

**UNTERSUCHUNGEN ZU CagA-INDUZIERTEN
SIGNALKASKADEN WÄHREND DER INFEKTION
MIT *HELICOBACTER PYLORI***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biochemikerin Sabine Brandt
geboren am 27.09.1979 in Bernburg

Gutachter: PD Dr. Steffen Backert
Prof. Dr. med. Manfred Kist

eingereicht am: 28.08.2007

verteidigt am: 27.02.2008

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden
Titeln veröffentlicht bzw. sind eingereicht:**

Sabine Brandt, Terry Kwok, Roland Hartig, Wolfgang König, Steffen Backert (2005)
NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by *Helicobacter pylori*
CagA protein. PNAS (USA) 102, 9300-9305

Ina Tammer^{*}, **Sabine Brandt**^{*}, Roland Hartig, Wolfgang König, Steffen Backert (2007)
Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: A Novel Kinase for CagA and Crucial
Mediator of Host Cell Scattering. Gastroenterology 132, 1309-1319

* diese Autoren waren zu gleichen Teilen beteiligt

Sabine Brandt, Sasha Shafikhani, Priya Balachandran, Shouguang Jin, Roland Hartig,
Wolfgang König, Joanne Engel, Steffen Backert (2007)
Use of novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII
phosphorylation in *Helicobacter pylori*-induced host cell actin cytoskeletal
rearrangements. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 50, 190-205

Sabine Brandt, Brendan Kenny, Manfred Rohde, Wolfgang König,
Steffen Backert (2007)
Dual infection of mammalian cells provides novel insights into injected bacterial
effector protein function. (eingereicht)

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|-----------|
| I. | Abkürzungsverzeichnis | IV |
| II. | Abbildungsverzeichnis..... | VI |
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | <i>Helicobacter pylori</i> : Historie, Mikrobiologie und Epidemiologie..... | 1 |
| 1.2 | Pathogenese und Immunantwort der <i>H. pylori</i> -Infektion | 2 |
| 1.3 | Bakterielle Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren..... | 8 |
| 1.4 | Molekulare Mechanismen der CagA-induzierten Signaltransduktion zum Aktin-Zytoskelett von Wirtszellen..... | 12 |
| 1.5 | Signaltransduktionswege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B | 18 |
| 2 | Zielsetzung..... | 22 |
| 3 | Materialien und Methoden | 23 |
| 3.1 | Materialien..... | 23 |
| 3.1.1 | Chemikalien..... | 23 |
| 3.1.2 | Aktivatoren/ Inhibitoren | 23 |
| 3.1.3 | Antikörper | 23 |
| 3.1.4 | Enzyme, Proteine und Kinasen..... | 24 |
| 3.1.5 | Toxine..... | 25 |
| 3.2 | Bakterienstämme | 25 |
| 3.2.1 | <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme | 25 |
| 3.2.2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stämme..... | 26 |
| 3.3 | Zellkulturen | 27 |
| 3.4 | Oligonukleotide und Vektoren | 28 |
| 3.4.1 | siRNA..... | 28 |
| 3.4.2 | Transfektionskonstrukte | 28 |
| 3.5 | Nährmedien und Platten | 30 |
| 3.6 | Computergestützte Analysen..... | 31 |
| 3.6.1 | Statistik..... | 31 |
| 3.6.2 | Datenbanken..... | 31 |
| 3.7 | Kultivierung von eukaryontischen Zellen | 31 |
| 3.8 | Kultivierung von Bakterien | 33 |
| 3.8.1 | Kultivierung von <i>Helicobacter pylori</i> | 33 |
| 3.9 | Infektionsexperimente | 34 |
| 3.9.1 | Infektionen mit <i>Helicobacter pylori</i> | 34 |
| 3.9.2 | Ko-Infektionsexperimente..... | 34 |
| 3.9.3 | Infektion im Transwell-System | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.9.4 | Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten (<i>cfu</i>)..... | 35 |
| 3.10 | Molekularbiologische Methoden..... | 35 |
| 3.10.1 | Transformation..... | 35 |
| 3.10.2 | Isolierung von Plasmid-DNA..... | 36 |
| 3.10.3 | Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA..... | 36 |
| 3.11 | Transiente und stabile Transfektion von DNA und siRNA..... | 36 |
| 3.11.1 | Transiente Transfektion von Plasmid-DNA..... | 37 |
| 3.11.2 | Transiente Transfektion von siRNA..... | 37 |
| 3.11.3 | Stabile Transfektion von shRNA..... | 38 |
| 3.12 | Biochemische Methoden..... | 38 |
| 3.12.1 | <i>in vitro</i> -Kinase-Reaktionen..... | 38 |
| 3.12.2 | Immunopräzipitation..... | 39 |
| 3.12.3 | Zelluläre Fraktionierung..... | 40 |
| 3.12.4 | Proteinbestimmung..... | 41 |
| 3.12.5 | SDS-PAGE, Coomassie-Färbung undWesternblot..... | 41 |
| 3.12.6 | ELISA..... | 44 |
| 3.13 | Mikroskopische Methoden..... | 46 |
| 3.13.1 | Phasenkontrastmikroskopie..... | 46 |
| 3.13.2 | Immunfluoreszenzfärbung von Zellen..... | 46 |
| 3.13.3 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 47 |
| 4 | Ergebnisse..... | 48 |
| 4.1 | CagA-abhängige Interleukin-8-Sekretion..... | 49 |
| 4.1.1 | Molekularer Signalweg der CagA-abhängigen IL-8-Induktion..... | 54 |
| 4.2 | Phosphorylierung von CagA..... | 58 |
| 4.2.1 | Einfluss der Abl-Kinase auf den CagA-induzierten Phänotyp..... | 58 |
| 4.2.2 | Die Expression von aktivem Abl und CagA sind ausreichend für die Ausbildung des Elongationsphänotyps..... | 67 |
| 4.2.3 | Bedeutung der Crk-Adapterproteine auf den CagA-induzierten Phänotyp..... | 69 |
| 4.3 | Molekulare Mechanismen der CagA-induzierten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts..... | 74 |
| 4.3.1 | Ko-Infektion von AGS-Zellen mit <i>H. pylori</i> und anderen Aktin-Zytoskelett manipulierenden Pathogenen..... | 74 |
| 4.3.2 | Identifizierung von Rho-GTPasen als zelluläre Zielstrukturen von <i>H. pylori</i> | 78 |
| 4.3.3 | Einfluss gereinigter Toxine auf den <i>H. pylori</i> -induzierten Elongationsphänotyp..... | 78 |
| 4.3.4 | Einfluss von ExoS und ExoT auf den <i>H. pylori</i> -induzierten Elongationsphänotyp..... | 80 |
| 4.3.5 | Aktivität von ExoT auf das CrkII-Adapterprotein..... | 85 |
| 4.3.6 | Effekte von ExoS/T auf Rac1, RhoA, Cdc42 und H-Ras..... | 86 |
| 5 | Diskussion..... | 90 |
| 5.1 | CagA-abhängige Aktivierung von NF-κB..... | 90 |
| 5.2 | CagA-abhängige Modulation des Aktin-Zytoskeletts..... | 98 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.2.1 | Die Rolle von c-Abl an der CagA-Phosphorylierung | 99 |
| 5.2.2 | Die Rolle der CrkII-Adapterproteine bei den <i>H. pylori</i> -induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen..... | 103 |
| 5.2.3 | Rolle der Rho-GTPasen RhoA, Rac1, Cdc42 und H-Ras..... | 105 |
| 6 | Zusammenfassung | 110 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 111 |
| 8 | Anhang | 133 |
| | Danksagung | 136 |
| | Lebenslauf..... | 137 |
| | Erklärung | 138 |

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------|---|
| A | Ampere (Stromstärke) |
| Abb. | Abbildung |
| ADPRT | ADP-Ribosyltransferase |
| Amp | Ampicillin |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| CagA | <i>Cytotoxin-associated gene A</i> |
| Cam | Chloramphenicol |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| Cdc42 | <i>cell division cycle 42</i> |
| cfu | Kolonie bildende Einheit (<i>colony forming unit</i>) |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| d | Durchmesser |
| d.h. | das heißt |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DN | dominant-negativ |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | Dulbecco's <i>Phosphate buffered saline</i> |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | <i>enhanced chemical luminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| et al. | <i>et aliter</i> |
| ExoS/T | ExotoxinS/ ExotoxinT |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GAP | Guanosintriphosphatase -aktivierendes Protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GDI | Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GEF | Guaninnukleotid-Austauschfaktor |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GST | Gluthathion-S-Transferase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GTPase | Guanosintriphosphatase |
| h | Stunde |
| <i>H. p.</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| <i>H. pylori</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| HA | Hämagglutinin |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunopräzipitation |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| Km | Kanamycin |
| LB | <i>Luria broth</i> |
| M | Molar |

| | |
|--------------|--|
| MALT | <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> |
| MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| Mbp | Megabasenpaar |
| min | Minute |
| MOI | <i>multiplicity of infection</i> |
| Mr | Molekulargewicht |
| NF-κB | <i>nuclear factor of κB</i> |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| NSAR | nichtsteroidale Antirheumatika |
| OD | optische Dichte |
| orf | <i>open reading frame</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAI | Pathogenitätsinsel |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PPI | Protonenpumpen-Inhibitoren |
| PT | Phänotyp |
| PVDF-Membran | Polyvinylidenfluoridmembran |
| PY | Phosphotyrosin |
| Rac1 | <i>Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate 1</i> |
| Ras | <i>rat-sarcoma</i> |
| RFP | rot fluoreszierendes Protein |
| Rho | <i>Ras-homology</i> |
| RISC-Komplex | <i>RNA-inducing silencing complex</i> |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SH2, SH3 | <i>src homology</i> |
| shRNA | <i>small-hairpin</i> Ribonukleinsäure |
| siRNA | <i>small-interfering</i> Ribonukleinsäure |
| T3SS | Typ-3-Sekretionssystem |
| T4SS | Typ-4-Sekretionssystem |
| TBST | Tris <i>buffered saline</i> mit Tween20 |
| TEMED | N,N,N,N-Tetramethyldiamin |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TLR | <i>Toll-like-receptor</i> |
| TRIS | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan |
| TRITC | Tetramethylrhodamine-isothiocyanat |
| TritonX100 | Polyethylenglycol-[4-(2',2',4',4'-tetramethylbutyl)phenyl]-ether |
| Tween20 | Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat |
| U | Unit/ml |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |

Aminosäuren

| | | | | | |
|----------------|-----|---|------------|-----|---|
| Alanin | Ala | A | Methionin | Met | M |
| Cystein | Cys | C | Asparagin | Asn | N |
| Asparaginsäure | Asp | D | Prolin | Pro | P |
| Glutaminsäure | Glu | E | Glutamin | Gln | Q |
| Phenylalanin | Phe | F | Argenin | Arg | R |
| Glycin | Gly | G | Serin | Ser | S |
| Histidin | His | H | Threonin | Thr | T |
| Isoleucin | Ile | I | Valin | Val | V |
| Lysin | Lys | K | Tryptophan | Trp | W |
| Leucin | Leu | L | Tyrosin | Tyr | Y |

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---|----|
| Abb. 1.1: | Schematische Darstellung der Faktoren, die zur Bildung der <i>H. pylori</i> -assoziierten Gastritis und deren Folgeerkrankungen führen. | 4 |
| Abb. 1.2: | Schematisches Modell zur Interaktion von <i>H. pylori</i> mit Magenepithelzellen und Zellen des Immunsystems. | 6 |
| Abb. 1.3: | Schematische Darstellung von T3SSs und T4SSs. | 11 |
| Abb. 1.4: | Schematische Darstellung der Diversität in den Tyrosinphosphorylierungsstellen von CagA. | 13 |
| Abb. 1.5: | Schematisches Modell der CagA-vermittelten zellulären Aktivitäten. | 14 |
| Abb. 1.6: | Schematische Darstellung der Regulation der Rho-GTPasen. | 16 |
| Abb. 1.7: | Schematische Darstellung der durch Rho, Rac und Cdc42 induzierten Aktin-abhängigen zellulären Strukturen (rot). | 17 |
| Abb. 1.8: | Schematische Darstellung der Angriffsorte verschiedener bakterieller Toxine oder Effektorproteine in Rho-GTPasen. | 18 |
| Abb. 1.9: | Schematische Darstellung der NF- κ B-Signalwege. | 19 |
| Abb. 3.1: | Schematische Darstellung der siRNA-vermittelten Genabschaltung. | 37 |
| Abb. 4.1: | Phänotypische Analyse von AGS-Zellen nach Infektion mit verschiedenen <i>H. pylori</i> WT- Stämmen. | 48 |
| Abb. 4.2: | Identifizierung von <i>cagPAI</i> -positiven <i>H. pylori</i> -Stämmen, die eine hohe und niedrige IL-8-Sekretion induzieren. | 50 |
| Abb. 4.3: | CagA ist an der IL-8-Induktion von Gruppe-A-Stämmen beteiligt. | 51 |
| Abb. 4.4: | Die CagA-vermittelte IL-8-Induktion ist zeitabhängig und wird im Laufe der Infektion potenziert. | 52 |
| Abb. 4.5: | Die <i>cagPAI</i> -vermittelte IL-8-Sekretion durch den Gruppe-B-Stamm P310 ist zeitabhängig und potenziert sich im Laufe der Infektion. | 53 |
| Abb. 4.6: | Induktion der IL-8-Sekretion durch transient exprimiertes CagA. | 55 |
| Abb. 4.7: | Transfektion von CagA induziert die Aktivierung von NF- κ B und dem IL-8-Promotor. | 56 |
| Abb. 4.8: | Die CagA-induzierte IL-8-Sekretion ist von Ras, Raf und Mek, aber nicht von Shp-2 oder c-Met, abhängig. | 57 |
| Abb. 4.9: | Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Arg und Abl. | 59 |
| Abb. 4.10: | Inhibitoren der Src- und Abl-Kinase, aber nicht des EGF- und PDGF-Rezeptors, blockieren den <i>H. pylori</i> -induzierten Elongationsphänotyp. | 60 |
| Abb. 4.11: | Die Inhibierung der Abl-Kinase blockiert die CagA-Phosphorylierung. | 61 |
| Abb. 4.12: | Der <i>H. pylori</i> -induzierte Elongationsphänotyp und die CagA-Phosphorylierung ist von Abl- und Arg-Kinasen abhängig. | 62 |
| Abb. 4.13: | Die Phosphorylierung von CagA in Lysaten von SYF-Zellen ist durch Abl-Inhibitoren blockiert. | 63 |
| Abb. 4.14: | Rekombinante Src- und Abl-Kinasen phosphorylieren CagA <i>in vitro</i> | 64 |
| Abb. 4.15: | Abl wird im Laufe der <i>H. pylori</i> -Infektion kontinuierlich aktiviert. | 65 |
| Abb. 4.16: | Zusammenhang zwischen Src-Inaktivierung, Abl-Aktivierung, CagA-Phosphorylierung und Induktion des Elongationsphänotyps. | 66 |
| Abb. 4.17: | Src und Abl phosphorylieren CagA zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion und die CagA-Phosphorylierungs- oder -Dephosphorylierungsreaktionen unterliegen einer hohen Dynamik. | 67 |
| Abb. 4.18: | Die transiente Expression von konstitutiv-aktiven c-Abl und CagA ^{WT} führt zu einer starken CagA-Phosphorylierung und zur Ausbildung des Elongationsphänotyps. | 68 |
| Abb. 4.19: | Schematische Darstellung der Crk-Adapterproteine. | 69 |
| Abb. 4.20: | Durch <i>H. pylori</i> -aktiviertes c-Abl stimuliert die Phosphorylierung von CrkII <i>in vitro</i> | 70 |
| Abb. 4.21: | CagA ^{PY} bildet einen Komplex mit aktiviertem Abl und CrkII <i>in vivo</i> | 71 |
| Abb. 4.22: | CrkII ist essentiell für die Ausbildung des <i>H. pylori</i> -induzierten Elongationsphänotyps. | 72 |
| Abb. 4.23: | Einfluss von CrkI, CrkII und Abl auf den <i>H. pylori</i> -induzierten Elongationsphänotyp | 73 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Abb. 4.24: | Einfluss der Ko-Infektion auf den durch <i>H. pylori</i>-induzierten Elongationsphänotyp. | 75 |
| Abb. 4.25: | Einfluss der Ko-Infektionen auf die CagA-Phosphorylierung und -Translokation. | 77 |
| Abb. 4.26: | Die Inhibierung von Rac, aber nicht von RhoA, blockiert den <i>H. pylori</i>-induzierten Elongationsphänotyp. | 79 |
| Abb. 4.27: | Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von ExoS und ExoT. | 80 |
| Abb. 4.28: | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> blockiert den <i>H. pylori</i>-induzierten Elongationsphänotyp dosis- und kontaktabhängig. | 81 |
| Abb. 4.29: | ExoS und ExoT blockieren den <i>H. pylori</i>-induzierten Phänotyp. | 82 |
| Abb. 4.30: | Einfluss der Rho-GAP- und ADPRT-Domänen von ExoS und ExoT auf den <i>H. pylori</i>-induzierten Elongationsphänotyp. | 83 |
| Abb. 4.31: | Die Rho-GAP- und die ADPRT-Domäne von ExoT inhibieren den <i>H. pylori</i>-induzierten Phänotyp. | 84 |
| Abb. 4.32: | Die ADPRT-Aktivität von ExoT inhibiert die <i>H. pylori</i>-induzierte CrkII-Phosphorylierung, aber nicht die CagA Interaktion. | 85 |
| Abb. 4.33: | Einfluss von ExoS und ExoT auf die Lokalisation von Rac1, H-Ras, RhoA und Cdc42 während der <i>H. pylori</i>-Infektion. | 87 |
| Abb. 4.34: | DN Rac1 und H-Ras blockieren den <i>H. pylori</i>-induzierten Elongationsphänotyp. | 88 |
| Abb. 4.35: | Rac1 und H-Ras sind für die Ausbildung des <i>H. pylori</i>-induzierten Elongationsphänotyps notwendig. | 89 |
| Abb. 5.1: | Schematische Darstellung von Signalwegen der <i>H. pylori</i>-induzierten NF-κB-Aktivierung. | 97 |
| Abb. 5.2: | Schematisches Modell der CagA-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen. | 109 |

1 EINLEITUNG

1.1 *HELICOBACTER PYLORI*: HISTORIE, MIKROBIOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE

Der Magen des Menschen galt lange Zeit aufgrund seines stark sauren Milieus als ein steriles Organ und schien daher als Habitat für Mikroorganismen nicht von Bedeutung zu sein. Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieb der Pathologe W. Krienitz in Magenkarzinompräparaten spiralförmige Bakterien in der Magenschleimhaut (Krienitz, 1906; Rickes *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen konnten auch in anderen Laboratorien bestätigt, aber nie bewiesen werden. Diese Mikroben konnten im Labor nicht kultiviert werden und somit gerieten diese Arbeiten zunächst in Vergessenheit. Erst 1982 gelang Barry Marshall und Robin Warren neben dem histopathologischen Nachweis von spiralförmigen Bakterien in der Magenschleimhaut auch der Nachweis heranwachsender Kolonien (Marshall und Warren, 1984; Warren, 1984). Den endgültigen Beweis, dass diese Bakterien für die Entstehung der Gastritis verantwortlich sind, konnte B. Marshall anhand eines spektakulären Selbstversuches erbringen. Dabei trank er eine Suspension dieser Bakterien und erkrankte innerhalb von 24 h an einer akuten Gastritis. Die Bakterien wurden nach ihrer Form *Helicobacter* (griech. *helico* = spiralförmig, *bacter* = Bakterium) und nach ihrem Fundort *pylori* (griech. *pylorus* = Magenpförtner) bezeichnet. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) wurde zunächst nur am unteren Ende des Magens am so genannten Magenpförtner gefunden. Inzwischen weiß man allerdings, dass *H. pylori* überall im Magen vorhanden sein kann. Im Jahre 2005 wurden B. Marshall und R. Warren für diese Entdeckung und deren Bedeutung für die moderne Medizin mit dem Nobelpreis für Physiologie ausgezeichnet.

Helicobacter pylori ist ein gebogenes, gramnegatives Stäbchen mit einer Länge von 2,5 bis 5 µm und einem Durchmesser von 0,5 bis 1 µm mit einer lophotrichen Begeißelung (2 - 7 Geißeln an einem Zellpol). Aufgrund der Begeißelung ist *H. pylori* gut beweglich und in der Lage die visköse Magenschleimhaut zu durchdringen (O'Toole *et al.*, 2000). Nach der biochemischen Analyse wurde *H. pylori* als Oxidase-, Katalase- und Urease-positiv beschrieben. Diese biochemischen Eigenschaften werden in der Medizin zum Nachweis des Erregers herangezogen. *Helicobacter pylori* benötigt eine mikroaerophile Umgebung zum Wachsen, wobei ein optimales Wachstum bei 37°C, 2 bis 5 % O₂, 5 bis 10 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit erfolgt. Das einzige natürliche Habitat von *H. pylori* ist das saure gastrische Gewebe des Menschen. *Helicobacter pylori* gehört zu den neutralophilen Bakterien. Er kann für kurze Zeit bei einem pH-Wert < 4 überleben,

das Wachstum erfolgt allerdings nur in einem engen pH-Wert Bereich von 5,5 bis 8,0 mit einem Optimum im neutralen pH-Wert (Scott *et al.*, 2002; Stingl *et al.*, 2002). Die Genome von drei *H. pylori*-Stämmen, J99, 26695 und HPAG1, sind bis jetzt vollständig sequenziert worden (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006). Das Genom von *H. pylori* ist im Vergleich zu anderen pathogenen Bakterien relativ klein. Die durchschnittliche Genomgröße der bisher sequenzierten Stämme beträgt ca. 1,7 Mbp und der G+C Gehalt 35 bis 45 %. Der *H. pylori*-Stamm 26695 besitzt 1587 Gene, der Stamm HPAG1 1536 Gene, wohingegen der Stamm J99 nur aus 1491 Genen aufgebaut ist (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006). Viele Stämme tragen ein oder mehrere kryptische Plasmide, bisher wurden aber keine Antibiotikaresistenzgene oder Virulenzgene auf ihnen gefunden (Heuermann und Haas, 1995). Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten ca. 1800 *H. pylori*-Proteinspezies identifiziert werden, aber die Funktion ist nur für wenige dieser Proteine bekannt (Jungblut *et al.*, 2000; Bumann *et al.*, 2001; Backert *et al.*, 2005). Unter den bisher bekannten Proteinen sind diejenigen, die während der Wechselwirkung mit humanen Zellen eine wichtige Rolle spielen, die sogenannten Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren (Blaser und Berg, 2001; Montecucco und Rappuoli, 2001; Peek und Blaser, 2002; Wolle *et al.*, 2002; Suerbaum und Josenhans, 2007).

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass *H. pylori* nach dem Karieserreger *Streptococcus mutans* der zweithäufigste Infektionserreger weltweit ist (Megraud, 1989). Etwa 50 % der Weltbevölkerung sind chronisch mit *H. pylori* infiziert, wobei die Prävalenz stark mit dem sozioökonomischen Status korreliert (Malaty *et al.*, 1992; Malaty und Graham, 1994; Suerbaum und Michetti, 2002). In den Entwicklungsländern sind 70 – 90 % und in den Industriestaaten 25 – 50 % der Bevölkerung mit dem Keim infiziert. Daher wird vermutet, dass mangelnde Hygienezustände einen großen Risikofaktor für eine Infektion darstellen (Megraud, 1993). Eine Infektion mit *H. pylori* wird meistens im Kindesalter auf oral-oralem oder fäkal-oralem Wege erworben und kann, wenn sie unbehandelt bleibt, ein Leben lang persistieren (Megraud, 1995; Parsonnet, 1995; Everhart, 2000; Mitchell und Megraud, 2002). Das Infektionsalter in Entwicklungsländern ist deutlich niedriger als in Industriestaaten.

1.2 PATHOGENESE UND IMMUNANTWORT DER *H. PYLORI*-INFEKTION

Helicobacter pylori infiziert den Raum zwischen Mukus und Magenepithel und ist das einzige bis jetzt bekannte Bakterium, das den ansonsten sterilen Magen dauerhaft besiedeln kann (Hazell *et al.*, 1991; Schreiber *et al.*, 2005). Für diese Besiedlung ist die Urease, die Harnstoff ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) in Ammoniak (NH_3) und Kohlendioxid (CO_2) spaltet

und so die nähere Umgebung neutralisiert, essentiell (Mobley, 2001). Eine weitere wichtige Rolle bei der Besiedlung spielt die Beweglichkeit. Diese ermöglicht es *H. pylori* den Mukus zu durchdringen und mit Hilfe von Adhäsinen (BabA, SabA) an die Epithelzellen zu binden (Josenhans und Suerbaum, 2002; Ottemann und Lowenthal, 2002; Suerbaum und Michetti, 2002). Die Kolonisierung des menschlichen Magens kann über einen sehr langen Zeitraum erfolgen und führt in der Regel zu einer chronischen Entzündungsreaktion, die sich unter Umständen in der Ausbildung einer häufig asymptomatisch verlaufenden chronischen Gastritis äußert. Bei 10 bis 15 % der chronisch infizierten Personen führt die *H. pylori*-Infektion zur Ausbildung von Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüren, die sich unter Umständen zu malignen Magentumoren, sowie dem seltenen MALT-Lymphom, entwickeln können (Parsonnet *et al.*, 1991; Wotherspoon *et al.*, 1993; Nomura *et al.*, 1994; Telford *et al.*, 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass das Auftreten von MALT-Lymphomen eng mit dem *H. pylori*-Status korreliert. Etwa 72 – 98 % der MALT-Lymphom-positiven Patienten waren mit *H. pylori* infiziert (Parsonnet *et al.*, 1994; Wotherspoon, 1998). Für die Ausbildung der nachfolgenden Erkrankungen ist meistens die Lokalisierung der Gastritis entscheidend. So führt eine im Antrum angesiedelte Gastritis zu einer Säuresekretion im Magen und Zwölffingerdarm. Im Gegensatz dazu führt eine Gastritis des Korpus oder eine multifokale Atrophie des Magens zu Magengeschwüren bzw. Adenokarzinomen. Diese entwickeln sich aus einer atrophischen Gastritis, bei der das zerstörte Drüsengewebe durch Dick- oder Dünndarmgewebe ersetzt wird (Craanen *et al.*, 1992; Malfertheiner, 1996). Das Magenkrebsrisiko erhöht sich in Gegenwart von *H. pylori* um den Faktor 6 (Krejs, 2000). Aus diesem Grund hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1994 *H. pylori* in die oberste Krebsrisikoklasse eingestuft (Karzinogen der Klasse I). Die *H. pylori*-Infektion hat aber auch eine protektive Wirkung auf die Ausbildung der gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD), bei der ein Rückfluss der Magensäure in die Speiseröhre erfolgt, und reduziert das Risiko der Folgeerkrankungen wie die Bildung des Barrett-Ösophagus bzw. des Ösophaguskarzinoms (Chow *et al.*, 1998; Vicari *et al.*, 1998; Blaser, 1999). Es konnte auch beobachtet werden, dass mit *H. pylori* infizierte Kinder weniger an Durchfallerkrankungen leiden (Rothenbacher *et al.*, 2000). Diese unterschiedlichen klinischen Manifestationen unterstreichen die enorme Wichtigkeit des Verständnisses der Pathogen-Wirt-Interaktionen. Dabei scheint sowohl das Zusammenspiel von genetischen Faktoren des Bakteriums als auch der Wirtsfaktoren von Bedeutung zu sein.

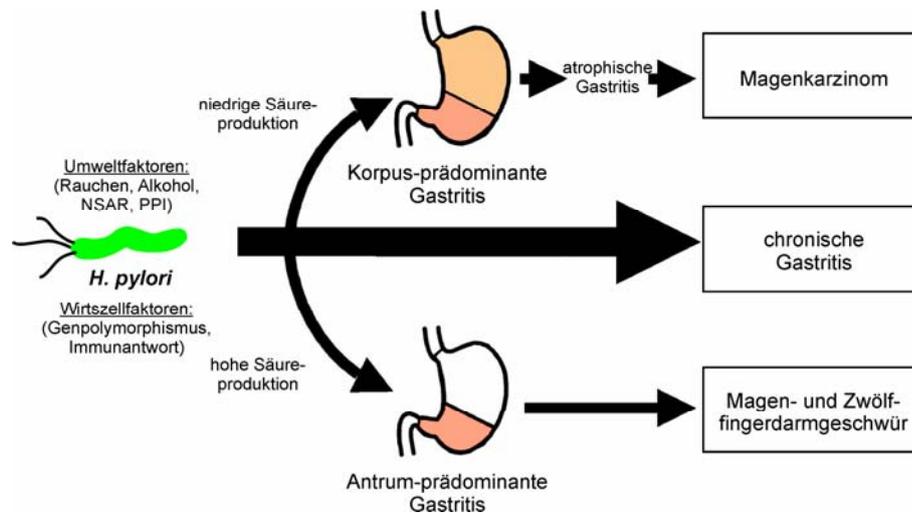


Abb. 1.1: **Schematische Darstellung der Faktoren, die zur Bildung der *H. pylori*-assoziierten Gastritis und deren Folgeerkrankungen führen.** Die Infektion mit *H. pylori* führt in der Regel zur Ausbildung einer chronischen Gastritis. Die Säureproduktion und die Lokalisierung der Gastritis sind für die nachfolgenden Erkrankungen entscheidend. Eine niedrige Säureproduktion in Folge der *H. pylori*-Infektion führt zu einer Korpus-prädominanten Gastritis, die zu einer atrophischen Gastritis führt und die Entstehung eines Magenkarzinoms zur Folge haben kann. Ist die Säureproduktion hoch, kommt es zu einer Antrum-prädominanten Gastritis und zur Bildung von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren (in Anlehnung an Kusters *et al.*, 2006).

Helicobacter pylori hat während der langen Ko-Existenz mit dem Menschen zahlreiche Strategien entwickelt, um sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem zu umgehen (Baldari *et al.*, 2005). Nur so ist *H. pylori* in der Lage, den menschlichen Magen über einen sehr langen Zeitraum zu kolonisieren, eine chronische Infektion auszulösen und ein Leben lang zu persistieren (Abb. 1.2). Ein weiterer wichtiger Faktor für die dauerhafte Kolonisierung ist die Entwicklung von Resistenzmechanismen. Eine zunehmende Zahl der aus der Magenschleimhaut isolierter *H. pylori*-Stämme besitzt Antibiotikaresistenzen, vorwiegend gegen Metronidazol oder Clarithromycin, aber auch gegen Amoxicillin oder Tetracyclin (Glupczynski *et al.*, 2001; Moder *et al.*, 2007). Diese Resistenzmechanismen ermöglichen es *H. pylori* trotz Therapie weiter den menschlichen Magen zu kolonisieren.

Nach erfolgreicher Kolonisierung der Magenschleimhaut und Bindung an die Epithelzellen, kommt es zur Ausschüttung von Toxinen und Injektion von Effektorproteinen in die Zellen. Die adhärennten Bakterien induzieren dabei die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (Naumann *et al.*, 1999). NF- κ B reguliert die Transkription vieler, insbesondere für die Entzündung und Immunantwort wichtiger Gene, hat aber auch eine anti-apoptotische Wirkung (Backert und König, 2005). Das Magenepithel infizierter Personen ist durch eine vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 und TNF- α , die als Signalproteine an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, charakterisiert

(Barnes und Karin, 1997). Es kommt zu einer Infiltration der Magenmukosa mit Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Des Weiteren werden verschiedene Toll-ähnliche (*toll-like*; TLR) Rezeptoren stimuliert und die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX2) verstärkt (Chang *et al.*, 2004). Der hohe Anteil an stark methylierter DNA erschwert die Erkennung durch den TLR-9 (Blaser und Atherton, 2004). Auch das Flagellin von *H. pylori* wird vom humanen TLR-5 nicht erkannt (Lee *et al.*, 2003; Gewirtz *et al.*, 2004; Andersen-Nissen *et al.*, 2005) und das Lipopolysaccharid (LPS) ist im Vergleich zu dem anderer gramnegativer Bakterien kaum in der Lage das Immunsystem zu stimulieren (Muotiala *et al.*, 1992; Perez-Perez *et al.*, 1995; Bliss *et al.*, 1998; Mandell *et al.*, 2004). Somit hat *H. pylori* zahlreiche Mechanismen entwickelt, um der angeborenen Immunantwort zu entkommen.

Eine *H. pylori*-Infektion löst vorwiegend eine Th1 (CD4+) Antwort aus, die durch eine moderate Th2-Antwort kontrolliert wird (Wolle *et al.*, 2002). Durch die Aktivierung der CD4+-T-Zellen kommt es zur Produktion von IFN- γ und IL-2 und somit zur Unterstützung der zellvermittelten Immunität und Aktivierung von Makrophagen. Die Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation sowie die Antigenprozessierung in B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) durch den Virulenzfaktor VacA, schwächt die adaptive Immunantwort (Molinari *et al.*, 1998; Montecucco und Rappuoli, 2001; Gebert *et al.*, 2003; Baldari *et al.*, 2005; Gerhard *et al.*, 2005).

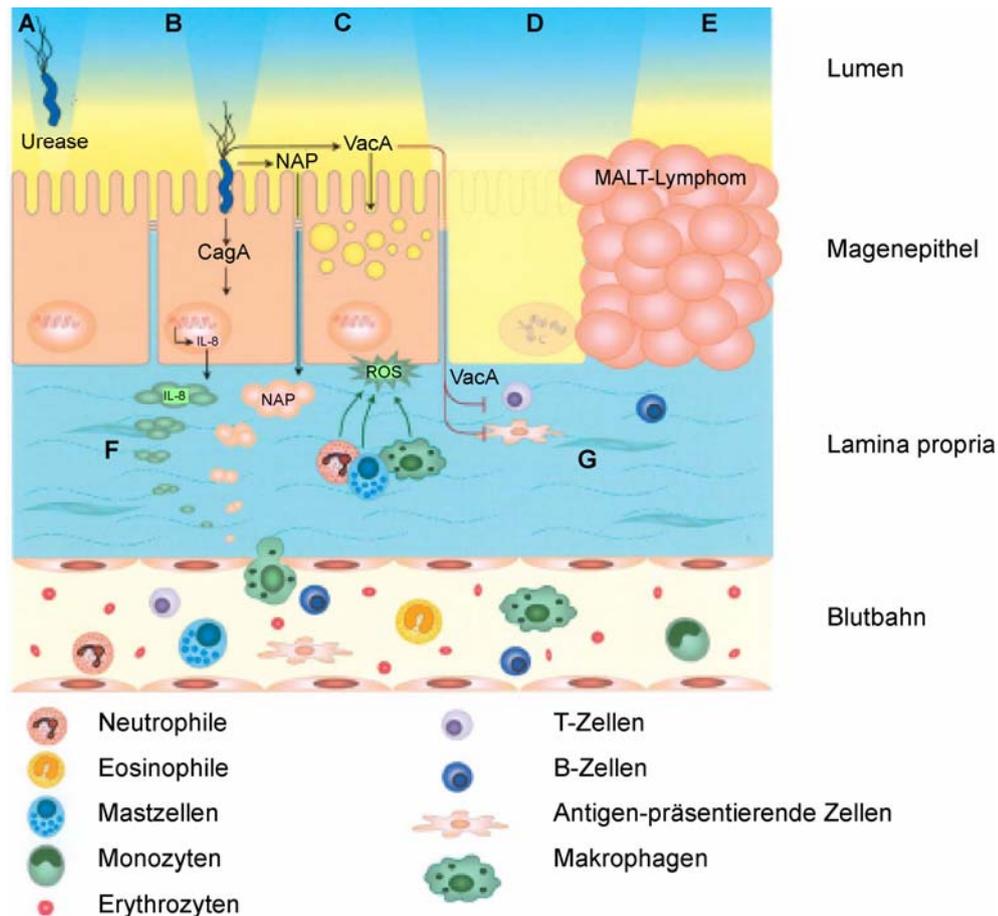


Abb. 1.2: **Schematisches Modell zur Interaktion von *H. pylori* mit Magenepithelzellen und Zellen des Immunsystems.** Schematische Darstellung des gastrischen Epithelgewebes, des angrenzenden Gewebes (*Lamina propria*) und der fortschreitenden Stadien der Entwicklung eines MALT-Lymphoms in Folge einer *H. pylori*-Infektion. (A) Die erfolgreiche Kolonisierung des Magenepithels durch *H. pylori* ist abhängig von den Flagellen und der Urease. (B) Injektion des Effektorproteins CagA in die Zielzellen und Induktion der IL-8-Expression. (C) VacA-abhängige Bildung von großen Vakuolen in der Zelle, die (D) zur Induktion der Apoptose und zur Schädigung des Magenepithels führen. (E) Entwicklung des MALT-Lymphoms. (F) Das sekretierte IL-8 und der *H. pylori*-Pathogenitätsfaktor NAP wirken chemotaktisch auf die Zellen des angeborenen Immunsystems. Es kommt zur Infiltration von Phagozyten und Mastzellen, die reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindungen (ROS) freisetzen und so das Magenepithel schädigen. (G) Die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und T-Zellen gelangen in die *Lamina propria*. Der Virulenzfaktor VacA inhibiert die Induktion des erworbenen Immunsystems durch die Blockierung der Antigenbildung und der T-Zell-Aktivierung. In einer späten Phase der Infektion erreichen B-Zellen das zerstörte Gewebe, wo es zur Folikelbildung von wuchernden Zellen kommt und zur Bildung des MALT-Lymphoms (in Anlehnung an Baldari *et al.*, 2005).

Der einzige bisher bekannte Wirt für *H. pylori* ist der Mensch. Es existieren dennoch eine Reihe von Tiermodellen, die zur Erforschung der Pathogenese der *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen beim Menschen herangezogen werden können. Ein besonders häufig verwendetes Tiermodell ist die Hausmaus (*Mus musculus*). Der Vorteil dieses Tiermodells ist die genaue immunologische und genetische Charakterisierung, die gute Verfügbarkeit, einfache Handhabung sowie der geringe

Platzbedarf. Ein weiteres gut etabliertes Tiermodell ist die mongolische Rennmaus (*Meriones unguiculatus*, Gerbil). Deren Gastritis-, Ulkus- und Karzinomentwicklung ähnelt, im Gegensatz zur Hausmaus, stark der Situation im menschlichen Magen (Wirth *et al.*, 1998; Kavermann *et al.*, 2003). Neben Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) oder Ferkeln (*Sus scrofa*) werden auch Primaten als Tiermodelle herangezogen, spielen aber eine eher untergeordnete Rolle (Akopyants *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 2000; Solnick *et al.*, 2003). Aufgrund der Ähnlichkeit des Primatenmagens in Anatomie und Physiologie mit dem menschlichen Magen ist es möglich, den Verlauf der Infektion durch endoskopische Kontrollen zu verfolgen. Diesen Vorteilen stehen aber hohe Anschaffungs- und Unterhaltskosten gegenüber. Auch konnte die chronisch-aktive Gastritis beim Erwachsenen bislang im Tiermodell nicht regelmäßig beobachtet werden (Lee, 1998). Der Einsatz humaner Zelllinien ist somit für das Verständnis der *H. pylori*-Infektion unabdingbar. Allerdings sind humane Magenepithelzelllinien bis jetzt noch nicht käuflich zu erwerben. Viele Untersuchungen erfolgen demzufolge an, aus humanen Magenkrebszellen generierten Zelllinien, wie AGS und MKN-45. Diese Zellen bilden, aufgrund fehlender Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungsproteine, im Vergleich zu Epithelzellen kein polarisiertes Epithel aus. Versuche an primären humanen Epithelzellen zeigten, dass die Adhärenz von *H. pylori* vor allem an den Zell-Zell-Kontakten erfolgt (Smoot *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1994; Heczko *et al.*, 2000). Die oft verwendeten MDCK-Zellen bilden zwar ein polares Epithel aus, wurden allerdings aus der Niere eines Hundes generiert. Primäre humane Magenepithelzellen werden häufig eingesetzt um die, durch eine *H. pylori*-Infektion verursachte Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrixproteine, zu untersuchen (Conlin *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2007). Die humanen Magenepithelzellen Caco-2 bilden auch ein polares Epithel aus und werden auch in *in vitro* Untersuchungen eingesetzt (Cottet *et al.*, 2002). Zwar spiegeln primäre humane Magenepithelzellen die *in vivo* Situation wieder, sind aber im Vergleich zu den generierten Zelllinien AGS und MKN-45 schwieriger in der Handhabung. Wichtige durch die Verwendung von AGS-Zellen gewonnene Erkenntnisse konnten durch die Anwendung primärer humaner Magenepithelzellen bereits bestätigt werden (Lai *et al.*, 2006). Demzufolge ist die Verwendung der aus Magenkrebszellen generierten Zelllinien für die Grundlagenforschung essentiell und auch legitim. Weiterführende Untersuchungen sollten dann allerdings an primären humanen Magenepithelzellen durchgeführt werden.

1.3 BAKTERIELLE VIRULENZ- UND PATHOGENITÄTSFAKTOREN

Der pathogene Effekt von *H. pylori* erfolgt ausschließlich über den Kontakt zur Magenschleimhaut und der Auseinandersetzung zwischen keimspezifischen Virulenzfaktoren und der Immunantwort des Wirtes (Wolle *et al.*, 2002). Dabei bildet sowohl die hohe Beweglichkeit und gute Adhärenzfähigkeit an die Epithelzellen des Magens, als auch die Enzymausstattung von *H. pylori* eine wichtige Grundlage für die erfolgreiche Kolonisierung. In Tabelle 1.1 sind wichtige bisher bekannte Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren und ihre jeweiligen Funktionen zusammenfassend dargestellt.

