43+
CE10	GAC ACC GGG ACC GAT CCA GC	<i>sense</i> Primer zur Sequenzierung von pTrex; Bindung bei Base 631
CE61	CAA TCA ATT GCG GTG GGA G	<i>sense</i> Primer zur Sequenzierung von <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i>
CE62	ACT TTT TAC AAC CAG CCA G	<i>sense</i> Primer zur Sequenzierung von <i>H. pylori</i> Tx30a <i>hopQ</i>
CE63	TGT GGA TAA CCG TAT TAC	<i>sense</i> Primer zur Sequenzierung über die MCS von pIB6
CE64	CGC TCC AAT TGC TGT AAC	<i>antisense</i> Primer zur Sequenzierung über die MCS von pIB6
CE67	GAT CGT CGA CAT GTA CCC ATA CGA TGT TCC AGA TTA CGC TAT GAA AAA AAC GAA AAA AAC	<i>sense</i> Primer mit SalI -Schnittstelle und HA -Tag zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> P12 und Tx30a <i>hopQ</i>
CE68	GAT CGT CGA CAT GAA AAA AAC GAA AAA AAC	<i>sense</i> Primer mit SalI -Schnittstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> P12 und Tx30a <i>hopQ</i>
CE69	GAT CAG ATC TTT TAA TAC GCG AAC ACA TAA	<i>antisense</i> Primer mit BglII -Schnittstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i>
CE70	GAT CAG ATC TTT TAA TAG GCA AAC ACA TAA	<i>antisense</i> Primer mit BglII -Schnittstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i>
CE71	AGA AAG CTG GGT CTA CAT CAC	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-

	GCC ATC ATG TTT TAG	Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 1-504)
CE72	AGA AAG CTG GGT CTA GAA ATC TAC TTT GTT TCG GAT	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 1-404)
CE73	AGA AAG CTG GGT CTA CAG AGC GTT ATT GTG AAT C	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 1-304)
CE74	AGA AAG CTG GGT CTA ATT TTT TTC TGC TTC TTG CC	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 1-204)
CE75	AGA AAG CTG GGT CTA ATC AAT GAG ATT GTC TTT GTT G	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 1-106)
CE76	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGA ATC TCA TTG ATG TAG AAT C	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 103-612)
CE77	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGC CTA CTG GTG GGG ATT GG	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 207-612)
CE78	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGG CTC TGT CTT CTG TGT TAA TG	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 303-612)
CE79	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGT TCA TGG AAT TTC TTG CAC	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 404-612)
CE80	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGG ATT ATT CTA ATT TCA AAT AC	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für die AS 507-612)
CE82	TGG TGA TAA AGG TCG TTA AAC CCG C	Bestätigung der Deletion von <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i> ; Bindung stromaufwärts des Gens
CE83	CGG CGA TGG AAC TAA ACT CTA AGG C	Bestätigung der Deletion von <i>H. pylori</i> P12 <i>hopQ</i> ; Bindung stromabwärts des Gens
CE96	GATC CTC GAG TAA TTG GTT GAA CTT GTA A	<i>antisense</i> Primer mit XhoI -Schnittstelle zur inversen Amplifikation von pWS241; Bindung innerhalb <i>H. pylori</i> P12 <i>cagA</i>
CE96	GATC CTC GAG GAA CTT CTT GCA CAA AAC	<i>sense</i> Primer mit XhoI -Schnittstelle zur inversen Amplifikation von pWS241; Bindung innerhalb <i>H. pylori</i> P12 <i>cagA</i>
LJ67	ATG GTA GGT CTC AGG CCA TGA ATT TAC AAC CAA TTT TCT GGA TT	<i>sense</i> Primer mit BsaI -Erkennungssequenz zur Amplifikation des extrazellulären Bereichs des ITGB1 ab dem Startcodon
LJ68	ATG GTA GGT CTC AGC GCT GAT GTC TGG ACC AGT GGG ACA C	<i>antisense</i> Primer mit BsaI -Erkennungssequenz zur Amplifikation des extrazellulären Bereichs des ITGB1
LJ69	ATG GTA GGT CTC AGC GCT TCC TTT GCT ACG GTT GGT TAC ATT	<i>antisense</i> Primer mit BsaI -Erkennungssequenz zur Amplifikation der PSI-Domäne des extrazellulären Bereichs

		von ITGB1
LJ70	ATG GTA GGT CTC AGG CCG TAA CCA ACC GTA GCA AAG GAA C	<i>sense</i> Primer mit Bsal -Erkennungssequenz zur Amplifikation der <i>I-like</i> -Domäne des extrazellulären Bereichs von ITGB1
LJ71	ATG GTA GGT CTC AGC GCT ATC CTT TTT TGG ACA CTT ATT TGA AG	<i>antisense</i> Primer mit Bsal -Erkennungssequenz zur Amplifikation der <i>I-like</i> -Domäne des extrazellulären Bereichs von ITGB1
LJ72	ATG GTA GGT CTC AGG CCT CAG AAG GAG TAA CAA TAA GTT ACA A	<i>sense</i> Primer mit Bsal -Erkennungssequenz zur Amplifikation der EGF <i>repeats</i> des extrazellulären Bereichs von ITGB1
LJ73	ATG GTA GGT CTC AGC GCT AAA CTT CGG ATC TGT ACA CTT ACA G	<i>antisense</i> Primer mit Bsal -Erkennungssequenz zur Amplifikation der EGF <i>repeats</i> des extrazellulären Bereichs von ITGB1
LJ74	ATG GTA GGT CTC AGG CCT GTC GTG TGT GTG AGT GCA ACC	<i>sense</i> Primer mit Bsal -Erkennungssequenz zur Amplifikation der β - <i>tail</i> -Domäne des extrazellulären Bereichs von ITGB1
RB63	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGA TCA TAG CTC TAG ATA AAC TCA TAG GC	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagY</i> (kodierend für den C-terminalen Bereich)
RB64	AGA AAG CTG GGT CTA ATT GCC ACC TTT GGG GCT	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagY</i> (kodierend für den C-terminalen Bereich)
RB87	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGA TAA CGC TTG AAC CCG CC	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagl</i>
RB88	AGA AAG CTG GGT CTA TTT GAC AAT AAC TTT AGA GCT AGC AAT	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagl</i>
RB101	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGA CTA ACG AAA CTA TTG ATC AAA CA	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für den N-terminalen Bereich)
RB102	AGA AAG CTG GGT CTA CAC CTC GTC ATA GTT GCC TGT GCT TTT	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von <i>H. pylori</i> 26695 <i>cagA</i> (kodierend für den N-terminalen Bereich)
SK5	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGA ATT TAC AAC CAA TTT TCT GG	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von ITGB1 PSI-Domäne
SK6	AGA AAG CTG GGT CTA TCC TTT GCT ACG GTT GGT TAC	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von ITGB1 PSI-Domäne
SK7	AGA AAG CTG GGT CTA ATC CTT TTT TGG ACA CTT ATT TC	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von ITGB1 PSI + <i>I-like</i> -Domäne
SK5	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGT CAG AAG GAG TAA CAA TAA G	<i>sense</i> Primer mit internen Sequenz der attB1-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von ITGB1 EGF <i>repeats</i>
SK9	AGA AAG CTG GGT CTA AAA CTT CGG ATC TGT ACA C	<i>antisense</i> Primer mit internen Sequenz der attB2-Rekombinationsstelle zur Amplifikation von ITGB1 EGF

		<i>repeats</i>
SK10	AAA AAG CAG GCT CCG CCA TGT GTC GTG TGT GTG AGT GCA ACC	sense Primer mit internen Sequenz der attB1- Rekombinationsstelle zur Amplifikation von ITGB1 β -tail- Domäne
SK11	AGA AAG CTG GGT CTA GAT GTC TGG ACC AGT GGG ACA C	antisense Primer mit internen Sequenz der attB2- Rekombinationsstelle zur Amplifikation von ITGB1 β -tail- Domäne
VK9	GAT CCT CGA GTT TAG ACA ACA AGG AAT TGG	sense Primer mit XhoI-Schnittstelle zur Amplifikation der stromaufwärts Region von <i>sabB1</i>
VK12	GAT CCC GCG GAA GGT GGT CCA TAA TGA G	antisense Primer mit SacI-Schnittstelle zur Amplifikation der stromabwärts Region von <i>sabB1</i>
VK13	GAT CCT CGA GTA TAG TAT AGT AAA ACA TCG	antisense Primer XhoI-Schnittstelle zur Amplifikation der stromaufwärts Region von <i>sabB2</i>
VK16	GAT CCC GCG GCA AGA AAT GTT GCA AAG TG	antisense Primer SacI-Schnittstelle zur Amplifikation der stromabwärts Region von <i>sabB2</i>
VK32	GTA ACA TGG AAG ACA TGG ATG	sense Primer Analyse der Signalsequenz von <i>sabB1</i>
VK33	GTA ACA TGG AAG ACA TGG ATG	sense Primer Analyse der Signalsequenz von <i>sabB2</i>
VK34	GCC GAA TCA ATC CGA TTA CC	antisense Primer Analyse der Signalsequenz von <i>sabB1</i> und 2
attB1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT	sense Primer mit externen Sequenz der attB1- Rekombinationsstelle
attB2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT	sense Primer mit externen Sequenz der attB2- Rekombinationsstelle

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Tab. 2.7: primäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung / Bezugsquelle
AK 175	Polyklonales Antiserum gegen intakte <i>H. pylori</i> Zellen (Kaninchen)
α-CagA (AK257)	Polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen CagA-Bereich von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer)
α-CagA (AK268)	Polyklonales Antiserum gegen die N-terminale Hälfte des CagA-Proteins von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer)
α-CagY (AK273)	Polyklonales Antiserum gegen das CagY-Protein (AS 351-1311) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (Rohde et al. 2003)
α-CagI (AK250)	Polyklonales Antiserum gegen das CagI-Protein von <i>H. pylori</i> (Kaninchen) (W. Fischer)
α-AlpA (AK214)	Polyklonales Antiserum gegen ein AlpA-Fusionsprotein (Kaninchen)

α-AlpB (AK262)	Polyklonales Antiserum gegen ein AlpB-Fusionsprotein von <i>H. pylori</i> 26695 (Kaninchen) (Odenbreit et al., 2002)
α-BabA (AK277)	Polyklonales Antiserum gegen ein BabA-Fusionsprotein (Kaninchen)
α-BabB (AK276)	Polyklonales Antiserum gegen ein BabB-Fusionsprotein (Kaninchen)
α-BabC (AK275)	Polyklonales Antiserum gegen ein BabC-Fusionsprotein (Kaninchen)
α-SabA (AK278)	Polyklonales Antiserum gegen ein SabA-Fusionsprotein (Kaninchen)
α- RecA (AK263)	Polyklonales Antiserum gegen das RecA-Protein von <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen) (Fischer and Haas, 2004)
α-His	Monoklonaler Antikörper gegen das Hexamer der Aminosäure Histidin (Maus), GeneScript (Piscataway, USA)
α-HA	Polyklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop (Kaninchen), Antikörper-Online (Aachen, D)
α-GST	Monoklonaler Antikörper gegen das Glutathion-S-Transferase Protein (Maus), Sigma (Aachen, D)
α-P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper gegen Tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus), Santa Cruz Technologies (Santa Cruz, USA)
α-P-Tyr (4G10)	Monoklonaler Antikörper gegen Tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus), Upstate (Millipore, Schwalbach, D)
α-human β1-Integrin MAB 1981 (LM534)	Monoklonaler Antikörper gegen das humane β 1-Integrin (Maus), Millipore (Schwalbach, D)
α-humanβ1-Integrin (AIIB2)	Polyklonaler Antikörper gegen das humane β 1-Integrin (Ratte) (L.Jimenez-Soto)
α-human β1-Integrin (9EG7)	Monoklonaler Antikörper gegen das humane und murine β 1-Integrin (Ratte), Calbiochem (Darmstadt, D)

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.8: sekundäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung / Bezugsquelle
α-Maus IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) (Dianova, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
α-Kaninchen IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
α-Maus IgG-AP	Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

α-Kaninchen IgG-Alexa₄₈₈	Alexa-Fluor ₄₈₈ -gekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG; Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, USA)
α-Kaninchen IgG-Alexa₅₅₅	Alexa-Fluor ₅₅₅ -gekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG; Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, USA)
α-Maus IgG-Alexa₄₈₈	Alexa-Fluor ₄₈₈ -gekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen Maus-IgG; Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, USA)
α-Ratte IgG-Alexa₄₈₈	Alexa-Fluor ₄₈₈ -gekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen Ratte-IgG; Molecular Probes/Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.7 Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien wurden mit entsalztem und filtriertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D) hergestellt und in einem Wasserdampf Hochdruckautoklaven Sterimaquet™ (Maquet/Getinge, Rastatt, D) für 20 Min bei 121°C und $1,013 \times 10^5$ Pascal Überdruck sterilisiert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 µm Porengröße; Millipore, Schwalbach, D) und den jeweiligen Nährmedien nach dem Autoklavieren bei einer maximalen Temperatur von 55°C unter sterilen Bedingungen beigelegt.

2.1.7.1 Nährmedien für Bakterien

Tab. 2.9: Nährmedien

Nährmedium	Herstellung und Bezugsquelle
LB-Flüssigmedium	20g/l Lennox-L-Medium (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA), autoklaviert
LB-Platten	32 g/l Lennox-L-Agar (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA), autoklaviert
Brucella-Medium (<i>Brucella Broth</i>; BB)	28 g/l Brucella Broth (Falcon BD, Franklin Lakes, USA), autoklaviert
Serumplatten	36 g/l GC-Agar-Basis (Oxoid, Darmstadt, D), autoklaviert, nachträglich Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix, 80 ml/l Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprin, 1 mg/l Nystatin
Vitaminmix	100 g/l α-D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3

	mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l Nicotinamidadeninindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l LCystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil
--	---

2.1.8 Hemmstoffe und Medienzusätze

Chloramphenicol und Nystatin wurden von Merck (Darmstadt, D), alle weiteren Antibiotika und Zusätze von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tab. 2.10: Hemmstoffe und Medienzusätze

Medienzusätze	Abkürzung	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Amp	H ₂ O	100 µg/ml
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-Dgalactopyranosid	X-Gal	H ₂ O	40 µg/ml
Chloramphenicol	Cam	EtOH	30 µg/ml (<i>E. coli</i>) 6 µg/ml (<i>H. pylori</i>)
Diaminopimelinsäure	DAP	H ₂ O	14 µg/ml
Erythromycin	Erm	EtOH	250 µg/ml (<i>E. coli</i>) 10 µg/ml (<i>H. pylori</i>)
Gentamycin	Gen	H ₂ O	10 µg/ml (<i>E. coli</i>)
Kanamycin	Kan	H ₂ O	50 µg/ml (<i>E. coli</i>) 8 µg/ml (<i>H. pylori</i>)
Nystatin	Nys	-	440 µl/l (<i>H. pylori</i>)
Trimetoprim		H ₂ O	5 µg/ml
Vancomycin	Van	H ₂ O	10 µg/ml
Leucin	Leu	H ₂ O	100 mg/l
Tryptophan	Trp	H ₂ O	20 mg/l
Adenin	Ade	H ₂ O	30 mg/l
3-Amino-1,2,4-Triazol	3-AT	H ₂ O	2,5 mM

2.1.9 Zellkulturmedien und –puffer

Alle verwendeten Zellkulturmedien und –puffer wurden von der Firma Gibco (BRL) bezogen.

Tab. 2.11: Zellkulturmedien

Zelllinie	Zellkulturmedium	Einfriermedium	Beschreibung
AGS	RPMI 10% FCS 2 mM Glutamin	70% RPMI 20% FCS 10% DMSO	RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin
HEK-293	DMEM 10% FCS 2 mM Glutamin	85% DMEM 10% FCS 5% DMSO	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit Natriumpyruvat und Pyridoxin
GE-11	DMEM (high glucose 4,5 g/l) 10% FCS 2 mM Glutamin	85% DMEM (high glucose 4,5 g/l) 10% FCS 5% DMSO	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit Natriumpyruvat und Pyridoxin
GE-11-β1	DMEM (high glucose 4,5 g/l) 10% FCS 2 mM Glutamin	85% DMEM (high glucose 4,5 g/l) 10% FCS 5% DMSO	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit Natriumpyruvat und Pyridoxin
HL-60	RPMI Superior 10% FCS 2 mM Glutamin	70% RPMI Superior 20% FCS 10% DMSO	RPMI 1640 Superior Medium mit L-Glutamin

Tab. 2.12: Zellkulturzusätze und Puffer

Medium- bzw. Zusatz und Puffer	Beschreibung
PBS	PBS Dulbeccos's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat
DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Zeocin	Invitrogen / GIBCO, BRL

2.1.10 Enzyme und Proteine

Tab. 2.13: Enzyme und Proteine mit der jeweiligen Bezugsquelle

Enzym / Protein	Firma
Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gateway® BPII Clonase® Enzyme Mix	Invitrogen, Carlsbad, USA
Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNaseI	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Takara-Taq-Polymerase	TaKaRa Bio Inc., Otsu, J
Expand High Fidelity Taq-Polymerase	Roche Grenzach-Wyhlen, D
Pfu-Polymerase	Roche Grenzach-Wyhlen, D
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, A
Pferdeserum	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen/Gibco, Carlsbad, USA
Lysozym	Roche Grenzach-Wyhlen, D
Restriktionsenzyme	Roche, Grenzach-Wyhlen, D; NEB Frankfurt a.M., D

T4-DNS-Ligase	Roche Grenzach-Wyhlen, D
---------------	--------------------------

2.1.11 Molekulargewichtsmarker

Tab. 2.14: Molekulargewichtsmarker

Anwendung	Marker und Bezugsquelle
DNS-Gelelektrophorese	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D)
DNS-Gelelektrophorese	O'GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, ready to use (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Prestained High Range 161-0373 (Bio-Rad, Hercules, USA)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Prestained Protein Molecular Weight Marker, SM0441 (MBI Fermentas, St. Leon-Roth, D)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (MBI, Fermentas, St. Leon-Roth)

2.1.12 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%) (Roth, Karlsruhe, D), Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Ammoniumsulfat (Roth, Karlsruhe, D), Ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ATP (Roche, Grenzach-Wyhlen, D), 5-Brom-3-chlor-3'-indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP) (Roth, Karlsruhe, D), Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, D), Brucella-Medium (Becton Dickinson, Heidelberg, D), Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Grenzach-Wyhlen, D), Chloramphenicol (Serva, Heidelberg, D), Cholesterol (Invitrogen Gibco®, Carlsbad, USA), 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimidmetho-p-toluensulfonat (CMC) (Chemicell, Berlin, D), Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat Mix (dNTPs) (Roche, Grenzach-Wyhlen, D), Diaminopimelinsäure (DAP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Fluoroprep™ (BioMérieux, Lausanne, CH), GC-Agar (Oxoid, Darmstadt, D), Glyzerin (Roth, Karlsruhe, D), Kanamycin (Merck, Darmstadt, D), Lennox-L-LB-Agar (Invitrogen, Carlsbad, USA), Leupeptin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Methylenblau (Serva, Heidelberg, D), Natriumlaurylsulfat (SDS) (Roth, Karlsruhe, D), NNN'N'Tetramethylendiamid (TEMED) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT) (Roth, Karlsruhe, D), PBS Dulbecco's (Invitrogen, Carlsbad, USA), Pepstatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Paraformaldehyd (PFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), RPMI 1640-Medium mit Glutamin (Invitrogen, Carlsbad, USA), Tetracyclin (Roche, Grenzach-Wyhlen), Trimethoprim (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Triton X 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Trypan Blau

(Invitrogen, Carlsbad, USA), Tween20 (Serva, Heidelberg, D), Vancomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Western Lightning™ Detektionsreagenz (Perkin Elmer Life Science, Schwerzenbach, CH), X-Gal (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Alle weiteren organischen und anorganischen Chemikalien wurden von Merck, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen. Spezielle Reagenzien werden mit den Methoden aufgeführt.

2.1.13 Kommerziell erwerbbaare Kits

Tab. 2.15: Kommerziell erwerbbaare Kits

Kit	Firma
illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE-Healthcare, Buckinghamshire, UK
QIAprep Spin Miniprep Kit™	Qiagen, Hilden, D
QIAamp DNA Mini Kit™	Qiagen, Hilden, D
TOPO-TA-Cloning™-Kits mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor	Invitrogen, Carlsbad, USA
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Madison, USA
Renilla Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA

2.1.14 Hilfsmittel

Adhesive Plate Seals (ABgene, Epsom, Surrey, UK), Deckgläser (Menzel, Braunschweig, D), 96-DeepWell-Block (2,2ml) (ABgene, Epsom, Surrey, UK), 96-DeepWell-Block (1,2ml) (ABgene, Epsom Surrey, UK), Dialyseschläuche (Medicell, London, UK), Einfrierröhrchen (Nalgene, Wiesbaden, D), Einmal-Spritzen Omnifix® 50 ml, 25 ml, 5 ml (Braun, Melsungen, D) Elektroporationsküvetten (Eurogenetec, Köln, D), Eppendorfgeläße (Eppendorf, Hamburg, D), Expositionskassetten für Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart, D), Falcon Röhrchen 15ml, 50ml (Falcon, BD, Franklin Lakes, USA), Filterpapiere (Whatman, Brentford, UK), Gas permeable adhesive seals (ABgene, Epsom, Surrey, UK), Glasperlen 3mm (Omnilab, Bremen, D), Halbmikroküvetten (Brand, Wertheim, D), Magnetische Kugeln *SiMAG-Carboxyl magnetic beads* (Chemicell, Berlin, D), Pipetten und -einmalspitzen (Gilson, Middleton, USA), Petrischalen (Greiner, Kremsmünster, A), PVDF-Membran (Bio-Rad, Hercules, USA), Nitrocellulose-Filter (Millipore, Schwalbach, D), Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen, D), Röntgenfilme Super RX (Fuji Film, Düsseldorf, D), Snake Skin Dialysis Tubing 3,5 MWCO (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA), Quick-Seal™-Röhrchen (Beckmann Coulter Inc., Fullerton, USA), Zellkulturflaschen/-schalen (Falcon BD, Franklin

Lakes, USA), 0,2 µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH, Aindling), Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, D) Zellschaber (Falcon, BD, Franklin Lakes, USA).

2.1.15 Apparaturen und Geräte

Agarosegelkammern Wide Mini-Sub® cell (Bio-Rad, Hercules, USA), Anaerobiertöpfe (Fritz Gößner GmbH, Hamburg, D) Anaerobenbrutschrank Microincubator MI22C (Scholzen, Wittenbach, CH), Brutschränke FED (Binder, D), Durchflusszytometer (BD), Elektroporationsgerät Gene Pulser™ (Bio-Rad, Hercules, USA), Fluoreszenzmikroskop Leitz MDRD (Leica), French Press SIM-AMINCO (Spectronic Instruments, Rochester, USA), -80°C Gefriertruhe (Heraeus, D), Geldokumentationssystem Quantity One 4.4.0 (BioRad, Hercules, USA), Gelelektrophoresesystem Mini-Protean IITM (Bio-Rad, Hercules, USA), Heizblöcke (Techne, Staffordshire, UK), Kühlschrank (Liebherr, Biberach a.d. Riss, D), Magnetrührer mit Heizung MR 3001 (Heidolph, Schwabach, D), Mikrowelle (AEG, Nürnberg, D), pH-Meter ProfilLine pH 197i (WTW, Weilheim, D), Photometer Libra S12 (Biochrom), Rollmischer (Assistent), Schüttelinkubatoren Certomat R BS-1 (Braun Biotech/Sartorius BBI Systems, Göttingen, D), Schüttler (Eppendorf, D), Spannungsquellen Power Pac 300 (BioRad, Hercules, USA), Sterile Werkbank (BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen), Thermocycler Microcycler Personal (Perkin Elmer, Eppendorf), Ultraschallgerät Sonifier II 450 (G. Heinemann, Ultraschall- u. Labor-geräte, Schwäbisch Gmünd, D), Ultrazentrifuge Optima™ TL (Rotoren TLA45) (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA), Vakuumzentrifuge Savant SpeedVac DNA 110 (GMI, Ramsey, USA), Tischzentrifugen (Megafuge 1.0R, Biofuge 15R, Biofuge 15) (Heraeus, Hanau, D), Vortex Gene 2 (Scientific Industries), Waagen (Biotech Fischer, Reiskirchen D), Wasserbäder 1012 (GFL, Burgwedel, D), Western Blot-Apparatur *semi-dry* (Biotech Fischer, Reiskirchen D), Zentrifuge RC5C Plus (Rotoren SS34, SLA3000) (Sorvall, Langensfeld, D).

2.2. Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *Escherichia coli*

E. coli-Stämme wurden nach Bedarf auf festem bzw. in flüssigem Luria-Bertani (LB) Komplexmedium kultiviert, welches bei Bedarf nach dem Autoklavieren mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Die Inkubation der Bakterien erfolgte anschließend aerob bei 37°C in einem Brutschrank bzw. Schüttelinkubator (180 rpm). Die Anzucht von *E. coli* zur Proteinexpression wurde bei Temperaturen von 27°C bis 37°C durchgeführt.

Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer LB-Agarplatte mit einem sterilen Wattestäbchen in 1 ml LB-Flüssigmedium mit 20% Glycerin resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

2.2.1.1.2 Kultivierung und Stammhaltung von *Helicobacter pylori*

H. pylori wurde auf Serumplatten, oder bei Bedarf auf Serum-Selektivplatten mit entsprechenden Antibiotika ein bis zwei Tage bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) im Inkubationsschrank (Scholzen) kultiviert. Für die Anzucht von Flüssigkulturen wurden die Bakterien in Brucella-Medium, welches mit 10% FCS bzw. Cholesterol (1:250 (v/v); Gibco/Invitrogen; Carlsbad, USA) versetzt wurde bei 80 rpm in einem Anaerobiertopf unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert.

Zur Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer dicht bewachsenen Serumplatte mit einem sterilen Wattestäbchen in 1 ml Brucella-Medium mit 20% Glycerin und 10% FCS resuspendiert und bei -70°C eingefroren. Die Reaktivierung aus der Gefrierkultur erfolgte durch Ausstreichen der *H. pylori*-Stämme auf Serumplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum. Die Bebrütung der Stämme wurde anschließend unter mikroaeroben Bedingungen bei 37°C für 48 h durchgeführt. Nach ein bis zwei Passagen auf jeweils frische Serumplatten wurden die Bakterien für Experimente eingesetzt.

2.2.1.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien

Zur Messung der optischen Dichte (OD) einer Bakteriensuspension wurde das Zellmaterial einer Bakterienkultur entweder von einer Agarplatte abgenommen und im gewünschten Medium bzw. 1 x PBS resuspendiert, oder es wurde ein Aliquot aus einer Flüssigkultur entnommen. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte nach entsprechender Verdünnung in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ (OD_{550}) gegen den jeweiligen Blindwert.

2.2.1.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* (Hanahan et al., 1983)

Chemisch kompetente Bakterienzellen wurden nach der Rubidium-Chlorid-Methode hergestellt. Dafür wurden 100 ml LB-Flüssigmedium mit einer Übernachtskultur *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD_{550} von 0,5 - 0,6 bei 37°C im Schüttelinkubator (180 rpm) kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis für 30 min gekühlt und mit Hilfe von Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4°C) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml des Puffers TFB I (30 mM Kaliumacetat CH_3COOK , 100 mM RbCl , 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 15% (v/v) Glycerin; pH 5,2 mit 0,2 M CH_3COOH eingestellt; sterilfiltriert) resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und nochmals zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 4 ml des Puffers TFB II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl ; 15% (v/v) Glycerin; pH 6,5 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert) resuspendiert, anschließend zu 50 μl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.1.1.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (Sambrook et al., 1989)

Die Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Hierzu wurden 1 μl Plasmid-DNS bzw. 5 μl eines Ligationsansatzes zu einem 50 μl Aliquot chemisch kompetenter Zellen, welche zuvor auf Eis aufgetaut wurden pipettiert. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 sec ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Nach einer Inkubation auf Eis für 1 min wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C aerob unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Darauf folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm. Das sedimentierte Zellmaterial wurde in 100 μl LB-Medium resuspendiert und zur Selektion auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37°C über Nacht.

2.2.1.1.6 Transformation von *E. coli* TOP10

Zur Steigerung der Transformationseffizienz bzw. zur Durchführung von TOPO® *cloning* wurden käuflich erwerbbar, superkompetente *E. coli* TOP10-Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.1.1.7 Transformation von *H. pylori*

Eine Vorbehandlung der *H. pylori* ist aufgrund der natürlichen Kompetenz des Bakteriums für die Aufnahme von DNS nicht notwendig. Für die Transformation wurden die Bakterien daher ohne Vorbehandlung in Brucella-Flüssigmedium mit 10% FCS resuspendiert und die Suspension auf eine OD₅₅₀ von 0,2 eingestellt. Aliquots von jeweils 1 ml der verdünnten Bakterien wurde mit 1 bis 3 µg DNS versetzt und ca. 4 bis 6 h bei 37°C und 10% CO₂ bebrütet. Anschließend wurde die Zellsuspension bei einem Zentrifugationsschritt von 4000 rpm für 5 min sedimentiert und das resuspendierte Bakterienpellet auf entsprechende Selektiv-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte unter mikroaeroben Bedingungen für 3 bis 5 Tage.

2.2.1.1.8 Elektroporation von *H. pylori* modifiziert nach Segal und Tompkins (Segal and Tompkins, 1993)

Für die Elektroporation von *H. pylori*-Zellen wurden diese in 1 ml sterilem 1 x PBS resuspendiert und die OD₅₅₀ der Suspension auf 1 pro ml eingestellt. Die Zellen wurden 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und jeweils einmal mit 500 µl 1 x PBS bzw. mit 500 µl Elektroporationspuffer (272 mM Saccharose; 15% (v/v) Glycerin; 2,43 mM K₂HPO₄; 0,57 mM KH₂PO₄) gewaschen. Nachdem das Zellpellet in 40 µl Elektroporationspuffer aufgenommen und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt wurde, erfolgte die Zugabe von 1 bis 2 µl der zu transformierenden Plasmid-DNS. Die Elektroporation der Zellen wurde in einer Gene Pulser™ Apparatur bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω durchgeführt. Nach dem elektrischen Puls wurden die Bakterien unmittelbar in 1 ml BB mit 10% FCS aufgenommen und in eine 12-Napfplatte überführt. Es erfolgte eine 4-stündige Inkubation bei 37°C und 10% CO₂. Anschließend wurde der Transformationsansatz 5 min bei 3000 rpm sedimentiert und das Bakterienpellet in ca. 100 µl des Überstands resuspendiert. Die Inkubation auf Selektiv-Agarplatten erfolgte für 3 bis 6 Tage unter mikroaeroben Bedingungen.

2.2.1.1.9 Konjugation von Plasmiden zwischen *E. coli* und *H. pylori*

Für die Übertragung von „Shuttle-Vektoren“ von *E. coli* zu *H. pylori* wurden der *E. coli*-Donorstamm β 2150, ein *E. coli*-Mobilisator-Stamm und ein *H. pylori*-Akzeptorstamm P76 verwendet. Der Donorstamm β 2150 wurde zuvor mit dem entsprechenden „Shuttle-Vektor“ transformiert. Als Mobilisator diente der *E. coli*-Stamm β 2150[pRK2013], dessen Plasmid pRK2013 *tra*-Gene enthält, die für den Konjugationsapparat kodierenden. Der erste Schritt besteht in der Übertragung des Plasmids pRK2013 vom Mobilisator auf den Donor durch Konjugation. Dadurch entsteht ein Konjugations-kompetenter Donorstamm, der den „Shuttle-Vektor“ in einem zweiten Konjugationsschritt an den *H. pylori*-Akzeptorstamm P76 weitergeben kann.

Die *E. coli*-Stämme β 2150 und β 2150[pRK2013] sind aufgrund einer Mutation defekt für die Diaminopimelinsäure (DAP)-Aminotransferase (Δ *dapA::erm*) und somit auxotroph für DAP. Dies ermöglicht eine Kontraselektion der entstandenen *H. pylori*-Transkonjuganten auf Selektivagar, welcher kein DAP enthält. *E. coli*-Transkonjuganten können aufgrund der Auxotrophie für DAP auf diesem Medium nicht wachsen.

Für den Konjugationsansatz wurden Donor- und Mobilisatorstamm auf LB-Agarplatten, supplementiert mit DAP ausgestrichen. Der *H. pylori*-Akzeptorstamm wurde auf entsprechenden Serumagarplatten ausgestrichen. Nach Resuspension der Stämme in jeweils 1 ml BB-Medium wurden für alle Stämme Verdünnungen mit einer OD₅₅₀ von 10 hergestellt und im Verhältnis 1:1:10 (Donor:Mobilisator:Akzeptor) zusammengeführt. Das Zellgemisch wurde sedimentiert (2 min, 3000 rpm) und resuspendiert. Nachdem die resuspendierten Bakterien auf einen Nitrozellulosefilter, aufgelegt auf eine Serumplatte getropft wurden, erfolgte eine Inkubation für 4 h bei 37°C und 10% CO₂. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml BB vom Filter abgespült, sedimentiert (2 min, 3000 rpm) und zur Selektion auf Serumagarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Bebrütung der Konjugationsansätze erfolgte unter mikroaeroben Bedingungen für 3 bis 6 Tage.

2.2.1.1.10 Immunfluoreszenzfärbung mit *H. pylori*

Für die Detektion von Oberflächenproteinen von *H. pylori* wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden *H. pylori*-Stämme in 1 ml PBS resuspendiert und nach Bestimmung der optischen Dichte auf eine OD₅₅₀ von 0,02 / ml verdünnt. Anschließend wurde 1 ml dieser Bakteriensuspension in einer 24-Napfschale bei 2500 rpm für 5 min auf ein Deckglas zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde abgesaugt und die sedimentierten Bakterien auf dem Deckglas mit einer Lösung von 3% PFA in 1 x PBS für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einmaligem

Waschen mit 1 x PBS, folgte eine Absättigung mit 10% FCS in 1 x PBS für 2 h bei 37°C. Der Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein wurde in der jeweiligen Verdünnung in 1 x PBS mit 10% FCS zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 3 bis 5 x mit 1 x PBS gewaschen und daraufhin für 45 min bei Raumtemperatur mit einem entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurde eine Kontrollfärbung der Bakterien mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:50000; 1 min) durchgeführt. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNS an und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau. Die Präparate wurden ein weiteres Mal mit 1 x PBS gewaschen, anschließend luftdicht in Fluoprep® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) eingebettet und bis zur mikroskopischen Analyse bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Leica). Die Bilder wurden digital abgespeichert und mit der Software Microsoft Power Point 2010 bearbeitet.

2.2.1.1.11 Isolierung von Membranvesikeln von *H. pylori*

Zur Isolierung äußerer Membranvesikel (OMV) von *H. pylori* wurden die Bakterien in einer Flüssigkultur (25 ml BB + 10%) mit einer OD_{550} von 0,2 angeimpft und über Nacht unter mikroaeroben Bedingungen unter Schütteln (80 rpm) kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Wachstum der Kultur über die Bestimmung der optischen Dichte, die jetzt zwischen 0,5 und 0,7 betragen sollte kontrolliert. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 20 min, 4°C) und der Überstand durch Sterilfiltrieren von restlichen Bakterien befreit. Nach Ultrazentrifugation (40000 rpm, 2h, 4°C) dieser Lösung wurden die sedimentierten OMVs in 100 µl sterilem destilliertem Wasser mit Proteaseinhibitoren resuspendiert.

2.2.1.2 Arbeiten mit Hefen

2.2.1.2.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte nach Bedarf entweder auf Vollmediumagarplatten (YPD-Medium), oder auf Minimalmediumagarplatten (SD-Base) unter aeroben Bedingungen bei 30°C in einem Brutschrank. Für Flüssigkulturen wurden die Hefen in entsprechendem Medium ohne Zugabe von Agar ebenfalls aerob bei 30°C in einem Schüttelinkubator (180 rpm) kultiviert. Die Selektion von Hefen, die ein Expressionsplasmid enthalten wurde auf Minimalmedium, mit dem jeweiligen Mangel an der zu selektierenden Aminosäure (Leucin oder Tryptophan) durchgeführt.

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt, wofür 600 µl einer gut gewachsenen Flüssigkultur mit 500 µl 80% Glycerin (sterilfiltriert) gemischt wurden. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.1.2.2 Bestimmung der optischen Dichte von Hefen

Für die Messung der optischen Dichte von Hefen wurde eine Zellsuspension mit der entsprechenden Verdünnung in Kunststoffküvetten überführt. Die optische Dichte wurde anschließend in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD_{600}) gegen den jeweiligen Blindwert bestimmt.

2.2.1.2.3 Herstellung kompetenter Hefen

Zur Herstellung kompetenter Hefen wurden 600 ml YPD-Medium mit 25 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Nachdem die Kultur bei 30°C ca. 4,5 h bis zu einer OD_{600} von 0,6 gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation (930 x g, 5 min, 4°C) sedimentiert und das Zellpellet zunächst in SBEG-Lösung (1 M Sorbitol, 10 mM Bicine pH=8,35, 3% PEG, sterilfiltriert) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 12 ml SBEG-Lösung aufgenommen. Die Hefesuspension wurde in 100 µl aliquotiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.1.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von kompetenten Hefestämmen für den *Yeast Two Hybrid Assay* erfolgte mit einer Hitzeschock-Methode. Hierzu wurden 5 µl Plasmid-DNS zu einem Aliquot kompetenter Hefen gegeben und der Ansatz mit 750 µl PEG/Bicine-Lösung (40% PEG, 200 mM Bicine pH=8,35, sterilfiltriert) gemischt. Nach einer Inkubation bei 30°C für 1 h wurde ein Hitzeschock bei 45°C für 5 min durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2700 x g, 2 min) sedimentiert und das Hefepellet in 1 ml NB-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Bicine pH=8,35, sterilfiltriert) resuspendiert. Ein Aliquot von 200 µl des Ansatzes wurde auf die entsprechenden Selektiv-Agarplatten ausplattiert und für 3 bis 6 aerob Tage inkubiert.

2.2.1.2.5 Herstellung diploider Hefestämme nach Uetz (Uetz et al., 2006)

Hefezellen können sowohl haploid, als auch diploid vorkommen. Zur Generierung diploider Hefestämme wurde das „*mating*“-Verfahren angewendet bei dem man sich die beiden Paarungstypen a und α von *S. cerevisiae* zunutze macht. Die haploiden *S.*

cerevisiae-Stämme AH109 und Y187 stellen entweder den Paarungstyp a (AH109) oder α (Y187) dar.

In einem ersten Schritt wurden die haploiden *S. cerevisiae*-Stämme mit den entsprechenden Expressionsplasmiden, die in „prey“ (pGADT7) und „bait“ (pGBKT7) unterschieden werden transformiert (s. 2.2.1.2.4.). Das „prey“-Plasmid wird für die Transformation des Stammes AH109 verwendet und kodiert für die Gene der Leucin Biosynthese, wohingegen das „bait“-Plasmid für die Transformation des Stammes Y187 verwendet wird und Gene für die Tryptophan Biosynthese enthält. Somit konnten die haploiden, Expressionsplasmid-tragenden *S. cerevisiae*-Stämme auf Minimalmedium, dem die entsprechende Aminosäure fehlt selektiert werden. Für das „mating“ wurden jeweils 5 μ l der generierten haploiden *S. cerevisiae*-Stämme des Paarungstyps a bzw. α auf einer Vollmedium-Agarplatte vereinigt und für 24 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Zellmaterial von der Agarplatte abgenommen und in Doppelselektivmedium, dem Leucin und Tryptophan (SD –Leu/-Trp) fehlen zur Selektion diploider Hefezellen resuspendiert. Für eine vollständige Selektion diploider *S. cerevisiae*-Stämme wurde die Flüssigkultur zwei- bis dreimal in Doppelselektivmedium passagiert, bevor die Kultur für weitere Experimente oder zur Stammhaltung verwendet wurde.

2.2.1.2.6 Protein-Interaktionstest in *S. cerevisiae* nach Busler (Busler et al., 2006)

Eine mögliche Interaktion von Proteinen, die in der Hefezelle entweder durch das „prey“- oder „bait“-Plasmid kodiert werden, wurde durch einen Wachstumstest der für Histidin auxotrophen *S. cerevisiae*-Stämme auf Dreifachselektivmedium, dem zusätzlich zu Leucin und Tryptophan auch Histidin fehlt (SD –Leu/-Trp/-His) bestimmt. Die „prey“- oder „bait“-Proteine sind jeweils entweder an die Aktivierungs- („prey“) oder DNS-Bindedomäne („bait“) des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen „prey“ und „bait“ führt somit zur Rekonstitution des Gal4-Transkriptionsfaktors in diesen Hefen, wodurch die Histidinbiosynthese induziert wird und folglich das Wachstum auf dem Dreifachselektivmedium ermöglicht wird.

Für den Protein-Interaktionstest wurden die generierten diploiden Hefestämme in Flüssigmedium (SD –Leu/-Trp) 2 bis 3 Tage kultiviert und weitergeführt. Nach dem Verdünnen der Hefesuspension auf eine OD₆₆₀ von 0,26/100 μ l wurden Verdünnungsreihen von 10⁻¹ bis 10⁻³ angesetzt und davon 10 μ l pro Verdünnungsstufe (in 3 Parallelen) einmal auf SD –Leu/Trp- und einmal auf SD –Leu/-Trp/-His-Agarplatten getropft. Die Ansätze wurden anschließend bei 30°C im Brutschrank inkubiert und das Wachstum nach 3 bis 6 Tagen ermittelt. Die Lebensfähigkeit der eingesetzten diploiden *S. cerevisiae*-Stämme wurde durch Wachstum der Hefen auf SD –Leu/Trp Medium bestätigt.

2.2.2 Genetische und molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von DNS

2.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* nach Holmes und Quigley (Holmes and Quigley, 1981)

Die von Holmes und Quigley etablierte Kochpräparation von Plasmid-DNS aus *E. coli* ist eine kostengünstige Variante für analytische Untersuchungen der isolierten DNS.

Hierzu werden *E. coli*-Zellen auf einem Sechstel einer selektiven LB-Agarplatte über Nacht bei 37°C kultiviert und die Bakterien anschließend mit einer sterilen Impföse abgenommen. Das Zellmaterial wird in 300 µl STET-Puffer (8% Saccharose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 15 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml in STET-Puffer gelöst) mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Durch Aufkochen der Bakterien bei 100°C werden die Zellen lysiert und chromosomale DNS, Proteine sowie Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 10000 x g) sedimentiert. Die in Lösung gebliebene Plasmid-DNS wurde vom Sediment getrennt, indem dieses mit einem sterilen Zahnstocher entfernt wurde. Durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und 20-minütiger Inkubation bei -20°C wurde die DNS gefällt. Anschließend wurde die gefällte DNS zentrifugiert (10 min, 10000 x g) und das DNS-Pellet mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 10000 x g) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die präzipitierte DNS für 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die sedimentierte Plasmid-DNS wurde anschließend in 50 µl sterilem destilliertem Wasser resuspendiert.

2.2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* für präparative Zwecke erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, D) nach Herstellerangaben.

2.2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus *H. pylori*

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNS aus *H. pylori* wurde das Wizard™ Plus SV Miniprep Kit von Promega (Madison, USA) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Plasmid-DNS wurde mit 50 µl sterilem destilliertem Wasser gelöst.

2.2.2.1.4 Isolierung chromosomaler DNS aus *H. pylori*

Die Isolierung chromosomaler DNS aus *H. pylori* erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QIAamp Tissue Kit der Firma QIAgen (Hilden, D).

H. pylori-Zellen wurden dafür über Nacht bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und anschließend mit einer sterilen Impföse von der Serumagarplatte abgenommen. Die chromosomale DNS wurde mit 100 bis 200 µl sterilem destilliertem Wasser eluiert.

2.2.2.2 Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNS nach Sambrook (Sambrook et al., 1989)

DNS-Fragmente wurden für präparative und analytische Zwecke nach Sambrook *et al.* (1989) auf horizontalen 1-2%igen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) für ca. 50 min bei 70 V aufgetrennt. Vor dem Beladen der Agarosegele wurden die DNS-Proben mit ¼ Volumen GEBS-Puffer (20% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (w/v) N-Laurylsarcosyl) versetzt. Die Bestimmung der DNS-Fragmentgrößen erfolgte mit Hilfe des mitgeführten DNS-Längen-Standard (s. Tab. 2.15).

Für analytische Aussagen wurden die Nukleinsäurefragmente in den Agarosegelen anschließend in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) angefärbt. Die Dokumentation wurde unter UV-Exposition bei 260 nm mit Hilfe eines Videosystems (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad) durchgeführt.

Im Zuge präparativer Aufreinigung von DNS wurden die Agarosegele nach erfolgter Auftrennung mit einer 0,1% Methylenblau-Lösung (1 g/l Methylenblau) gefärbt. Die anschließende Entfärbung des Gels erfolgte mit Wasser, wodurch die blau angefärbten DNS-Fragmente auf einem Durchlichttisch sichtbar wurden und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden konnten.