Tab. 1.1: Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*.

| | Gen | Funktion | Referenz |
|---------------------------------|---|---|--|
| Virulenzfaktoren | | | |
| Cag-Pathogenitätsinsel | <i>cagPAI</i> (ca. 32 Gene) | kodiert für Proteine des T4SS und für CagA | Censini <i>et al.</i> , 1996 |
| Zytotoxin-assoziiertes Gen A | <i>cagA</i> | Effektorprotein | Covacci <i>et al.</i> , 1993 |
| Vacuolisierendes Zytotoxin A | <i>vacA</i> | Bildung von Vakuolen, Induktion von Apoptose, Hemmung der T-Zellaktivierung | Cover und Blaser, 1992; Galmiche <i>et al.</i> , 2000; Gebert <i>et al.</i> , 2003 |
| Pathogenitätsfaktoren | | | |
| Adhäsine | <i>alpA, alpB,</i> <i>babA,</i> <i>sabA, sabB</i> | Anheftung an die Zielzellen | Kusters <i>et al.</i> , 2006 |
| Urease | <i>ureA, ureB</i> | Säureschutz, Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Phagozyten | Cussac <i>et al.</i> , 1992 |
| Flagellen | <i>flaA, flaB</i> | Beweglichkeit, essentiell für Kolonisierung | Suerbaum <i>et al.</i> , 1993 Schreiber <i>et al.</i> , 2004 |
| Katalase | <i>katA</i> | Schutz vor oxidativen Schäden | Odenbreit <i>et al.</i> , 1996 |

| | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|---|------------------------------|
| Arginase | <i>rocF</i> | Säureresistenz, Inhibierung der NO Produktion | Gobert <i>et al.</i> , 2001 |
| Proteine der äußeren Membran | <i>oipA</i> | Beteiligung an der IL-8 Induktion | Yamaoka <i>et al.</i> , 2000 |
| Neutrophil-aktivierendes Protein | <i>napA</i> | Aktivierung von PMN`s | Evans <i>et al.</i> , 1995 |
| IceA | <i>iceA1</i> , <i>iceA2</i> | Funktion und Proteinexpression bisher noch nicht unbekannt | Peek <i>et al.</i> , 1998 |

Helicobacter pylori ist ein neutralophiles Bakterium, kann aber im sauren Milieu des Magens überleben. Für diese Säureresistenz ist unter anderem, wie bereits beschrieben, die Urease verantwortlich (Burne und Chen, 2000; Montecucco und Rappuoli, 2001). Die Urease ist in allen *H. pylori*-Isolaten aktiv, jedoch können sich die Aktivitäten zwischen einzelnen *H. pylori*-Isolaten signifikant unterscheiden (van Vliet *et al.*, 2001; Contreras *et al.*, 2003). Experimente mit Urease-negativen *H. pylori*-Stämmen haben gezeigt, dass diese Stämme nicht in der Lage sind die Magenschleimhaut *in vivo* zu kolonisieren (Eaton *et al.*, 1991; Segal *et al.*, 1992). Eine zweite essentielle Funktion der Urease könnte die Bereitstellung von Ammoniak, der als Stickstoffquelle für die Aminosäureproduktion genutzt wird, sein (Williams *et al.*, 1996). Untersuchungen an gnotobiotischen Schweinen haben gezeigt, dass Urease-negative *H. pylori*-Stämme weder in sauren noch in neutralisierten Mägen kolonisieren können (Eaton und Krakowka, 1994). Weiterhin bewirkt die bakterielle Urease die zellschädigende Aktivierung des *oxidativen burst* in Phagozyten (Makristathis *et al.*, 1998). Am Säureschutz sind neben der Urease noch andere Enzyme beteiligt. Die Arginase RocF ist für die Säureresistenz sowie die Inhibierung der NO-Produktion verantwortlich, indem sie Arginin (C₆H₁₄N₄O₂) in Ornithin (C₅H₁₂N₂O₂) und Harnstoff (CH₄N₂O) umwandelt. Eine *rocF*-Mutante zeigt im Mausmodell eine geringere Kolonisierungsfähigkeit (McGee *et al.*, 1999). Ein weiterer essentieller Pathogenitätsfaktor für die Besiedlung des Magens durch *H. pylori* sind die Flagellen. Die Flagellen bestehen aus den Untereinheiten FlaA und FlaB, die das Geißelfilament bilden (Suerbaum *et al.*, 1993). Auch hier konnten *in vivo* Experimente mit unbeweglichen Δ *flaA/B*-Mutanten zeigen, dass die Proteine FlaA und FlaB für die Kolonisierung des Magens essentiell sind (Suerbaum, 1995; Eaton *et al.*, 1996). Die Mehrzahl der *H. pylori* Bakterien bewegt sich aufgrund der unipolaren und lophotrichen Begeißelung in der Magenschleimhaut. Ein kleiner Teil jedoch steht in sehr engem Kontakt zu den Epithelzellen (Wolle *et al.*, 2002). Für diesen Kontakt sind die Adhäsine AlpA/B, BabA und SabA/B verantwortlich. Das vermutlich am besten charakterisierte

Adhäsion ist BabA. Das Adhäsion BabA ist ein Protein der äußeren Membran und ermöglicht die Bindung von *H. pylori* an die Lewis-b (Le^b) Blutgruppenantigene der humanen Wirtszellen (Boren *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998). Mit Hilfe von Tierversuchen konnte auch für diesen Faktor gezeigt werden, dass die BabA-vermittelte Adhäsion für die Kolonisierung und Pathogenese von *H. pylori* wichtig ist (Guruge *et al.*, 1998; Rad *et al.*, 2002). Das Adhäsion SabA interagiert im Laufe der Infektion mit Sialyl Lewis^x- Molekülen auf der Oberfläche von entzündetem Magengewebe (Mahdavi *et al.*, 2002). AlpA und AlpB sind Lewis^b-unabhängige Adhäsine, die einen bisher noch unbekanntem Rezeptor binden (Odenbreit *et al.*, 1999). Das 34 kDa große Protein der äußeren Membran von *H. pylori* OipA kann möglicherweise auch als Adhäsion wirken (Dossumbekova *et al.*, 2006), wurde aber ursprünglich als Immunantwort-induzierendes Protein beschrieben (Yamaoka *et al.*, 2000). Untersuchungen an Gerbilen haben gezeigt, dass *oipA*-Mutanten in der Besiedlung des Magens beeinträchtigt sind (Akanuma *et al.*, 2002). Das *oipA*-Gen ist in allen *H. pylori*-Stämmen vorhanden, die Expression wird aber über eine variable Anzahl an CT-Dinukleotidwiederholungen moduliert (Yamaoka *et al.*, 2000). Der Virulenzfaktor NapA (HP-NAP *H. pylori* neutrophil activating protein) lockt Granulozyten und andere Entzündungszellen an, aktiviert die NADPH-Oxidase und führt zur Freisetzung aggressiver Sauerstoffradikale, die einen *oxidativen burst* bewirken (Satin *et al.*, 2000; Brisslert *et al.*, 2005). Zum Schutz vor schädlichen Sauerstoffradikalen ist *H. pylori* mit einer Superoxiddismutase ausgerüstet (Spiegelhalder *et al.*, 1993). *Helicobacter pylori* verfügt auch über eine Katalase, die das von Phagozyten freigesetzte Wasserstoffperoxid unschädlich macht (Ramarao *et al.*, 2000).

Das 128-140 kDa Protein CagA wird von Antikörpern im Blut infizierter Menschen erkannt und wurde daher als immundominantes Antigen bezeichnet (Covacci *et al.*, 1993). *Helicobacter pylori*-Stämme, die das immundominante Protein exprimieren, sezernieren fast immer auch aktives vakuolisierendes-Zytotoxin-A (VacA) und sind virulenter als diejenigen Stämme, die es nicht exprimieren. Demzufolge wurde *cagA* als Zytotoxin-assoziiertes GenA (*cytotoxin-associated geneA*, *cagA*) bezeichnet (Covacci *et al.*, 1993; Tummuru *et al.*, 1993). Die genetische Charakterisierung des CagA-Lokus ergab, dass die DNA in der Nachbarschaft des *cagA*-Gens charakteristische Eigenschaften einer Pathogenitätsinsel (PAI) aufweist (Censini *et al.*, 1996). Die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*), die für etwa 32 Gene kodiert, ist ca. 40 kb groß und kennzeichnet die virulenten Typ-I-Stämme von *H. pylori* (Covacci und Rappuoli, 2000; Fischer *et al.*, 2001). Die weniger virulenten Typ-II-Stämme sind *cagPAI*-negativ (Xiang *et al.*, 1995). Etwa 50 % der westeuropäischen *H. pylori*-Stämme besitzen die *cagPAI*. Eine Pathogenitätsinsel ist ein DNA-Abschnitt im Genom von Krankheitserregern, der für Virulenzfaktoren kodiert und über horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde. Im Allgemeinen kodieren die Pathogenitätsinseln, die auch bei

anderen Pathogenen wie *Salmonella*, *Yersinia*, *Bordetella*, *Legionella*, *Bartonella* oder *Rickettsia* vorkommen, häufig für Toxine, Adhäsine, Invasine, aber auch für Sekretionssysteme (Shea *et al.*, 1996). Achtzehn der auf der *cagPAI* enthaltenden Gene kodieren für Proteine eines Typ-IV-Sekretionssystems (T4SS) (Abb. 1.3 B). Bislang ist für das T4SS von *H. pylori* nur ein einziges transloziertes Effektorprotein, das CagA, bekannt. In die Epithelzellen transloziertes CagA wird dort an Tyrosinresten phosphoryliert und führt zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Veränderung der Zellmorphologie (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001).

Typ-III-Sekretionssysteme (T3SS) und T4SS sind Strukturen vorwiegend gramnegativer Bakterien, die Virulenzfaktoren direkt in das Zytoplasma von Wirtszellen injizieren. Diese essentiellen Virulenzfaktoren sind strukturell mit den Flagellen-Transportern bzw. Konjugations-Apparaten verwandt (Abb.1.3 A). Sowohl das T3SS's als auch T4SS's können auf einer Pathogenitätsinsel kodiert sein.

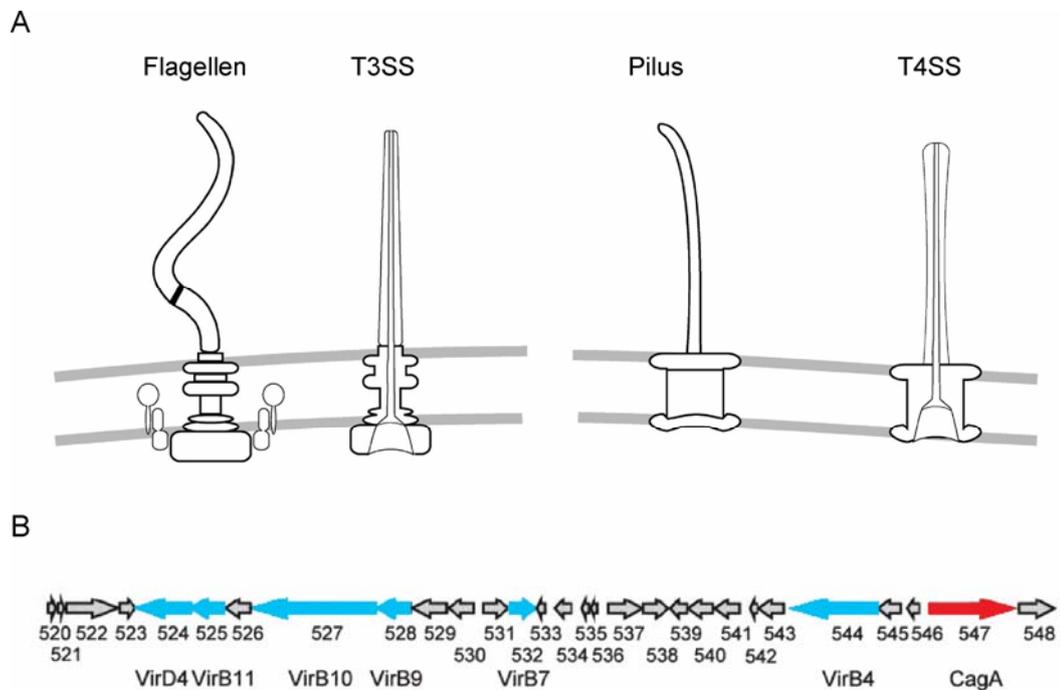


Abb. 1.3: **Schematische Darstellung von T3SSs und T4SSs.** (A) Strukturelle Ähnlichkeiten der bakteriellen Flagellen mit dem T3SS zum einem und der bakteriellen Pili mit dem T4SS zum anderen. (B) Schematische Darstellung der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) von *H. pylori*. Die offenen Leserahmen sind als Pfeile dargestellt und entsprechend ihrer Sequenzanordnung im *H. pylori* 26695 (hp520-548) bezeichnet. Gene, die für Proteine des T4SS kodieren, sind blau dargestellt, das bisher einzig bekannte Effektorprotein CagA rot (in Anlehnung an Covacci und Rapuoli, 2000).

Die Sekretion des vakuolisierenden Toxins-A (*vacuolating toxin A*, VacA) durch *H. pylori* hat für den Wirtsorganismus verschiedene Folgen. So führt die Sekretion zur (i) Vakuolisierung von Epithelzellen, (ii) Anschalten von proinflammatorischen

Reaktionen, (iii) Freisetzung von Cytochrom C und damit Schädigung von Mitochondrien, sowie (iv) Apoptose von Epithelzellen (Nakayama *et al.*, 2004; Baldari *et al.*, 2005; Cover und Blanke, 2005). Die Type-II-Stämme, sezernieren kein VacA und auch kein CagA, sind weniger virulent als die Typ-I-Stämme (Baldari *et al.*, 2005). Verschiedene *H. pylori*-Stämme produzieren unterschiedlich stark aktive VacA-Varianten, die auf die Heterogenität des Gens zurückzuführen sind (Atherton *et al.*, 1997). Dieser VacA-Polymorphismus zeigt sich in zwei verschiedenen Signalsequenzen (s1 und s2) sowie zwei verschiedenen Mittelregionen (m1 und m2) (Blaser und Atherton, 2004). *Helicobacter pylori*-Stämme, die die Kombination s1/m1 besitzen sezernieren größere Mengen an VacA als s1/m2 Stämme. Die Varianten s2/m1 und s2/m2 werden nicht sezerniert und Stämme mit diesen Genotypen zeigen demzufolge auch keine messbare VacA-Aktivität (Atherton *et al.*, 1997).

1.4 MOLEKULARE MECHANISMEN DER CagA-INDUZIERTEN SIGNALTRANSDUKTION ZUM AKTIN-ZYTOSKELETT VON WIRTSZELLEN

Die Translokation von CagA in die Magenepithelzellen erfolgt über das T4SS. Dort lagert es sich über einen bisher unbekanntem Mechanismus an die Innenseite der Plasmamembran an und wird durch die Familie der Src-Kinasen phosphoryliert (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). Die Anlagerung von CagA an die Plasmamembran ist unabhängig von der Phosphorylierung (Hatakeyama, 2004). Die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten ist ein gängiger Mechanismus zur Aktivierung von Proteinen in höher entwickelten eukaryontischen Zellen. Somit wird das CagA-Protein in der Epithelzelle irrtümlich als Komponente des internen Signal-Netzwerkes erkannt, das Prozesse wie Zellmorphologie, Motilität oder die Zellproliferation steuert. CagA ahmt somit zelluläre Signalproteine nach, indem es mit einer Vielzahl anderer Proteine im Wirt interagiert und so normale Prozesse in der Epithelzelle nachhaltig manipuliert (Backert und Meyer, 2006).

Die Tyrosinphosphorylierung von CagA erfolgt an den EPIYA-Motiven (Glu-Pro-Ile-Tyr-Alu), einer Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende des Proteins (Backert *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). Das EPIYA-Motiv kann aus vier verschiedenen EPIYA-Motiven bestehen. Diese werden, basierend auf den flankierenden Sequenzen, als EPIY-A, -B, -C und -D bezeichnet (Azuma *et al.*, 2004; Hatakeyama, 2004). Dabei exprimieren *H. pylori*-Stämme, die in den westlichen Ländern, wie Europa, Nordamerika und Australien, isoliert wurden, vorwiegend CagA-Proteine mit EPIYA-A und EPIYA-B gefolgt von einer bis drei Wiederholungen an EPIYA-C (Abb. 1.4). Die Tyrosinphosphorylierungsstelle im EPIYA-C (Y972) ist die

populärste in den westlichen CagA-Proteinen (Backert *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002a; Stein *et al.*, 2002). Die ostasiatischen CagA-Proteine, die aus *H. pylori*-Stämmen aus Japan, Korea und China isoliert wurden, besitzen nur die EPIYA-A und EPIYA-B aber nicht die EPIYA-C Stelle. Diese ist durch eine EPIYA-D Stelle ausgetauscht (Abb. 1.4; Higashi *et al.*, 2002a; Hatakeyama, 2004).

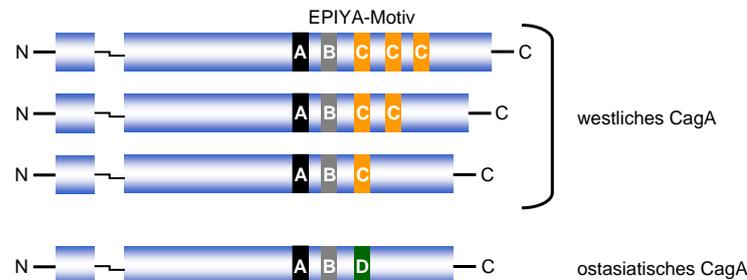


Abb. 1.4: **Schematische Darstellung der Diversität in den Tyrosinphosphorylierungsstellen von CagA.** Die Tyrosinphosphorylierung von CagA erfolgt durch die Src-Kinase am EPIYA-Motiv. Basierend auf den flankierenden AS-Sequenzen gibt es vier verschiedene EPIYA-Stellen, die man als EPIYA-A, -B, -C und -D bezeichnet. Westliche *H. pylori*-Stämme exprimieren CagA-Proteine, die EPIYA-A und EPIYA-B Stellen gefolgt von ein bis drei Wiederholungen der EPIYA-C Stellen enthalten. Ostasiatische Stämme exprimieren eine Form von CagA, in der die EPIYA-C Stelle gegen eine EPIYA-D Stelle ausgetauscht ist (Hatakeyama, 2004).

Im Laufe der vergangenen Jahre konnten zahlreiche zelluläre Interaktionspartner von CagA identifiziert werden. Dabei treten sowohl phosphorylierungsabhängige als auch -unabhängige Interaktionen auf (Backert und Selbach, 2005). Nach Translokation von CagA über das T4SS in die Wirtszelle kommt es phosphorylierungsunabhängig zur Zerstörung der Zell-Zell-Verbindungen, indem es mit *Tight junction* Proteinen JAM und ZO-1 assoziiert, wobei der Mechanismus allerdings unklar ist (Amieva *et al.*, 2003; Bagnoli *et al.*, 2005). Die Zerstörung der Zell-Zell-Verbindungen ist eine Folge der kürzlich beschriebenen CagA-PAR1 Interaktion (Saadat *et al.*, 2007). Die Bindung von CagA an das Adapterprotein Grb2 und anschließende Aktivierung des Ras>Raf>Mek>Erk Signalweges wurde ebenfalls als ein phosphorylierungsunabhängiges Ereignis beschrieben (Mimuro *et al.*, 2002).

Phosphoryliertes CagA (CagA^{PY}) interagiert mit einigen Wirtszellproteinen, die eine klassische SH2-Domäne besitzen. Die am besten untersuchte Interaktion ist die Interaktion mit der Tyrosin-Phosphatase Shp-2 über deren SH2-Domäne (Higashi *et al.*, 2002b). Shp-2 vermittelt die Signale zwischen Rezeptor-Tyrosinkinase, wie zum Beispiel c-Met, und vermittelt dabei Zellbewegung und Proliferation (Neel *et al.*, 2003). Shp-2 wird durch die Bindung von Tyrosinphosphorylierten Substraten über die SH2-Domäne aktiviert (Neel *et al.*, 2003). Während der Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori* gelangt Shp-2 an die Zellmembran und wird CagA-abhängig aktiviert (Higashi *et al.*, 2002). Shp-2/CagA-Komplexe konnten auch aus gastrischen Biopsien

ko-immunopräzipitiert werden (Yamazaki *et al.*, 2003). Das durch CagA^{PY} aktivierte Shp-2 führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung des Erk/MAPK-Signalweges und somit zu einer verstärkten Zellelongation (Higashi *et al.*, 2004). Phosphoryliertes CagA bindet auch an die C-terminale-Src-Kinase (Csk) und diese inaktiviert über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Src-Kinase (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003). Die Inaktivierung der Src-Kinase führt zu einer Dephosphorylierung der zellulären Proteine Cortactin, Ezrin und Vinculin (Selbach *et al.*, 2003, 2004; Moese *et al.*, 2007). Diese Proteine sind an der Regulation und Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Somit wird die Dephosphorylierung als eine Ursache für die auftretenden Aktin-zytoskelettalen Veränderungen angesehen (Backert *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2002; 2003; 2004). Ein zusammenfassendes Modell über die bekannten CagA-vermittelten zellulären Aktivitäten zu Beginn meiner Arbeit ist in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt.

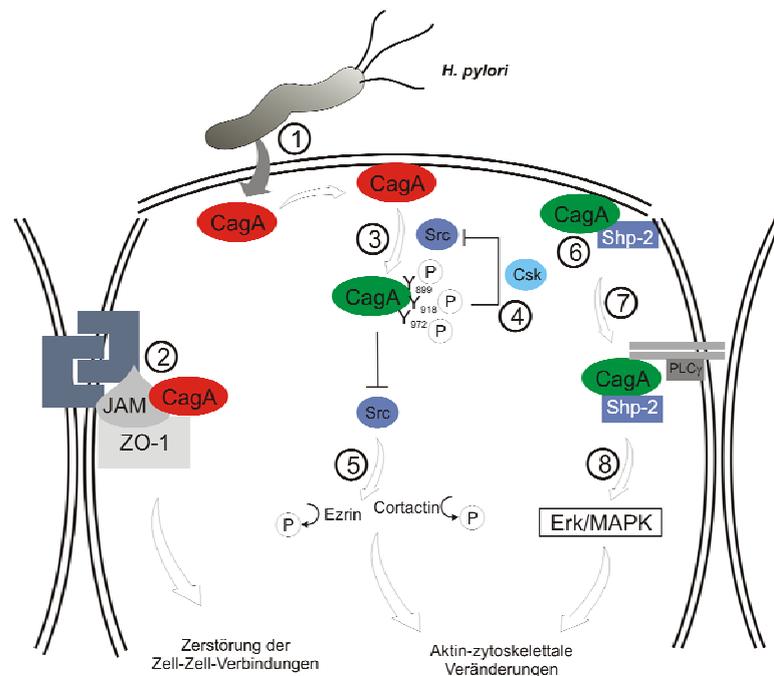


Abb. 1.5: **Schematisches Modell der CagA-vermittelten zellulären Aktivitäten.** (1) CagA wird über das T4SS in die Zelle eingeschleust. (2) CagA assoziiert unabhängig von seiner Phosphorylierung mit den *Tight junction*-Proteinen JAM und ZO-1 und führt möglicherweise zu einer Zerstörung der Zell-Zell-Verbindungen. (3) Die Src-Kinase phosphoryliert CagA in den EPIYA-Stellen. (4) Phosphoryliertes CagA bindet die C-terminale-Src-Kinase (Csk) und Src wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus inaktiviert. (5) Die autoinhibitorische Hemmung von Src führt zu einer Dephosphorylierung der zellulären Proteine Cortactin und Ezrin und hat Aktin-zytoskelettale Veränderungen zur Folge. (6) Phosphoryliertes CagA interagiert mit dem zellulären Shp-2 über die SH2-Domäne. (7) Der CagA/Shp-2-Komplex assoziiert mit dem c-Met Rezeptor und PLC γ . (8) Das durch phosphoryliertes CagA aktivierte Shp-2 aktiviert den Erk/MAPK-Signalweg. Die Aktivierung von Shp-2, c-Met und Erk ist für den CagA-induzierten Elongationsphänotyp und die Zellbewegung notwendig (in Anlehnung an Bourzac und Guillemin, 2005).

Das Aktin-Zytoskelett ist ein komplexes, flexibles und dynamisches Netzwerk, das bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Es ist in die Zellbewegung, die Erhaltung der zellulären Gestalt, die Anheftung der Zelle und ihre Interaktion mit der extrazellulären Matrix involviert (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Hall, 1998). Um diese verschiedenen Funktionen in der Zelle ausüben zu können, weist das Aktin-Zytoskelett eine Vielzahl von dynamischen Strukturen auf. Der Aufbau und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts wird insbesondere durch die Familie der Rho-GTPasen reguliert (Hall, 1998). Von besonderem Interesse sind dabei die Hauptvertreter RhoA, Rac1 und Cdc42. Die Familie der Rho-GTPasen ist weiterhin an der Zelladhäsion, Ausbildung und Erhaltung der Zellpolarität und Endozytose, dem Vesikeltransport sowie der Zelldifferenzierung und Transkription beteiligt (Nobes und Hall, 1999; Etienne-Manneville und Hall, 2002). Die beobachteten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen lassen eine Beteiligung der Rho-GTPasen am *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp vermuten.

Rho-GTPasen gehören zu der Familie der Ras-GTPasen (Aspenström *et al.*, 2004). Sie haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 20 – 40 kDa und werden meistens ubiquitär exprimiert. Zu den bis jetzt 22 bekannten Mitgliedern gehören die humanen Proteine RhoA, B, C, Rac1, 2, 3 und zwei Isoformen von Cdc42 (Schmidt und Aktories, 1998; Aspenström *et al.*, 2004). Sie sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, indem sie Signale ausgehend von Rezeptoren zu den Effektoren weiterleiten und so verschiedene Zellfunktionen beeinflussen. Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter. Im aktiven Zustand haben sie GTP gebunden. Nach Hydrolyse des GTP zu GDP befinden sie sich im inaktiven, GDP-gebundenen, Zustand. Dieser GDP-GTP Zyklus unterliegt einer starken Kontrolle (Takai *et al.*, 2001). Guanin-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*; GEFs) begünstigen den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP und somit die Aktivierung. Unterdessen verstärken die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) die hydrolytische Aktivität der GTPase und fördern damit die inaktive Konformation. Zusätzlich können Guanin-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) die Aktivität negativ beeinflussen. Diese blockieren die Dissoziation des GDP. In ruhenden Zellen liegen die Rho-GTPasen im inaktiven Zustand, komplexiert mit GDIs, vor (Olofsson, 1999). Nach der Stimulation der Zelle werden sie aus diesem Komplex gelöst und können sich mit Hilfe ihres isoprenylierten C-Terminus an der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran lokalisieren und dort durch GEFs aktiviert werden (Olofsson, 1999; Takai *et al.*, 2001; Robbe *et al.*, 2003). Im aktiven Zustand binden die GTPasen diverse Effektormoleküle und induzieren so spezifische zelluläre Antworten auf externe Stimuli (Bishop und Hall, 2000).

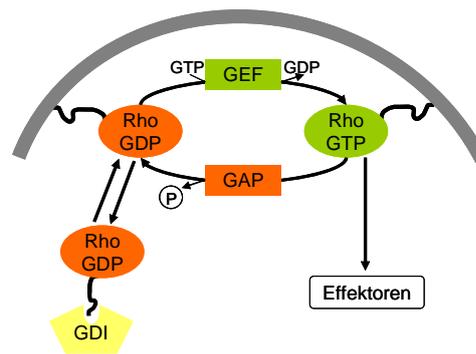


Abb. 1.6: **Schematische Darstellung der Regulation von Rho-GTPasen.** Rho-GTPasen sind im GDP-gebundenen Zustand inaktiv und werden durch Bindung des Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitors (GDI) in diesem Zustand gehalten. Der durch die GEFs induzierte GDP/GTP Austausch führt zur Aktivierung. Im aktiven, GTP-gebundenen, Zustand können die Rho-GTPasen mit zahlreichen Effektorproteinen, wie Proteinkinasen, Phospholipasen und einer Vielzahl von Adapterproteinen, interagieren. Die Hydrolyse von GTP zu GDP durch die GAPs führt zur Inaktivierung der Rho-GTPasen. Der isoprenylierte C-Terminus ist für die Verankerung mit der Zellmembran verantwortlich (in Anlehnung an Aktories und Barbieri, 2005).

Die Aktivierung der ubiquitär exprimierten Rho-GTPasen, Rho, Rac und Cdc42 erfolgt durch vielfältige zelluläre Signale und führt zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Hall, 1998; Bernards und Settleman, 2004; Munter *et al.*, 2006). Rho ist für die Formierung und Kontraktion von Stressfasern sowie für die Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten, den Stellen an denen Stressfasern mittels Integrinen an die extrazelluläre Matrix gekoppelt sind, verantwortlich (Izzard und Lochner, 1976; 1980; Parsons *et al.*, 2000). Stressfasern sind lange, dichte Bündel aus parallel angeordneten Aktinfilamenten. Durch die bipolare Anordnung von Aktin und Myosin-II sind sie in der Lage zu kontrahieren und die Spannung der Zelle aufrecht zu erhalten (Small *et al.*, 1999). Nach der Aktivierung von Rac kommt es zur Formation von Lamellipodien. Als Lamellipodium bezeichnet man den flachen, breiten Leitsaum an der vorderen Front einer sich vorwärts bewegenden Zelle (Abercrombie *et al.*, 1970a, 1971). Es zeichnet sich durch eine relativ konstante Breite von 1-5 μm und eine Höhe von ca. 200 nm aus (Small *et al.*, 2002; Small und Resch, 2005). Die Aktinfilamente innerhalb eines Lamellipodiums sind locker mit einander verbunden und netzwerkartig polymerisiert (Svitkina und Borisy, 1999; Small *et al.*, 2002). Sie sind in der Lage neue adhäsive Kontakte auszubilden und treiben die Zelle bei der Zellmigration voran (Kaverina *et al.*, 2002). Außerdem können Lamellipodien in Form von gekräuselten Membranausstülpungen, den so genannten *membrane ruffles*, über die Zelloberseite nach hinten zurück wandern (Abercrombie *et al.*, 1970b). Cdc42 reguliert die Ausbildung von Filopodien. Filopodien sind fingerartige Ausläufer der Zellmembran. Sie bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten, die durch aktinbindende Proteine vernetzt sind (Small, 1988; Bartles, 2000). Filopodien dienen möglicherweise als

„sensorisches Organ“, das die extrazelluläre Matrix sowie die Oberfläche benachbarter Zellen abtastet (Wood und Martin, 2002).

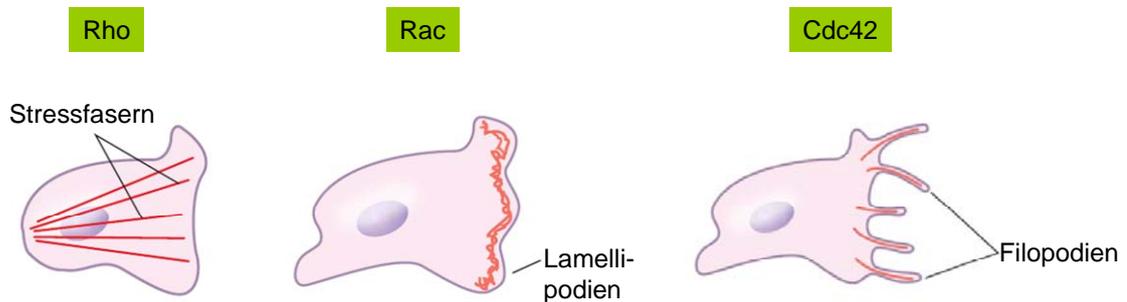


Abb. 1.7: **Schematische Darstellung der durch Rho, Rac und Cdc42 induzierten Aktin-abhängigen zellulären Strukturen (rot).** Aktives Rho führt zur Bildung von Stressfasern. Rac induziert die Bildung von Lamellipodien und Cdc42 führt zur Bildung von Filopodien (in Anlehnung an Munter *et al.*, 2006).

Aufgrund seiner zentralen Rolle und seiner komplexen Regulation ist das Aktin-Zytoskelett ein attraktives Angriffsziel von pathogenen Mikroorganismen. Zahlreiche mikrobielle Pathogene haben während der langen Ko-Existenz mit dem Wirt Methoden entwickelt, mit denen sie das Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle zu ihren Gunsten ausnutzen (Dramsi und Cossart, 1998; Barbieri *et al.*, 2002; Kahn *et al.*, 2002; Gruenheid und Finlay, 2003). In den letzten Jahren hat sich beispielsweise herausgestellt, dass die Rho-GTPasen das Hauptziel verschiedener bakterieller Toxine oder Effektorproteine sind (Abb. 1.8). Kovalente Modifikationen durch Glykolysierung (durch clostridiale glykolysierende Zytotoxine, CGTs), ADP-Ribosylierung (durch die C3 ähnlichen Exoenzyme) oder proteolytische Toxine (YopT von *Yersinia enterocolitica*) führen zu einer irreversiblen Inhibierung der Rho-GTPasen (Abbildung 1.5; Tabelle Anhang). Andere Pathogene besitzen Effektorproteine, die die Funktion eines GAP nachahmen. So führen YopE (*Yersinia* spp.), SptP (*Salmonella* spp.) oder ExoS und ExoT (*Pseudomonas aeruginosa*) zu einer reversiblen Inhibierung der Rho-GTPasen (Abbildung 1.5; Tabelle 8.1 Anhang). Auf der anderen Seite können die GTPasen durch bakterielle Toxine oder Effektorproteine auch aktiviert werden. So ahmt SopE (*Salmonella* spp.), ein T3SS-Effektorprotein, die Funktion eines GEF nach und führt somit zur Aktivierung der Rho-GTPasen. Die Aktivierung der Rho-GTPasen kann aber auch durch CNF (*cytotoxic necrotizing factor*) von *E. coli* und *Yersinia pseudotuberculosis* oder dem DNT (*dermotoxic necrotizing toxin*) aus *Bordetella* spp. erfolgen (Abb. 1.8; Tabelle 8.1 Anhang).

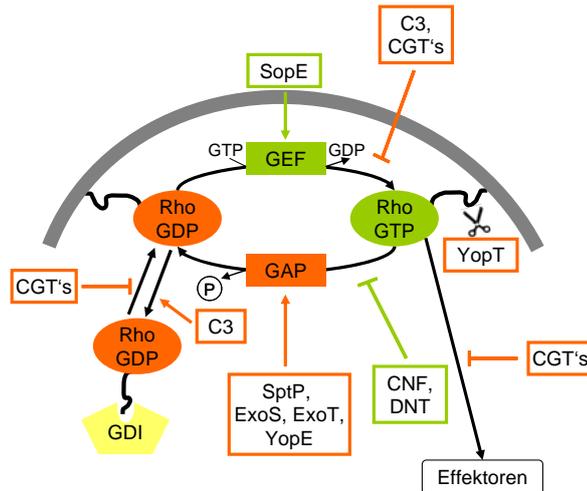


Abb. 1.8: **Schematische Darstellung der Angriffsorte verschiedener bakterieller Toxine oder Effektorproteine in Rho-GTPasen.** Die Glykolyse von RhoA am Thr37 (oder Rac1 und Cdc42 am Thr35) durch die clostridialen glykolyisierenden Toxine (CGTs) inhibiert die Interaktion der aktivierten Rho-GTPasen mit ihren Effektorproteinen, blockiert die Aktivierung durch die GEFs und verhindert die Bindung an die Zellmembran. ADP-Ribosylierung von RhoA am Asn41 durch das C3-Toxin inhibiert die Aktivierung durch GEFs, führt zum Herauslösen aus der Zellmembran und Stabilisierung des Rho-GDI Komplexes. RhoA wird am C-Terminus durch die Protease YopT von der Zellmembran abgelöst. YopE, ExoS und ExoT sowie SptP ahmen die Funktion eines GAPs nach und führen so zur Inaktivierung der Rho-GTPasen. SopaE ahmt die Funktion eines GEFs nach und führt zur Aktivierung der Rho-GTPasen. CNF und DNT aktivieren die Rho-GTPasen durch Deaminierungs- bzw. Transglutaminierungsreaktionen des Gln63 von RhoA, Gln61 von Rac und Cdc42 (in Anlehnung an Aktories und Barbieri, 2005).

Churin und Mitarbeiter (2001) konnten bereits zeigen, dass Rac und Cdc42 durch einen unbekanntem Faktor in der *H. pylori-cagPAI* aktiviert werden (Churin *et al.*, 2001). Auch die Ausbildung von Stressfasern und Lamellipodien in Folge einer *H. pylori* Infektion wurde in *in vitro* Untersuchungen bereits beschrieben (Palovuori *et al.*, 2000). Der Signalweg zur Aktivierung von Rac und Cdc42 während der *H. pylori*-Infektion war zu Beginn meiner Arbeit allerdings noch nicht bekannt.

1.5 SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE ZUR AKTIVIERUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NF- κ B

Während der Infektion mit *H. pylori* kommt es *cagPAI*-abhängig zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP1 (Sharma *et al.*, 1998; Naumann *et al.*, 1999). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kann von über 450 verschiedenen Aktivatoren, wie oxidativer Stress, Mitogene, Bakterien und Apoptosemediatoren, aktiviert werden. Dabei verläuft die Aktivierung in Folge einer bakteriellen- oder viralen-Infektion über den klassischen Signalweg oder über den alternativen Signalweg durch Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Familie. Diese beiden Signalwege aktivieren verschiedene Gene und vermitteln somit verschiedene immunmodulierende Funktionen.

Die Aktivierung von NF- κ B durch extrazelluläre Signale in normalen Zellen ist eine Folge von Phosphorylierungsreaktionen und sequentiellen Abbaureaktionen (Abb1.9).

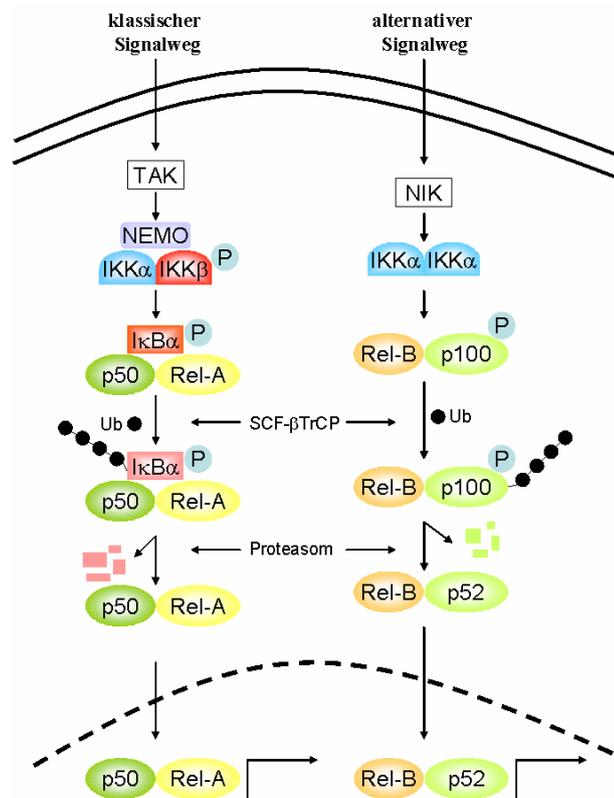


Abb. 1.9: **Schematische Darstellung der NF- κ B-Signalwege.** Im klassischen Signalweg, stimuliert durch TNF-Rezeptoren, dem IL-1-Rezeptor oder den Toll-ähnliche-Rezeptoren (TLRs), wird die TGF β aktivierte Kinase (TAK) aktiviert und es kommt zur Phosphorylierung und Aktivierung von IKK β . IKK β phosphoryliert I κ B α , das dann zur Ubiquitinierung durch den SCF- β TrCP Ubiquitin-Ligase-Komplex und zum schrittweisen Abbau durch das Proteasom führt. Der RelA-p50-Komplex wandert in den Kern und reguliert die Expression der Gene, die an Entzündungsreaktionen, der Immunität und der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Der alternative Signalweg wird durch Rezeptoren der TNFR-Familie, wie zum Beispiel der B-Zell-Rezeptor BAFF, stimuliert und aktiviert die NIK-Kinase über einen noch unbekanntem Mechanismus. NIK phosphoryliert IKK α , das dann den NF- κ B-Vorläufer p100 phosphoryliert. p100 wird durch den SCF- β TrCP-Komplex ubiquitiniert und schrittweise zur funktionellen p52 Untereinheit abgebaut. Der p52-Rel-B-Komplex wandert in den Kern und führt zur Expression von Genen, die für die B-Zell-Reifung verantwortlich sind (Beinke und Ley, 2004; Hayden und Ghosh, 2004; Gilmore, 2006).

Die *H. pylori*-assoziierte NF- κ B-Aktivierung ist transient, direkt und sehr spezifisch (Naumann, 2000). Foryst-Ludwig und Naumann (2000) konnten PAK1 (p21-aktivierte-Kinase-1) als ein mögliches Schlüsselprotein für die NF- κ B-Aktivierung identifizieren. PAK-1 wird in Folge einer *H. pylori*-Infektion aktiviert und phosphoryliert NIK (NF- κ B induzierende Kinase), das die Phosphorylierung (Inhibierung) des NF- κ B-Inhibitors I κ B α durch IKK β (Inhibitor der I κ B-Kinasen) zur Folge hat. I κ B α wird daraufhin ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (Foryst-Ludwig und Naumann, 2000; Naumann, 2000). Die aktiven NF- κ B-Faktoren (p50, Rel-A, Rel-B, p52) wandern in

den Zellkern und werden transkriptionell aktiv. Der genaue Mechanismus der *H. pylori*-induzierten NF- κ B-Aktivierung war zu Beginn der Arbeit noch nicht aufgeklärt. Es war lediglich bekannt, dass einige Gene der *cagPAI* für die Aktivierung essentiell sind (Peek und Blaser, 2002). Ein weit verbreitetes Dogma war allerdings, dass CagA nicht an der IL-8-Sekretion beteiligt ist, weil CagA-Mutanten ebenfalls signifikante IL-8 Mengen induzieren können (Crabtree *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001). Eine detaillierte Untersuchung von CagA gab es bislang allerdings nicht.

Wie bereits dargestellt wurde *H. pylori* als ein Karzinogen der Klasse 1 angesehen. Eine Verbindung zwischen chronischer Entzündung und der Entstehung von Krebs wird seit vielen Jahren diskutiert. Die Entzündungsreaktion ist eine ganz normale physiologische Antwort auf eine Verletzung oder Infektion, wodurch (i) die verletzte oder infizierte Region im Körper lokalisiert wird, (ii) Effektorzellen und Moleküle zum Ort der Entzündung mobilisiert werden und so letztendlich die Entzündungsreaktion gestoppt wird. Eine Entzündungsreaktion beinhaltet zum einem die transkriptionelle Aktivierung von entzündungsfördernden Genen, die zur Ausschüttung von (i) entzündungsfördernden Interleukinen und Chemokinen, (ii) Adhäsionsmolekülen und (iii) reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen führen. Parallel dazu werden aber auch entzündungshemmende Signalwege zur Kontrolle der Entzündungsreaktion aktiviert. Es wird zwischen einer akuten und chronischen Entzündung unterschieden. Eine akute Entzündungsreaktion dauert lediglich einige Tage und kann leicht behandelt werden. Wohingegen eine chronische Entzündung sich über mehrere Wochen und Monate erstrecken kann und so zu Gewebeschädigungen führt. Entzündungsreaktionen, die auf eine chronische Exposition von infektiösen und nicht infektiösen Materialien zurückzuführen sind, sind bedeutende Faktoren in der Tumorentstehung. Die Produktion und Ausschüttung von freien Sauerstoffradikalen am Ort der Entzündung kann zum einen zur Zerstörung der eingedrungenen Pathogene oder Fremdpartikel führen zum anderen aber auch zur Zerstörung von gesundem Epithel- oder Bindegewebe. Diese Reaktionen können unter Umständen zu einer Tumorentstehung führen. Allerdings ist der genaue Mechanismus, der von der Entzündung zur Krebsentstehung führt, noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine wichtige Bedeutung scheint die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu spielen (Karin *et al.*, 2002; Basseres und Baldwin, 2006). Aufgrund der anti-apoptotischen Wirkung von NF- κ B kann die ständige Aktivierung von NF- κ B infolge einer Entzündung oder Infektion die Eliminierung von genetisch veränderten Zellen verhindern (Karin *et al.*, 2002). Weiterhin können entzündliche Zellen die DNA benachbarter Zellen durch die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffradikale infolge der kontinuierlichen NF- κ B-Aktivierung schädigen (Karin *et al.*, 2002). Die Entstehung einiger gastrischer Tumorarten unterstützt die Hypothese, dass die kontinuierliche Aktivierung von NF- κ B

eine Verbindung von chronischer Entzündung und Tumorentstehung ist. Einer der größten Risikofaktoren für die Entstehung gastrischer Tumore ist das Bakterium *H. pylori* (Peek und Blaser, 2002). Es ist bekannt das *H. pylori* NF- κ B aktivieren kann. Dabei ist NF- κ B nicht nur in den gastrischen Epithelzellen aktiviert, sondern auch in dem mit *H. pylori*-infizierten entnommenen Tumorgewebe (Keates *et al.*, 1997). Ist NF- κ B in Folge einer *H. pylori*-Infektion aktiviert, kommt es zur verstärkten Transkription von IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , Cyclooxygenase-2 (COX2) und möglicherweise weiterer entzündungsvermittelnder Mediatoren, die die kontinuierliche NF- κ B-Aktivierung ermöglichen (Barnes und Karin, 1997; Keates *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001).

2 ZIELSETZUNG

Helicobacter pylori besiedelt die Magenschleimhaut des Menschen und kann dort zu einer chronischen Gastritis, aber auch zu Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren oder zu malignen Tumoren beitragen. Epidemiologische Studien zahlreicher Arbeitsgruppen zeigten, dass das Krankheitsbild mit der Präsenz des CagA-Proteins korreliert. CagA ist das einzige bekannte Effektorprotein eines Typ-IV-Sekretionssystems, das auf der *cag*-Pathogenitätsinsel von virulenten *H. pylori*-Stämmen kodiert ist. Detaillierte Kenntnisse über die Pathogen-Wirt-Interaktion sind für das allgemeine Verständnis der Pathologie wichtig und könnten neue Ansatzpunkte für die Erforschung von Therapiestrategien sein.

Die Infektion von gastrischen Epithelzellen mit *cagPAI*⁺-*H. pylori*-Stämmen *in vitro* führt zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen sowie zu einer starken Immunantwort. Über die molekularen Mechanismen der *H. pylori*-induzierten Signalkaskaden war zu Beginn der Arbeit nur wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die CagA-induzierten Signalwege in gastrischen Epithelzellen näher charakterisiert werden.

Der Fokus meiner Arbeit lag auf folgenden Schwerpunkten:

- I. Untersuchung der *H. pylori*-induzierten Signalwege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.
- II. Untersuchung der *H. pylori*-induzierten Signalkaskaden zur Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 CHEMIKALIEN

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

3.1.2 AKTIVATOREN/INHIBITOREN

PMA wurde von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

MG132, PD98059, SB203580, Calphostin C, PP1, PP2, AG1478, AG1295, AG370 und Genistein wurden von Calbiochem-Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

SKI-DV2-43 wurde von Dr. Nikolas von Bubnoff (Universität München) zur Verfügung gestellt.

STI571 wurde von Novartis (Basel, Schweiz) bezogen.

3.1.3 ANTIKÖRPER

Folgende Antikörper wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Anweisung des Herstellers verwendet.

monoklonale Antikörper

| | |
|-----------------|---|
| α -PY-99 | Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) |
| α -GAPDH | Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) |
| α -Ras | Upstate (Billerica, MA, USA) |
| α -Rac1 | Upstate (Billerica, MA, USA) |
| α -RhoA | Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) |
| α -Src | Upstate/ Millipore (Billerica, MA, USA) |

polyklonale Antikörper

| | |
|----------------|--|
| α -CagA | AMS Biotechnology (Wiesbaden, Deutschland) |
|----------------|--|

| | |
|--------------------------|--|
| α -OipA | Dr. Stefan Odenbreit (Universität München) |
| α -HA | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| α -c-Abl | Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) |
| α -c-Abl (Tyr412) | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| α -Arg | Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) |
| α -CrkII | Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) |
| α -CrkII (Tyr221) | NEB (Frankfurt, Deutschland) |
| α -GAPDH | Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) |
| α -GST | Amersham Bioscience (Freiburg, Deutschland) |
| α -Src (Tyr529) | Biosource/ Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) |
| α -Src (Tyr416) | Biosource/ Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) |

Sekundäre Antikörper für Westernblot

| | |
|--|-----------------------------|
| polyklonales Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin/ HRP | Dako (Hamburg, Deutschland) |
| polyklonales Kaninchen-anti-Ziege-Immunglobulin/ HRP | Dako (Hamburg, Deutschland) |
| polyklonales Schwein Anti-Kaninchen Immunglobulin/ HRP | Dako (Hamburg, Deutschland) |

Sekundäre Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie

| | |
|--|----------------------------------|
| polyklonales Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin/ TRITC | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
|--|----------------------------------|

3.1.4 ENZYME, PROTEINE UND KINASEN

| | |
|---------------------|---|
| Trypsin/EDTA-Lösung | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Fötale Kälberserum | Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) |
| Pferdeserum | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Rinderserumalbumin | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| CrkII-GST | Dr. Silja Wessler (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) |
| Src-Kinase | Upstate/Millipore (Billerica, MA, USA) |
| Abl-Kinase | NEB (Frankfurt, Deutschland) |

3.1.5 TOXINE

Gereinigtes Tcd-B, Tcd-BF und C3-Toxin wurden von Dr. Harald Genth (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

CNF-1 und CNF-Y wurden von Prof. Dr. Gudula Schmidt (Albert Ludwig Universität Freiburg) bezogen.

3.2 BAKTERIENSTÄMME

3.2.1 *HELICOBACTER PYLORI*-STÄMME

Tab. 3.1: Darstellung der verwendeten *H. pylori*-Stämme*.

| Stamm | Resistenz | Beschreibung/ Endoskopie | Referenz |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| P1 | | klinisches Isolat/ <i>Dyspepsie</i> | Schmitt und Haas, 1994 |
| P12 | | klinisches Isolat/ <i>Ulkus duodeni</i> | Schmitt und Haas, 1994 |
| Ka88 | | klinisches Isolat/ Magen- und Zwölffingerdarmgeschwür | Backert <i>et al.</i> , 2004 |
| NCTC11637 | | Referenzstamm | ATCC 43504 (NCTC, London, UK) |
| 26695 | | klinisches Isolat/ Gastritis | Tomb <i>et al.</i> , 1997 |
| 2808/ P277 | | klinisches Isolat/ Gastritis | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| Ka204 | | klinisches Isolat | Backert <i>et al.</i> , 2004 |
| P310 | | klinisches Isolat/ Magenkarzinom | Backert <i>et al.</i> , 2004 |
| P1 GFP | Km ^R | P1 + pSB14/GFP | Backert <i>et al.</i> , 2005 |
| P1 RFP | Km ^R | P1 + pSB108/RFP | Brandt <i>et al.</i> , 2007 |
| P1Δ <i>oipA</i> | Km ^R | <i>oipA</i> -Mutante | Dossumbekova <i>et al.</i> , 2006 |
| P1Δ <i>virB11</i> | Cam ^R | T4SS-Mutante | Backert <i>et al.</i> , 2000 |
| P1Δ <i>cagA</i> | Cam ^R | <i>cagA</i> -Mutante | Backert <i>et al.</i> , 2000 |
| P1Δ <i>cagA/cagA</i> ²⁶⁶⁹⁵ | Cam ^R /Km ^R | P1Δ <i>cagA</i> + <i>cagA</i> (26695) | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| P1Δ <i>cagA/cagA</i> ^{P310} | Cam ^R /Km ^R | P1Δ <i>cagA</i> + <i>cagA</i> (P310) | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| P1Δ <i>cagA/cagA</i> ²⁸⁰⁸ | Cam ^R /Km ^R | P1Δ <i>cagA</i> + <i>cagA</i> (2808) | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |

| | | | |
|---|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| P310 Δ <i>virB11</i> | Cam ^R | T4SS-Mutante | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| P310 Δ <i>cagA</i> | Cam ^R | <i>cagA</i> -Mutante | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| P310 Δ <i>cagA/cagA</i> ²⁶⁶⁹⁵ | Cam ^R /Km ^R | P310 Δ <i>cagA</i> + <i>cagA</i> (26695) | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| 2808 Δ <i>virB11</i> | Cam ^R | T4SS-Mutante | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| 2808 Δ <i>cagA</i> | Cam ^R | <i>cagA</i> -Mutante | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| 2808 Δ <i>cagA/cagA</i> ²⁶⁶⁹⁵ | Cam ^R /Km ^R | 2808 Δ <i>cagA</i> + <i>cagA</i> (26695) | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| P12 Δ <i>cagA</i> | Cam ^R | <i>cagA</i> -Mutante | Tammer <i>et al.</i> , 2007 |
| P12 Δ <i>cagL</i> | Cam ^R | T4SS-Mutante | Tammer <i>et al.</i> , 2007 |

* Alle *H. pylori*-Mutanten wurden von PD Dr. Steffen Backert zur Verfügung gestellt. Die P1 Δ *virB11*-, P1 Δ *cagA*-, P310 Δ *virB11*-, P310 Δ *cagA*-, 2808 Δ *virB11*-, 2808 Δ *cagA*-, P12 Δ *cagA*- und P12 Δ *cagL*-Mutanten wurden durch den Einbau einer Chloramphenicol-Kassette in das *virB11*- bzw. *cagA*- bzw. *cagL*-Gen erzeugt (Backert *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2003). Für die Komplementation der Δ *cagA*-Stämme, wurden die *cagA*-Gene der Stämme 26695, P310 bzw. 2808 mit ihren eigenen Promotoren über einen *E. coli/H. pylori-Shuttle*-Vektor (pSB19) mit einer Kanamycin-Kassette in die Δ *cagA*-Stämme transformiert (Backert *et al.*, 2001).

3.2.2 PSEUDOMOANS AERUGINOSA-STÄMME

Tab. 3.2: Darstellung der verwendeten *P. aeruginosa*-Stämme*.

| Stamm | Beschreibung | Referenz |
|--|---|-----------------------------------|
| PAO1 ATCC 15692 | Laborstamm (Wildtyp-Stamm) | Engel, 2001 |
| PAK | Laborstamm (Wildtyp-Stamm) | Kaufmann <i>et al.</i> , 2000 |
| PA103 Δ <i>pscJ</i> | T3SS Mutante | Kang <i>et al.</i> , 1997 |
| PAK Δ <i>exoS</i> Δ <i>exoT</i> | <i>exoS/exoT</i> -Doppelmutante | Kaufmann <i>et al.</i> , 2000 |
| PAK Δ <i>exoS</i> | <i>exoS</i> -Mutante | Kaufmann <i>et al.</i> , 2000 |
| PAK Δ <i>exoT</i> | <i>exoT</i> -Mutante | Kaufmann <i>et al.</i> , 2000 |
| PA103 Δ U Δ T+pUCP20 | PA103 Δ <i>exoU</i> Δ <i>exoT</i> + pUCP20; Gm ^r Cb ^r | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2000 |
| PA103 Δ U Δ T+pUCPExoS(G ⁺ A ⁺) | PA103 Δ <i>exoU</i> Δ <i>exoT</i> + pUCP20/ <i>exoS</i> ; Gm ^r Cb ^r | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2000 |
| PA103 Δ U Δ T+pUCPExoS(G ⁻ A ⁺) | PA103 Δ <i>exoU</i> Δ <i>exoT</i> + pUCP20/ <i>exoS</i> (R146A); Gm ^r Cb ^r | Brandt <i>et al.</i> , 2007 |
| PA103 Δ U Δ T+pUCPExoS(G ⁺ A ⁻) | PA103 Δ <i>exoU</i> Δ <i>exoT</i> + pUCP20/ <i>exoS</i> (E379-381A); Gm ^r Cb ^r | Brandt <i>et al.</i> , 2007 |

| | | |
|--|--|-----------------------------------|
| PA103 Δ U Δ T+pUCPExoS(G ⁻ A ⁻) | PA103 Δ exoU Δ exo + pUCP20/exoS (R146A)(E379-381A); Gm ^r Cb ^r | Brandt <i>et al.</i> , 2007 |
| PA103 Δ U | PA103 Deletion der AS 330-571 von <i>exoU</i> | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2000 |
| PA103 Δ U Δ T | PA103 Δ U Austausch der AS 36-348 von <i>exoT</i> durch eine xylE/aacC1-Kassette, Gm ^r | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2000 |
| PA103 Δ U/ExoT(G ⁺ A ⁺) | PA103 Δ exoU + ExoT (R149K) | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |
| PA103 Δ U/ExoT(G ⁺ A ⁻) | PA103 Δ exoU + ExoT (EQE383-385AAA) | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |
| PA103 Δ U/ExoT(G ⁻ A ⁻) | PA103 Δ exoU + ExoT (R149K) (EQE383-385AAA) | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |

* Die *P. aeruginosa*-Mutanten wurden aus dem Labor von Prof. Joanne Engel und Shouguang Jin zur Verfügung gestellt. (G⁺ = GTPase Aktivität ist vorhanden; G⁻ = GTPase-Aktivität ist nicht vorhanden; A⁺ = ADP-Ribosyltransferase-Aktivität ist vorhanden; A⁻ = ADP-Ribosyltransferase Aktivität ist nicht vorhanden).

3.3 ZELLKULTUREN

| Zelllinie | Abstammung/ Herkunft | Referenz |
|--------------------------------|---|---|
| <u>Humane Zelllinien</u> | | |
| AGS | Adenokarzinom des Magens | ATCC CRL 1739 |
| AGS Δ Abl | stabile shRNA Abl <i>knockout</i> -Zellen | Poppe <i>et al.</i> , 2007 |
| MCF-7 | Adenokarzinom der Brust | ATCC HTB-22 |
| MKN-28 | Gastrische Epithelzellen | JCRB0253 |
| <u>Embryonale Fibroblasten</u> | | |
| SYF | src ^{-/-} , yes ^{-/-} , fyn ^{-/-} <i>triple knockout</i> -Zellen | ATCC CRL-2498, Klinghoffer <i>et al.</i> , 1999 |
| SYF + c-src | src, yes, fyn <i>knockout</i> -Zellen + c-src | ATCC CRL-2459, Klinghoffer <i>et al.</i> , 1999 |
| Shp-2 ^{+/+} | homozygote Shp-2 ^{WT} -Zellen | Shi <i>et al.</i> , 1998 |
| Shp-2 ^{-/-} | homozygote Shp-2 ^{A46-110} -Zellen | Shi <i>et al.</i> , 1998 |

3.4 OLIGONUKLEOTIDE UND VEKTOREN

3.4.1 siRNA

Die siRNA von Cdc42, RhoA und Rac1 wurden von Dr. Nikolaus Machuy (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Cdc42 (1) 5'-TTCAGCAATGCAGACAATTAA-3'

Cdc42 (2) 5'-CTCGAGCCTCCGAAACTCAA-3'

RhoA (1) 5'-TAGGCTGTAACACTTTTATAA-3'

RhoA (2) 5'-TACCTTATAGTTACTGTGTAA-3'

Rac 5'-AAAACCTGCCTACTGATCAGT-3'

Die siRNA gegen CrkII, Arg und Ras wurde von SantaCruz (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

3.4.2 TRANSFEKTIONSKONSTRUKTE

| Plasmid | Charakteristika | Referenzen |
|--|--|-----------------------------------|
| pIRESKII-EGFP | pIRESKII-EGFP (Clontech) | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |
| pIRESKII-EGFP-ExoT(G ⁺ A ⁺) | pIRESKII-EGFP mit dem <i>exoT open reading frame</i> | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |
| pIRESKII-EGFP-ExoT(G ⁻ A ⁺) | ExoT mit einer R149K-Mutation | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |
| pIRESKII-EGFP-ExoT(G ⁺ A ⁻) | ExoT mit einer EQE383-385AAA-Mutation | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |
| pIRESKII-EGFP-ExoT(G ⁻ A ⁻) | ExoT mit einer R149K- und einer EQE383-385AAA-Mutation | Garrity-Ryan <i>et al.</i> , 2004 |
| pIRES2-EGFP-Crkl | pIRES2-EGFP mit dem <i>crkl open reading frame</i> | Brandt <i>et al.</i> , 2007 |
| pIRES2-EGFP-Crkl R38K | Crkl mit einer R38K-Mutation in der SH2-Domäne | Brandt <i>et al.</i> , 2007 |
| pIRES2-EGFP-Crkl W170K | Crkl mit einer W170K-Mutation in der SH3-Domäne | Brandt <i>et al.</i> , 2007 |
| pCAGGS-CrkII | pCAGGS- <i>crkII open reading frame</i> | Abassi und Vuori, 2002 |
| pCAGGS-CrkII R38V | CrkII mit einer R38V-Mutation in der SH2-Domäne | Abassi und Vuori, 2002 |

| | | |
|--|--|-------------------------------|
| pCAGGS-CrkII-W169L | CrkII mit einer W169L-Mutation in der SH3-Domäne | Abassi und Vuori, 2002 |
| pCAGGS-CrkII-Y221F | CrkII mit einer Y221F-Mutation | Abassi und Vuori, 2002 |
| pcDNA3-GFP-RhoA (DN) | RhoA mit einer T19N-Mutation | Ben-Ami <i>et al.</i> , 1998 |
| pcDNA3-GFP-Rac1 (DN) | Rac1 mit einer T17N-Mutation | Ben-Ami <i>et al.</i> , 1998 |
| pcDNA3-GFP-Cdc42 (DN) | Cdc42 mit einer T17N-Mutation | Ben-Ami <i>et al.</i> , 1998 |
| pSP65R α -H-Ras (DN) | H-Ras mit einer S17N-Mutation | Higashi <i>et al.</i> , 2004 |
| pSP65R α -H-Ras | pSP65R α -H-Ras <i>open reading frame</i> | Higashi <i>et al.</i> , 2004 |
| pRK5-c-Met (DN) | c-Met mit einer Y1367F- und Y1374F-Mutation | Furge <i>et al.</i> , 2001 |
| Raf (DN) | Raf mit einer S621A-Mutation | Petra Dersch |
| Mek1 (DN) | Mek1 mit einer D208A-Mutation in der Kinasedomäne | Petra Dersch |
| pSP65R α -Shp-2 Δ SH2 (DN) | Shp-2(Δ AS33-191) im pSP65R α Vektor | Higashi <i>et al.</i> , 2002 |
| pNF- κ B-d2EGFP | NF κ B(p65) gekoppelt mit GFP | Brandt <i>et al.</i> , 2005 |
| pIL-8-GFP | IL-8-Promoterregion (-420 bis +102) im pEGFP-1-Vektor | Dragneva <i>et al.</i> , 2001 |
| pSR65R α CagA WT | CagA (WT,NCTC11637) mit C-terminalen HA-Tag in pSR65R α | Higashi <i>et al.</i> , 2002 |
| pSR65R α CagA (Y>F) | CagA (NCTC11637) mit einer Y893F-, Y912F-, Y965F-, Y999F- und Y1033F-Mutation im pSR65R α -Vektor | Higashi <i>et al.</i> , 2004 |
| pSR65R α CagA (Y>A) | CagA (NCTC11637) mit einer Y893A-, Y912A-, Y965A-, Y999A- und Y1033A-Mutation im pSR65R α -Vektor | Higashi <i>et al.</i> , 2002 |
| pHel2-CagA (WT) | CagA (WT, 26695) im pHel2 Vektor | Backert <i>et al.</i> , 2001 |
| pHel2-CagA (Y899F/918F/972F) | CagA (26695) mit einer Y899F-, Y918F- und einer Y972F-Mutation im pHel2 Vektor | Backert <i>et al.</i> , 2001 |
| pCMV-c-Abl-IV | c-Abl (Maus) <i>open reading frame</i> im pCMV-Vektor | Sionov <i>et al.</i> , 1999 |

| | | |
|-----------------------|--|-----------------------------|
| pCMV-c-Abl K290H | c-Abl mit einer K290H-Mutation in der Kinasedomäne | Sionov <i>et al.</i> , 2001 |
| pCMV-c-Abl-P242/249/E | c-Abl mit einer P242/249/E-Mutation | Burton <i>et al.</i> , 2005 |

3.5 NÄHRMEDIEN UND PLATTEN

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Platten bzw. im LB-Flüssigmedium.

LB-Medium: 25 g/l Luria Broth-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), autoklaviert, gegebenenfalls Zugabe von 20 mg/l Chloramphenicol bzw. 30 mg/l Kanamycin

LB-Platten: 32 g/l Luria Broth-Platten (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe), autoklaviert, gegebenenfalls Zugabe von 20 mg/l Chloramphenicol bzw. 30 mg/l Kanamycin

Die Kultivierung von *C. difficile* und *B. fragiles* erfolgte auf Schaedler-Platten (Oxoid Basingstoke, Hampshire, UK).

Die Kultivierung von *Yersinien* erfolgte auf *Yersinien*-Platten (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK).

Die Kultivierung von *P. aeruginosa* erfolgte auf Blutplatten bzw. in LB-Medium und entsprechender Antibiotika-Zugabe.

Die Kultivierung von *H. pylori* erfolgte auf GC-Agar-Base-Platten bzw. BHI-Medium.

GC-Agar-Base-Platten: 36 g/l GC-Agar-Base, 15 g/l Peptose Pepton (Difco/Becton Dickenson, Maryland, USA), autoklaviert, Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix, 100 ml/l Pferdeserum (Biochrom), 10 mg/l Vancomycin, gegebenenfalls Zugabe von 4 mg/l Chloramphenicol bzw. 8 mg/l Kanamycin

BHI-Flüssigmedium: BHI-Medium supplementiert mit 10 % FCS, 1 % Vitaminmix; 0,1 % Vancomycin (10 mg/l)

Für die Herstellung des Vitamin-Mixes wurden zunächst zwei Lösungen separat hergestellt, komplett gelöst, vereinigt, auf 1000 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.

Vitamin-Mix: Lösung 1 (500 ml in dd. H₂O)
 100 g/l Dextrose; 10 g/l L-Glutamin; 26 g/l L-Cystein; 0,1 g/l Coocarboxylase; 0,02 g/l Fe(NO₃)₃; 0,003 g/l Thiamin-HCl; 0,013 g/l p-Aminobenzoesäure; 0,250 g/l NAD⁺; 0,010 g/l Vitamin B₁₂

Lösung 2 (300 ml in dd. H₂O + 15 ml HCl)

1,1 g/l L-Cystin; 1 g/l Adenin; 0,03 g/l Guanin-HCl; 0,150 g/l L-Arginin; 0,5 g/l Uracil

3.6 COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN

3.6.1 STATISTIK

Alle Daten in der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SigmaStat Version 2.03 unter Verwendung des *t-Testes nach Student*. Mit dem *t-Test nach Student* wird überprüft, ob sich zwei unabhängige Datengruppen signifikant unterscheiden. Voraussetzungen für den Test sind annähernde Normalverteilung und hohe Varianzhomogenität (Bühl und Zöfel, 1995; Precht und Kraft, 1992). Als statistisch signifikant wurden P-Werte $\leq 0,05$ angesehen (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,005$).

3.6.2 DATENBANKEN

Für die Literatursuche und Analyse von Proteinsequenzen wurden folgende Datenbanken im Internet genutzt:

NCBI (National Center for Biotechnology Information): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Human Protein Reference Database: <http://www.hprd.org>

Swissprot: <http://us.expasy.org/sprot>

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

3.7 KULTIVIERUNG VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN

Die Kultivierung der humanen Magenkarzinomzelllinie AGS (ATCC CRL 1739) erfolgte in 75cm²- bzw. 175cm²- Gewebekulturflaschen (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) in RPMI-1640-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), das mit 10% FCS und gegebenenfalls mit 1% Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) supplementiert war, bei 37°C und 5 % CO₂. Von einer konfluent gewachsenen Kultur wurde das Medium abgenommen und die adhärenzte Zellschicht zweimal mit PBS-Dulbecco's gewaschen, um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml bzw. 7 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) für 5 min bei 37°C und 5 % CO₂

inkubiert. Durch die Protease Trypsin werden die Zellen von der Oberfläche abgelöst und diese durch FCS-haltiges Medium inaktiviert. Nachdem die Zellen abgelöst wurden, konnten sie je nach Bedarf in neue Gewebekulturflaschen, in 6-Loch- bzw. 12-Loch-Platten oder in Gewebekulturschalen (alle Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) eingesät werden.

Die embryonalen Maus Fibroblasten $Shp2^{+/+}$; $Shp2^{-/-}$; $src^{-/-}$, $yes^{-/-}$, $fyn^{-/-}$ (SYF) und SYF^{+c-src} wurden in D-MEM-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), das mit 10 % FCS und gegebenenfalls mit 1 % Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) supplementiert war, angezüchtet. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte analog den AGS-Zellen.

Hitze-Inaktivierung von FCS

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das FCS für 30 min bei 56°C inkubiert und anschließend zu 50 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Einfrieren/ Auftauen von Zellen

Für eine Langzeitlagerung und zur Haltbarmachung ist es notwendig Zellen einzufrieren.

Einfriermedium: 90 % FCS; 10 % DMSO

Zu diesem Zweck wurden die Zellen, wie vorher beschrieben, trypsinisiert. Nach dem trypsinieren wurden sie aus der Zellkulturflasche entfernt, in ein steriles Reaktionsgefäß mit Medium gegeben und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet entsprechend in 1,8 ml Einfriermedium (2×10^6 Zellen) aufgenommen und in ein Einfrierrohrchen (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Die Zellen wurden zunächst für 24 h bei -70°C und dann im flüssigen Stickstoff für die Langzeitlagerung aufbewahrt.

Die in DMSO eingefrorenen Zellen müssen schnell bei 37°C aufgetaut werden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen sofort in das jeweilige Medium gegeben und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in Medium aufgenommen und die Zellen in die Gewebekulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wurde das noch vorhandene DMSO durch Mediumwechsel entfernt und die Zellen entsprechend weiter kultiviert.

3.8 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

3.8.1 KULTIVIERUNG VON *HELICOBACTER PYLORI*

Die Kultivierung von *H. pylori* erfolgte auf *GC-Agar-Base*-Platten (siehe 3.5) bei 37°C in Anaerobiertöpfen (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) für 48 h. Durch Zugabe von Campygen (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) wurde eine mikroaerophile Atmosphäre (5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂) geschaffen. Anschließend wurde ein Verdünnungssaustrich hergestellt. Dafür wurde der jeweilige *H. pylori*-Stamm mit einem sterilem Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) von der Platte abgenommen und in 1 ml BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) resuspendiert. Das Wattestäbchen wurde anschließend auf einer *H. pylori*-Platte ausgestrichen (erste Verdünnung), erneut in 1 ml BHI resuspendiert, auf einer *H. pylori*-Platte ausgestrichen (zweite Verdünnung), zum dritten mal in 1 ml BHI resuspendiert und auf einer *H. pylori*-Platte ausgestrichen (dritte Verdünnung). Nach zwei Tagen Inkubation in Anaerobiertöpfen in einer Campygen-Atmosphäre bei 37°C konnten die *H. pylori*-Stämme für Infektionsexperimente verwendet werden. Für die Infektionsexperimente wurde jeweils die 3. Verdünnung benutzt. Die Mutanten wurden auf den entsprechenden antibiotikahaltigen Platten angezüchtet.

Zur Stammerhaltung wurden die Bakterien einer dicht bewachsenen Platte in BHI mit 20 % Glycerin resuspendiert und bei –70°C eingefroren.

Anlegen von *H. pylori*-Flüssigkulturen

Zur Herstellung von *H. pylori*-Flüssigkulturen wurde der jeweilige *H. pylori*-Stamm von der dritten Verdünnung (siehe Kultivierung von *H. pylori*) in BHI-Flüssigmedium resuspendiert und über Nacht bei 37°C im Anaerobiertopf unter Campygen Atmosphäre (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) schüttelnd (160 rpm) inkubiert.

Kultivierung der Ko-Infektanten

Pseudomonas aeruginosa wurde auf Columbiablut-Agarplatten bei 37°C unter aeroben Bedingungen angezüchtet. Die Anzüchtung der Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika.

Die anaeroben Bakterien *Clostridium difficile* und *Bacteroides fragiles* wurden auf einer Schaedler-Platte bei 37°C anaerob angezüchtet.

Die Anzucht der aeroben Bakterien *Yersinia* spp. erfolgte auf speziellen *Yersinien*-Platten, wohingegen *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Bordetella* spp., *Staphylococcus*

spp., *Listeria* spp. und *Neisseria* spp. auf LB-Platten bei 37°C angezüchtet wurden. Die Anzucht der Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium.

Die *Campylobacter*-Stämme wurden auf *Campylobacter*-Platten (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) unter mikroaerophilen Bedingungen (5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂) für 48 h bei 37°C angezüchtet.

3.9 INFEKTIONSEXPERIMENTE

3.9.1 INFEKTIONEN MIT *HELICOBACTER PYLORI*

Für die Infektion mit *H. pylori* wurden AGS-Zellen in 6-Loch- bzw. 12-Loch-Platten oder in Gewebekulturschalen (alle Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit RPMI 1640, supplementiert mit 10 % FCS, eingesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70 – 80 % bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. *Helicobacter pylori* wurde mit einem sterilem Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann & Rascher, Rengsdorf) von der Agarplatte (dritte Verdünnung, siehe 3.8.1) abgenommen und in BHI resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien wurde photometrisch (OD=550 nm) bestimmt. Bei der Verwendung einer *H. pylori*-Flüssigkultur wurde diese photometrisch bestimmt. Die Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100 infiziert. Zu den nicht-infizierten Zellen wurde das gleiche Volumen an DPBS zugegeben. Die mit *H. pylori* infizierten Zellen wurden im CO₂-Inkubator für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Mittels Phasenkontrast-Mikroskop wurde die Infektion analysiert und die Zellen entsprechend weiter verarbeitet.

3.9.2 KO-INFEKTIONSEXPERIMENTE

Für die Ko-Infektionsexperimente wurden die AGS-Zellen in 6-Loch-Platten oder in Gewebekulturschalen mit RPMI 1640, supplementiert mit 10 % FCS, eingesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70 – 80 % bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden 30 min vor der Infektion mit *H. pylori*, mit den jeweiligen weiteren Pathogen mit entsprechender MOI (siehe Tabelle 8.2 Anhang), infiziert. *Helicobacter pylori* wurde zeitgleich mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100 eingesetzt. Die infizierten Zellen wurden im CO₂-Inkubator für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Mittels Phasenkontrast-Mikroskop wurde die Infektion analysiert und die Zellen entsprechend weiter verarbeitet.

3.9.3 INFEKTION IM TRANSWELL-SYSTEM

Die Infektionsexperimente mittels Transwell-Filter-System wurden eingesetzt, um die Kontaktabhängigkeit bzw. Unabhängigkeit des Effektes der Ko-Infektanten auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp darzustellen. Hierfür wurde das Transwell-Filter-System (Corning B.V. Life Sciences, Schiphol, Niederlande) mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Diese Porengröße verhindert das Durchdringen von Bakterien. Lösliche Faktoren, wie Toxine, können durch die Membran allerdings diffundieren.

AGS-Zellen wurden in einer 12-Loch-Platte wie beschrieben eingesät und vor der Infektion das Transwell-Filter-System eingesetzt. *Helicobacter pylori* wurde zu den AGS-Zellen in die untere Kammer gegeben und die jeweiligen Ko-Infektanten in die obere Kammer auf die Membran. Als Kontrollen wurden die Zellen nur mit dem Ko-Infektant in der oberen Kammer infiziert. Die Zellen wurden für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend die Ausbildung des Elongationsphänotyps mittels Phasenkontrastmikroskop analysiert. Die Unpassierbarkeit der Membran für Bakterien wurde mikroskopisch und durch Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten/ml (*cfu*, *colony forming units*) überprüft.

3.9.4 BESTIMMUNG DER KOLONIE-BILDENDEN-EINHEITEN (CFU)

Die Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten (*cfu*; *colony forming units*) wurde eingesetzt, um toxische Effekte auf *H. pylori* in Folge von Inhibitoren auszuschließen und zur Kontrolle der Infektionen im Transwell-Filter-System. Dazu wurden die AGS-Zellen, wie beschrieben, infiziert und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Danach erfolgte das Anlegen von Verdünnungsreihen in den Stufen 1/10, 1/100, 1/1000 und 1/10000 in DPBS und anschließendem Ausplattieren auf *Helicobacter*-Platten. Nach einer viertägigen Inkubation im Anaerobiertopf in einer Campygen-Atmosphäre (5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂) bei 37°C erfolgte die Bestimmung der Kolonie-bildenden-Einheiten/ml der einzelnen Verdünnungsstufen.

3.10 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.10.1 TRANSFORMATION

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien nach chemischer oder physikalischer Behandlung.

SOC-Medium: 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂;
20 mM Glukose in H₂O

Chemische Transformation von *E. coli*

Für die chemische Transformation von *E. coli*-TOP-10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden diese langsam auf Eis aufgetaut, wahlweise mit dem Ligationsansatz oder der Plasmid-DNA versetzt, und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 min bei 42°C einem Hitzeschock im Wasserbad unterzogen und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Platten in geeigneter Verdünnung ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroporation von *E. coli*-Zellen

Für die Elektroporation wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, die Plasmid-DNA hinzugegeben und der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mittels einer Easyject Prima Apparatur (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland) bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium gegeben, für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, in geeigneten Verdünnungen auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.10.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Jetstar *Plasmid Purification Maxi*-Kit nach Angaben des Herstellers (Genomed, Löhne, Deutschland).

3.10.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PLASMID-DNA

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde bei 260 nm mit dem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt.

3.11 TRANSIENTE UND STABILE TRANSFEKTION VON DNA UND siRNA

Die Transfektion beschreibt die Aufnahme von DNA bzw. Oligonukleotiden in eine eukaryontische Zelle nach chemischer oder physikalischer Behandlung.

3.11.1 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON PLASMID-DNA

Die Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen beruht auf der Bildung eines zellgängigen Polykation-DNA-Komplexes. Dieser entsteht durch die Verwendung eines polykationischen Transfektionsreagenzes, das einen Komplex mit der polyanionischen DNA bildet. Die Komplexe werden dem Kulturmedium zugegeben, adsorbieren an der Zelloberfläche, werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen und im Endosom eingeschlossen. Ist die Lebensdauer der aufgenommenen DNA nur auf wenige Tage beschränkt, handelt es sich um eine transiente Transfektion. Als Transfektionsreagenz wurde das *GeneJammer Transfection Reagent* (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Es wurden 2-4 µg Plasmid-DNA zu 8×10^5 Zellen gegeben und 36-48 h nach Transfektion wurden die Zellen entsprechend weiter verarbeitet.

3.11.2 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON siRNA

Bei dem Prinzip der RNA-Interferenz handelt es sich um eine Methode der Genabschaltung auf der Transkriptionsebene. Dazu werden kurze doppelsträngige RNA-Fragmente in die Zielzelle eingeschleust. Diese siRNAs bringen zelleigene Endonukleasen dazu, die zur siRNA komplementäre mRNA zu schneiden (Cullen, 2002).

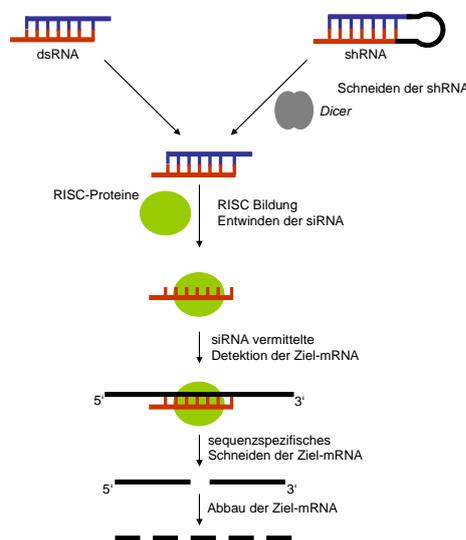


Abb. 3.1: **Schematische Darstellung der siRNA-vermittelten Genabschaltung.** Synthetisch produzierte siRNA oder ein shRNA-Expressionsvektor werden in die Zelle transfiziert. In der Zelle wird die shRNA durch das RNase-III ähnliche Enzym *Dicer* geschnitten und kann dann von den Proteinen des RISC Komplexes gebunden werden. Die Bildung des RISC-Komplexes führt zum Entwinden der siRNA und die siRNA-vermittelte Detektion des komplementären Ziel-mRNA Stranges kann erfolgen. Die Ziel-mRNA wird sequenzspezifisch durch Proteine des RISC-Komplexes geschnitten und führt zum Abbau der mRNA (in Anlehnung an Kurreck, 2003).

Die transiente Transfektion der siRNA-Oligonukleotide erfolgte mit dem siRNA-Transfektionsreagenz von Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. AGS-Zellen (2×10^5) wurden in 6-Loch-Platten wie beschrieben eingesät. Für die Transfektion wurden zwei separate Reaktionsgefäße vorbereitet. In einem Gefäß wurde 1 µg siRNA mit dem Transfektionsmedium (80 µl) und in dem anderen 4,8 µl Transfektions-Reagenz mit 80 µl Transfektionsmedium gemischt und beide für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Reaktionsgefäße gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 640 µl Transfektionsmedium. Das Medium von den Zellen wurde entfernt und das siRNA-Transfektionsreagenz-Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation für 5-7 h bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Zugabe von 1 ml Wachstumsmedium (RPMI 1640, 20 % FCS, 2 % PS), die Zellen wurden erneut für 36 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und entsprechend weiter verarbeitet.

3.11.3 STABILE TRANSFEKTION VON SHRNA

Die stabile Transfektion der c-Abl shRNA wurde das pSilencer2.1™-U6-Hygro-Vektorssystem (Ambion, Austin, TX, USA) verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurde eine unspezifische (*scrambled*) shRNA transfiziert. Die Transfektion mit Effectene (Quiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Durch Zugabe von 200 µg/ml Hygromycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) konnten die stabil transfizierten Zellen selektiert werden. Die Zellen wurden von Dr. Silja Wessler (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) zur Verfügung gestellt.

3.12 BIOCHEMISCHE METHODEN

3.12.1 *IN VITRO*-KINASE-REAKTIONEN

Die *in vitro* Phosphorylierung wurde eingesetzt, um die Phosphorylierbarkeit von CagA und CrkII *in vitro* darzustellen. Dazu wurden gereinigte rekombinante Kinasen, aber auch Zelllysate eingesetzt.

Kinase-Puffer: 25 mM Hepes pH 7,0; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 % Nonidet P-40; 5 mM DTT; 1 mM Na₃VO₄; COMPLETE™

2 x SDS-Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin; 100 mM DTT

in vitro-Phosphorylierung von CagA mit rekombinanter c-Src- oder c-Abl-Kinase

10^{10} CagA^{WT} bzw. CagA^{Y899/918/972F} exprimierende *H. pylori*-Stämme wurden in 1 ml eiskaltem Kinase-Puffer resuspendiert und durch 10-maliges durchziehen durch eine Injektionsspritze (d=0,3 mm) lysiert. 5 U von c-Src (Upstate/ Millipore (Billerica, MA, USA) oder c-Abl (NEB, Frankfurt, Deutschland) wurden zu 30 μ l *H. pylori*-Lysat gegeben. Nach der Zugabe von 1 μ M ATP (NEB, Frankfurt, Deutschland) wurden die Ansätze für 30 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 μ l 2xSDS Probenpuffer beendet.

in vitro-Phosphorylierung von CagA mit Lysaten von SYF- und SYF^{+c-Src}-Zellen

10^{10} CagA^{WT} exprimierende *H. pylori*-Stämme wurden in 200 μ l eiskaltem Kinase-Puffer resuspendiert und durch 10-maliges durchziehen durch eine Injektionsspritze (d=0,3 mm) lysiert. 1×10^7 SYF- oder SYF^{+c-Src}-Zellen wurden mit 50 μ M Na₃VO₄/H₂O₂ für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ stimuliert, anschließend in 1 ml eiskaltem Kinase-Puffer resuspendiert und analog den *H. pylori*-Lysaten lysiert. 25 μ l Zelllysate wurden mit 25 μ l *H. pylori*-Lysat und 1 μ M ATP für 30 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Gegebenenfalls erfolgte zusätzlich die Zugabe des Src-Kinase-Inhibitors PP2 (20 μ M) oder des c-Abl-Inhibitors SKI-DV2-43 (1 μ M). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 μ l 2xSDS-Probenpuffer beendet.

in vitro-Phosphorylierung von CrkII-GST

AGS-Zellen wurden für 50 min oder 240 min mit *H. pylori* infiziert und c-Abl anschließend immunopräzipitiert. Die Zelllysate wurden nach der Immunopräzipitation in 100 μ l Kinase-Puffer resuspendiert und mit 1 μ g CrkII-GST, 1 μ M ATP und gegebenenfalls SKI-DV2-43 für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l 2xSDS-Probenpuffer wurde die Reaktion beendet.

3.12.2 IMMUNOPRÄZIPITATION

Die Immunopräzipitation (IP) ermöglicht die Isolierung eines bestimmten Antigens und dessen Interaktionspartners aus einer nativen Proteinmischung.

| | |
|------------------------------|--|
| Lysispuffer: | 20 mM Tris pH 7,2; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % TitonX-100; 10 % Glycerol; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; COMPLETE™ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) |
| 2 x SDS-Probenpuffer: | 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin; 100 mM DTT |

Für die IP wurden 1×10^7 AGS-Zellen mittels Zentrifugation (5 min; 5000 rpm; 4°C) pelletiert, mit eiskaltem PBS gewaschen und für 30 min mit 800 µl Lysispuffer bei 4°C lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia), die zuvor mit DPBS und Lysispuffer gewaschen wurde, für 2 h bei 4°C inkubiert. So wurden Proteine, die sich unspezifisch an die Protein-G-Sepharose binden, aus der Zellsuspension entfernt. Die Protein-G-Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) wurde mittels Zentrifugation (5 min; 3000 rpm; 4°C) aus der Zellsuspension entfernt und der jeweilige Antikörper (2 µg) zu dem Überstand gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mit in DPBS und Lysispuffer gewaschener Protein-G-Sepharose für 2 h bei 4°C inkubiert und durch Zentrifugation (5 min; 5000 rpm; 4°C) präzipitiert. Nachdem die erhaltenden Präzipitate einmal mit Lysispuffer und 3-mal mit 0,5 x PBS gewaschen wurden, erfolgte die Zugabe von 2 x SDS-Probenpuffer und anschließende Analyse mittels SDS-PAGE. Im Fall der *in vitro*-Phosphorylierung nach IP wurden die erhaltenden Präzipitate nicht in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.12.3 ZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG

Die schrittweise Extraktion von vier verschiedenen Proteinfractionen (Zytosolische-, Membran-, Kern- und Zytoskelettfraction) wurde mit dem ProteoExtract *S-PEK Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Deutschland). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Zelllysate nativ präzipitiert werden und so den verschiedenen Anwendungen zur Verfügung stehen.

Um die subzelluläre Lokalisierung von verschiedenen GTPasen nachzuweisen, wurden AGS-Zellen (1×10^7) mit *H. pylori* und *P. aeruginosa* für 4 h infiziert, die Zellen anschließend von der Gewebekulturschale mit einem Zellschaber geerntet, für 10 min bei 4°C 3000 rpm pelletiert, mit 2 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Auf das Pellet wurden 1 ml Extraktionspuffer I und 5 µl Protease-Inhibitor gegeben und bei 4°C für 10 min rotierend inkubiert. Die zytosolischen Proteine wurden durch anschließende Zentrifugation bei 4°C 10000 rpm 10 min im Überstand erhalten. Folgend wurden die Membranproteine nach Zugabe des Extraktionspuffers II (1 ml) und 5 µl Protease-Inhibitor, 30 min rotierender Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 10 min) erhalten. Die Isolation der Kernproteine erfolgte durch die Zugabe von 1 ml Extraktionspuffer III, 5 µl Protease Inhibitor und 1,5 µl Benzonase. Die Lysate wurden für 10 min bei 4°C rotierend inkubiert und die Kernproteine von den Zytoskelettproteinen durch Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 10 min) getrennt. Die Kernproteine befanden sich im Überstand und das Pellet stellte die Zytoskelettproteine dar. Diese wurden in 500 µl Extraktionspuffer IV und 5 µl Proteaseinhibitor resuspendiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Zelllysate

wurde nach der Methode von Bradford (siehe 3.12.4) bestimmt und anschließend mit Hilfe des Westernblots (siehe 3.12.5) die Lokalisation der GTPasen analysiert.

3.12.4 PROTEINBESTIMMUNG

Die Gesamt-Proteinkonzentrationen der einzelnen Zellfraktionen (siehe Fraktionierung) wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 bindet in saurer Lösung an Proteine und wird dabei vom kationischen in den anionischen Zustand überführt. Beide Zustände absorbieren bei unterschiedlichen Wellenlängen. Diese Absorbptionsänderung von 470 nm zu 595 nm ist über weite Bereiche der Proteinkonzentration proportional.

Zu diesem Zweck wurden zu 800 µl Wasser 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad, München, Deutschland) und 5 µl Standard bzw. Probe gegeben und nach zehnmütiger Inkubation bei 595 nm gegen Wasser/ Bradfordreagenz gemessen. Die Absorbionsmessungen wurden anschließend auf einer Kalibriergerade mit BSA bezogen.

3.12.5 SDS-PAGE, COOMASSIE-FÄRBUNG UND WESTERNBLOT

SDS-PAGE

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen Natrium-Dodezyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durch das Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Bei dieser SDS-PAGE beruht das Prinzip auf den unterschiedlichen Ladungszuständen des Glyzins im Trenn- und Sammelgel. Im Sammelgel ist das Glyzin aufgrund seines pH-Wertes von 6,8 elektrisch neutral und die durch SDS, einem anionischen Detergenz, negativ geladenen Proteinkomplexe bilden die Leitonen und sammeln sich an der Lauffront. Im Trenngel hingegen ist das Glyzin aufgrund des pH-Wertes von 8,8 negativ geladen und fungiert somit als Leitton. Die reduzierten, denaturierten und durch SDS negativ geladenen Proteine liegen als Anionen mit gleicher Ladungsdichte vor, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld proportional dem Molekulargewicht ist.

Die SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von Zellysaten und IPs, unter Verwendung des vertikalen Gelelektrophoresesystems Mini-Protean-III™ (Bio-Rad, München, Deutschland), eingesetzt.