2.2.2.3 Extraktion von DNS aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung von DNS-Fragmenten in Agarosegelen wurden die DNS-Banden durch Methylenblau-Färbung sichtbar gemacht und ausgeschnitten (siehe 2.2.2.2). Die Extraktion der DNS-Fragmente aus dem Gel erfolgte anschließend mit dem illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit nach Herstellerangaben (GE Healthcare). Die Elution der DNS erfolgte durch Zugabe von 30-50 µl sterilem destilliertem Wasser.

2.2.2.4 Aufreinigung von DNS aus enzymatischen Reaktionen

Zur Aufreinigung von DNS aus enzymatischen Reaktionen wurde nach Herstellerangaben das illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit von GE Healthcare eingesetzt. Die Elution der DNS erfolgte durch Zugabe von 30-50 µl sterilem destilliertem Wasser.

2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die spezifische Amplifizierung von DNS-Fragmenten wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt (Maniatis et al., 1982; Mullis et al., 1986). Diese *in vitro*-Methode zur spezifischen Amplifikation ausgewählter Genabschnitte benötigt zwei Oligonukleotide (18-25 bp), die nach Hitzedenaturierung des DNS-Doppelstranges gerichtet an den jeweils komplementären DNS-Einzelstrang (*Template*) binden (*Annealing*), wodurch der zu amplifizierende Bereich flankiert wird. Dieses Intermediat dient der thermostabilen DNS-Polymerase als Startbereich zur Verlängerung (Elongation) der Oligonukleotide entlang des *Templates*. Diese katalytische Reaktion findet mit Hilfe der im Reaktionspuffer enthaltenen Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) statt. Um eine exponentielle Amplifikation der DNS zu erreichen werden die produzierten DNS-Fragmente nach jedem Elongationsschritt erneut denaturiert und amplifiziert.

Für Klonierungsarbeiten wurde die Polymerase Takara®-*Taq* der Firma Promega mit dem dazugehörigen Puffersystem eingesetzt. Die 3'-5'-Korrekturlesefunktion dieser Polymerase gewährleistet dabei eine geringe Fehlerwahrscheinlichkeit für die amplifizierten DNS-Fragmente.

Für analytische Zwecke wurde die PCR mit der *Taq* Polymerase PAN der Firma Promega im zugehörigen Puffersystem durchgeführt.

Als Matrize für alle PCR-Reaktionen dienten entweder chromosomale DNS (1:20-Verdünnung) oder Plasmid-DNS (1:10-Verdünnung). Die PCR-Ansätze wurden je nach Anwendung in einem Gesamtvolumen von 25 oder 50 µl durchgeführt. Pro 50 µl Ansatz wurden 1 µl *Template*-DNS, je 100 pmol Oligonukleotid, je 20 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP, 2,5 mM MgCl₂ sowie 2 U *Taq*-Polymerase eingesetzt. Die Dauer der Elongation wurde an die Länge des zu amplifizierenden Gens angepasst (1000 bp / min). Der Ablauf der Temperatur-Zeit-Zyklen für die jeweiligen Anwendungen ist in Tabelle 2.17 dargestellt. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.2.2.) überprüft.

Tab. 2.16: PCR-Protokoll

Die PCR-Reaktion wurde mit Variation der Annealing-Temperatur, Synthesetemperatur (PAN:72°C; Takara: 68°C) und -zeit wie angegeben durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Primäre Denaturierung	94°C	5 min	1x
Denaturierung	94°C	30 sec	30x
Annealing	48-55°C	1 min	
Elongation	Takara 68°C PAN 72°C	1 min / 1000 bp	
Finale Elongation	Takara 68°C PAN 72°C	10 min	1x

2.2.2.6 Kolonie-PCR nach Sambrook (Sambrook et al., 1989)

Zur schnellen Überprüfung von *E. coli*-Klonen wurde die so genannte „colony PCR“ nach (Sambrook et. al., 1989) durchgeführt. Das jeweilige Zellmaterial wurde mit einer Pipettenspitze in 14,75 µl Wasser gelöst und anschließend eine PCR nach Standardprotokoll (siehe 2.2.2.5) im 25 µl-Ansatz durchgeführt.

2.2.2.7 Restriktion von dsDNS

Präparative und analytische Restriktionen von DNS wurde gemäß den Herstellerangaben (Roche bzw. NEB, Schwalbach) der eingesetzten Restriktionsenzyme nach Maniatis et al., 1982 durchgeführt. Die entsprechenden Puffer- und Inkubationsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme individuell gewählt. Für die Spaltung von DNS mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigen, wurde zwischen den verschiedenen Restriktionsansätzen eine Aufreinigung der DNS mit dem illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit durchgeführt (s. 2.2.2.3).

Zur analytischen Untersuchung wurde die Plasmid-DNS in einem Ansatz von 10 µl Gesamtvolumen behandelt. Dafür wurden etwa 2,5-5 U der entsprechenden Restriktionsenzyme für die Spaltung von ca. 0,1-0,5 µg DNS eingesetzt und der Ansatz 1-2 h bei 37°C inkubiert.

Die präparative Hydrolyse von DNS wurde in einem Volumen von 30-50 µl durchgeführt und entsprechend mehr Restriktionsenzym (10-15 U) eingesetzt. Die Inkubation eines präparativen Restriktionsansatzes wurde auf mindestens 4 h verlängert.

Durch Zugabe von GEBS ($\frac{1}{4}$ des Ansatzvolumens) wurden die Enzyme anschließend inaktiviert und das Ergebnis der Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.2.2)

analysiert. Präparative Ansätze wurden mit Hilfe des illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (s. 2.2.2.3) aufgereinigt und für weitere Klonierungsarbeiten eingesetzt.

2.2.2.8 Dephosphorylierung

Plasmid-DNS, die nur mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert wurde, wurde anschließend durch die Alkalische Phosphatase SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) endständig dephosphoryliert, um die Religationsrate des Plasmids zu verringern. Der Restriktionsansatz wurde dazu mit SAP-Puffer in einem Verhältnis von 1:10, sowie 1 U SAP/ μ g DNS versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung dephosphorylierter Plasmide wurde mit dem illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (s. 2.2.2.3) entweder direkt oder nach erfolgter präparativer Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.2.2) durchgeführt.

2.2.2.9 Ligation

Ligationen von DNS-Fragmenten wurden mit 0,8 μ l T4-DNA-Ligase und 1,2 μ l 10 x Ligationspuffer (Roche Applied Science) in einem Gesamtvolumen von 12 μ l durchgeführt. Das Verhältnis von geschnittenem Plasmid und zu inserierendem DNS-Fragment sollte 1:3 betragen. Die Inkubation von Ligationsansätzen wurde entweder für 4 h bei 16°C oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Für die nachfolgende Transformation von *E. coli* wurden 5 μ l des Ligationsansatzes eingesetzt (s. 2.2.1.1.5).

2.2.2.10 DNS-Sequenzierung

DNS-Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg, D) und GATC (Kempton, D) durchgeführt, wobei entweder von der jeweiligen Firma angebotene Standardprimer oder für die entsprechende DNS-Sequenz spezifische Oligonukleotide gewählt wurden. Die Auswertung der Sequenzen wurde mit dem Programm DNAMAN (Lynnon Software) durchgeführt.

2.2.2.11 Rekombinatorische Klonierung nach Gateway®-Technologie

Bei der Gateway®-Klonierung handelt es sich um eine sehr effiziente Klonierungstechnologie, die von der Firma Invitrogen vertrieben wird. Diese Methode beruht auf dem System der sequenz-spezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda und ermöglicht ein schnelles und höchst effizientes Integrieren von DNS-Sequenzen in

verschiedene Vektorsysteme. Hierzu werden zu inserierende DNS-Fragmente in einer PCR-Reaktion mit sogenannten „*attachment sites*“ (*attB1*, *attB2*) versehen und mit einem Donorvektor mit *attachment sites* (*attP1*, *attP2*) während der BPClonase™-Reaktion über diese Sequenzbereiche rekombiniert. Der BPClonase™ Enzym-Mix enthält die, die Rekombination katalysierenden Proteine Lambda-Integrase sowie die *E. coli*-Proteinuntereinheiten „*Integration Host Factors*“ IHF a und IHF b. Die *attachment sites attP1* und *attP2* flankieren im Donorvektor eine Gen-Kassette bestehend aus einer Chloramphenicol-Resistenz und dem *ccdB*-Gen, einem Selbstmordgen, das für einen Gyraseinhibitor kodiert. Durch die Rekombination von B- und P-„*attachment sites*“ in der BPClonase™-Reaktion wird das DNS-Fragment von Interesse gegen die Chloramphenicol-Resistenz und *ccdB*-Genkassette ausgetauscht, wodurch ein Eingangsvektor entsteht, der das integrierte DNS-Fragment, flankiert von neuen „*attachment sites*“ (*attL1*, *attL2*) enthält. Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* mit dem Eingangsvektor sollten nur Bakterien ohne die *ccdB*-Genkassette überlebensfähig sein. Die erhaltenen Klone wurden zusätzlich auf Chloramphenicol-Sensitivität und Gentamycin-Resistenz überprüft sowie die isolierten Plasmide durch Restriktionsanalyse mit entsprechenden Restriktionsenzymen verifiziert. Mit Hilfe der Donorvektoren können nun die DNS-Fragmente über die sogenannte LRClonase™-Reaktion in verschiedenste Zielvektoren mit *ccdB*-Genkassette, flankiert von den „*attachment sites*“ (*attR1*, *attR2*) inseriert werden. Hierbei wird die Rekombination zwischen *attL1* und *attR1* bzw. *attL2* und *attR2* katalysiert, wobei im Expressions-Vektor erneut die *attB*-Seiten generiert werden. Diese Reaktion entspricht also einer umgekehrten BP-Reaktion, für die zusätzlich das Enzym Exzisionase (Xis), welches im LRClonase™ Enzym-Mix enthalten ist benötigt wird.

Die Gateway®-Klonierungs-Technologie wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt um Gene, welche für die im *Yeast Two Hybrid Assay* zu untersuchenden Proteine kodieren, in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 des Matchmaker Systems (Clontech, Kalifornien, USA) zu klonieren. Die dafür verwendeten Gensequenzen wurden in einer zweistufigen „*nested*“ PCR-Reaktion amplifiziert. Als Matrize für *H. pylori*-Gene diente genomische DNS des Stammes *H. pylori* 26695, für das eukaryotische Gen des β 1-Integrins dagegen die von GE11 β Zellen.

2.2.2.11.1 „*nested*“-PCR

Der erste Schritt der zweistufigen „*nested*“-PCR wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, die jeweils eine interne Vorwärts- bzw. Rückwärts-Sequenz der *attB*-Rekombinationsstellen sowie die Gensequenzabschnitte der zu klonierenden Gene enthalten (s. Tab. 2.6). Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit 1 μ l

Template-DNS, je 10 pmol Oligonukleotide, je 7 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP sowie 2 U *Taq*-Polymerase durchgeführt. MgCl₂ wurde je nach Anwendung in einer Endkonzentration von 1,5 mM oder 3 mM eingesetzt. In Tabelle 2.17 sind die Reaktionszyklen – und bedingungen für den ersten Schritt der „*nested*“-PCR aufgelistet.

Tab. 2.17: Protokoll „*nested*“-PCR Stufe I

Die erste Stufe der „*nested*“-PCR-Reaktion wurde mit entsprechender Variation der Annealing-Temperatur und Elongationszeit wie angegeben durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Primäre Denaturierung	94°C	2,5 min	1 x
Denaturierung	94°C	15 sec	10-15 x
Annealing	50-60 °C	1 min	
Elongation	68 °C	1 min / 1000 bp	

Der zweite Schritt der „*nested*“-PCR der erfolgte direkt im Anschluss, wobei die gen-spezifischen Amplifikate aus der ersten PCR-Reaktion als Matrize dienten. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die für alle Ansätze gleich waren, da sie nur aus den externen Vorwärts- bzw. Rückwärtsregionen der *attB*-sites bestehen (s. Tab. 2.6). Dadurch werden im zweiten Schritt der „*nested*“-PCR die spezifischen *attB*1- und *attB*2-Rekombinationsstellen am PCR-Produkt aus dem ersten Schritt vervollständigt.

In einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Ansatz wurden 10 µl der ersten PCR-Reaktion als Matrize sowie 16 pmol Oligonukleotid, je 7 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP und 2 U *Taq*-Polymerase verwendet. MgCl₂ wurde je nach Anwendung in einer Endkonzentration von 1,5 mM oder 3 mM eingesetzt. Tabelle 2.18 stellt eine Übersicht über die Reaktionszyklen und –dauer für den zweiten Schritt der „*nested*“-PCR dar.

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.2.2) überprüft und korrekte PCR-Produkte anschließend für die nachfolgenden BP-Reaktionen eingesetzt.

Tab. 2.18: Protokoll der „nested“-PCR Stufe II

Die zweite Stufe der „nested“-PCR-Reaktion wurde mit entsprechender Variation der Annealing-Temperatur und Elongationszeit wie angegeben durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung	94°C	15 sec	5 x
Annealing	45 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	1 min / 1000 bp	
Denaturierung	94°C	15 sec	10-15 x
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	68 °C	1 min / 1000 bp	
Finale Elongation	68 °C	10 min	1x

2.2.2.11.2 BPClonase™-Reaktion

Für die BP-Reaktion wurde der „Gateway® BPClonase™ Enzyme Mix“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Während der *in vitro*-Rekombination entsteht der sogenannte Eingangsvektor mit den „attachment sites“ *attL*, welcher für die LRClonase™-Reaktion eingesetzt wurde.

2.2.2.11.3 LRClonase™-Reaktion

Die LR-Reaktion wurde gemäß der Herstellerangaben mit dem „Gateway® LRClonase™ Enzyme Mix“ (Invitrogen) durchgeführt. Als Zielvektoren wurden die *Yeast Two Hybrid*-Plasmide pGADT7 und pGBKT7 (Clontech) verwendet. Diese enthalten *attR*-sites, welche die *ccdB*-Genkassette zwischen den *EcoRV* und *SmaI* Schnittstellen flankieren (Uetz et al., 2006).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung bakterieller Zelllysate

Für die Herstellung von Bakterienlysaten wurde das Zellmaterial in 1 x PBS resuspendiert und zu einer OD₅₅₀ von 10 verdünnt. Anschließend wurde die Suspension mit 2 x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM DTT; 2% (w/v) SDS; 10% (w/v) Glycerin; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die Zelllysate wurden für 10 min bei 96°C gekocht und zum Abtrennen von Zelltrümmern für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung der Bakterienlysate wurden diese bei –20°C gelagert.

2.2.3.2 Lyse von Zellmaterial zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts

Für Zwecke der Quantifizierung des Gesamtproteingehalts einer Probe wurde das Zellmaterial durch Zentrifugation (3200 x g) pelletiert und mit dem entsprechendem Volumen des RIPA-Lysepuffers (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,25% (w/v) Natriumdeoxylat) mit Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin) zur Vermeidung von Proteinabbau versetzt. Die Lyse wurde in einem Ultraschall-H₂O-Bad bei 4°C für ca. 45 min durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit entsprechenden Verdünnungen des Lysats nach Bradford (s. 2.2.3.4.) (Bradford, 1976).

2.2.3.3 Lyse von *H. pylori* für Proteinpräzipitationen

Zur Herstellung von *H. pylori*-Lysaten für Proteinpräzipitationen wurden die Bakterien über Nacht auf einer Serumagarplatte kultiviert und am nächsten Tag in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine OD₅₅₀ von 2 eingestellt, abzentrifugiert (3000 rpm, 5 min, 4°C) und das Bakterienpellet in der entsprechenden Menge eiskaltem HSL-150-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,005 % Triton, 4 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂ 150 mM NaCl) mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien in drei Intervallen mit jeweils 15 Impulsen mit einem Ultraschall-Gerät auf Eis lysiert. Nach einem 20-minütigen Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand mit den zytosolischen Proteinen für Proteinpräzipitationen verwendet.

2.2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Konzentration zytosolischer Proteine wurde die Methode von Bradford unter Verwendung von BSA als Standard eingesetzt (Bradford, 1976). Hierzu wurden 100 µl einer verdünnten Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure (85%ig)) versetzt und in Dunkelheit 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm gegen das Bradfordreagenz als Blindwert. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen aufgenommen.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts und unabhängig von ihrer Ladung wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach

Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Um eine Auftrennung ausschließlich nach der Größe der Proteine zu erreichen, werden diese mit SDS, einem stark amphiphatischen Detergenz vorbehandelt. Dadurch werden die Proteine denaturiert und erhalten eine negative Ladung, sodass sie innerhalb eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-Protein IITM von BioRad durchgeführt. Die jeweiligen Trenn- und Sammelgele wurden nach Sambrook angesetzt (Sambrook et al., 1989). Die Konzentrationen der Trenngele variierten je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine zwischen 6%-20% hergestellt aus einer 30% Acrylamidlösung in einem Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8). Die Konzentration des Sammelgels wurde immer auf 5% in einem Sammelgelpuffer (1,0 M Tris/HCl pH 6,8) eingestellt. Das Probenvolumen betrug zwischen 2-10 μ l, der in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteine. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Elektrophoresepuffer (250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 25 mM Tris/HCl pH 8,3) bei einer Spannung von 80-130 V für ca. 80 min. Zur Bestimmung der Molekülmasse der aufgetrennten Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard (s. Tab. 2.14) mitgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine aus den SDS-Polyacrylamidgelen entweder auf eine PVDF-Membran übertragen oder im Gel mit einer Coomassie-Lösung angefärbt.

2.2.3.6 Detektion von Proteinen im Polyacrylamidgel

Zur Sichtbarmachung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde die Coomassie-Färbung eingesetzt (Marshall and Williams, 1992). Hierzu wurden die Polyacrylamidgele für 20 min in Coomassie-Lösung (0,275% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) gefärbt. Durch anschließendes Entfärben der Gele mit einer Entfärbelösung (10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Ethanol, 7,5% (v/v) Essigsäure) wurden die Proteinbanden detektiert. Die SDS-Gele wurden für die digitale Bildverarbeitung eingescannt und anschließend mit der Software Power Point 2010 bearbeitet.

2.2.3.7 Western Blot

2.2.3.7.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Für die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde das „*semi-dry*“-Verfahren angewendet. Dabei wird zwischen zwei Graphitplatten ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt (Towbin et al., 1992). Der Stromfluss wurde gewährleistet, indem je zwei dicke und dünne

Filterpapiere auf die Anode gelegt wurden, wobei die beiden unteren dicken Filterpapiere in Anodenpuffer I (0,3 M Tris, pH 10,4; 10% Methanol), die folgenden dünnen Filterpapiere und die PVDF-Membran in Anodenpuffer II (25 mM Tris, pH 10,4; 10% Methanol) getränkt wurden. Auf die PVDF-Membran wurde das Gel gelegt und mit je zwei dünnen und dicken Filterpapieren, welche in Kathodenpuffer (25 mM Tris; 40 mM 6-Amino-n-Caprinsäure oder Glycin; 10% Methanol; eingestellt auf pH 9,4) getränkt wurden bedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² für 75 min.

2.2.3.7.2 Detektion von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden freie Bindungsstellen auf der Membran für mindestens eine Stunde mit einem Absättigungspuffer aus TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 5%, 0,75% Tween20) mit 5% Magermilchpulver (MMP) abgedeckt. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen wurde das jeweilige Antiserum entsprechend dem Titer 1:1000 bis 1:10000 in TBST mit 1% MMP verdünnt und die Membran 1 h bei Raumtemperatur damit inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen, um nicht gebundenes Antiserum zu entfernen. Es folgte eine 45-minütige Inkubation entweder mit einem Konjugat aus Protein A und alkalischer Phosphatase (AP) (Protein A-AP) (1:5000 in TBST mit 1% MMP) oder dem entsprechenden Sekundärantikörper, gekoppelt an eine Peroxidase (POX) (1:10000 in TBST mit 1% MMP). Nach dreimaligem Waschen mit TBST für 10 min erfolgte die Detektion der Proteine. Dies erfolgte bei Verwendung von Protein A-AP durch Schwenken der Membran in 10 ml Detektionslösung (0,1 M Tris/HCl pH 9,6, 0,1g/l NBT, 7 mM MgCl₂, 50 mg/l BCIP), wobei die Proteinbanden durch eine Farbreaktion, katalysiert durch die alkalische Phosphatase auf der Membran sichtbar werden. Die Reaktion kann anschließend mit Wasser abgestoppt werden. Eine sensitivere Methode stellt die Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe des POX-gekoppelten Zweitantikörpers dar. Aufgrund der Chemilumineszenz der Proteinbanden nach Zugabe des entsprechenden Substrats, können diese auf einem Röntgenfilm als schwarze Banden sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde das Western LightningTM-Detektionsreagenz von Perkin Elmer Life Science nach Herstellerangaben angewendet.

2.2.3.7.3 Entfernung von Immunkomplexen von PVDF-Membranen

Membranen die während des Western Blots mit Hilfe eines POX-gekoppelten Sekundärantikörpers behandelt wurden, können nach Entfernung der gebundenen Antikörper erneut zur Immundetektion der transferierten Proteine eingesetzt werden.

Zum Lösen der Immunkomplexe wurden die PVDF-Membranen zunächst 5 min Raumtemperatur mit Wasser gewaschen, um Reste der Detektionslösung zu entfernen. Anschließend wurde die nicht kovalente Bindung zwischen Antigen und Antikörper durch eine 45-minütige Inkubation in 50 mM NaOH bei Raumtemperatur aufgebrochen und die Antikörper von der Membran gelöst. Die kovalent an die PVDF-Membran gebundenen Proteine verbleiben auf dieser, wodurch nach einem 5-minütigen Waschschrift mit Wasser die Membranen für weitere Immundetektionen verwendet werden können.

2.2.3.8 Produktion und Aufreinigung von *His-Tag* markierten Proteinen

Für die Produktion der rekombinanten Domänen der β -Untereinheit des β 1-Integrin (ITGB1) wurden die entsprechenden Gensequenzen über geeignete Restriktionsschnittstellen in das *E. coli*-Expressionsplasmid pASK IBA43+ kloniert. Die entsprechende Gensequenz wurde dabei mit dem N-terminalen Ende an die Sequenz für ein Hexapeptid der Aminosäure Histidin (*His-Tag*) fusioniert. Die Überproduktion des gentechnisch erzeugten Fusionsproteins in *E. coli* erfolgte durch Induktion des Promotors mit Anhydrotetracyclin (aTC).

E. coli-Stämme mit den entsprechenden Expressionsplasmiden wurden für die Produktion und Aufreinigung der *His-Tag* markierten Proteine über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit Ampicillin (LB/Amp) bei 180 rpm geschüttelt. 3 ml der Übernachtskultur wurden für die Inokulation von 300 ml frischem LB/Amp verwendet und weitere 3 h bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 kultiviert. Nach der Induktion des aTC-Promotors wurden die Bakterien bei 27°C und 180 rpm für mindestens 4 h zur Proteinproduktion inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4°C) pelletiert und in 10 ml eiskaltem Bindepuffer (300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, 10 mM Imidazol, pH 8.0) mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis mit einem Ultraschall-Gerät in 5 Intervallen mit jeweils 30 Impulsen. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 50 min, 4°C) des Lysats wurde der zytosolische Teil auf zuvor mit Bindepuffer äquilibrierte Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden, D) gegeben und 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA Agarose durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (300 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, 20 mM Imidazol, pH 8.0) von kontaminierenden Proteinen befreit und anschließend die gebundenen *His-Tag* markierten Proteine mit Elutionspuffer (300 mM NaCl; 250 mM Imidazol, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8.0) von der Agarose gelöst. Die Bindung, Reinigung und Elution der *His-Tag* markierten β 1-Integrindomänen erfolgte nach Herstellerangaben der Ni-NTA Agarose.

2.2.3.9 Proteinpräzipitation mit magnetischen Kügelchen

Um Protein-Protein-Interaktionen, die aus *Yeast Two Hybrid* Experimenten hervorgegangen sind biochemisch zu unterstützen wurden Proteinpräzipitationen mit magnetischen Kügelchen durchgeführt. Die Präzipitation von Proteinen aus *H. pylori*-Lysaten (s. 2.2.3.3.) mit β 1-Integrin bzw. der entsprechenden β 1-Integrindomänen wurde dabei mit Hilfe von *SiMAG-Carboxyl magnetic beads* von Chemicell durchgeführt. Hierzu wurden aufgereinigte rekombinante β 1-Integrindomänen über Nacht gegen 1 x PBS dialysiert (4°C) und an die magnetischen Kugeln nach Herstellerangaben gekoppelt. Dies erfolgte über die Carbodiimide Methode. Die Lagerung erfolgte in Blockierungspuffer (PBS, 0,1% BSA) bei 4°C.

Für die Präzipitation von Proteinen aus *H. pylori*-Lysaten wurden 5 μ l der mit den entsprechenden Proteinen gekoppelten magnetischen Kugeln zu 500 μ l des Lysats (s. 2.2.2.3.) zugegeben und der Ansatz für 30-60 min bei 4°C in einem rotierenden Eppendorfgefäß inkubiert. Anschließend wurden die Magnetkugeln dreimal im Magnetfeld mit HSL-400-Waschpuffer (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,005 % Triton, 4 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 400 mM NaCl) gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen und in 10 μ l Resuspensions-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH=7,4; 1 mM EDTA, pH=8,0; 1% Triton x 100; 1 mM PMSF) bzw. 15 μ l 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Nach 10-minütigem Aufkochen der Proben wurden die Magnetkugeln abzentrifugiert und der Überstand für die Proteinanalyse auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen.

2.2.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.4.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zellen (AGS, HEK-293, GE-11, GE-11- β 1) erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) in 10 ml Zellkulturmedium (s. Tab. 2.11), versetzt mit 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ in wassergedämpfter Umgebung. GE-11- β 1 Zellen wurden zusätzlich mit 220 μ g Zeocin/ml im Zellkulturmedium inkubiert, um die Selektion der β 1-Integrin-exprimierenden Plasmide zu gewährleisten. Vor Bildung eines konfluenten Rasens wurden die Zellen verdünnt und umgesetzt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend für 3-5 min mit 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, BRL) bei 37°C inkubiert und das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 5 ml Medium mit 10% FCS gestoppt und die Zellen darin resuspendiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche oder für Infektionsversuche (s. 2.2.4.9) in die Vertiefungen einer 6-

Napfplatte mit frischem Medium umgesetzt. HEK-293 und AGS Zellen wurden im Verhältnis 1:2-1:4, GE-11, GE-11- β 1 Zellen im Verhältnis 1:5-1:15 in frischem Medium verdünnt.

2.2.4.2 Kultivierung nicht-adhärenter Zellen

Nicht-adhärenente HL-60 Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 10 ml RMPI-Medium, versetzt mit 10% FCS (s. Tab. 2.12) bei 37 °C und 5% CO₂ wassergedämpfter Umgebung kultiviert. Da es sich bei HL-60 Zellen um runde Einzelzellen in Suspension handelt, wurde ein Teil der Zellsuspension alle zwei Tage zur Subkultivierung im einem Verhältnis von 1:2-1:5 in frischem Medium verdünnt. Die Zelldichte sollte dabei zwischen 1,0 – 2,0 x 10⁶ Zellen/ml betragen.

2.2.4.3 Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen zu dHL-60 Zellen

Die humanen promyeloischen HL-60 Zellen können unter Zugabe von PMA zu Makrophagen-ähnlichen Zellen (dHL-60) ausdifferenziert werden. Dafür wurden 1 x 10⁵ HL-60 Zellen in 2 ml Medium in eine Vertiefung einer 6-Napfplatte verdünnt und für 12-18 h mit 50 nM PMA inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Ausdifferenzierung der HL-60 zu adhärenenten dHL-60 Zellen, die für weitere Infektionsversuche (s. 2.2.4.9.) eingesetzt wurden.

2.2.4.4 Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte durch die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Konfluente Zellrasen adhärenter Zellen wurden abgelöst (s. 2.2.4.1.) und in einer Konzentration von 5 x 10⁵ Zellen in 1 ml Einfriermedium (Tab. 2.11) in Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) konserviert. HL-60 Zellen wurden in einer Konzentration von 4-5 x 10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium (Tab. 2.11) konserviert.

2.2.4.5 Auftauen von Zellen

Für die Kultivierung wurden kryokonservierte Zellen bei 37 °C aufgetaut und anschließend sofort mit 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt, um die im Einfriermedium enthaltene schädigende DMSO-Konzentration zu verdünnen. Aufgetaute AGS, HEK-293, GE-11, GE-11- β 1, Zellen wurden bei 800 x g für 5 min sedimentiert. HL-60 Zellen wurden nach dem Auftauen dreimal mit 10-20 ml Zellkulturmedium gewaschen und dazwischen für 5 min bei 500 x g pelletiert. Alle Zellsedimente wurden mit dem

entsprechenden Zellkulturmedium (s. Tab. 2.11) versetzt und in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in wassergedämpfter Umgebung inkubiert.

2.2.4.6 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Um definierte Zellkonzentrationen zu kultivieren wurde die genaue Zellanzahl in einer Suspension bestimmt. Hierzu wurde ein Aliquot einer Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung (Invitrogen) verdünnt. Trypanblau lagert sich in toten Zellen ab, wodurch diese von lebenden unterschieden werden können. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl in eine Neubauer-Zellkammer pipettiert, die Zellzahl in den vier Quadraten der Kammer mikroskopisch ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die absolute Zellzahl pro ml Suspension wurde daraufhin wie folgt bestimmt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.4.7 Transfektion von HEK-293 Zellen

Für die Transfektion von HEK-293 Zellen mit den Plasmiden für den *Renilla Luciferase Assay* (s. 2.2.4.13.) wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen 40-50% konfluent. Es wurden 500 ng Kontroll-DNS zur Expression eines *gfp*-Gens bzw. 1 µg Ziel-DNS eingesetzt. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Zusätzlich wurde die Expression der Zielgene auf den Plasmiden pRenilla und pTrex biochemisch mit der Western Blot Methode überprüft (s. 2.2.3.7.)

2.2.4.8 Isolierung peripherer Blutmonozyten (PBLC) aus humanem Blut

Für die Isolierung von peripheren Blutmonozyten aus humanem Blut wurde eine Dichtegradienten- Zentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden 15 ml einer Ficoll-Lösung (Dichte 1,077) mit frisch entnommenem, heparinisiertem Blut, welches zuvor mit 3 Volumen 1 x PBS verdünnt wurde überschichtet und das Gemisch zentrifugiert (400 x g, 40 min, ohne Bremse, Heraeus Megafuge 1.0R). Dadurch entstand an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Blutserum eine Schicht aus Lymphozyten, PBLC`s und Blutplättchen, welche vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen wurde. Die Zellen wurden einmal mit 50 ml 1 x PBS gewaschen. Zur Abtrennung der Blutplättchen wurden die Zellen nochmals zweimal mit 1 x PBS gewaschen und bei 200 x g für 10 min zentrifugiert, wobei die Blutplättchen im Überstand bleiben. Die Präparation der PBLC`s erfolgte durch positive Selektion mit dem MACS-System. Dazu wurden die sedimentierten Zellen in 400 µl MACS-Puffer (1 x PBS;

0,5% BSA; 2 mM EDTA) aufgenommen und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.4.6.). Die Zellen wurden so verdünnt, dass 10^7 Zellen pro 80 μ l MACS-Puffer vorlagen. Nach Zugabe von 20 μ l MACS-CD14-MicroBeads (Miltenyi Biotec) pro 10^7 Zellen, wurden diese bei 4°C für 15 min inkubiert, wobei die Magnetkugeln an die Oberfläche der PBLC's binden. Anschließend wurden die Zellen mit dem 20fachen Volumen an MACS-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation (300 x g, 10 min) sedimentiert. Zum Auftragen auf die mit MACS-Puffer äquilibrierte Säule (Typ LS) wurde das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und konnte durch die Säule tropfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit 4 ml MACS-Puffer. Zur Elution wurde die Säule aus der Magnethalterung genommen und die Zellen mit 3 ml MACS-Puffer durch mechanische Trennung der, mit den Magnetkugeln markierten PBLC's von der Säule eluiert. Zur Kultivierung wurden die Zellen nach Zentrifugation (200 x g, 5 Min) in 5 ml RPMI / 10% FCS resuspendiert, gezählt und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Die Kultivierung erfolgte für Infektionsexperimente (s. 2.2.4.9.) mit *H. pylori* in 6-Napfschalen.

2.2.4.9 Infektionsexperimente mit *H. pylori*: Phosphotyrosin Assay

Zum Nachweis der Translokation des Effektorproteins CagA wurden 1×10^6 Zellen für 3-4 h Stunden mit *H. pylori* mit einer MOI von 60 infiziert. Hierzu wurde Zellmaterial der entsprechenden *H. pylori*-Stämme von einer gut bewachsenen Serumplatte mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen, in 1 x PBS resuspendiert und die optische Dichte bestimmt. Die eukaryotischen Zellen wurden dann mit der *H. pylori*-Suspension mit einer OD_{550} von 0,2 pro ml infiziert. Vor der Infektion wurde das Zellkulturmedium in den Vertiefungen der 6-Napfplatte gewechselt. Die Dauer der Infektion betrug zwischen 3-4 h bei 37°C und 5% CO_2 . Anschließend wurden die Infektionsansätze auf Eis gestellt und mit eiskaltem PBS* (PBS, 1 mM EDTA, 1 mM Na-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 μ M Leupeptin, 1 μ M Pepstatin) gewaschen. Die infizierten adhärenen Zellen wurden in 1 ml PBS* mit einem Zellschaber vorsichtig von der 6-Napfplatte abgelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (400 x g, 5 min, 4°C) wurden die sedimentierten Zellen in 20 μ l PBS* und 25 μ l 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden durch Aufkochen für 10 min bei 95°C lysiert und anschließend mittels Western Blot analysiert.

2.2.4.10 Inhibition der CagA-Translokation während Infektionsexperimenten mit *H. pylori*

Die Inhibition der Translokation wurde entweder mit rekombinanten *His-Tag* markierten Proteinen oder Integrin-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dafür wurde der

Ablauf des oben beschriebenen *Phosphotyrosin Assays* (s. 2.2.4.9) modifiziert. AGS Zellen wurden über Nacht in Zellmedium mit 10% FCS kultiviert, oder zum Zwecke der Synchronisierung ohne FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurde das FCS-freie Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml Medium mit 10% FCS versehen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C und 5% CO₂ wurden 50 µg des rekombinanten Proteins bzw. 30 µg des Antikörpers zu den Zellen pipettiert. Die Bindung erfolgte bei 4°C für 30 min. Anschließend wurde die Infektion wie unter 2.4.9. beschrieben durchgeführt.

2.2.4.11 Bindung von *His-Tag* markierten Proteinen an Zellen

Zum Nachweis der Bindung von *His-Tag* markierten Proteinen an die Oberflächenproteine von eukaryotischen Zellen wurden diese mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS) analysiert. Hierzu wurden Zellen, die 95% konfluent in einer 75 cm² Zellkulturflasche in entsprechendem Medium gewachsen waren mit Trypsin-EDTA-Lösung (s. 2.2.4.1.) abgelöst und in 10 ml Medium ohne FCS überführt. Nach Zentrifugation (200 x g, 10 min) wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, woraufhin ein weiterer Waschschrift mit 10 ml FACS-Puffer (27 mM Tris-HCl pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,4 mM KCl) folgte, bevor die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert wurden. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 3 x 10⁵ Zellen in die Vertiefung einer 96-Napfplatte verdünnt und bei 200 x g weitere 10 min pelletiert. Die Zellsedimente wurden anschließend in 200 µl FACS-Puffer mit 1 mM PMSF und 5-10 µg des *His-Tag* markierten Proteins resuspendiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 1 h. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 200 µl FACS-Puffer/PMSF wurde der spezifische Antikörper gegen den *His-Tag* in einer Verdünnung von 1:1000 in FACS-Puffer/PMSF zugegeben und die Ansätze für 1h bei 4°C inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu beseitigen wurden die Proben dreimal gewaschen (FACS-Puffer/PMSF) und anschließend 45 min bei Raumtemperatur mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper, in diesem Fall anti-Maus-Alexa488 behandelt. Nach zwei Waschschriften mit FACS-Puffer/PMSF wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer/PMSF resuspendiert und die Bindung des Proteins an die Oberfläche der Zellen durch Anregung mit dem 488 nm Laser (Pycoerythrin-Kanal) im Durchflusszytometer (BD FACS Canto II; BD Bioscience, Heidelberg) gemessen. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden alle Zelllinien zusätzlich ungefärbt bzw. nur mit dem Sekundärantikörper behandelt im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.4.12 Bestimmung adhärenter *H. pylori* auf AGS Zellen

Zur Bestimmung der Bakterienzahl, die während einer Infektion an AGS Zellen binden wurden Lebendzellzahlbestimmungen durchgeführt. Hierzu wurden AGS Zellen mit den entsprechenden Stämmen von *H. pylori* infiziert (s. 2.2.4.9.) Nach der Infektion wurden die Ansätze dreimal mit 2 ml PBS für 5 min unter Schwenken gewaschen, um nicht adhärenente Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die AGS Zellen mit 1 ml PBS + 0,1% Saponin (Sigma) für 30 min bei 37°C lysiert, wodurch *H. pylori* frei schwimmend in Lösung vorlag. Diese Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorfgesäß überführt und *H. pylori* durch Zentrifugation (300 x g, 5 min) pelletiert. Das Bakteriensediment wurde anschließend in 1 ml BB resuspendiert und für die Bestimmung der Lebendzellzahl eine Verdünnungsreihe angesetzt. Es folgte das Ausplattieren von jeweils 100 µl einer Verdünnungsstufe auf Serumagarplatten und die Kultivierung bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen für 3-6 Tage. Die CFU wurden ausgezählt und ein Mittelwert bestimmt.

2.2.4.13 *Renilla Luciferase Assay*

Um Protein-Protein-Interaktion in einem biochemischen System quantitativ zu bestimmen, wurde das „*Renilla Luciferase Assay System*“ (Promega) nach Herstellerangaben angewendet. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proteine bzw. Proteinfragmente in HEK-293 Zellen als Fusionsproteine produziert. Durch genetische Klonierung wurde dabei jeweils ein Protein an die *Renilla*-Luciferase und ein Protein an Protein A fusioniert. Nach Koexpression der Genkonstrukte in HEK-293 Zellen kommt es bei einer Interaktion zwischen zwei zu untersuchenden Proteinen zu einer indirekten Zusammenführung der *Renilla*-Luciferase mit dem Protein A. Die transfizierten Zellen wurden nach Herstellerangaben lysiert und ein Aliquot des Zelllysats als Kontrolle genommen. Die entstandenen Proteinkomplexe wurden dann mit Hilfe von IgG-gekoppelten Magnetkugeln (Invitrogen) aus dem verbleibenden Lysat getrennt. Nach dreimaligem Waschen im Magnetfeld wurden die Magnetkugeln nach Herstellerangaben mit dem „*Renilla Luciferase Assay Reagent*“ inkubiert. Die *Renilla*-Luciferase Aktivität wurde anschließend in einem Luminometer (Microumat Plus LB 96V; Berthold Technologies) gemessen und nach folgender Formel berechnet:

Renilla-Luciferase Aktivität (RLU) =

Renilla-Luciferase Aktivität (Magnetkugeln) / *Renilla*-Luciferase Aktivität

(Gesamtzelllysats)

2.2.5 Statistische Auswertung

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bestimmt und ist für das entsprechende Experiment angegeben. Die Werte sind normalverteilt. Signifikanz-Werte von $(p) \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1. Etablierung eines *Yeast Two Hybrid Assays* zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen von CagA, CagY und CagI mit den Domänen des β 1-Integrins

Das Effektorprotein CagA ist ein bedeutender Virulenzfaktor von *H. pylori* und wird durch das Cag-T4SS in eukaryotische Zellen transloziert. Da der genaue Mechanismus für die Translokation des CagA-Proteins noch nicht bekannt ist, sollte in Vorarbeiten als erster Schritt ein möglicher Rezeptor für das Cag-T4SS von *H. pylori* identifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* das Oberflächenprotein β 1-Integrin der Wirtszelle als Rezeptor nutzt (Jimenez-Soto et al., 2009 Kwok et al., 2007). Die Interaktion mit dem eukaryotischen Rezeptor konnte sowohl für das translozierte Effektorprotein CagA, als auch für die Apparatsproteine CagI und CagY gezeigt werden (Jimenez-Soto et al., 2009). In Tabelle 3.1 sind die Fragmente der entsprechenden Proteine, die Bindung an das β 1-Integrin zeigten, zusammengestellt.

Die rezeptorabhängige CagA-Translokation sollte in dieser Arbeit weiterhin genauer untersucht werden, um ein detaillierteres Translokationsmodell zu entwickeln. Da das β 1-Integrin eine ausgeprägte Domänenstruktur aufweist (Takagi und Springer, 2002), interessierte in diesem Zusammenhang besonders, ob die interagierenden *cag*-PAI kodierten Proteine CagA, CagY und CagI spezifische Bindungsregionen innerhalb des extrazellulären Bereichs des β 1-Integrins aufweisen. Die spezifische Bindung der einzelnen Proteine an die unterschiedlichen Domänen von β 1-Integrinen könnte zur Klärung des Mechanismus der CagA-Translokation in die Wirtszelle beitragen.

Tab. 3.1: Aminosäurebereiche von CagA, CagI und CagY, die mit dem extrazellulären Teil des β 1-Integrin interagieren

Gen	Protein	Region (Aminosäureposition)
<i>hp0547</i>	CagA	1-613
<i>hp0540</i>	CagI	24-381
<i>hp0527</i>	CagY	1815-1927

Ausgehend von der Domänenstruktur des extrazellulären Teils des β 1-Integrins wurde das Protein durch Klonierung der entsprechenden Genregionen in fünf verschiedene Domänen unterteilt (s. Tab. 3.2).

Aufgrund seiner Homologie zu Membranproteinen, wie Plexinen und Semaphorinen wird der Cystein-reiche, N-terminale Teil des β 1-Integrins als PSI-Domäne (Aminosäure 1-50) bezeichnet. Im folgenden *Yeast Two Hybrid Assay* wurde diese Domäne sowohl einzeln, als auch in Kombination mit der darauf folgenden *I-like*-Domäne (Aminosäuren 100-340) eingesetzt (s. Tab. 3.2). Die *I-like*-Domäne enthält das Aminosäuremotiv DXSXS, welches möglicherweise für die Bindung von Metallionen verantwortlich und bei Integrinen ohne *I*-Domäne in der α -Untereinheit an der Ligandenbindung beteiligt ist (Takagi and Springer, 2002). C-terminal folgt der *I-like*-Domäne ein weiterer Cystein-reicher Abschnitt, der in vier aufeinanderfolgende *EGF-like repeats* (Aminosäuren 435-600) sowie in die *β -tail*-Domäne unterteilt wird. Die *EGF-like repeats*, sowie die *β -tail*-Domäne wurden ebenfalls einzeln, als auch in Kombination miteinander für den *Yeast Two Hybrid Assay* eingesetzt (s. Tab. 3.2). Eine potenzielle Interaktion dieser Domänen mit dem Effektorprotein CagA und den Apparatskomponenten CagI, sowie CagY wurde anschließend im Hefemodell mit Hilfe des *Yeast Two Hybrid Assays* getestet.

Tab. 3.2: Aminosäurebereiche des β 1-Integrins, die zur Untersuchung ihrer jeweiligen Interaktion mit CagA, CagY und CagI verwendet wurden

Protein	Proteindomäne	Region (Aminosäurepositionen)
ITGB1	PSI	1-99
ITGB1	PSI + <i>I-like</i>	1-460
ITGB1	<i>EGF repeats</i>	410-625
ITGB1	<i>EGF repeats</i> + <i>β-tail</i>	410-728
ITGB1	<i>β-tail</i>	575-728

3.1.1 Klonierung der β 1-Integrindomänen in *Yeast Two Hybrid*-Vektoren

Die Gensequenzen für die in Tabelle 3.2 beschriebenen Domänen des β 1-Integrins wurden mit Hilfe der *Gateway*® Klonierungsstrategie in den *prey*-Vektor pGADT7 gebracht. Dafür wurden die Gensequenzen der ausgewählten Domänen des β 1-Integrins während des Amplifizierens N- und C-terminal mit *attachment-sites* versehen (s. 2.2.2.11.). Durch Rekombination wurden die DNS-Sequenzen in das Plasmid integriert und N-terminal an die GAL4-DNS-Aktivierungsdomäne fusioniert. Anschließend wurden kompetente Hefezellen mit den entstandenen Plasmiden transformiert (s. 2.2.1.2.4.) und die daraus resultierenden Hefestämme Y1, Y2, Y3, Y4 und Y5 benannt (s. Abb. 3.1).

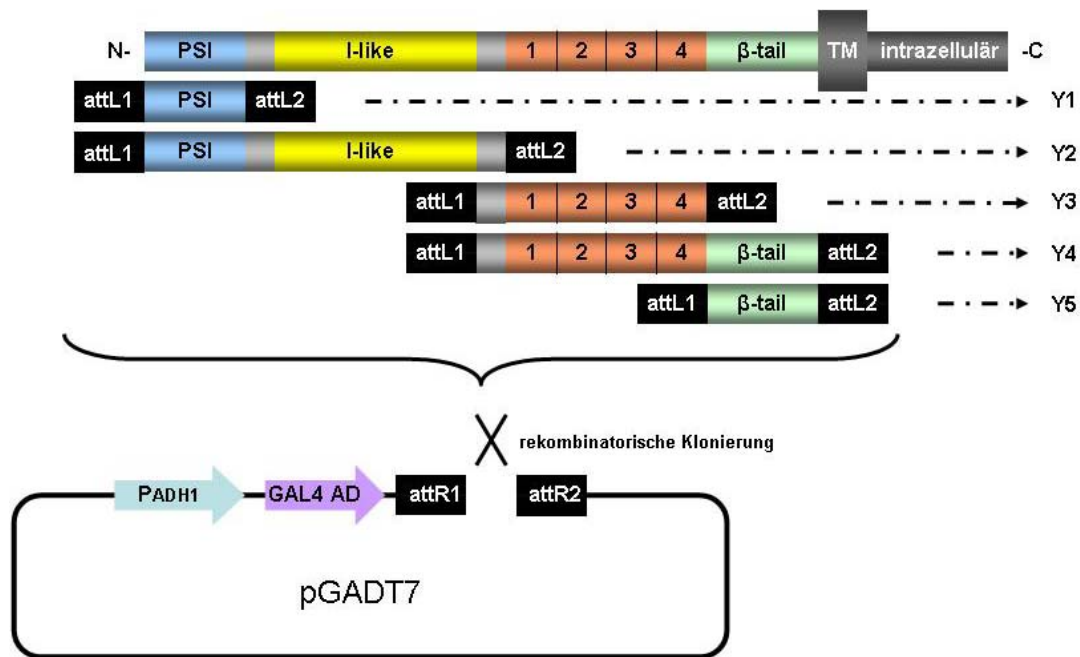


Abb. 3.1: Rekombinatorische Klonierung der $\beta 1$ -Integrindomänen und Fusion an die Gal4-DNS-Aktivierungsdomäne:

Der extrazelluläre Bereich des $\beta 1$ -Integrins wurde in fünf verschiedene Domänen unterteilt, die durch Amplifikation der entsprechenden Genbereiche erzeugt wurden. Durch rekombinatorische Klonierung über *attachment-sites* zunächst in den Eingangsvektor pDONR207 (nicht dargestellt) wurden die erhaltenen Genabschnitte anschließend in das „prey“-Plasmid pGADT7 integriert. Dieses Plasmid beinhaltet einen *ADH1*-Promotor und fusioniert die klonierte Gensequenz N-terminal an die Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors. Die nach der Transformation resultierenden Hefestämme wurden Y1, Y2, Y3, Y4 und Y5 genannt.

3.1.2 Paarung haploider Hefezellen zur Gewinnung diploider Hefen

Eine mögliche Interaktion zwischen zwei Proteinen wird in diploiden Hefen getestet. Haploide Zellen kommen in zwei verschiedenen Paarungstypen (a und α) vor. Die gegeneinander zu testenden Gene wurden mit den „bait“- und „prey“-Plasmiden jeweils in den korrespondierenden Hefestamm gebracht. Als Selektionsmarker diente dabei entweder die eingeführte Expression des Tryptophan- (*pGBKT7*; „bait“) oder Leucin-Biosynthesegens (*pGADT7*; „prey“). Durch Zusammenführung zweier verschiedener Zelltypen kommt es zu einer Paarung zwischen a und α („mating“). Dafür wurden die „bait“ und „prey“ exprimierenden haploiden Hefen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und nach 24 h Inkubation das erfolgreiche „mating“ durch Überführung der diploiden Hefen auf Doppelselektivmedium (SD-Leu/Trp) bestätigt (s. Abb. 3.2).

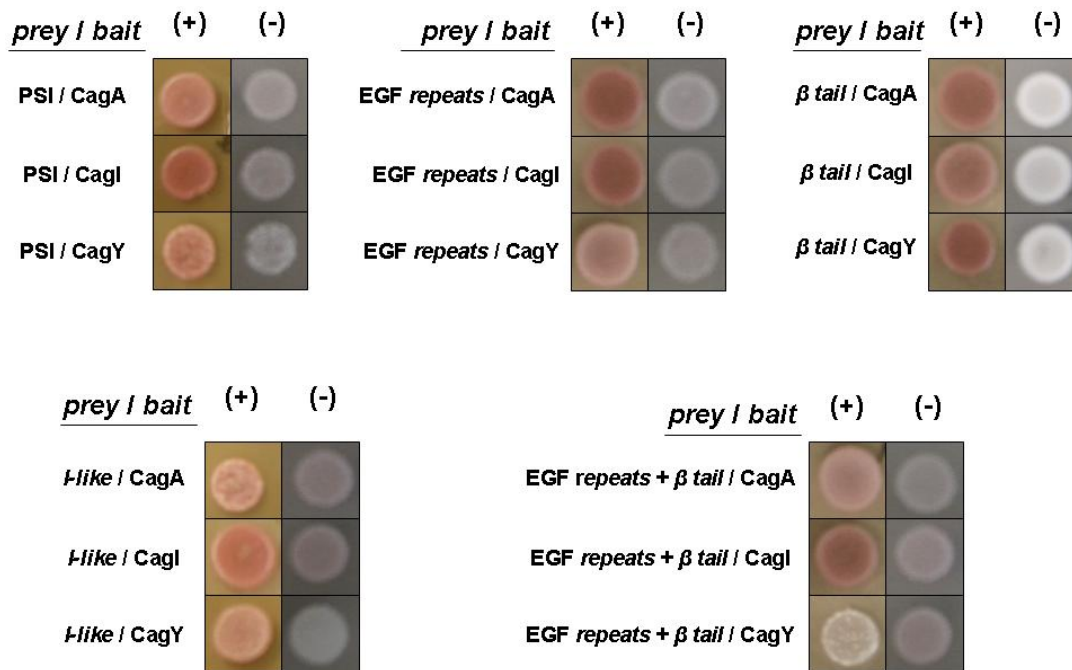


Abb. 3.2: Generierung diploider Hefestämme mit Hilfe des „mating“ und Selektion auf Doppelselektivmedium:

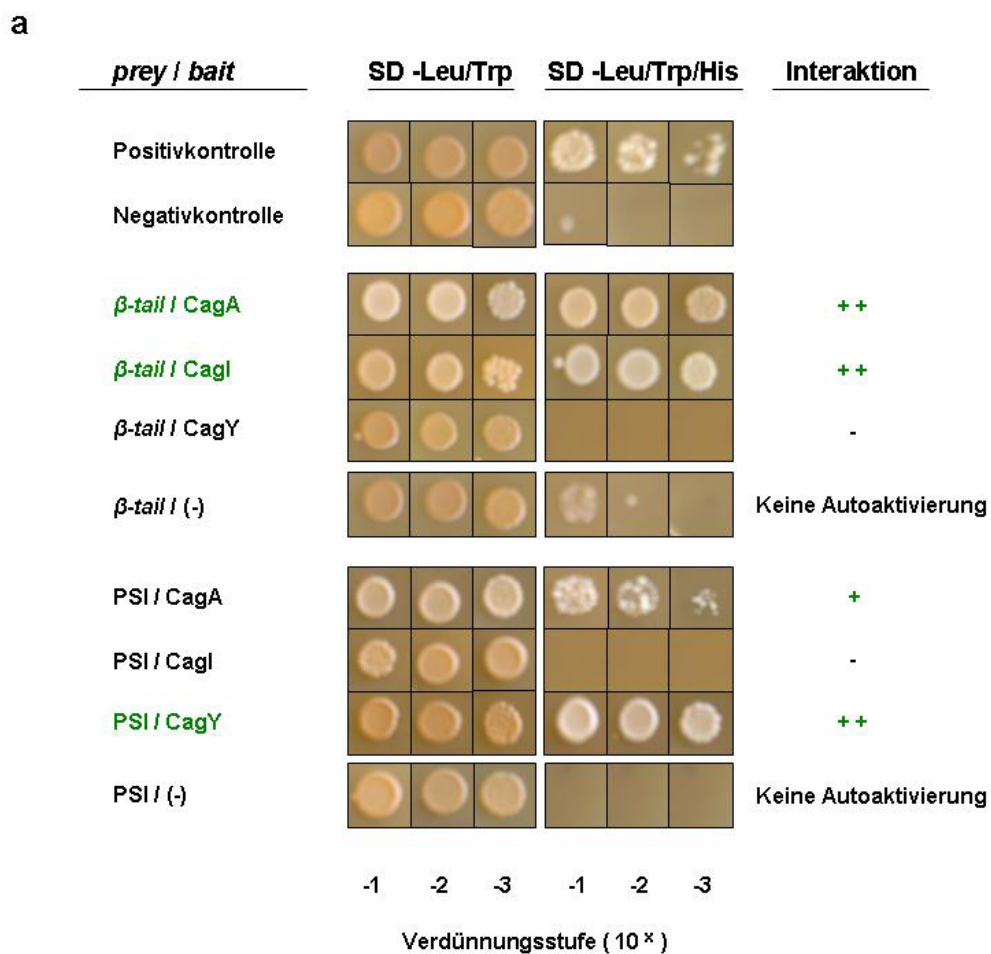
Zur Generierung diploider Hefestämme wurden jeweils haploide Hefezellen, die entweder das „prey“- oder „bait“-Konstrukt enthalten auf eine Vollmediumplatte (gekennzeichnet mit (+)) getropft und dabei gemischt. Nach 24 h Inkubation wurden die gewachsenen Hefen in Doppelselektivflüssigmedium überführt und zweimal umgesetzt, um diploide Hefezellen zu selektionieren. Diese wurden anschließend auf Doppelselektivmediumplatten (gekennzeichnet mit (-)) überführt und für die weiteren Experimente verwendet.

Abbildung 3.2 zeigt, dass die haploiden Hefestämme erfolgreich zu diploiden Hefen gepaart wurden, da in allen Fällen Wachstum der Hefezellen auf Doppelselektivmedium zu sehen ist. Die so entstandenen diploiden Stämme produzieren jetzt die gegeneinander zu testenden Proteine und konnten folglich für Interaktionstests im *Yeast Two Hybrid Assay* untersucht werden.

3.1.3 Wachstumstests zur Untersuchung der Interaktion von $\beta 1$ Integrindomänen mit CagA, CagI und CagY

Die diploiden Hefestämme aus 3.1.2. wachsen auf Doppelselektivmedium aufgrund der Koexpression der Plasmide pGBKT7 und pGADT7, was zur Fähigkeit der Aminosäurebiosynthese von Tryptophan und Leucin der korrespondierenden Hefen führt.

Eine Interaktion zwischen den „bait“- und „prey“-Proteinen in der Hefezelle wird durch einen Wachstumstest auf Tripelselektivmedium (SD-Leu/Trp/His) bestimmt (s. 2.2.1.2.6). Die Ergebnisse nach vier Tagen Inkubation sind in Abbildung 3.3 dargestellt.



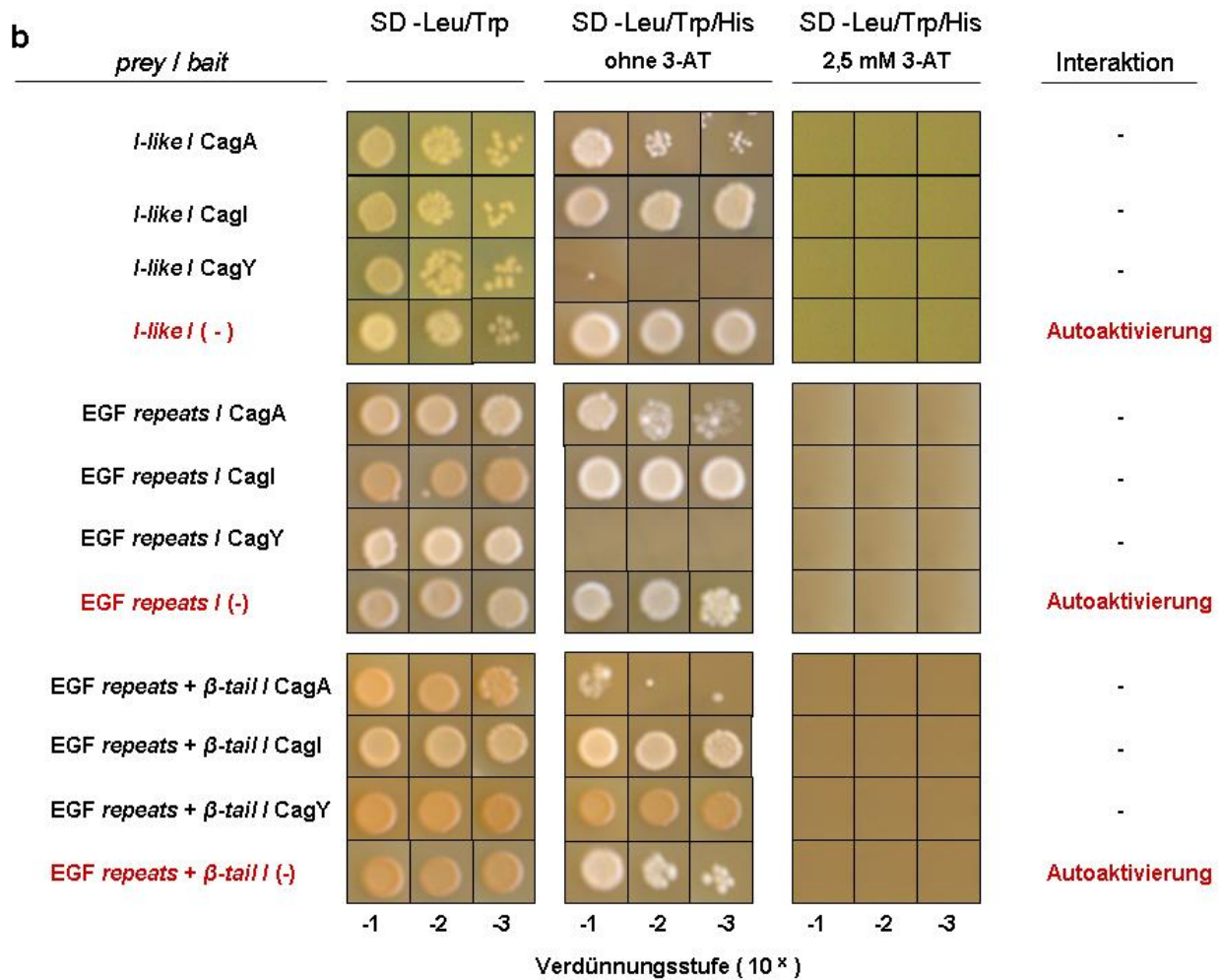


Abb. 3.3: Bestimmung der Interaktion zwischen β 1-Integrindomänen und CagA, Cagl und CagY aufgrund von Wachstumstests:

Die generierten diploiden Hefestämme sind auf Doppelselektivmedium (SD –Trp/-Leu) lebensfähig (**a und b**); die Positivkontrolle zeigt die Expression des Histidinbiosynthesegens, was durch Wachstum auf Tripelselektivmedium (SD-Trp/Leu/His) bestätigt wird, die Negativkontrolle dagegen nicht (**a**). Mögliche Interaktionen zwischen den β 1-Integrindomänen und den Proteinen CagA, Cagl und CagY wurden durch Wachstumstests der diploiden Hefestämme entweder auf Tripelselektivmedium (**a und b**) oder Tripelselektivmedium mit dem Histidinbiosyntheseinhibitor 3-AT (**b**) bestimmt.

(**a**) Eine deutliche heterotypische Interaktion wird zwischen der β -tail-Domäne und dem CagA-Protein (++) bzw. Cagl-Protein (++) deutlich, da diese Kombinationen zu einem starken Wachstum der diploiden Hefen auf Selektivmedium führen. Die Kombination der Plasmide für die β -tail-Domäne mit dem für das CagY-Protein führt zu keiner Interaktion dieser Proteine in der Hefezelle, da hier kein Wachstum auf Selektivmedium zu sehen ist (-). Eine Kombination des Leerplasmids mit dem für die β -tail-Domäne führt in diploiden Hefen nur sehr schwach zur Autoaktivierung des Histidinbiosynthesegens, weshalb das detektierte Hefewachstum auf Selektivmedium auf eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen zurückgeführt wird.

CagY zeigt dagegen eine starke heterotypische Interaktion mit der PSI-Domäne, da die Kombination dieser Proteine zu einem Wachstum der diploiden Hefen auf Selektivmedium führt (++)). Eine schwache Interaktion der PSI-Domäne mit dem CagA-Protein ist ebenfalls, aufgrund leichten Wachstums der entsprechenden Hefen auf Selektivmedium sichtbar (+). Cagl zeigt im *Yeast Two Hybrid Assay* keine Interaktion mit der PSI-Domäne, da hier kein Wachstum auf Selektivmedium detektiert werden konnte (-). Die Kombination des Leerplasmids mit dem

für die PSI-Domäne führt in diploiden Hefen nicht zu Autoaktivierung des Histidinbiosynthesegens, weshalb das detektierte Hefewachstum auf Selektivmedium auf eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen zurückgeführt wird.

(b). Die Plasmide für die β 1-Integrindomänen PSI + *I-like*, EGF *repeats* und EGF *repeats* + β -*tail* führen in diploiden Hefen kombiniert mit einem Leerplasmid zu einer starken Autoaktivierung des Histidinbiosynthesegens, da diese Hefen ohne rekonstituierten Gal4-Transkriptionsfaktor auf Selektivmedium wachsen können. Kombinationen von PSI + *I-like* bzw. EGF *repeats* mit dem CagA- oder CagI-Protein, sowie die Kombinationen EGF *repeats* + β -*tail* mit den Proteinen CagA, CagI und CagY führen zu unspezifischem Wachstum der Hefezellen auf Tripelselektivmedium aufgrund dieser Autoaktivierung. Die Zugabe von 2,5 mM 3-AT unterdrückt sowohl die Autoaktivierung dieser Domänen, als auch das unspezifische Wachstum der Hefezellen in Kombination mit den jeweiligen Cag-Proteinen.

Zur Analyse einer möglichen Interaktion von β 1-Integrindomänen wurden 15 verschiedene Kombinationen zwischen den fünf beschriebenen Integrindomänen und CagA, CagI und CagY getestet. Die untersuchten Proteinfragmente sind entweder an die DNS-Bindungsdomäne oder –Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 fusioniert. Durch eine mögliche Interaktion zwischen einer Integrindomäne und einem Cag-Protein wird der Transkriptionsfaktor für die Histidinbiosynthese zusammengefügt und ermöglicht dem Hefestamm das Wachstum auf Selektivmedium. In einzelnen Fällen kann die Fusion der DNS-Binde- oder Aktivierungsdomäne mit einem Protein dazuführen, dass eine einzelne Domäne des Transkriptionsfaktors ausreicht, um die DNS-Transkription zu starten, was als Autoaktivierung bezeichnet wird. Um ein autoaktivierendes Potenzial der Integrindomänen in den durchgeführten *Yeast Two Hybrid Assays* auszuschließen, wurden die an die Gal4-Aktivierungsdomäne fusionierten Genbereiche des β 1-Integrins jeweils zusammen mit einem Leerplasmid in der Hefe kombiniert.

Der *Yeast Two Hybrid Assay* deutet aufgrund des Wachstums auf Selektivmedium von Hefezellen, die die Plasmide für CagY und die PSI-Domäne enthalten, daraufhin, dass CagY mit der PSI-Domäne interagiert (s. Abb. 3.3. (a)). Für das Apparatsprotein CagY wurde im *Yeast Two Hybrid Assay* keine weitere positive Interaktion mit einer der Integrindomänen gefunden (s. Abb. 3.3 (a)), was zusätzlich die Hypothese unterstützt, dass CagY spezifisch an die PSI-Domäne des β 1-Integrins bindet. CagA scheint dagegen nur schwach mit der PSI-Domäne in Wechselwirkung zu stehen, da der entsprechende Hefestamm nur leicht auf dem Selektivmedium anwächst (s. Abb. 3.3 (a)). CagA zeigt neben der schwachen Interaktion mit der PSI-Domäne auch eine zweite, stärkere Interaktion mit der β -*tail* Domäne (s. Abb. 3.3 (a)). Diese Domäne ruft ebenfalls eine starke Interaktion mit dem Apparatsprotein CagI hervor (s. Abb. 3.3 (a)). Die Kombination der Plasmide, die für die PSI- bzw. β -*tail*-Domäne kodieren, mit dem entsprechenden Leerplasmid zeigt keine Autoaktivierung, da die resultierenden Hefestämme nicht auf Selektivmedium wachsen können (s. Abb. 3.3. (a)). In Vorarbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die Cag-

Proteine nicht autoaktivierend sind (Daten nicht dargestellt). Das selektive Wachstum der Hefestämme mit den Plasmiden, die für die Proteinkombinationen β -tail-Domäne und CagA bzw. Cagl, oder der PSI-Domäne und CagY kodieren, sind daher auf eine direkte Interaktion der entsprechenden Proteine in der Hefezelle zurückzuführen.

Die Integrindomänen PSI+I-like, EGF repeats und EGF repeats + β -tail-Domäne zeigen dagegen ein deutliches Potenzial zur Autoaktivierung des Histidinbiosynthesegens (s. Abb. 3.3 (b)). Diese Hefezellen, die nur das jeweilige prey-Plasmid gemeinsam mit dem Leervektor enthalten wachsen trotz Mangel an einem rekonstituierten Transkriptionsfaktor für das Histidinbiosynthesegen auf Selektivmedium. In diesem Fall kann die DNS-Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors aufgrund der Fusion an diese Integrindomänen allein die Expression des Reportergens induzieren. Das unspezifische Wachstum diploider Hefen mit der Kombination aus den Integrindomänen PSI+I-like, EGF repeats und EGF repeats + β -tail mit CagA, Cagl oder CagY wurde daher nicht als echte Interaktion der Proteine interpretiert. Zusätzlich konnte die Zugabe von 3-AT, einem kompetitiven Inhibitor der Histidinbiosynthese sowohl die beobachtete Autoaktivierung, als auch das unspezifische Wachstum der Hefen unterbinden (s. Abb. 3.3 (b)).

Die beschriebenen Wachstumsbeobachtungen des durchgeführten *Yeast Two Hybrid Assays* führen zu der ersten Annahme, dass die N-terminale PSI-Domäne des β 1-Integrins mit dem CagY-Protein, die nahe der Zytoplasmamembran lokalisierte β -tail-Domäne dagegen mit den Proteinen CagA und Cagl interagieren. Diese Proteinwechselwirkungen gehen aus einem Hefemodell hervor und wurden daher in weiteren Versuchen quantitativ und biochemisch bestätigt.

3.1.4 Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktionen aus dem *Yeast Two Hybrid Assay* durch den *Renilla Luciferase Assay*

Die Protein-Protein-Interaktionen, die aus dem *Yeast Two Hybrid Assay* mit Hilfe von Wachstumstests auf Tripelsektivmedium hervorgegangen sind, sollten weiter in einem biochemischen System untersucht werden. Dazu wurde das „*Renilla Luciferase Assay System*“ (Promega) verwendet (s. 2.2.4.13).

Abbildung 3.4 zeigt die Expression und Funktionalität, der an die *Renilla*-Luciferase gekoppelten, klonierten Cag-Proteine, sowie der Domänen des β 1-Integrins, welche an Protein A fusioniert wurden, in HEK-293 Zellen. Die klonierten Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Expression der jeweiligen Gene für die β 1-Integrindomänen im Western Blot mit Hilfe des fusionierten

Protein A nachgewiesen. Abbildung 3.4 (a) zeigt, dass die β 1-Integrindomänen *β -tail*, EGF *repeats*, EGF *repeats* + *β -tail*-Domäne und *I-like*-Domäne erfolgreich in HEK-293 Zellen produziert werden konnten (s. Abb. 3.4 (a)). Die Einführung des Gens für die PSI-Domäne in HEK-293 Zellen führte, trotz korrekt kloniertem Gen, dagegen zu keiner ausreichenden Expression des Gens (s. Abb. 3.4 (a)), weshalb ein Interaktionstest zwischen CagY und der PSI-Domäne in diesem System nicht möglich war. Um die erfolgreiche Expression von *cagA* und *cagI*, fusioniert an das Gen für die *Renilla*-Luciferase nachzuweisen, wurden die HEK-293 Zellen nach der Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden mit dem „*Renilla Luciferase Assay System*“ nach Herstellerangaben lysiert und die Aktivität des fusionierten Enzyms im Luminometer nachgewiesen und bestätigt (s. Abb. 3.4 (b)). Die Einführung beider Plasmide in die HEK-293 Zellen führte zu einer deutlichen Aktivität des Enzyms *Renilla*-Luciferase, verglichen mit einer Negativkontrolle, die kein Plasmid enthält. Da das *Renilla*-Luciferase-Gen an das *cagA*- oder *cagI*-Gen gekoppelt ist, bestätigt die gemessene Enzymaktivität auch die Produktion von CagA und CagI.

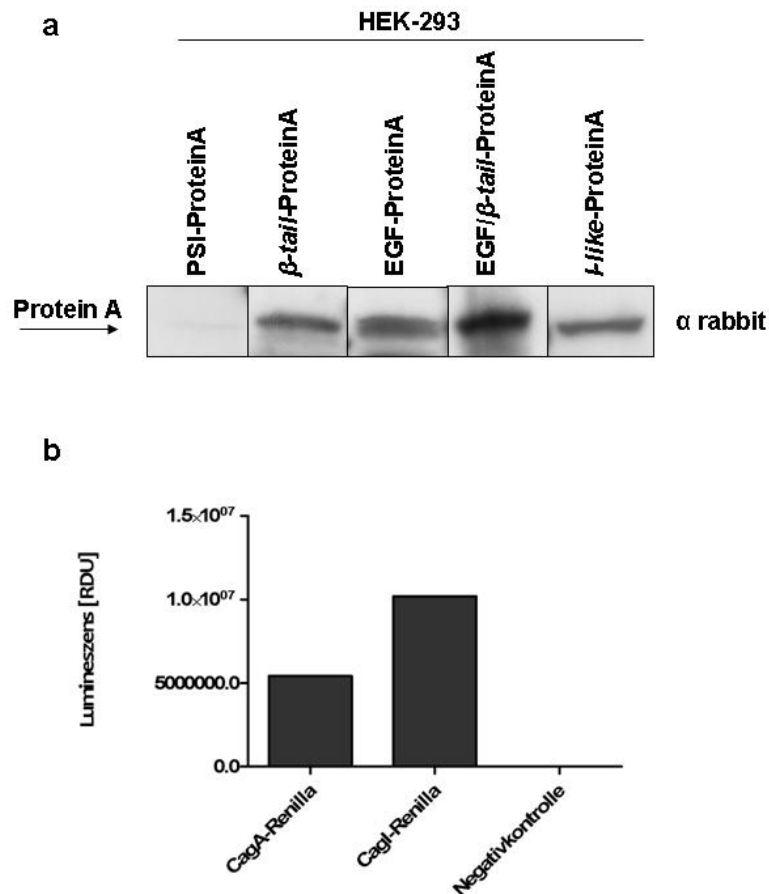


Abb. 3.4: Kontrolle der Produktion und Funktionalität der fusionierten Cag-Proteine und β 1-Integrindomänen in HEK-293 Zellen:

(a) HEK-293 Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden, die für die an das Protein A gekoppelten β 1-Integrindomänen kodieren, transfiziert und anschließend lysiert. Die Zelllysate wurden mit Hilfe von Western Blot auf das Vorhandensein von Protein A mit einem Antikörper gegen Kaninchen untersucht.

(b) HEK-293 Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden, die für die an das Enzym *Renilla*-Luciferase gekoppelten Proteine CagA und CagI kodieren, transfiziert und anschließend lysiert. Die Zelllysate wurden auf ihre Lumineszenz im Luminometer untersucht.

Nach Koexpression beider Plasmide, die entweder für ein *Renilla*-Luciferase fusioniertes Cag-Protein oder eine an das Protein A gekoppelte Domäne des β 1-Integrins kodieren, wurde die Protein-Interaktion zwischen Cag-Proteinen und β 1-Integrindomänen quantitativ untersucht. Für jedes Experiment wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, die zwei interagierende Proteine, welche jeweils durch die Plasmide pRenilla-CENP-T und pTrex-RBBP-7 kodiert werden, enthält (s. Abb. 3.5). Zusätzlich wurde für jedes Experiment die Hintergrundbindung von *Renilla*-CagA bzw. *Renilla*-CagI mit dem Protein A des pTrex-Plasmid bestimmt und die relative *Renilla*-Aktivität nach Abzug des Hintergrundes ermittelt.

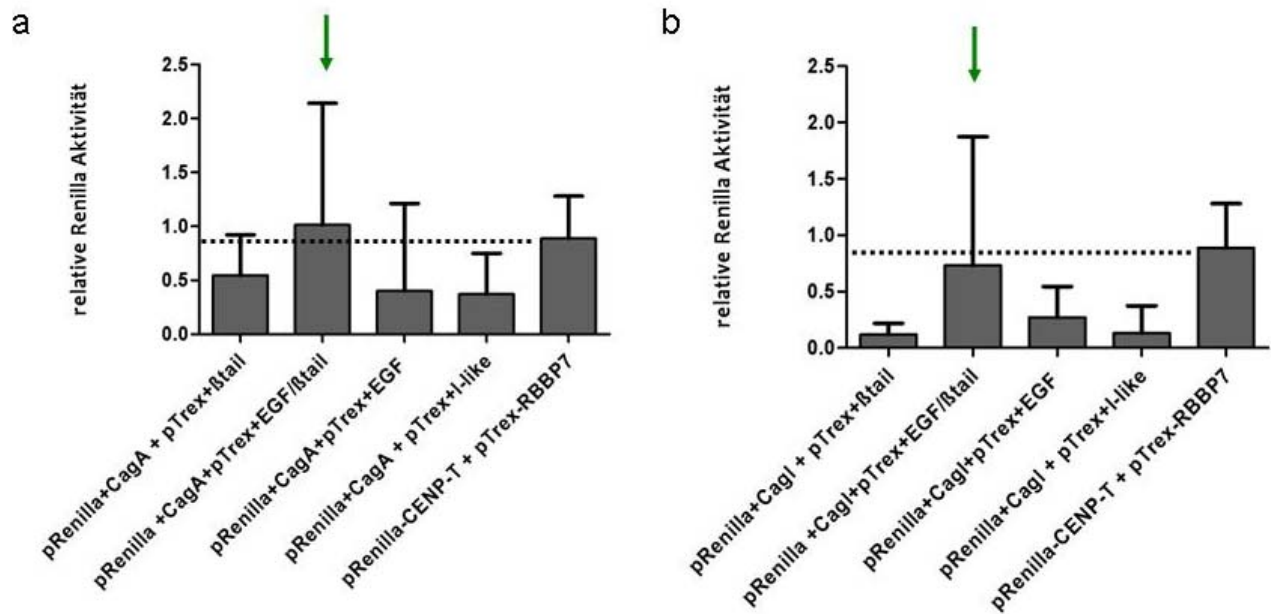


Abb. 3.5: Renilla Luciferase Assay zur quantitativen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen aus dem Yeast Two Hybrid Assay:

HEK-293 Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden, die für die, an das Protein A gekoppelten β 1-Integrindomänen (pTrex) und für die, an die *Renilla*-Luciferase fusionierten CagA- bzw. Cagl-Proteine (pRenilla) kodieren transfiziert und anschließend lysiert. Die Zellysate wurden mit IgG-gekoppelten Magnetkugeln inkubiert und diese im Magnetfeld vom Lysat getrennt. Die gebundenen Enzymkomplexe wurden durch Messung der *Renilla*-Luciferase Aktivität im Luminometer bestimmt. Die Enzymaktivität ist als Prozentteil der gesamten Aktivität im Zellysate angegeben und ergibt sich aus dem Anteil an *Renilla*-Luciferase, die aufgrund der Interaktion der Cag-Proteine mit der entsprechenden β 1-Integrindomäne mit Hilfe des Protein A aus dem Zellysate gezogen werden konnte. Die relative *Renilla*-Aktivität wurde nach Abzug der Hintergrundbindung von *Renilla*-CagA bzw. *Renilla*-Cagl an Protein A dargestellt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten und einschließlich der Standardabweichungen angegeben.

(a) *Renilla*-Luciferase Aktivität aus HEK-293 Zellen, die die angegebenen Domänen des β 1-Integrins mit dem N-terminalen Teil von CagA produzieren.

(b) *Renilla*-Luciferase Aktivität aus HEK-293 Zellen, die die angegebenen Domänen des β 1-Integrins mit Cagl produzieren.

In Abbildung 3.5 ist zu sehen, dass sowohl CagA als auch Cagl in Kombination mit der β 1-Integrindomäne EGF repeats + β -tail-Domäne die stärkste *Renilla*-Luciferase Aktivität hervorruft. Die gemessene Aktivität entspricht etwa der Aktivität der Positivkontrolle. Die Kombination von CagA und Cagl mit den anderen β 1-Integrindomänen führt nur zu einer sehr geringen Enzymaktivität, die unter der der Positivkontrolle liegt. Dieses System lässt auf eine Interaktion zwischen den Cag-Proteinen und der EGF repeats + β -tail-Domäne des β 1-Integrins schließen. Da diese Domäne ebenfalls die β -tail-Domäne enthält, welche im Yeast

Two Hybrid Assay zu einer positiven Protein-Interaktion mit CagA und CagI geführt hat, unterstützen diese Ergebnisse zusätzlich die zuvor erhaltenen Daten.

3.1.5 Verifizierung der Bindungsstellen von CagA, CagI und CagY innerhalb des β 1-Integrins

Zur weiteren biochemischen Bestätigung der im *Yeast Two Hybrid Assay* gefundenen Protein-Interaktionen, wurde ein unabhängiger *Pulldown Assay* durchgeführt (s. 2.2.3.9.). Die fünf Integrindomänen wurden dafür rekombinant in *E.coli* produziert (s. 2.2.3.8.) und kovalent an magnetische Kügelchen gebunden (s. 2.2.3.9.).

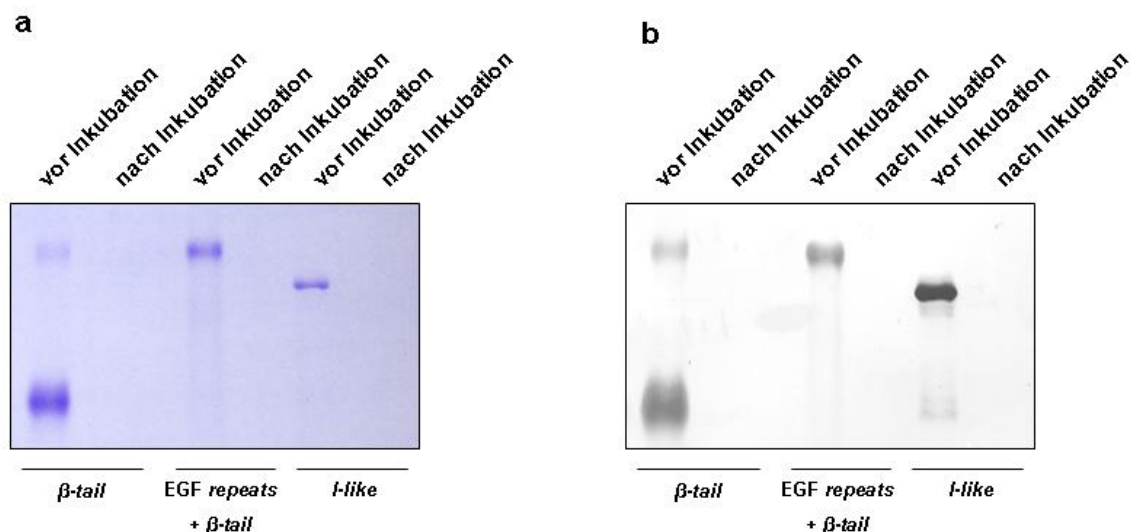


Abb. 3.6: Kopplung der rekombinant produzierten β 1-Integrindomänen an magnetische Kügelchen:

Nach der Aktivierung der Carboxylgruppen an der Oberfläche der magnetischen Kügelchen wurden diese mit den rekombinant produzierten Integrindomänen β -tail, EGF repeats + β -tail sowie I-like inkubiert. Die Proteinmenge im Proteinbindepuffer wurde vor und nach der Inkubation einmal mittels Western Blot mit dem Antikörper gegen den *His Tag* (a) und einmal mittels Coomassie-Färbung (b) detektiert.

Abbildung 3.6 zeigt die erfolgreiche Kopplung der rekombinanten Integrindomänen an die magnetischen Kügelchen. Die Proteine, die vor Inkubation der Magnetkugeln im Kopplungspuffer detektiert wurden sind anschließend nicht mehr nachweisbar. Dies bestätigt die Bindung der rekombinanten Proteine an die Magnetkugeln.

Um eine direkte Protein-Interaktion zwischen den Domänen des β 1-Integrins und den *Helicobacter*-Proteinen CagA, CagI und CagY zu bestätigen, wurden die oben beschriebenen magnetischen Kügelchen mit Lysaten von *H. pylori* inkubiert. Ein Vorteil

dieser Methode besteht darin, dass die zu untersuchenden Proteine nicht ausschließlich rekombinant hergestellt wurden. Die Proteine des Cag-T4SS werden vielmehr in ihrem nativen Zustand aus einem *Helicobacter*-Lysat präzipitiert. Damit ist auch das Expressionslevel bzw. Mengenverhältnis der Proteine den natürlichen Bedingungen angepasst. Die Bindung von CagA, Cagl und CagY an die entsprechende Integrindomäne nach den *Pulldown Assays* wurde mit dem jeweiligen Antikörper nachgewiesen (s. Abb. 3.7 und 3.8).

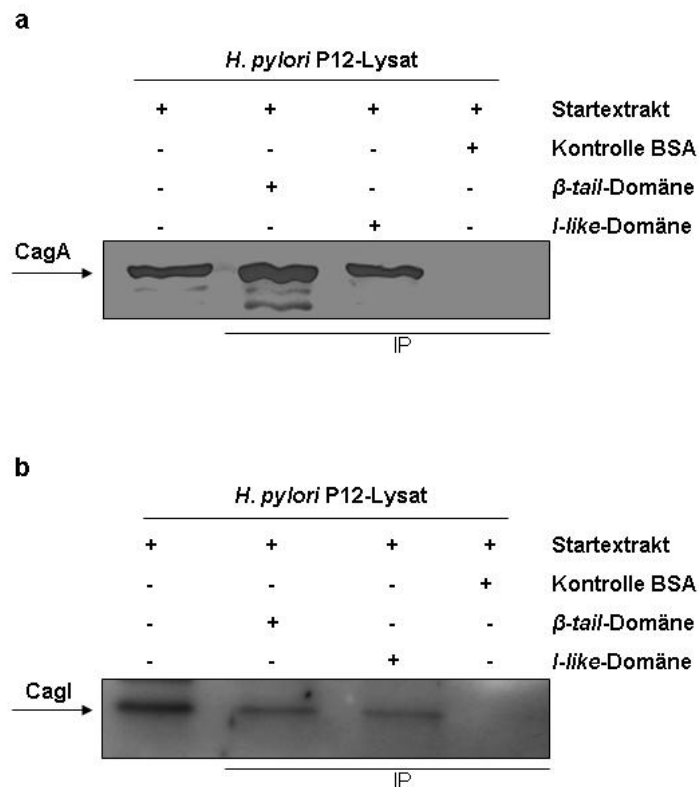


Abb. 3.7: Präzipitation von Proteinen aus *H. pylori* P12-Lysaten mittels magnetischer Kügelchen, die mit den Integrindomänen β -tail bzw. *I-like* gekoppelt sind:

Als Negativkontrolle dienen BSA-gekoppelte Magnetkügelchen. Die Bakterien wurden in HSL-Puffer durch Ultraschall aufgeschlossen und der zytoplasmatische Teil für den *Pulldown Assay* verwendet. Präzipitation von nativem CagA (**a**) und Cagl (**b**) aus einem Lysat des Stamms *H. pylori* P12. Kontrollpräzipitationen mit BSA-gekoppelten Magnetkügelchen zeigen die Spezifität der Proteinbindung. Die dargestellten Experimente sind beispielhaft aus fünf unabhängigen Versuchen ausgewählt und abgebildet.

Wie im *Yeast Two Hybrid Assay*, kann eine direkte Protein-Interaktion zwischen CagA bzw. Cagl und der β -tail-Domäne auch mit dem biochemischen *Pulldown Assay* bestätigt werden (s. Abb. 3.7). Da CagA und Cagl auch mit der *I-like*-Domäne des β 1-Integrins präzipitiert werden können, ist das positive Signal für diese Proteinkombination im *Yeast Two Hybrid Assay* nicht nur auf das autoaktivierende Potenzial der *I-like*-Domäne

zurückzuführen. Es scheint eine weitere biochemische Wechselwirkung zwischen der *I-like*-Domäne und CagA bzw. CagI zu geben. Die Spezifität der Protein-Interaktion von CagA und CagI, ausschließlich mit dem β 1-Integrin wird mit Hilfe von BSA-Magnetkügelchen bestätigt.

CagY zeigte im *Yeast Two Hybrid Assay* eine Interaktion mit der PSI-Domäne, mit den Domänen *β -tail* und *I-like* des β 1-Integrins konnte dagegen keine Interaktion festgestellt werden. Die rekombinante Produktion der PSI-Domäne für *Pulldown Assays* konnte weder in prokaryotischen, noch in eukaryotischen Expressionsmodellen, aufgrund der hohen Toxizität des Proteins für die entsprechenden Zellen nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Um dennoch im Ausschlussverfahren die Interaktion von CagY mit der N-terminalen PSI-Domäne zu untermauern, wurden die Präzipitate der, mit den Domänen *β -tail* und *I-like* gekoppelten magnetischen Kügelchen zusätzlich auf das Vorhandensein von CagY untersucht (s. Abb. 3.8).

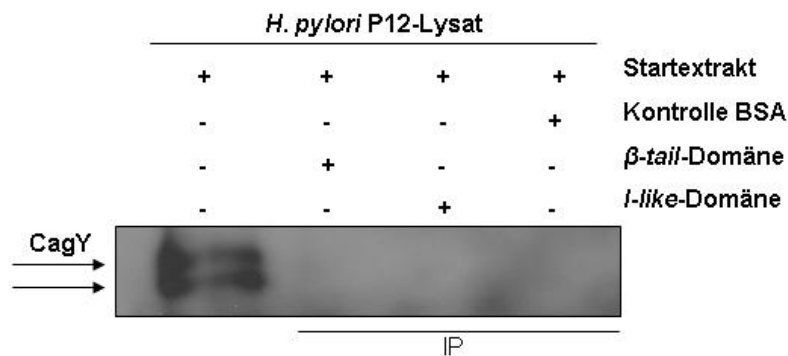


Abb. 3.8: Test auf Präzipitation von CagY aus *H. pylori* Lysaten mittels magnetischer Kügelchen, die mit den Integrindomänen *β -tail* bzw. *I-like* gekoppelt sind:

Als Negativkontrolle dienen BSA-gekoppelte Magnetkügelchen. Die Bakterien wurden in HSL-Puffer mittels Ultraschall lysiert und der zytoplasmatische Teil zur Präzipitation verwendet. Eine mögliche Bindung an die β 1-Integrindomänen von CagY aus einem Lysat von *H. pylori* P12 wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen CagY detektiert. Dieses Experiment wurde beispielhaft aus drei unabhängigen Versuchen ausgewählt und abgebildet.

CagY ist deutlich im Startextrakt detektierbar, was bestätigt, dass das Protein in ausreichender Menge für eine möglich Präzipitation während des *Pulldown Assays* zur Verfügung stand (s. Abb. 3.8). Wie Abbildung 3.8 zeigt konnte CagY aber weder mit der *β -tail* noch der *I-like*-Domäne präzipitiert werden. Damit konnte biochemisch bestätigt werden, dass es keine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen diesen Domänen des β 1-Integrins und CagY gibt. Dadurch wird das Ergebnis des unter 3.1.3. beschriebenen *Yeast Two Hybrid Assays* mit einer unabhängigen Methode verifiziert.