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8

Sammelgelpuffer: 1,0 M Tris-HCl; pH 7,4

Gellaufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS ; pH 8,3

Zunächst wurde das Trenngel, welches je nach Anwendung 6, 8, 10, 12 oder 15 % Acrylamid enthielt, gegossen und nach der Polymerisierung mit dem Sammelgel (4 %) überschichtet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Gelkassette wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Gellaufpuffer gefüllt. Die in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Lysate wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 10-30 µl aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde parallel der Proteingrößenstandard Page-Ruler-Prestained™ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht oder auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Roth, Karlsruhe, Deutschland) transferiert.

Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist eine Methode zur Visualisierung und Abgleich von Proteinbanden nach der Auftrennung in der SDS-PAGE. Gleichzeitig mit dem Färben werden die Proteine im Gel fixiert. Das Fixieren erfolgt durch eine Methanol-Essigsäure-Wasser-Mischung in der die Coomassie Farbe enthalten ist. Man erreicht mit diesem Farbstoff eine Nachweisempfindlichkeit von 1 µg bis 0,1 µg.

Färbelösung: 50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,05 % Serva-Blue R-250 in H₂O

Entfärbelösung: 5 % Methanol; 12,5 % Essigsäure in H₂O

Fixierlösung: 20 % Glycerin in H₂O

Das Gel wird nach der Auftrennung in der SDS-PAGE in die Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung für 30 min bei RT gegeben. Die Proteine werden durch die Essigsäure fixiert und das enthaltene Methanol bringt den Coomassie-Farbstoff in Lösung. Dieser lagert sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren an und macht so die Proteine sichtbar. Die Entfärbelösung wäscht den unspezifisch gebundenen Farbstoff aus dem Gel heraus. Der Entfärbeprozess ist beendet, wenn das Gel nahezu komplett entfärbt ist und nur die Proteinbanden sichtbar sind. Legt man die Gele nach dem Entfärbeprozess in die Fixierlösung, dann ist eine Langzeitlagerung möglich.

Westernblot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran übertragen und für Immunfärbungen fixiert werden (Towbin *et al.*, 1979). In diesem Fall erfolgt der Transfer mittels eines „*semidry*“-Graphitplattensystems (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Bei der so genannten „*semidry*“-Methode liegen Gel und Membran zwischen puffergetränkten Filterpapieren, der Aufbau selbst ist nicht vom Puffer umgeben. Die Spannung wird durch zwei außen angelegte Graphitplatten erzeugt und die durch das SDS negativ geladenen Proteine, wandern im elektrischen Feld in Richtung der anodisch angeordneten Membran.

Transferpuffer: 20 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,4

1 x TBST: 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20; pH 7,4

1 x PBST: 130 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄,
0,1 % (v/v) Tween-20; pH 7,2

Der Transfer, der durch die SDS-PAGE getrennten Proteine, erfolgte auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter Verwendung der *semidry* Blot-Apparatur (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Auf die Graphitanode wurde ein Stapel aus drei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren gelegt. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 5 min in Methanol permeabilisiert, in Transferpuffer gelegt und anschließend auf den Filterpapierstapel gelegt. Das Gel wurde aus der Elektrophoreseapparatur entnommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Es folgten wiederum drei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere und die Apparatur wurde durch Auflegen der Graphitkathode geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte für 2 h bei 0,8 mA/cm².

Die durch den Blotvorgang auf der Membran immobilisierten Proteine können durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.1). Zuerst wurden die unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran mit dem jeweiligen Blockierungspuffer geblockt. Dieses erfolgte je nach Antikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 3 % Rinderserum-Albumin Fraktion V (BSA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in TBST oder in 5 % Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in TBST bzw. in PBST. Danach wurde die Membran mit der in 3 % BSA, 5 % BSA oder 5 % Milchpulver verdünnten Antikörperlösung (in Abhängigkeit der Antikörper) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der erste Antikörper bindet spezifisch an sein Antigen. Nach dem Entfernen der Antikörperlösung und dreimaligem Waschen mit TBST, PBST bzw. H₂O für 15 min, erfolgte die Zugabe des in 3 % BSA oder 5 % Milchpulver 1/1000

verdünnten, sekundären Antikörpers für 1 h bei RT im Dunkeln. Die sekundären Antikörper erkennen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers und wurden als HRP-Konjugat eingesetzt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST, PBST oder H₂O für 15 min erfolgte die Visualisierung des Protein-Antikörper-Komplexes durch Chemilumineszenz unter Verwendung des ECL Plus Westernblotting Detection Reagents™ (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland). Die Detektion und Dokumentation erfolgte am Lumi Imager F-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Entfernen („Strippen“) von Antikörpern von der PVDF-Membran

„*Stripping-Puffer*“: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 100 mM β -Mercaptoethanol; 2 % SDS

Um auf derselben Blotmembran nacheinander verschiedene Antigene nachzuweisen, wurden die an die Membran gebundenen Antikörper entfernt. Dazu wurde die getrocknete Membran in Methanol für 5 min behandelt und anschließend für 45 min bei 58°C im *Stripping-Puffer* inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran erneut blockiert und stand einer erneuten Antikörperfärbung zur Verfügung.

3.12.6 ELISA

Der Enzym-gekoppelte Immunadsorptions-Assay (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*, ELISA) ist eine semiquantitative Nachweismethode für Proteine. In dieser Arbeit ist die IL-8-Protein-Menge nach Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori* oder nach Transfektion von AGS- bzw. Shp2^{+/+}- bzw. Shp2^{-/-}-Zellen mit verschiedenen CagA-Konstrukten aus dem Überstand bestimmt worden. Beim ELISA wird zunächst eine ELISA-Kunststoffplatte mit dem, für das nachzuweisende Protein, spezifischen Antikörper (*Capture-Antibody*) beschichtet und anschließend die Proteinlösung dazugegeben. Nicht gebundenes Protein wird abgewaschen und die freien Bindungsstellen mit Blockierungspuffer geblockt. Die Detektion des gebundenen Proteins erfolgt durch Zugabe eines biotinylierten Detektionsantikörpers und anschließender Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung, die eine zur Konjugatkonzentration äquivalente Färbung hervorruft. Diese wird mittels eines Photometers gemessen und die Konzentration des nachzuweisenden Proteins anhand einer Standardkurve berechnet.

Für die Bestimmung der freigesetzten IL-8-Mengen aus AGS-Zellen wurde das OptEIA™ Human IL-8 Set nach Angaben des Herstellers verwendet (BD-Bioscience, Heidelberg, Deutschland).

| | |
|----------------------------|---|
| Coating-Puffer: | PBS |
| Blockierungspuffer: | PBS + 10 % FCS |
| Assay-Puffer: | PBS + 10 % FCS |
| Wasch-Puffer: | 130 mM NaCl, 90 mM Na ₂ H ₂ PO ₂ x H ₂ O, 1 mM KH ₂ PO ₄ , 3 mM KCl |
| Substrat-Lösung: | Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) |
| Stopp-Lösung: | 2 N H ₂ SO ₄ |

Die ELISA-Platten (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden mit je 100 µl in *Coating*-Puffer verdünnten α-IL-8-Antikörper beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch einen Waschschrift entfernt und die freien Bindungsstellen mit je 200 µl Blockierungspuffer abgesättigt. Die Platte wurde anschließend für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte erneut gewaschen und je 100 µl der 1/20 in Assay-Puffer verdünnten Proben bzw. die definierten Standardlösungen dazugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen und es erfolgte die Zugabe von je 100 µl des in Assay-Puffer verdünnten Detektionsantikörpers und des Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Gemisches. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde erneut gewaschen und je 100 µl der Substrat-Lösung dazugegeben und für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 50 µl Stopp-Lösung beendet und die Platten am Plattenphotometer (SpectraFluor Plus, Tecan) bei 450 nm gemessen. Die Proben wurden jeweils einer Dreifachbestimmung unterzogen.

Für die Bestimmung der gebildeten IL-8-Mengen nach Transfektion von CagA-Konstrukten in Shp2^{+/+}- bzw. Shp2^{-/-}-Zellen wurde das Quantikine® mouse KC Set (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die ELISA-Platten waren bereits mit dem spezifischen α-KC-(Maus)-Antikörper beschichtet und die Proben bzw. Standardlösungen konnten direkt dazugegeben werden. Der weitere Ablauf war analog dem zuvor beschriebenen ELISA bzw. den Angaben des Herstellers.

3.13 MIKROSKOPISCHE METHODEN

3.13.1 PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE

Für die Phasenkontrastmikroskopie wurden die Zellen direkt in dem jeweiligen Zellkulturgefäß an einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einer 20-fachen Vergrößerung betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit der CCD-Kamera MP Focus 5000 (Intas, Göttingen, Deutschland) und dem Programm ImageProPlus (MediaCybernetics, Wokingham Berkshire, UK).

3.13.2 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ZELLEN

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde angewandt, um (i) den Phänotyp von transfizierten Zellen nach *H. pylori*-Infektion, (ii) die NF- κ B-Lokalisierung in Gegenwart von CagA oder (iii) die Induktion des IL-8-GFP-Promotors in Gegenwart von CagA darzustellen.

| | |
|----------------------------------|---|
| Fixierlösung: | 3,8 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS |
| Permeabilisierungslösung: | 0,5 % TritonX-100 in PBS |
| Blockpuffer: | 1 % BSA, 0,1 % Tween-20 in PBS |
| Einbettmedium: | Vectashild (Vector Labs, Peterborough, UK) + Glycerin (1:1) + 2 % DABCO (1,4-diazobicyclo-(2,2,2)-octan) |

Die AGS-Zellen wurden auf runden Deckgläsern (12 mm Durchmesser, Omnilab, Bremen, Deutschland) eingesät und entsprechend weiter verarbeitet. Im Anschluss an die Infektion wurden die Zellen mit 3,8 % PFA für 25 min fixiert, mit DPBS gewaschen und konnten dann sofort angefärbt oder in DPBS bei 4°C gelagert werden. Für die Färbung mussten die Zellen zunächst mit 0,5 % TritonX-100 Lösung für 1 min permeabilisiert, dreimal mit DPBS gewaschen und anschließend für 45 min im Blockpuffer blockiert werden. Bei der indirekten Färbung wurde dann der erste Antikörper (verdünnt im Blockpuffer) zu den Zellen gegeben und anschließend die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Nachdem die Zellen erneut für 10 min im Blockpuffer blockiert wurden, erfolgte die Zugabe des in Blockpuffer verdünnten sekundären Antikörpers für 45 min. Bei der direkten Färbung durch die Verwendung von Rhodamin-gekoppelten Phalloidin (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) waren der zweite Blockierungsschritt und der sekundäre Antikörper nicht notwendig. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und im

Einbettmedium überschichtet. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Phalloidin

Phalloidin, ein Gift des weißen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, lagert sich seitlich an Aktinfilamente an und blockiert dadurch die Depolymerisation (Cooper, 1987). Durch Fluorochrome, wie zum Beispiel Rhodamin, die an Phalloidin gekoppelt werden, können Aktinfilamente für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

3.13.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die für die Immunfluoreszenzmikroskopie angefärbten Zellen wurden mit dem Leica DMRE7 (Leica, Wetzlar) Fluoreszenzmikroskop ausgestattet mit einer CCD-Kamera Spot-RT (Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA) und einem 63/1,4 Objektiv analysiert und dokumentiert. Die Auswertung und Überlagerung der Bilder erfolgte mit der SPOT Advanced (Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA) bzw. ImageJ Software (National Institute of Health, USA).

4 ERGEBNISSE

Aufgrund der Tatsache, dass zu Beginn meiner Promotionsarbeit wenig über die CagA-induzierten Signalwege bekannt war (Abb. 1.5), sollten sowohl die CagA-abhängige Interleukin-8-(IL-8)-Ausschüttung als auch die Aktin-zytoskelettalen Veränderungen näher untersucht werden. Die Infektion von AGS-Zellen mit *cagPAI*-positiven (*cagPAI*⁺) *H. pylori*-Stämmen weist folgende Charakteristika auf: (i) die Ausbildung des „Elongationsphänotyps“ (Abb. 4.1), (ii) die CagA-Translokation und (iii) -Phosphorylierung sowie (iv) die IL-8-Ausschüttung (Abb. 4.2). Der Elongationsphänotyp ist durch die Bildung von dünnen, nadelförmigen Zellfortsätzen mit einer Länge von 20-70 µm charakterisiert. Dabei kommt es auch zur Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen und einer verstärkten Zellbewegung, der so genannten Zellstreuung. Diese morphologischen Veränderungen treten bei 65-80 % der mit *H. pylori* (*cagPAI*⁺) infizierten AGS-Zellen auf (Backert *et al.*, 2001).

Im ersten Teil meiner Arbeit werde ich die CagA-abhängige IL-8-Ausschüttung durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB darstellen. Die nachfolgenden Untersuchungen beziehen sich auf die Analyse einer weiteren CagA-phosphorylierenden Kinase sowie auf den Einfluss des Adapterproteins CrkII und der kleinen Rho-GTPasen auf die *H. pylori*-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen.

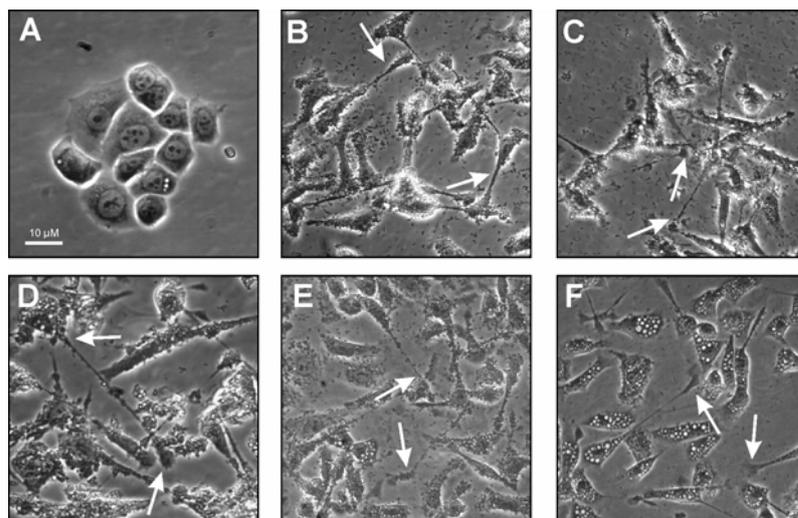


Abb. 4.1: **Phänotypische Analyse von AGS-Zellen nach Infektion mit verschiedenen *H. pylori* WT-Stämmen.** AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* WT-Stämmen (MOI = 100) für 8 h infiziert. Im Vergleich zur (A) nicht infizierten Kontrolle sind die Zellen nach Infektion mit (B) P1, (C) 26695, (D) ATCC, (E) Ka204 oder (F) P310 langgestreckt und es kommt zur Zellstreuung (Erläuterungen im Text).

4.1 CagA-ABHÄNGIGE INTERLEUKIN-8-SEKRETION

In früheren Studien verschiedener Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass AGS-Zellen, die mit *cagPAI*⁺ *H. pylori*-Stämmen infiziert wurden, IL-8 sekretieren, der auslösende Faktor war aber noch unklar (Crabtree *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996, Sharma *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001). Aufgrund der Tatsache, dass Δ *cagA*-Mutanten in einzelnen Studien bei kurzer Inkubationsdauer ebenfalls eine signifikante Menge an IL-8 sekretieren, wurde CagA als nicht essentiell für die IL-8-Sekretion beschrieben (Crabtree *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001). Dieses Dogma hielt sich lange in der Literatur, wurde aber nie systematisch untersucht.

Um die Rolle von CagA im Detail zu untersuchen, wurden AGS-Zellen mit sieben verschiedenen *H. pylori*-Stämmen mit unterschiedlichem klinischen Krankheitsbild (Tab. 3.1) für 8 h infiziert und die IL-8-Ausschüttung analysiert. Alle *cagPAI*⁺-Stämme sekretieren hohe Mengen (< 1000 pg/ml) von IL-8. Aufgrund der unterschiedlichen Mengen an sekretiertem IL-8 konnten die *H. pylori*-Stämme in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Gruppe-A charakterisiert die Stämme, die mehr als 2000 pg/ml IL-8 induzieren, wobei die Gruppe-B die Stämme beinhaltet, die ca. 1000 pg/ml IL-8 induzieren. Sowohl die Stämme der Gruppe-A als auch die der Gruppe-B führen zu einer starken CagA-Phosphorylierung in AGS-Zellen (Abb. 4.2 B). Damit wird deutlich, dass das T4SS in allen Stämmen funktionell ist. Die deutlichen Unterschiede der IL-8-Induktion zwischen *cagPAI*⁺-Stämmen weisen darauf hin, dass die IL-8-Induktion nicht nur von einem funktionellen T4SS abhängig ist, sondern möglicherweise auch von CagA oder einem anderen Faktor. Neben einem funktionalen T4SS wird die Expression von OipA als ein möglicher IL-8-induzierender Faktor diskutiert (Yamaoka *et al.*, 2000). Die Analyse der OipA-Expression mittels Westernblot zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den Stämmen der Gruppe-A und -B, da sowohl in der Gruppe der starken IL-8- als auch in der Gruppe der schwachen IL-8-Induktoren eine starke OipA-Expression nachgewiesen werden konnte. Abweichend davon weist der *H. pylori*-Stamm NCTC11637 (Gruppe-A) eine niedrige und der Stamm Ka204 (Gruppe-B) keine Expression von OipA auf (Abb. 4.2 D). Des Weiteren war die IL-8-Sekretion der P1 Δ *oipA*-Mutante im Vergleich zum P1 WT nicht signifikant reduziert (Abb. 4.2 E).

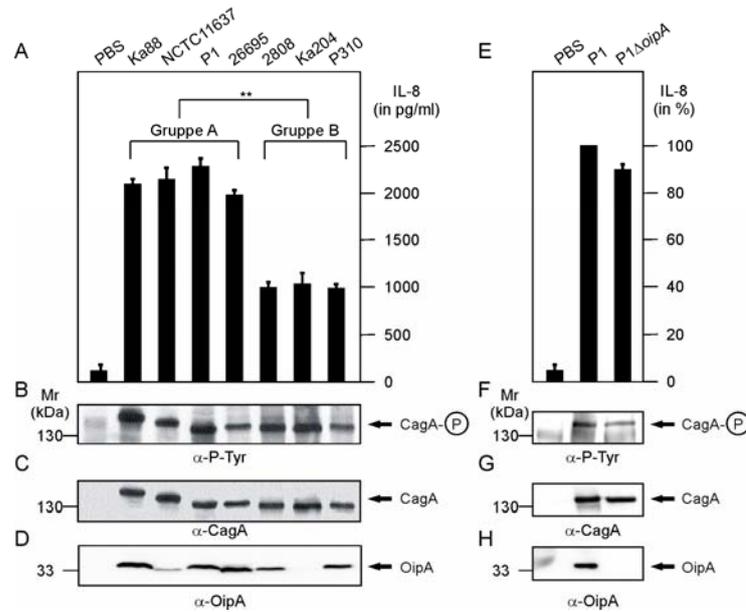


Abb. 4.2: **Identifizierung von *cagPAI*-positiven *H. pylori*-Stämmen, die eine hohe und niedrige IL-8-Sekretion induzieren.** (A) Die IL-8-Sekretion von AGS-Zellen nach Infektion mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen wurde mittels ELISA analysiert. (B) Die Translokation und Phosphorylierung von CagA mittels Westernblot-Analyse wurde mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper PY-99 verfolgt. Die CagA- bzw. OipA-Expression wurde mit dem spezifischen CagA-Antikörper α -CagA (C) bzw. OipA-Antikörper α -OipA (D) kontrolliert. Der Einfluss der OipA-Expression auf die IL-8-Sekretion wurde mit Hilfe der P1 Δ oipA-Mutante analysiert (E-H). Die Pfeile zeigen die Positionen der jeweiligen Proteine auf der Membran. AGS-Zellen wurden für 9 h bei einer MOI von 100 mit den angegebenen Stämmen infiziert. Für die nicht infizierte Kontrolle wurde PBS zu den Zellen gegeben. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (P1^{WT} = 100 % IL-8; $P < 0,005$ **).

Nach der Einteilung der *H. pylori*-WT-Stämme in hoch und niedrig IL-8-induzierende Stämme, wurde nachfolgend der molekulare Mechanismus der unterschiedlichen IL-8-Sekretion in den Gruppe-A/B-Stämmen untersucht. Dazu wurden die jeweiligen T4SS-Mutanten (Δ virB11) und *cagA*-Mutanten (Δ cagA), in ihrer Fähigkeit IL-8 zu induzieren, untersucht. AGS-Zellen wurden für 9 h mit den *H. pylori*-Stämmen infiziert und die Kulturüberstände mittels IL-8-ELISA untersucht. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Crabtree *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996, Sharma *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001, Viala *et al.*, 2004), wurde eine starke Abnahme der IL-8-Sekretion bei allen Δ virB11-Mutanten detektiert (Abb. 4.3). Damit kann bestätigt werden, dass für die IL-8-Sekretion ein funktionales T4SS erforderlich ist. Überraschenderweise wiesen auch die Δ cagA-Mutanten der Stämme der Gruppe-A eine signifikante Reduktion der IL-8-Sekretion auf (Abb. 4.3 A), wohingegen die IL-8-Sekretion der Δ cagA-Mutanten der Stämme der Gruppe-B vergleichbar der WT-induzierten IL-8-Konzentrationen war (Abb. 4.3 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es mindestens zwei T4SS-abhängige Mechanismen der *H. pylori*-induzierten IL-8-Sekretion gibt und darüber hinaus bei den Stämmen der Gruppe-A ein weiterer CagA-abhängiger Mechanismus existieren könnte.

Zur Analyse des CagA-abhängigen Mechanismus erfolgte der Austausch der *cagA*-Gene zwischen den hoch- und niedriginduzierenden Stämmen. Nach Infektion von AGS-Zellen mit den generierten Stämmen wurde die IL-8-Freisetzung mittels ELISA bestimmt. Dabei konnte deutlich eine CagA-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Komplementiert man den P1 Δ *cagA*-Stamm mit dem CagA des Gruppe-A-Stammes 26695, erhält man dem P1 WT entsprechende IL-8-Werte. Im Gegensatz dazu führt die Komplementation des P1 Δ *cagA*-Stammes mit dem CagA der Gruppe-B-Stämme P310 bzw. 2808 zu einer der Gruppe-B entsprechenden IL-8-Sekretion (Abb. 4.3 A). Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Komplementation von P310 Δ *cagA* und 2808 Δ *cagA* (Gruppe-B-Stämme) mit dem CagA des Gruppe-A-Stammes 26695 erzielt werden (Abb. 4.3 D). Der Austausch von CagA eines hochinduzierenden- bzw. niedriginduzierenden-Stammes gegen ein CagA eines niedriginduzierenden- bzw. hochinduzierenden-Stammes resultiert in einen niedriginduzierenden- bzw. hochinduzierenden-Stamm. Die CagA-Translokation und -Phosphorylierung konnte bei allen komplementierten Stämmen als Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 4.3 B-C; 4.3 E-F).

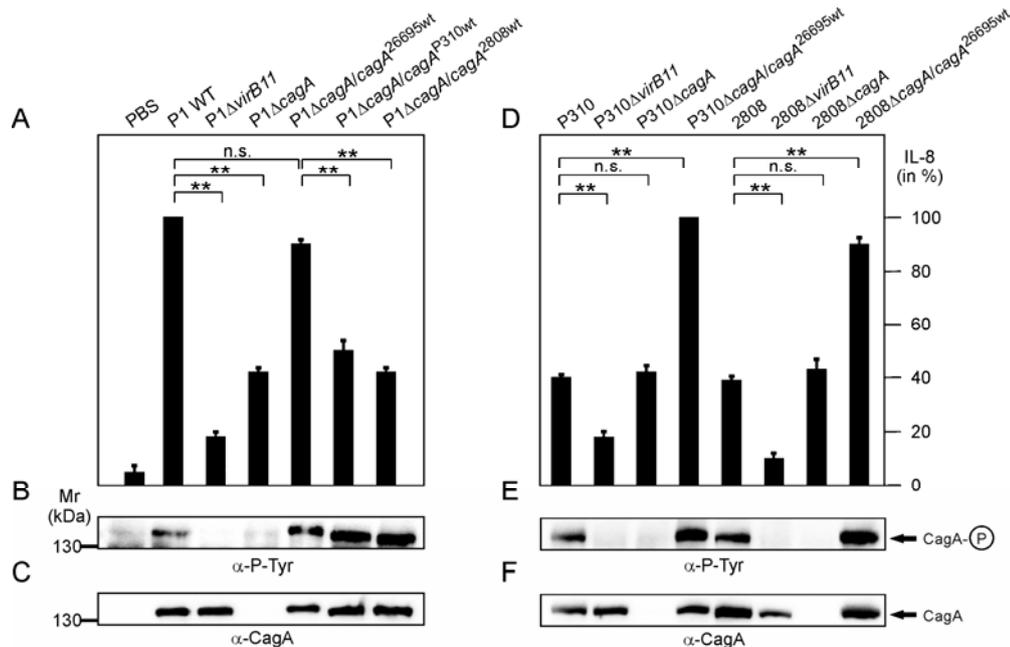


Abb. 4.3: **CagA ist an der IL-8-Induktion von Gruppe-A-Stämmen beteiligt.** Durch genetischen Austausch der *cagA*-Gene konnte gezeigt werden, dass niedrig- und hochinduzierende *H. pylori*-Stämme ineinander umgewandelt werden können. Die ELISA-Analysen zeigen, dass durch genetischen Austausch der *cagA*-Gene, zwischen hoch- und niedriginduzierenden *H. pylori*-Stämmen die IL-8-Sekretion modifiziert werden kann (A und D). Die CagA-Translokation und -Phosphorylierung in AGS-Zellen wurde mittels Westernblot-Analyse (PY99 und α -CagA) überprüft (B-C und E-F). Die Pfeile zeigen die Positionen der einzelnen CagA-Proteine auf dem Gel. AGS-Zellen wurden für 9 h bei einer MOI von 100 mit den angegebenen Stämmen infiziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ($P1^{WT}$ bzw. $P310\Delta cagA/cagA^{26695WT} = 100\%$ IL-8; $P < 0,005$ **; n.s. nicht signifikant).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das CagA der Gruppe-A-Stämme an der Induktion der IL-8-Sekretion beteiligt ist und durch genetischen Austausch von CagA modifiziert werden kann. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass CagA stammabhängig ein bestimmender Faktor bei der IL-8-Ausschüttung ist. Nachfolgende Experimente konzentrierten sich somit auf die Untersuchung des molekularen Mechanismus der CagA-vermittelten IL-8-Sekretion.

In vorangegangenen Studien wurde die *H. pylori*-induzierte IL-8-Sekretion nur zu einem Zeitpunkt und nach viel zu kurzer Infektion von 4-8 h analysiert (Crabtree *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996, Sharma *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001, Viala *et al.*, 2004). Die Unterschiede der sekretierten Mengen an IL-8 von *H. pylori* WT, $\Delta cagA$ und $\Delta virB11$ werden aber erst im späteren zeitlichen Verlauf deutlich. Dazu wurden AGS-Zellen mit *H. pylori* P1 WT, P1 $\Delta cagA$ und P1 $\Delta virB11$ für 12 h, 24 h, 36 h und 48 h infiziert. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mikroskopisch überprüft und die Überstände für die IL-8-Bestimmungen mittels ELISA abgenommen. Alle Zellen waren zu den angegebenen Zeitpunkten adhärent und vital. Die sekretierten IL-8-Mengen sind in Abb. 4.4 dargestellt.

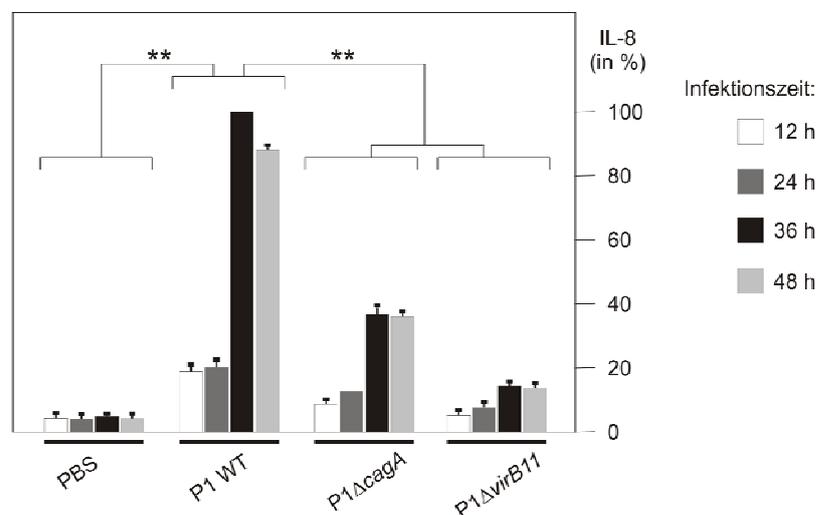


Abb. 4.4: **Die CagA-vermittelte IL-8-Induktion ist zeitabhängig und wird im Laufe der Infektion potenziert.** AGS-Zellen wurden mit P1 WT bzw. P1 $\Delta cagA$ oder P1 $\Delta virB11$ über 12 h, 24 h, 36 h und 48 h infiziert und anschließend die sekretierten Mengen an IL-8 bestimmt. Die IL-8-ELISA-Analysen zeigen deutlich, dass die durch *H. pylori*-induzierten IL-8-Mengen sich zeitabhängig erhöhen. Die *cagPAI*- und CagA-Abhängigkeit ist 36h nach Infektion am größten (MOI = 50; P1^{WT} bei 36 h = 100 % IL-8; $P < 0,005$ **).

Der Vergleich der Menge an freigesetztem IL-8 nach Infektion mit P1 WT zu den jeweiligen Zeitpunkten zeigt einen deutlichen Anstieg zwischen 24 h und 36 h, wohingegen sich die Menge an sekretierten IL-8 48 h nach der Infektion leicht

verringert. Diese Ergebnisse lassen sich ebenfalls bei den sekretierten IL-8-Mengen nach Infektion mit P1 Δ *cagA* und P1 Δ *virB11* feststellen. In diesem Versuch werden auch die zuvor dargestellten Unterschiede der IL-8-Sekretion zwischen WT, Δ *cagA* und Δ *virB11* ersichtlich. Der Vergleich zwischen WT und Mutanten 36 h nach Infektion zeigt eine ca. 64 %ige CagA-Abhängigkeit und ca. 86 %ige *cagPAI*-Abhängigkeit der *H. pylori*-induzierten IL-8-Sekretion.

Derartige Infektionen erfolgten ebenfalls mit dem als Gruppe-B-Stamm identifizierten Stamm P310 mit anschließender IL-8-Analyse. Die Freisetzung von IL-8 durch AGS-Zellen nach Infektion mit P310 Δ *cagA* entspricht der P310 WT Menge zu allen angegebenen Zeitpunkten, wohingegen die *cagPAI*-Abhängigkeit sich auch im zeitlichen Verlauf erhöht (Abb. 4.5).

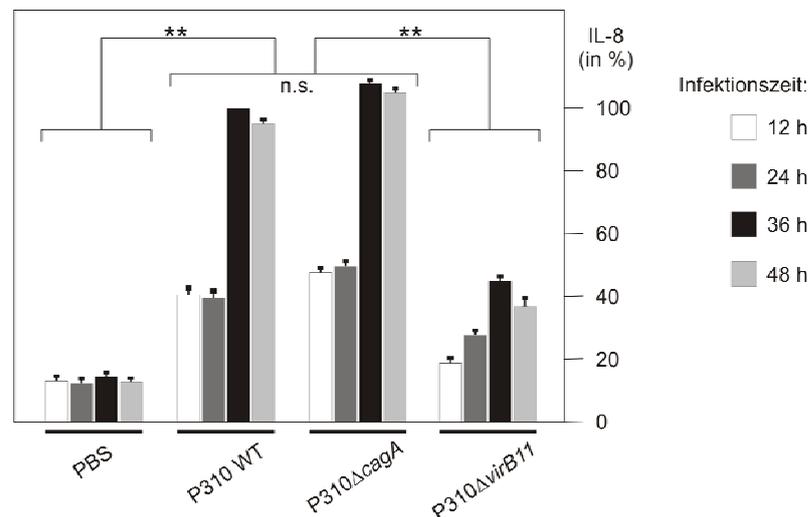


Abb. 4.5: Die *cagPAI*-vermittelte IL-8-Sekretion durch den Gruppe-B-Stamm P310 ist zeitabhängig und potenziert sich im Laufe der Infektion. Die IL-8-Sekretion der Δ *cagA*-Mutante weist zu allen Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied zu den P310 WT-induzierten Mengen auf. Die *cagPAI*-Abhängigkeit ist 36 h nach Infektion am größten (MOI = 50; P310^{WT} bei 36 h = 100 % IL-8; P > 0,05 n.s.; P < 0,005 **).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine *cagPAI*-Abhängigkeit der *H. pylori*-induzierten IL-8-Sekretion sowie eine CagA-Abhängigkeit der Gruppe-A- bzw. CagA-Unabhängigkeit der Gruppe-B-Stämme im zeitlichen Verlauf der Infektion.

4.1.1 MOLEKULARER SIGNALWEG DER CagA-ABHÄNGIGEN IL-8-INDUKTION

Da eine Abhängigkeit der IL-8-Sekretion von CagA deutlich gezeigt werden konnte (Abb. 4.3), wurde anschließend überprüft, ob CagA allein IL-8 induzieren kann. Dazu wurden CagA^{WT} und zwei phosphorylierungsdefiziente Mutanten (CagA^{Y>F} und CagA^{Y>A}) transient in AGS-Zellen exprimiert (Higashi *et al.*, 2002, 2004) und 48 h nach der Transfektion die sekretierte Menge an IL-8 mittels ELISA bestimmt. Es konnten deutliche Unterschiede in der IL-8-Sekretion bei den mit CagA^{WT} transfizierten AGS-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden (Abb. 4.6). Erstaunlicherweise wurden bei den mit der phosphorylierungsdefizienten CagA^{Y>F}-Mutante ähnliche IL-8-Konzentrationen detektiert, wohingegen bei den mit der CagA^{Y>A}-Mutante transfizierten Zellen nahezu keine IL-8-Freisetzung beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass zum einen die vorhandenen EPIYA-Motive für die Signalübertragung wichtig sind und zum anderen die Tyrosinphosphorylierung nicht essentiell ist bzw. einen indirekten Einfluss auf die CagA-induzierte IL-8-Sekretion hat.

Die Expression von IL-8 kann generell durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP1 oder SRF erfolgen (siehe Einleitung Kapitel 1.5.). In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die *H. pylori*-induzierte IL-8-Expression vorwiegend durch die Aktivierung von NF- κ B erfolgt (Crabtree *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001). Die NF- κ B-Aktivierung ist eine Kaskade verschiedener Phosphorylierungsmechanismen, aus denen der Abbau von I κ B resultiert (Abb.1.9). Aktiviertes NF- κ B wandert in den Kern und erhöht dort unter anderem die IL-8-Genexpression. Zur Analyse des CagA-induzierten Signalweges, wurden AGS-Zellen mit CagA^{WT} in Gegenwart verschiedener zellgängiger pharmakologischer Inhibitoren transient exprimiert und die gebildeten IL-8-Mengen mittels ELISA bestimmt. In Gegenwart des *mitogen-activated protein* (MAP) kinase Erk1/2-Inhibitors (PD98059) und des Proteasom-Inhibitors (MG132) wurde die CagA-induzierte IL-8-Sekretion gehemmt, wohingegen der Einsatz des MAP-Kinase p38- (SB203580) bzw. des PKC-Inhibitors (Calphostin C) keinen signifikanten Einfluss auf die IL-8-Sekretion hatten. Der Inhibitor der *c-Jun N-terminal*-Kinase (SP600125) zeigte sogar eine leichte Erhöhung der CagA-induzierten IL-8-Sekretion (Abb. 4.6). Diese Ergebnisse weisen auf eine Erk1/2-abhängige NF- κ B-Aktivierung nach CagA-Transfektion hin.

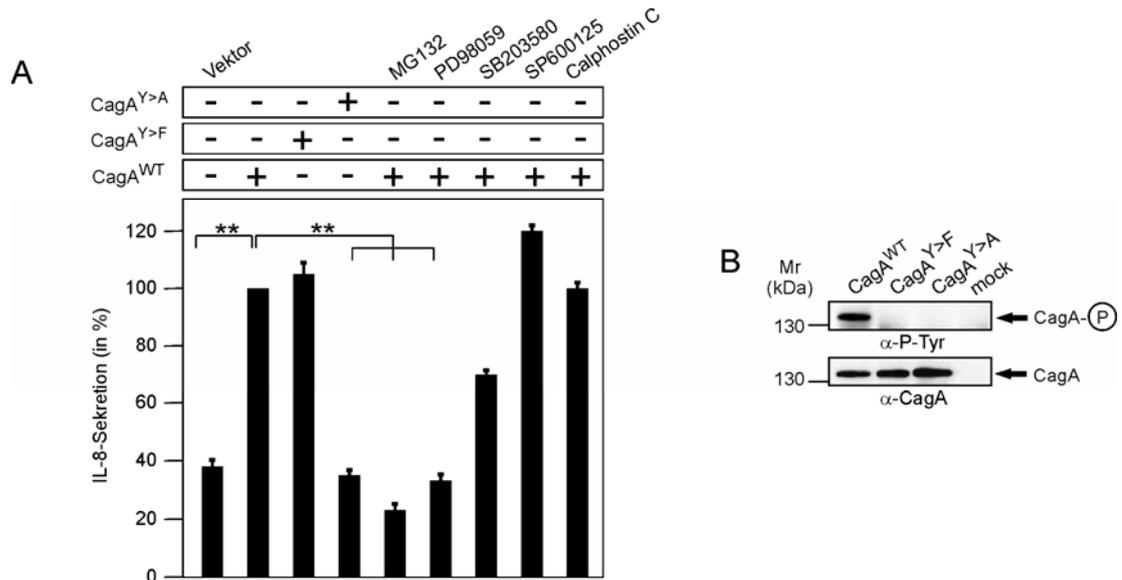


Abb. 4.6: **Induktion der IL-8-Sekretion durch transient exprimiertes CagA.** (A) CagA^{WT} und Mutanten des hochinduzierenden-Stammes NCTC11637 wurden allein oder in Gegenwart des Proteasom-Inhibitors MG132 (30 μ M), Erk1/2-Inhibitors PD98059 (25 μ M), MAP-Kinase p38-Inhibitors SB203580 (25 μ M), c-Jun N-terminal-Kinase-Inhibitors SP600125 (25 μ M) oder des PKC-Inhibitors-Calphostin C (100 nM) in AGS-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die IL-8-Sekretion mittels ELISA bestimmt. Der leere Vektor wurde als Kontrolle transfiziert. (B) Darstellung der Expression und Tyrosinphosphorylierung der CagA-Konstrukte mittels Westernblot-Analyse. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (CagA^{WT} = 100 % IL-8; $P < 0,005$ **).

Anschließend wurde untersucht, ob die Expression von CagA zu einer NF- κ B-Aktivierung führt. Dazu wurde die NF- κ B-Kernlokalisierung in Gegenwart von CagA^{WT}-Konstrukten untersucht. Zu diesem Zweck wurden AGS-Zellen mit CagA^{WT} zusammen mit der NF- κ B Untereinheit p65 (RelA), die mit GFP (p65-GFP) gekoppelt ist, transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 4.7 A). CagA^{WT}, aber nicht die Vektorkontrolle, resultiert in der Kernlokalisierung von p65-GFP. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Expression von CagA^{WT} zu einer Aktivierung von NF- κ B und somit zur IL-8-Expression führt. Um das direkte Anschalten des IL-8-Promotors durch CagA nachzuweisen, wurden AGS-Zellen mit CagA^{WT} und einem GFP-Konstrukt unter Kontrolle des IL-8-Promotors kotransfiziert (pIL-8-GFP, Dragneva *et al.*, 2001) und mikroskopisch analysiert (Abb. 4.7 B). Eine transiente Expression von CagA^{WT} führt zu einer durch den IL-8-Promotor induzierten, GFP-Expression, wohingegen eine transiente Transfektion von CagA^{Y>A} oder der Vektorkontrolle keine IL-8-Promotor-abhängige GFP-Expression auslöst.

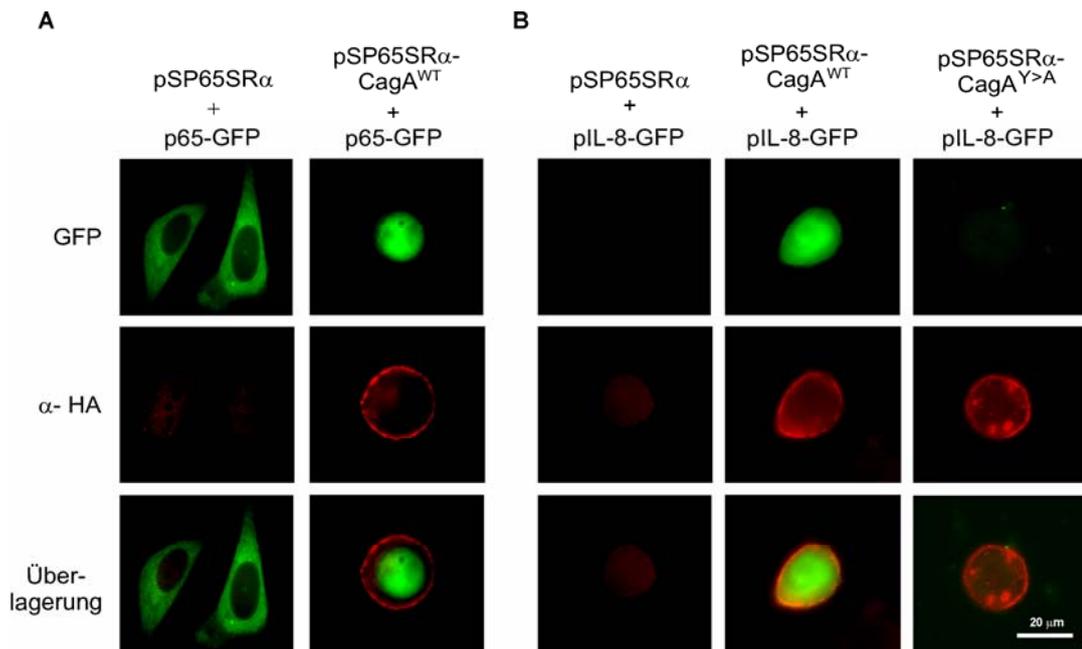


Abb. 4.7: **Transfektion von CagA induziert die Aktivierung von NF-κB und dem IL-8-Promotor.** Immunfluoreszenzanalyse von AGS-Zellen, die mit (A) NF-κB p65 Untereinheit (p65-GFP, grün) oder (B) pIL-8-GFP (grün) in der Gegenwart von HA-markierten CagA-Konstrukten (pSP65SRα) transfiziert wurden. Die CagA-Transfektion konnte durch α-HA-Färbung (rot) dargestellt werden. Eine transiente Expression von CagA^{WT} führt sowohl zu einer Kernlokalisierung von NF-κB als auch zur Induktion von pIL-8-GFP, wohingegen die Vektorkontrolle NF-κB nicht aktiviert und auch keine Induktion des pIL-8-GFP hervorruft. Auch die transiente Expression von CagA^{Y>A} kann die pIL-8-GFP Expression nicht induzieren.

Nachfolgend sollte der Signalweg näher untersucht werden, der zur Erk1/2-abhängigen NF-κB-Aktivierung durch CagA führt. Die Aktivierung von Ras, einem Regulatorprotein oberhalb von Erk1/2, führt in bekannten Systemen zur Aktivierung von NF-κB (Kolch, 2000; Beinke und Ley, 2004). Um die Rolle von CagA für die mögliche Ras-Aktivierung und nachfolgender IL-8-Induktion zu untersuchen, wurde dominant-negatives (DN) Ras zusammen mit CagA^{WT} in AGS-Zellen transfiziert und die sekretierten IL-8-Mengen bestimmt. Eine transiente Expression von DN Ras in Gegenwart von CagA^{WT} führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-8-Sekretion im Vergleich zu CagA^{WT}-transfizierten Zellen (Abb. 4.8 B). Dieses Ergebnis wurde durch die transiente Expression von Ras siRNA in AGS-Zellen und anschließender Infektion mit *H. pylori* bestätigt. Die verminderte Ras-Expression wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft (Abb. 4.8 C).