3.2. Identifizierung der Bindungsregion des CagA-Proteins für das β 1-Integrin

Es konnte sowohl in Vorarbeiten, als auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Effektorprotein CagA von *H. pylori* mit dem Oberflächenprotein β 1-Integrin direkt interagiert (Jimenez-Soto et al., 2009; Kwok et al., 2007). Diese Protein-Protein-Interaktion scheint für die anschließende Translokation und Tyrosinphosphorylierung von CagA in die menschliche Magenepithelzelle essentiell zu sein. Zur weiteren Untersuchung des Translokationsmechanismus von CagA sollte der Aminosäurebereich innerhalb des Proteins identifiziert werden, der für die Bindung an den Rezeptor notwendig ist.

3.2.1 Eingrenzung des N-terminalen Bereichs von CagA

Es wurde gezeigt, dass CagA mit seiner N-terminalen Hälfte an das β 1-Integrin bindet (Jimenez-Soto et al., 2009). Dieser Bereich umfasst noch 612 Aminosäuren der 1214 Aminosäurereste des CagA-Proteins. In dieser Arbeit sollte dieser Teil des Proteins weiter verkürzt werden und die entstandenen Fragmente auf ihr Interaktionspotenzial mit dem β 1-Integrin getestet werden. Dafür wurden die ersten 612 Aminosäuren von CagA, jeweils ausgehend vom N- bzw. C-terminalen Ende schrittweise um ca. 100 Aminosäuren verkürzt. Es wurden mit Hilfe der „nested“-PCR acht Fragmente des N-terminalen *cagA*-Gens generiert (Abb. 3.10), welche nach der Gateway®-Klonierung in dem „bait“-Plasmid pGBKT7 exprimiert wurden (s. 2.2.2.11). Die daraus resultierenden Hefestämme wurden Y31 bis Y38 bezeichnet (s. Abb. 3.9)

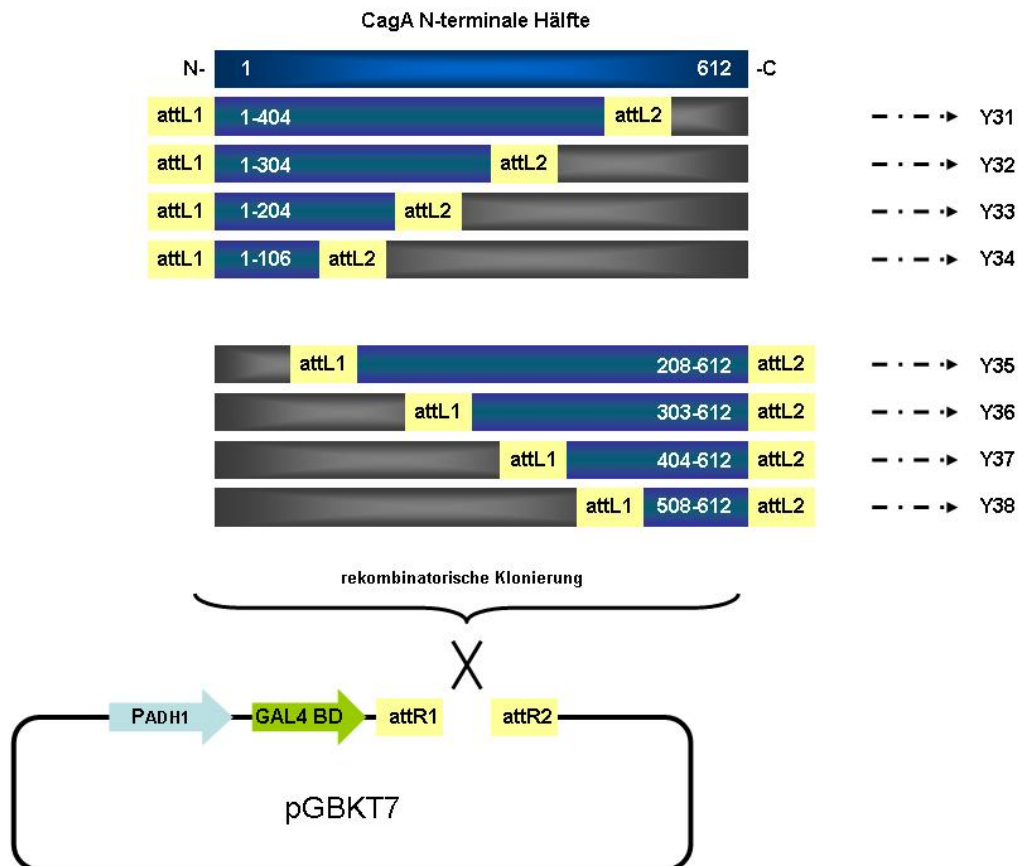


Abb. 3.9: Klonierung von CagA-Fragmenten und Fusion an die Gal4-DNS-Bindedomäne:

Der N-terminale Bereich des CagA-Proteins wurde in acht verschiedene Fragmente des *cagA*-Gens unterteilt und aus dem Stamm *H. pylori* 26695 amplifiziert, die durch rekombinatorische Klonierung über *attachment sites* zunächst in den Eingangsvektor pDONR207 (nicht dargestellt) und anschließend in das „*baït*“-Plasmid pGBKT7 eingefügt wurden. Dieses Plasmid beinhaltet einen *ADH1*-Promotor und fusioniert die klonierte Gensequenz N-terminal an die Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors. Die nach der Transformation resultierenden Hefestämme wurden Y31, Y32, Y33, Y34, Y35, Y36, Y37 und Y38 benannt.

Für die Expression der β -*tail*-Domäne des β 1-Integrins wurden die „*prey*“-Plasmide (pGADT7) aus dem vorangegangenen *Yeast Two Hybrid Assay* (s. 3.1.3.) verwendet. Die haploiden Hefen wurden, wie unter Kapitel 2.2.1.2.5. beschrieben, zur Generierung diploider Hefestämme gepaart (nicht dargestellt). Die Interaktion der exprimierten Genprodukte wurde daraufhin durch den Wachstumstest der diploiden Hefestämme auf Tripelselektivmedium ermittelt (s. 2.2.1.2.6) (s. Abb. 3.10).

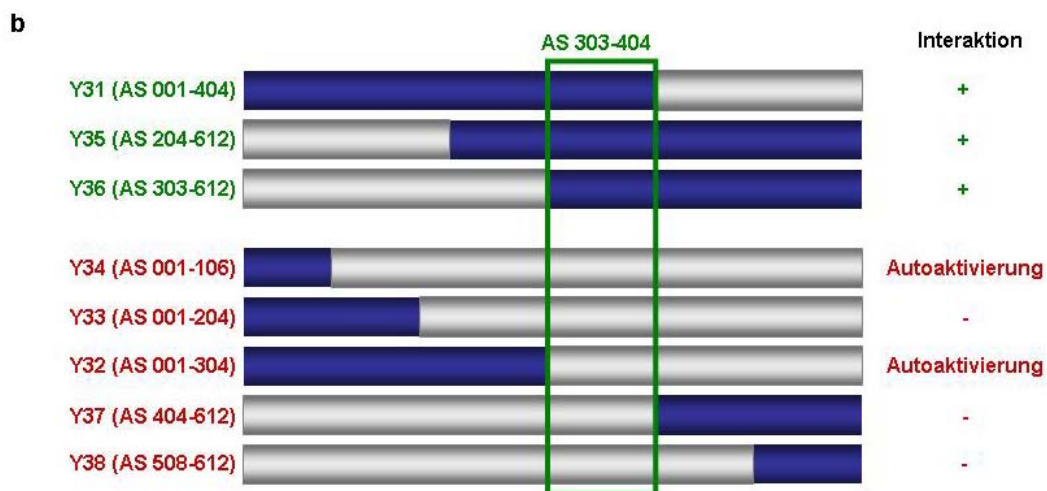
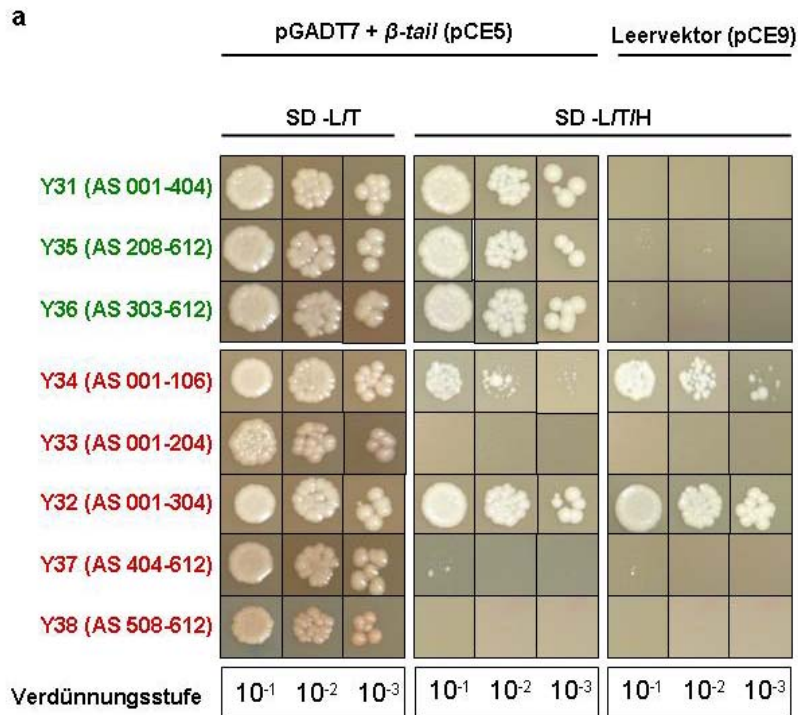


Abb. 3.10: Interaktionstest der Fragmente der N-terminalen Hälfte von CagA mit der β -tail-Domäne des β 1-Integrins:

(a) Die haploiden Hefestämme Y31, Y32, Y33, Y34, Y35, Y36, Y37 und Y38 wurden mit dem entsprechenden haploiden Hefestamm der das „prey“-Plasmid kodierend für die β -tail-Domäne bzw. den entsprechenden Leervektor enthält gepaart. Die Selektion erfolgte auf Doppelselektivmedium (SD-Leu/Trp) und der anschließende Wachstumstest auf Tripelselektivmedium (SD-Leu/Trp/His). Jedes Fragment des verkürzten CagA-Proteins wurde in Kombination mit dem Leervektor (pCE9) auf autoaktivierendes Potenzial getestet.

(b) Schematische Darstellung der CagA-Fragmente. Das grüne Rechteck grenzt den Aminosäurebereich (AS 303-404) ein, der vorhanden sein muss um eine Interaktion mit der β -tail-Domäne in der Hefezelle zu erzeugen.

Die Hefestämme Y31, Y35 und Y36 exprimieren einen Sequenzbereich des *cagA*-Gens, der die Region kodierend für die Aminosäurereste 303 bis 404 enthält, wohingegen den Hefestämmen Y34, Y33, Y32, Y37 und Y38 dieser Sequenzbereich fehlt. Nach Paarung aller Hefestämme mit dem Hefestamm, welcher die β -tail-Domäne über das „prey“-Plasmid produziert, ist nur den Hefestämmen Y31, Y35 und Y36 ein Wachstum auf Tripelselektivmedium möglich. Diese Stämme produzieren die CagA-Fragmente, die den *cagA*-Sequenzbereich von Aminosäure 303 bis 404 kodieren. Hefen (Y34, Y33, Y32, Y37 und Y38), die diesen Genbereich des *cagA* nicht mehr exprimieren zeigen kein Wachstum auf Tripelselektivmedium und somit keine Interaktion des jeweiligen CagA-Fragment mit der β -tail-Domäne. Dies gilt auch für die Hefestämme Y34 und Y32, deren Wachstum auf Tripelselektivmedium vermutlich auf das starke Autoaktivierungspotenzial der CagA-Fragmente 1-106 (Y34) bzw. 1-304 (Y32) zurückzuführen ist. Mit diesem Eingrenzungsverfahren kann gezeigt werden, dass im *Yeast Two Hybrid Assay* der Proteinbereich von Aminosäure 303-404 von CagA notwendig ist, um eine Interaktion mit der β -tail-Domäne hervorzurufen. Dadurch kann geschlussfolgert werden, dass die Region von CagA, die für die Bindung an das β 1-Integrin verantwortlich ist innerhalb der Aminosäuren 303 bis 404 lokalisiert ist.

In einem weiteren *Yeast Two Hybrid Assay* sollte das Potenzial der Aminosäureregion 303 bis 404 bezüglich seiner Interaktion mit der β -tail-Domäne noch weiter eingegrenzt werden. Dafür wurden die Genbereiche des *cagA*-Gens, welche für die Aminosäuren 303-404, 303-350, 350-404 und 329-374 kodieren durch direkte Klonierung über die Schnittstellen *EcoRI* und *Sall* in das „bait“-Plasmid pGBKT7 inseriert (s. Abb. 3.11) und anschließend der korrespondierende Hefestamm mit den entstandenen Plasmiden transformiert (s. 2.2.1.2.4.), woraus die Hefestämme Y79, Y63; Y69 und Y80 entstanden.

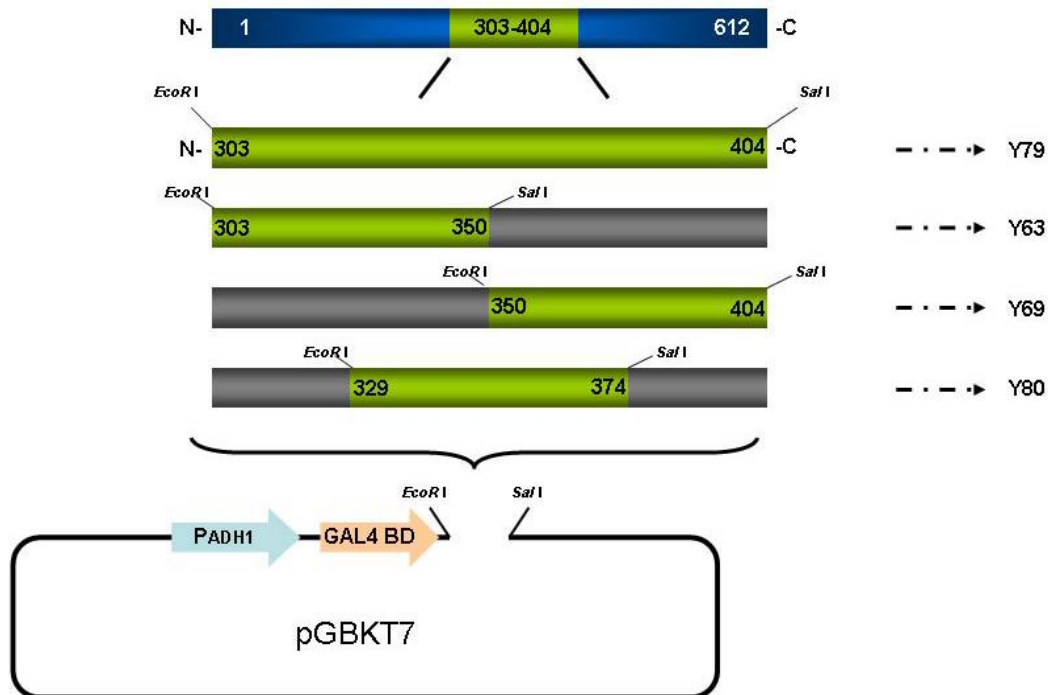


Abb. 3.11: Klonierung von CagA-Fragmenten und Fusion an die Gal4-DNS-Bindedomäne:

Vier verschiedene Fragmente der potenziellen Integrin-Bindedomäne des *cagA*-Gens aus dem Stamm *H. pylori* 26695 wurden amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SalI* direkt in den *Yeast Two Hybrid*-Vektor pGBKT7 kloniert. Dieses Plasmid beinhaltet einen *ADH1*-Promotor und fusioniert die klonierte Gensequenz N-terminal an die DNS-Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors. Die daraus resultierenden Hefestämme wurden Y79, Y63, Y69 und Y80 benannt.

Die Hefestämme Y79 (AS 303-404), Y63 (AS 303-350), Y69 (AS 350-404) und Y80 (AS 329-374) wurden durch „*mating*“ mit dem für die β -*tail*-Domäne kodierenden Hefestamm Y5 für Wachstumstests gepaart. Eine mögliche Interaktion zwischen den CagA-Fragmenten und der β -*tail*-Domäne wurde durch Wachstum der so generierten, diploiden Hefestämme auf Tripelselektivmedium ermittelt (s. Abb 3.12).

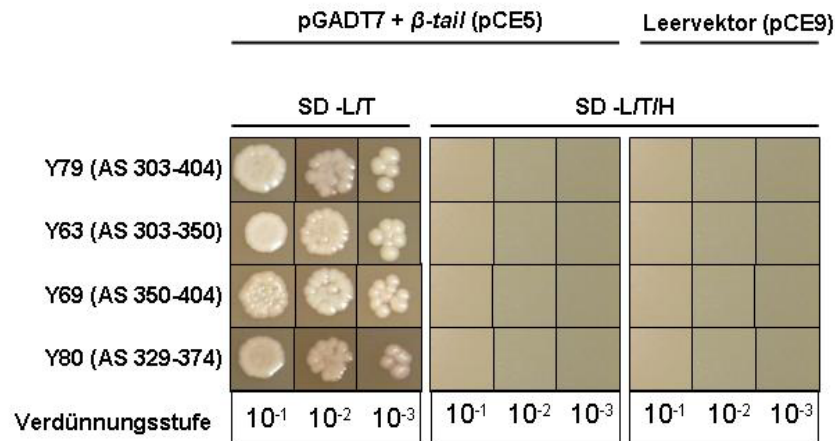


Abb. 3.12: Interaktionstest der verkürzten CagA-Fragmente des Aminosäurebereichs 303 bis 404 mit der β -tail-Domäne des β 1-Integrins:

Die Hefestämme Y79, Y63, Y69 und Y80 wurden mit den entsprechenden haploiden Hefestämmen die das, für die β -tail-Domäne kodierende „prey“-Plasmid bzw. den entsprechenden Leervektor enthalten gepaart. Die Selektion erfolgte auf Doppelselektivmedium (SD-Leu/Trp) und der anschließende Wachstumstest auf Tripelselektivmedium (SD-Leu/Trp/His). Jedes Fragment des verkürzten CagA-Proteins wurde in Kombination mit dem Leervektor (pCE9) auf autoaktivierendes Potenzial getestet.

Aus Abbildung 3.12 geht hervor, dass eine Interaktion von diesen kurzen CagA-Fragmenten mit der β -tail-Domäne im *Yeast Two Hybrid Assay* nicht nachweisbar ist. Weder die vorhergesagte CagA-Region von Aminosäure 303-404, noch die weiteren Verkürzungen (AS 303-350; AS 350-404; AS 329-374) zeigen eine Interaktion mit der β -tail-Domäne in der Hefezelle. Es handelt sich bei den Fragmenten des CagA-Proteins um sehr kurze Proteinfragmente, die genetisch an die DNS-Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors gekoppelt wurden. Das deutlich höhere Molekulargewicht der fusionierten DNS-Bindedomäne könnte während der Proteinfaltung in der Hefezelle das jeweilige kurze CagA-Fragment abschirmen und so die Bindung mit der β -tail-Domäne inhibieren. Um die CagA-Binderegion der Aminosäuren 303-404 dennoch zu untersuchen und zu bestätigen, wurden weitere biochemische und physiologische Tests durchgeführt.

3.2.2 Auswirkungen der potenziellen CagA - β 1-Integrin Binderegion auf die Infektion von AGS Zellen mit *H. pylori*

Um zu bestätigen, dass die Aminosäuresequenz 303-404 von CagA (CagA₃₀₃₋₄₀₄) an das β 1-Integrin bindet, wurde die Gensequenz, die für diesen Bereich kodiert in das Expressionsplasmid pASK IBA43+ kloniert. Dadurch kommt es nach Expression in *E. coli* zur Produktion von CagA₃₀₃₋₄₀₄ mit einem N-terminalen *His-Tag* (His- CagA₃₀₃₋₄₀₄), über den das

Proteinfragment aufgereinigt wurde. Das isolierte Protein wurde anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, um den Reinheitsstatus mit Hilfe von Coomassie-Färbung zu überprüfen. Da dieses Proteinfragment für Infektionsexperimente benutzt werden sollte, war ein hoher Reinheitsstatus nötig um keine anderen störenden Komponenten in den Infektionsablauf zu bringen. In Abbildung 3.13 ist His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ nach der Aufreinigung im Lysepuffer (6M Urea), sowie nach Dialyse im Arbeitspuffer (1x PBS) dargestellt. Es sind keine Verunreinigungen durch andere Proteine oder Abbauprodukte nach der Dialyse des gewünschten CagA-Fragments zu erkennen.

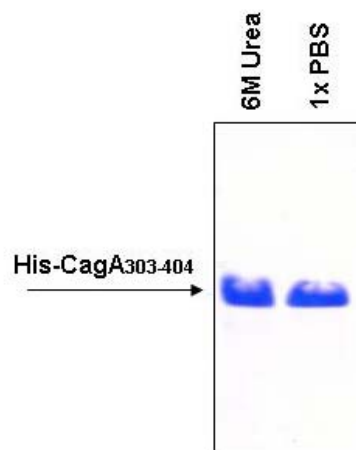


Abb. 3.13: Nachweis von aufgereinigtem His-CagA₃₀₃₋₄₀₄:

Ein Aliquot des aufgereinigten His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ (10 µl) wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (20 %) aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt.

Um zu untersuchen, ob die Bindung von CagA mit seiner Aminosäuresequenz von 303-404 an das β 1-Integrin eukaryotischer Zellen eine Funktion im Ablauf der CagA-Translokation hat, sollte die Rolle dieser Aminosäuresequenz während Infektionsexperimenten von AGS Zellen mit *H. pylori* getestet werden (s. 2.2.4.10.). Hierzu wurde zunächst kontrolliert, ob das aufgereinigte His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an AGS Zellen bindet. Die Zellen wurden dafür mit verschiedenen Konzentrationen des aufgereinigten Proteins 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit 1 x PBS gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Volllysate der Zellen wurden daraufhin mittels Western Blot analysiert und His-Tag markierte Proteine mit einem Antikörper gegen das Histidin-Hexamer detektiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die zuvor nicht mit dem CagA-Fragment inkubiert wurden.

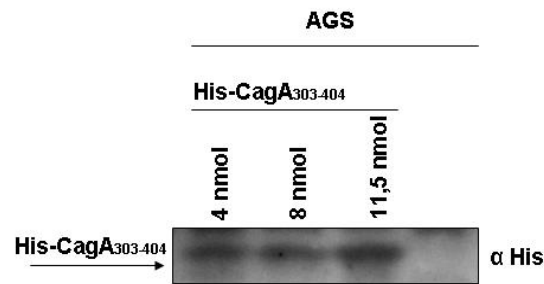


Abb. 3.14: Nachweis der Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die Oberfläche von AGS Zellen:

Zum Nachweis der Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die AGS Zellen wurden diese, nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C mit unterschiedlichen Mengen des Proteinfragments, dreimal gewaschen und anschließend lysiert. Die Lysate wurden mit Western Blot untersucht und His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ mit Hilfe des spezifischen Antikörpers gegen den *His-Tag* detektiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen die zuvor nicht mit dem Proteinfragment inkubiert wurden.

Wie aus Abbildung 3.14 hervorgeht, bindet das Proteinfragment His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die AGS Zellen. *His-Tag* markiertes Protein konnte in allen Ansätzen, die mit His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ inkubiert wurden nachgewiesen werden. Die so detektierten Banden befinden sich auf der Höhe von Proteinen der Größe 13 kDa, was auch dem Molekulargewicht von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ entspricht. Weiterhin ist diese Bande nur in Zelllysaten zu erkennen, die zuvor mit dem Protein behandelt wurden, was die Spezifität der Analyse und des Antikörpers bestätigt.

Zusätzlich sollte die Bindung des Proteinfragments His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ in Abhängigkeit von β 1-Integrinen auf der Zelloberfläche untersucht werden. Hierfür wurden die Epithelzelllinien GE11 (β 1-Integrin-negativ) und GE11 β (β 1-Integrin-positiv) mit dem aufgereinigten Proteinfragment inkubiert. GE11 Zellen produzieren im Gegensatz zu GE11 β Zellen keine β 1-Integrine an ihrer Oberfläche. Um zu untersuchen, ob die Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an Epithelzellen über das β 1-Integrin vermittelt wird, wurden die GE11 und GE11 β Zellen mit dem Proteinfragment inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Daraufhin wurde die Bindung des *His-Tag* markierten Proteins mit einem Antikörper gegen den *His-Tag* detektiert und die Zellen durchflusszytometrisch gemessen (s. Abb. 3.15).

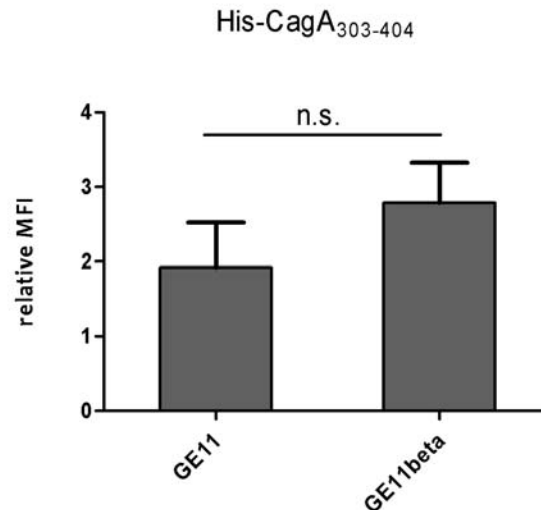


Abb 3.15 : Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an GE11 und GE11β:

5×10^5 GE11 und GE11β Zellen wurden mit His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ für 1h bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die Zellen wurde mit einem Antikörper gegen den *His-Tag* (1:1000) und einem sekundären Kaninchen anti-Maus FITC Konjugat (1:1000) detektiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt.

Die Versuche ergaben, eine leicht erhöhte Bindung (~ 0,5-fach) des isolierten Proteinfragments His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die Zelllinie GE11β, die zusätzlich zu β3-Integrinen auch β1-Integrine exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ das β1-Integrin als Bindungsmolekül nutzt, in Abwesenheit des Rezeptors aber beispielsweise auch an die β-Untereinheit von β3-Integrinen binden kann. Da die Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die GE11 Zellen aber weniger intensiv ist, zeigt dies, dass die zusätzliche Anwesenheit von β1-Integrinen die Bindungskapazität von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die Epithelzellen erhöht und die β1-Integrine somit als Bindungsrezeptoren für das Proteinfragment dienen.

Ausgehend von diesen Ansätzen wurden Infektionsexperimente mit AGS Zellen, die zuvor mit dem Proteinfragment His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ inkubiert wurden, mit *H. pylori* P12 durchgeführt. Dabei sollte die Translokation von nativem CagA in AGS Zellen nach Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an den Rezeptor β1-Integrin untersucht werden. Hierzu wurden die AGS Zellen nach der Inkubation mit His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ für 3-4 h mit *H. pylori* P12 infiziert und die Zelllysate anschließend mittels Western Blot analysiert, wobei Tyrosin-phosphorylierte Proteine mit dem Antikörper 4G10 detektiert wurden.

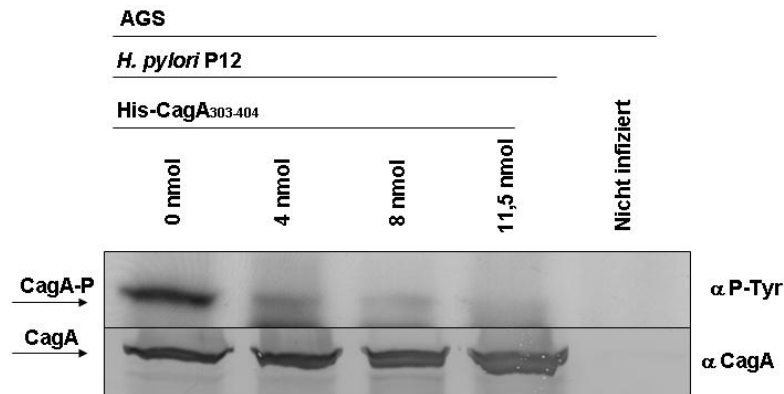


Abb. 3.16: Effekt von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ auf die Translokation von nativem CagA in AGS Zellen:

Die Zellen wurden 30 min mit 4 nmol (Spur 2), 8 nmol (Spur 3) und 11,5 nmol (Spur 4) His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ bei 4°C inkubiert und anschließend mit *H. pylori* P12 infiziert. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen dienten Zellen, die nicht mit His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ behandelt wurden und dann mit *H. pylori* P12 infiziert wurden (Spur 1) bzw. nicht infizierte Zellen (Spur 5). Nach 3-4 h wurde die Infektion gestoppt, die Zellen lysiert und die Lysate im Western Blot untersucht. Dabei wurden Tyrosin-phosphorylierte Proteine mit Hilfe des Antikörpers 4G10 detektiert. Dieses Experiment ist beispielhaft aus sechs unabhängigen Versuchen ausgewählt und abgebildet worden.

Der Western Blot zeigt, dass der verwendete Stamm *H. pylori* P12 AGS Zellen infiziert und dabei sein Effektorprotein CagA in die Zellen transloziert, was wiederum durch eine Tyrosin-Phosphorylierung deutlich wird (s. Abb. 3.16 Spur 1). Nach Inkubation der Zelllinie AGS mit unterschiedlichen Konzentrationen von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ nimmt die Intensität der Tyrosin-Phosphorylierung und folglich die Translokation von CagA konzentrationsabhängig ab. Bei einer zugegebenen Menge von 4 nmol des Proteinfragments ist noch eine leichte CagA-Phosphorylierung in den AGS Zellen zu sehen (s. Abb. 3.16 Spur 2). Bei erhöhten Konzentrationen (8 nmol, Spur 3; 11,5 nmol Spur 4) nimmt diese weiter deutlich ab. Die Inhibition der CagA-Translokation durch His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ zeigt, dass eine Bindung von nativem CagA von *H. pylori* an die Oberfläche von AGS Zellen ein essentieller Schritt für die weitere Translokation des Proteins in das Zytoplasma der eukaryotischen Zelle ist. Das Fragment His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ scheint den Rezeptor β 1-Integrin durch seine Bindung an die β -tail-Domäne für das native CagA von *H. pylori* zu blockieren und damit seine Translokation zu verhindern. Dies wird zudem verdeutlicht, da dies ein konzentrationsabhängiger Mechanismus zu sein scheint, bei dem die Anzahl der blockierten Rezeptoren auch die Effizienz der CagA-Translokation reduziert.

Viele Proteine werden als Liganden für das β 1-Integrin beschrieben, darunter Invasin. Invasin ist ein Protein, welches bei *Yersinia spp.* die β 1-Integrin-abhängige Adhäsion und Invasion des Bakteriums in eukaryotische Zellen vermittelt (Dersch and Isberg, 1999). Um zu bestätigen, dass die Inhibition der CagA-Translokation durch His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ spezifisch auf der Blockierung der Bindungsregion für CagA innerhalb der β -Untereinheit beruht und

nicht eine allgemeine Unzugänglichkeit der β 1-Integrine für *H. pylori* verursacht, wurden Translokationsexperimente unter der Beteiligung von Invasin durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen, wie oben beschrieben für 30 min mit dem rekombinanten GST-Invasin inkubiert und anschließend eine drei- bis vier-stündige Infektion mit *H. pylori* P12 durchgeführt. Nach der Zellyse wurden die Proben wiederum auf Tyrosin-phosphorylierte Proteine im Western Blot untersucht.

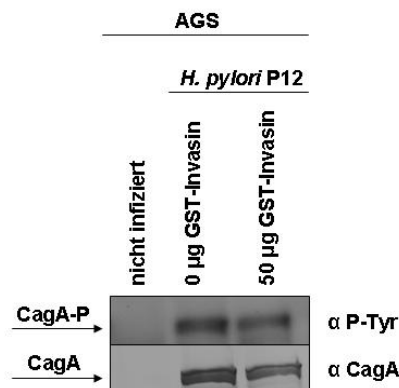


Abb. 3.17: Effekt von GST-Invasin auf die Translokation von nativem CagA in AGS Zellen:

Zur Kontrolle der spezifischen Inhibition der nativen CagA-Translokation durch His-CagA₃₀₃₋₄₀₄, wurde der Effekt des β 1-Integrin-bindenden Proteins GST-Invasin auf die CagA-Translokation während der *H. pylori*-Infektion untersucht. Hierzu wurden die Zellen 30 min bei 4°C mit 50 µg GST-Invasin inkubiert und anschließend eine Infektion mit *H. pylori* P12 für 3-4 h durchgeführt. Nach der Zellyse wurden die Proben mit Western Blot analysiert und Tyrosin-phosphorylierte Proteine mit dem Antikörper 4G10 detektiert.

In Abbildung 3.17 ist zu erkennen, dass die Behandlung der Zellen mit GST-Invasin keine Reduktion von phosphoryliertem CagA im Vergleich zu Infektionen mit unbehandelten Zellen hervorruft. Die CagA-Translokation ist folglich durch die Bindung von GST-Invasin an das β 1-Integrin nicht beeinträchtigt. Invasin nutzt eine andere Bindungsregion als CagA innerhalb der β 1-Integrine, wodurch die β -tail-Domäne für CagA weiter zugänglich bleibt. Dies zeigt, dass eine spezifische Bindung von CagA an die β -tail-Domäne ein essentieller Schritt während der Translokation des Effektorproteins in eukaryotische Zellen ist.

3.2.3 Effekt von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ auf die Bindung des 9EG7 Antikörpers an β 1-Integrine

Der Antikörper 9EG7 ist ein β 1-Integrin-spezifischer monoklonaler Antikörper, der im Bereich der EGF repeats an die β -Untereinheit bindet. Die Bindungsregion des Antikörpers konkurriert nicht mit der Bindungsregion von CagA, weshalb beide Proteine gleichzeitig an

das $\beta 1$ -Integrin binden können (Jimenez-Soto et al., 2009). Integrine können auf der Zelloberfläche in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, die Auskunft über ihren Aktivierungszustand geben. Sind die extrazellulären Domänen der Integrine gestreckt, werden sie als aktiviert betrachtet. Eingeklappte Domänen deuten dagegen auf einen inaktiven Zustand der Integrine hin (Askari et al., 2009; Luo et al., 2007). Der Antikörper 9EG7 bindet verstärkt an die aktivierte $\beta 1$ -Untereinheit des Integrins, die eine gestreckte Konformation aufweist. Dieser Effekt lässt sich durch Zugabe von 2 mM $MnCl_2$ noch erhöhen (s. Abb. 3.18) (Lu et al., 1998; Oxvig und Springer, 1998). Um zu untersuchen, ob His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ eine Konformationsänderung der Integrine in den inaktiven Zustand hervorruft und über diesen Mechanismus die CagA-Translokation inhibiert, wurden Bindungsexperimente mit dem 9EG7 Antikörper durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob eine Vorinkubation von AGS Zellen mit dem Proteinfragment His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ Einfluss auf die Bindungskapazität des 9EG7 Antikörpers hat. Die Experimente wurden dabei jeweils mit und ohne Zugabe von $MnCl_2$ durchgeführt (s. Abb. 3.18).

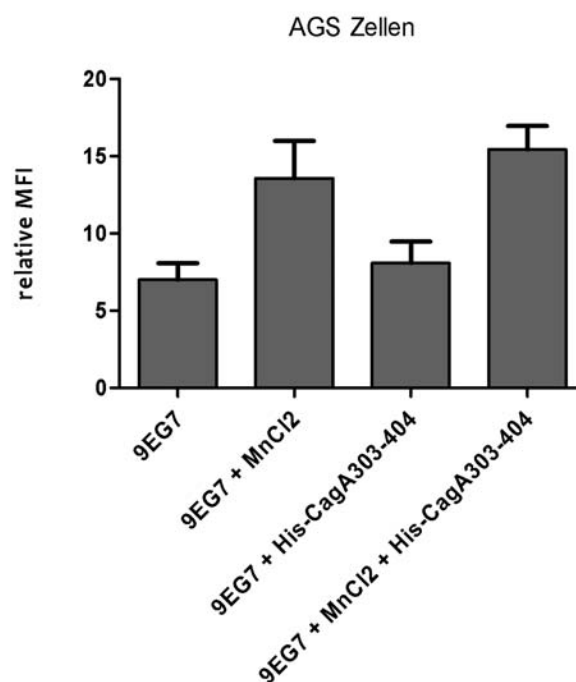


Abb. 3.18 : Bindung des Antikörper 9EG7 an AGS Zellen in An- und Abwesenheit von 2mM $MnCl_2$ bzw. His-CagA₃₀₃₋₄₀₄:

5×10^5 AGS Zellen wurden entweder nach 1-stündiger Vorinkubation mit His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ bei 4°C oder unbehandelt dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Ratte anti-human CD29 Antikörper (9EG7; 1:1000) in An- bzw. Abwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ für 1h bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper anti-Ratte FITC Konjugat wurden alle Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt.

Wie in Abbildung 3.18 deutlich wird, zeigt der Antikörper 9EG7 eine Bindung an die AGS Zellen, die durch Zugabe von $MnCl_2$ wie erwartet erhöht wird (~ 2 -fach). Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Proteinfragment His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ verhindert die anschließende Bindung des 9EG7 Antikörper weder in An- noch in Abwesenheit von $MnCl_2$. Dabei liegt die Bindungskapazität ohne $MnCl_2$ für den 9EG7 Antikörper nach Vorbehandlung mit His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ im gleichen Bereich, wie ohne Zugabe von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄. Dies trifft auch für die Versuchsansätze zu, denen $MnCl_2$ zugegeben wurde zu. Eine Inkubation mit His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ verändert die Bindungsintensität des Antikörpers 9EG7 nicht. Dies deutet darauf hin, dass die alleinige Bindung von His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ an $\beta 1$ -Integrine keinen Effekt auf die Konformation des Rezeptors hat und weder eine Aktivierung noch eine Inaktivierung des $\beta 1$ -Integrins auslösen kann.

3.3. Untersuchungen zu möglichen CagA-Translokationsmechanismen, die unabhängig vom Cag-TypIV-Sekretionssystem sind

Die Translokation des Effektorprotein CagA wird, wie bereits beschrieben über das Cag-T4SS vermittelt. Beide Komponenten dieses Translokationsvorgangs stellen dabei wichtige Virulenzfaktoren von *H. pylori* dar. CagA interferiert aufgrund seiner Tyrosin-Phosphorylierung durch eukaryotische Kinasen mit zellulären Signalwegen. Der äußere Teil des Cag-T4SS dagegen, führt zu einer Immunantwort der Zelle in Form von Sekretion des Zytokins Interleukin-8 (IL-8). Die Induktion der IL-8 Sekretion durch den Cag-Apparat ist dabei unabhängig von der Expression des *cagA*-Gens, vielmehr ist ein intaktes Cag-T4SS Voraussetzung für die Sekretion von IL-8 durch die menschliche Magenepithelzelle (Fischer et al., 2001). Des Weiteren konnten Murata-Kamiya et al. zeigen, dass eine direkte Interaktion von CagA und Phosphatidylserin auf der Wirtszellmembran eine Bedingung der CagA-Translokation ist. *H. pylori* ruft dabei die Externalisierung von Phosphatidylserin an die äußere Schicht der eukaryotischen Membran hervor, wobei dieser Prozess unabhängig von CagA und dem Cag-T4SS ist (Murata-Kamiya et al., 2010). Diese Beobachtungen könnten auf einen anderen Translokationsmechanismus, ohne Beteiligung des Cag-T4SS am Transfer von CagA über die eukaryotische Membran hinweisen. Um dies zu untersuchen, sollte zunächst festgestellt werden, ob *H. pylori* CagA auch ohne funktionelles Cag-T4SS auf seiner Oberfläche exponieren kann.

3.3.1 Lokalisierung von CagA auf der Oberfläche von Cag-TypIV-Sekretionssystem-defekten Mutanten

Das Cag-T4SS von *H. pylori* ist ein supramolekulares Proteingerüst, welches die innere und äußere Membran des Bakteriums durchspannt (Christie et al., 2005). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. pylori* zeigen nadelartige Fortsätze, welche als Kanal für den Transport von CagA durch das Cag-T4SS an die Bakterienoberfläche dienen könnten (Rhode et al., 2003). Deletionen der Gene *cagE* oder *cagY*, die für eine ATPase (CagE) bzw. ein Apparatsprotein (CagY) kodieren, unterbinden die Translokation von CagA in die Wirtszelle während einer Infektion. Um zu zeigen, dass dieser Phänotyp nicht lediglich auf das Fehlen von CagA an der Bakterienoberfläche zurückzuführen ist, wurden Wildtyp-Bakterien, sowie Deletionsmutanten der Gene *cagE* und *cagY* mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (s. 2.2.1.1.10). Zusätzlich sollte dabei untersucht werden, ob der N-Terminus von CagA an der Oberfläche präsentiert wird, da dieser Teil für die Bindung an den Rezeptor β 1-Integrin notwendig ist. Hierzu wurde das Protein mit einem spezifischen Antikörper gegen den N-terminalen Teil von CagA (AK268) auf der Bakterienoberfläche detektiert. Die Exposition von CagA an der Oberfläche konnte bei den Stämmen P12, P12 Δ *cagE*, P12 Δ *cagY* durch rote Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden. Die Mutante P12 Δ *cagA* führte zu keiner Anfärbung der Bakterienoberfläche und zeigt die Spezifität dieses Versuchs (s. Abb. 3.19).

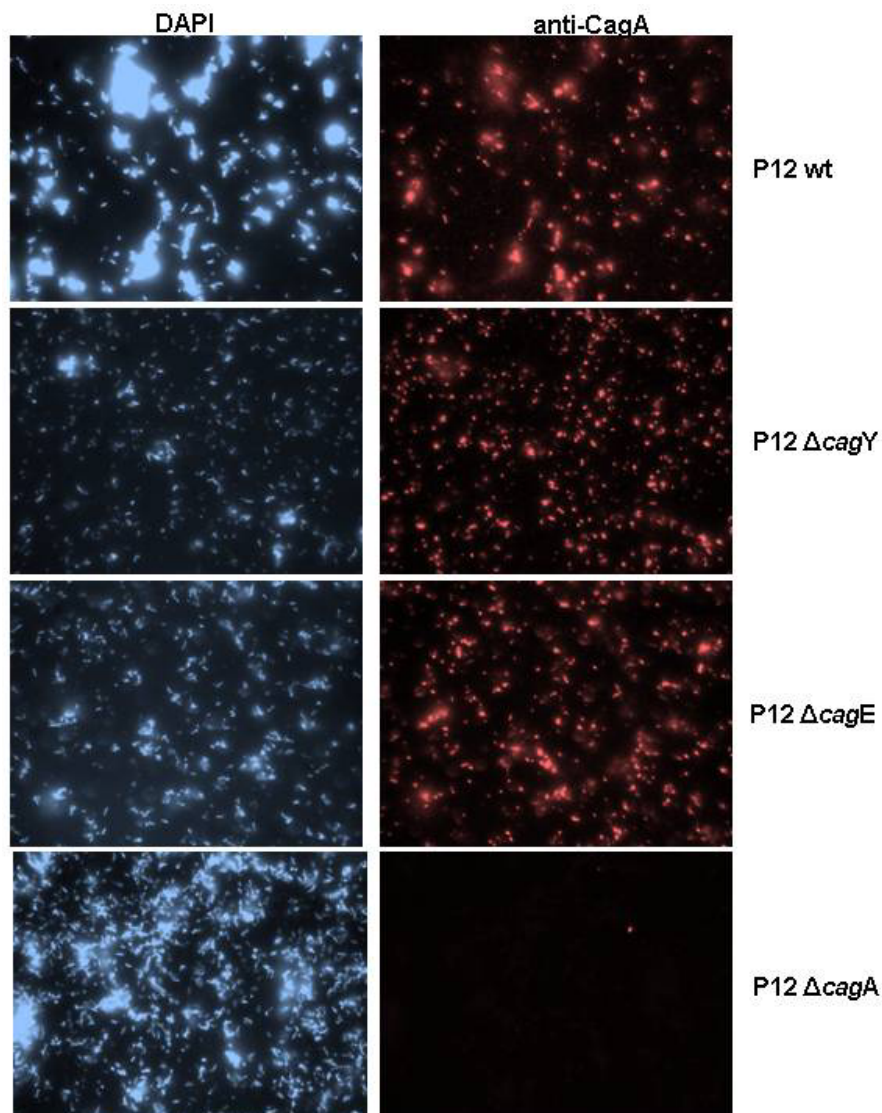


Abb. 3.19: Oberflächenlokalisierung von CagA:

Die CagA-Proteine auf der Oberfläche der *H. pylori* Stämme P12, P12 Δ cagE, P12 Δ cagY und P12 Δ cagA wurden mit einem Antikörper gegen CagA (AK268) und einem Alexa555 gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörper sichtbar gemacht (dargestellt in rot). Die Gegenfärbung der Bakterien wurde mit DAPI durchgeführt (dargestellt in blau). Die Stämme P12 und P12 Δ cagA dienen als Positiv- bzw. Negativkontrollstämmen.

Wie Abbildung 3.19 zeigt, konnte CagA an der Oberfläche der CagA-translokationsdefekten Mutanten P12 Δ cagY und P12 Δ cagE nachgewiesen werden. Da der gegen CagA gerichtete Antikörper spezifisch den N-terminalen Teil von CagA erkennt, konnte zusätzlich bestätigt werden, dass der für die Bindung an das β 1-Integrin notwendige Bereich auch bei diesen Mutanten oberflächlich exponiert wird. Da hiermit gezeigt wurde, dass die Mutanten von *H. pylori* mit defektem Cag-T4SS, sowohl CagA an der Oberfläche exponieren, als auch eine Externalisierung von Phosphatidylserin in der eukaryotischen Zellmembran erzeugen (Murata-Kamiya et al., 2010) sollte weiterhin untersucht werden, ob ein Cag-T4SS-unabhängiger Mechanismus der CagA-Translokation in *H. pylori* existiert.

3.3.2 Nachweis von CagA in Membranvesikeln

Eine Möglichkeit für den Cag-T4SS-unabhängigen Transfer von CagA stellen Membranvesikel (OMV) dar. Mikroorganismen produzieren Membranvesikel um verschiedene Virulenzfaktoren zu mobilisieren. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob *H. pylori* zusätzlich zum Cag-T4SS diesen Mechanismus nutzt, um das Cytotoxin CagA in die eukaryotische Zelle zu translozieren. Hierfür wurden Membranvesikel aus dem Überstand von Flüssigkulturen der Stämme P12, P12 Δ cagY und P12 Δ cagE isoliert (s. 2.2.1.1.11.) und auf das Vorhandensein von CagA getestet. Das Effektorprotein konnte dabei in allen drei Stämmen nachgewiesen werden (s. Abb 3.20). Damit konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* trotz eines defekten Cag-T4SS CagA an der Oberfläche exponieren und über Membranvesikel in die Umgebung abgeben kann.

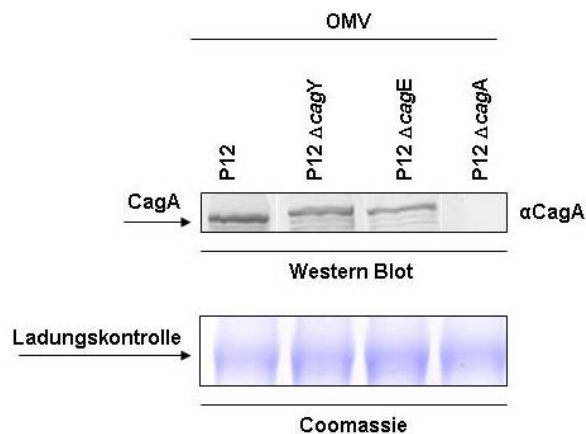


Abb. 3.20: Lokalisierung und Nachweis von CagA in Membranvesikeln:

Die Stämme P12, P12 Δ cagE, P12 Δ cagY und P12 Δ cagA wurden in Flüssigmedium kultiviert und Membranvesikel aus dem Überstand isoliert. Zur Gewinnung der Membranvesikel-Lysate wurden diese mit 2 x SDS Probenpuffer bei 95°C gekocht. Die Anwesenheit von CagA in den Membranvesikel wurde mit einem Antikörper gegen CagA nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde das SDS-Polyacrylamidgel zusätzlich mittels Coomassie-Färbung auf den Gehalt an Gesamtprotein kontrolliert.

3.3.2.1 Untersuchung des Potenzials zur CagA-Translokation durch Membranvesikel

Um zu klären, ob die Membranvesikel-abhängige Ausschleusung von CagA in die Umgebung zu einer Translokation von CagA, ohne Beteiligung des Cag-T4SS in menschliche Zellen führt, wurden AGS Zellen, sowie differenzierte HL-60 Zellen (dHL-60) mit den isolierten Membranvesikeln der Stämme *H. pylori* P12, P12 Δ cagY, P12 Δ cagE und

P12 Δ cagPAI inkubiert. Bei der Zelllinie HL-60 handelt es sich um Zellen, die sich aufgrund verschiedener Stimuli zu monozytischen oder granulozytischen Zellen verändern können. Die Translokation von CagA in dHL-60 Zellen führt zu einer Prozessierung des Proteins. Odenbreit et al. beschrieben die Prozessierung von CagA erstmals bei der Translokation in Makrophagen. Dabei wird CagA proteolytisch in ein 100 kDa und ein 40 kDa Fragment gespalten. Das 40 kDa Fragment stellt den C-terminalen Teil des Proteins dar und wird von der Makrophagenzelle an den EPIYA-Motiven phosphoryliert. Diese Prozessierung von CagA ist in der Zelllinie AGS nicht zu beobachten.

Für die hier gezeigten *Phosphotyrosin Assays* wurden die Zellen 24 bis 48 h zu monozytischen Zellen differenziert (dHL60) (s. 2.2.4.3.). Nach Infektion mit *H. pylori* P12 bzw. der Inkubation mit den verschiedenen OMV wurden die Zellen, wie bei einer Infektion lysiert (s. 2.2.4.9.) und mit Hilfe von Western Blot auf phosphoryliertes CagA untersucht. Zusätzlich wurde eine Infektion mit dem Stamm P12 als Positivkontrolle durchgeführt (s. Abb. 3. 21).

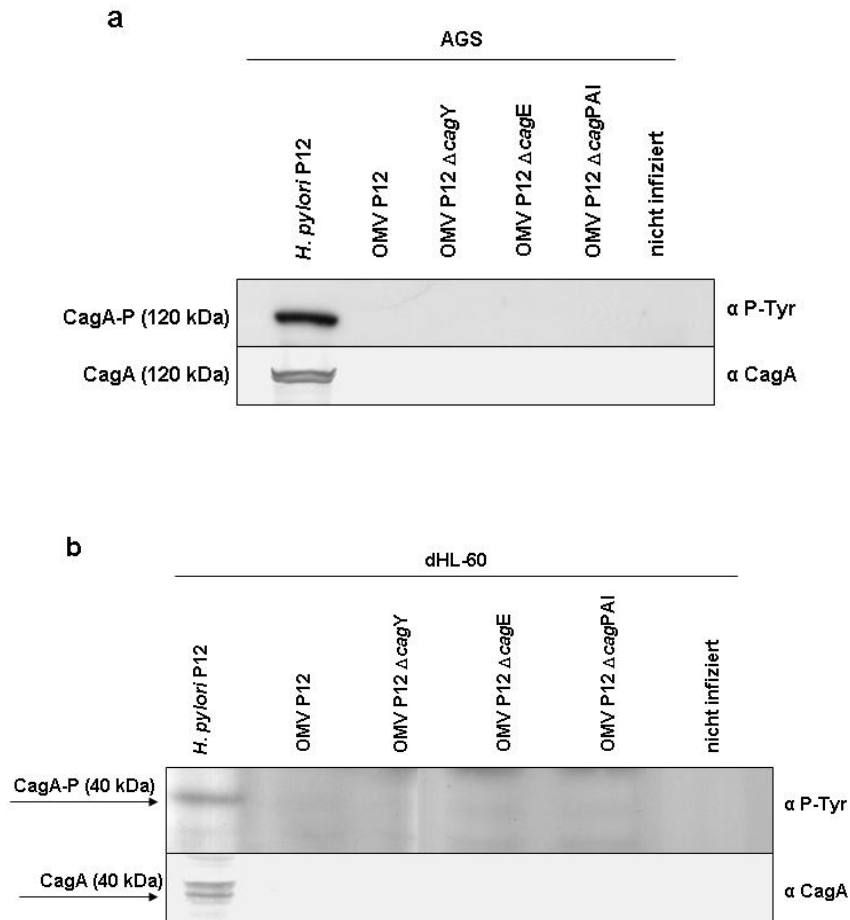


Abb. 3.21: Phosphotyrosin Assay mit isolierten Membranvesikeln und lebenden *H. pylori* P12:

Immunoblots, mit *H. pylori* P12 infizierter Zellen (Spur 1), sowie mit Membranvesikel der Stämme P12 (Spur 2), P12 Δ cagY (Spur 3), P12 Δ cagE (Spur 4), P12 Δ cagPAI (Spur 5) inkubierter Zellen. Die Zellysate wurden in AGS Zellen auf ungespaltenes (120 kDa), sowie in dHL-60 Zellen auf gespaltenes (40 kDa) Tyrosin-phosphoryliertes CagA (CagA-P) untersucht und mit dem Antikörper 4G10 detektiert. Anschließend wurden die Immunoblots mit NaOH von den gebundenen Antikörpern befreit und ungespaltenes, sowie gespaltenes nicht phosphoryliertes CagA als Ladungskontrolle mit einem Antikörper gegen CagA detektiert.

(a) Phosphotyrosin Assay mit Mageneithelzellen AGS

(b) Phosphotyrosin Assay mit dHL60

Eine Infektion mit lebenden Bakterien *H. pylori* P12 führte sowohl bei der Infektion von AGS Zellen, sowie bei dHL-60 Zellen zu einer Translokation und Phosphorylierung von CagA und bestätigt so die Funktionalität des Versuchs (Abb. 3.21 a und b (Spur 1)). Die Inkubation der entsprechenden Zelllinien mit den isolierten Membranvesikeln (OMV) brachte dagegen in beiden Zelllinien kein Phosphorylierungssignal hervor. Dies stimmt auch mit der Detektion von unphosphoryliertem CagA auf den Zellen überein. Abbildung 3.21 zeigt, dass CagA nur nach einer Inkubation mit den lebenden Bakterien auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden konnte. Die Bindung isolierter Membranvesikel an die Zellen scheint demnach nicht möglich zu sein. Folglich stellt die bloße Ausschleusung von CagA-positiven

Membranvesikeln in den Überstand vermutlich keine Möglichkeit zum Transfer von CagA über die Membran eukaryotischer Zellen dar. Andere Faktoren, wie die Adhäsion-vermittelte Adhärenz von *H. pylori* an eukaryotische Zellen könnten für eine OMV-vermittelte Translokation von CagA Voraussetzungen sein.

3.3.3 Untersuchung möglicher CagA-Translokationsmechanismen hinsichtlich der CagA-Prozessierung

Um zu klären, ob die Proteolyse von CagA in Zusammenhang mit einem anderen Translokationsmechanismus zu bringen ist, der durch die Beteiligung phagozytierender Zellen induziert wird, wurden Infektionsexperimente mit den *H. pylori*-Stämmen P12, P12 Δ cagY und P12 Δ cagE und dHL-60 Zellen, sowie frisch isolierten PBLC`s aus humanen Blut (s. 2.2.4.8.) durchgeführt. PBLC`s zirkulieren im Blut und sind mitunter Vorläuferzellen von Makrophagen, deren Aufgabe die Abwehr körperfremder Strukturen durch Phagozytose und anschließende Antigenpräsentation ist.

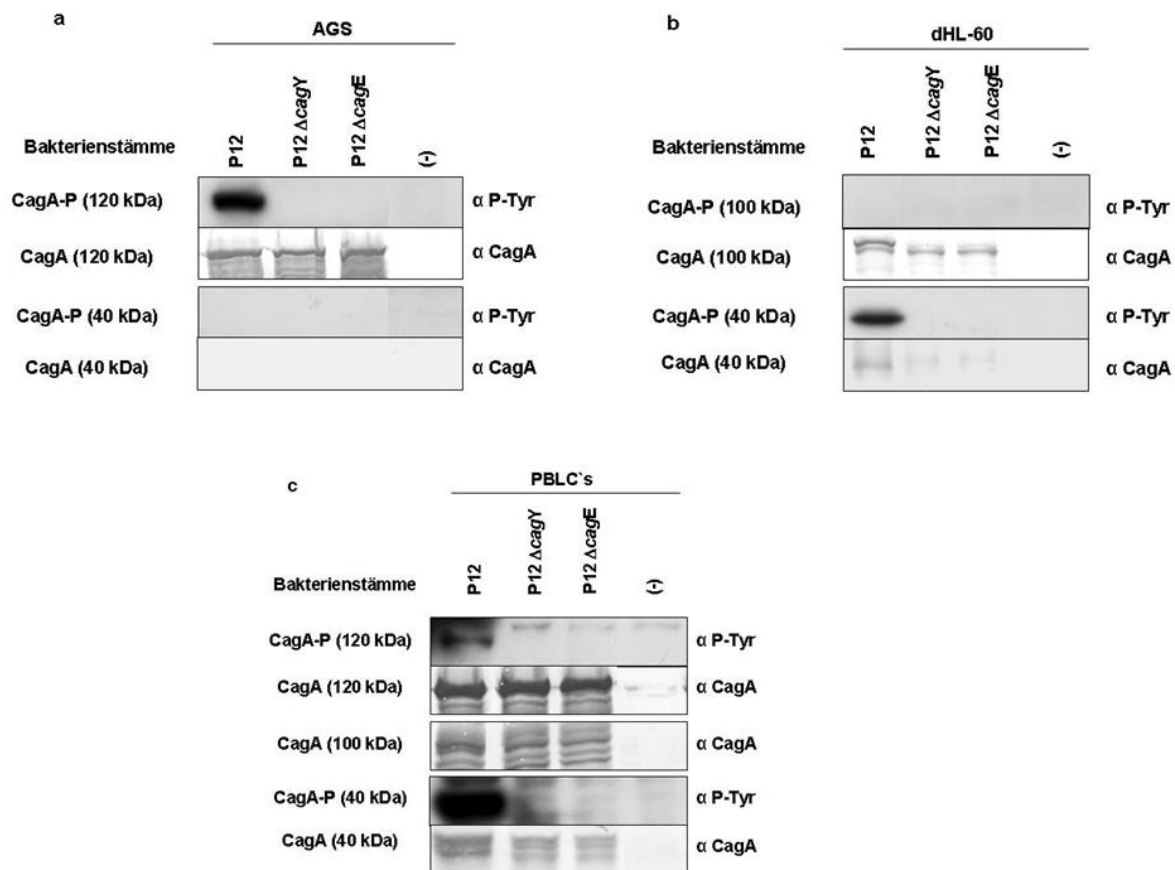


Abb. 3.22: Prozessierung und Phosphorylierung von CagA in den Zelllinien AGS, dHL60 und PBLC's:

Immunoblots, von mit P12, P12 Δ cagE und P12 Δ cagY infizierten Zelllinien. Die Zellysate wurden auf ungespaltenes (120 kDa), sowie gespaltenes (40 kDa) phosphoryliertes CagA (CagA-P) untersucht und mit Antikörper PY99 detektiert. Anschließend wurden die Immunoblots mit NaOH von den gebundenen Antikörpern befreit und ungespaltenes, sowie gespaltenes nicht phosphoryliertes CagA (CagA) als Ladungskontrolle mit einem Antikörper gegen CagA detektiert.

(a) *Phosphotyrosin Assay* mit den Magenepithelzellen AGS

(b) *Phosphotyrosin Assay* mit dHL-60 Zellen

(c) *Phosphotyrosin Assay* mit frisch isolierten PBLC's

Abbildung 3.22 zeigt, dass eine Translokation und Phosphorylierung von CagA auch bei dHL60 Zellen und PBLC's nur durch den Wildtypstamm von *H. pylori* vermittelt wird. Mutanten mit defektem Cag-T4SS zeigen weder bei der Magenepithelzelllinie noch bei den Immunzellen ein positives Translokationssignal für CagA. Eine Prozessierung von CagA ist nur bei dHL60 Zellen und PBLC's sichtbar. Zudem ist die Prozessierung von unphosphoryliertem CagA in ein 100 kDa und ein 40 kDa Fragment nur in Zellysaten nach Infektion mit dem P12 Wildtypstamm sichtbar. Die deutlich schwächeren Banden in dHL-60- und PBLC's-Zellysaten nach Infektion mit P12 Δ cagY und P12 Δ cagE sind nicht auf der gleichen Höhe, wie die CagA-Banden nach Infektion mit P12 Wildtypbakterien und daher als Hintergrundbanden zu betrachten. In Zellysaten der Infektionen mit den Stämmen

P12 Δ cagY und P12 Δ cagE ist somit kein unphosphoryliertes CagA sichtbar. Eine generelle proteolytische Spaltung von CagA durch infizierte Zellen kann dadurch ausgeschlossen werden und bestätigt die Beobachtungen von Odenbreit und Kollegen. Dies zeigt zusätzlich, dass die phagozytierenden dHL60 Zellen und PBLC's nicht unspezifisch Oberflächen-CagA von *H. pylori* aufnehmen und proteolytisch spalten. Vielmehr scheint die proteolytische Spaltung von CagA in diesen Zellen nach erfolgreicher Translokation von CagA durch *H. pylori* abzulaufen. Da die Deletionsmutanten, wie bei der AGS Zelllinie keine CagA-Translokation und Phosphorylierung in den Immunzellen zeigen, deutet dies zusätzlich darauf hin, dass die Prozessierung von CagA nicht von einem Cag-T4SS unabhängigen Mechanismus stammt, wie beispielsweise Phagozytose. Vielmehr scheint die Translokation und Phosphorylierung von CagA ein sehr spezifischer Vorgang zu sein, der von einem intakten Cag-T4SS und der Translokation abhängig ist.

3.4. Untersuchungen zur Beteiligung von HopQ an der CagA-Translokation

H. pylori produziert eine große Anzahl an äußeren Membranproteinen, darunter wichtige Virulenzfaktoren wie BabA und SabA, die die Bindung des Bakteriums an das Magenepithel ermöglichen. HopQ gehört ebenfalls zu den äußeren Membranproteinen von *H. pylori* und ist aufgrund seines Vorkommens in zwei verschiedenen Allelen von besonderem Interesse. Das Allel I von *hopQ* wird in den stark virulenten TypI-Stämmen von *H. pylori* exprimiert, wohingegen *hopQ* Allel II in den weniger virulenten TypII-Stämmen vorkommt. In einem gemeinsamen Projekt mit dem Labor von Prof. Thomas Meyer (MPI, Berlin) sollte die Rolle von HopQ während der *H. pylori*-Infektion untersucht werden.

Um die Frage zu klären, ob außerhalb der *cag*-PAI kodierte bakterielle Faktoren an einer Cag-T4SS-vermittelten Zellantwort beteiligt sind, wurde eine auf dem Transposon Tn7 basierte Bank von Mutanten des *H. pylori*-Stammes G27 (Salama et al., 2004) bezüglich ihrer Fähigkeit der NF- κ B-Aktivierung in der Wirtszelle getestet. Der Wildtyp von Stamm G27 führt während der Infektion der Magenepithelzelllinie AGS zur Translokation der NF- κ B Untereinheit p65 in den Zellkern und damit zur NF- κ B-Aktivierung. Eine Infektion mit der Cag-T4SS-defekten Mutante G27 Δ cagE dagegen, löst in der AGS Zelllinie keine Aktivierung von NF- κ B aus. Somit konnte gezeigt werden, dass diese Art der Zellantwort auf einem intakten Cag-TypIV-Sekretionssystem basiert. Eine Wildtyp-Infektion der rekombinanten Zelllinie AGS-SIB02, welche die p65 Untereinheit von NF- κ B als Fusionsprotein mit dem „*green fluorescent protein*“ (GFP) (p65-GFP) produziert führte ebenfalls zu einer Aktivierung von NF- κ B, wohingegen dies bei der Mutante G27 Δ cagE nicht der Fall war. Ausgehend von

dieser rekombinanten Zelllinie konnte die Aktivierung und Translokation von p65-GFP in den Nukleus für einen quantitativen „read out“ (Bartfeld et al., 2009) der Tn7 basierten Mutanten-Bank des *H. pylori* Stammes G27 genutzt werden.

Es konnten dabei 59 Mutanten mit einem Defekt zur Translokation von p65-GFP identifiziert werden, wovon 56 eine Mutation in einem Gen der *cag*-PAI enthielten. Die verbleibenden drei Mutanten hatten die Insertion entweder in einem hypothetischen Gen, der Lipopolysaccharid 1,2- Glykosyltransferase oder dem äußeren Membranprotein HopQ. Dies zeigte, dass HopQ eine Beteiligung an der Induktion einer Immunantwort eukaryotischer Zellen hat und somit wichtig für den Infektionsprozess ist.

3.4.1 Herstellung der *hopQ*-Deletionsmutanten im Stamm P12

In den folgenden Experimenten wurde die Bedeutung des äußeren Membranproteins HopQ für die Virulenz von *H. pylori* weiterhin in dem CagA-translokationsstabilen Stamm P12 untersucht.

Da die Translokation von CagA ein wichtiger Virulenzfaktor von *H. pylori* ist und zudem auch zur Aktivierung von NF- κ B führt, sollte eine direkte Beteiligung von HopQ an der CagA-Translokation durch Deletion des *hopQ*-Gens untersucht werden. Die Klonierung des Plasmids pGEMTeasy_{cat} (pCE41) zur Deletion des *hopQ*-Gens wurde von Elena Belogolova (Max Planck Institut, Berlin) durchgeführt. Dieses Plasmid wurde dann für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Es enthält die *cat*_{GC}-Kassette mit den flankierenden Genbereichen stromaufwärts und stromabwärts von *hopQ* (s. Abb. 3.23 (a)).

Die Deletion des *hopQ*-Gens im Stamm P12 wurde anschließend durch homologe Rekombination der flankierenden Bereiche erreicht und so das Gen durch die *cat*_{GC}-Kassette ersetzt (s. Abb. 3.23 (b)).

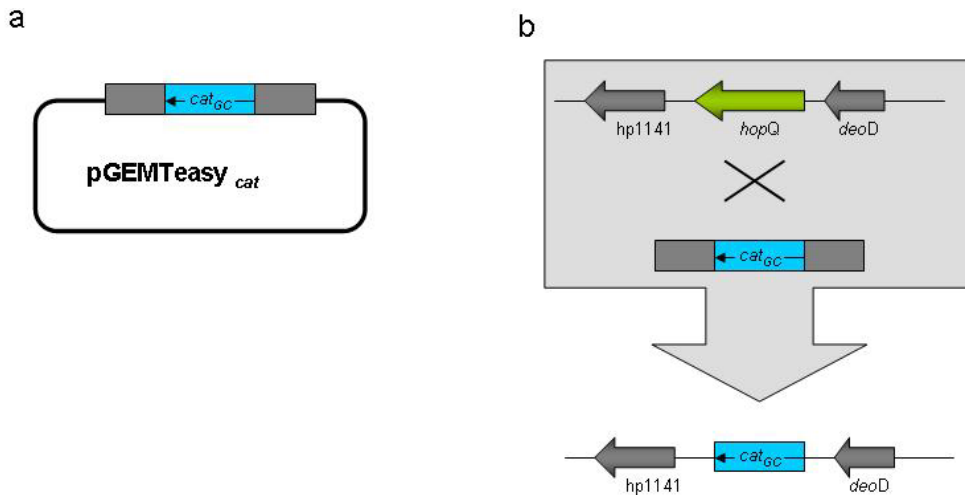


Abb. 3.23: Graphische Darstellung der Deletion des *hopQ*-Gens:

- (a) Für die Deletion von *hopQ* wurden die flankierenden Bereiche (grau dargestellt) mittels PCR amplifiziert und stromaufwärts bzw. –abwärts der *cat_{GC}*-Kassette kloniert, woraus das Deletionsplasmid pGEMTeasy_{cat} entstanden ist (Klonierung wurde von Elena Belogolova (MPI) durchgeführt).
- (b) Die Transformation von *H. pylori* P12 mit dem Plasmid pGEMTeasy_{cat}, welches in *H. pylori* nicht repliziert führt zur homologen Rekombination der flankierenden Bereiche, der damit verbundenen Deletion des Gens und der Einführung der *cat_{GC}*-Kassette in das Chromosom.

Die aus der Transformation entstandene Deletion von *hopQ* wurde einerseits durch die erworbene Resistenz der Mutanten gegenüber Chloramphenicol und andererseits durch eine PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotidpaaren und anschließender Restriktionsanalyse, sowie Sequenzierung (nicht dargestellt) überprüft und bestätigt. Abbildung 3.24 stellt die verwendeten Oligonukleotide CE82 und CE83 in ihrem genetischen Kontext dar und zeigt die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte (s. Abb. 3.24 (a)). Die PCR-Reaktion mit chromosomaler DNS der *H. pylori* Mutante P12Δ*hopQ* erzeugte für Klon 1 und 2 ein PCR-Fragment der Größe 2 kb und konnte somit die Deletion bestätigen (s. Abb. 3.24 (b) Spuren 3 und 4). Ist das *hopQ*-Gen noch im Chromosom enthalten entsteht ein PCR-Produkt der Größe 3 kb (s. Abb. 3.24 (b) Spur 2). Da die *cat_{GC}*-Kassette über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI in das Deletionsplasmid eingeführt wurde, konnte mit einer Restriktionsanalyse ein 1 kb Fragment nachgewiesen werden, welches die *cat_{GC}*-Kassette darstellt. Zusätzlich ist eine Doppelbande von ca. 600 bp sichtbar, die die flankierenden Enden darstellt (s. Abb. 3.24 (c) Spur 2). Die Deletion des *hopQ*-Gens aus dem Chromosom konnte somit für die Mutante P12Δ*hopQ* bestätigt werden.

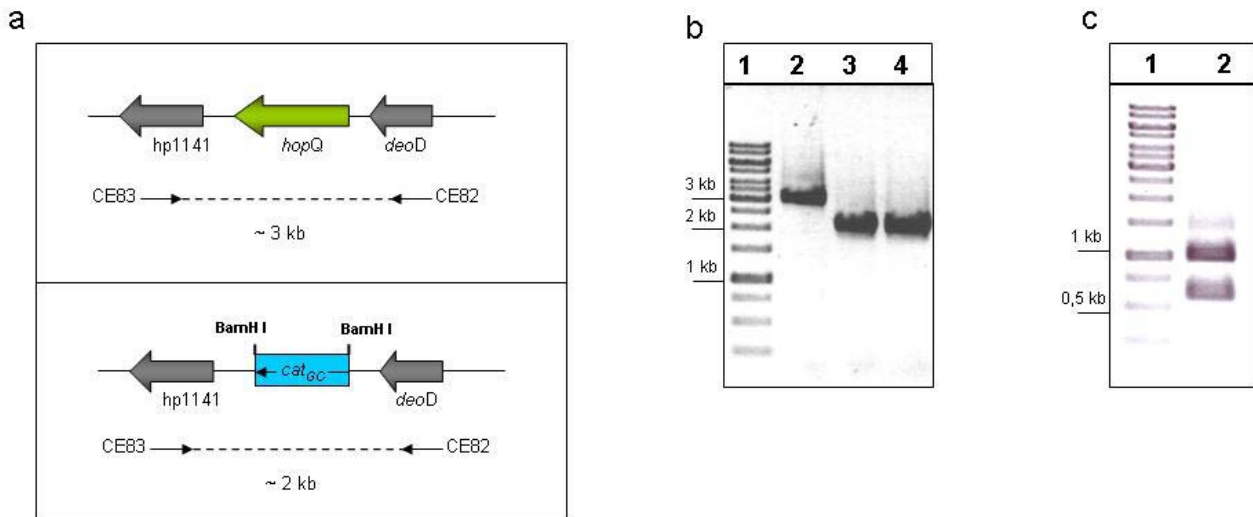


Abb. 3.24: Bestätigung der Deletion von *hopQ*:

Der Nachweis der genetischen Deletion von *hopQ* wurde mit dem spezifischen Oligonucleotidpaar CE82 und CE83, sowie einer analytischen Restriktionsreaktion mit *BamHI* durchgeführt.

(a) Für die PCR-Reaktion zur Erzeugung von DNS-Fragmenten, die Aufschluss über die Deletion des *hopQ*-Gens geben wurden die Oligonucleotide CE82 / CE83 eingesetzt. Für die Mutante P12Δ*hopQ* ist ein PCR-Fragment der Größe 2 kb, für den Stamm P12 mit intaktem *hopQ*-Gen dagegen ein Fragment der Größe 3 kb zu erwarten.

(b) Bestätigung der Deletion von *hopQ*. 1: 1 kb Leiter; 2: *H. pylori* P12; 3-4: *H. pylori* P12Δ*hopQ* Klone 1-2

(c) Restriktionsanalyse des PCR-Produkts von *H. pylori* P12Δ*hopQ* mit *BamHI*. 1: 1 kb Leiter; Fragmente aus der Restriktionsreaktion. Fragment bei 1 kb entspricht der *cat_{GC}*-Kassette, Fragment bei 600 bp entspricht den flankierenden Enden.

3.4.2 Untersuchung der CagA-Translokationseffizienz von *H. pylori* P12Δ*hopQ*

Bisher konnte noch kein, außerhalb der *cag*-PAI kodierter Faktor von *H. pylori* identifiziert werden, der essentiell für die Funktion des Cag-T4SS ist. Da in den Studien am Max Planck Institut in Berlin gezeigt werden konnte, dass die Transposon Tn7 generierte HopQ-Mutante des *H. pylori* Stammes G27 keine Cag-T4SS-abhängige NF-κB-Aktivierung hervorruft, könnte HopQ solch ein potenzielles Protein sein. Um die Frage zu klären, ob HopQ im Zusammenhang mit seiner Bedeutung für das Cag-T4SS auch eine Rolle bei der CagA-Translokation in eukaryotische Zellen spielt, wurden die *H. pylori* Stämme P12 und P12Δ*hopQ* für Infektionsexperimente mit der Magenepithelzelllinie AGS eingesetzt.

3.4.2.1 Die Effizienz der CagA Translokation ist abhängig von der Expression des *hopQ*-Gens

Nachdem die korrekte Deletion des *hopQ*-Gens im Stamm P12 nachgewiesen wurde, sollte die Translokation von CagA im Vergleich mit dem Wildtypstamm untersucht werden. Für die Deletion von *hopQ*, sowie die Translokationsexperimente wurden zwei Varianten des Stammes *H. pylori* P12 verwendet, die entweder aus dem Labor in Berlin (P12 Berlin) oder München (P12 München) stammen.

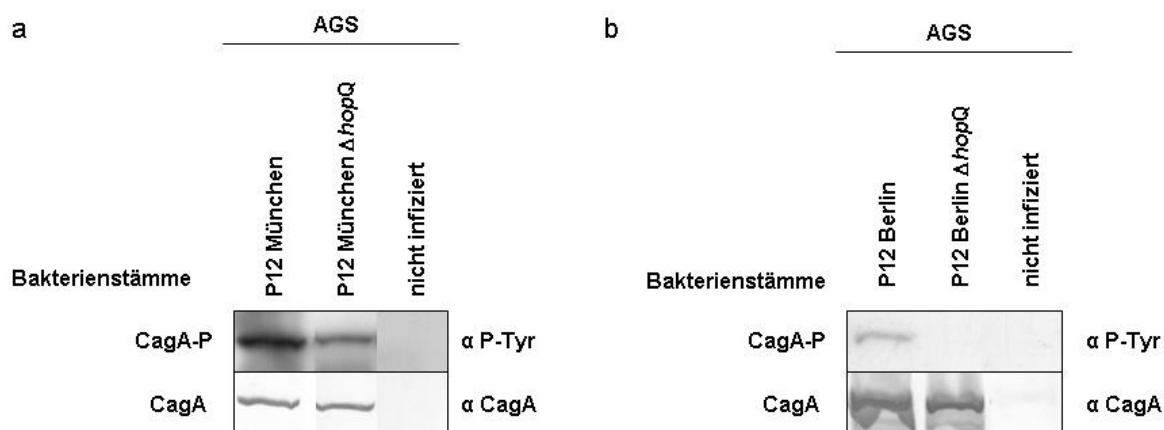


Abb. 3.25: Einfluss der *hopQ*-Genexpression auf die CagA-Translokation in AGS Zellen:

(a) *Phosphotyrosin Assay* mit *H. pylori* P12, sowie P12Δ*hopQ* aus dem Labor in München. Die Mageneepithelzelllinie AGS wurde für 3-4 h mit den entsprechenden Stämmen infiziert, anschließend lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion von CagA (CagA) und phosphoryliertem CagA (CagA-P) wurden die spezifischen Antikörper AK257 bzw. 4G10 verwendet. Die Translokationseffizienz von CagA ist für die Mutante P12Δ*hopQ* (Spur 2) im Vergleich zum Wildtyp Stamm P12 (Spur 1) deutlich herabgesetzt. Nicht infizierte Zellen (Spur 3) dienen als Kontrolle.

(b) *Phosphotyrosin Assay* mit *H. pylori* P12, sowie P12Δ*hopQ* aus dem Labor in Berlin. Die Mageneepithelzelllinie AGS wurde für 3-4 h mit den entsprechenden Stämmen infiziert, anschließend lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion von CagA (CagA) und phosphoryliertem CagA (CagA-P) wurden die spezifischen Antikörper AK257 bzw. 4G10 verwendet. Die Mutante P12Δ*hopQ* (Spur 2) zeigt im Vergleich zum Wildtyp Stamm P12 (Spur 1) keine Translokation und Phosphorylierung von CagA. Nicht infizierte Zellen (Spur 3) dienen als Kontrolle.

In Abbildung 3.25 ist zu erkennen, dass das äußere Membranprotein HopQ eine Rolle für die effiziente Translokation von CagA spielt. Die Deletion des *hopQ*-Gens in *H. pylori* P12 München führt zu einer deutlich reduzierten Translokation und Phosphorylierung von CagA in die AGS Zellen (s. Abb. 3.25 (a)). Im Stamm P12 aus Berlin führt die Deletion von *hopQ* sogar zum kompletten Verschwinden der CagA-Translokation und Phosphorylierung. Somit muss HopQ eine Beteiligung an der Infektion, mit CagA-Translokation als Folge, haben.

Die Signalstärke der Tyrosin-Phosphorylierung von CagA war in allen Experimenten, die mit dem Stamm *H. pylori* P12 München durchgeführt wurden deutlich stärker, als mit dem entsprechenden Stamm aus Berlin. Somit scheint der Stamm aus München generell ein effizienteres Infektionspotenzial zu haben, als *H. pylori* P12 Berlin. Dennoch wurde die starke Fähigkeit der CagA-Translokation durch den Verlust von HopQ in *H. pylori* P12 Δ hopQ München abgeschwächt. Ein wichtiger Schritt für die Virulenz und die Funktionalität des Cag-Apparats ist die Bindung des Bakteriums an die menschliche Magenepithelzelle. HopQ könnte, als äußeres Membranprotein eine Funktion als Adhäsion in *H. pylori* haben und so indirekt die Funktionalität des Cag-T4SS unterstützen.

3.4.2.1.1 Charakterisierung einer *hopQ*-vermittelten Adhärenz in Abhängigkeit von β 1-Integrin an der Zelloberfläche

HopQ ist ein Protein von *H. pylori*, das außerhalb der *cag*-PAI kodiert ist und eine Beteiligung bei der CagA-Translokation zeigt. Als potenzielles Adhäsion könnte HopQ durch Bindung an den für die CagA-Translokation notwendigen Rezeptor β 1-Integrin den Erstkontakt zur Zelle herstellen. Um zu überprüfen, ob HopQ eine β 1-Integrin-abhängige Adhärenz von *H. pylori* an die eukaryotische Zelle vermittelt, wurden Adhärenzversuche durchgeführt (s. 2.2.4.12). Hierfür wurden β 1-Integrin-positive (GE11 β) bzw. β 1-Integrin-negative (GE11) Zellen mit *H. pylori* P12 und P12 Δ hopQ infiziert und nach Zellyse die Bakterien auf Serumagarplatten ausplattiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl auf den Platten bestimmt.

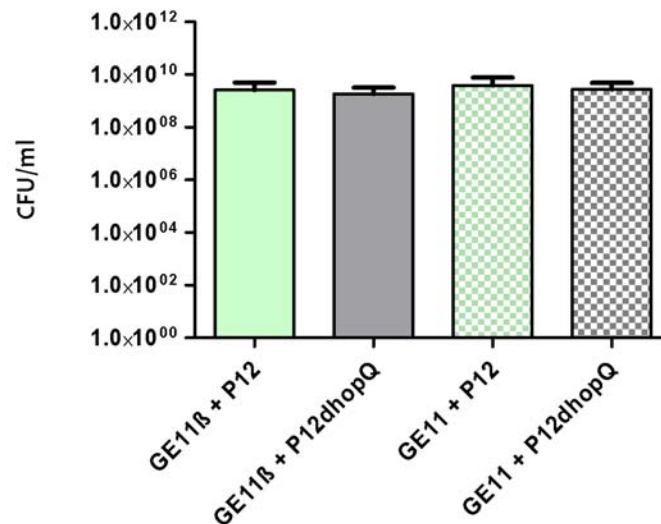


Abb 3.26: Adhärenzversuche mit den Stämmen *H. pylori* P12 München und *H. pylori* P12ΔhopQ München an GE11β und GE11 Zellen:

Um eine eventuelle Beteiligung von HopQ an der β1-Integrin-vermittelten Adhärenz von *H. pylori* an eukaryotische Zellen zu untersuchen wurden Adhärenzversuche mit GE11β und GE11 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zelllinien mit den Stämmen *H. pylori* P12 bzw. P12ΔhopQ für 4h infiziert. Die Zellen wurden anschließend dreimal gewaschen und lysiert. Im Überstand verbleibende Bakterien wurden in sechs Verdünnungsstufen auf Serumagarplatten ausplattiert. Nach einer 4-5 tägigen Kultivierung wurde die Lebendzellzahl von *H. pylori* nach der Infektion bestimmt und als CFU/ml logarithmisch dargestellt. Die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Aus den in Abbildung 3.26 dargestellten Adhärenzversuchen geht hervor, dass die Produktion von β1-Integrin an der Oberfläche der eukaryotischen Zellen die Adhäsion von *H. pylori* P12 nicht verstärkt. Der Rezeptor β1-Integrin scheint somit nicht am Prozess der Adhäsion beteiligt zu sein, da die ermittelte Lebendzellzahl von *H. pylori* keine Unterschiede zwischen den GE11β und GE11 Zellen hervorbringt. Zudem scheint die Adhärenz von *H. pylori* nicht durch eine Interaktion von HopQ und dem β1-Integrin vermittelt zu werden. Sowohl der Stamm *H. pylori* P12, als auch P12ΔhopQ adhären gleich stark an die infizierten Zelllinien, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit des β1-Integrin an der Zelloberfläche. Diese Experimente zeigen, dass das Oberflächenprotein HopQ von *H. pylori* die Adhäsion von *H. pylori* während einer Infektion nicht signifikant verstärkt und nicht in einem Adhäsions-vermittelten Zusammenhang mit dem β1-Integrin steht.

3.4.2.1.2 Untersuchungen zur Beteiligung weiterer Adhäsine von *H. pylori* P12 an der CagA-Translokation

Um den deutlichen Unterschied im CagA-Translokationspotenzial zwischen den Varianten *H. pylori* P12 München und Berlin zu klären, wurden die Bakterien auf die

Produktion anderer äußerer Membranproteine getestet. Hierfür wurden die *H. pylori* Varianten auf Agarplatten kultiviert und anschließend Lysate hergestellt (s. 2.2.3.1.). Die lysierten Bakterienzellen wurden daraufhin mit der SDS-PAGE auf die Produktion der Adhäsine BabA, BabB, BabC, AlpA, AlpB und SabB untersucht.

Wie Abbildung 3.27 zeigt ist das Produktionslevel von BabA, BabB, BabC, AlpA und AlpB in beiden Varianten des untersuchten Stammes *H. pylori* P12 identisch. Lediglich für das äußere Membranprotein SabB, ist ein eindeutiger Unterschied in der Proteinmenge zwischen P12 München und P12 Berlin zu erkennen (s. Abb. 3.27 (*)). Für die Detektion von SabB wurde der Antikörper, der gegen das Protein SabA gerichtet ist verwendet. *H. pylori* P12 produziert kein SabA. Aufgrund der Homologie von 81% zwischen den Proteinen SabA und SabB konnte daher im *H. pylori* P12-Lysat SabB durch den Antikörper gegen SabA detektiert werden. Die Differenz in der SabB-Proteinmenge zwischen *H. pylori* P12 München und Berlin deutet auf eine zusätzliche Beteiligung von SabB am Infektionsprozess in *H. pylori* P12 hin und könnte das unterschiedliche CagA-Translokationspotenzial der Varianten *H. pylori* P12 München und Berlin erklären.

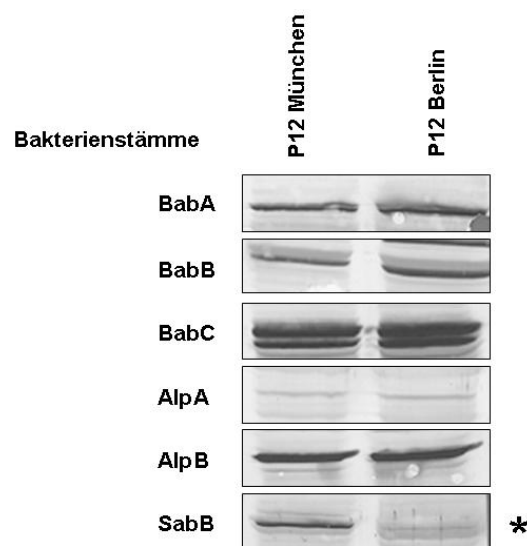


Abb. 3.27: Vergleich der produzierten Menge an Adhäsinen in *H. pylori* P12 München und Berlin:

Die Proteinmenge der Adhäsine BabA, BabB, BabC, AlpA, AlpB und SabB wurde in den Stämmen *H. pylori* P12 München bzw. Berlin untersucht. Die Bakterien wurden auf eine optische Dichte OD₅₅₀ von 10 in PBS resuspendiert und lysiert. Die Lysate der ganzen Bakterien wurden mittels SDS-PAGE auf einem 12% Gel aufgetrennt und mit den jeweiligen Antisera die Adhäsine detektiert. Das Adhäsins SabB wird in *H. pylori* P12 von dem Antiserum gegen SabA erkannt, welches in P12 nicht produziert wird.

Für die Adhäsine BabA, BabB, BabC, AlpA, AlpB konnten identische Proteinmengen detektiert werden. SabB wird dagegen im Stamm P12 München deutlich stärker exprimiert, als in P12 Berlin (markiert mit *).

H. pylori P12 besitzt zwei chromosomal kodierte Kopien des *sabB*-Gens, *sabB1* und *sabB2*. Um sicherzustellen, dass der Stamm P12 Berlin nicht aufgrund der genetischen

Variation eines oder beide dieser Gene verloren hat, wurde eine PCR mit chromosomaler DNS von P12 München und Berlin durchgeführt. Hierzu wurden die Oligonukleotidpaare VK9/VK12 (*sabB1*) bzw. VK13/VK16 (*sabB2*), die jeweils stromaufwärts und stromabwärts der beiden Kopien von *sabB* binden, verwendet. Die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte betragen in beiden Fällen 4,2 kb (s. Abb. 3.28 (a)).

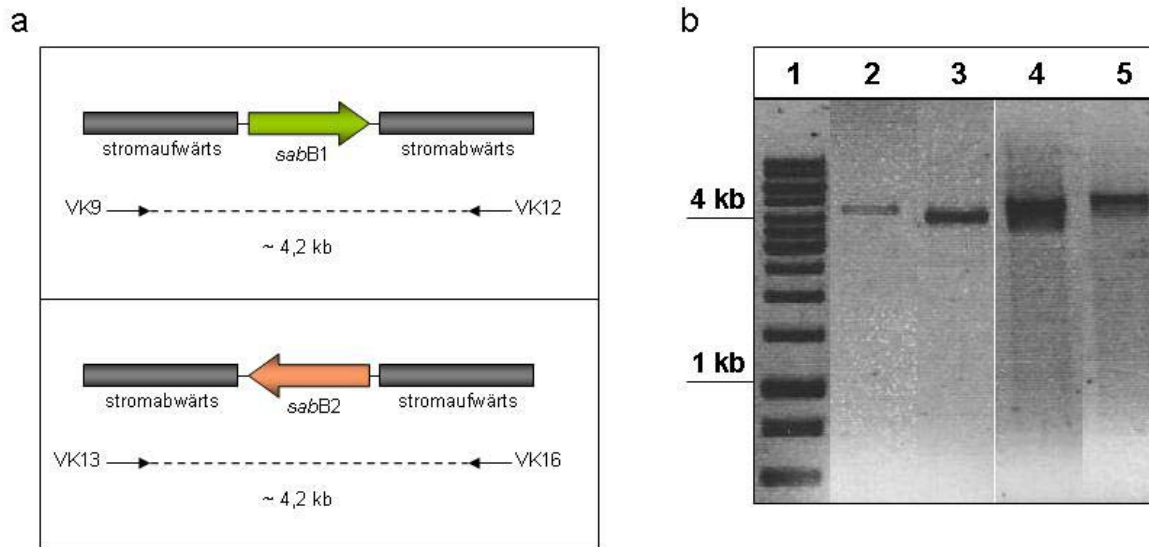


Abb. 3.28: Bestätigung der *sabB1*- und *sabB2*-Loci im Chromosom von *H. pylori* P12 München und Berlin:

Der Nachweis der Gene *sabB1* und *sabB2* in den Stämmen *H. pylori* P12 München und Berlin wurde anhand einer PCR mit den Oligonukleotidpaaren VK9/VK12 und VK13/VK16 durchgeführt.