Raf und Mek1 sind zwei weitere Regulatorproteine, die oberhalb von Erk1/2 und unterhalb von Ras in der Signaltransduktionskaskade lokalisiert sind. Transfektionsexperimente von CagA^{WT} zusammen mit DN Raf bzw. DN Mek1 führten zu einer ähnlich starken Reduktion der IL-8-Freisetzung, wohingegen die Expression von DN c-Met und DN Shp-2 keine Reduktion der IL-8-Sekretion zur Folge hatte.

Die Tyrosinphosphatase Shp-2 wird als ein Hauptbindungspartner für CagA beschrieben (Higashi *et al.*, 2001, 2002, 2004). Zur Überprüfung, ob Shp-2 für die CagA-induzierte IL-8-Sekretion tatsächlich nicht essentiell ist, wurden Shp-2 *knockout* (Shp-2^{-/-})-Zellen mit CagA^{WT} transfiziert. Die Shp-2^{-/-}-Zellen sind murine Fibroblasten, die ein deletiertes, nicht funktionales Shp-2 enthalten (Shi *et al.*, 1998). Parallel dazu wurden Fibroblasten mit funktionellem Shp-2 (Shp-2^{+/+}) transfiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass die sekretierten IL-8-Mengen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Shp-2^{+/+}- und Shp-2^{-/-}-Zellen aufweisen und unterstützen die Hypothese, dass Shp-2 keinen Einfluss auf die CagA-induzierte IL-8-Sekretion hat. In Gegenwart des Erk1/2-Inhibitors (PD98059) wurde auch in den Fibroblasten die CagA-induzierte IL-8-Sekretion, wie bereits für die AGS-Zellen gezeigt, inhibiert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass derselbe Signalweg der IL-8-Induktion in AGS-Zellen und murinen Fibroblasten vorliegt.

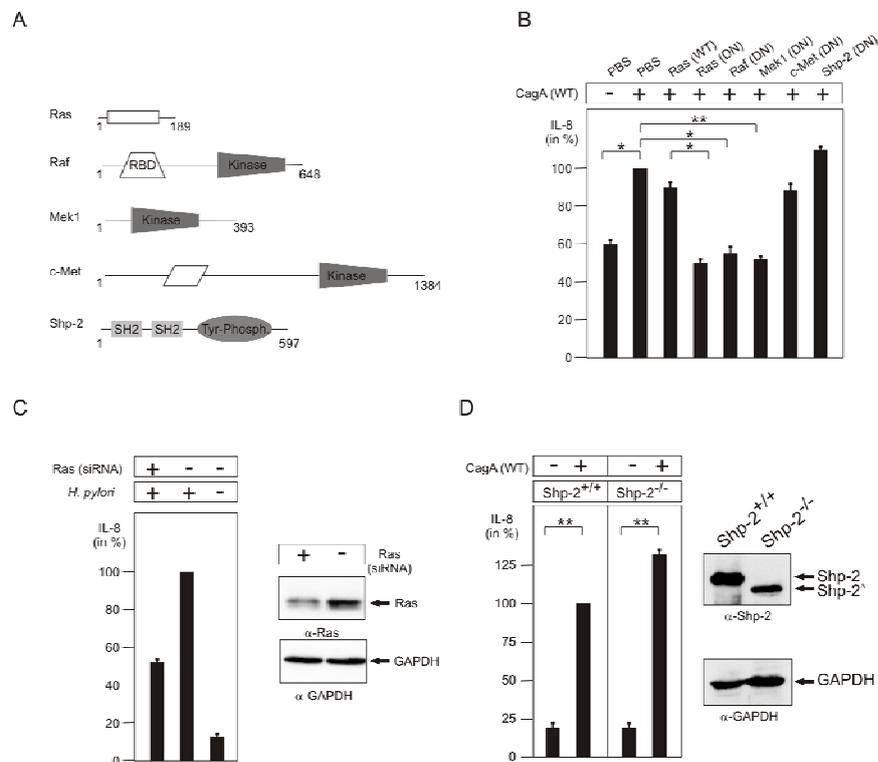


Abb. 4.8: **Die CagA-induzierte IL-8-Sekretion ist von Ras, Raf und Mek, aber nicht von Shp-2 oder c-Met, abhängig.** (A) Schematische Darstellung von Ras, Raf, Mek1, c-Met und Shp-2. (B) AGS-Zellen wurden mit CagA^{WT} und den angegebenen WT- oder dominant-negativen (DN)-Konstrukten transfiziert und das sekretierte IL-8 mittels ELISA bestimmt (CagA^{WT} = 100 % IL-8). (C) Mit Ras siRNA transfizierte AGS-Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit *H. pylori* infiziert und die sekretierten Mengen an IL-8 bestimmt. Die verringerte Ras-Expression wurde mittels Westernblot-Analyse (α -Ras) überprüft, die α -GAPDH-Färbung stellt die Ladekontrolle dar. (D) IL-8-Sekretion von mit CagA^{WT} transfizierten Shp-2^{-/-} und Shp-2^{+/+} Zellen. Als Kontrolle wurde der leere Vektor transfiziert. Westernblot-Analysen stellen die Expression von Shp-2 und Shp-2 ^{Δ 46-110} dar. Die Ergebnisse wurden von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst ($P < 0,005$ **, $P < 0,05$ *).

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass die CagA-induzierte IL-8-Sekretion über die Aktivierung des Ras → Raf → Mek → Erk → NF-κB-Signalweges erfolgt, aber Shp-2 und c-Met unabhängig ist.

4.2 PHOSPHORYLIERUNG VON CagA

Zu Beginn meiner Arbeit war bereits bekannt, dass transloziertes CagA in den AGS-Zellen durch die Src Kinase phosphoryliert wird. Die Src-Kinase wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus inaktiviert, CagA dagegen bleibt weiterhin phosphoryliert (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003). Letztere Tatsache lässt die Vermutung zu, dass eine weitere CagA-phosphorylierende zelluläre Kinase existiert, die auch zu späteren Zeitpunkten der Infektion aktiv sein muss. Zur Identifizierung dieser Kinase wurden im zweiten experimentellen Teil der Arbeit umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse nachfolgend dargestellt werden.

4.2.1 EINFLUSS DER Abl-KINASE AUF DEN CagA-INDUZIERTEN PHÄNOTYP

Die Abl-Tyrosin-Kinase Familie beinhaltet die Abl- und die Arg- (*Abl-related gene*) Kinase. Diese Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen vermitteln die Signale der Oberflächenrezeptoren zum Aktin-Zytoskelett und sind somit an der Regulierung der Zellmorphologie und Motilität beteiligt. Zahlreiche Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die Aktivierung von Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsrezeptoren die Abl-Aktivität erhöht und diese erhöhte Aktivität zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen, wie z.B. der verstärkten Bildung von Membranausstülpungen und einer reduzierten Zellbewegung führt (Plattner *et al.*, 1999; Renshaw *et al.*, 2000; Frasca *et al.*, 2001; Kain und Klemke, 2001; Howe *et al.*, 2002;). Die Domänenstruktur von zwei wichtigen Vertretern der Abl-Kinasen ist in Abb. 4.9 dargestellt. Sowohl die Arg- als auch die Abl-Kinase besitzen eine SH3- und SH2-Domäne, eine Kinase-Domäne sowie prolinreiche-Regionen (PxxP-Motive) und F-Aktin-Bindungsstellen. Unterschiede bestehen in der Existenz von DNA-Bindungsdomänen, Kernlokalisierungssignalen und einer Bindungsstelle für globuläres Aktin bei der Abl-Kinase sowie einer Mikrotubulin-Bindungsdomäne bei der Arg-Kinase (Hernandez *et al.*, 2004). Die Regulierung der Kinaseaktivität erfolgt über einen der Src-Kinase ähnlichen Mechanismus. In der inaktiven Form bilden die SH3- und SH2-Domänen eine inhibitorische Schleife entlang der Kinase-Domäne. Nach Aktivierung löst sich die Kinase-Domäne aus der inaktiven Konformation und die freien SH2- und SH3-Domänen können nun an Oberflächenrezeptoren, Adapterproteine und andere Substrate binden (Pendergast, 2002, Hantschel *et al.*, 2003; Nagar *et al.*, 2003).

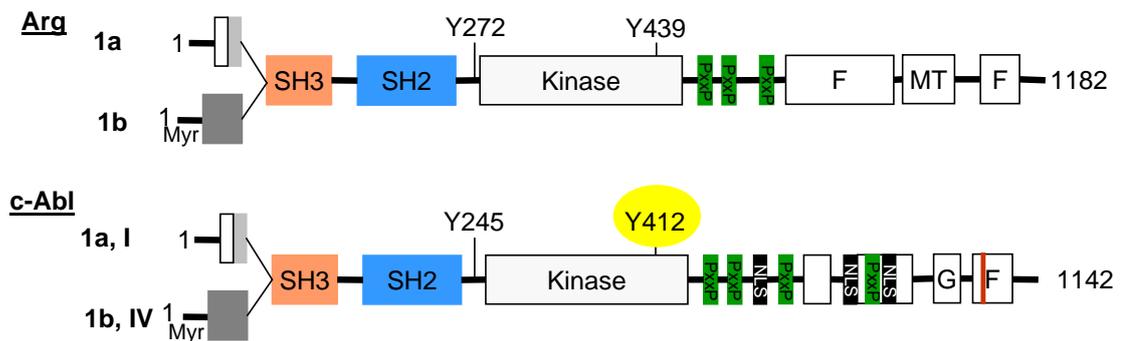


Abb. 4.9: **Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Arg und Abl.** Arg und c-Abl besitzen N-terminal eine variable Region (weiß und helles grau), die in einigen Fällen auch eine Cap-Region besitzen kann (helles grau) und/oder eine *myristolation* Domäne (Myr). Die SH3- (orange), SH2- (blau) und die katalytische-Domäne (Kinase, grau) stellen den restlichen Teil des N-Terminus dar. Am C-Terminus befinden sich vier prolinreiche-Regionen (PxxP, grün), drei Kernlokalisationsdomänen (NLS, schwarz) sowie eine Kernexportsequenz (rot). Den größten Anteil am C-Terminus hat die aktinbindende-Domäne, die sowohl Bindungsstellen für monomeres G-Aktin (G) als auch filamentöses F-Aktin (F) trägt. Die regulatorischen Phosphorylierungsstellen von Arg (Y272; Y439) und c-Abl (Y245; Y412) sind eingezeichnet. Arg besitzt zusätzlich eine mikrotubulinbindende-Domäne (in Anlehnung an Woodring *et al.*, 2003).

In zahlreichen Studien wurden potente und sehr spezifische Abl-Kinase-Inhibitoren (SKI-DV2-43 und STI571) entwickelt, die die Untersuchung der Hypothese ermöglichten, dass Abl an den *H. pylori*-induzierten zytoskelettalen Veränderungen beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurden AGS-Zellen in Gegenwart verschiedener Tyrosin-Kinase-Inhibitoren für 30 min inkubiert und anschließend mit *H. pylori* infiziert. Die Ausbildung des typischen Elongationsphänotyps konnte in der Positivkontrolle 4 h nach *H. pylori*-Infektion beobachtet werden (Abb. 4.10 A). Die Inkubation von AGS-Zellen in Gegenwart der Abl-Kinase-Inhibitoren SKI-DV2-43 oder STI571 bzw. des Src-Kinase-Inhibitors PP2 führte zu einer drastischen Reduktion der Zellelongation (Abb. 4.10). Vergleichbare Beobachtungen konnten in Experimenten mit den Epithelzelllinien MKN28 und MCF7 gemacht werden (Daten nicht gezeigt). In Gegenwart von AG370, einem Inhibitor des PDGF-Rezeptors, oder dem Inhibitor des EGF-Rezeptors, AG1478, war der Phänotyp nicht signifikant beeinflusst (Abb. 4.10). Als nicht infizierte Kontrolle wurden die Zellen vor der Infektion mit DMSO inkubiert und das hatte wie erwartet keinen Einfluss. Die Ergebnisse zeigen, dass die Abl-Kinase an der Induktion des Elongationsphänotyps beteiligt ist.

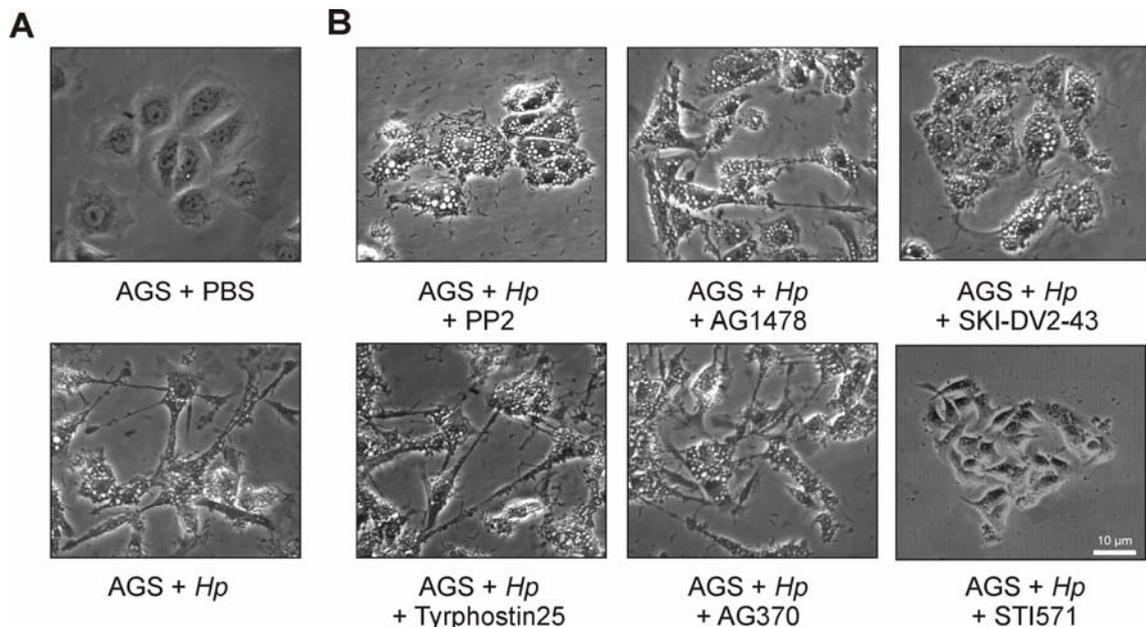


Abb. 4.10: **Inhibitoren der Src- und Abl-Kinase, aber nicht des EGF- und PDGF-Rezeptors, blockieren den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp.** AGS-Zellen wurden mit den entsprechenden Inhibitoren 30 min vor der Infektion inkubiert und der Elongationsphänotyp 8 h nach Infektion analysiert. (A) Kontrollen ohne Inhibitor zeigen eine starke Ausbildung des Phänotyps. (B) Der Phänotyp ist in Gegenwart von PP2 (20 µM), SKI-DV2-43 (1 µM) und STI571 (2,5 µM) blockiert. Tyrphostin25 (100 µM), AG1478 (20 µM) und AG370 (20 µM) haben keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Ausbildung des Elongationsphänotyps.

Tab. 4.1: **Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp*.**

| Inhibitor | wirkt auf | Konzentration | Phänotyp nach <i>H. pylori</i> -Infektion |
|------------|-------------|---------------|---|
| PP1 | Src-Kinasen | 10 µM | - |
| PP2 | Src-Kinasen | 20 µM | - |
| AG1478 | EGFR | 20 µM | ++ |
| AG370 | PDGFR | 20 µM | +++ |
| Genistein | Tyr-Kinasen | 100 µM | - |
| SKI-DV2-43 | Abl-Kinase | 1 µM | - |
| STI571 | Abl-Kinase | 2,5 µM | - |

* AGS-Zellen wurden für 30 min mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert, anschließend mit *H. pylori* für 4-6 h infiziert und der entstehende Phänotyp mikroskopisch analysiert. (- vollständige Inhibierung des Phänotyps; ++ 40-60 % Phänotyp; +++ 60-80 % Phänotyp)

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von SKI-DV2-43 oder STI571 auch einen Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung hat, wurden die AGS-Zelllysate mittels Westernblot analysiert. Dafür wurden die Membranen mit einem phosphospezifischen-Antikörper (α -PY99) und mit einem CagA-spezifischen Antikörper (α -CagA)

analysiert. Wie in Abbildung 4.11 ersichtlich, ist die CagA-Phosphorylierung in Gegenwart der Abl-Kinase-Inhibitoren SKI-DV2-43 oder STI571 reduziert, jedoch nicht vollständig blockiert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Src-Inhibitor PP2 bereits publiziert (Selbach *et al.*, 2002). Zur Kontrolle, ob die starke Abnahme der detektierbaren Menge an CagA^{PY} auf eine bakterizide Wirkung der Inhibitoren zurückzuführen ist, erfolgten zelluläre Vitalitätstests, in denen keine Veränderungen detektiert werden konnten.

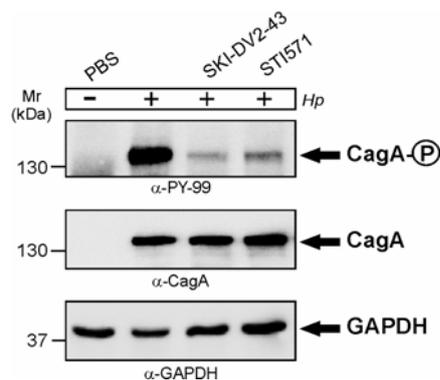


Abb. 4.11: **Die Inhibierung der Abl-Kinase blockiert die CagA-Phosphorylierung.** AGS-Zellen wurden allein oder in Gegenwart von SKI-DV2-43 und STI571 mit *H. pylori* infiziert. Der Einfluss der Inhibitoren auf die CagA-Phosphorylierung und -Translokation wurde mittels Westernblot unter Verwendung des α -PY-99- bzw. α -CagA-Antikörpers analysiert. Die GAPDH-Färbung stellt die Ladekontrolle dar.

In nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Expression von c-Abl für die *H. pylori*-Infektion wichtig ist. Zu diesem Zweck wurden stabile *c-abl*-defiziente AGS-Zellen mittels eines spezifischen shRNA-Konstruktes generiert (Poppe *et al.*, 2007) und mit *H. pylori* infiziert. Dieser effiziente *knockdown* der c-Abl-Kinase hatte keinen signifikanten Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung und auf die Ausbildung des Elongationsphänotyps (Abb. 4.12). Wie bereits in Abbildung 4.9 gezeigt wurde, besteht die Abl-Kinase Familie aus zwei eng verwandten Proteinen, c-Abl und Arg. Die Verminderung der Genexpression der Arg Kinase mittels siRNA zeigte einen reduzierenden Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung aber keinen Einfluss auf den Elongationsphänotyp (Abb. 4.12). Die Verminderung der Expression von beiden Kinasen (c-Abl und Arg) führte dagegen zu einer nahezu vollständigen Reduktion des Elongationsphänotyps, wohingegen die Expression eines Kontroll-shRNA Oligonukleotides keinen Einfluss auf den Phänotyp hatte (Abb. 4.12).

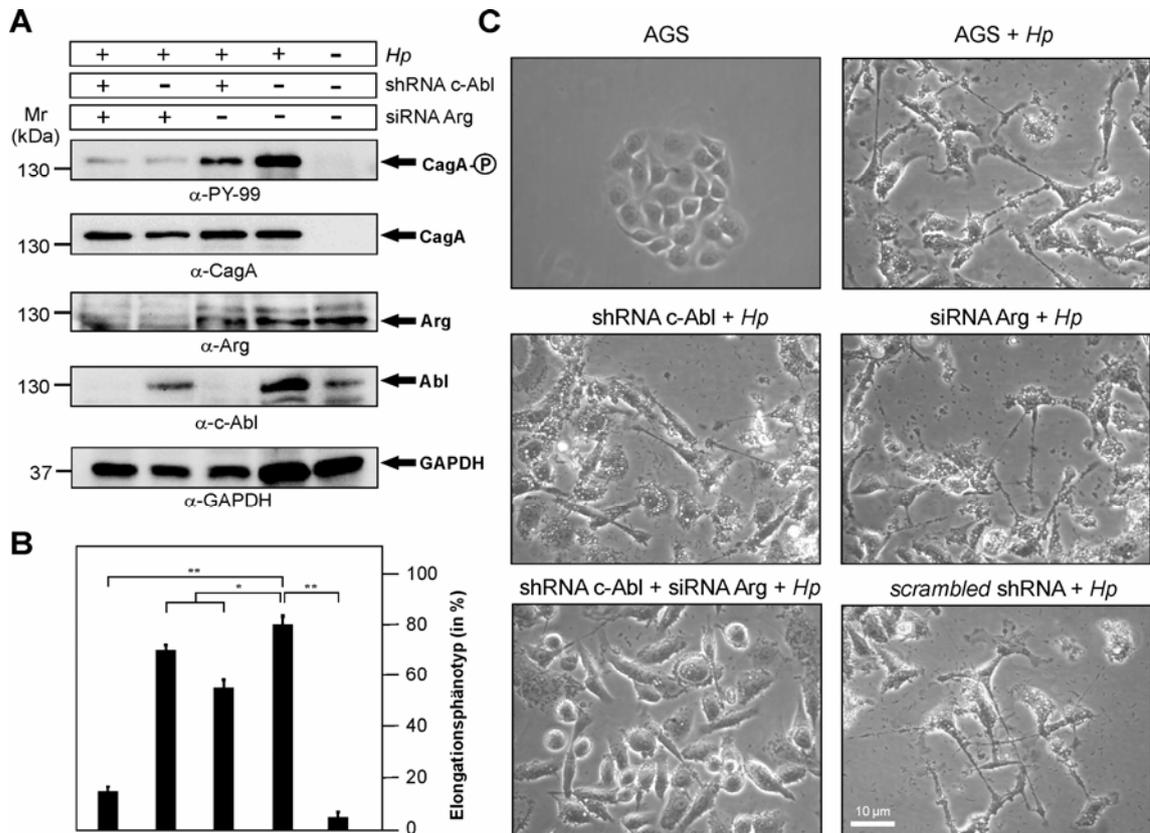


Abb. 4.12: **Der *H. pylori*-induzierte Elongationsphänotyp und die CagA-Phosphorylierung ist von Abl- und Arg-Kinasen abhängig.** (A) AGS-Zellen wurden entweder mit dem *c-abl*-shRNA-Vektor allein oder zusammen mit *arg*-siRNA transfiziert und anschließend mit *H. pylori* für 6 h infiziert. Mittels Westernblot-Analyse, unter Verwendung des α-c-Abl- und α-Arg-Antikörpers, wurde die Verminderung der Expression, mit dem α-PY-99- und dem α-CagA-Antikörpers die CagA-Phosphorylierung und -Translokation dargestellt. Die α-GAPDH Färbung stellt die Ladekontrolle dar. (B) Die Anzahl der elongierten Zellen in jedem Experiment wurde aus zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. ($P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *) (C) Mikroskopische Aufnahmen von *c-abl/arg* knockdown Zellen nach *H. pylori*-Infektion im Vergleich zu den mit dem shRNA-Kontrollvektor transfizierten Zellen und nicht infizierten AGS-Zellen.

In den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses der Abl-Kinase mit Hilfe der Inhibitoren konnte eine Abnahme des Elongationsphänotyps sowie eine Reduktion der CagA-Phosphorylierung in Gegenwart von SKI-DV2-43 oder STI571 gezeigt werden. Auch der *knockdown* beider Mitglieder der Abl-Kinase Familie, Abl und Arg, führte zu einer Blockierung des Elongationsphänotyps und der CagA-Phosphorylierung. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass beide Abl-Kinasen einen Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp haben und, neben den bisher beschriebenen SFK's (*Src family kinases*) an der CagA-Phosphorylierung beteiligt sind. Um das mögliche Zusammenspiel von Abl- und Src-Kinasen aufzuklären, wurden zunächst *in vitro*-

Phosphorylierungsstudien mit spezifischen Inhibitoren beider Kinasen durchgeführt. Dazu wurden Lysate von Fibroblasten erzeugt, die zuvor aus *c-src*^{-/-}, *c-yes*^{-/-} und *c-fyn*^{-/-} dreifach-*knockout* Mäusen isoliert wurden (Klinghoffer *et al.*, 1999), als Kontrollen wurden Lysate aus *c-src* komplementierten Fibroblasten mitgeführt. Es ist bekannt, dass *H. pylori* das CagA-Protein nicht in murine Fibroblasten translozieren kann (Selbach *et al.*, 2002). Demzufolge wurden die Zellen zur Aktivierung von Abl mit Na₃VO₄/H₂O₂ stimuliert und anschließend die generierten Zelllysate für *in vitro* Phosphorylierungsansätze eingesetzt. Wie erwartet induzieren die Lysate von SYF^{+c-Src}-Zellen eine starke CagA-Phosphorylierung (Abb. 4.13). Die Inhibierung der Src-Kinase durch PP2 führt zu einer 25 %igen Reduktion des CagA^{PY}-Signals, wohingegen die Inhibierung von Abl durch SKI-DV2-43 die CagA-Phosphorylierung um ca. 70 % reduziert. Im Vergleichsexperiment waren die SYF-Zelllysate ebenfalls in der Lage CagA zu phosphorylieren, zeigten jedoch einen geringeren Phosphorylierungsgrad. In Gegenwart des Abl-Inhibitors SKI-DV2-43 war diese Phosphorylierung komplett geblockt (Abb. 4.13). Der Src-Inhibitor PP2 hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung (Abb. 4.13).

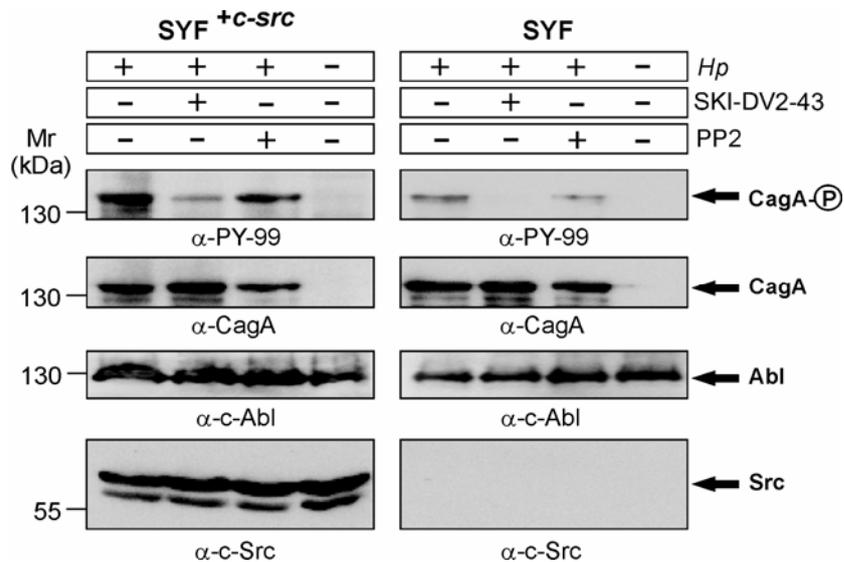


Abb. 4.13: **Die Phosphorylierung von CagA in Lysaten von SYF-Zellen ist durch Abl-Inhibitoren blockiert.** Lysate aus SYF- und SYF^{+c-Src}-Zellen wurden für die *in vitro* Phosphorylierung von CagA genutzt. Durch Zugabe des Abl-Inhibitors SKI-DV2-42 (1 μM) bzw. des Src-Inhibitors PP2 (10 μM) konnte die Abl- bzw. Src-Abhängigkeit der CagA-Phosphorylierung dargestellt werden. Westernblot-Analysen mit dem α-PY-99 und dem α-CagA Antikörper zeigen, dass sowohl die Abl- als auch die Src-Kinase CagA phosphorylieren kann. Zur Kontrolle wurden die Membranen mit α-c-Abl und α-c-Src gefärbt (Die Pfeile zeigen die Positionen der jeweiligen Proteine).

Diese *in vitro*-Phosphorylierungsuntersuchungen zeigen, dass sowohl Src als auch c-Abl in der Lage sind, CagA in den genannten Zelllysaten zu phosphorylieren. Um

eine direkte Funktion von c-Abl bei der CagA-Phosphorylierung zu zeigen, wurden *in vitro* Untersuchungen mit rekombinanter Abl-Kinase oder Src-Kinase durchgeführt. Die Kinasen wurden entweder mit CagA^{WT} oder CagA^{Y899/918/972F}, einer Mutante in der die bekannten Tyrosin-Phosphorylierungstellen gegen Phenylalanin ausgetauscht sind (Backert *et al.*, 2001), inkubiert und mittels Westernblot untersucht. Dabei wurde eine starke CagA-Phosphorylierung von CagA^{WT} in Gegenwart von Src oder Abl detektiert (Abb. 4.14). Die Kontrollansätze ohne Kinasen waren wie erwartet negativ. Weder c-Abl noch c-Src waren in der Lage CagA^{Y899/918/972F} zu phosphorylieren. Damit konnte gezeigt werden, dass die EPIYA-Motive im CagA-Protein die Substrate für beide Kinasen darstellen.

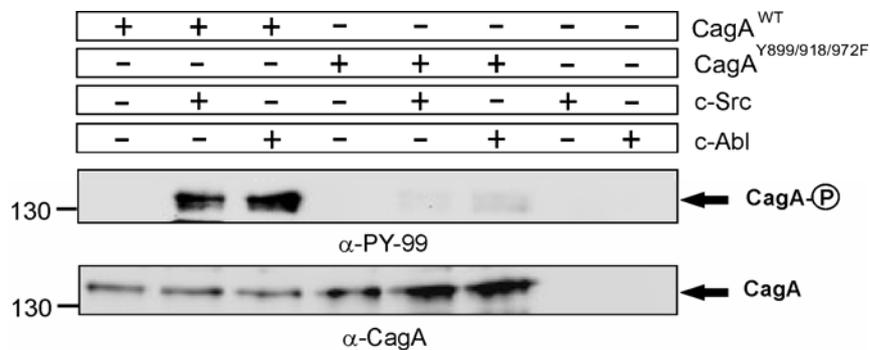


Abb. 4.14: **Rekombinante Src- und Abl-Kinasen phosphorylieren CagA *in vitro*.** CagA^{WT} bzw. CagA^{Y899/918/972F} wurden in Gegenwart von rekombinanter Src- und Abl-Kinase phosphoryliert. Westernblot-Analysen unter Verwendung des α-PY-99-Antikörpers zeigen, dass nur CagA^{WT} von Src und Abl *in vitro* phosphoryliert werden.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen weisen auf eine Aktivierung der Abl-Kinase im Verlauf der *H. pylori*-Infektion hin. Um eine zeitabhängige Aktivierung von Src und Abl *in vivo* darzustellen, wurden AGS-Zellen für Zeitpunkte von 30 min bis 8 h mit *H. pylori* infiziert und anschließend mittels Westernblot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 zusammenfassend dargestellt. Durch die Verwendung des Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers (α-c-Abl-PY-412), der das Tyrosin an der Position 412 in der Aktivierungsschleife von Abl erkennt, konnte eine erhöhte Abl-Phosphorylierung im Laufe der *H. pylori*-Infektion beobachtet werden (Abb. 4.15). Die Phosphorylierung von Abl an der Position Y-412 steigt in den ersten 60 min der Infektion stark an, erreicht nach 2 h ein Maximum und ist 8 h nach Infektion noch in großer Menge nachweisbar. Damit wird c-Abl im Laufe der *H. pylori*-Infektion, im Gegensatz zu Src, kontinuierlich phosphoryliert. Die kontinuierliche Abl-Aktivierung im Verlauf der *H. pylori*-Infektion war etwas unerwartet. Aus diesem Grund wurde der Phosphorylierungsstatus der Src-Kinase im gleichen Experiment analysiert. Die Src-Kinase ist ein 52-62 kDa großes Protein und besteht aus sechs Domänen. Über die

Tyrosin-Phosphorylierung in der Protein-Kinase-Domäne erfolgt die Regulierung der Aktivität. Die Autophosphorylierung und damit Aktivierung von c-Src, erfolgt an der Position Y-416, wohingegen die Phosphorylierung an Position Y-527 durch Csk, die inaktive Form darstellt (Hunter, 1987; Hubbard, 1999). Um den Aktivierungszustand der Src-Kinase im Laufe der Infektion zu analysieren, wurden die identischen Proben von Abbildung 4.15 A mit dem polyklonalen α -c-Src-PY-416 und dem α -c-Src-PY-527 Antikörper geprobt (Abb. 4.15 B). Im Gegensatz zur konstitutiven Abl-Aktivierung wird Src nur in den ersten 30 bis 120 min der Infektion aktiviert und danach erfolgt eine schnelle Inaktivierung. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Befunden überein, die zeigten, dass Src zu einem späten Zeitpunkt der Infektion durch Dephosphorylierung an der Position Y-416 und Phosphorylierung an Position Y-527 inaktiviert wird (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003). Die wichtigste Beobachtung in diesem Experiment ist jedoch, dass die CagA-Phosphorylierung im Laufe der *H. pylori*-Infektion stetig ansteigt. Die Menge an phosphoryliertem CagA steigt sogar noch 4 bis 8 h nach Infektion an. Zu diesem Zeitpunkt ist c-Src inaktiv aber die Abl-Kinase sehr aktiv. Die Aktivierung von Abl, die Inaktivierung von Src und große Mengen an phosphoryliertem CagA korrelieren mit der Entstehung des Elongationsphänotyps, der 2 bis 8 h nach Infektion sichtbar ist. (Abb. 4.16). Diese Befunde sprechen dafür, dass Src und Abl zeitlich reguliert werden und Abl möglicherweise die dominante Tyrosin-Kinase zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion ist.

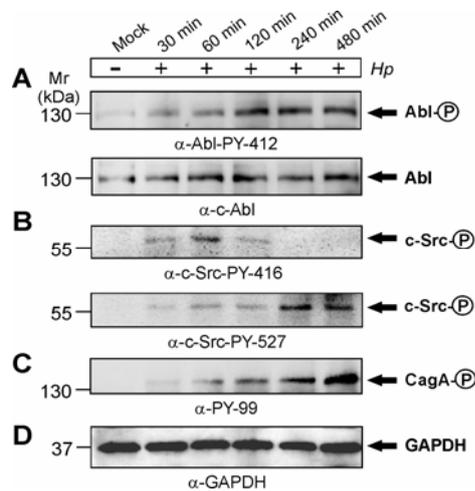


Abb. 4.15: **Abl wird im Laufe der *H. pylori*-Infektion kontinuierlich aktiviert.** AGS-Zellen wurden im Zeitverlauf von 30 min bis 480 min mit *H. pylori* (*Hp*) infiziert. (A) Die anschließende Westernblot-Analyse unter Verwendung des α -Abl-PY-412 zeigt eine kontinuierliche Aktivierung von Abl. (B) Die Aktivierung der Src-Kinase wurde mit dem α -c-Src-PY-416- und die Inaktivierung mit dem α -c-Src-PY-527-Antikörper analysiert. (C) Die CagA-Phosphorylierung im Laufe der *H. pylori*-Infektion wurde mit dem α -PY-99-Antikörper detektiert. (D) Die α -GAPDH-Färbung dient als Ladekontrolle (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ina Tammer).

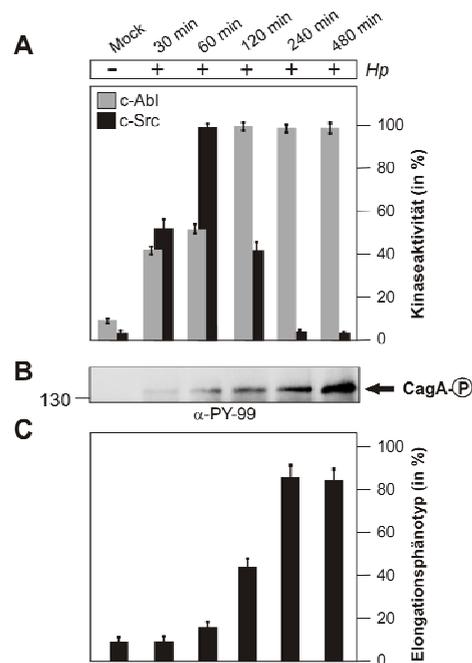


Abb. 4.16: **Zusammenhang zwischen Src-Inaktivierung, Abl-Aktivierung, CagA-Phosphorylierung und Induktion des Elongationsphänotyps.** AGS-Zellen wurden im Zeitverlauf von 30 min bis 480 min mit *H. pylori* infiziert und anschließend die Aktivität von Abl und Src sowie Anzahl der elongierten Zellen zu jedem Zeitpunkt quantifiziert. Die Aktivierung von Abl (A), Inaktivierung von Src (A) und große Mengen an CagA^{PY} (B) korrelieren mit der Induktion des Elongationsphänotyps (C). Die Quantifizierung der Westernblots erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM. Die Anzahl der elongierten Zellen in jedem Experiment wurde aus zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert.

Die bisher gezeigten Ergebnisse stützen die Hypothese, dass CagA während der Infektion erst von c-Src und dann von c-Abl phosphoryliert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden AGS-Zellen mit *H. pylori* für 2 h infiziert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von PP2 oder SKI-DV2-43 um Src oder Abl zu inhibieren. Zwanzig Minuten nach Zugabe der Inhibitoren konnte nahezu kein CagA^{PY}-Signal im Westernblot bei den mit PP2 behandelten Zellen aber ein unverändertes Signal bei den mit SKI-DV2-42 behandelten Zellen detektiert werden (Abb. 4.17). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Src-Aktivität zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion wichtiger als die Abl-Aktivität für die CagA-Phosphorylierung ist. In einem weiteren Ansatz wurden AGS-Zellen für 6 h mit *H. pylori* infiziert und anschließend erfolgte die Zugabe von SKI-DV2-43 oder PP2, um zu untersuchen, ob Abl zu einem späten Zeitpunkt der Infektion für die CagA-Phosphorylierung verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den Beobachtungen, die 2 h nach Infektion gemacht wurden, geht die CagA-Phosphorylierung in Gegenwart von SKI-DV2-43 stark zurück. Dieser Effekt ist schon 5 min nach Zugabe des Inhibitors zu beobachten. Innerhalb von 20 min kann nahezu kein CagA^{PY}-Signal mehr detektiert werden (Abb. 4.17). Der sich zuvor ausgebildete Elongationsphänotyp war nach Zugabe des Abl-Inhibitors reversibel. Im

Gegensatz dazu hatte PP2 6 h nach Infektion weder einen Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung noch auf den Elongationsphänotyp (Abb. 4.17).

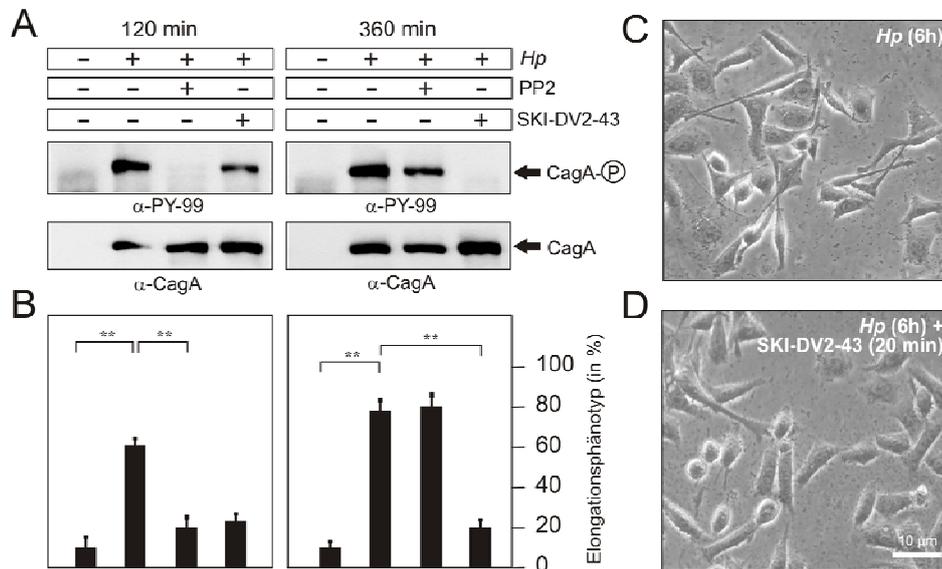


Abb. 4.17: **Src und Abl phosphorylieren CagA zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion und die CagA-Phosphorylierungs- oder -Dephosphorylierungsreaktionen unterliegen einer hohen Dynamik.** (A) AGS-Zellen wurden für 120 min oder 360 min mit *H. pylori* infiziert und anschließend mit dem Src-Inhibitor PP2 (10 μM) oder dem Abl-Inhibitor SKI-DV2-43 (1 μM) inkubiert. Der Einfluss der Inhibitoren auf die CagA-Phosphorylierung mittels Westernblot-Analyse (α-PY-99) zeigt, dass die CagA-Phosphorylierung durch PP2 zu einem frühen Zeitpunkt und durch SKI-DV2-43 zu einem späten Zeitpunkt der Infektion blockiert ist. (B) Die Anzahl der elongierten Zellen in jedem Experiment wurde aus zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (P < 0,005 **). Mikroskopische Aufnahmen von mit *H. pylori* infizierten AGS-Zellen vor (C) und nach Zugabe des Abl-Inhibitors SKI-DV2-43 (D).

4.2.2 DIE EXPRESSION VON AKTIVEM Abl UND CagA SIND AUSREICHEND FÜR DIE AUSBILDUNG DES ELONGATIONSPHÄNOTYPS

Die Transfektion von CagA^{WT} in AGS-Zellen allein ist nicht ausreichend für die Ausbildung des Elongationsphänotyps und erfordert mindestens einen weiteren Faktor (Backert *et al.*, 2001). Folglich sollte untersucht werden, ob aktives c-Abl in Gegenwart von CagA^{WT} für die Aktivierung des Phänotyps ausreichend ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein konstitutiv-aktives c-Abl-Konstrukt, das Prolin zu Glutaminsäure Mutationen an der Position 242 und 249 trägt (Abl-PP), in AGS-Zellen transfiziert. Die Expression von Abl-PP in AGS-Zellen alleine führt zu einer starken Abl-Phosphorylierung, aber nicht zur Ausbildung des Elongationsphänotyps. Allerdings konnte bei AGS-Zellen, die mit Abl-PP und CagA^{WT} zusammen transfiziert wurden,

eine Ausbildung des Elongationsphänotyps beobachtet werden. In diesen Zellen war die Abl-Aktivität und die CagA-Phosphorylierung im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltransfektionen stark erhöht (Abb. 4.18). Dieser Effekt war von der Phosphorylierung von CagA abhängig, weil die Transfektion von Abl-PP und einer phosphorylierungsdefizienten CagA^{Y899/918/972F}-Mutante keinen Effekt zeigte.