(a) Die Oligonukleotidpaare binden jeweils an den stromaufwärts- und stromabwärts-Regionen von *sabB*. Für die PCR-Fragmente beider Loci ist ein Fragment der Größe 4,2 kb zu erwarten.

(b) Bestätigung der Gene *sabB1* (Spur 2: *H. pylori* P12 München; Spur 3: *H. pylori* P12 Berlin) und *sabB2* (Spur 4: *H. pylori* P12 München; Spur 5: *H. pylori* P12 Berlin). Zur Abschätzung der DNS-Fragmentgrößen wurde ein DNS-Marker mitgeführt (Spur1: 1 kb Leiter).

Abbildung 3.28 zeigt, dass die Amplifikation über die Gene *sabB1* und *sabB2* in beiden Stämmen zu einem PCR-Produkt der erwarteten Größe von 4,2 kb führt. Dies bestätigt, dass die Stämme *H. pylori* P12 München und Berlin die *sabB*-Gene enthalten. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es zwischen den beiden Varianten zu Unterschieden in der Regulation der Genexpression kommt. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Gene *sabB1* und *sabB2* am N-terminalen Ende eine CT-reiche Dinukleotidsequenz in der Signalsequenz aufweisen. Durch Phasenvariabilität kommt es daher in verschiedenen *H. pylori*-Stämmen zu Expressionsunterschieden für die nachfolgenden Gene (de Jonge et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die Stammvarianten von *H. pylori* P12 München und Berlin Differenzen in den CT-reichen Dinukleotidsequenzen aufweisen, die folglich zu einem veränderten Expressionslevel von *sabB* führen würden, wurden die erhaltenen PCR-Produkte durch Sequenzierung untersucht.

a

Signalsequenz von <i>H. pylori</i> P12 <i>sabB1</i>		Anzahl der Dinukleotide
München	<pre> ATGAAAAAACAATTTTTCTCTCTCTCTCTCGCTTCATCGCTCTTGCACGCTGAAGAC M K K Q F F L S L S L A S S L L H A E D AACGGCTTTTTGTGAGCGTGGGCTATCAAATCGGCGAAGCGGTGCAAATGGTC N G F F V S V G Y Q I G E A V Q M V </pre>	7 → Gen „an“
Berlin	<pre> ATGAAAAAACAATTTTTACTCTCTCTCTCTCTCGCTTCATCGCTCTTGCACGCTGA M K K Q F L L S L S L S R F I A L A R * </pre>	9 → Gen „aus“

b

Signalsequenz von <i>H. pylori</i> P12 <i>sabB2</i>		Anzahl der Dinukleotide
München	<pre> ATGAAAAAACAATTTTTCTCTCTCTCTCTCGCTTCATCGCTCTTGCACGCTGAAGAC M K K Q F F L S L S L A S S L L H A E D AACGGCTTTTTGTGAGCGTGGGCTATCAAATCGGCGAAGCGGTGCAAATGGTC N G F F V S V G Y Q I G E A V Q M V </pre>	7 → Gen „an“
Berlin	<pre> ATGAAAAAACAATTTTTACTCTCTCTCTCTCTCGCTTCATCGCTCTTGCACGCTGAAG M K K Q F L L S L S L S L H R S C T L K ACAACGGCTTTTTGTGA T T A F L * </pre>	8 → Gen „aus“

Abb. 3.29: Sequenzvergleich der Signalsequenzen von *sabB1* und *sabB2* in den Varianten *H. pylori* P12 München und Berlin:

Die Sequenzen der *sabB*-Signalsequenz der Loci 1 und 2 in den Bakterienvarianten P12 München und Berlin wurden mit dem Oligonukleotid CE98 ermittelt und miteinander verglichen.

(a) Die CT-Dinukleotidwiederholungen (dargestellt in blau) im *sabB1*-Locus variieren zwischen den *H. pylori* P12 Varianten aus München bzw. Berlin. In der Variante P12 München führt die Anzahl der sieben CT-Dinukleotide zu einem aktiven Leserahmen des Genlocus *sabB1*, wohingegen die Anzahl von neun CT-Dinukleotiden bei P12 Berlin den Leserahmen inaktiviert und zu einem Stoppcodon (dargestellt in rot) führt.

(b) Die CT-Dinukleotidwiederholungen (dargestellt in blau) im *sabB2*-Locus variieren zwischen den *H. pylori* P12 Varianten aus München bzw. Berlin. In der Variante P12 München führt die Anzahl der sieben CT-Dinukleotide zu einem aktiven Leserahmen des Genlocus *sabB2*, wohingegen die Anzahl von acht CT-Dinukleotiden bei P12 Berlin den Leserahmen inaktiviert und zu einem Stoppcodon (dargestellt in rot) führt.

Die Sequenzvergleiche der *sabB*-Signalsequenzen zeigten Unterschiede in der Anzahl der CT-Dinukleotide, was im Fall der Variante *H. pylori* P12 München den Leserahmen für beide *sabB*-Gene in einem aktiven Status hält. Für die Variante *H. pylori* P12 Berlin konnten im *sabB* Locus 1 neun und im Locus 2 acht Wiederholungen des CT-Dinukleotids in der jeweiligen Signalsequenz gefunden werden. In beiden Fällen führt dies zu einer Leserahmenverschiebung der DNS, durch die ein frühzeitiges Stoppcodon entsteht und die Produktion des Proteins SabB verhindert wird. Somit fehlt der Variante P12 Δ *hopQ* Berlin nicht nur das Oberflächenprotein HopQ, sondern zusätzlich auch SabB. Dies deutet daraufhin, dass diese beiden Proteine gemeinsam am Infektionsprozess und der CagA-Translokation beteiligt sind. Es konnte zwar bereits eine deutliche Reduktion der CagA-Translokation im Stamm P12 Δ *hopQ* München festgestellt werden, aber die komplette Inhibition der CagA-Translokation ist nur bei P12 Δ *hopQ* Berlin zu sehen, dem zusätzlich das SabB Protein fehlt.

Da SabB ebenfalls in die Adhäsion-Familie von *H. pylori* gruppiert wird, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob das zusätzliche Fehlen von SabB im Stamm *H. pylori* P12 Δ *hopQ* Berlin eine Auswirkung auf die Adhäsion an eukaryotische Zellen hat. Für diese Tests wurden Adhärenzversuche von *H. pylori* P12 München und Berlin, sowie den entsprechenden *hopQ*-Deletionsmutanten an AGS Zellen durchgeführt (s. 2.2.4.12.).

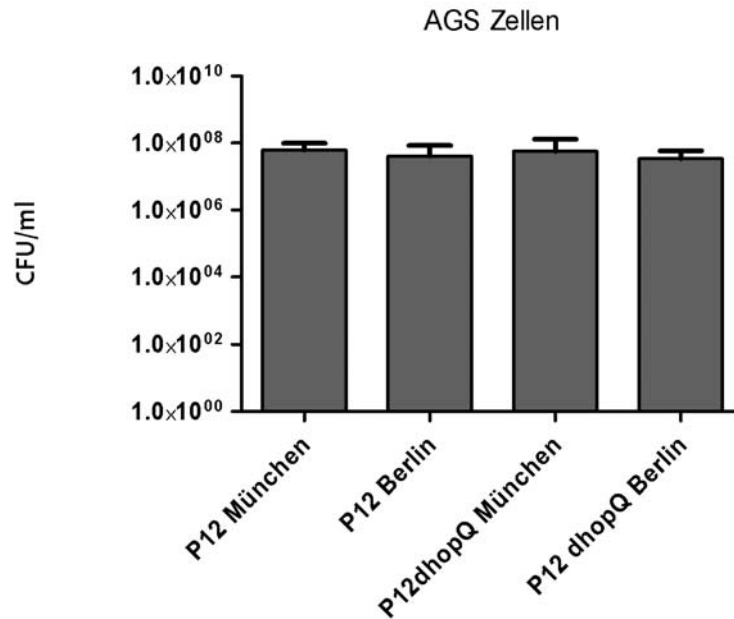


Abb. 3.30: Adhärenzversuche mit den Stämmen *H. pylori* P12 Berlin und München, sowie den entsprechenden *hopQ*-Deletionsmutanten:

Um eine eventuelle Beteiligung von SabB an der Adhärenz von *H. pylori* an eukaryotische Zellen zu untersuchen wurden Adhärenzversuche mit AGS Zellen durchgeführt. Hierfür wurden AGS Zellen mit den Stämmen *H. pylori* P12 in den Varianten München und Berlin bzw. P12Δ*hopQ* in den Varianten München und Berlin für 4h infiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und im Überstand verbleibende Bakterien in sechs Verdünnungsstufen auf Serumagarplatten ausplattiert. Nach einer 4-5-tägigen Kultivierung wurde die Lebendzellzahl von *H. pylori* nach der Infektion bestimmt und als CFU/ml logarithmisch dargestellt. Die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Die Vermutung, dass die Kombination der Oberflächenproteine HopQ und SabB von *H. pylori* Adhärenz-vermittelnd sind, konnte nicht bestätigt werden. Die *hopQ*-Deletionsmutanten beider Stammesvarianten zeigen das gleiche Bindungspotenzial an AGS Zellen (s. Abb. 3.30). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die rein mechanische Bindung von *H. pylori* hauptsächlich über das Oberflächenprotein BabA vermittelt wird. Die offensichtliche Beteiligung von HopQ und SabB an der CagA-Translokation könnte in diesem Fall die Erkennung der Zelle und eine anschließende Signalweiterleitung für den CagA-Translokationsmechanismus nach Anheften an die eukaryotische Zelle betreffen.

3.4.2.2 Die Komplementation des *hopQ*-Gens rekonstituiert die Effizienz der CagA-Translokation in P12Δ*hopQ*

Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit, CagA in die eukaryotische Zelle zu translozieren, mit der Expression von *hopQ* korreliert. Die Effizienz der CagA-Translokation ist nach der Deletion des Gens in P12 München deutlich abgeschwächt und in P12 Berlin

konnte dadurch der Translokationsprozess sogar ganz unterbunden werden. Durch eine Re-Insertion des *hopQ* Gens in *trans* sollte bestätigt werden, dass der beobachtete Effekt allein auf die eingeführte Deletion von *hopQ* zurückzuführen ist und sich durch die Komplementation des Gens die Effizienz der CagA-Translokation wieder steigern lässt.

3.4.2.2.1 Klonierung von *hopQ* in den *E. coli* / *H. pylori* Shuttle-Vektor pIB6

Die genetische Arbeit mit äußeren Membranproteinen von *H. pylori* gestaltet sich sehr schwierig, da die Genexpression dieser Proteine einen stark toxischen Effekt in *E. coli* hervorruft. Deshalb wurde bei der Klonierungsarbeit zur Komplementation des *hopQ*-Gens auf den Shuttle-Vektor pIB6 zurückgegriffen (Iris Barwig, unveröffentlicht). Basierend auf dem kryptischen *H. pylori*-Plasmid pHel3, enthält der Shuttle-Vektor pIB6 einen Promotor stromaufwärts der „multiple cloning site“, der die Expression des klonierten Gens in *E. coli* unterdrückt, jedoch in *H. pylori* unterstützt. Zunächst wurde das Gen *hopQ* mit den Oligonukleotiden CE68/69 amplifiziert. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Oligonukleotide CE70/69 ein Konstrukt von *hopQ* produziert, das am N-terminalen Ende ein HA-Epitop fusioniert hat. Dies sollte zur Kontrolle der Genexpression der in *trans* eingeführten Gene in *H. pylori* dienen. Die DNS-Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *Sall* / *BglII* in den Shuttle-Vektor pIB6 inseriert und die daraus resultierenden Plasmide pCE39 und pCE40 durch Konjugation von *E. coli* β 2150 mit *H. pylori* P76 in *H. pylori* eingeführt (s. 2.2.1.1.9.). Die aus dem *H. pylori* Stamm P76 reisolierten und DNS-modifizierten Plasmide konnten anschließend für die erfolgreiche Transformation von *H. pylori* P12 Δ *hopQ* München und Berlin eingesetzt werden. Die Transformanten wurden auf die im Plasmid enthaltene Kanamycin-Resistenz selektioniert und der eingeführte Shuttle-Vektor aus diesen Klonen reisoliert. Zur Kontrolle des Shuttle-Vektors auf das Gen *hopQ* wurde eine spezifische PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidpaaren CE68/69 (*hopQ*) bzw. CE70/69 (HA-*hopQ*) durchgeführt (s. Abb. 3.31).

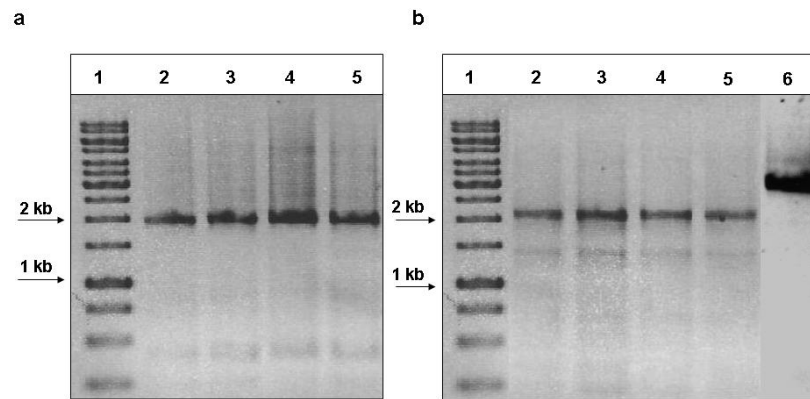


Abb. 3.31: Kontrolle der Komplementation des Gens *hopQ* der *H. pylori* Stämme P12 Δ *hopQ* München und Berlin:

(a) Aus den Transformanten wurde das eingeführte Plasmid pCE39 bzw. pCE40 reisoliert und zur Kontrolle auf Vorhandensein des *hopQ*- bzw. HA-*hopQ*-Gens eine PCR-Reaktion mit dem Oligonukleotidpaar CE68/CE69 bzw. CE70/CE69 durchgeführt, die ein DNS Fragment der Größe 2 kb hervorbringt. Spur 1: 1 kb Leiter; Spur 2: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] München; Spur 3: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] Berlin; Spur 4: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] München; Spur 5: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] Berlin.

(b) Aus den Transformanten wurde chromosomale DNS isoliert und die Deletion des *hopQ*-Gens im Chromosom der komplementierten Deletionsmutanten nochmals bestätigt. Dafür wurde eine PCR mit dem Oligonukleotidpaar CE82/83 durchgeführt. Die Deletion von *hopQ* führt in dieser PCR zu einem DNS-Fragment der Größe 2,2 kb. Das intakte *hopQ*-Gen bringt dagegen ein Fragment der Größe 3 kb hervor. Spur 1: 1 kb Leiter; Spur 2: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] München; Spur 3: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] Berlin; Spur 4: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] München; Spur 5: *H. pylori* P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] Berlin; Spur 6: *H. pylori* P12.

Die PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidpaaren CE68/69, sowie CE70/69 führte jeweils zu einem ein DNS-Fragment der Größe 2 kb, wodurch bestätigt wurde, dass die reisolierten Plasmide, pCE39 und pCE40, die Gene *hopQ* bzw. HA-*hopQ* enthalten. Um sicherzustellen, dass bei der Einführung des Shuttle-Vektors in die Deletionsmutanten keine unspezifische Rückrekombination des *hopQ*-Gens ins Chromosom aufgetreten ist, wurde zusätzlich chromosomale DNS, der mit den Plasmiden pCE39 und pCE40 komplementierten Deletionsmutanten isoliert und diese mit Hilfe einer PCR-Reaktion untersucht. Das Oligonukleotidpaar CE82/83 brachte für alle komplementierten Stämme ein PCR-Fragment der Größe 2,2 kb hervor, welches der Größe der flankierenden Enden für *hopQ* und der darin enthaltenen *cat*_{GC}-Kassette entspricht. Die erfolgreiche Deletion von *hopQ*, auch nach der Reinsertion des Gens in *trans* konnte somit bestätigt werden.

3.4.2.2 Expression des Gens HA-*hopQ* in den *H. pylori* Stämmen P76 und P12 Δ *hopQ*

Da ein spezifischer Antikörper gegen das Protein HopQ nicht zur Verfügung stand, sollte die Expression des HA-*hopQ*-Gens in den Stämmen *H. pylori* P76, sowie P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] München und Berlin mit Hilfe des Antikörpers gegen das HA-Epitop bestätigt werden.

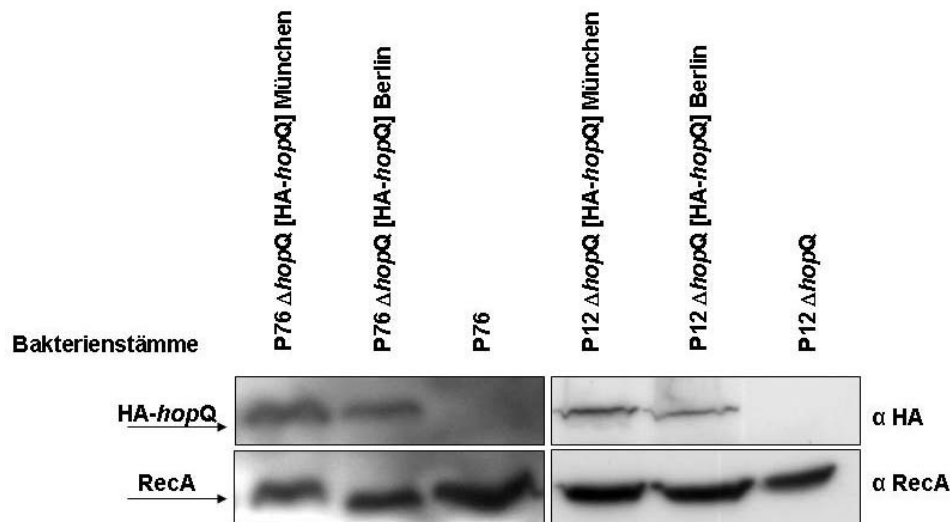


Abb. 3.32: Kontrolle der Genexpression von HA-*hopQ* vom Plasmid pCE40:

Die Bakterienstämme *H. pylori* P76 bzw. P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] (Berlin und München) wurden zu einer optischen Dichte OD₅₅₀ von 10 verdünnt und lysiert. Die Proteine der Bakterienlysate wurden mittels der SDS-PAGE auf einem 10% Gel aufgetrennt. Eine erfolgreiche Produktion des Proteins HA-HopQ in den Stämmen *H. pylori* P76 bzw. P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] (Berlin und München) wurde mit Hilfe des Antikörpers gegen das HA-Epitop nachgewiesen. Die Lysate der Stämme *H. pylori* P76 und P12 Δ *hopQ* dienen als Negativkontrolle und zeigen die Spezifität des Antikörpers gegen das HA-Epitop. Als Ladungskontrolle wurde das Protein RecA nachgewiesen.

Neben der erfolgreichen Einführung der Plasmide, pCE39 und pCE40, konnte weiterhin die Expression des in *trans* eingebrachten Gens HA-*hopQ* in den Stämmen *H. pylori* P76 bzw. P12 Δ *hopQ*[HA-*hopQ*] (Berlin und München) gezeigt werden (s. Abb. 3.32). Das Signal für das HA-Epitop ist in beiden Stämmen deutlich auf der Höhe des HopQ Proteins (70 kDa) zu erkennen. Die Expression des HA-*hopQ*-Gens zeigt weiterhin die Stabilität und Funktionalität des Shuttle-Vektors in verschiedenen Stämmen von *H. pylori*. Da das Gen *hopQ* in gleicher Weise im Shuttle-Vektor inseriert ist, wie das Gen HA-*hopQ*, wird für die fortführenden Experimente eine erfolgreiche Expression des *hopQ*-Gens über den Shuttle-Vektor vorausgesetzt.

3.4.2.2.3 CagA Translokationsverhalten der komplementierten *H. pylori*-Stämme P12 Δ *hopQ*[*hopQ*]

Nachdem die erfolgreiche Komplementation des *hopQ*-Gens für die Mutanten aus München und Berlin bestätigt wurde, sollte weiterhin ihr Verhalten bezüglich der CagA-Translokation untersucht werden. Hierfür wurden *Phosphotyrosin Assays* der Zelllinie AGS mit den unter Kapitel 3.4.2.2.1. beschriebenen komplementierten Stämmen durchgeführt.

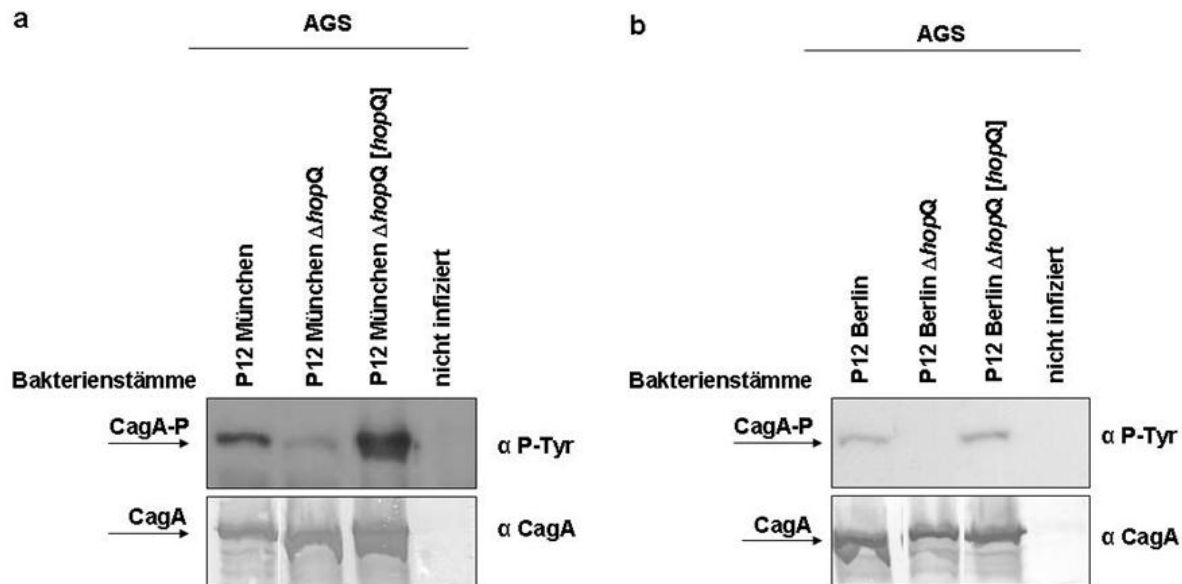


Abb. 3.33: Phosphotyrosin Assays von AGS Zellen zur Kontrolle der Komplementation der CagA-Translokation der *hopQ*-Deletionsmutanten:

(a) *Phosphotyrosin Assay* mit *H. pylori* P12, P12 Δ *hopQ* sowie P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] aus dem Labor in München. Es wurde eine Infektion der Mageneithelzelllinie AGS für 3-4 h mit den entsprechenden Stämmen durchgeführt und die Zellen anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE auf einem 6% Gel aufgetrennt. Zur Detektion von CagA (CagA) und phosphoryliertem CagA (CagA-P) wurden die spezifischen Antikörper AK257 bzw. 4G10 verwendet. Die Deletionsmutante (Spur 2) zeigt im Vergleich zum Wildtyp (Spur 1) eine deutlich herabgesetzte Translokation von CagA. Die Einführung des *hopQ*-Gens in *trans* führt im Stamm P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] München zur Wiederherstellung der Effizienz der CagA-Translokation, vergleichbar mit der des Stammes P12 München.

(b) *Phosphotyrosin Assay* mit *H. pylori* P12, P12 Δ *hopQ* sowie P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] aus dem Labor in Berlin. Es wurde eine Infektion der Mageneithelzelllinie AGS für 3-4 h mit den entsprechenden Stämmen durchgeführt und die Zellen anschließend lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE auf einem 6% Gel aufgetrennt. Zur Detektion von CagA (CagA) und phosphoryliertem CagA (CagA-P) wurden die spezifischen Antikörper AK257 bzw. 4G10 verwendet. Die Deletionsmutante (Spur 2) hat die Fähigkeit zur Cag-Translokation verloren. Die Einführung des *hopQ*-Gens in *trans* führt im Stamm P12 Δ *hopQ*[*hopQ*] Berlin zur Wiederherstellung des Potenzials zur CagA-Translokation, vergleichbar mit dem des P12 Berlin.

Die in Abbildung 3.33 dargestellten *Phosphotyrosin Assays* zeigen, dass die Fähigkeit der CagA-Translokation in die menschliche Magenepithelzelllinie AGS eindeutig von der Expression des Gens *hopQ* abhängt. Eine starke Minderung von phosphoryliertem CagA in den AGS Zellen konnte für die Deletionsmutante im Stamm P12 München gezeigt werden, wohingegen die Deletionsmutante im Stamm P12 Berlin die Fähigkeit der CagA-Translokation verloren hat. Diese Effekte können in beiden *H. pylori*-Stämmen durch die Reinsertion des *hopQ*-Gens mit Hilfe des Shuttle-Vektors pCE39 aufgehoben werden. Durch die erfolgreiche Wiederherstellung des Phänotyps der jeweiligen Stämme P12 München und Berlin, konnte gezeigt werden, dass das äußere Membranprotein HopQ an der Translokation von CagA in die eukaryotische Zelle beteiligt ist. Somit stellt dieses Oberflächenprotein einen, außerhalb der *cag*-PAI kodierten, neuen Virulenzfaktor von *H. pylori* P12 dar.

4 DISKUSSION

H. pylori kolonisiert den Magen von ca. 50% der Weltbevölkerung und führt zu einer chronischen Entzündung der Magenmukosa, sowie zu Magengeschwüren bis hin zum Adenokarzinom (Dunn et al., 1997). Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori* ist die *cag*-Pathogenitätsinsel, die für das Cag-T4SS, sowie das translozierte Cytotoxin CagA kodiert (Odenbreit, 2000). Nach Translokation des Cytotoxins interagiert CagA in der Eukaryotenzelle mit verschiedenen Signalmolekülen in Tyrosin-phosphorylierter aber auch unphosphorylierter Form (Backert et al., 2010). Ob und welche Interaktionen von CagA mit den eukaryotischen Signalwegen zur Tumorgenese führen können ist noch unklar. Die Translokation von CagA wird über das Cag-T4SS vermittelt und bedarf verschiedener Faktoren, die nach heutigen Annahmen alle auf der *cag*-PAI kodiert sind. Einige der *cag*-PAI kodierten Proteine zeigen starke Homologien zu Proteinen anderer T4SS, wodurch sich ihre wahrscheinliche Funktion für das Cag-T4SS voraussagen lässt. Dennoch enthält die *cag*-PAI zusätzlich Gene für Proteine, die in keinem anderen bakteriellen T4SS gefunden werden und so eine Funktionszuordnung erschweren. Nicht zuletzt deshalb ist der genaue Mechanismus der CagA-Translokation in die eukaryotische Zelle noch weitestgehend unklar. Daher ist das Verständnis der Interaktion des Cag-T4SS und CagA mit der Wirtszelle von zentraler Bedeutung.

4.1. Integrine als Rezeptoren für pathogene Mikroorganismen

Die Adhäsion von Mikroorganismen an die Oberfläche der Wirtszelle ist meist der erste Schritt bei einer Infektion. Für intrazelluläre Mikroorganismen stellt die Adhärenz die Grundlage für die Aufnahme in die Wirtszelle dar, wohingegen sich extrazelluläre Mikroorganismen durch Adhäsion an die Wirtszelle vor der mechanischen Eliminierung aus dem Wirt schützen, sowie Adhäsions-vermittelt den Zell-Zell Kontakt zur Übertragung von bakteriellen Effektorproteinen herstellen. Viele mikrobielle Pathogene nutzen hierfür die Bindung an zelluläre Adhäsionsmoleküle, darunter Integrine, Immunglobulinrezeptoren oder Selektine (Kerr, 1999). Integrine werden von einer Vielzahl von Bakterien und Viren, wie z.B. *Yersinia ssp.* und dem humanen Cytomegalievirus als Rezeptoren genutzt (Scibelli et al., 2007; Feire, 2004).

Während der Pathogenese von *H. pylori*-Infektionen spielt die CagA-Translokation eine zentrale Rolle. Der direkte Zell-Zell Kontakt ist dabei eine wichtige Grundlage zur Übertragung von T4SS-Substraten. Somit war die Erkenntnis, dass das Effektorprotein CagA nicht an wahllosen Stellen über das Cag-T4SS in die eukaryotische Zelle transloziert wird

sondern, dass zelluläre β 1-Integrine als Rezeptoren dienen von großer Bedeutung. Bei der Identifizierung des β 1-Integrins als Rezeptor für das Cag-T4SS wurden vier *cag*-PAI kodierte Proteine bestimmt, die den Kontakt mit der Zelle über die Rezeptorbindung vermitteln. Das Pilus-assoziierte CagL-Protein von *H. pylori* soll den Kontakt mit dem β 1-Integrin über ein Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) -Motiv vermitteln und könnte somit als potenzielles Adhäsin fungieren (Kwok et al., 2007). Neben CagL wurden in einer unabhängigen Arbeit der N-terminale Teil von CagA (CagAn), der C-terminale Teil von CagY (CagYc) und das vollständige CagI als Interaktionspartner mit der β 1-Untereinheit des Integrins identifiziert. Im Gegensatz zu CagL enthalten diese Proteine keine RGD-Aminosäuresequenz, weshalb diese Daten auf einen zusätzlichen RGD-unabhängigen CagA-Translokationsmechanismus hinweisen (Jimenez-Soto et al., 2009). Die Bindung der meisten Integrinliganden, darunter Vitronectin, Fibrinogen oder Fibronectin wird zwar über das RGD-Motiv vermittelt (Ruoslahti, 1996), dennoch sind auch andere RGD-unabhängige Integrinbindungsmotive bekannt, wie sie beispielsweise in verschiedenen Extrazellulären Matrix (ECM)-Proteinen und der ADAM-Proteinfamilie (a disintegrin and a metalloprotease) vorkommen (Feire, 2004). Die Spezifität für die Ligandenbindung wird durch die beiden Untereinheiten der heterodimeren Integrine gewährleistet, wovon jede Untereinheit mehrere potenzielle Ligandenbindungsstellen aufweisen kann (Ruoslahti, 1996). Die Hälfte der 18 bekannten α -Untereinheiten enthält eine 200 Aminosäuren-umfassende Proteindomäne, die als α I-Domäne bezeichnet wird. Für Integrinmoleküle, die diese Proteindomäne in ihrer α -Untereinheit enthalten stellt sie meist die alleinige Ligandenbindungsstelle dar (Luo et al., 2007). Integrine ohne die α I-Domäne vermitteln die Ligandenbindung üblicherweise über den β -Propeller der α -Untereinheit zusammen mit der *I-like*-Domäne der β -Untereinheit (Luo et al., 2007). In verschiedenen Arbeiten konnte mit Hilfe von RGD-Peptiden eine Ligandenbindungsstelle in den ersten 200 Aminosäuren der β -Untereinheit lokalisiert werden (Bajt et al., 1992; Bajt and Loftus, 1994; Smith and Cheresch, 1988). Charo und Kollegen konnten zusätzlich zeigen, dass die β -Untereinheit von Integrinen weitere mögliche Ligandenbindungsstellen aufzeigt (Charo et al., 1991). Diese Daten deuten darauf hin, dass es innerhalb der Integrinmoleküle mehrere potenzielle Bindungsbereiche für verschiedene Liganden gibt.

4.1.1 CagAn, CagYc und CagI nutzen unterschiedliche Domänen des β 1-Integrins zur Bindung

Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen zwischen Integrinen und ihren Liganden hinsichtlich ihrer Bindungsregionen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die bereits bestätigten Interaktionen von CagAn, CagYc und CagI mit dem extrazellulären Teil der β 1-Untereinheit genauer untersucht. Dies sollte helfen ein besseres Verständnis für die Interaktion des Cag-

T4SS mit seinem Rezeptor zu erlangen. Es konnte gezeigt werden, dass CagYc eine andere Domäne als CagAn und Cagl für die Interaktion mit dem β 1-Integrin nutzt. Die *Yeast Two Hybrid* Daten zeigten eine Interaktion von CagAn und Cagl mit dem Bereich des Integrins, welcher die β -tail-Domäne sowie die EGF *repeats* beinhaltet. Bisher wurde noch kein Protein beschrieben, das diese Domänen des Integrins zur Bindung nutzt. Ein biochemischer *Pulldown Assay* mit der rekombinant hergestellten β -tail-Domäne führte zur Präzipitation von CagA und Cagl aus *H. pylori*-Lysaten und bestätigt somit unabhängig die, im *Yeast Two Hybrid* gefundene Interaktion (s. 3.1.5). In einem weiteren Experiment konnte durch Messung der *Renilla*-Luciferase Aktivität eine Interaktion zwischen CagAn bzw. Cagl mit dem Bereich der β 1-Untereinheit, der die β -tail-Domäne gemeinsam mit den EGF *repeats* 3 und 4 beinhaltet, gefunden werden (s. 3.1.4.). Die EGF *repeats* stellen wie die β -tail-Domäne einen Cystein-reichen Proteinbereich dar, der an der Signalweiterleitung für die Auslösung von Konformationsänderungen beteiligt ist (Takagi and Springer, 2002).

Integrine kommen auf der Zelloberfläche in drei Aktivierungszuständen vor, die wahrscheinlich durch solche Konformationsänderungen ausgelöst werden. Es werden die Zustände „inaktiv“, „intermediär“ und „aktiv“ unterschieden (s. Abb. 4.1.). Studien mit Kristallstrukturen von Integrinen, die eine β 3-Untereinheit enthalten deuten auf einen Aktivierungsmechanismus der Integrine hin, der dem Öffnen eines Klappmessers ähnelt („*switchblade*“-Modell) (Takagi und Springer, 2002). In diesem Modell entspricht der aktive Zustand der gestreckten Konformation, der inaktive Zustand dagegen der eingeklappten Konformation des Integrins (s. Abb. 4.1). Im inaktiven Zustand sind die N-terminalen Bereiche der α - und der β -Untereinheiten jeweils an deren membrannahen Domänen geklappt, wodurch der Rezeptor in den Zustand der geringsten Bindeaffinität für Liganden kommt. Integrine in der inaktiven Form weisen einen Knick zwischen den EGF *repeats* 1 und 2 auf (Takagi and Springer, 2002). Die N-terminale PSI-Domäne bildet dabei mit den EGF *repeats* und der β -tail-Domäne die Kontaktfläche, die die β -Untereinheit in der eingeklappten Konformation hält. Andere Studien konnten zeigen, dass es in inaktiven, eingeklappten Integrinen zu Interaktionen zwischen den EGF *repeats* sowie der β -tail-Domäne in der β -Untereinheit mit den *Calf*-1 und *Calf*-2-Domänen der α -Untereinheit kommt (Xiong et al., 2001). Dadurch werden die Transmembranregionen der Integrine zusammengeführt, was ein entscheidendes Merkmal für inaktive Integrine ist (s. Abb. 4.1). Eine Aktivierung der Integrine kann durch intra- und extrazelluläre Signale induziert werden, wobei die Konformation der Integrine über den intermediären Zustand, in dem die Domänen der α - und β -Untereinheit leicht aufklappen, in den aktivierten Zustand übergeht. In der aktivierten Konformation sind die extrazellulären Bereiche der Integrine vollständig gestreckt und besitzen die höchste Ligandenbindeaffinität (s. Abb. 4.1) (Askari et al., 2008). Die Öffnung des intramolekularen Kontakts zwischen der PSI-Domäne und den EGF *repeats* sowie der β -tail-Domäne scheint

ein wichtiger Schritt für den Übergang in die gestreckte Konformation, und somit für die Aktivierung der Integrine zur Ligandenbindung zu sein. Konstrukte der $\beta 1$ -Untereinheit bestehend aus der PSI und *I-like*-Domäne, sowie den EGF *repeats* 1 und 2 führten nach Kristallisierung zu Proteinen, die der inaktiven Integrinform entsprachen. Konstrukte die zusätzlich das EGF *repeat* 3 enthielten führten zur aktiven Konformation des Integrins (Askari et al., 2009). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen zeigen eine Bindung von CagAn und CagI an den Bereich der β -tail-Domäne und den EGF *repeats* 3 und 4, und könnten gemeinsam mit den oben beschriebenen Beobachtungen auf eine Beteiligung von CagAn und CagI an der Konformationsänderung des Integrins hinweisen.

CagYc zeigte im *Yeast Two Hybrid Assay* ausschließlich eine Interaktion mit der N-terminalen PSI-Domäne der $\beta 1$ -Untereinheit (s. 3.1.5). In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Hantavirus in einem RGD-unabhängigen Mechanismus an die PSI-Domäne des Integrin $\alpha\beta 3$ bindet. Mit Hilfe von chimären human/maus- $\beta 3$ -Untereinheiten konnte dabei die PSI-Domäne als Bindungsdomäne für das Hantavirus, welches ausschließlich an humanes $\beta 3$ -Integrin bindet, identifiziert werden (Raymond et al., 2005). Auch für viele Integrin-aktivierende Antikörper ist eine Bindung an die PSI-Domäne beschrieben worden (Lu et al., 2001; Mould, 2004; Peterson et al., 2003). Die Interaktion von CagYc mit der PSI-Domäne könnte in diesem Zusammenhang zur Integrinaktivierung beitragen. Eine endgültige, biochemische Bestätigung der Interaktion zwischen CagYc und der PSI-Domäne konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Die rekombinante Expression dieser Domäne zeigte sowohl in prokaryotischen, als auch in eukaryotischen Expressionsmodellen eine hohe Toxizität für die entsprechenden Zellen, deren Grundlage nicht verstanden ist. Dies konnte auch durch das Einsetzen verschiedener Expressionssysteme oder Expressionsbedingungen nicht verhindert werden (Daten nicht gezeigt). Die *Pulldown Assays* in Abbildung 3.9 zeigen aber, dass CagY weder mit der rekombinanten *I-like*-Domäne noch der rekombinanten β -tail-Domäne präzipitiert werden kann, was im Ausschlussverfahren und den *Yeast Two Hybrid* Daten stark auf eine Interaktion zwischen CagYc und dem N-terminalen Teil der $\beta 1$ -Untereinheit, und somit der PSI Domäne, schließen lässt. Eine weitere Möglichkeit die Interaktion zwischen CagYc und der PSI-Domäne zu untersuchen, könnte die Expression von hybriden $\beta 1$ -Integrinen in eukaryotischen Zellen darstellen. Hierbei wird die humane Sequenz für die PSI-Domäne durch die Sequenz der PSI-Domäne von anderen Organismen, wie beispielsweise Hühnern ersetzt. Wegen der humanspezifischen Kolonisierung von *H. pylori* geht man davon aus, dass die Bindung von CagYc anschließend nur an das $\beta 1$ -Integrin mit der humanen Sequenz für die PSI-Domäne möglich ist. Diese Untersuchungen sollen in fortführenden Arbeiten durchgeführt werden.

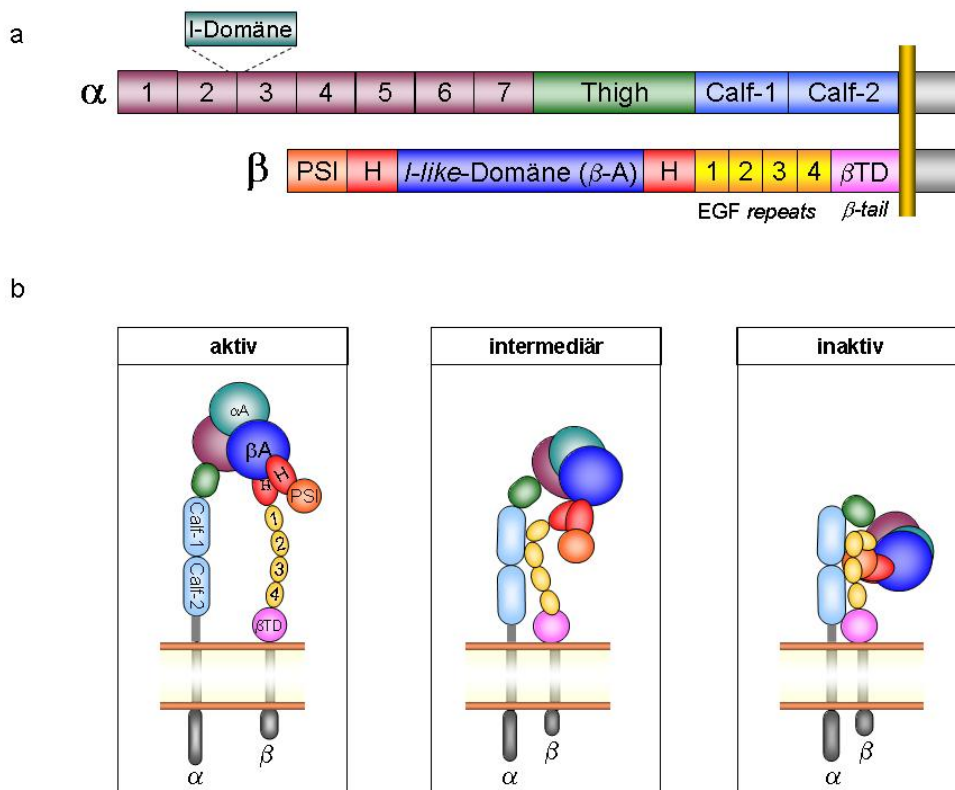


Abb. 4.1: Domänen des Integrins und die möglichen Aktivierungszustände:

(a) Die α -Untereinheit des Integrins besteht aus einem β -Propeller (dargestellt in lila), der eine I-Domäne (oder αA Domäne) enthalten kann. Darauf folgen die Thigh-Domäne und die Calf-1, sowie Calf-2 Domänen. Die β -Untereinheit besteht aus der PSI-Domäne, der I-like-Domäne (oder βA Domäne), welche zwischen zwei Hybrid-Domänen (dargestellt in rot) liegt. Darauf folgen Cystein-reiche Domänen, die in die vier EGF repeats, sowie die β -tail-Domäne unterschieden werden können. Beide Untereinheiten besitzen eine Transmembrandomäne, die den extrazellulären Teil der Integrin-Untereinheiten mit dem zytoplasmatischen Teil (dargestellt in grau) verbindet.

(b) Mögliche Konformationszustände des Integrins sind der aktivierte Zustand (gestreckt), welche die höchste Bindungsaffinität für Liganden aufweist, der intermediäre Zustand und der inaktive Zustand (eingeklappt), welcher die geringste Bindungsaffinität aufweist.

4.1.1.1 CagA-Translokation durch molekulare Konformationsänderung des $\beta 1$ -Integrins?

Die Identifizierung der Bindungsdomänen für die Cag-Proteine in der $\beta 1$ -Untereinheit führte gemeinsam mit Daten aus Vorarbeiten, die eine Inhibition der CagA-Translokation durch den Antikörper 9EG7 zeigen, zu einem ersten Modell für den Translokationsmechanismus von CagA (s. Abb. 4.2). Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper 9EG7 eine Hemmung der CagA-Translokation hervorruft, ohne dabei die Bindung von CagAn, CagYc und CagI an das Integrin zu inhibieren (Jimenez-Soto et al., 2009). Die Bindungsstelle des Antikörpers 9EG7 in der $\beta 1$ -Untereinheit umfasst die EGF repeats 1-4

und überschneidet sich somit mit der Region, die im Rahmen dieser Arbeit als Bindungsstelle für CagAn und CagI identifiziert wurde. Dennoch wird die Bindung von CagA und CagI an das β 1-Integrin durch eine 9EG7-Bindung nicht verhindert. Die Bindung des 9EG7 Antikörpers wird durch die Zugabe von Mn^{2+} deutlich erhöht, wodurch gezeigt wurde, dass der Antikörper an die aktive Form des β 1-Integrins bindet (Mould et al., 1995; Bazzoni et al., 1995). Durch die Bindung des 9EG7 Antikörpers im Bereich der EGF *repeats* 1-4 wird vermutlich die Interaktion der EGF *repeats* und β -tail-Domäne mit der PSI-Domäne, die wie oben beschrieben die β 1-Untereinheit in den eingeklappten Zustand bringt, verhindert. Der Antikörper 9EG7 hält dadurch das β 1-Integrin in aktiviertem, gestrecktem Zustand. Diese Daten stützen die Hypothese, dass die Inhibition der CagA-Translokation weniger auf einen kompetitiven Mechanismus zwischen dem 9EG7 Antikörper und den Cag-Proteinen, sondern auf eine Blockade der Integrin-Konformationsänderung durch den Antikörper 9EG7 zurückzuführen ist. Somit könnte die molekulare Bewegung des Integrins in den inaktiven, eingeklappten Zustand einen entscheidenden Schritt während der CagA-Translokation darstellen (s. Abb. 4.2).