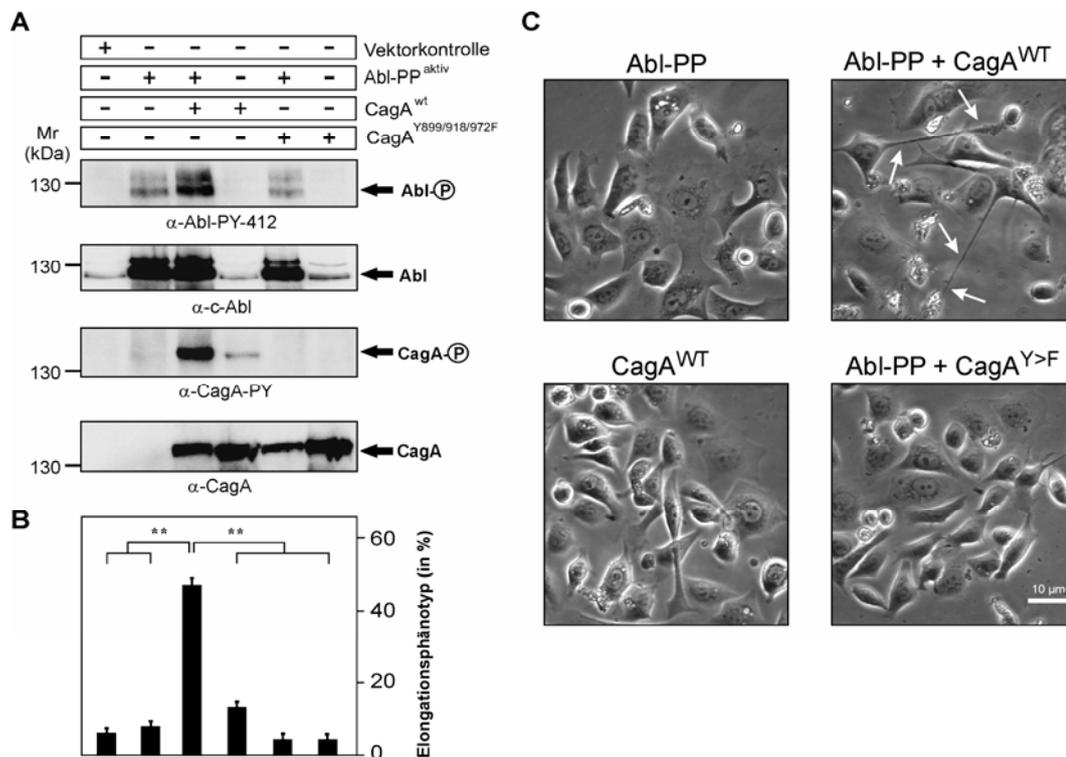


Abb. 4.18: **Die transiente Expression von konstitutiv-aktiven c-Abl und CagA^{WT} führt zu einer starken CagA-Phosphorylierung und zur Ausbildung des Elongationsphänotyps.** AGS-Zellen wurden mit den entsprechenden Abl- und CagA-Konstrukten transient transfiziert und der entstehende Phänotyp und die Abl- bzw. CagA-Phosphorylierung 36 h nach Transfektion analysiert. (A) Die Expression und Phosphorylierung von CagA bzw. Abl wurde mittels Westernblot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert. (B) Die Anzahl der elongierten Zellen wurde quantifiziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ($P < 0,005$ **). (C) Mikroskopische Aufnahmen von mit Abl-PP, CagA^{WT} und CagA^{Y>F} transfizierten Zellen.

Mit den hier gezeigten Experimenten konnte verdeutlicht werden, dass neben Src auch c-Abl an der CagA-Phosphorylierung und an der Ausbildung des Elongationsphänotyps beteiligt ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass aktives c-Abl und phosphoryliertes CagA, auch in Abwesenheit von *H. pylori*, die Ausbildung des Elongationsphänotyps induzieren können. Die weiteren Arbeiten konzentrierten sich somit auf den Einfluss der Substrate der Abl-Kinase auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp. Von besonderem Interesse waren dabei die Crk-Proteine, die als Adapterproteine für Abl und andere Signalfaktoren dienen (Feller *et al.*, 1994).

4.2.3 BEDEUTUNG DER Crk-ADAPTERPROTEINE AUF DEN CagA-INDUZIERTEN PHÄNOTYP

Die Familie der Crk-Adapterproteine (CrkI, CrkII und CrkL) spielt eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von Informationen in bestimmten Signaltransduktionskaskaden. Sie besitzen eine SH2-Domäne und eine bzw. zwei SH3-Domänen. CrkL und CrkII besitzen eine Phosphorylierungsstelle zwischen den SH3-Domänen. Sowohl die SH2- als auch die SH3-Domäne kann mit zahlreichen Proteinen über das PxxP-Motiv interagieren und ermöglichen so die schnelle Bildung von sehr spezifischen Proteinkomplexen, die wichtige Schnittstellen bei der Signaltransduktion darstellen. Der schematische Aufbau der Crk-Proteine ist in Abb. 4.19 dargestellt.

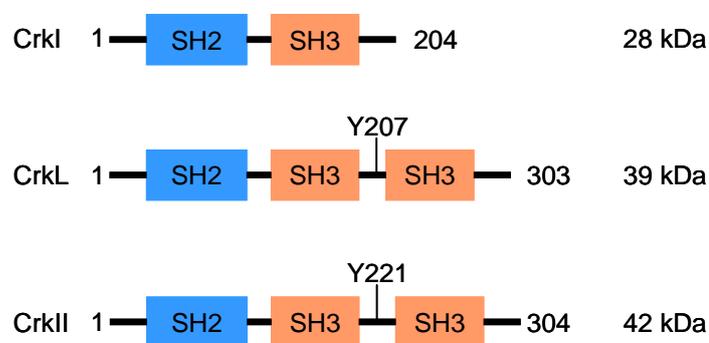


Abb. 4.19: **Schematische Darstellung der Crk-Adapterproteine.** Die Familie der Crk-Adapterproteine setzt sich aus dem 28 kDa großen CrkI, 39 kDa großen CrkL und 42 kDa großen CrkII Protein zusammen. Alle Proteine bestehen aus einer N-terminalen SH2-Domäne und CrkI aus einer SH3-Domäne. CrkL und CrkII besitzen neben einer zusätzlichen C-terminalen SH3-Domäne auch ein Tyrosinphosphorylierungsmotiv.

Wie bereits beschrieben, ist CrkII ein Substrat der Abl-Kinase (Feller *et al.*, 1994). Aus diesem Grund sollte nun untersucht werden, ob durch *H. pylori* aktiviertes Abl die Phosphorylierung von CrkII *in vitro* stimuliert. Um dies zu überprüfen wurden AGS-Zellen in Gegenwart von SKI-DV2-43 (Abl-Inhibitor) mit *H. pylori* infiziert, Abl präzipitiert und gereinigtes CrkII-GST, als Substrat für einen *in vitro* Phosphorylierungsassay, zugegeben. Westernblot-Analysen mit dem spezifischen α -P-CrkII-PY-221 zeigen, dass durch *H. pylori* aktiviertes c-Abl CrkII tatsächlich an der Position Y-221 phosphoryliert (Abb. 4.20).

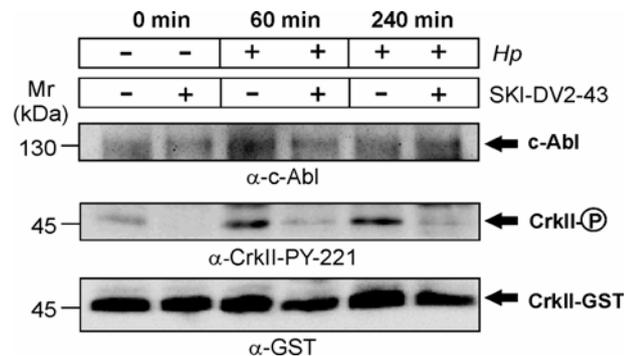


Abb. 4.20: **Durch *H. pylori*-aktiviertes c-Abl stimuliert die Phosphorylierung von CrkII *in vitro*.** AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* für 60 min und 240 min infiziert, Abl mittels IP angereichert und anschließend einer *in vitro*-Kinase-Reaktion unter Verwendung von gereinigtem CrkII-GST (1 µg) unterzogen. Westernblot-Analysen mit Hilfe des α-CrkII-PY-221 Antikörpers zeigen, dass CrkII durch *H. pylori*-aktiviertes Abl phosphoryliert wird. Die Verwendung des Abl spezifischen Inhibitors SKI-DV2-43 (1 µM) stellt die Abl-Abhängigkeit der CrkII-Phosphorylierung dar. Westernblot-Analysen mit α-c-Abl bzw. α-GST zeigen das gleiche Mengen an Abl und CrkII vorhanden waren.

Anschließend sollte untersucht werden, ob die Crk-Adapterproteine an CagA binden. Dafür wurden AGS-Zellen mit *H. pylori* WT oder $\Delta cagA$ -Mutanten infiziert und anschließend erfolgte die Immunopräzipitation von CagA oder CrkII. Es konnte sowohl eine Interaktion zwischen CagA und CrkII als auch CrkII und Abl nachgewiesen werden (Abb. 4.21). Dabei ist diese Interaktion von phosphoryliertem CagA abhängig. Durch die Verwendung der isogenen $\Delta cagL$ -Mutante und anschließender Immunopräzipitation von c-Abl konnte die T4SS-Abhängigkeit der Abl-Aktivierung nachgewiesen werden. Mit P12 $\Delta cagL$ infizierte AGS-Zellen zeigen keine signifikante Erhöhung von phosphoryliertem Abl im Vergleich zu den nicht infizierten AGS-Zellen (Abb. 4.21).

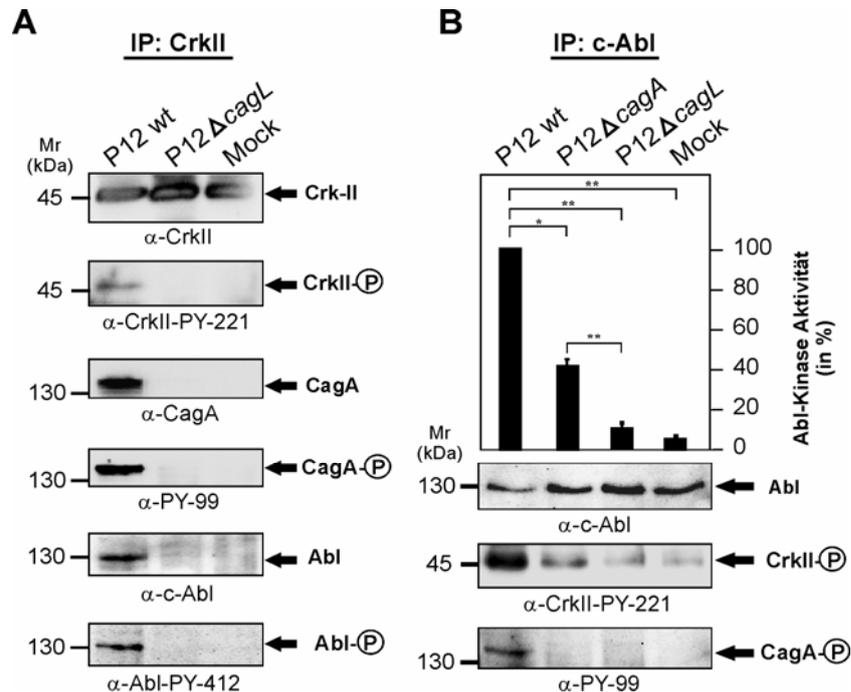


Abb. 4.21: **CagA^{PY} bildet einen Komplex mit aktiviertem Abl und CrkII *in vivo*.** (A) AGS-Zellen wurden mit P12 WT oder der isogenen $\Delta cagL$ -Mutante für 6 h infiziert und anschließend CrkII immunopräzipitiert. Die Lysate der IP's wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Westernblot-Analysen mit den angegebenen Antikörpern zeigen das Vorhandensein von CrkII^{PY}, CagA^{PY} und c-Abl^{PY} in einem Komplex. Dieser Komplex ist nicht in mit P12 $\Delta cagL$ infizierten Zellen und auch nicht in den nicht infizierten Zellen (mock) nachweisbar. (B) AGS-Zellen wurden mit P12 WT oder den isogenen Mutanten P12 $\Delta cagA$ und P12 $\Delta cagL$ für 6 h infiziert und anschließend c-Abl immunopräzipitiert. Die IP's wurden mit den angegebenen Antikörpern analysiert und zeigen, dass die isogene $\Delta cagA$ -Mutante Abl immer noch zu 40 % aktiviert und somit auch zu einer schwachen CrkII-Phosphorylierung führt ($P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *).

Die bisher dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die phosphorylierungsabhängige Aktivierung von c-Abl und CrkII für die *H. pylori*-induzierten Aktin-zytoskeletalen Veränderungen wichtig ist. Folglich sollte mittels siRNA für CrkII überprüft werden, ob CrkII essentiell für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps ist. Diese Vermutung wurde bestätigt, da die Transfektion von CrkII siRNA zu einer drastischen Inhibierung des Elongationsphänotyps führt (Abb. 4.22).

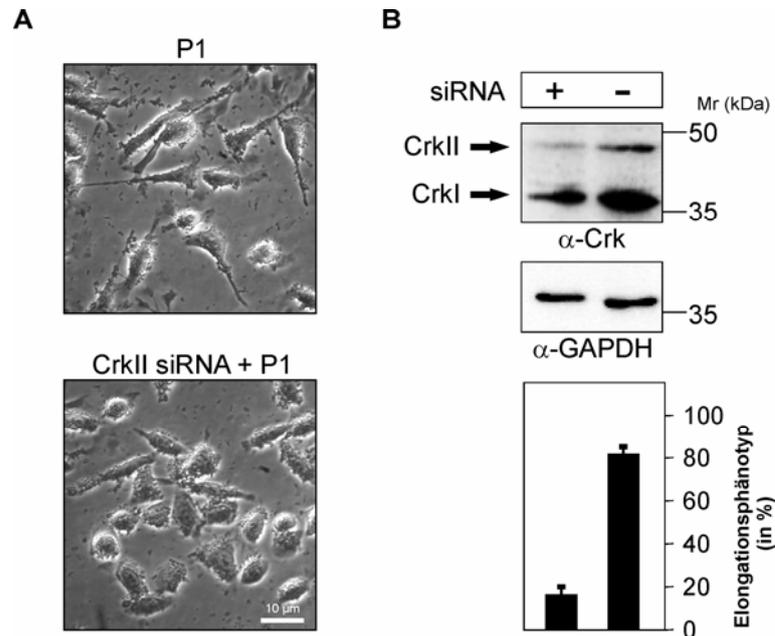


Abb. 4.22: **CrkII ist essentiell für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps.** (A) AGS-Zellen wurden mit CrkII siRNA transfiziert und 48 h nach Transfektion mit *H. pylori* P1 WT für 6 h infiziert. Der Elongationsphänotyp in den mit CrkII siRNA transfizierten Zellen ist inhibiert. (B) Westernblot-Analysen mit α -Crk zeigen, dass die Expression von sowohl CrkI als auch CrkII vermindert wurde. Die Anzahl der elongierten Zellen wurde quantifiziert. Die Ergebnisse sind von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von CrkII und c-Abl wurden verschiedene CrkI-, CrkII- und c-Abl-Konstrukte in AGS-Zellen transient exprimiert und die Ausbildung des Phänotyps nach *H. pylori*-Infektion analysiert. Die Expression eines c-Abl-Konstruktes, das in der Kinase-Domäne mutiert ist (K290H), führt im Gegensatz zur Expression von c-Abl^{WT} zu einer Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps (Abb. 4.23). Die Abhängigkeit des *H. pylori*-induzierten Phänotyps von den Crk-Adapterproteinen CrkI und CrkII wurde sowohl mit Mutanten, die Punktmutationen in der SH2- und SH3-Domäne tragen, sowie einer phosphorylierungsdefizienten-CrkII-Mutante untersucht. AGS-Zellen, die mit CrkI^{WT} bzw. CrkII^{WT} transfiziert wurden, waren weiterhin in der Lage den Elongationsphänotyp nach *H. pylori*-Infektion auszubilden. Im Gegensatz dazu war dieser Phänotyp in Gegenwart von CrkI^{R38K}, CrkI^{W170K}, CrkII^{R38V} sowie CrkII^{W169L} blockiert. Die Ausbildung des Elongationsphänotyps nach *H. pylori*-Infektion war auch in Gegenwart der phosphorylierungsdefizienten-CrkII^{Y221F}-Mutante reduziert (Abb. 4.23).

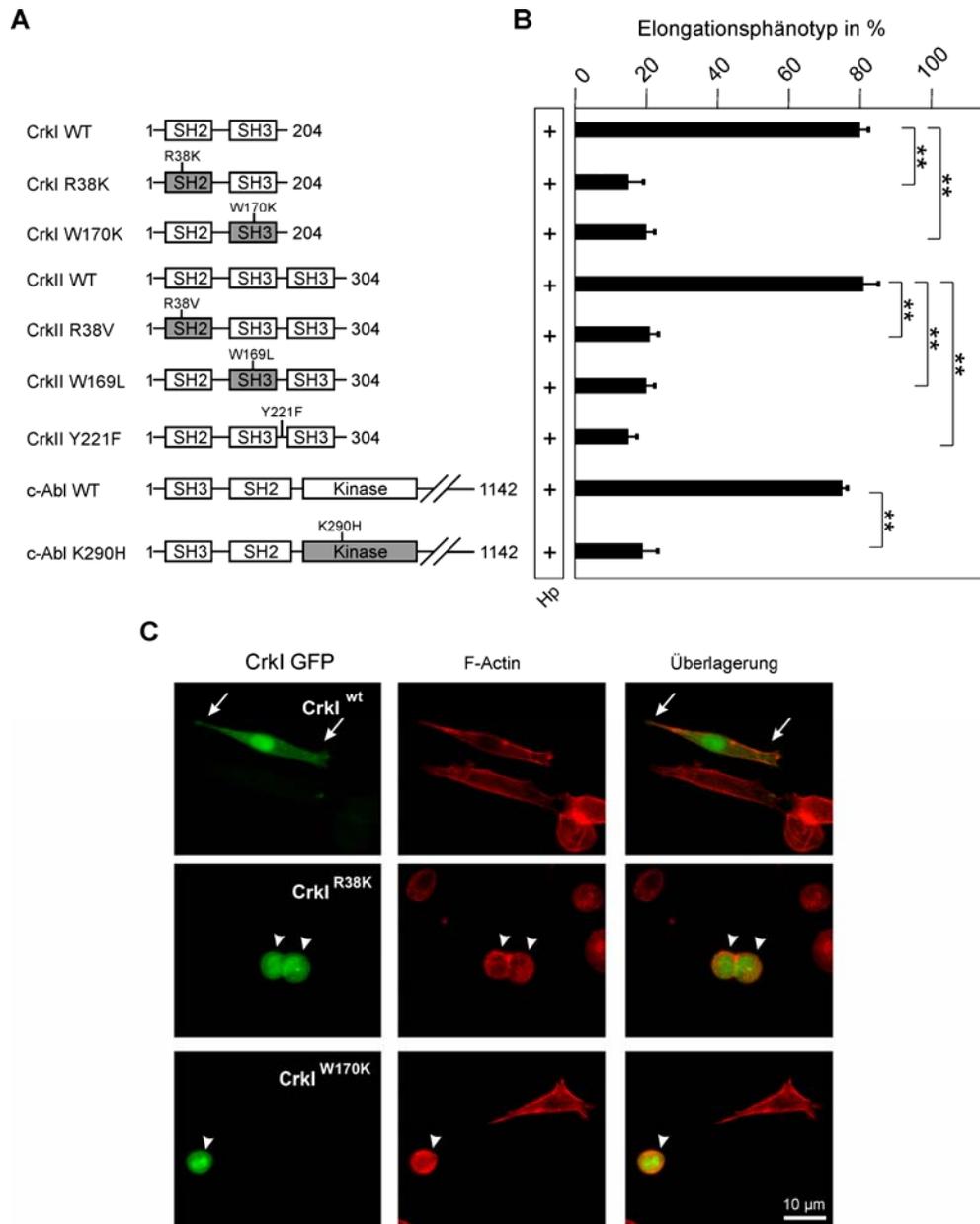


Abb. 4.23: **Einfluss von CrkI, CrkII und Abl auf den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten Expressions-Konstrukte. (B) In AGS-Zellen wurden die angegebenen Konstrukte transient exprimiert und 48 h nach Transfektion mit *H. pylori* WT für 6 h infiziert. Die Anzahl der elongierten Zellen wurde quantifiziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten ($P < 0,005$ **). (C) AGS-Zellen wurden mit CrkI^{WT}, CrkI^{R38K} bzw. CrkI^{W170K} fusioniert mit GFP (grün) transfiziert und anschließend mit *H. pylori* für 6 h infiziert. Filamentöses F-Aktin wurde mit Phalloidin (rot) angefärbt. Die Expression der Mutanten führt zur Blockierung des Elongationsphänotyps. Die Pfeilspitzen zeigen exemplarisch Zellen, die mit CrkI^{R38K} bzw. CrkI^{W170K} transfiziert sind. Die Pfeile stellen die mit CrkI^{WT} transfizierten und nach *H. pylori*-Infektion elongierten Zellen dar.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Crk-Adapterproteine eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps spielen. Darüber hinaus konnte mit verschiedenen methodischen Ansätzen gezeigt werden, dass in Folge einer *H. pylori*-Infektion (i) c-Abl aktiviert wird, (ii) CrkII und CagA phosphoryliert und (iii) CagA^{PY}, c-Abl^{PY} und Crk^{PY} einen funktionellen Komplex *in vivo* bilden. Allerdings ist noch nicht bekannt, über welche Domänen die einzelnen Interaktionen zustande kommen.

4.3 MOLEKULARE MECHANISMEN DER CAGA-INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN DES AKTIN-ZYTOSKELETTS

Im dritten Teil meiner Arbeit möchte ich die Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der CagA-induzierten Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts darstellen. Dabei werde ich einen neuen methodischen Ansatz, die Ko-Infektion, und die Rolle der kleinen Rho GTPasen, RhoA, Rac1 und Cdc42 besonders herausstellen.

4.3.1 KO-INFESTION VON AGS-ZELLEN MIT *H. PYLORI* UND ANDEREN AKTIN-ZYTOSKELETT MANIPULIERENDEN PATHOGENEN

Wie bereits mehrmals beschrieben führt die Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori* über 4-8 h und einer MOI (*Multiplicity of infection*) von 100 zu drastischen Aktin-zytoskelettalen Veränderungen und ausgeprägter Zellstreuung (Abb.4.1). Zu Beginn meiner Arbeit waren lediglich einige Arbeiten über den molekularen Mechanismus der CagA-induzierten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts veröffentlicht (Peek und Blaser, 2002; Amieva *et al.*, 2003). Weiterführende Untersuchungen zur Analyse der molekularen Mechanismen des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps sollten im Rahmen dieser Arbeit erfolgen. Zu diesem Zweck wurde ein neuer methodischer Ansatz, die Ko-Infektion, gewählt. Es ist bekannt dass zahlreiche Pathogene die Mechanismen der Signaltransduktion in der Zelle, von der Tyrosinphosphorylierung bis zur Aktinpolymerisierung, an vielen Schaltstellen zu ihrem Vorteil manipulieren können (Gruenheid und Finlay, 2003; Lara Tejero und Galan, 2004). Aus diesem Grund wurden einige dieser Pathogene als „Werkzeug“ benutzt, um den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp näher zu charakterisieren. Dazu wurden AGS-Zellen für 4 h mit dem jeweiligen Pathogen in einem Ko-Infektionsansatz zusammen mit *H. pylori* infiziert und der entstehende Phänotyp analysiert. In Abhängigkeit des jeweiligen Pathogens und der MOI konnten zum einen (i) eine Blockierung oder (ii) eine Verstärkung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps aber auch (iii) kein modulierender Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp beobachtet werden. Zu den Pathogenen, die zu einer Blockierung des Phänotyps führten, gehörten enteropathogene

E. coli, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. und *Shigella* spp. (Abb. 4.24, Tabelle 8.2 Anhang). Die Pathogene mit blockierendem Einfluss auf den Phänotyp können außerdem in starke Blocker (Inhibierung bei einer $MOI < 10$) und moderate Blocker (Inhibierung bei einer $MOI < 50$) unterteilt werden. Überraschenderweise zeigten drei Pathogene einen verstärkenden Einfluss auf den Elongationsphänotyp. AGS-Zellen, die mit *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis* oder *Bordetella parapertussis* ko-infiziert wurden, zeigten nahezu 90-95% elongierte Zellen (Abb. 4.24, Tabelle Anhang). Unter den Pathogenen, die keinen Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp hatten, sind *E. coli* K12, *Neisseria gonorrhoeae* und *Staphylococcus aureus* zu nennen (Abb. 4.24, Tabelle 8.2 Anhang).

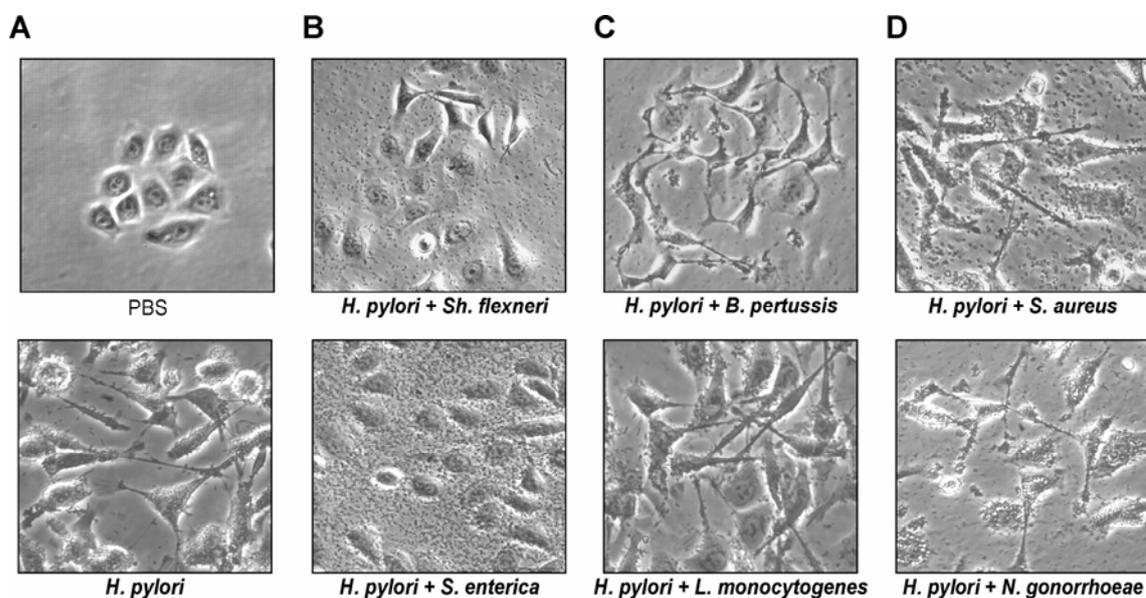


Abb. 4.24: **Einfluss der Ko-Infektion auf den durch *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp.** AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* und mit *Sh. flexneri*, *S. enterica*, *B. pertussis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* oder *N. gonorrhoeae* ko-infiziert. (A) Die Kontrollen zeigen nicht infizierte AGS-Zellen und mit *H. pylori* infizierte AGS-Zellen. Die Ko-Infektionen führten zu einer Inhibierung (B) oder Verstärkung (C) des Elongationsphänotyps. Es gab aber auch Pathogene, wie *S. aureus* und *N. gonorrhoeae*, die keinen Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp hatten (D).

Diese beschriebenen Effekte auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp in den Ko-Infektionen sind dosisabhängig und variieren von Pathogen zu Pathogen. So konnte eine eindeutige Blockierung des Elongationsphänotyps in einer *S. enterica*-Ko-Infektion bei einer MOI von 20 bis 80 beobachtet werden, wohingegen in den Ko-Infektionen mit *V. cholerae*, *C. difficile* oder *Yersinia* spp. schon bei einer MOI von fünf bis zehn eine deutliche Blockierung auftrat. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Gruppe der Pathogene, die einen verstärkenden Einfluss auf den Elongationsphänotyp hatten, gemacht werden. Eine MOI von fünf war bei den Ko-Infektionen mit *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *L. monocytogenes* ausreichend um den Phänotyp zu verstärken.

Eine $MOI > 10$ führte hingegen zum Ablösen der AGS-Zellen. Ko-Infektionen mit *S. aureus* und *N. gonorrhoeae* zeigten auch bei einer MOI von 100 keinen modulierenden Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp.

In darauf folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die beschriebenen Blockierungs- bzw. Verstärkungseffekte auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp, auf lösliche ins Medium sekretierte Faktoren oder auf den direkten Kontakt zwischen Zelle und Pathogen und der anschließenden Translokation von Effektorproteinen zurückzuführen sind. In einem Transwell-System wurden die mit *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen von dem jeweiligen zweiten Pathogen räumlich durch eine Membran (0,45 μm Porengröße) getrennt und der direkte Kontakt, aber nicht die Diffusion der löslichen bakteriellen Faktoren, war nicht mehr gewährleistet. Die Ergebnisse dieser sehr umfangreichen Experimente sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Von den 14 Pathogenen die den *H. pylori*-induzierten Phänotyp geblockt hatten, konnten nur *V. cholerae*, *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. difficile* und *B. fragiles* auch im Transwell-System den Phänotyp blocken. *Bordetella* spp. und *L. monocytogenes* hatten auch im Transwell-System einen verstärkenden Einfluss auf den Elongationsphänotyp. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei den eben beschriebenen Pathogenen ins Medium sekretierte Faktoren für die Blockierung bzw. Verstärkung verantwortlich sind. Andererseits ist bei den Pathogenen, die im Transwell-System keinen inhibitorischen Einfluss auf den Phänotyp hatten, der direkte Kontakt zu den AGS-Zellen offenbar notwendig. Letztere Pathogene besitzen interessanterweise alle ein TypIII- bzw. TypIV-Sekretionssystem, das kontaktabhängig die Effektorproteine direkt in die Wirtszelle einschleust.

Tab. 4.2: Zusammenfassende Darstellung der Ko-Infektionen nach direktem Kontakt bzw. nach Trennung durch eine 0,45 μm Membran.

| Ko-Infektion mit | Stamm | Elongationsphänotyp nach Infektion | |
|------------------------------------|-----------|------------------------------------|------------------|
| | | mit direktem Kontakt * | im Trans-Well ** |
| <i>Vibrio cholerae</i> | TCB5 | - | - |
| <i>Clostridium difficile</i> | ATCC13124 | + | - |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 81-176 | + | + |
| <i>Campylobacter fetus</i> | 97-3574 | + | + |
| <i>Bacteroides fragiles</i> | ATCC25285 | - | + |
| <i>Bordetella pertussis</i> | ATCC9797 | ++++ | ++++ |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | ATCC15311 | ++++ | ++++ |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | EGD-e | ++++ | ++++ |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | ATCC9610 | - | +++ |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | YP3 | - | +++ |
| EPEC | E2348/96 | - | +++ |

| | | | |
|-------------------------------|-----------|----|-----|
| <i>EHEC</i> | NCTC12900 | + | +++ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | NCTC10662 | - | +++ |
| <i>Salmonella enterica</i> | SI3261 | + | +++ |
| <i>Shigella flexneri</i> | SF01 | ++ | +++ |
| <i>Shigella sonnei</i> | ATCC25931 | - | +++ |

* Ko-Infektionen mit den angegebenen Pathogenen über 4 h in einer 6-Loch-Platte.

** AGS-Zellen wurden in der unteren Kammer mit *H. pylori* infiziert (MOI=100) und in der oberen Kammer mit dem jeweiligen zweiten Pathogen. Der Phänotyp wurde nach 4 h analysiert. (- vollständige Inhibierung des Phänotyps; + 15-40 % Phänotyp; ++ 40-50 % Phänotyp; +++ 60-80% Phänotyp; ++++ mehr als 80 % Phänotyp).

Die Translokation und Phosphorylierung von CagA ist absolut essentiell für die *H. pylori*-induzierten morphologischen Veränderungen. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die CagA-Translokation und -Phosphorylierung in Gegenwart der Pathogene beeinflusst wurde. Dazu wurden AGS-Zellen für 4 h in Gegenwart der jeweiligen Pathogene und *H. pylori* ko-infiziert und die Tyrosinphosphorylierung bzw. Translokation von CagA mittels Westernblot (α -PY-99 bzw. α -CagA) analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der CagA-Phosphorylierung und -Translokation bei den Ko-Infektionen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden (Abb. 4.25). Nach einer genaueren Analyse konnten jedoch einige Auffälligkeiten beobachtet werden. Die Ko-Infektion mit *S. enterica* führte beispielsweise zu einem leichten Rückgang der CagA-Phosphorylierung aber zu einer vollständigen Blockierung des Phänotyps. Wohingegen die *L. monocytogenes*-Ko-Infektion keinen Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung zeigten, jedoch eine deutlich Verstärkung des Phänotyps auftrat (Abb. 4.25). Auf der anderen Seite war die CagA-Phosphorylierung, wie auch der Phänotyp, bei der *B. fragiles* Ko-Infektion reduziert. Diese Einflüsse auf die CagA- Phosphorylierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

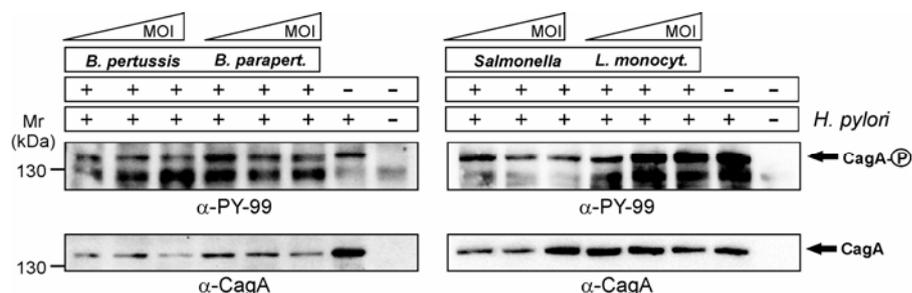


Abb. 4.25: **Einfluss der Ko-Infektionen auf die CagA-Phosphorylierung und -Translokation.** AGS-Zellen wurden für 4 h mit den angegebenen Pathogenen und *H. pylori* ko-infiziert. Der Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung und -Translokation wurde mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung der α -PY-99- und α -CagA-Antikörper analysiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ko-Infektion ein wichtiges und nützliches Werkzeug bei der Analyse der molekularen Mechanismen der *H. pylori*-

induzierten zellulären Veränderungen sein könnte. Die CagA-Translokation und – Phosphorylierung ist kaum beeinflusst und somit beruhen die Blockierungs- bzw. Verstärkungseffekte auf der Manipulation von Signalwegen offenbar unterhalb der CagA-Phosphorylierung. Die Signalwege einiger ausgewählter Pathogene und deren Effektorproteine standen im Vordergrund der nachfolgenden Untersuchungen.

4.3.2 IDENTIFIZIERUNG VON RHO-GTPASEN ALS ZELLULÄRE ZIELSTRUKTUREN VON *H. PYLORI*

Alle der hier verwendeten Pathogene haben während der Evolution Strategien entwickelt, um das Aktin-Zytoskelett nachhaltig zu manipulieren. Einige produzieren Toxine, die direkt das Aktin-Zytoskelett modifizieren. Andere Bakterien sekretieren Toxine, die die kovalente Modifikation von Aktin, durch ADP-Ribosylierung, oder der Rho-GTPasen, durch ADP-Ribosylierungs-, Glykosylierungs-, Transglutaminierungs- oder Deaminierungsreaktionen, katalysieren (Abb. 1.8). Eine weitere Gruppe ahmt die Wirkung bzw. die Struktur von zellulären GAP's oder GEF's nach und erreicht somit eine reversible Modulation des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 1.8). Es wurden aber auch Exotoxine, die invasiven Adenylatzyklasen, beschrieben, die die Zellfunktion durch Änderung des cAMP-Spiegels beeinflussen. Des weiteren sind Toxine bekannt, die die heterotrimeren G-Proteine durch ADP-Ribosylierung beeinflussen (Kather und Aktories, 1983; Barbieri *et al.*, 2002).

4.3.3 EINFLUSS GEREINIGTER TOXINE AUF DEN *H. PYLORI*-INDUZIERTEN ELONGATIONSPHÄNOTYP

Zur Untersuchung des Einflusses der Rho-GTPasen auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp standen gereinigte Proteine von zellgängigen C3-Toxin, Toxin-B (Tcd-B) und Toxin-BF (Tcd-BF) sowie von CNF1 und CNFY zur Verfügung, die bekanntermaßen verschiedene GTPasen hemmen oder aktivieren (Tabelle 4.3).

Tab. 4.3: Darstellung der Wirkungsmechanismen der verwendeten Toxine.*

| Toxin | Reaktionsmechanismus | Einfluss auf die Rho-GTPasen |
|--------|--|--------------------------------------|
| Tcd-B | Glykosylierung (RhoA _{Thr35}) | Inhibierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 |
| Tcd-BF | Glykosylierung (RhoA _{Thr37}) | Inhibierung von Rac1 und Ras |
| CNF-1 | Deaminierung (RhoA _{Gln63}) | Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 |
| CNF-Y | Deaminierung (RhoA _{Gln63}) | Aktivierung von RhoA |
| C3 | ADP-Ribosylierung (RhoA _{Asn41}) | Inhibierung von RhoA |

* in Anlehnung an Aktories und Barberie, 2005

AGS-Zellen wurden in Gegenwart der in Tabelle 4.3 dargestellten Toxine mit *H. pylori* infiziert und der entstehende Phänotyp mit dem typischen *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp verglichen (Abb. 4.26).

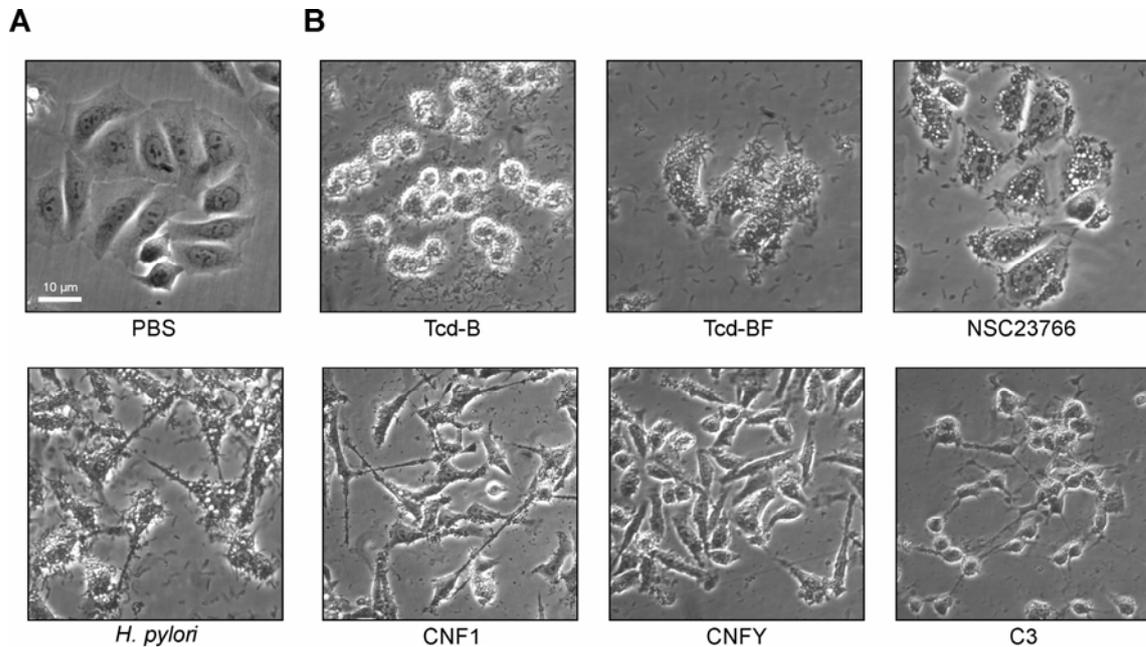


Abb. 4.26: **Die Inhibierung von Rac, aber nicht von RhoA, blockiert den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp.** AGS-Zellen wurden für 4-6 h in Gegenwart der jeweiligen Toxine bzw. Inhibitoren mit *H. pylori* infiziert und der Elongationsphänotyp analysiert. (A) AGS-Zellen vor Infektion und nach Infektion mit *H. pylori*. (B) In Gegenwart von Tcd-B, Tcd-BF und NSC23766 ist der Elongationsphänotyp inhibiert. Im Gegensatz dazu zeigen AGS-Zellen in Gegenwart von CNF1 und C3-Toxin eine leichte Verstärkung und CNFY einen leichten Rückgang des Elongationsphänotyps.

Die Ergebnisse zeigen, dass Tcd-B und Tcd-BF den *H. pylori*-induzierten Phänotyp inhibieren. Infektionen in Anwesenheit des spezifischen Rac-Inhibitors NSC23766 blockieren ebenfalls den Elongationsphänotyp. Interessante Beobachtungen wurden mit CNF-1 und CNF-Y erzielt. Die Infektion von AGS-Zellen in Gegenwart von CNF-1, das RhoA, Rac1 und Cdc42 aktiviert, führte zu einer Verstärkung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps. In Gegenwart von CNF-Y, das nur RhoA aktiviert, war der Phänotyp reduziert. Die Inhibierung von RhoA durch das C3-Toxin führt zu einer Verstärkung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps. Diese Ergebnisse zeigen, dass der *H. pylori*-induzierte Phänotyp von den GTPasen Rac1, Ras und RhoA abhängig ist.

4.3.4 EINFLUSS VON ExoS UND ExoT AUF DEN *H. PYLORI*-INDUZIERTEN ELONGATIONSPHÄNOTYP

Pseudomonas aeruginosa, ein opportunistisches Pathogen, ist Auslöser zahlreicher Infektionskrankheiten bei immunsupprimierten Menschen oder Patienten mit zystischer Fibrose. Das Genom des Bakteriums kodiert für vier Effektorproteine (ExoS, ExoT, ExoY und ExoU), die über ein TypIII-Sekretionssystem (T3SS) in die Zelle eingeschleust werden (Engel, 2001). Von besonderem Interesse sind ExoS und ExoT, zwei zu 76 % homologe bifunktionale Toxine, die auf das Aktin-Zytoskelett wirken. ExoS und ExoT besitzen am N-Terminus eine GAP-Aktivität, welche zur Inaktivierung von Rho, Rac und Cdc42 führt und am C-Terminus besitzen beide eine ADP-Ribosyltransferase-(ADPRT)-Aktivität. Zahlreiche Aktin-Zytoskelett modulierende Proteine, wie H-Ras, Ral, Rab und Cdc42, sind Ziele der ExoS ADPRT-Domäne (Coburn und Gil, 1991; Ganesan *et al.*, 1999; Barbieri *et al.*, 2001; Wurtele *et al.*, 2001; Fraylick *et al.*, 2002; Henrikson *et al.*, 2002; Pedersom *et al.*, 2002; Garrity-Ryan *et al.*, 2004). Es wird aber auch der zytotoxische Phänotyp, durch Induktion der Apoptose, durch ExoS ausgelöst (Alaoui-El-Azher *et al.*, 2006; Jansson *et al.*, 2006). Die ADPRT-Domäne von ExoT ribosyliert einige wenige Wirtszellproteine, wie zum Beispiel die Crk-Adapterproteine (Sun und Barbieri, 2003).

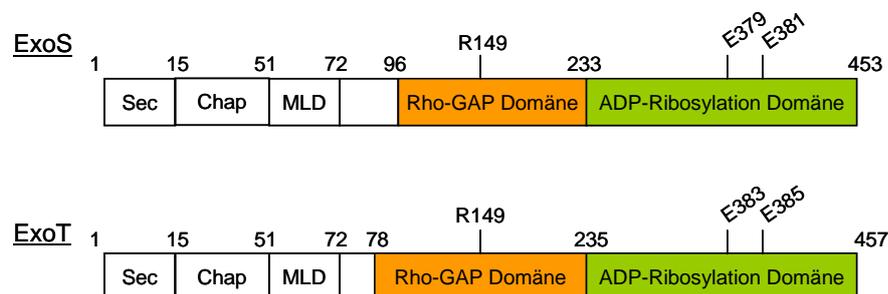


Abb. 4.27: **Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von ExoS und ExoT.** ExoS und ExoT sind zu 76 % homolog und besitzen beide eine N-terminale Rho-GAP- (orange) und C-terminale ADPRT-Domäne (grün). Beide Toxine besitzen weiterhin ein Sekretionssignal (Sec), eine Chaparon-bindende-Domäne (Chap) und eine Membranlokalisierungsdomäne (MLD), (in Anlehnung an Barbieri und Sun, 2004).