Eine Funktion dieser Konformationsänderung könnte sein, dass das Cag-T4SS, welches über CagA, CagY und CagI bereits an das Integrin gebunden ist näher an die Zytoplasmamembran bewegt wird. In diesem Modell ist die Bindung der Cag-Proteine an das aktive β 1-Integrin eine Voraussetzung, um durch die Konformationsänderung in den inaktiven Zustand eine CagA-Translokation herbeizuführen. Es gibt viele Hinweise darauf, dass Integrine auf ruhenden Zellen hauptsächlich in der eingeklappten, inaktiven Form vorkommen. Es bleibt zu klären, ob die Bindung von CagAn und CagI an die EGF *repeats* 3-4 und die β -tail-Domäne in einem ersten Schritt gemeinsam mit der Bindung von CagYc an die PSI-Domäne die Kontaktfläche dieser Integrindomänen öffnet und somit zur Konformationsänderung des Integrins in den aktiven Zustand führt. In diesem Fall wäre der Effekt im Gegensatz zu dem des 9EG7 Antikörpers reversibel, wodurch eine erneute Konformationsänderung des Integrins zurück in den inaktiven Zustand weiterhin möglich bleibt und die CagA-Translokation herbeiführt.

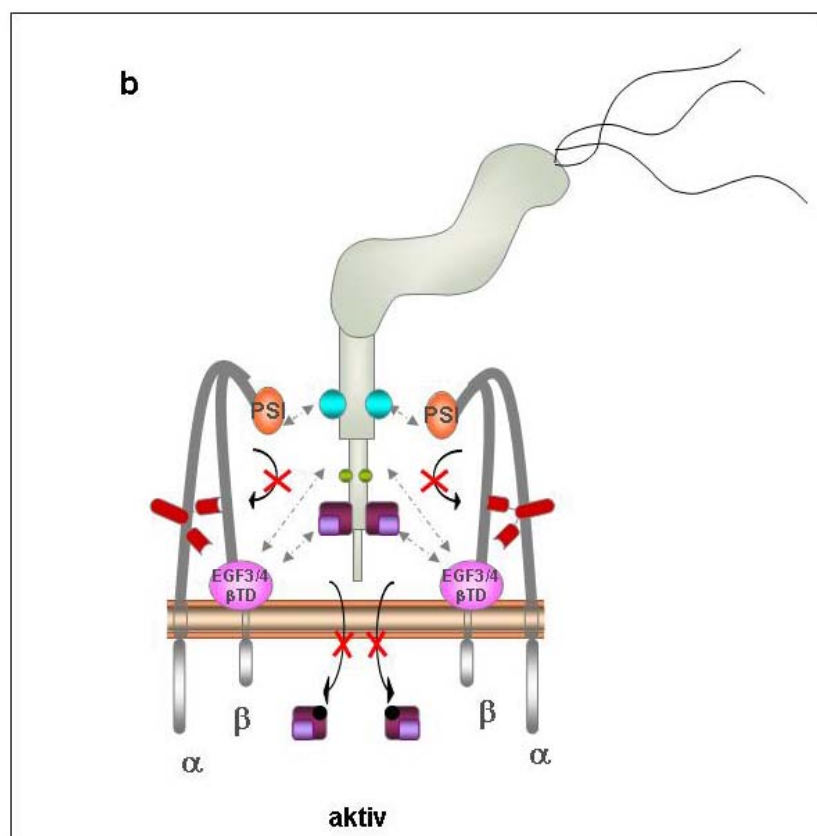
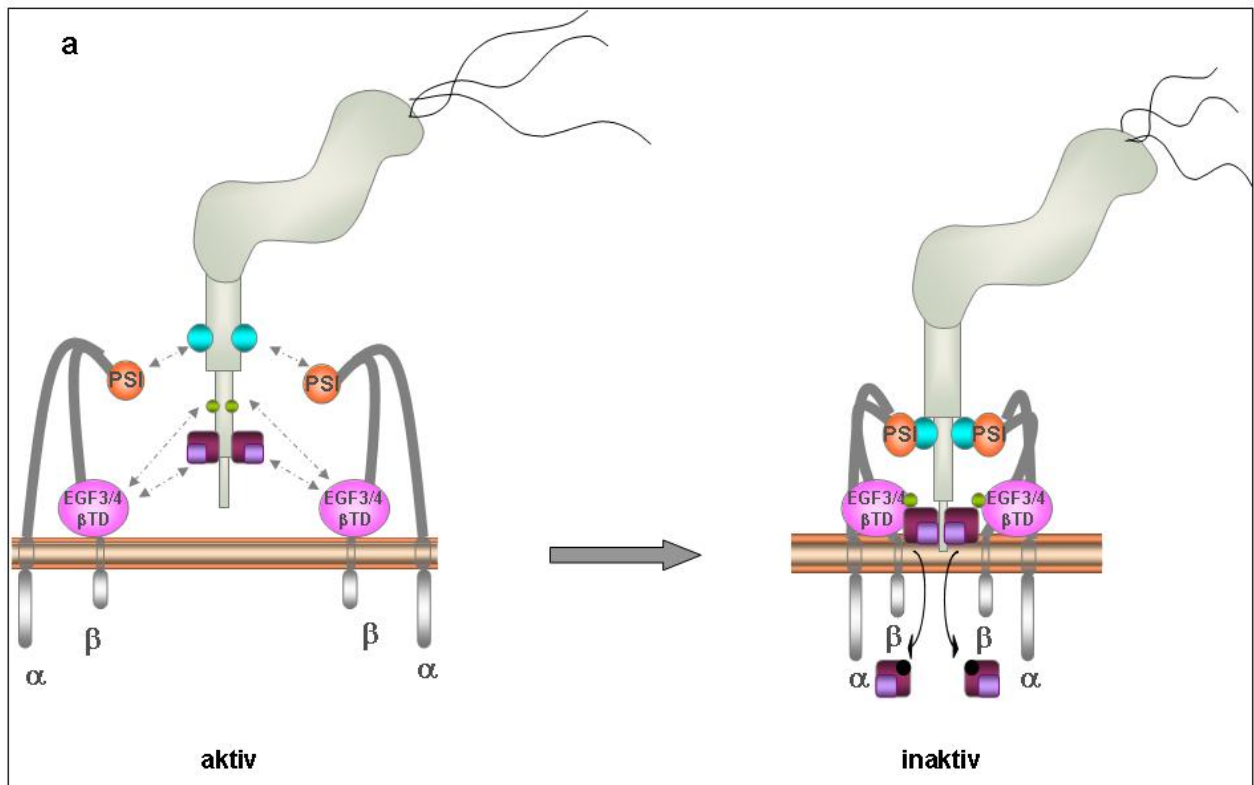


Abb. 4.2: Modell der CagA-Translokation aufgrund einer Konformationsänderung des Integrins:

(a) Die Pilus-assoziierten Cag-Proteine CagA, CagY und CagI interagieren mit den Domänen der aktivierten β 1-Untereinheit des Integrins oder führen zur Aktivierung des β 1-Integrins, wodurch es zu einer direkten Bindung von CagA, CagY und CagI mit den jeweiligen Domänen der β -Untereinheit kommt. Dieses Intermediat von Protein-Protein-Interaktionen könnte eine weitere Konformationsänderung des β 1-Integrins in den inaktiven Zustand hervorrufen, die für die Translokation von CagA notwendig ist.

(b) Die Bindung des Antikörpers 9EG7 verhindert die Interaktion von CagA, CagY und CagI mit den Domänen der aktivierten β 1-Untereinheit des Integrins nicht. Ein möglicher Mechanismus, wie der Antikörper 9EG7 die CagA-Translokation inhibiert, könnte daher die Blockade der Konformationsänderung des β 1-Integrin in den inaktiven Zustand sein.

4.1.1.1.1 Weitere mögliche Modelle zum CagA-Translokationsmechanismus

Die Bindungsaffinität für Liganden und damit die Konformation der Integrine wird zusätzlich über bivalente Kationen reguliert, die an bestimmte Proteinmotive in der I-Domäne der α -Untereinheit bzw. der *I-like*-Domäne der β -Untereinheit binden (Lu et al., 1998; Oxvig and Springer, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Ligandenbindung in Anwesenheit von Mn^{2+} und Mg^{2+} stimuliert wird, wohingegen die Zugabe von Ca^{2+} zu einer teilweisen Inhibition führt (Gailit and Ruoslahti, 1988). Die *I-like*-Domäne der β -Untereinheit bildet gemeinsam mit der I-Domäne der α -Untereinheit die typische Ligandenbindungsstelle, die aber erst in der aktiven Form der Integrine die höchste Ligandenbindeaffinität aufweist, welche unter anderem von der Bindung bivalenter Kationen an die *I-like*-Domäne der β -Untereinheit beeinflusst zu sein scheint. Die zusätzliche Interaktion von CagA und CagI mit der *I-like*-Domäne, die in den *Pulldown Assays* gefunden wurde (s. 3.1.5.), könnte auf eine zusätzliche Ligandenbindungsstelle im β 1-Integrin hindeuten. In diesem Modell würde die Bindung von CagA und CagI an die *I-like*-Domäne eine sekundäre Ligandenbindung darstellen, die erst nach erfolgter Aktivierung des Integrins stattfinden kann (s. Abb. 4.3). Die Kristallstrukturen aktivierter Integrine zeigen, dass die „stalk“-Regionen voneinander getrennt sind (Takagi und Springer, 2002). Somit könnte eine erste Bindung von CagA und CagI an die EGF *repeats* und die *β -tail*-Domäne zur Aktivierung der Integrine durch sterische Trennung der „stalk“-Regionen führen. Dies würde die Ligandenbindeaffinität der *I-like*-Domäne unabhängig von der Präsenz bivalenter Kationen erhöhen. Die Bindung von weiteren CagA und CagI-Molekülen an die *I-like*-Domäne, könnte die anschließende Translokation von CagA durch die Bewegung des Integrins in den inaktiven Zustand induzieren (s. Abb. 4.3). Bisher konnte dies noch nicht experimentell gezeigt werden, weshalb der so beschriebene Mechanismus der CagA-Translokation als hypothetisches Modell zu verstehen ist.

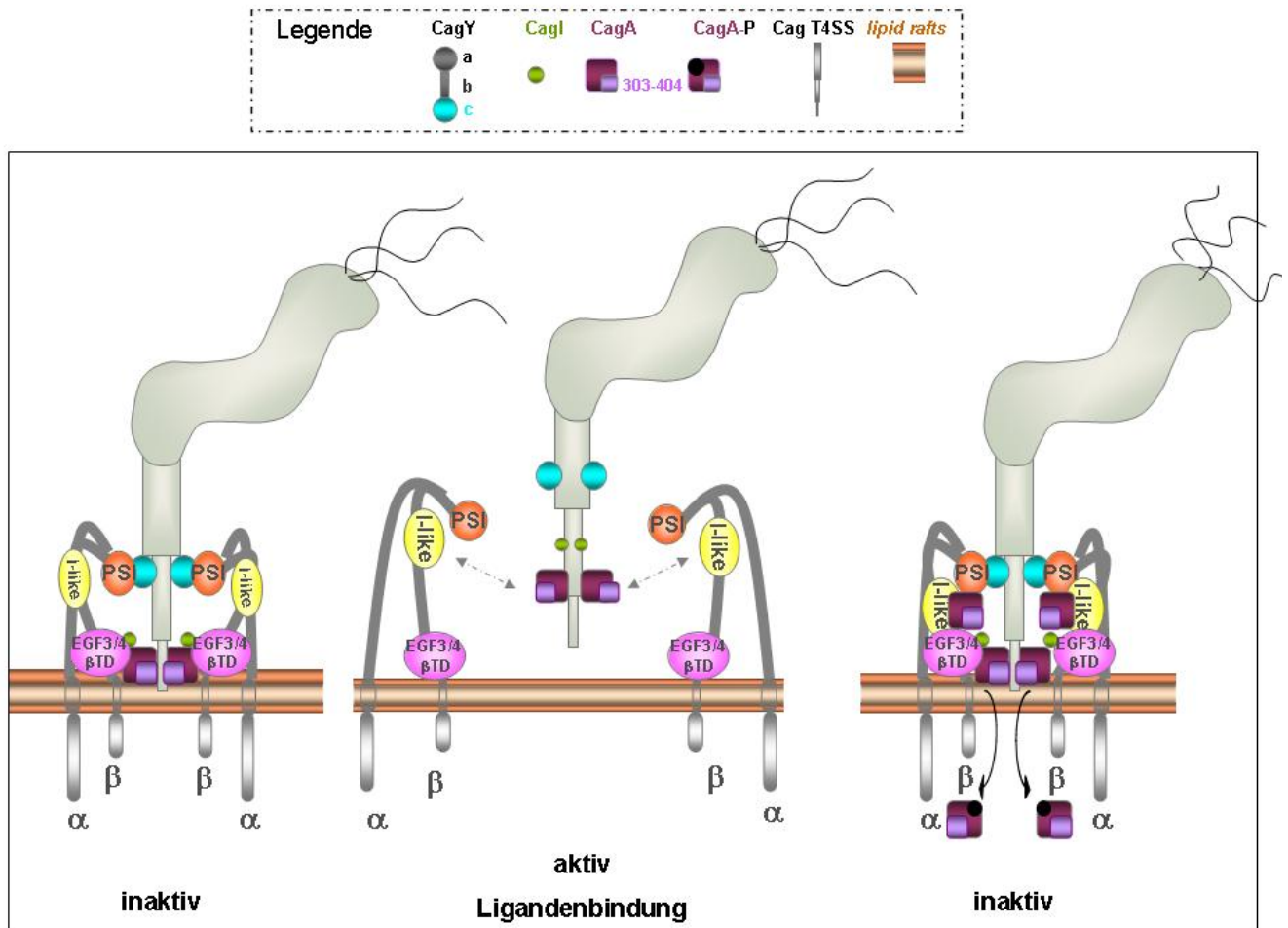


Abb. 4.3: Hypothetisches Modell der CagA-Translokation unter Einbeziehung der *I-like* Ligandenbindungsdomäne des β 1-Integrins:

Die Interaktion von CagAn, CagYc und CagI mit der PSI und β -tail-Domäne, sowie den EGF repeats des β 1-Integrins führt in einem ersten Schritt zur Aktivierung des Rezeptors, wodurch eine verzögerte Ligandenbindung des Effektorproteins CagA an die *I-like*-Domäne ermöglicht wird. In einem weiteren Schritt kommt es zur erneuten Konformationsänderung des β 1-Integrins in den inaktiven Zustand, was zur Translokation von CagA in die eukaryotische Zelle führt.

4.1.2 His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ hemmt die CagA-Translokation in einem kompetitiven Mechanismus

In dieser Arbeit konnte eine direkte Interaktion der Cag-T4SS Proteine CagAn, CagYc und CagI mit den verschiedenen extrazellulären Domänen der β 1-Untereinheit des Integrins gezeigt werden (s. 3.1.3; 3.1.4; 3.1.5). Für diese Bindung an das Integrin sollten die Cag-Proteine auf der Oberfläche des T4SS lokalisiert sein. Mit Hilfe von Feldemissionsrastermikroskopie (FSEM) konnte gezeigt werden, dass es sich bei CagY um ein Protein handelt, welches auch auf der Pilusoberfläche des Cag-T4SS zu finden

ist (Rohde et al., 2003; Tanaka et al., 2003). Auch für das Effektorprotein CagA führten FSEM-Versuche zur Lokalisierung des Proteins an der Pilusoberfläche (Jimenez-Soto et al., 2009). Des Weiteren konnte eine Kolokalisierung von *H. pylori* P12 mit β 1-Integrinen während einer Infektion von AGS Zellen beobachtet werden. Da auch die Deletionsmutante *H. pylori* P12 Δ cagA während dieser Versuche mit den β 1-Integrinen kolokalisiert, reichen CagY und Cagl auf der Pilusoberfläche vermutlich für die Bindung mit dem Rezeptor aus (Jimenez-Soto et al., 2009). Obwohl CagA für die Kontaktherstellung zum β 1-Integrin nicht notwendig ist, wird in dieser Arbeit gezeigt, dass CagA eine direkte Proteinbindung mit dem Rezeptor eingeht. Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, dass die direkte Bindung von CagA an die β 1-Untereinheit des Integrins eine essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche CagA-Translokation während der *H. pylori*-Infektion ist. In dieser Arbeit wurde zunächst mit einem *Yeast Two Hybrid* Experiment die Bindungsdomäne von CagA an das β 1-Integrin auf die Aminosäuresequenz 303–404 eingegrenzt (s. 3.2.1.). Es konnte dann gezeigt werden, dass ein rekombinantes Proteinfragment aus diesem Aminosäurebereich (His-CagA₃₀₃₋₄₀₄) an AGS Zellen bindet (s. 3.2.2). Die Bindung an β 1-Integrin-positive GE11 β Zellen ist im Vergleich zur Bindung an β 1-Integrin-negative GE11 Zellen erhöht, weshalb, neben anderen Integrinen, eine β 1-Integrin-vermittelte Bindung an die GE11 β Zellen vermutet wird (s. 3.2.2). Die Behandlung von AGS Zellen mit dem aufgereinigten Proteinfragment dieser Aminosäuresequenz führte zur konzentrationsabhängigen Inhibition der CagA-Translokation (s. 3.2.2.). Die Bindung des CagA-Proteinfragments an das β 1-Integrin interferiert somit mit dem CagA-Translokationsmechanismus. Eine Bindung von *H. pylori* an die behandelten AGS Zellen, vermittelt über CagY und Cagl ist aufgrund der Kolokalisierungsdaten mit dem Stamm P12 Δ cagA aus Vorarbeiten sehr wahrscheinlich. Auch die Inkubation von AGS Zellen mit dem rekombinanten *Yersinia*-Invasin führte nicht zu verminderter CagA-Translokation (s. 3.2.2.). Dies macht eine Hemmung der CagA-Translokation aufgrund einer sterischen Zugangshinderung an den Rezeptor, ausgelöst von gebundenen Proteinfragmenten unwahrscheinlich. Weitere Experimente ergaben, dass die Bindung des Antikörpers 9EG7 an AGS Zellen durch eine Vorbehandlung mit dem CagA-Proteinfragment nicht inhibiert wird (s. 3.2.3). Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die Bindung des CagA-Proteinfragments an die AGS Zellen zu einer dauerhaften Inaktivierung der β 1-Integrine führt, da der 9EG7 Antikörper nicht an inaktivierte Integrine binden würde. Dies lässt einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus vermuten bei dem das CagA-Proteinfragment wahrscheinlich die Bindung des nativen CagA auf dem Cag-T4SS Pilus von *H. pylori* hemmt, indem es die Bindungsregion in der β -tail-Domäne besetzt. Da dies zur Inhibition der CagA-Translokation führt, ist eine Bindung von nativem CagA an den Rezeptor als Voraussetzung für die weitere Translokation des Effektorproteins sehr wahrscheinlich (s. Abb. 4.4).

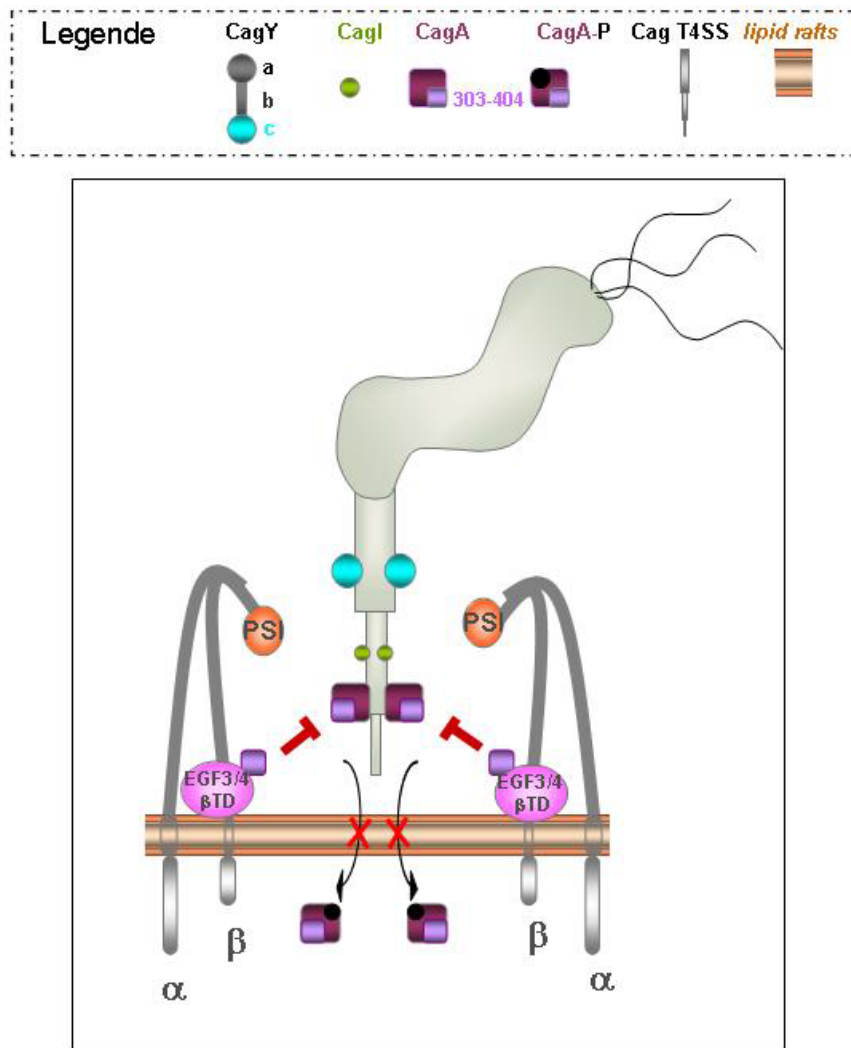


Abb. 4.4: Modell der kompetitiven Inhibition der CagA-Translokation durch His-CagA₃₀₃₋₄₀₄:

Ein möglicher Mechanismus wie His-CagA₃₀₃₋₄₀₄ die CagA-Translokation in AGS Zellen verhindert könnte auf einer kompetitiven Inhibition der Bindung von Pilus-assoziiertem CagA an die β -tail-Domäne / EGF repeats 3-4 beruhen. Dadurch wird möglicherweise der weitere Ablauf, welcher die Ligandenbindung an die *I-like*-Domäne und den Übergang des β 1-Integrins zurück in den inaktiven Zustand beinhaltet unterbunden.

4.2. Alternative Mechanismen für die CagA-Translokation

Die Translokation des Effektorproteins CagA von *H. pylori* steht bisher in direktem Zusammenhang mit dem Cag-T4SS, welches wie CagA auf der *cag*-PAI kodiert ist. Dabei sind die T4SS-Proteine CagL, CagA, CagY und CagI durch eine direkte Interaktion mit dem Rezeptor β 1-Integrin beteiligt. In anderen Arbeiten konnte zusätzlich die Interaktion von CagA mit Phosphatidylserin auf der eukaryotischen Membran als wichtige Voraussetzung für die Translokation des Effektorproteins identifiziert werden. Die Externalisierung von Phosphatidylserin und somit der Zugang zu diesen Membranbestandteilen an der äußeren

Schicht der eukaryotischen Membran für *H. pylori* ist dabei unabhängig von CagA und dem Cag-T4SS (Murata-Kamiya et al., 2010). Wie die, in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von CagA mit dem β 1-Integrin, wird auch die Bindung an Phosphatidylserin über den N-terminalen Teil des Effektorproteins vermittelt. Experimente mit Mutanten im CagA-Aminosäuremotiv K-Xn-R-X-R ergaben, dass eine Änderung der Aminosäure an den Positionen 619 und 621 sowohl die Bindung an Phosphatidylserin, als auch die CagA-Translokation in AGS Zellen verhindert (Murata-Kamiya et al., 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Bindungsregion von CagA an die β 1-Untereinheit des Integrins umfasst dagegen die Aminosäuresequenz 303-404 (s. 3.2.1). Es stellt sich die Frage, ob die Interaktion von CagA mit Phosphatidylserin auf einen alternativen Mechanismus hinweist oder einen weiteren Schritt während der komplexen CagA-Translokation darstellt.

4.2.1 Membranvesikel als Transportmittel für CagA in die Wirtszelle?

Ein potenzieller Weg der alternativen Effektorproteinübertragung sind Membranvesikel, die neben dem Cag-T4SS an dem Transfer von CagA in die eukaryotische Zelle beteiligt sein könnten. Eine Infektion mit *H. pylori* ist meist lebenslang, wodurch eine Umgehung des Immunsystems des Wirts eine wichtige Voraussetzung für das Persistieren von *H. pylori* darstellt. Die Adhärenz von *H. pylori* an die Wirtszelle führt zu einer Möglichkeit Effektorproteine zu translozieren, zum anderen wird dadurch aber auch die Immunantwort des Wirts aktiviert. Der Kontakt mit der Wirtszelle über Membranvesikel könnte *H. pylori* ermöglichen Effektorproteine zur Immunmodulation in die Wirtszelle zu translozieren ohne zytotoxische Effekte hervorzurufen.

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Membranvesikeln in Gram-negativen Bakterien in vielen Studien untersucht. Ihre Funktion für Mikroorganismen besteht im Transfer von Proteinen und DNS zwischen Bakterienzellen, sowie in der Intra- und Interspezies-Kommunikation und im Transfer von Zell-Zell-Signalen. Zudem wird den Membranvesikeln eine Rolle bei der Translokation von Toxinen in eukaryotische Zellen beigemessen (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006). Verschiedene Studien zeigten bereits die Beteiligung von Membranvesikeln an der Ausschleusung von Toxinen, darunter die *E. coli*-Toxine LT Toxin, ClyA, CNF1 Toxin und α -Hämolyisin (Horstman and Kuehn, 2000; Wai et al., 2003; Balsalobre et al., 2006; Kouokam et al., 2006). Membranvesikel werden auch von *H. pylori* produziert, die unter anderem mit dem Transport von VacA in eukaryotische Zellen in Verbindung gebracht werden (Fiocca et al., 1999; Keenan and Allardyce, 2000). Die Ausschleusung von VacA über Membranvesikel führt, wie bei einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Ausbildung von Vakuolen in der Zelle, wenngleich in abgeschwächter Form (Ricci et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Effektorprotein in isolierten

Membranvesikeln von *H. pylori* P12 nachgewiesen (s. 3.3.2). Diese Beobachtung stimmt mit unabhängigen Untersuchungen überein, die ebenfalls CagA in oder auf der Oberfläche der Membranvesikel von *H. pylori* Wildtypstämmen lokalisieren können (Chitcholtan et al., 2008; Olofsson et al., 2010). In dieser Arbeit wurden zusätzlich die Membranvesikel der *H. pylori* Deletionsmutanten P12 Δ cagY und P12 Δ cagE, die ein defektes Cag-T4SS aufweisen auf CagA untersucht. CagA ist ebenfalls in den Membranvesikeln dieser Deletionsmutanten zu finden. Eine Exposition und somit eine Ausschleusung von CagA aus *H. pylori* mit defektem Cag-T4SS konnte zusätzlich durch Immunfluoreszenz-Färbung der Oberfläche der Deletionsmutanten P12 Δ cagY und P12 Δ cagE bestätigt werden (s. 3.3.1). Damit wurde gezeigt, dass es einen alternativen Mechanismus zur Ausschleusung von CagA unabhängig vom Cag-T4SS geben könnte, der unter Beteiligung von Membranvesikeln abläuft. In den Arbeiten von Olofsson und Kollegen wurde gezeigt, dass die Adhäsine BabA und SabA als funktionelle Proteine auf der Oberfläche von *H. pylori*-Membranvesikeln zu finden sind. Die Bindung dieser Membranvesikel an Magenepithelgewebe hängt dabei von einer korrekten Adhäsine-Rezeptorbindung ab (Olofsson et al., 2010). Membranvesikel mit Oberflächen-assoziiertem CagA könnten somit wahrscheinlich über die Adhäsine BabA und SabA an das Magenepithelgewebe binden und über diesen Weg auch bei Cag-T4SS defekten *H. pylori*-Bakterien das Effektorprotein an die Wirtszelle transportieren. Diese Daten könnten auf einen neuen, Cag-T4SS unabhängigen Mechanismus der Übertragung von CagA in die Epithelzellen hinweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Möglichkeit genauer untersucht. Infektionsexperimente mit den Deletionsmutanten P12 Δ cagY und P12 Δ cagE zeigten aber keine Phosphorylierung von CagA in AGS Zellen (s. 3.3.3), was eine Translokation des Proteins ausschließt. Auch die Inkubation der AGS Zellen mit aufgereinigten Membranvesikeln sowohl von *H. pylori* P12 Wildtypbakterien, als auch von den Deletionsmutanten P12 Δ cagY und P12 Δ cagE führte im Vergleich zu einer Infektion mit lebenden Wildtyp-Bakterien nicht zur CagA-Translokation in die AGS Zellen (s. 3.3.2.1). Diese Daten zeigen, dass die CagA-Translokation nicht nur über die Ausschleusung des Proteins aus dem Bakterium ablaufen kann, sondern vielmehr von einer spezifischen Interaktion des Cag-T4SS mit dem Rezeptor β 1-Integrin abhängt.

4.2.2 Die Translokation von prozessiertem CagA ist abhängig vom Cag-T4SS

Bei der Translokation von CagA in phagozytierende Zellen kommt es zu einer Prozessierung des Proteins. Erstmals wurde die Prozessierung von CagA in ein 100 kDa und ein 40 kDa Fragment bei der Translokation in Makrophagen beschrieben (Odenbreit et al., 2001). Die Phosphorylierung findet dann am C-terminalen 40 kDa Fragment statt. Da

diese Prozessierung von CagA in der Zelllinie AGS nicht zu beobachten ist, könnte dieser Effekt nur in Abhängigkeit von Phagozytose auftreten und einen alternativen Mechanismus der CagA-Translokation darstellen. Wie bereits beschrieben ist CagA auch auf der Oberfläche und in den Membranvesikeln von Bakterien ohne intaktes Cag-T4SS zu finden (s. 3.3.1 und 3.3.2) und könnte nach Kontakt mit phagozytierenden Zellen Cag-T4SS-unabhängig aufgenommen werden. Die Infektionsexperimente mit den phagozytierenden Zelllinien dHL-60 und PBLC's bestätigten die Daten von Odenbreit et al., da auch in diesen Zelllinien das translozierte CagA nach Infektion mit Wildtyp-Bakterien proteolytisch gespalten und die Phosphorylierung am C-terminalen 40 kDa Fragment von CagA sichtbar wird (s. 3.3.2). Ein Cag-T4SS unabhängiger Mechanismus konnte dagegen auch bei den phagozytierenden Zelllinien nicht nachgewiesen werden, da die Infektion mit den Cag-T4SS defekten Mutanten P12 Δ cagY und P12 Δ cagE nicht zur CagA-Phosphorylierung in den untersuchten Zelllinien führt (s. 3.3.2). In Einklang mit diesen Daten steht die Beobachtung, dass auch nach Inkubation von dHL-60 Zellen mit den Membranvesikeln der *H. pylori*-Stämme P12, P12 Δ cagY und P12 Δ cagE kein CagA-Phosphorylierungssignal für das C-terminale 40 kDa Fragment detektiert wurde (s. 3.3.1). Dies zeigt, dass weder ganze Bakterien noch deren Strukturen, wie Membranvesikel von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Eine alternative CagA-Translokation, die über Phagozytose vermittelt wird, kann somit ausgeschlossen werden.

4.3. Die Bedeutung äußerer Membranproteine an der *H. pylori*-Pathogenese

H. pylori besitzt eine große Anzahl an äußeren Membranproteinen, wovon einige bereits als Adhäsine identifiziert wurden. Adhäsion ist ein wichtiger Aspekt für das Fortdauern einer Infektion und wird durch die Bindung von Bakterien an Wirtszell-spezifischen Glykoproteinen bzw. Glykolipiden vermittelt (Olofsson et al., 2010). In Biopsien von Magenepithelzellen konnte *H. pylori* tief in der Mukusschicht nachgewiesen werden und ein Teil dieser Bakterien war dabei an die Zelloberfläche gebunden (Hessey et al., 1990). *H. pylori* scheint für eine erfolgreiche Adhäsion an die menschlichen Magenepithelzellen mehrere Rezeptorstrukturen zu nutzen und sich somit den wechselnden Bedingungen während einer Infektion optimal anzupassen (Prinz et al., 2001). Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass *H. pylori* an gesundes Gewebe über die Bindung von BabA mit fucosyliertem Lewis^b, an entzündetes Gewebe dagegen über die Bindung von SabA mit sialyliertem Lewis^{x/a} adhärert (Aspholm-Hurtig, 2004; Boren et al., 1993; Mahdavi, 2002) (Aspholm-Hurtig et al., 2004). Der Adhäsion-vermittelte Kontakt pathogener Mikroorganismen mit der Wirtszelle kann verschiedene biologische Prozesse auslösen, die für die

Pathogenese eine Rolle spielen. Für *Pseudomonas aeruginosa* wurde in diesem Zusammenhang die Entstehung von Mikrokolonien und Biofilmen beschrieben (Ishida et al., 2006). Auch die Auslösung einer Signaltransduktion kann auf den Adhäsion-vermittelten Kontakt mit der Wirtszelle zurückgeführt werden. Dabei kann entweder eine Signalkaskade in die Wirtszelle, wie beispielsweise durch die bakterielle Bindung an Integrine (Isberg and Leong, 1990) oder in das Bakterium, wie beispielsweise bei der P-Fimbrien-vermittelten Siderophorinduktion von *E. coli* gestartet werden (Abraham et al., 1998). Die Bedeutung äußerer Membranproteine für die CagA-Translokation kann daher entweder an einer festen Bindung mit an die Wirtszelle liegen, oder auch die Signalweiterleitung in das Bakterium bzw. die Wirtszelle darstellen.

4.3.1 Äußere Membranproteine sind in die CagA-Translokation involviert

Bisher konnte noch kein Protein von *H. pylori*, das nicht aus der *cag*-PAI stammt, in direkten Zusammenhang mit der Fähigkeit zur CagA-Translokation gebracht werden. Kürzlich wurde aber eine Beteiligung des Adhäsins BabA an der Cag-T4SS-vermittelten Induktion von proinflammatorischen Zellantworten gezeigt. Die Bindung von BabA an den Rezeptor Lewis^b scheint demnach die Effekte des Cag-T4SS, sowie die Induktion der Transkription von Genen, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind *in vitro* und *in vivo* zu potenzieren (Ishijima et al., 2011).

In diesem Zusammenhang wurde in einer Kollaboration mit dem Labor von Prof. Thomas Meyer am Max-Planck Institut Berlin eine, auf dem Transposon Tn7 basierte Bank von Mutanten des *H. pylori*-Stammes G27 (Salama et al., 2004), bezüglich ihrer Fähigkeit der NF- κ B-Aktivierung in der Wirtszelle getestet. CagA induziert in der Wirtszelle über die NF- κ B-Aktivierung die Transkription von proinflammatorischen Genen (Glocker et al., 1998). Mit Hilfe dieser Methode wurde die Genexpression von *hopQ*, als potenzieller Faktor für die NF- κ B-Aktivierung gefunden und könnte somit an der CagA-Translokation beteiligt sein. Die Infektionsexperimente mit *hopQ*-Deletionsmutanten von *H. pylori* P12 konnten bestätigen, dass die Expression des *hopQ*-Gens die Effizienz der CagA-Translokation beeinflusst. P12 Δ *hopQ*-Deletionsmutanten zeigten eine abgeschwächte oder sogar keine CagA-Translokation in AGS Zellen (s. 3.4.2.1). Somit wurde erstmals ein Protein von *H. pylori* identifiziert, das direkten Einfluss auf die Translokation des Effektorproteins CagA hat und nicht auf der *cag*-PAI kodiert ist. Dass dieser Effekt direkt auf die Deletion des *hopQ*-Gens und somit das Fehlen von HopQ zurückzuführen ist, wurde durch die Komplementation des Gens bestätigt. Nach erfolgreicher Klonierung des *hopQ*-Gens in einen *E. coli* / *H. pylori*-

Shuttle-Vektor und der Expression des *hopQ*-Gens in *H. pylori*, wurden die komplementierten Bakterien für Infektionsversuche eingesetzt. Die CagA-Translokation konnte durch Komplementation des *hopQ*-Gens wieder vergleichbar zum entsprechenden Wildtypstamm hergestellt werden (s. 3.4.2.2.3). Es wird vermutet, dass das äußere Membranprotein HopQ als Adhäsion fungieren könnte. Adhäsionsversuche mit Wildtypbakterien und der entsprechenden Deletionsmutante P12 Δ *hopQ* ergaben aber bezüglich der Adhärenz an AGS, GE11 und GE11 β Zellen keine Unterschiede zwischen diesen Stämmen (s. 3.4.2.1.1 und 3.4.2.1.2). Die Adhäsion von *H. pylori* in diesem Stadium der Infektion scheint demnach hauptsächlich über andere Adhäsine, beispielsweise BabA vermittelt zu sein. Da die CagA-Translokation in Abhängigkeit von β 1-Integrinen auf der Wirtszelle abläuft, stellte sich die Frage ob HopQ, neben CagA, CagY und CagI, mit dem β 1-Integrin interagiert. Die Adhärenzversuche mit GE11 (β 1-Integrin-negativ) und GE11 β (β 1-Integrin-positiv) brachten aber keine Unterschiede hervor. Es wurde gezeigt, dass die Wildtypbakterien mit der gleichen Effizienz an GE11 Zellen, wie an GE11 β Zellen adhären (s. 3.4.2.1.2). GE11 Zellen exprimieren noch Integrine mit einer β 3-Untereinheit und könnten die Adhärenz an die Zellen über die Bindung an β 3-Integrine vermitteln. Da die Adhärenz von *hopQ*-Deletionsmutanten an die GE11 Zellen ebenfalls nicht vermindert ist (s. 3.4.2.1.2), schließt dies aber eine direkte Interaktion von HopQ mit Integrinen zur Vermittlung von Adhärenz aus. Diese Beobachtung wird durch Arbeiten von Loh und Kollegen mit einer *hopQ*-Insertionsmutante bestätigt, die wie die, im Rahmen dieser Arbeit hergestellte *hopQ*-Deletionsmutante, keine verminderte Adhärenz an AGS Zellen zeigt (Loh et al., 2008). Somit kann die Beteiligung von HopQ an der CagA-Translokation nicht ausschließlich auf einen Mechanismus der Adhärenz zurückgeführt werden.

4.3.1.1 Mehrere äußere Membranproteine potenzieren das CagA-Translokationspotenzial

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Deletion des *hopQ*-Gens in zwei Varianten des *H. pylori* Stammes P12 eingeführt. Eine Variante stammte dabei aus dem Labor von Prof. Meyer in Berlin (P12 Berlin), die andere aus dem Labor von Prof. Haas in München (P12 München). Die Infektionsexperimente mit beiden Varianten ergaben deutliche Unterschiede zwischen den Bakterien aus Berlin und München hinsichtlich ihres Potenzials zur CagA-Translokation. Die *H. pylori*-Variante aus Berlin zeigte im Vergleich zu der aus München durchweg eine schwächere CagA-Translokation (s. 3.4.2.1). Diese Beobachtung bestätigt sich auch im CagA-Translokationspotenzial der entsprechenden *hopQ*-Deletionsmutanten. Der Stamm P12 Δ *hopQ* München zeigt im Vergleich zum Stamm P12 Δ *hopQ* Berlin lediglich eine deutlich verringerte CagA-Translokation. Die CagA-Translokation bei der Mutante aus

Berlin ist dagegen komplett unterbunden (s. 3.4.2.1), was eine essentielle Beteiligung von HopQ am Transfer des Effektorproteins vermuten ließe. Da dieser Effekt in der Deletionsmutante aus München aber nur in abgeschwächter Form auftritt, scheint HopQ lediglich das Potenzial der CagA-Translokation in AGS Zellen zu erhöhen. Wahrscheinlich werden mehrere äußere Membranproteine von *H. pylori* genutzt, um eine effiziente CagA-Translokation zu gewährleisten.

Die Expression von äußeren Membranproteinen, darunter OipA, HopZ, SabA, und SabB in *H. pylori* wird über phasenvariable Dinukleotidsequenzen in den 5'-Bereichen der kodierenden Regionen dieser Gene reguliert (de Jonge et al., 2004). Die korrekte Translation des Proteins hängt dabei von der Länge der Dinukleotidsequenz ab, wodurch der Leserahmen des Gens entweder „in frame“ ist oder in ein verfrühtes Stoppcodon läuft (Peck et al., 1999; Yamaoka, 2000). Dieser Mechanismus des „*slipped strand mispairing*“ könnte *H. pylori* der Adaption an veränderte Umweltbedingungen dienen. Auch das äußere Membranprotein SabA sowie das homologe SabB, beides Proteine, die vorrangig an entzündetes Gewebe binden werden phasenvariabel reguliert (Mahdavi, 2002). Damit wird die Annahme untermauert, dass *H. pylori* die Produktion einer Vielzahl seiner äußeren Membranproteine, angepasst an die Umweltbedingungen, auf Transkriptions- oder Translationsebene reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass der Expressionsstatus dieser vier Gene mit der Schwere des Krankheitsverlaufs während einer *H. pylori* Infektion korreliert (de Jonge et al., 2004). Somit könnten die Genprodukte von OipA, HopZ, SabA, und SabB auch Einfluss auf das Potenzial der CagA-Translokation haben. Ein *sabA*-Gen kommt im Stamm *H. pylori* P12 nicht vor, weshalb seine Funktion wahrscheinlich von dem homologen Protein SabB erfüllt wird. Auch der gegen das SabA gerichtete Antikörper erkennt in SabA-negativen *H. pylori*-Lysaten das SabB-Protein, aufgrund der 81% Homologie zu SabA. Die Vergleiche der beiden Stammvarianten von *H. pylori* P12 München und Berlin bezüglich der Expression verschiedener äußerer Membranproteine zeigten in der SDS-PAGE einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der Produktion von SabB. In den *H. pylori*-Lysaten P12 München konnte eine starke Bande detektiert werden, die in den *H. pylori*-Lysaten P12 Berlin fehlt (s. 3.4.2.1.2). Die Untersuchung der chromosomalen DNS ergab in einer PCR-Analyse, dass beide Stammvarianten die Genloci für *sabB*, welches im P12 Chromosom zweimal vorkommt, enthalten (s. 3.4.2.1.2). Die Sequenzanalyse der kodierenden Regionen von *sabB* bestätigte die Vermutung, dass der Expressionsstatus von *sabB* in den Stammvarianten *H. pylori* P12 München und Berlin unterschiedlich ist. Die CT-Dinukleotidsequenz beider *sabB*-Gene führt in der Variante München zu einem Leserahmen „in frame“, wohingegen die Expression der *sabB*-Gene in der Variante Berlin aufgrund einer CT-Dinukleotid-basierten Leserahmenverschiebung unterbunden ist (s. 3.5.2.1.2). Diese Daten lassen darauf schließen, dass der Unterschied im CagA-Translokationspotenzial

zwischen den Stammvarianten *H. pylori* P12 München und Berlin sowie deren *hopQ*-Deletionsmutanten in Zusammenhang mit dem Expressionsstatus von *sabB* steht. Beide Proteine scheinen die Stärke der CagA-Translokation zu potenzieren, dabei aber unabhängig voneinander zu sein. Der Stamm P12 Δ *hopQ* München produziert noch SabB, aber kein HopQ und führt in Infektionsexperimenten zu einer verminderten CagA-Translokation. Dies gilt auch für den Stamm P12 Berlin, der noch HopQ aber kein SabB produziert. Lediglich der Stamm P12 Δ *hopQ* Berlin, ohne SabB und HopQ zeigt in den Infektionsexperimenten keine CagA-Translokation mehr (s. 3.4.2.1). Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass ein Protein für die Funktion des anderen Proteins notwendig ist. SabB scheint, wie HopQ nicht essentiell an der Vermittlung der Adhärenz an AGS Zellen beteiligt zu sein, da beide Stammvarianten in Adhärenzversuchen zu einer äquivalenten Lebendzellzahl führen (s. 3.4.2.1.1). Das Aufrechterhalten der Adhäsion bei HopQ- und SabB-negativen in *H. pylori*-Stämmen kann aber auch durch andere Adhäsine, wie BabA vermittelt werden. Des Weiteren ist eine Integrin-vermittelte Adhäsion über SabB an Epithelzellen unwahrscheinlich, da Adhärenzversuche mit GE11 und GE11 β Zellen keine Unterschiede im Adhäsionspotenzial der Stammvarianten P12 München und Berlin sowie den entsprechenden *hopQ*-Deletionsmutanten aufweisen (s. und 3.4.2.1.2).