Nachdem im Kapitel 4.3.1 bereits gezeigt werden konnte, dass die Ko-Infektion ein wichtiges und nutzbares Werkzeug für die Analyse der molekularen Mechanismen der *H. pylori*-induzierten zellulären Veränderungen ist, sollte nun mit Hilfe von ExoS und ExoT die durch CagA-vermittelten bzw. -genutzten Signalwege weiter analysiert werden. Zunächst wurden AGS-Zellen mit *H. pylori* und anschließend mit *P. aeruginosa* ko-infiziert und der entstehende Phänotyp analysiert. Beide *P. aeruginosa*-WT-Stämme PAO1 und PAK haben einen blockierenden Einfluss auf den Elongationsphänotyp (Abb. 4.28). Dieser Blockierungseffekt ist kontakt- und dosisabhängig (Abb. 4.28 B). Die Kontaktabhängigkeit konnte mit Hilfe eines

Transwell-Systems gezeigt werden. Eine niedrige MOI (20-40) von *P. aeruginosa* ist ausreichend, um den *H. pylori*-induzierten Phänotyp effizient zu blockieren (Abb. 4.28 B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *P. aeruginosa* Faktoren produziert, die kontaktabhängig in die AGS-Zellen gelangen und dort die von *H. pylori*-benutzten Signalwege, die zur Ausbildung des Elongationsphänotyps führen, blockiert. Diese Blockierungseffekte sind auch nicht auf eine verminderte CagA-Translokation und -Phosphorylierung zurückzuführen (Abb. 4.29). Weitere Untersuchungen dienen der Analyse dieser Faktoren.

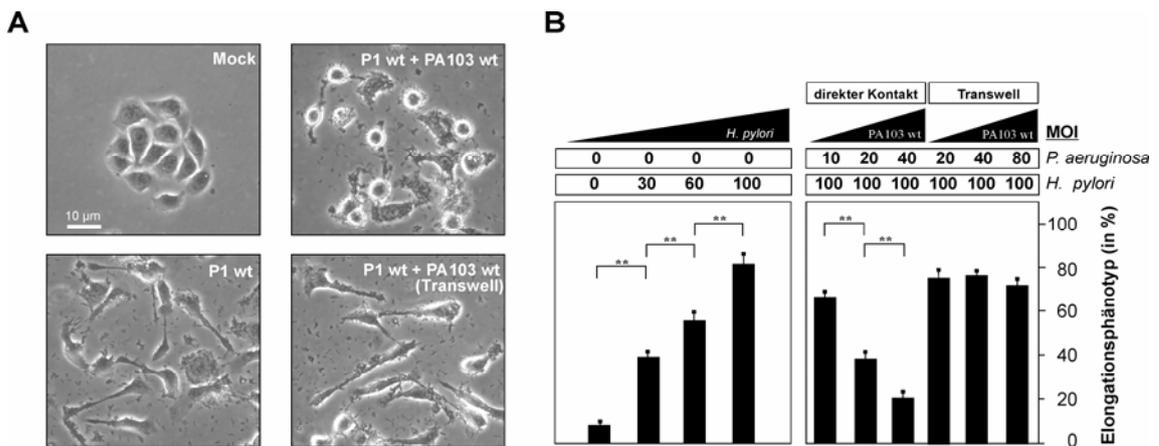


Abb. 4.28: ***Pseudomonas aeruginosa* blockiert den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp dosis- und kontaktabhängig.** AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* (P1 WT) alleine oder in Gegenwart von *P. aeruginosa* (PA103 WT) infiziert. (A) Mit *H. pylori* infizierte AGS-Zellen bilden den typischen Elongationsphänotyp aus, wohingegen dieser in Gegenwart von *P. aeruginosa* kontaktabhängig blockiert ist. Die Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps war im Transwell-System aufgehoben. (B) Die Anzahl der elongierten Zellen nach *H. pylori*-Infektion, nach Ko-Infektion mit direktem Kontakt bzw. im Transwell-System wurde quantifiziert.

Die vorher beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die kontaktabhängige Sekretion von T3SS-Effektorproteinen durch *P. aeruginosa* in die AGS-Zellen der essentielle Mechanismus ist, um den *H. pylori*-induzierten Phänotyp zu blockieren. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Mutanten des *P. aeruginosa*-Stammes PAK, die entweder ExoS (PAK Δ exoT) oder ExoT (PAK Δ exoS) exprimieren, in einem Ko-Infektionsexperiment analysiert. Sowohl PAK WT als auch PAK Δ exoT und PAK Δ exoS hatten einen blockierenden Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp. Eine Aufhebung des Blockierungseffektes konnte lediglich nach Ko-Infektion mit der PAK Δ exoS Δ exoT-Doppelmutante erzielt werden (Abb. 4.29). Diese Ergebnisse zeigen, dass entweder ExoS oder ExoT für die Blockierung des Phänotyps verantwortlich sind. Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach Ko-Infektion mit PA103 Δ exoU, einem *P. aeruginosa* Stamm der eine *in-frame* Deletion im *exoU* Gen trägt, aber immer noch ExoT sekretiert, und mit der isogenen Mutante PA103 Δ exoU Δ exoT, die ExoS von einem Plasmid exprimiert, beobachtet werden. Des Weiteren konnte der

Blockierungseffekt durch die Ko-Infektion mit der *pscJ*-Mutante, einer Mutante die kein funktionelles T3SS besitzt (Hauser und Engel, 1999), aufgehoben werden (Abb. 4.29). Ko-Infektionen mit diesem *P. aeruginosa*-Stamm hatten auch bei hohen MOI's keinen Effekt auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp (Abb. 4.29).

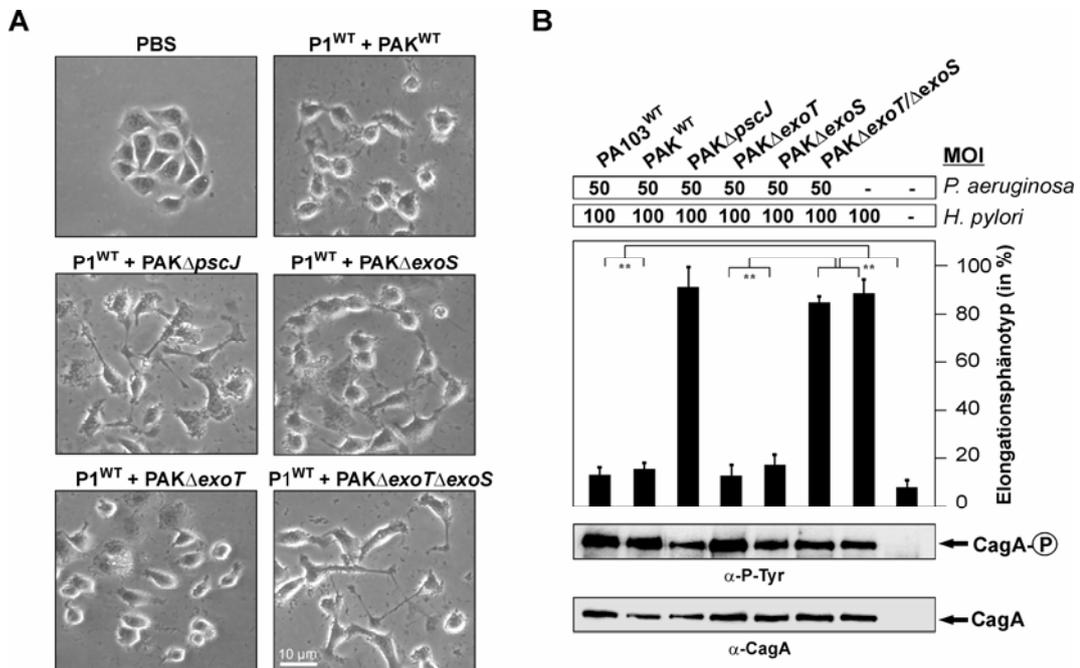


Abb. 4.29: **ExoS und ExoT blockieren den *H. pylori*-induzierten Phänotyp.** AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* ($P1^{WT}$) und den angegebenen *P. aeruginosa*-Stämmen ko-infiziert. (A) Die Ausbildung des Elongationsphänotyps wurde mikroskopisch analysiert. Sowohl *P. aeruginosa* (PAK^{WT}) als auch die isogenen $\Delta exoS$ - bzw. $\Delta exoT$ -Mutanten sind in der Lage den *H. pylori*-induzierten Phänotyp zu blockieren. Lediglich die $\Delta exoT/\Delta exoS$ -Doppelmutante und die T3SS-Mutante ($\Delta pscJ$) hatten keinen inhibierenden Einfluss auf die Ausbildung des Elongationsphänotyps. (B) Die Anzahl der elongierten Zellen in jedem Experiment wurde quantifiziert ($P < 0,005$ **). (C) Der Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung und -Translokation wurde mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung der α -PY-99- und α -CagA-Antikörper analysiert.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass der *P. aeruginosa*-vermittelte Blockierungseffekt auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp von einem funktionierenden T3SS abhängig ist und sowohl durch ExoS als auch durch ExoT vermittelt werden kann. Die weiteren Untersuchungen dienten demzufolge der Analyse der Mechanismen, die ExoS und ExoT benutzen, um den *H. pylori*-induzierten Phänotyp zu blockieren. Wir erhofften uns somit Hinweise auf die molekularen Mechanismen der CagA-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen zu erhalten.

ExoS und ExoT besitzen beide eine N-terminale GAP-Aktivität (G^+) mit Rho, Rac und Cdc42 als Substrate und eine C-terminale ADPRT-Aktivität (A^+) mit jeweils verschiedenen Substraten (Barbieri und Sun, 2004). Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass sowohl ExoS als auch ExoT für die Inhibierung des Phänotyps

verantwortlich sind, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, welche der beiden Aktivitäten für die Blockierung verantwortlich ist. Dafür wurden ExoS- und ExoT-Konstrukte von der AG Joanne Engel und Shouguang Jin zur Verfügung gestellt, die entweder in einer oder in beiden Domänen defekt waren, und in den Stamm PA103 Δ exoU Δ exoT transformiert wurden (Abb. 4.30; Garrity-Ryan *et al.*, 2004). AGS-Zellen wurden mit den angegebenen Stämme und *H. pylori* für 4 h infiziert und der Phänotyp analysiert. Wie in der Abbildung 4.30 dargestellt ist, ist weder die ADPRT-Aktivität [ExoS(G⁺A⁺)] noch die GAP-Aktivität [ExoS(G⁺A⁻)] von ExoS alleine in der Lage den *H. pylori*-induzierten Phänotyp zu blockieren. Im Gegensatz dazu besitzen sowohl die ADPRT-Aktivität von ExoT [ExoT(G⁺A⁺)] als auch die GAP-Aktivität [ExoT(G⁺A⁻)] alleine die Fähigkeit den *H. pylori*-induzierten Phänotyp zu blockieren. Die jeweiligen Doppelmutanten von ExoS(G⁻A⁻) und ExoT(G⁻A⁻) waren dagegen nicht mehr in der Lage den Phänotyp zu inhibieren.

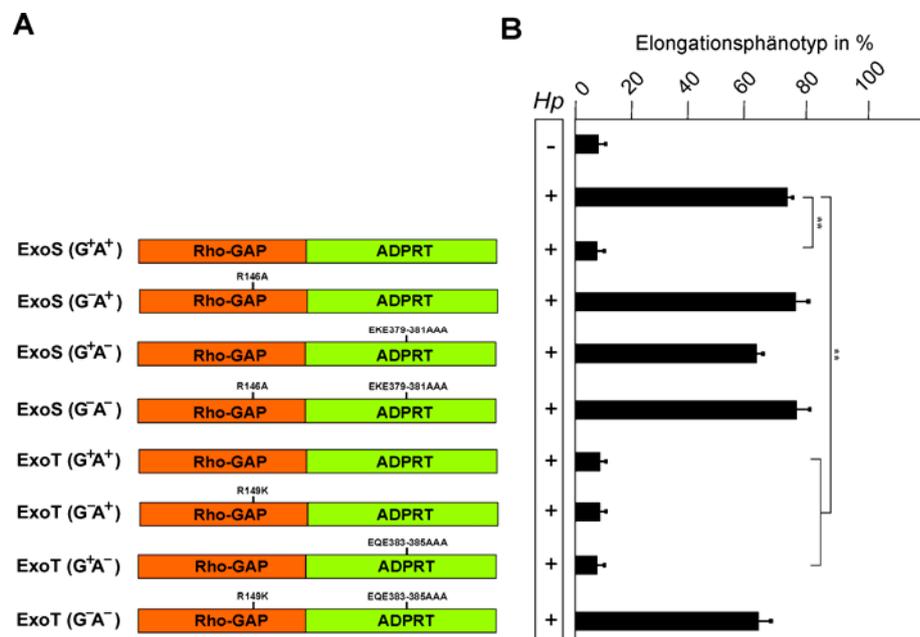


Abb. 4.30: **Einfluss der Rho-GAP- und ADPRT-Domänen von ExoS und ExoT auf den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp.** (A) AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* (*Hp*) und *P. aeruginosa*-Stämmen mit Mutationen in der ExoS bzw. ExoT Rho-GAP-(G^{+/}-) oder ADPRT-(A^{+/}-)-Domäne ko-infiziert (MOI von *H. pylori* = 100; MOI von *P. aeruginosa* = 40). (B) Die Anzahl der elongierten Zellen in jedem Experiment wurde quantifiziert (P < 0,005 **).

Diese Ergebnisse zeigen, dass entweder die GAP- oder die ADPRT-Domäne von ExoT aber beide Domänen von ExoS für die Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps erforderlich sind. Diese Befunde schließen aber nicht aus, dass die Blockierungseffekte auch auf andere bakterielle Faktoren zurückzuführen sind. Um derartige andere Faktoren auszuschließen, wurden verschiedene GFP-markierte ExoT-Konstrukte transient in AGS-Zellen für 36 h exprimiert, mit *H. pylori* infiziert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dazu wurden ExoT-Konstrukte im eukaryotischen

Expressionsvektor pIRES-EGFP verwendet (Garrity-Ryan *et al.*, 2004). AGS-Zellen wurden transient mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert und 36 h nach Transfektion mit mRFP-exprimierendem *H. pylori* für 4 h infiziert, anschließend fixiert und die elongierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. AGS-Zellen, die mit den Plasmiden ExoT(G⁺A⁻), ExoT(G⁺A⁻) oder ExoT(G⁻A⁺) transfiziert wurden, waren immer noch adhären und vital aber erheblich abgerundet, bildeten weniger Stressfasern (Geiser *et al.*, 2001) und verhinderten die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps (Abb. 4.31). Im Gegensatz dazu bildeten AGS-Zellen, die mit der ExoT-Doppelmutante [ExoT(G⁻A⁻)] transfiziert wurden, den *H. pylori*-induzierten Phänotyp aus. Ähnliche Beobachtungen wurden bei nicht transfizierten oder mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen gemacht. Westernblot-Analysen zeigen, dass die Aufhebung des Blockierungseffektes bei den ExoT(G⁻A⁻) transfizierten Zellen nicht auf eine verminderte Expression zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

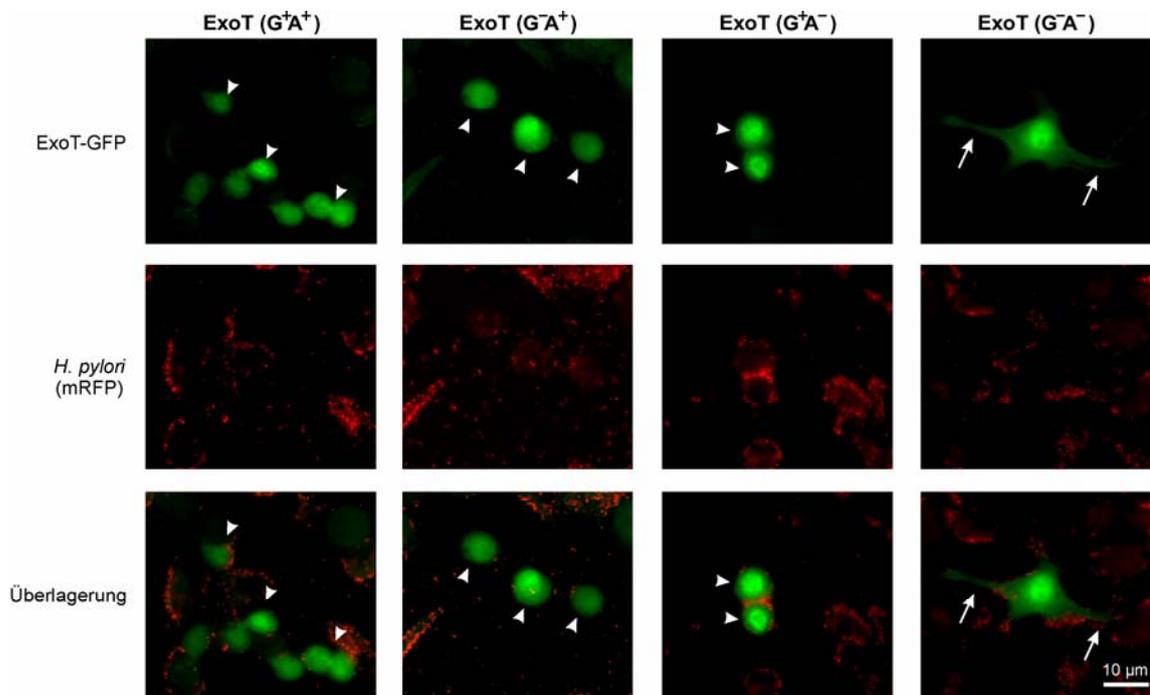


Abb. 4.31: **Die Rho-GAP- und die ADPRT-Domäne von ExoT inhibieren den *H. pylori*-induzierten Phänotyp.** (A) Die jeweiligen ExoT-Konstrukte, wurden transient in AGS-Zellen transfiziert und nach 36 h mit einem mRFP-exprimierendem *H. pylori* (rot) infiziert. Die transfizierten Zellen konnten durch die GFP-Expression (grün) identifiziert werden. AGS-Zellen die mit ExoT^{WT}, ExoT(G⁺A⁺) oder ExoT(G⁺A⁻) transfiziert wurden sind abgerundet und der *H. pylori*-induzierte Phänotyp ist geblockt (Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu bilden die Zellen, die mit dem leeren Vektor oder ExoT(G⁻A⁻) transfiziert sind, weiterhin den Elongationsphänotyp aus (Pfeil).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die GAP- oder die ADPRT-Domäne von ExoT und kein anderer Faktor für die Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps verantwortlich ist.

4.3.5 AKTIVITÄT VON ExoT AUF DAS CrkII-ADAPTERPROTEIN

ExoT zerstört das Aktin-Zytoskelett durch die Rho-GAP-Aktivität und durch die ADP-Ribosylierung der Crk-Adapterproteine (Garrity-Ryan *et. al.*, 2000; Sun und Barbieri, 2003; Barbieri und Sun, 2004). Eine Rolle von CrkII in der *H. pylori*-Infektion konnte bereits ausgearbeitet werden (Kapitel 4.2.3). Dabei konnte ich mit dieser Arbeit unter anderem zeigen, dass phosphoryliertes-CagA mit phosphoryliertem-CrkII interagiert. Unklar blieb allerdings, ob diese Interaktion durch die ADP-Ribosylierung von CrkII an der SH2-Domäne aufgehoben ist. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden AGS-Zellen mit *H. pylori* in Gegenwart oder in Abwesenheit von *P. aeruginosa* PA103 Δ *exoU/exoT*(G⁻A⁺) infiziert und CrkII immunopräzipitiert. Überraschenderweise hatte die ADP-Ribosylierung von CrkII durch ExoT keinen Einfluss auf die Menge an CagA^{PY}-gebundenen CrkII (Abb. 4.32 A). Die *H. pylori*-induzierte CrkII-Phosphorylierung ist in Gegenwart von *P. aeruginosa* blockiert (Abb. 4.32 A und B).

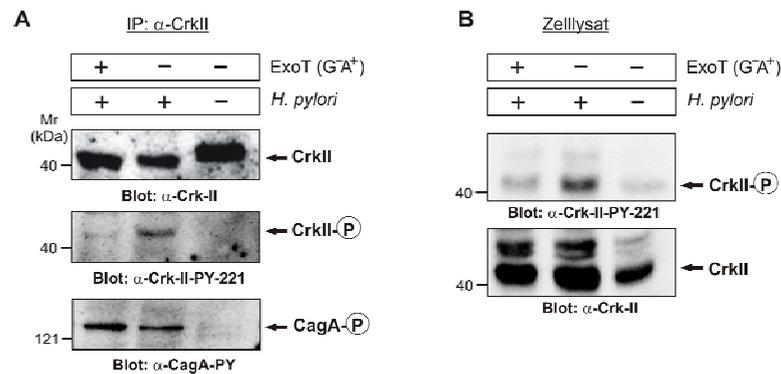


Abb. 4.32: **Die ADPRT-Aktivität von ExoT inhibiert die *H. pylori*-induzierte CrkII-Phosphorylierung, aber nicht die CagA Interaktion.** AGS-Zellen wurden für 4 h mit *H. pylori* in Abwesenheit oder in Gegenwart des *P. aeruginosa*-Stammes PA103 Δ *exoU/exoT*(G⁻A⁺) infiziert. (A) CrkII wurde unter Verwendung des α -CrkII Antikörpers immunopräzipitiert und die Lysate auf das Vorhandensein von CagA^{PY} (α -PY99) und CrkII^{PY} (α -CrkII-PY-221) überprüft. (B) Westernblot-Analysen von Zelllysaten unter Verwendung des α -CrkII-PY-221- und α -CrkII-Antikörpers zeigen, dass die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung von CrkII in Gegenwart von ExoT(G⁻A⁺) geblockt ist.

In PDGF-stimulierten Fibroblasten reguliert phosphoryliertes CrkII (Y-221) die Translokation von Rac aus dem Zytoplasma in die Membran (Abassi und Vuori, 2002). Mit Hilfe von Fraktionierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Rac in Gegenwart von ExoT(G⁻A⁺) nicht membrangebunden ist, wobei Rac in Gegenwart von ExoS(G⁺A⁺) membrangebunden ist (Abb.4.33). Eine Ursache für die Inhibierung der Membranlokalisierung von Rac in Gegenwart von ExoT kann die ADP-Ribosylierung von CrkII sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die ADP-Ribosylierung von CrkII nicht die Interaktion mit CagA verhindert (Abb. 4.32A). Demzufolge wurde die *H. pylori*-induzierte CrkII-Phosphorylierung in Gegenwart von PA103 Δ *exoU/exoT*(G⁻

A⁺) analysiert. Die Westernblot-Analyse der Zelllysate mit dem α -CrkII-PY-221 zeigte, dass *H. pylori* die CrkII-Phosphorylierung schon 90 min nach Infektion stimuliert, diese Phosphorylierung jedoch in Gegenwart von PA103 Δ exoU/exoT(G⁻A⁺) aufgehoben ist (Abb. 4.32 B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die ADP-Ribosylierung von CrkII durch ExoT die Phosphorylierung von CrkII *in vitro* blockiert und damit unter anderem die Aktivierung von Rac1 verhindert.

Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.3 zeigen diese deutlich, dass die Crk-Adapterproteine eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Elongationsphänotyps spielen.

4.3.6 EFFEKTE VON ExoS/T AUF Rac1, RhoA, Cdc42 UND H-Ras

Die bisher gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass die Inaktivierung von mindestens einem Zielprotein von ExoS oder ExoT für die Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps verantwortlich ist. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass ExoS und ExoT unter anderem die kleinen GTPasen der Rho- und Ras-Familie inaktivieren (Barbieri und Sun, 2004). Rho-GTPasen unterliegen einer stringenten Kontrolle (Abb. 1.6) und haben einen Einfluss auf die Struktur und Funktion des Aktin-Zytoskeletts (Hall, 1998). In ruhenden Zellen liegen die Rho-GTPasen im inaktiven Zustand im Zytoplasma vor. Nach der Stimulation der Zelle können sie sich mit Hilfe ihres isoprenylierten C-Terminus an der Plasmamembran lokalisieren. Dort können sie durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) aktiviert werden und an bestimmte Effektormoleküle binden (Bishop und Hall, 2000). Auf der anderen Seite verstärken die GAPs (GTPase aktivierende Proteine) die hydrolytische Aktivität und fördern damit die inaktive, zytosolische Konformation. Die GAP-Domänen von ExoS und ExoT inaktivieren RhoA, Rac1 und Cdc42 und die ADPRT-Domäne von ExoS inhibiert H-Ras (Barbieri und Sun, 2004). Um den Einfluss von ExoS, ExoT und *H. pylori* auf die Aktivität der GTPasen zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine während der *H. pylori*-Infektion und in Gegenwart von ExoS und ExoT überprüft. Zu diesem Zweck wurden AGS-Zellen mit *H. pylori* und *P. aeruginosa* (PAK), der entweder ExoS (G⁺A⁺) oder ExoT (G⁺A⁺) exprimiert, ko-infiziert und 6 h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und in Membran- und Zytoplasma-Fractionen fraktioniert. Die Auftrennung der erhaltenden Fractionen erfolgte mittels SDS-PAGE und die anschließende Lokalisierung von RhoA, Rac1, Cdc42 und H-Ras mittels spezifischer Antikörper im Westernblot. Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche Effekte von ExoS, im Vergleich zu ExoT, auf die Lokalisierung der einzelnen GTPasen (Abb. 4.33). ExoS induziert eine Erhöhung der molekularen Masse von Rac1 und H-Ras um etwa 5 kDa (Abb. 4.33 A,B). Diese Veränderung der molekularen Masse ist auf die ADPRT-Aktivität von ExoS zurückzuführen (Ganesan *et*

al., 1998; Rucks *et al.*, 2003; Barbieri und Sun, 2004; Rocha *et al.*, 2005). Weiterhin konnte deutlich mehr membranständiges als zytoplasmatisches Rac1 in Gegenwart von ExoS(G⁺A⁺) detektiert werden. H-Ras ist in Gegenwart von ExoS sowohl im Zytoplasma als auch in der Membran lokalisiert, wohingegen RhoA vorwiegend im Zytoplasma detektiert wurde (Abb. 4.33 B,C). ExoT führt, aufgrund seiner ADPRT-Substratspezifität für Crk-Proteine und der Phosphoglyzerat-Kinase, nicht zu der bei ExoS beobachteten Erhöhung der molekularen Masse von Rac1 und H-Ras um 5 kDa (Abb. 4.33 A,B). Es konnte jedoch mehr zytoplasmatisches Rac1 in Gegenwart von ExoT, im Vergleich zu ExoS, detektiert werden (Abb. 4.33 A). Weder ExoS noch ExoT oder *H. pylori* haben einen Einfluss auf die Größe und die Verteilung von Cdc42. (Abb. 4.33 D).

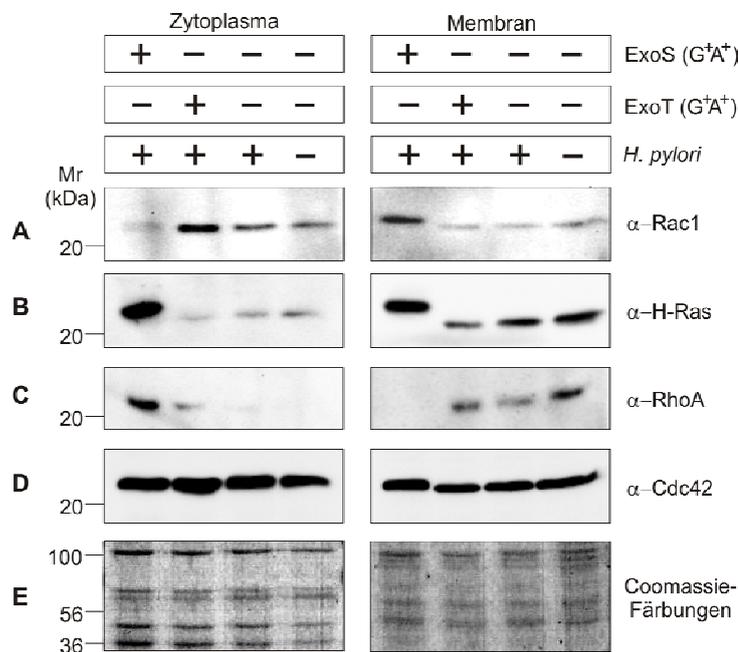


Abb. 4.33: **Einfluss von ExoS und ExoT auf die Lokalisation von Rac1, H-Ras, RhoA und Cdc42 während der *H. pylori*-Infektion.** AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* allein oder in Gegenwart der jeweiligen *P. aeruginosa*-Stämme infiziert und 6 h nach Infektion die Proteine in Membran- und Zytoplasmaproteine fraktioniert. Die Expression, Verteilung und Modifikation von Rac1, H-Ras, RhoA und Cdc42 wurde mittels Westernblot unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass ExoS und ExoT einen Einfluss auf die Lokalisation von (A) Rac1, (B) H-Ras und (C) RhoA, aber nicht auf (D) Cdc42, im Ko-Infektionsansatz haben. (E) Die Coomassie-Färbung zeigt, dass jeweils ähnliche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

Die Modulierung von Rac1, H-Ras oder RhoA durch ExoS oder ExoT kann die Ursache für die Blockierung der *H. pylori*-induzierten zytoskelettalen Veränderungen sein und macht damit die GTPasen zu wichtigen Kandidaten für den *H. pylori*-induzierten Phänotyp. Die Beteiligung der kleinen Rho-GTPasen am *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp wurde durch Transfektion von DN Rac1 (Rac1-T17N), Cdc42

(Cdc42-T17N), RhoA (RhoA-T19N) oder H-Ras (H-Ras-S17N) in AGS-Zellen, anschließender Infektion und Analyse des Phänotyps untersucht. Die Expression von Rac1-T17N oder H-Ras-S17 in AGS-Zellen führt zu einer deutlichen Blockierung der *H. pylori*-induzierten zytoskelettalen Veränderungen (Abb.4.34). Diese Ergebnisse stimmen mit den zuvor beschriebenen Effekten von ExoS und ExoT auf Rac und Ras überein. Im Gegensatz dazu waren die Zellen, die mit Cdc42-T17N, RhoA-T19N, den entsprechenden WT-Konstrukten oder der Vektorkontrolle transfiziert wurden, weiterhin in der Lage den *H. pylori*-induzierten Phänotyp auszubilden.

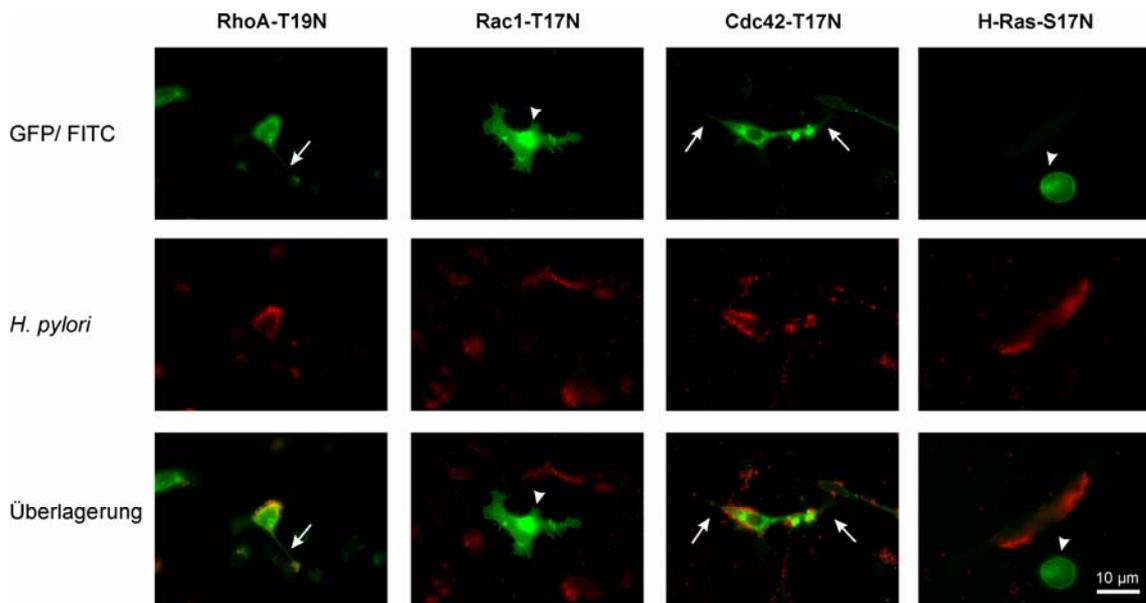


Abb. 4.34: **DN Rac1 und H-Ras blockieren den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp.** AGS-Zellen wurden transient mit DN-Konstrukten von RhoA, Rac1, Cdc42 oder H-Ras transfiziert und 36 h nach Transfektion mit *H. pylori* (rot) infiziert. Die Expression von Rac1-T17N oder H-Ras-S17N, aber nicht RhoA-T19N oder Cdc42-T17N, inhibiert den *H. pylori*-induzierten Phänotyp. Die Pfeilspitzen zeigen Zellen, an denen *H. pylori* gebunden ist, der Phänotyp aber inhibiert ist. Die Pfeile zeigen transfizierte Zellen, die den *H. pylori*-induzierten Phänotyp immer noch ausbilden.

Die Verwendung spezifischer siRNA ermöglicht eine sehr effiziente Genabschaltung. Si-RNA zum *knockdown* der kleinen GTPasen Rac1, RhoA, Cdc42 oder H-Ras wurde in die AGS-Zellen transfiziert und 48 h nach der Transfektion mit *H. pylori* infiziert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von DN Rac1 und H-Ras war die Ausbildung des Elongationsphänotyps in AGS-Zellen, in denen die Expression von Rac1 oder H-Ras durch spezifische siRNA vermindert wurde, blockiert (Abb. 4.35). Eine Inhibierung der Expression von RhoA oder Cdc42 mittels siRNA hatte jedoch keinen blockierenden Einfluss auf die Ausbildung des Phänotyps (Abb. 4.35). Die Inhibierung der Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Analyse überprüft (Abb. 4.35).

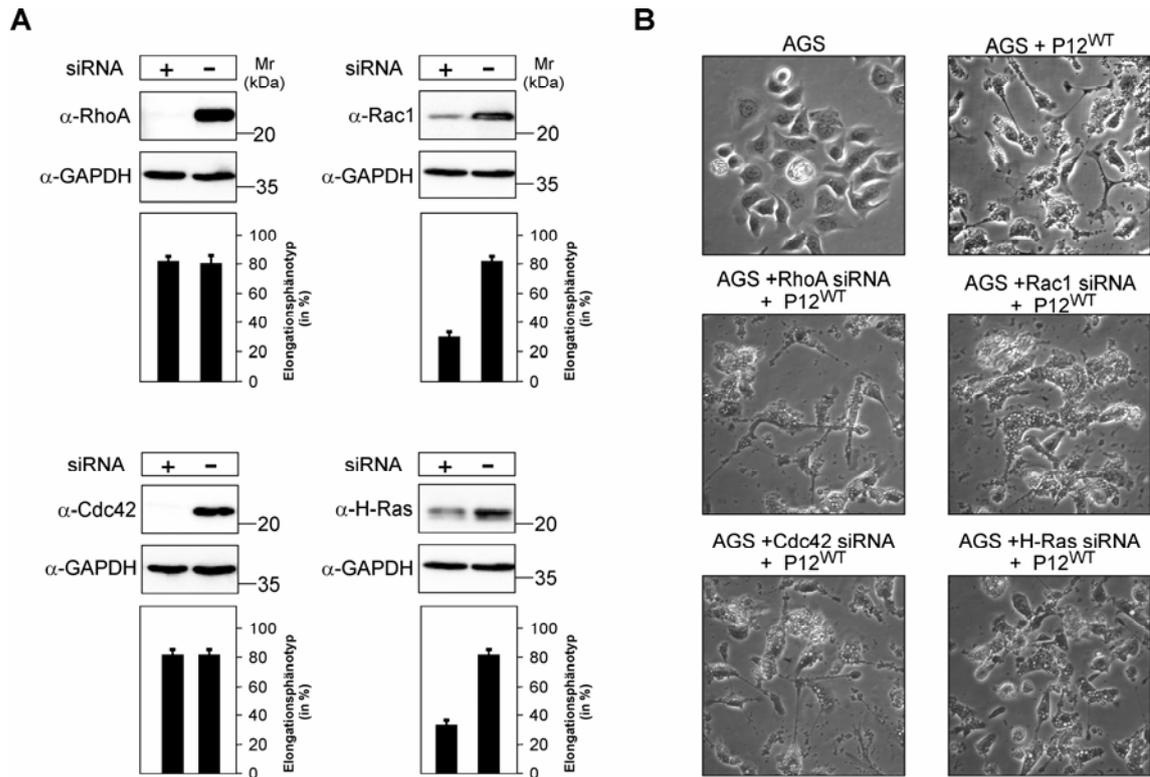


Abb. 4.35: **Rac1 und H-Ras sind für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps notwendig.** AGS-Zellen wurden mit RhoA, Rac1, Cdc42 oder H-Ras siRNA transfiziert und nach 48 h mit *H. pylori* infiziert. (A) Die Anzahl der elongierten Zellen wurde quantifiziert und die Verminderung der Expression der jeweiligen GTPasen mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung des α -RhoA-, α -Rac1-, α -Cdc42- oder α -H-Ras-Antikörpers kontrolliert. Westernblot-Analysen mit dem α -GAPDH-Antikörper zeigen, dass die Unterschiede in der Expression der jeweiligen Proteine nicht auf weniger Gesamtprotein zurückzuführen sind. (B) Mikroskopische Analysen zeigen, dass der *H. pylori*-induzierte Phänotyp in Gegenwart von Rac1 siRNA und H-Ras siRNA inhibiert ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von Rac1 und H-Ras, aber nicht von Cdc42 oder RhoA, eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Elongationsphänotyps durch *H. pylori* spielen.

5 DISKUSSION

Helicobacter pylori besiedelt die Magenschleimhaut des Menschen und kann dort zu einer chronischen Gastritis, aber auch zu Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren oder zu malignen Tumoren führen (Wotherspoon *et al.*, 1993; Parsonnet *et al.*, 1994; Covacci *et al.*, 1999; Montecucco und Rappuoli, 2001; Peek und Blaser, 2002; Monack *et al.*, 2004). Die Pathogenese der *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen ist von einem funktionellen T4SS und dem einzig bisher bekannten T4SS-Effektorprotein CagA abhängig (Crabtree *et al.*, 1991; Blaser *et al.*, 1995; Kuipers *et al.*, 1995; Parsonnet *et al.*, 1997; Shimoyama *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 1999; Rugge *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 2002). Die Infektion von gastrischen Epithelzellen mit *cagPAI*⁺-*H. pylori*-Stämmen *in vitro* führt zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen sowie zu einer starken Immunantwort. Über die molekularen Mechanismen der CagA-induzierten Signalwege war zu Beginn der vorliegenden Arbeit wenig bekannt (Abb. 1.5).

Ziel meiner Arbeiten war die Aufklärung neuer Interaktionspartner von CagA und deren Signalkaskaden während der Infektion von gastrischen Epithelzellen *in vitro*. Die Verwendung der gastrischen Epithelzelllinie AGS als Infektionsmodell und die Anwendung von molekularbiologischen, biochemischen und zellbiologischen Methoden, führten zu wichtigen neuen Erkenntnissen der CagA-induzierten Signalwege. Im Verlauf dieser Arbeit konnte (i) die CagA-abhängige Aktivierung von NF- κ B über den Ras>Raf>Mek>Erk>NF- κ B Signalweg, (ii) die c-Abl-abhängige Phosphorylierung von CagA sowie (iii) das Adapterprotein CrkII und die kleinen Rho-GTPasen Rac und H-Ras als wichtige Komponenten des CagA-induzierten Phänotyps identifiziert werden.

5.1 CagA-ABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON NF- κ B

In humanen Darmepithelzellen spielt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Folge einer mikrobiellen Infektion eine zentrale Rolle bei der Regulierung von immunmodulierenden Genen (Medzhitov, 2001; Girardin *et al.*, 2002; Akira, 2003; Beutler, 2004; Kim *et al.*, 2004; Viala *et al.*, 2004). Die Infektion mit *H. pylori* führt zu einer persistierenden Kolonisierung des menschlichen Magens, die eine chronische Gastritis zur Folge haben kann. Die Entstehung der chronischen Gastritis ist durch die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-8, gekennzeichnet, das eine Infiltration der Magenmukosa mit Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten und Monozyten induziert (Dixon, 1994). Die *H. pylori*-

induzierte IL-8-abhängige Infiltration der Magenmukosa mit Entzündungszellen wird durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B induziert (Naumann *et al.*, 1999; Censini *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2001). Die *H. pylori*-assoziierte NF- κ B-Aktivierung ist transient, direkt und sehr spezifisch (Naumann, 2000). Der genaue Mechanismus der *H. pylori*-induzierten NF- κ B-Aktivierung war zu Beginn der Arbeit allerdings noch nicht aufgeklärt. Es war lediglich bekannt, dass die Induktion der IL-8-Sekretion *in vitro* und *in vivo* von einigen Genen der *cagPAI* abhängig ist (Crabtree *et al.*, 1995; Peek *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001; Peek und Blaser, 2002). Der auslösende Faktor, der entweder in die eukaryontische Zelle injiziert wird oder einen eukaryontischen Rezeptor kontaktabhängig aktiviert, war aber noch unklar (Naumann *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2001). Ein allgemein akzeptiertes Dogma war, dass CagA nicht an der IL-8-Sekretion beteiligt ist, obwohl detaillierte Studien fehlten (Crabtree *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001). Weiterhin wurde die Expression von OipA als ein möglicher Faktor für die Induktion der IL-8-Sekretion diskutiert (Yamaoka *et al.*, 2000).

Die Aktivierung von NF- κ B in Folge einer bakteriellen Infektion erfolgt im Allgemeinen durch die Aktivierung der Toll-ähnlichen-Rezeptoren (*toll like receptors*, TLRs) (Imler und Hofmann, 2000; MacDonald und Pettersson, 2000; Takeuchi und Akira, 2001; Zhang und Ghosh, 2001). Die Rolle der TLRs und NOD-Proteine bei der Erkennung der bakteriellen Komponenten wie LPS, Peptidoglykan, unmethylierter CpG-Motive, Flagellin oder Lipoteichonsäure in der *H. pylori*-induzierten NF- κ B-Aktivierung wurde bereits untersucht (Medzhitov, 2001; Girardin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Akira, 2003; Beutler, 2004; Viala *et al.*, 2004). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von TLR-2,-4 oder -5, welche typische Erkennungsstrukturen bakterieller Komponenten darstellen, nicht an der *H. pylori*-induzierten NF- κ B-Aktivierung beteiligt sind (Gewirtz *et al.*, 2004; Monack *et al.*, 2004; Viala *et al.*, 2004). Allerdings konnten Viala und Mitarbeiter in einer neueren Arbeit zeigen, dass die NF- κ B-Aktivierung in TLR-2 und -4 defizienten Zellen auf transloziertes Peptidoglykan zurückzuführen sein könnte. Das Gen *slt* wurde als eine lytische Transglykosylase beschrieben und eine entsprechende isogene Mutante war unfähig, IL-8 in infizierten Zellen zu erzeugen (Viala *et al.*, 2004). Sezerniertes Peptidoglykan aktiviert bekanntermaßen Nod1 und führt zur schrittweisen Aktivierung von NF- κ B (Viala *et al.*, 2004). Experimente mit dieser Δ *slt*-Mutante in unserem Labor zeigen jedoch, dass diese keine T4SS-Pili ausbildet. Das spricht dafür, dass die *slt*-Mutante möglicherweise einen T4SS-Defekt aufweist (persönliche Mitteilung, PD Dr. Steffen Backert).