4.3.2 Signaltransduktion durch äußere Membranproteine zur Rekrutierung von β 1-Integrinen?

In der Arbeit von Ishijima et al., sowie im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die äußeren Membranproteine BabA, HopQ und SabB Einfluss auf die Cag-T4SS vermittelte proinflammatorische Zellantwort (Ishijima et al., 2011) oder die CagA-Translokation haben. Obwohl sowohl HopQ, als auch SabB adhäsive Eigenschaften zugesprochen werden konnte in dieser Arbeit ein direkter Effekt dieser Proteine bei der Adhärenz von *H. pylori* an AGS, GE11 und GE11 β Zellen nicht gefunden werden. Dies bedeutet wahrscheinlich, dass *H. pylori* sein großes Repertoire an äußeren Membranproteinen nutzt, um sich an die Rezeptorverfügbarkeit der Zellen in seiner Umgebung anzupassen. Dies wird zusätzlich dadurch untermauert, dass die Expression vieler äußerer Membranproteine über Dinukleotidsequenzen phasenvariabel reguliert wird (de Jonge et al., 2004). Somit kann die Adhäsion von *H. pylori* an Wirtszellen auch bei Fehlen einzelner Adhäsine oder Rezeptoren aufrecht erhalten werden. Die Abwesenheit von HopQ und SabB an der bakteriellen Oberfläche wird wahrscheinlich durch andere Adhäsine, wie BabA und OipA kompensiert und somit die Adhäsion an die Wirtszelle weiterhin ermöglicht. Dennoch ist die CagA-Translokation bei HopQ oder SabB-negativen Stämmen von *H. pylori* geschwächt und verschwindet in Stämmen, denen beide Proteine fehlen

komplett. Dies lässt vermuten, dass die Oberflächenproteine, neben der Adhäsion, noch eine weitere Funktion in der Pathogenese von *H. pylori* haben. Dies könnte beispielsweise die Signalweiterleitung in *H. pylori* sein, die zu einer Aktivierung des Cag-T4SS führt.

Des Weiteren konnte sowohl in dieser Arbeit, als auch in verschiedenen anderen Studien gezeigt werden, dass die CagA-Translokation nicht zufällig stattfindet, sondern vielmehr in einem kontrollierten Mechanismus, der auf Erkennung des Wirtszellrezeptors β 1-Integrin durch das Cag-T4SS beruht (Kwok et al., 2007; Jimenez-Soto et al., 2009). Integrine sind in gesundem Magengewebe nicht auf der apikalen, sondern auf der basalen Membran der Epithelzellen zu finden. Dies bedeutet, dass der Rezeptor β 1-Integrin *in vivo* von der für *H. pylori* zugänglichen Membranseite getrennt ist. Die Abgrenzung wird zusätzlich durch die „tight junctions“ zwischen den Epithelzellen verstärkt. Es scheint somit einen sehr differenzierten Mechanismus für die β 1-Integrin-vermittelte CagA-Translokation in Magenepithelzellen zu geben, der über *cag*-PAI unabhängige Faktoren abläuft. Potenzielle Kandidaten stellen dabei die äußeren Membranproteine von *H. pylori* dar, da über sie der Erstkontakt mit der Zelle stattfindet. Die Interaktion über Oberflächenproteine mit der Wirtszelle könnte zur Induktion einer Signaltransduktion in der Zelle führen. Eine mögliche Auswirkung einer solchen Signaltransduktion könnte das Lösen des interzellulären Verbands der Epithelzellen sein, wodurch *H. pylori* Zugang zur basalen Membranseite und somit zu β 1-Integrinen erhalten würde (Tegtmeyer et al., 2011). Des Weiteren ist es denkbar, dass das Auslösen einer Signalkaskade in der Wirtszelle durch HopQ und SabB zur Transzytose von β 1-Integrinmolekülen an die apikale Membran führt. Die Induktion der Bewegung von β 1-Integrinen in der Zellmembran zur apikalen Membranseite wurde bereits für enteropathogene *E. coli* beschrieben (Muza-Moons et al., 2003).

Eine Polarisierung von β 1-Integrinen oder „tight junctions“ sind jedoch im AGS-Zellmodell nicht zu finden. Eine Beteiligung von HopQ und SabB an Prozessen, wie der Transzytose von β 1-Integrinen oder dem Öffnen von „tight junctions“ kann in diesem Modell daher nicht untersucht werden. Dennoch können in diesem Zusammenhang HopQ und SabB *in vivo* relevant für eine erfolgreiche CagA-Translokation sein. Dies könnte erklären, wie *H. pylori* das CagA-Effektorprotein über die apikale Membran in Magenepithelzellen transloziert. HopQ und SabB würden in diesem Modell die Signalkaskade zur Transzytose der β 1-Integrine über zwei verschiedene Wirtszellproteine auslösen, wodurch das Fehlen von nur einem Protein in einer schwächeren Signalweiterleitung resultieren würde. Die Rezeptorverfügbarkeit für das Cag-T4SS wäre somit herabgesetzt und die CagA-Translokationseffizienz vermindert. Die komplett unterbundene CagA-Translokation in Abwesenheit von HopQ und SabB könnte somit bedeuten, dass HopQ und SabB als einzige

H. pylori-Proteine eine Signalkaskade zur Transzytose von β 1-Integrinen auslöst, wodurch sie sehr entscheidend an der Pathogenese von *H. pylori*-Infektionen beteiligt wären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Helicobacter pylori ist ein humanpathogenes Bakterium, das die Magenmukosa von etwa 50% der Weltbevölkerung besiedelt. Es persistiert meist lebenslang im Magen und ruft eine chronische Entzündung der Magenmukosa hervor, die zu vielen schweren Erkrankungen, wie z.B. chronischer Gastritis, Magengeschwüren und Magenkrebs führen kann. Aufgrund der unwirtlichen Bedingungen im menschlichen Magen wurde lange Zeit angenommen, dass dieses Milieu steril sei. Um diese ökologische Nische dennoch zu besiedeln, hat *H. pylori* verschiedene Strategien entwickelt und wird dadurch zum vorherrschenden Bestandteil der Mikroflora des Magens. Ein wichtiger Virulenzfaktor von *H. pylori* stellt das Cag-T4SS dar, welches auf der *cag*-Pathogenitätsinsel kodiert ist und die Translokation des Effektorproteins CagA in Magenepithelzellen katalysiert. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit der *cag*-PAI im Chromosom, sowie einem aktiven *VacA* hinsichtlich der Schwere von *H. pylori* assoziierten Erkrankungen besteht. Die Translokation von CagA in die eukaryotische Zelle geschieht dabei nicht zufällig, sondern über eine gezielte Interaktion des Cag-T4SS mit dem Rezeptor β 1-Integrin auf der Wirtszelle. Die *cag*-PAI kodierten Proteine CagA, CagY und CagI wurden als Pilus-assoziierte Komponenten des Cag-T4SS identifiziert, die direkt mit dem extrazellulären Teil der β -Untereinheit des β 1-Integrin interagieren. In dieser Arbeit wurde diese Interaktion genauer untersucht, wobei der Fokus auf die Identifizierung der jeweiligen Bindungsdomänen für CagA, CagY und CagI in der β 1-Untereinheit gelegt wurde. Es konnte erstmals eine Bindung bakterieller Proteine an die *β -tail*-Domäne und die EGF *repeats* der β 1-Untereinheit gezeigt werden. CagA und CagI zeigten in *Yeast Two Hybrid*, wie auch in biochemischen Untersuchungen eine Bindung an diese Domänen des Integrins. Für das CagY-Protein wird aufgrund von *Yeast Two Hybrid* Daten eine Interaktion mit der PSI Domäne vermutet. Gemeinsam mit Experimenten, bei denen die CagA-Translokation durch eine irreversible Blockade der Konformationsänderung des β 1-Integrins inhibiert wird, lassen diese Daten auf einen Mechanismus für die CagA-Translokation schließen, der auf der Konformationsänderung des Integrins beruht. In weiteren Versuchen konnte die Bindungsregion im CagA-Protein, die für die Interaktion mit dem β 1-Integrin verantwortlich ist lokalisiert werden. Die Inkubation von AGS Zellen mit dem rekombinanten Proteinfragment (His-CagA₃₀₃₋₄₀₄) inhibiert die CagA-Translokation, aber nicht die Bindung des Antikörpers 9EG7, welcher nur an aktivierte Integrine bindet. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Bindung von CagA₃₀₃₋₄₀₄ an die β 1-Untereinheit nicht für die Konformationsänderung des Integrins in den inaktiven Zustand verantwortlich ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition der CagA-Translokation durch das rekombinante CagA-Proteinfragment auf einem kompetitiven Mechanismus beruht. Dies zeigt erstmals, dass eine direkte Bindung von CagA

an den Rezeptor eine grundlegende Voraussetzung für die Translokation des Proteins darstellt. Die Abhängigkeit der CagA-Translokation von der Rezeptorerkennung durch das Cag-T4SS konnte im Rahmen dieser Arbeit untermauert werden. Obwohl CagA an der Oberfläche und in den Membranvesikeln von *H. pylori*, mit defektem Cag-T4SS gefunden wurde, konnte kein CagA-Transfer in Wirtszellen beobachtet werden. Auch ein auf Phagozytose basierender Mechanismus, bei dem CagA T4SS-unabhängig aufgenommen und anschließend proteolytisch gespalten wird, konnte ausgeschlossen werden. Die Infektionsexperimente mit Cag-T4SS-defekten *H. pylori* und der phagozytierenden Zelllinie dHL-60 oder PBLC`s zeigten keine CagA-Translokation.

Neben den Untersuchungen zur Rolle des Cag-T4SS bei der CagA-Translokation wurden im Rahmen dieser Arbeit auch äußere Membranproteine von *H. pylori* hinsichtlich ihrer Beteiligung an der CagA-Translokation untersucht. Bisher gibt es kein bekanntes Protein von *H. pylori*, welches unabhängig vom Cag-T4SS den CagA-Transfer in die Wirtszelle beeinflusst. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Oberflächenprotein HopQ die Effizienz der CagA-Translokation in AGS Zellen steigert. Auch eine Beteiligung des phasenvariabel regulierten äußeren Membranproteins SabB wurde aufgezeigt. Die Fähigkeit von *H. pylori* zur CagA-Translokation ist in Abwesenheit von jeweils einem dieser Proteine stark geschwächt und geht in Abwesenheit beider Proteine sogar verloren. Der Mechanismus über welchen HopQ und SabB CagA-Translokation beeinflussen bleibt aber unklar. Obwohl HopQ und SabB adhäsive Eigenschaften zugesprochen werden, konnte in Adhärenzversuchen eine Bedeutung dieser Proteine für die CagA-Translokation, die ausschließlich auf der Adhäsionsvermittlung an die Wirtszelle beruht, ausgeschlossen werden. Bakterien, denen entweder HopQ oder SabB bzw. beide Proteine fehlen, zeigen das gleiche Adhäsionspotenzial an AGS, GE11 und GE11 β Zellen, wie Wildtypbakterien. Die äußeren Membranproteine HopQ und SabB stellen daher eine interessante Möglichkeit für die Signaltransduktion in *H. pylori* zur Aktivierung des Cag-T4SS bzw. in die eukaryotische Zelle zur Rekrutierung von β 1-Integrinen dar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abraham, S.N., Jonsson, A.B., and Normark, S. (1998). Fimbriae-mediated host-pathogen cross-talk. *Curr Opin Microbiol* 1, 75-81.

Aihara, M., Tsuchimoto, D., Takizawa, H., Azuma, A., Wakebe, H., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1997). Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 65, 3218-3224.

Akopyants, N.S., Fradkov, A., Diatchenko, L., Hill, J.E., Siebert, P.D., Lukyanov, S.A., Sverdlov, E.D., and Berg, D.E. (1998). PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13108-13113.

Allen, L.A., Schlesinger, L.S., and Kang, B. (2000). Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp Med* 191, 115-128.

Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., *et al.* (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397, 176-180.

Alvarez-Martinez, C.E., and Christie, P.J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 775-808.

Amieva, M.R., and El-Omar, E.M. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134, 306-323.

Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J., and Falkow, S. (2003). Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300, 1430-1434.

Anderson, L.A., Murphy, S.J., Johnston, B.T., Watson, R.G., Ferguson, H.R., Bamford, K.B., Ghazy, A., McCarron, P., McGuigan, J., Reynolds, J.V., *et al.* (2008). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy and the stages of the oesophageal inflammation, metaplasia, adenocarcinoma sequence: results from the FINBAR case-control study. *Gut* 57, 734-739.

Andrzejewska, J., Lee, S.K., Olbermann, P., Lotzing, N., Katzowitsch, E., Linz, B., Achtman, M., Kado, C.I., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2006). Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J Bacteriol* 188, 5865-5877.

Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., *et al.* (2000). *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 191, 593-602.

- Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., and Humphries, M.J. (2008). Linking integrin conformation to function. *Journal of Cell Science* *122*, 165-170.
- Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., and Humphries, M.J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* *122*, 165-170.
- Aspholm-Hurtig, M. (2004). Functional Adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO Blood Group Antigen Binding Adhesin. *Science* *305*, 519-522.
- Atherton, J.C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* *1*, 63-96.
- Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Jr., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., and Cover, T.L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* *270*, 17771-17777.
- Backert, S., and Meyer, T.F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* *9*, 207-217.
- Backert, S., and Selbach, M. (2008). Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* *10*, 1573-1581.
- Backert, S., Tegtmeyer, N., and Selbach, M. (2010). The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* *15*, 163-176.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M., and Meyer, T.F. (2000). Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* *2*, 155-164.
- Bajt, M.L., Ginsberg, M.H., Frelinger, A.L., 3rd, Berndt, M.C., and Loftus, J.C. (1992). A spontaneous mutation of integrin alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa) helps define a ligand binding site. *J Biol Chem* *267*, 3789-3794.
- Bajt, M.L., and Loftus, J.C. (1994). Mutation of a ligand binding domain of beta 3 integrin. Integral role of oxygenated residues in alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) receptor function. *J Biol Chem* *269*, 20913-20919.
- Balsalobre, C., Silvan, J.M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E., and Wai, S.N. (2006). Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* *59*, 99-112.
- Bartfeld, S., Engels, C., Bauer, B., Aurass, P., Flieger, A., Bruggemann, H., and Meyer, T.F. (2009). Temporal resolution of two-tracked NF-kappaB activation by *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* *11*, 1638-1651.
- Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B.E., and Mobley, H.L. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* *40*, 25-30.

- Bazzoni, G., Shih, D.T., Buck, C.A., and Hemler, M.E. (1995). Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem* 270, 25570-25577.
- Blok, P., Craanen, M.E., Offerhaus, G.J., and Tytgat, G.N. (1997). Gastric carcinoma: clinical, pathogenic, and molecular aspects. *QJM* 90, 735-749.
- Boncristiano, M., Paccani, S.R., Barone, S., Ulivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elis, M.M., Telford, J.L., and Baldari, C.T. (2003). The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 198, 1887-1897.
- Boonjakuakul, J.K., Canfield, D.R., and Solnick, J.V. (2005). Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression in vitro and in the Rhesus macaque. *Infect Immun* 73, 4895-4904.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G., and Normark, S. (1993). Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262, 1892-1895.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., Konig, W., and Backert, S. (2005). NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9300-9305.
- Buhrdorf, R., Forster, C., Haas, R., and Fischer, W. (2003). Topological analysis of a putative virB8 homologue essential for the cag type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 293, 213-217.
- Burroni, D., Lupetti, P., Pagliaccia, C., Reyrat, J.M., Dallai, R., Rappuoli, R., and Telford, J.L. (1998). Deletion of the major proteolytic site of the *Helicobacter pylori* cytotoxin does not influence toxin activity but favors assembly of the toxin into hexameric structures. *Infect Immun* 66, 5547-5550.
- Busler, V.J., Torres, V.J., McClain, M.S., Tirado, O., Friedman, D.B., and Cover, T.L. (2006). Protein-protein interactions among *Helicobacter pylori* cag proteins. *J Bacteriol* 188, 4787-4800.
- Cao, P., and Cover, T.L. (2002). Two different families of hopQ alleles in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 40, 4504-4511.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 1, 137-149.
- Cascales, E., and Christie, P.J. (2004). Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science* 304, 1170-1173.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996). cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-

specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14648-14653.

Chandran, V., Fronzes, R., Duquerroy, S., Cronin, N., Navaza, J., and Waksman, G. (2009). Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature* 462, 1011-1015.

Charo, I.F., Nannizzi, L., Phillips, D.R., Hsu, M.A., and Scarborough, R.M. (1991). Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J Biol Chem* 266, 1415-1421.

Chitcholtan, K., Hampton, M.B., and Keenan, J.I. (2008). Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis* 29, 2400-2405.

Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 59, 451-485.

Christie, P.J., and Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* 22, 51-61.

Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C. (1979). Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J Exp Med* 149, 969-974.

Correa, P. (1997). *Helicobacter pylori* as a pathogen and carcinogen. *J Physiol Pharmacol* 48 Suppl 4, 19-24.

Couturier, M.R., Tasca, E., Montecucco, C., and Stein, M. (2006). Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect Immun* 74, 273-281.

Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284, 1328-1333.

Cover, T.L., and Blanke, S.R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 3, 320-332.

Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267, 10570-10575.

Cover, T.L., Krishna, U.S., Israel, D.A., and Peek, R.M., Jr. (2003). Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 63, 951-957.

Cover, T.L., Tummuru, M.K., Cao, P., Thompson, S.A., and Blaser, M.J. (1994). Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 269, 10566-10573.

- de Jonge, R., Pot, R.G., Loffeld, R.J., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., and Kusters, J.G. (2004). The functional status of the *Helicobacter pylori* sabB adhesin gene as a putative marker for disease outcome. *Helicobacter* 9, 158-164.
- Dehio, C., and Meyer, M. (1997). Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 538-540.
- Dersch, P., and Isberg, R.R. (1999). A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J* 18, 1199-1213.
- Donnenberg, M.S. (2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406, 768-774.
- Dorer, M.S., Talarico, S., and Salama, N.R. (2009). *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog* 5, e1000544.
- Drumm, B. (1990). *Helicobacter pylori*. *Arch Dis Child* 65, 1278-1282.
- Dunn, B.E., Cohen, H., and Blaser, M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10, 720-741.
- Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R., and Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 59, 2470-2475.
- Eaton, K.A., Morgan, D.R., and Krakowka, S. (1992). Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 37, 123-127.
- El-Omar, E.M., Oien, K., Murray, L.S., El-Nujumi, A., Wirz, A., Gillen, D., Williams, C., Fullarton, G., and McColl, K.E. (2000). Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology* 118, 22-30.
- Elitsur, Y., Adkins, L., Saeed, D., and Neace, C. (1999). *Helicobacter pylori* antibody profile in household members of children with *H. pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 29, 178-182.
- Evans, D.J., Jr., and Evans, D.G. (2000). *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter* 5, 183-195.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., *et al.* (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299, 1582-1585.
- Feire, A.L. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 15470-15475.
- Feng, G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res* 253, 47-54.

- Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T.L., and Solcia, E. (1999). Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* 188, 220-226.
- Fischer, W. (2011). Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *FEBS J* 278, 1203-1212.
- Fischer, W., and Haas, R. (2004). The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranslational modification for full activity. *J Bacteriol* 186, 777-784.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., and Haas, R. (2001). Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 42, 1337-1348.
- Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R., Zimmer, R., and Haas, R. (2010). Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res* 38, 6089-6101.
- Franco, A.T., Israel, D.A., Washington, M.K., Krishna, U., Fox, J.G., Rogers, A.B., Neish, A.S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G.I., Hatakeyama, M., *et al.* (2005). Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10646-10651.
- Fronzes, R., Christie, P.J., and Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7, 703-714.
- Gailit, J., and Ruoslahti, E. (1988). Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem* 263, 12927-12932.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301, 1099-1102.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H., and Opferkuch, W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 38, 371-377.
- Gimond, C., van Der Flier, A., van Delft, S., Brakebusch, C., Kuikman, I., Collard, J.G., Fassler, R., and Sonnenberg, A. (1999). Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol* 147, 1325-1340.
- Glocker, E., Lange, C., Covacci, A., Bereswill, S., Kist, M., and Pahl, H.L. (1998). Proteins encoded by the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappaB activation. *Infect Immun* 66, 2346-2348.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.

- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4645-4649.
- Haas, R., Kahrs, A.F., Facius, D., Allmeier, H., Schmitt, R., and Meyer, T.F. (1993). TnMax-- a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene* *130*, 23-31.
- Hamilton, H.L., Dominguez, N.M., Schwartz, K.J., Hackett, K.T., and Dillard, J.P. (2005). *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol* *55*, 1704-1721.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* *166*, 557-580.
- Harris, P.R., Mobley, H.L., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J., and Smith, P.D. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* *111*, 419-425.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* *68*, 692-744.
- Hessey, S.J., Spencer, J., Wyatt, J.I., Sobala, G., Rathbone, B.J., Axon, A.T., and Dixon, M.F. (1990). Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* *31*, 134-138.
- Higashi, H., Nakaya, A., Tsutsumi, R., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ishikawa, S., Higuchi, M., Takahashi, A., Kurashima, Y., Teishikata, Y., *et al.* (2004). *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* *279*, 17205-17216.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2002). SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* *295*, 683-686.
- Higashi, H., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ren, S., Yuasa, H., Saadat, I., Murata-Kamiya, N., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2005). EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem* *280*, 23130-23137.
- Ho, S.B., Takamura, K., Anway, R., Shekels, L.L., Toribara, N.W., and Ota, H. (2004). The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig Dis Sci* *49*, 1598-1606.
- Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* *210*, 171-186.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., and Haas, R. (2001). Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* *41*, 379-391.

- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Henke, G., and Haas, R. (1998). Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol Microbiol* 28, 1027-1038.
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Puls, J., Plano, G.V., Haas, R., and Fischer, W. (2006). A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol* 59, 1624-1637.
- Holmes, D.S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114, 193-197.
- Horstman, A.L., and Kuehn, M.J. (2000). Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* 275, 12489-12496.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., and Boren, T. (1998). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279, 373-377.
- Isberg, R.R., and Leong, J.M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871.
- Ishida, Y., Goto, Y., Kondo, T., Kurata, M., Nishio, K., Kawai, S., Osafune, T., Naito, M., and Hamajima, N. (2006). Eradication rate of *Helicobacter pylori* according to genotypes of CYP2C19, IL-1B, and TNF-A. *Int J Med Sci* 3, 135-140.
- Ishijima, N., Suzuki, M., Ashida, H., Ichikawa, Y., Kanegae, Y., Saito, I., Boren, T., Haas, R., Sasakawa, C., and Mimuro, H. (2011). BabA-mediated Adherence Is a Potentiator of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System Activity. *Journal of Biological Chemistry* 286, 25256-25264.
- Ji, X., Fernandez, T., Burroni, D., Pagliaccia, C., Atherton, J.C., Reyrat, J.M., Rappuoli, R., and Telford, J.L. (2000). Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Infect Immun* 68, 3754-3757.
- Jimenez-Soto, L.F., Kutter, S., Sewald, X., Ertl, C., Weiss, E., Kapp, U., Rohde, M., Pirch, T., Jung, K., Retta, S.F., *et al.* (2009). *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog* 5, e1000684.
- Judd, P.K., Kumar, R.B., and Das, A. (2005). Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11498-11503.
- Juhas, M., Crook, D.W., and Hood, D.W. (2008). Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* 10, 2377-2386.
- Jurik, A., Hausser, E., Kutter, S., Pattis, I., Prassl, S., Weiss, E., and Fischer, W. (2010). The coupling protein Cagbeta and its interaction partner CagZ are required for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Infect Immun* 78, 5244-5251.

- Keenan, J.I., and Allardyce, R.A. (2000). Iron influences the expression of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle-associated virulence factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12, 1267-1273.
- Kerr, J.R. (1999). Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *Mol Pathol* 52, 220-230.
- Kersulyte, D., Lee, W., Subramaniam, D., Anant, S., Herrera, P., Cabrera, L., Balqui, J., Barabas, O., Kalia, A., Gilman, R.H., *et al.* (2009). *Helicobacter Pylori*'s plasticity zones are novel transposable elements. *PLoS One* 4, e6859.
- Kersulyte, D., Velapatino, B., Mukhopadhyay, A.K., Cahuayme, L., Bussalleu, A., Combe, J., Gilman, R.H., and Berg, D.E. (2003). Cluster of type IV secretion genes in *Helicobacter pylori*'s plasticity zone. *J Bacteriol* 185, 3764-3772.
- Kouokam, J.C., Wai, S.N., Fallman, M., Dobrindt, U., Hacker, J., and Uhlin, B.E. (2006). Active Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Associated with Outer Membrane Vesicles from Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 74, 2022-2030.
- Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P.H., Stremmel, W., and Rudi, J. (2001). Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 69, 5080-5087.
- Kutter, S., Buhrdorf, R., Haas, J., Schneider-Brachert, W., Haas, R., and Fischer, W. (2008). Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol* 190, 2161-2171.
- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W., *et al.* (2007). *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449, 862-866.
- Labigne, A., Cussac, V., and Courcoux, P. (1991). Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 173, 1920-1931.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J., and Frost, L.S. (2003). F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* 224, 1-15.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., *et al.* (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445, 915-918.
- Loh, J.T., Torres, V.J., Algood, H.M., McClain, M.S., and Cover, T.L. (2008). *Helicobacter pylori* HopQ outer membrane protein attenuates bacterial adherence to gastric epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 289, 53-58.

- Lu, C., Ferzly, M., Takagi, J., and Springer, T.A. (2001). Epitope mapping of antibodies to the C-terminal region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation. *J Immunol* *166*, 5629-5637.
- Lu, C., Oxvig, C., and Springer, T.A. (1998). The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J Biol Chem* *273*, 15138-15147.
- Luo, B.H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* *25*, 619-647.
- Lupetti, P., Heuser, J.E., Manetti, R., Massari, P., Lanzavecchia, S., Bellon, P.L., Dallai, R., Rappuoli, R., and Telford, J.L. (1996). Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* *133*, 801-807.
- Mahdavi, J. (2002). *Helicobacter pylori* SabA Adhesin in Persistent Infection and Chronic Inflammation. *Science* *297*, 573-578.
- Malaty, H.M., and Graham, D.Y. (1994). Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* *35*, 742-745.
- Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B., and Glancy, R.J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* *142*, 436-439.
- Marshall, B.J., Barrett, L.J., Prakash, C., McCallum, R.W., and Guerrant, R.L. (1990). Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* *99*, 697-702.
- Marshall, B.J., and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* *1*, 1311-1315.
- Marshall, T., and Williams, K.M. (1992). Recovery of protein by coomassie brilliant blue precipitation prior to electrophoresis. *Electrophoresis* *13*, 887-888.
- Mashburn-Warren, L.M., and Whiteley, M. (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular Microbiology* *61*, 839-846.
- McCullen, C.A., and Binns, A.N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* *22*, 101-127.
- Merz, A.J., and So, M. (2000). Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 423-457.
- Merz, A.J., So, M., and Sheetz, M.P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* *407*, 98-102.
- Mimuro, H., Suzuki, T., Tanaka, J., Asahi, M., Haas, R., and Sasakawa, C. (2002). Grb2 is a key mediator of *helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* *10*, 745-755.

- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C. (1998). Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* 187, 135-140.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordonez, C.L., Lory, S., *et al.* (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526-1530.
- Mould, A.P. (2004). Evidence That Monoclonal Antibodies Directed against the Integrin Subunit Plexin/Semaphorin/Integrin Domain Stimulate Function by Inducing Receptor Extension. *Journal of Biological Chemistry* 280, 4238-4246.
- Mould, A.P., Garratt, A.N., Askari, J.A., Akiyama, S.K., and Humphries, M.J. (1995). Identification of a novel anti-integrin monoclonal antibody that recognises a ligand-induced binding site epitope on the beta 1 subunit. *FEBS Lett* 363, 118-122.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Murata-Kamiya, N., Kikuchi, K., Hayashi, T., Higashi, H., and Hatakeyama, M. (2010). *Helicobacter pylori* Exploits Host Membrane Phosphatidylserine for Delivery, Localization, and Pathophysiological Action of the CagA Oncoprotein. *Cell Host & Microbe* 7, 399-411.
- Muza-Moons, M.M., Koutsouris, A., and Hecht, G. (2003). Disruption of Cell Polarity by Enteropathogenic *Escherichia coli* Enables Basolateral Membrane Proteins To Migrate Apically and To Potentiate Physiological Consequences. *Infection and Immunity* 71, 7069-7078.
- Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoe, K., Yamazaki, S., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2006). Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 130, 1181-1190.
- Neel, B.G., Gu, H., and Pao, L. (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 28, 284-293.
- Nguyen, V.Q., Caprioli, R.M., and Cover, T.L. (2001). Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun* 69, 543-546.
- Novak, R., and Tuomanen, E. (1999). Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Semin Respir Infect* 14, 209-217.
- Odenbreit, S. (2000). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Science* 287, 1497-1500.
- Odenbreit, S., Faller, G., and Haas, R. (2002). Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int J Med Microbiol* 292, 247-256.

Odenbreit, S., Gebert, B., Puls, J., Fischer, W., and Haas, R. (2001). Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol* 3, 21-31.

Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., and Haas, R. (1999). Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 31, 1537-1548.

Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., *et al.* (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1003-1008.

Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson, S., Haas, R., Backert, S., Wai, S.N., Gröbner, G., *et al.* (2010). Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Molecular Microbiology* 77, 1539-1555.

Ota, H., Nakayama, J., Momose, M., Hayama, M., Akamatsu, T., Katsuyama, T., Graham, D.Y., and Genta, R.M. (1998). *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch* 433, 419-426.

Oxvig, C., and Springer, T.A. (1998). Experimental support for a beta-propeller domain in integrin alpha-subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4870-4875.

Pagliaccia, C., de Bernard, M., Lupetti, P., Ji, X., Burrone, D., Cover, T.L., Papini, E., Rappuoli, R., Telford, J.L., and Reyrat, J.M. (1998). The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10212-10217.

Parsonnet, J. (1998). *Helicobacter pylori*. *Infect Dis Clin North Am* 12, 185-197.

Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelstein, J.H., and Friedman, G.D. (1994). *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330, 1267-1271.

Pattis, I., Weiss, E., Laugks, R., Haas, R., and Fischer, W. (2007). The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology* 153, 2896-2909.

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

Peek, R.M., Jr., and Blaser, M.J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2, 28-37.

Peterson, J.A., Nyree, C.E., Newman, P.J., and Aster, R.H. (2003). A site involving the "hybrid" and PSI homology domains of GPIIIa (beta 3-integrin subunit) is a common target for antibodies associated with quinine-induced immune thrombocytopenia. *Blood* 101, 937-942.

- Pinto-Santini, D.M., and Salama, N.R. (2009). Cag3 is a novel essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system outer membrane subcomplex. *J Bacteriol* **191**, 7343-7352.
- Prinz, C., Schoniger, M., Rad, R., Becker, I., Keiditsch, E., Wagenpfeil, S., Classen, M., Rosch, T., Schepp, W., and Gerhard, M. (2001). Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res* **61**, 1903-1909.
- Raymond, T., Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I.N., and Mackow, E.R. (2005). Pathogenic hantaviruses bind plexin-semaphorin-integrin domains present at the apex of inactive, bent alpha3 integrin conformers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1163-1168.
- Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Eshagh Hosseini, M., and Atherton, J.C. (2007). A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* **133**, 926-936.
- Ricci, V., Chiozzi, V., Necchi, V., Oldani, A., Romano, M., Solcia, E., and Ventura, U. (2005). Free-soluble and outer membrane vesicle-associated VacA from *Helicobacter pylori*: Two forms of release, a different activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **337**, 173-178.
- Ricci, V., Ciacci, C., Zarrilli, R., Sommi, P., Tumuru, M.K., Del Vecchio Blanco, C., Bruni, C.B., Cover, T.L., Blaser, M.J., and Romano, M. (1996). Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. *Infect Immun* **64**, 2829-2833.
- Rieder, G., Hatz, R.A., Moran, A.P., Walz, A., Stolte, M., and Enders, G. (1997). Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect Immun* **65**, 3622-3630.
- Rohde, M., Puls, J., Buhrdorf, R., Fischer, W., and Haas, R. (2003). A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol* **49**, 219-234.
- Rubin, C.E. (1997). Are there three types of *Helicobacter pylori* gastritis? *Gastroenterology* **112**, 2108-2110.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 697-715.
- Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., *et al.* (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* **447**, 330-333.
- Sachs, G., Weeks, D.L., Melchers, K., and Scott, D.R. (2003). The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol* **65**, 349-369.
- Sakamoto, S., Watanabe, T., Tokumaru, T., Takagi, H., Nakazato, H., and Lloyd, K.O. (1989). Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood

group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* 49, 745-752.

Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T.K., Sherlock, G., Tompkins, L., and Falkow, S. (2000). A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14668-14673.

Salama, N.R., Shepherd, B., and Falkow, S. (2004). Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 186, 7926-7935.

Satin, B., Norais, N., Telford, J., Rappuoli, R., Murgia, M., Montecucco, C., and Papini, E. (1997). Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J Biol Chem* 272, 25022-25028.

Schmitt, W., and Haas, R. (1994). Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 12, 307-319.

Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H.O., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2004). The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5024-5029.

Scibelli, A., Roperto, S., Manna, L., Pavone, L.M., Tafuri, S., Morte, R.D., and Staiano, N. (2007). Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens. *The Veterinary Journal* 173, 482-491.

Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999). Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14559-14564.

Segal, E.D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L.S., and Falkow, S. (1997). Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7595-7599.

Segal, E.D., and Tompkins, L.S. (1993). Transformation of *Helicobacter pylori* by electroporation. *Biotechniques* 14, 225-226.

Sewald, X., Gebert-Vogl, B., Prassl, S., Barwig, I., Weiss, E., Fabbri, M., Osicka, R., Schiemann, M., Busch, D.H., Semmrich, M., *et al.* (2008). Integrin subunit CD18 is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host Microbe* 3, 20-29.

Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermuller, J., Reinhardt, R., *et al.* (2010). The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 464, 250-255.

Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., and Kerr, L.D. (1998). Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* 160, 2401-2407.

- Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Miller, G.G., and Blaser, M.J. (1995). Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect Immun* 63, 1681-1687.
- Sheu, B.S., Yang, H.B., Yeh, Y.C., and Wu, J.J. (2010). *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric epithelium: a bug's first step is a novel target for us. *J Gastroenterol Hepatol* 25, 26-32.
- Smith, J.W., and Cheresch, D.A. (1988). The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. Photoaffinity cross-linking implicates amino acid residues 61-203 of the beta subunit. *J Biol Chem* 263, 18726-18731.
- Sommi, P., Ricci, V., Fiocca, R., Romano, M., Ivey, K.J., Cova, E., Solcia, E., and Ventura, U. (1996). Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions induced by *Helicobacter pylori*: an in vitro study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion* 57, 299-304.
- Stingl, K., and De Reuse, H. (2005). Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? *Int J Med Microbiol* 295, 307-315.
- Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 5, 441-452.
- Suerbaum, S., and Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347, 1175-1186.
- Sundrud, M.S., Torres, V.J., Unutmaz, D., and Cover, T.L. (2004). Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7727-7732.
- Takagi, J., and Springer, T.A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* 186, 141-163.
- Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2003). Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 5, 395-404.
- Tegtmeyer, N., Wessler, S., and Backert, S. (2011). Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS Journal* 278, 1190-1202.
- Telford, J.L., Covacci, A., Ghiara, P., Montecucco, C., and Rappuoli, R. (1994). Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. *Trends Biotechnol* 12, 420-426.
- Teysse, S., Chari, S.T., Scheid, J., and Singer, M.V. (1995). Effect of repeated boluses of intravenous omeprazole and primed infusions of ranitidine on 24-hour intragastric pH in healthy human subjects. *Dig Dis Sci* 40, 247-255.
- Thanassi, D.G., and Hultgren, S.J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 12, 420-430.

- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**, 145-149.
- Tsutsumi, R., Higashi, H., Higuchi, M., Okada, M., and Hatakeyama, M. (2003). Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* **278**, 3664-3670.
- Tsutsumi, R., Takahashi, A., Azuma, T., Higashi, H., and Hatakeyama, M. (2006). Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* **26**, 261-276.
- Uetz, P., Dong, Y.A., Zeretzke, C., Atzler, C., Baiker, A., Berger, B., Rajagopala, S.V., Roupelieva, M., Rose, D., Fossum, E., *et al.* (2006). Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**, 239-242.
- Van den Brink, G.R., Tytgat, K.M., Van der Hulst, R.W., Van der Loos, C.M., Einerhand, A.W., Buller, H.A., and Dekker, J. (2000). *H. pylori* colonises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* **46**, 601-607.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., *et al.* (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**, 1166-1174.
- Vinion-Dubiel, A.D., McClain, M.S., Czajkowsky, D.M., Iwamoto, H., Ye, D., Cao, P., Schraw, W., Szabo, G., Blanke, S.R., Shao, Z., *et al.* (1999). A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol Chem* **274**, 37736-37742.
- Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., Jass, J., Richter-Dahlfors, A., Mizunoe, Y., and Uhlin, B.E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**, 25-35.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., and Sachs, G. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**, 482-485.
- Wessler, S., and Backert, S. (2008). Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* **16**, 397-405.
- Wotherspoon, A.C. (1998). Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Med* **49**, 289-299.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**, 339-345.

Yahiro, K., Niidome, T., Kimura, M., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Imagawa, K., Wada, A., Moss, J., and Hirayama, T. (1999). Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem* 274, 36693-36699.

Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J., *et al.* (2003). Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem* 278, 19183-19189.

Yamaoka, Y. (2000). A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7533-7538.

Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckstuhl, C., Zarfel, G.E., and Koraimann, G. (2005). Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151, 3455-3467.

Zheng, P.Y., and Jones, N.L. (2003). *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol* 5, 25-40.

DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl möchte ich mich nicht nur, für die unkomplizierte Übernahme der Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für WZW der Technischen Universität München herzlich bedanken, sondern auch für seine stete Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Angelegenheiten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer Haas für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Seine stete Diskussionsbereitschaft für alle wissenschaftlichen Fragestellungen und die wertvollen Ratschläge waren maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt. Insbesondere möchte ich mich für die Freiheit zum selbstständigen Arbeiten und seine optimistische Unterstützung in allen Situationen während dieser Zeit bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. Wolfgang Fischer für sein Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit und die kritische Durchsicht dieses Manuskripts bedanken. Durch sein stets offenes Ohr für wissenschaftliche Probleme, seine Klarsicht und Ratschläge war er mir immer eine große Hilfe bei der Fortführung der Projekte. Für seine Bereitschaft zu wissenschaftlichen und privaten Diskussionen möchte ich mich ganz herzlich bedanken!

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Luisa dafür, dass sie mich unglaublich engagiert in das Laborleben der Haasen eingearbeitet hat. Ihre herzliche, aber auch fordernde Art war immer motivierend und die vielen interessanten wissenschaftlichen und privaten Diskussionen haben mir immer neue Sichtweisen eröffnet.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Evelyn Weiss für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und Geduld im Laboralltag bedanken. Ohne sie würde die Laborarbeit nicht so angenehm sein. Danke auch für den ein oder anderen Plausch über die Höhen und Tiefen einer Doktorarbeit.

Ein großer Dank geht an Friederike, der guten Seele der AG Haas, für die reibungslose Organisation und die tolle „Betreuung“ der Zellen. Besonders am Ende dieser Arbeit hat sie mir mit ihrer offenen und optimistischen Art viele Gründe zum Lachen gegeben. Wie schön, dass wir uns noch „richtig“ kennengelernt haben.

Für das wunderbare Arbeitsklima möchte ich mich bei allen ehemaligen und neuen Mitgliedern der AG Haas bedanken. Die immerwährende Unterstützung, die hilfreichen Diskussionen und die vielen fröhlichen Momente im Labor und außerhalb des Instituts werden mir immer im Gedächtnis bleiben.

Ohne Lachen geht's nicht! Meiner lieben, ehemaligen Kollegin und Freundin Steffi möchte ich für die tolle gemeinsame Zeit am Institut danken. Vielen Dank für die allmorgendlichen Geschichten, die vielen weisen Sprüche und die Unterstützung in allen Lebens- und Gemütslagen.

Für die vielen schönen Stunden am Mittagstisch möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Freundinnen Steffi, Julia, Iris, Andrea, Beate, Tina und Gigi ganz herzlich bedanken. Die Ablenkungen, Ermutigungen und Ratschläge in wissenschaftlichen und privaten Angelegenheiten waren mir immer sehr wichtig.

An meine Mädels geht ein ganz großes Dankeschön für die vielen lustigen Geschichten außerhalb der Biologie und dafür, dass ihr immer für mich da seid! Ein besonderer Dank geht an Babsy für ihre Freundschaft, Unterstützung und ihr Vertrauen. Danke für die vielen Gespräche und wundervollen Abende!

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Vater und meinen Tata dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Meinen Großeltern aus Köln gilt ein besonderer Dank für Ihr ehrliches Interesse am Fortschreiten meiner Ausbildung und die vielen kleinen und großen Hilfen in allen Lebenslagen.

Meiner Schwester Barbara gilt ein ganz besonderer Dank. Ihre Ehrlichkeit und Kritik, aber auch ihre Herzlichkeit und unser gemeinsamer Humor waren mir immer sehr wichtig. Vielen Dank für die vielen wundervollen Momente!

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Mutter Ursula danken. Sie hat mich auf meinem Weg in jeder Hinsicht liebevoll unterstützt und immer an mich geglaubt.

Meinem Freund Alex möchte ich ganz besonders danken. Seine beständige Unterstützung und Geduld, aber auch die vielen liebevollen Aufmunterungen waren mir eine sehr große Hilfe. Vielen Dank, dass Du mit mir durchgehalten hast!

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben:

Name: Claudia Ertl
Geburtsdatum: 01.03.1982 in München
Adresse: Geiseltasteigstraße 108, 81545 München
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Hochschullaufbahn:

März 2008 – Dezember 2011 **Dissertation** am Max von Pettenkofer Institut
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
Betreuer:
Prof. Dr. Wolfgang Liebl
Prof. Dr. Rainer Haas

Titel:
Interaktion des Cag-TypIV-Sekretionssystems von
Helicobacter pylori mit beta1 Integrin zur Untersuchung
des Translokationsmechanismus des Cytotoxin-
assoziierten Antigens (CagA)

Oktober 2002 – September 2007 **Studium Biologie**
Technische Universität München (TUM)

September 2007 **Diplom Biologie (DIPL.-BIOL. UNIV.)**
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Pharmakologie und Toxikologie, Botanik

Februar 2007 – September 2007

Diplomarbeit

An der Technischen Universität München (TUM)

Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie

Betreuer:

Prof. Dr. Franz Hofmann

PD Dr. Jörg Wegener

Titel: Analyse des NO/cGMP-Signalwegs anhand gentechnisch veränderter Mäuselinien

Schulausbildung:

Juli 2002

Abitur

Oktober 2000 – Juli 2002

Edith-Stein Gymnasium, München

Lehraktivitäten:

August 2009 – September 2009

4-wöchige Praktikumsbetreuung eines Biologiestudenten

März 2010 – Mai 2010

3-monatige Praktikumsbetreuung eines Biologiestudenten

Veröffentlichungen:

Artikel:

Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, **Ertl C**, Weiss E, Kapp U, Rohde M, Pirch T, Jung K, Retta SF, Terradot L, Fischer W, and Haas R (2009) *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGDindependent manner. *PLoS Pathog*, **5**, e1000684.

Ertl C, Lukowski R, Sigl K, Schlossmann J, Hofmann F, Wegener JW. (2011) Kinetics of relaxation by cGMP/cGKI signaling in fundus smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 16;670(1):266-71.

Vorträge:

Ertl C., Jimenez-Soto L.F., Haas R
Helicobacter pylori type IV secretion system exploits distinct domains of the human beta1 integrin for CagA translocation

63. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 25-28 September 2011, Essen, Deutschland

Ertl C., Jimenez-Soto L.F., Haas R.
Interactions between *Helicobacter pylori* type IV secretions system and the human beta1 integrin for effector protein translocation

61. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 20-23 September 2009, Göttingen, Deutschland

Posterpräsentationen:

Ertl C., Jimenez-Soto L.F., Haas R.
Interaction between *Helicobacter pylori* type IV secretion system and integrin beta1
Interact PhD Symposium (Ludwig Maximilians Universität München), 02. April 2009, München, Deutschland

Werkstudententätigkeit:

November 2003 – Februar 2008

maihiro GmbH; Tätigkeit im Vertrieb, Marketing und administrativen Bereich

Sprachen:

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (sehr gut in Wort und Schrift)
Französisch (Grundkenntnisse)

EDV-Kenntnisse:

MS-Office (Word, Excel, Power Point)
digitale Bildbearbeitung (Adobe Photoshop)
sicherer Umgang mit biologischen/biochemischen
Datenbanken und Softwareprogrammen (BLAST,
Graph Pad Prism, DNA Man, Vector NTI)

Interessen:

Familie und Freunde
Ehrenamtliche Tätigkeiten im Jugendrotkreuz
Wandern