In den letzten Jahren sind zahlreiche Untersuchungen über den molekularen Mechanismus der *H. pylori*-induzierten NF- κ B-Aktivierung durchgeführt worden, ohne den auslösenden Faktor zu kennen. Die Infektion von gastrischen Epithelzellen mit *cagPAI*⁺-*H. pylori*-Stämmen führt zu einer schnellen Aktivierung der MAP-Kinasen, p38, JNK und Erk1/2, des IKK-Komplexes sowie der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (Keates *et al.*, 1997, 1999; Naumann *et al.*, 1999; Foryst-Ludwig und Naumann, 2000; Meyer-ter-Vehn *et al.*, 2000; Pomorski *et al.*, 2001). Eine Verbindung zwischen Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und der IL-8-Sekretion in Folge einer *H. pylori*-Infektion wurde bereits beschrieben (Keates *et al.*, 2001). *Helicobacter pylori* induziert T4SS-abhängig die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors in AGS-Zellen und aktiviert Ras (Keates *et al.*, 2001). Aktiviertes Ras führt zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und zu einer verstärkten IL-8-Sekretion (Keates *et al.*, 2001). Foryst-Ludwig und Naumann konnten PAK1 (p21-aktivierte-Kinase) als ein mögliches Schlüsselprotein der *H. pylori*-induzierten NF- κ B-Aktivierung identifizieren (Foryst-Ludwig und Naumann, 2000). Diese Kinase aktiviert die NF- κ B-induzierende-Kinase (NIK), die die I κ B-Kinase (IKK) reguliert. Die IKK ist für die Phosphorylierung von I κ B essentiell und somit Voraussetzung für die *H. pylori*-induzierte NF- κ B-Aktivierung. Bislang ergaben diese verschiedenen Studien allerdings noch kein einheitliches Bild über die *H. pylori*-induzierte IL-8-Sekretion, was möglicherweise auf die Existenz mehrerer Signalwege schließen lässt. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl transfiziertes- als auch transloziertes-CagA von einer Vielzahl von *H. pylori*-Stämmen in der Lage ist, die IL-8-Sekretion über die NF- κ B-Aktivierung zu induzieren. Meine Ergebnisse zeigen, dass CagA ein weiterer wichtiger Faktor für die *cagPAI*-abhängige Induktion pro-inflammatorischer Gene ist.

Meine Infektionsexperimente von AGS-Zellen mit verschiedenen *cagPAI*⁺-Stämmen und anschließende Analyse der IL-8-Sekretion führte zur Identifizierung von hoch- und niedrig-IL-8-induzierenden-Stämmen (Abb. 4.2). Diese Unterschiede sind nicht auf eine verminderte CagA-Phosphorylierung oder -Translokation zurückzuführen. Die CagA-Abhängigkeit der Induktion der IL-8-Sekretion konnte zum einen durch die Verwendung von isogenen Δ *cagA*-Mutanten gezeigt werden und zum anderen war es möglich durch genetischen Austausch der *cagA*-Gene, hochinduzierende- in niedriginduzierende-Stämme und *vice versa* umzuwandeln (Abb. 4.3). Dabei ist bei den hochinduzierenden-Stämmen die IL-8-Sekretion zu 64 % von CagA-abhängig. Die dargestellten Ergebnisse stehen zunächst im Widerspruch zu den bereits publizierten Daten, die CagA als einen wichtigen Faktor für die Pathogenese beschreiben aber keine Rolle bei der Induktion der Immunantwort sehen (Crabtree *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996; Covacci *et al.*, 1999; Yamaoka *et al.*, 2000; Censini *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2001; Montecucco und Rappuoli, 2001; Peek und Blaser, 2002; Monack *et al.*, 2004). Bei genauer Betrachtung geben die Ergebnisse jedoch

Erklärungen, warum die CagA-Abhängigkeit der NF- κ B-Aktivierung und IL-8-Sekretion bisher unbemerkt blieb. Erstens ist die *H. pylori*-induzierte IL-8-Sekretion stammabhängig (Abb. 4.2; 4.3). Sharma und Mitarbeiter hatten bereits Unterschiede in der IL-8-Sekretion bei der Stimulation mit WT-Stämmen beschrieben und auch die Δ cagA-Stämme konnten zu einem bestimmten Anteil IL-8 sekretieren (Sharma *et al.*, 1995). Die dargestellten Ergebnisse von Crabtree und Mitarbeiter zeigten, dass CagA nicht an der Induktion der IL-8-Sekretion beteiligt ist (Crabtree *et al.*, 1995). Dafür hat diese Gruppe zwei verschiedene WT-Stämme und eine isogene Δ cagA-Mutante in ihrer Fähigkeit IL-8 zu sekretieren untersucht. Beim Betrachten der Ergebnisse fällt auf, dass es aber Unterschiede in der sekretierten IL-8-Menge zwischen den beiden WT-Stämmen gab. Diese Unterschiede entsprechen in etwa denen der in meiner Arbeit identifizierten hoch- und niedriginduzierenden Stämmen. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete CagA-Unabhängigkeit kann demzufolge sein, dass es sich bei dem WT-Stamm um einen Gruppe-B-Stamm handelt und somit die Δ cagA-Mutante ähnliche IL-8-Mengen wie der WT-Stamm induziert (Abb. 4.3). Neben der Stammabhängigkeit konnte ich auch eine Zeitabhängigkeit der *H. pylori*-induzierten IL-8-Sekretion aufzeigen. Die Zeitabhängigkeit bzw. der potenzierende Effekt von CagA auf die IL-8-Sekretion konnte zwischen 24 h und 36 h nach Infektion sehr deutlich gezeigt werden. Aber auch 9 h nach Infektion war dieser Unterschied bereits signifikant. Aus diesem Grund wurden die Überstände für die IL-8 Bestimmung 9 h nach Infektion abgenommen. Die bisher von anderen Gruppen publizierten Daten zur Induktion der IL-8-Sekretion durch *H. pylori* wurden nach einer Inkubationszeit < 9 h erhoben und auch nicht im zeitlichen Verlauf betrachtet (Crabtree *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1998; Censini *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2001; Viala *et al.*, 2004).

Der Einfluss von OipA, einem Protein der äußeren Membran, auf die proinflammatorischen Reaktionen wurde bisher nur in einigen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Yamaoka und Graham berichtet (Yamaoka *et al.*, 2000, 2002) und wird seither kontrovers diskutiert (Akanuma *et al.*, 2002; Ando *et al.*, 2002; Odenbreit *et al.*, 2002; Dossumbekova *et al.*, 2006a,b). Das *oipA*-Gen ist in allen *H. pylori*-Stämmen vorhanden, die Expression wird aber über eine variable Anzahl an CT-Dinukleotidwiederholungen moduliert (Yamaoka *et al.*, 2000). In einigen Studien wurde die OipA-Abhängigkeit der IL-8-Sekretion über die Aktivierung des STAT1>IRF1 Signalweges beschrieben (Yamaoka *et al.*, 2000; Yamaoka *et al.*, 2004). In meiner Arbeit und in verschiedenen anderen Untersuchungen konnte jedoch kein Einfluss von OipA auf die IL-8-Sekretion *in vitro* detektiert werden (Abb. 4.2; Akanuma *et al.*, 2002; Ando *et al.*, 2002; Odenbreit *et al.*, 2002; deJonge *et al.*, 2004; Dossumbekova *et al.*, 2006a,b). Eine mögliche Erklärung für diese Widersprüche zwischen den Untersuchungen könnte die Verwendung unterschiedlicher *H. pylori*-Stämme sein.

In meiner Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die transiente Expression von CagA^{WT} in AGS-Zellen die NF-κB-Aktivierung und -Kernlokalisierung sowie die IL-8-Freisetzung induziert (Abb. 4.6). Neben der transienten Expression von CagA^{WT} war auch die phosphorylierungsdefiziente CagA^{Y>F}-Mutante in der Lage die IL-8-Sekretion zu induzieren, die phosphorylierungsdefiziente CagA^{Y>A}-Mutante hatte keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion (Abb. 4.6). Diese Ergebnisse lassen zwei mögliche Schlussfolgerungen zu. Zum einen sind die EPIYA-Motive für die CagA-induzierten Signalwege wichtig und zum anderen ist die Tyrosinphosphorylierung nicht essentiell oder hat nur einen indirekten Einfluss auf die IL-8-Induktion. Die Unterschiede zwischen der CagA^{Y>F}- und CagA^{Y>A}-Mutante in der Fähigkeit IL-8 zu induzieren könnten auf die tertiäre Struktur von CagA in diesem Bereich zurückzuführen sein. Der Austausch von Y gegen F hat kaum einen Einfluss auf die tertiäre Struktur im Vergleich zum Y gegen A Austausch (Bordo und Agros, 1991). Somit konnte in meiner Arbeit die CagA-induzierte IL-8-Sekretion als ein phosphorylierungsunabhängiges Ereignis identifiziert werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass das T4SS-Effektorprotein CagA nicht nur an den Aktin-zytoskelettalen Veränderungen beteiligt ist, sondern auch die IL-8-Sekretion potenziert. CagA ist demzufolge direkt an der *H. pylori*-induzierten Entzündungsreaktion beteiligt. Bestätigend zu meiner Arbeit (Brandt *et al.*, 2005) sind weitere Arbeiten später erschienen, die zum einen die CagA-Abhängigkeit der IL-8-Sekretion (Kim *et al.*, 2006) und zum anderen die Unterschiede in den sekretierten IL-8-Mengen durch *cagPAI*⁺-*H. pylori*-Stämme *in vitro* bestätigen (Reyes-Leon *et al.*, 2007).

Für die Analyse des Signalweges der CagA-induzierten IL-8-Sekretion wurden CagA-Konstrukte, verschiedene pharmakologische Inhibitoren, DN-Konstrukte, siRNA sowie Shp-2 defiziente Zellen verwendet. Nachdem ich zeigen konnte, dass die transiente Expression von CagA zur IL-8-Sekretion führt, sollte der molekulare Mechanismus näher untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden mit transfiziertem CagA durchgeführt, um andere *cagPAI*-abhängige Effekte auf die IL-8-Sekretion, auszuschließen. Die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und Erk1/2 und der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 in Folge einer *H. pylori*-Infektion konnte in früheren Arbeiten bereits beschrieben werden (Keates *et al.*, 1997, 1999; 2001; Sharma *et al.*, 1998; Naumann *et al.*, 1999; Pomorski *et al.*, 2001). Die Transfektion von CagA^{WT} in Gegenwart des pharmakologischen NF-κB-Inhibitors MG132 bzw. des Erk1/2-Inhibitors PD98059 führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-8-Sekretion (Abb. 4.6). Diese Ergebnisse ließen die erste Schlussfolgerung zu, dass CagA die IL-8-Sekretion über den Erk>NF-κB Signalweg induziert. Der Signalweg oberhalb von Erk wurde durch die Verwendung verschiedener DN-Konstrukte analysiert.

Von Churin und Mitarbeitern wurde die CagA-abhängige Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors c-Met, der an der Regulation der Zellmotilität und –Proliferation beteiligt ist, beschrieben (Churin *et al.*, 2003). Von den vier bekannten Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, die nach Aktivierung des c-Met Rezeptors phosphoryliert werden, befinden sich zwei (Y1234, Y1235) in der Aktivierungsdomäne und führen zur Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität (Naldini *et al.*, 1991; Rodrigues und Park, 1994). Die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen Y1349 und Y1356 befinden sich im C-Terminus und aktivieren die Multisubstratbindungsstelle (Ponzetto *et al.*, 1994). Die umgebenden Sequenzen bilden Bindungsstellen für SH2-Domänen, PTP-Domänen und Met-Bindungsdomänen (Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Weidner *et al.*, 1995). Es konnten bereits einige Adapterproteine wie Grb2, SHC, Gab1 und Crk/CrkL aber auch andere signalübertragende Proteine wie die PI3-Kinase, der Transkriptionsaktivator-3 (Stat3), die Phospholipase-C- γ (PLC- γ), Sos (ein GEF), die Src-Kinase oder die Phosphatase Shp-2 als Bestandteile des c-Met-Komplexes identifiziert werden (Graziani *et al.*, 1991, 1993; Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Fixman *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996; Boccaccio *et al.*, 1998; Garcia-Guzman *et al.*, 1999; Sakkab *et al.*, 2000). Die Aktivierung von c-Met in Folge der *H. pylori*-Infektion führt zur Phosphorylierung des Rezeptors an bisher nicht bekannten Phosphorylierungsstellen und CagA kann in der IP unabhängig von der CagA-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Churin *et al.*, 2003). Die transiente Transfektion von DN c-Met (Y1349/1359F) in Gegenwart von CagA^{WT} in meinen Experimenten hatte keinen Effekt auf die CagA-induzierte IL-8-Sekretion (Abb. 4.8). Folglich spielt c-Met keine Rolle bei der CagA-abhängigen Aktivierung von NF- κ B.

Die Interaktion der Tyrosinphosphatase Shp-2 mit phosphoryliertem CagA wurde ebenfalls beschrieben (Higashi *et al.*, 2002a,b; 2004). Die Tyrosinphosphatase Shp-2 besteht aus zwei SH2-Domänen und einer Phosphatase-Domäne (Neel *et al.*, 2003). Es wurde beschrieben, dass die CagA/Shp-2 Interaktion auch zur Aktivierung der MAP-Kinase Erk1/2 führen soll (Higashi *et al.*, 2004). Somit lag die Vermutung nahe, dass Shp-2 sich oberhalb von Erk in der identifizierten CagA>Erk1/2>NF- κ B Signalkaskade befinden könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde zum einen DN Shp-2 in Gegenwart von CagA^{WT} in AGS-Zellen transient exprimiert und zum anderen CagA^{WT} in Shp-2^{-/-}-Zellen transient exprimiert und das sekretierte IL-8 bestimmt. Sowohl die transiente Expression von CagA^{WT} in Shp-2^{-/-}-Fibroblasten als auch die Expression von DN Shp-2 in Gegenwart von CagA^{WT} in AGS-Zellen führte nicht zu einer Reduktion der IL-8-Sekretion (Abb. 4.8). Aus diesen Experimenten lässt sich schlussfolgern, dass Shp-2 für die CagA-abhängige Induktion von IL-8 ebenfalls nicht essentiell ist.

Nachdem die Beteiligung der MAP-Kinasen p38 und JNK an der CagA-induzierten IL-8-Sekretion bereits ausgeschlossen werden konnte, wurde der Signalweg zur Aktivierung von Erk1/2 im Detail untersucht (Abb. 4.6). Die Aktivierung der MAP-Kinase Erk1/2 ist eine Folge der Ras>Raf>Mek1-Signalkaskade (Kolch, 2005). Die CagA-induzierte IL-8-Sekretion konnte durch transiente Expression von Ras, Raf und Mek1 DN Konstrukten inhibiert werden (Abb. 4.8). Somit sind die Befunde in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass die CagA-induzierte IL-8-Sekretion auf eine Aktivierung des Ras>Raf>Mek>Erk>NF- κ B Signalweges zurückzuführen ist. Diese Aussage stimmt mit früheren Arbeiten überein, die eine Beteiligung der MAP-Kinasen an der *H. pylori*-induzierten IL-8-Sekretion beschreiben (Aihara *et al.*, 1997; Covacci und Rappuoli, 2000; Keates *et al.*, 2001; Nozawa *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass die transiente Transfektion der CagA^{Y>F}-Mutante die IL-8-Sekretion stimuliert, kann auch mit der Aktivierung des Ras>Raf>Mek>Erk Signalweges erklärt werden. Dieser kann auch durch nicht phosphoryliertes-CagA aktiviert werden (Mimuro *et al.*, 2002). Aktuelle Untersuchungen zeigen auch eine Erk1/2-abhängige Phosphorylierung von I κ B α , dem endogenen Inhibitor von NF- κ B (Cho *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung von I κ B α führt zur Ubiquitinierung und zum schrittweisen Abbau durch das Proteasom. Der freie RelA-p50 Komplex wandert in den Kern und reguliert die Genexpression. Durch die Verwendung des Erk1/2-Inhibitors U0126, des p38-Inhibitors SB203580 und des JNK-Inhibitors SP600125 konnte eindeutig die Beteiligung der Erk1/2-Kinase an der I κ B α -Phosphorylierung dargestellt werden (Cho *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse stimmen mit unserem aufgestellten Modell, dass NF- κ B über den Ras>Raf>Mek>Erk Signalweg aktiviert wird, überein.

Die dargestellten Ergebnisse lassen über den molekularen Mechanismus der CagA-induzierten Ras-Aktivierung allerdings nur Vermutungen zu. Die Aktivierung von Ras kann unter anderem durch Sos erfolgen (Malumbres und Barbacid, 2003). Sos wiederum kann mit einer Vielzahl an Adapterproteinen, wie Grb2, CrkII oder Nck, interagieren (Okada und Pessin, 1996). Es ist bekannt dass CagA phosphorylierungs-unabhängig das Adapterprotein Grb2 bindet (Mimuro *et al.*, 2002). Somit könnte die Bindung des Adapterproteins Grb2 an CagA und die Rekrutierung von Sos zur Aktivierung von Ras führen, das dann NF- κ B über den Raf>Mek1>Erk1/2 Signalweg aktiviert.

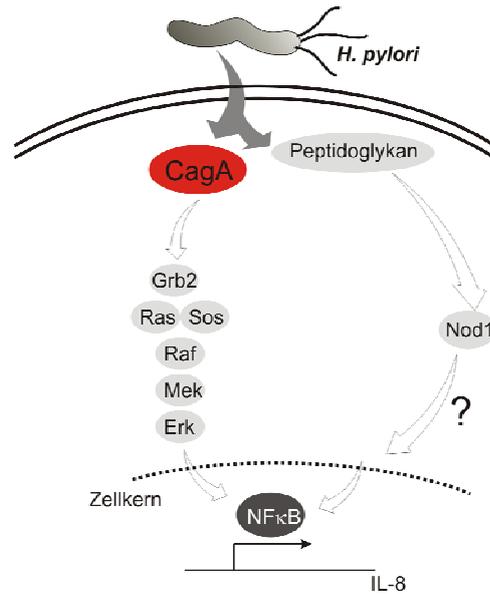


Abb. 5.1: **Schematische Darstellung von Signalwegen der *H. pylori*-induzierten NF-κB-Aktivierung.** *H. pylori* injiziert CagA und Peptidoglykan über das T4SS in die Zelle. CagA bindet an den Grb2/Sos Komplex und H-Ras wird aktiviert. Nachfolgend kommt es über den Raf > Mek > Erk Signalweg zur Aktivierung von NF-κB mit anschließender IL-8-Sekretion. Der genaue Mechanismus der von Viala und Mitarbeitern publizierte Peptidoglykan>Nod1 abhängigen NF-κB-Aktivierung ist noch unklar.

Die zentrale Rolle von NF-κB in der Regulierung der Immunantwort macht es zum Zielmolekül zahlreicher pathogener Mikroorganismen. Dabei haben sich neben Mechanismen, die NF-κB aktivieren auch NF-κB-inhibierende entwickelt. Einige pathogene Bakterien, die die NF-κB-Aktivierung inhibieren konnten bereits identifiziert werden. *Yersinia* spp. sekretiert über das T3SS-Virulenzfaktoren, bekannt als Yop's, in die Zelle die die NF-κB-aktivierenden Signalkaskaden inhibieren (Cornelis *et al.*, 1997). Der Virulenzfaktor YopJ inhibiert neben der NF-κB-Aktivierung auch die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskaden Erk1/2, JNK und p38 (Monack *et al.*, 1997; Boland und Cornelis, 1998; Palmer *et al.*, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 1998; Schesser *et al.*, 1998). Andere Pathogene, wie *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* oder *Helicobacter pylori*, haben Mechanismen entwickelt die zu einer NF-κB-Aktivierung führen (Keates *et al.*, 1997; Kayal *et al.*, 1999; Pahl, 1999; Philpott *et al.*, 2000; Rosenberger *et al.*, 2000; Muenzner *et al.*, 2001). Die jeweiligen induzierten Signalwege unterscheiden sich jedoch voneinander und sind für jedes Pathogen spezifisch.

Die hier dargestellten Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass CagA nicht nur an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist, wie ursprünglich von anderen Arbeitsgruppen publiziert wurde (Censini *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002; Mimuro *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Amieva *et al.*, 2003; Selbach *et al.*, 2003; Backert *et al.*, 2001, 2004; Higashi *et al.*, 2004). Das aufgestellte Modell

beschreibt CagA als ein multifunktionales Protein. Nachdem CagA über ein T4SS in die Wirtszelle eingeschleust wurde, kommt es zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen aber auch zur Aktivierung von NF- κ B und zur IL-8-Sekretion. Weiterführende Arbeiten sind allerdings notwendig, um zum einen die CagA-abhängige Ras-Aktivierung und zum anderen die Unterschiede in der IL-8-Sekretion zwischen den einzelnen *cagPAI*⁺-Stämme aufzuklären.

5.2 CagA-ABHÄNGIGE MODULATION DES AKTIN-ZYTOSKELETTS

Pathogene Mikroorganismen nutzen normale Wirtszellprozesse, schaffen sich so eine spezielle Nische und sichern das eigene Überleben und ihre Ausbreitung. Dabei ist das Aktin-Zytoskelett, welches zur (i) Anheftung und Invasion in die Zielzellen, (ii) Bewegung innerhalb und zwischen den Zellen, (iii) Vakuolenbildung sowie (iv) Blockierung der Phagozytose genutzt werden kann, Ziel zahlreicher Pathogene wie *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Listeria*, *EPEC*, *Bordetella*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* (Dramsi und Cossart, 1998; Kahn *et al.*, 2002; Barbieri *et al.*, 2002; Gruenheid und Finlay, 2003; Cossart und Sansonetti, 2004). Die durch diese Pathogene hervorgerufenen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts sind vornehmlich auf die spezifischen Funktionen von T3SS- und T4SS-Effektorproteinen zurückzuführen.

Infektionen mit *cagPAI*⁺-*H. pylori*-Stämmen führen zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen. Die Ausbildung des Elongationsphänotyps ist von CagA abhängig, welches über das T4SS in die Zelle injiziert und dort durch die Src-Kinase phosphoryliert wird (Backert *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass die Src-Kinase im Laufe der Infektion schnell inaktiviert wird (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003), CagA aber kontinuierlich phosphoryliert wird, lag die Vermutung nahe, dass es mindestens eine weitere CagA-phosphorylierende Kinase geben muss. Die hier dargestellten Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass die Phosphorylierung von CagA, und die damit verbundenen Aktin-zytoskelettalen Veränderungen auch von der Abl/Arg-Tyrosinkinase-Familie abhängig sind. Mit Hilfe von Inhibitoruntersuchungen, *in vitro* Kinasereaktionen und siRNA konnte die Familie der Abl-Kinasen als CagA phosphorylierende Kinase identifiziert werden. Weiterhin wurde die Rolle des CrkII-Adapterproteins, welches ein Substrat der Abl-Kinase darstellt, für die Ausbildung des Elongationsphänotyps untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CrkII im Laufe der Infektion durch *H. pylori*-aktiviertes c-Abl (c-Abl^{PY412}) phosphoryliert (CrkII^{PY221}) wird und mit phosphoryliertem CagA und c-Abl^{PY412} einen Komplex bildet. Des Weiteren wurde der Einfluss der Rho-GTPasen, die wichtige Schaltstellen zwischen extrazellulären Reizen und dem Aktin-Zytoskelett

darstellen, auf den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp mit Hilfe verschiedener methodischer Ansätze untersucht. Zusammenfassend mündeten meine Daten in einem neuen Modell der *H. pylori*-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen (Abb. 5.2).

5.2.1 DIE ROLLE VON C-ABL AN DER CagA-PHOSPHORYLIERUNG

Die Regulierung des Aktin-Zytoskeletts durch die Tyrosinkinase-Familien Abl/Arg und Src wurde bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben (Hunter, 1987; Feller *et al.*, 1994; Hubbard, 1999; Klinghoffer *et al.*, 1999; Plattner *et al.*, 1999; Sionov *et al.*, 2001; Abassie und Vuori, 2002; Pluk *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 2005). Das hochkonservierte Onkoprotein c-Abl wurde ursprünglich als ein homologes Protein des *Abelson murine leukemia virus*, welches an der Tumorentstehung beteiligt ist, identifiziert (Feller *et al.*, 1994; Sionov *et al.*, 2001). Weitere Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass c-Abl an der Regulierung vieler zellulärer Prozesse, wie der Differenzierung, der Zellteilung, der Zelladhäsion, dem Zelltod und der Stressbewältigung, involviert ist (Sionov *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 2005). Die c-Abl-Kinase besteht sowohl aus einer SH2- als auch einer SH3-Domäne sowie vier prolinreichen Regionen, den so genannten PxxP-Motiven, und einer F- und G-Aktin bindenden Domäne (Woodring *et al.*, 2003; Hantschel und Superti-Furga, 2004; Hernandez *et al.*, 2004). Die Regulierung der Kinaseaktivität erfolgt über einen der Src-Kinase ähnlichen Mechanismus. Im inaktiven Zustand bilden die SH2- und SH3-Domänen der Abl-Kinase eine inhibitorische Schleife um die Kinasedomäne. Nach Aktivierung wird die Kinasedomäne frei zugänglich und an der Position Y412 durch die Src-Kinase tyrosinphosphoryliert (Dorey *et al.*, 2001; Plattner *et al.*, 2003; Tanis *et al.*, 2003). Die Regulierung der Abl-Aktivität kann über viele Mechanismen erfolgen und stellt somit eine Schnittstelle für viele Signalwege dar (Wang, 2000). Zum einen führen die PDGF-Rezeptoraktivierung und zum anderen die Aktivierung des Integrinrezeptors in Folge der Adhäsion zur Aktivierung von c-Abl (Lewis *et al.*, 1996; Dorey *et al.*, 2001; Plattner *et al.*, 2003; Tanis *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung von c-Abl kann aber auch *in trans* durch einen autokatalytischen Mechanismus erfolgen (Dorey *et al.*, 2001). Die Domänenstruktur von c-Abl ermöglicht die Bindung zahlreicher Proteine. Es wurde bereits eine Vielzahl an Substraten bzw. Effektoren der Abl-Kinase identifiziert. Als Interaktionspartner für c-Abl wurden Adapterproteine, Kinasen und Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren sowie Proteine des Aktin-Zytoskeletts beschrieben (Feller *et al.*, 1994; Woodring *et al.*, 2003; Pendergast, 2002; Smith und Mayer, 2002; Hernandez *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit konnte die Abl-Kinase, neben der Src-Kinase, als eine weitere CagA-phosphorylierende Kinase beschrieben werden, die auch zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen führt. Die Familie der Src-Kinase wurde bisher als CagA-phosphorylierende Kinase *in vivo* und *in vitro* beschrieben (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). Doch mehrere Beobachtungen ließen die Existenz mindestens einer weiteren CagA-phosphorylierenden Kinase vermuten. Zum einen ist die CagA-Phosphorylierung in *src*^{-/-}, *yes*^{-/-}, *fyn*^{-/-}-*knockout*-Zellen nicht vollständig inhibiert (Selbach *et al.*, 2002) und zum anderen wird die Src-Kinase im Laufe der Infektion schnell inaktiviert, CagA aber kontinuierlich phosphoryliert (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003). Die Tyrosinphosphorylierungsstellen im CagA-Protein sind in den EPIYA-Motiven lokalisiert. Dieses Motiv hat Ähnlichkeiten mit dem Phosphorylierungsmotiv der Src-Kinasen, mit der Konsensussequenz EEIY(G/E) (Backert und Selbach, 2005). Die bereits beschriebenen Substrate der Abl-Kinase sind beispielsweise das EPGYAQP-Motiv von CrkII (Feller *et al.*, 1994) und das HSPYAQP-Motiv im p73-Protein (Yuan *et al.*, 1999). Beide weisen Ähnlichkeiten zum EPIYA-Motiv auf. Die Phosphorylierungsmotive der einzelnen Wirtszellkinasen sind sehr vielfältig und haben die Identifizierung der CagA-phosphorylierenden Kinasen bislang erschwert. Mit Hilfe von *in vitro* Phosphorylierungsreaktionen mit CagA^{WT} und CagA^{Y899/918/972F}, einer Mutante in der die Tyrosine in den EPIYA-Motiven gegen Phenylalanin ausgetauscht sind, konnten die Tyrosine in den EPIYA-Motiven auch als Abl-Substrate identifiziert werden. CagA^{WT} konnte auch durch Lysate der *src*^{-/-}, *yes*^{-/-}, *fyn*^{-/-}-*knockout* Zellen *in vitro* phosphoryliert werden (Abb. 4.13). Diese Phosphorylierung war in Gegenwart des Abl-Inhibitors SKI-DV2-43 aufgehoben, wohingegen der Src-Inhibitor PP2 keinen Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung hatte. Somit konnte Abl als eine weitere CagA-phosphorylierende Kinase identifiziert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Silja Wessler parallel publiziert und bestätigen meine Ergebnisse (Poppe *et al.*, 2007).

Die Aktivierung von c-Abl im Laufe der *H. pylori*-Infektion wurde unter anderem durch die Phosphorylierung von c-Abl an der Position Y412 und der Phosphorylierung des Adapterproteins CrkII an der Position Y221 sowie durch die Ausbildung des Elongationsphänotyps dargestellt. Die Aktivierung der Abl-Kinase ist essentiell für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps. Die pharmakologische Inhibierung der Src- bzw. Abl-Kinase durch PP2 bzw. SKI-DV2-43 oder GleevecTM, die Expression von c-Abl^{K290H}, einer ATP-Bindungsmutante, sowie die Verwendung von Abl/Arg siRNA führten in Gegenwart von *H. pylori* nicht zur Ausbildung des Elongationsphänotyps. Im Gegensatz dazu führt die Expression von konstitutiv-aktiven c-Abl (c-Abl^{P242/249P}) in Gegenwart von CagA^{WT} zu einer starken CagA-Phosphorylierung und zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen. Diese Aktin-zytoskelettalen Veränderungen traten nur auf, wenn CagA^{WT} zusammen mit konstitutiv-

aktiven c-Abl in den Zellen exprimiert wurde. Der genaue Mechanismus der *H. pylori*-induzierten Abl-Aktivierung konnte allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die *H. pylori*-induzierte Aktivierung der c-Abl-Kinase von einem intakten T4SS-abhängig ist. Infektionsexperimente mit der isogenen $\Delta cagA$ -Mutante führten nur zu einer 55 %igen Reduktion der Abl-Aktivität. Somit wird Abl durch einen weiteren bisher noch unbekanntem bakteriellen Faktor aktiviert, der in zukünftigen Arbeiten zu identifizieren ist.

Weiterhin konnte ich zeigen, dass Src und Abl zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der *H. pylori*-Infektion aktiviert werden. Die Src-Kinase ist in den ersten beiden Stunden der *H. pylori*-Infektion aktiv, wohingegen Abl kontinuierlich aktiviert wird (Abb. 4.15). Darüber hinaus ist ersichtlich, dass die Src-Aktivität zu einem frühen Zeitpunkt (in den ersten beiden Stunden) und die Abl-Aktivität zu einem späten Zeitpunkt der Infektion für die CagA-Phosphorylierung und die Ausbildung des Phänotyps essentiell ist (Abb. 4.17). Damit scheint die Src-Kinase zum einen für die initiale Phosphorylierung von CagA und zum anderen für die Abl-Aktivierung wichtig zu sein. Die Src-Kinase wird als eine c-Abl phosphorylierende Kinase beschrieben (Furstoss *et al.*, 2002). Die Verwendung des Src-Inhibitors PP2 und des Abl-Inhibitors STI-DV2-43 unterstützten die aufgestellte Hypothese, dass CagA erst durch Src und dann durch Abl phosphoryliert wird. Die CagA-Phosphorylierung war durch die Zugabe von PP2 2 h nach Infektion blockiert und durch die Zugabe von SKI-DV2-43 lediglich reduziert (Abb. 4.17 A), wohingegen PP2 360 min nach Infektion keinen Einfluss auf die CagA-Phosphorylierung mehr hatte (Abb. 4.17 B). Die Blockierung der Abl-Kinase 360 min nach Infektion hat eine Inhibierung der CagA-Phosphorylierung zur Folge (Abb. 4.17 B). Somit ist die kontinuierliche Abl-Aktivierung für die fortdauernde CagA-Phosphorylierung wichtig. Die beobachteten Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen sind sehr schnell und dynamisch und lassen eine räumliche Nähe von Abl, CagA^{PY} und möglicherweise anderer Proteine vermuten. Die Inaktivierung von c-Src erfolgt durch die C-terminale Src-Kinase Csk. Diese bindet mit ihrer SH2-Domäne an phosphoryliertes CagA und inaktiviert die Src-Kinase durch Phosphorylierung am Tyrosin 527 (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch *H. pylori*-aktiviertes c-Abl (c-Abl^{PY412}) CagA phosphoryliert und mit CagA^{PY} einen Komplex bildet (Abb. 4.22). Die Art der Bindung zwischen CagA und Abl wird in nachfolgenden Untersuchungen charakterisiert. Dabei sollte die Rolle der bereits beschriebenen Interaktionspartner von c-Abl wie, CrkII, Grb2, Abi1/2, Nck1/2, Dok-1, WAVE1/2 und PI3-K (Pendergast *et al.*, 1993; Feller *et al.*, 1994; Ren *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999; Kain und Klemke, 2001; Stradal *et al.*, 2001; Tani *et al.*, 2003 Woodring *et al.*, 2004), von denen die Crk-Adapterproteine und Grb2 bereits als CagA-bindende Proteine identifiziert wurden (Mimuro *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005), analysiert werden.

Neben *H. pylori* wurden in den letzten Jahren einige Mechanismen von pathogenen Bakterien und Viren beschrieben, die die Aktivität der Src- und Abl-Kinase-Familie zur Induktion der Aktinpolymerisierung nutzen. Interessanterweise nutzt das Vaccinia-Virus sowohl die Abl- als auch die Src-Kinase-Familie für die Invasion und Bewegung innerhalb der Zelle sowie für die Virionenfreisetzung aus der infizierten Zelle (Reeves *et al.*, 2005; Newsome *et al.*, 2006). Die Aktivierung der Abl-Kinase-Familie ist auch für die Invasion von *Shigella flexneri* von großer Bedeutung (Burton *et al.*, 2003, 2005, 2006; Nhieu *et al.*, 2005). Die Invasion von *Shigella flexneri* war in *abl/arg knockout*-Zellen stark beeinträchtigt (Burton *et al.*, 2003). Ein weiteres Abl-aktivierendes Pathogen ist *Enteropathogenic E. coli* (EPEC). EPEC sekretiert seinen eigenen Rezeptor Tir (Tir = *Translocated intimin receptor*) über ein T3SS in die Wirtszelle, der dann das bakterielle Intimin bindet (Kenny *et al.*, 1997). Tir wird in der Wirtszelle durch die Abl-Kinase und Tec-Kinase tyrosinphosphoryliert (Swimm *et al.*, 2004; Bommarius *et al.*, 2007). Es wird aber auch eine Beteiligung der Src-Kinase Fyn an der Tir-Phosphorylierung diskutiert (Phillips *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung von Tir ermöglicht die Bindung des Adapterproteins Nck über die SH2-Domäne (Gruenheid *et al.*, 2001) sowie von N-Wasp und Arp2/3 (Kalman *et al.*, 1999) und es kommt zur Aktinpolymerisierung. Die Aktinpolymerisierung führt zur Bildung von aktinhaltigen Strukturen den so genannten *pedestals* (Kenny *et al.*, 1997, 1999; Gruenheid *et al.*, 2001). Die Funktion dieser *pedestals* ist allerdings noch unklar. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Tir und CagA somit zwei durch die Abl-Kinase-Familie phosphorylierte bakterielle Effektorproteine darstellen, die an Aktin-zytoskelettalen Veränderungen beteiligt sind.

Die Anwendung des spezifischen Abl-Inhibitors STI-571 (Gleevec™, Novartis) hemmte den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp und auch die CagA-Phosphorylierung. Strukturelle Analysen verdeutlichen, dass Gleevec™ an eine konservierte ATP-Bindungstasche bindet und so die Aktivierungsschleife in eine nicht phosphorylierte Konformation drängt (Nagar *et al.*, 2003). Gleevec™ ist in seiner Wirkung sehr spezifisch. Neben Abl werden lediglich zwei andere Tyrosin-Kinasen, der PDGF-Rezeptor und c-Kit inhibiert (Heinrich *et al.*, 2000; Hantschel und Superti-Furga, 2004). Aufgrund der hohen Spezifität wird Gleevec™ in Deutschland seit 2001 erfolgreich in der Medizin zur Behandlung von Krebspatienten mit Chronisch Myeloischer Leukämie (CML), Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) oder gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eingesetzt (Heinrich *et al.*, 2000, 2003; Traxler *et al.*, 2001; Kerkela *et al.*, 2006). Gleevec™ könnte folglich auch als eine alternative Behandlungsmethode für die Folgen von *H. pylori*-Infektionen eingesetzt werden.

5.2.2 DIE ROLLE DER CrkII-ADAPTERPROTEINE BEI DEN *H. PYLORI*-INDUZIERTEN AKTIN-ZYTOSKELETTALEN VERÄNDERUNGEN

Die Familie der Crk-Adapterproteine (CrkI, CrkII und CrkL) ist ubiquitär exprimiert und für die koordinierte Bildung von Proteinkomplexen nach extrazellulärer Stimulierung verantwortlich (Feller, 2001). Adapterproteine besitzen SH2- und SH3- oder PTB-Domänen, aber keine enzymatische Aktivität (Schlessinger und Lemmon, 2003). Adapterproteine sind an der Verbindung von Signalrezeptoren mit den Effektorsystemen und somit bei der Organisation eines dynamischen Ensembles von Signaleinheiten von entscheidender Bedeutung. Sie binden mit ihren SH2-Domänen an tyrosinphosphorylierte Proteine und mit ihren SH3-Domänen an prolinreiche Regionen, den PxxP-Motiven, ihrer *downstream* Effektoren (Schlessinger und Lemon, 2003). CrkII wurde ursprünglich als ein onkogenes Produkt des CT10 Sarcoma-Retrovirus isoliert (Mayer *et al.*, 1988). CrkI stellt eine alternative Spleißvariante der CrkII mRNA dar (Matsuda *et al.*, 1992) und besitzt sowohl eine SH2- als auch eine SH3-Domäne, wohingegen bei CrkII bzw. CrkL eine zweite SH3-Domäne am C-Terminus lokalisiert ist. Zahlreiche Interaktionspartner der SH2- und SH3-Domänen wurden bereits publiziert (Feller *et al.*, 1994; Feller, 2001). Die Regulierung von CrkII erfolgt über die Phosphorylierung am Tyrosin 221 zwischen den beiden SH3-Domänen. Diese Phosphorylierung kann sowohl von der aktivierten Abl-Kinase (Feller *et al.*, 1994), als auch durch Stimulation des EGF-Rezeptors erfolgen (Hashimoto *et al.*, 1998). Die Tyrosinphosphorylierung von CrkII führt über die intramolekulare Bindung an die SH2-Domäne zur Bildung einer geschlossenen Konformation (Feller *et al.*, 1994; Rosen *et al.*, 1995).

Meine Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass CrkII für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps essentiell ist. Die Verwendung von CrkII siRNA sowie die Expression von CrkII-SH2- bzw. SH3-Mutanten führte nicht zur Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps. Die Expression von CrkII^{WT} hingegen hatte einen verstärkenden Einfluss auf den Elongationsphänotyp. CrkII ist in Zellen, in denen die Abl-Aktivität blockiert ist, nicht phosphoryliert bzw. kann nicht phosphoryliert werden (Abb. 4.20, 4.21A). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass CrkII im Laufe der *H. pylori*-Infektion an Position Y221 phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung auf durch *H. pylori*-aktiviertes Abl zurückzuführen ist (Abb. 4.20). Die Expression von CrkII^{Y221F}, eine Mutante die nicht mehr phosphoryliert werden kann, führte zu einer Reduktion des Elongationsphänotyps. In einer parallelen Arbeit einer japanischen Arbeitsgruppe wurden die SH2-Domänen der Adapterproteine CrkI, CrkII und CrkL als Bindungspartner von phosphoryliertem CagA beschrieben (Suzuki *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse korrelieren mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Daten. Auch ich konnte zeigen, dass CrkII an phosphoryliertes CagA

bindet. Darüber hinaus wurde in diesem Komplex auch Abl^{PY412} nachgewiesen (Abb. 4.21). Suzuki und Mitarbeiter haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass einige Crk-induzierte Signalwege für die *H. pylori*-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen wichtig sind. Diese schließen die Crk>Sos1>H-Ras>Raf1 sowie die Crk>C3G>Rap>B-Raf und die Crk>Dock180>Elmo>Rac1 Signalwege ein. Eine Beteiligung des Sos1>H-Ras>Raf1 Signalweges an der CagA-induzierten NF-κB-Aktivierung konnte bereits im Kapitel 4.1.1 dargestellt werden.

Mit Hilfe von Ko-Infektionsexperimenten mit *H. pylori* und *P. aeruginosa* wurde die zentrale Rolle von CrkII bei der Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps bestätigt. *Pseudomonas aeruginosa* sekretiert ExoS, ExoT, ExoU und ExoY über ein T3SS in eukaryontische Zellen. ExoU ist eine Phospholipase (Sato *et al.*, 2003) und ExoY eine Adenylatzyklase (Yahr *et al.*, 1998). In meiner Arbeit wurden *P. aeruginosa*-Stämme verwendet, die nur ExoS und ExoT exprimieren und somit ein ideales Modellsystem darstellen. ExoS und ExoT sind bifunktionale zu 76 % homologe Toxine, die auf das Aktin-Zytoskelett wirken. Sie besitzen eine N-terminale GAP- und eine C-terminale ADPRT-Aktivität. Die ADPRT-Aktivität von ExoT wirkt spezifisch auf CrkII (Sun und Barbieri, 2003). Massenspektrometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Arginin 20 (R20) der Crk-Proteine durch ExoT ADP-ribosyliert wird (Deng *et al.*, 2005). R20 ist eine konservierte Aminosäureposition in der SH2-Domäne der Crk-Proteine, die zum Beispiel für die Crk/Paxillin- oder Crk/p130Cas-Bindung benötigt wird (Abassi und Vuori, 2002). Ko-Infektionsexperimente mit *H. pylori* und einem *P. aeruginosa*-Stamm, der nur die aktive ADPRT-Domäne von ExoT exprimiert, führten zur Blockade der CrkII-Phosphorylierung und des *H. pylori*-induzierten Phänotyps, verhinderten aber nicht die Bindung von CagA^{PY} an CrkII (Abb. 4.32). Somit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Adapterproteins CrkII im Laufe der *H. pylori*-Infektion für die Ausbildung des Elongationsphänotyps essentiell ist, aber nicht für die Bindung an CagA^{PY}.

Neben *H. pylori* wurde auch *Shigella* als ein Pathogen beschrieben, welches CrkII im Laufe der Infektion an Position Y221 phosphoryliert (Burton *et al.*, 2003). Dort interagiert phosphoryliertes CrkII direkt mit phosphoryliertem Cortactin um die Cortactin-abhängige lokale Invasion zu ermöglichen (Bougneres *et al.*, 2004). *H. pylori* ist ein extrazelluläres Bakterium, welches kaum invasiv ist und folglich eine andere Strategie verwendet. Im Gegensatz zur Shigellen-Infektion, wird Cortactin während der *H. pylori*-Infektion an Tyrosinresten dephosphoryliert (Selbach *et al.*, 2003; Abb.1.5). Folglich ist CrkII während der *H. pylori*-Infektion nicht im Komplex mit Cortactin sondern im beschriebenen Crk/Abl/CagA-Komplex lokalisiert, der für globale Veränderungen im Zytoskelett verantwortlich ist.

5.2.3 ROLLE DER RHO-GTPASEN RHOA, RAC1, CDC42 UND H-RAS

Die Familie der kleinen Rho-GTPasen beinhaltet unter anderem RhoA, Rac1, Cdc42 und H-Ras (Aspenström *et al.*, 2004; Wennerberg und Der, 2004). Diese Proteine unterliegen einer starken Kontrolle und haben einen Einfluss auf die Struktur und Funktion des Aktin-Zytoskeletts (Hall, 1998; Kapitel 1.4). Der Einfluss dieser Proteine auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp wurde mit Hilfe von gereinigten Toxinen, DN-Konstrukten, siRNA aber auch mit Ko-Infektionsexperimenten untersucht.

Ko-Infektionsexperimente mit *H. pylori*- und *P. aeruginosa*-Stämmen, die entweder ExoS oder ExoT exprimierten, führten zu einer Inhibierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps. Die anschließende Lokalisierung der Rho-GTPasen durch zelluläre Fraktionierung zeigte deutlich, dass sowohl H-Ras und Rac1 in Gegenwart von ExoS ADP-ribosyliert und damit inaktiviert werden. Die ADP-Ribosylierung wird durch eine etwa 5 kDa große Zunahme an molekularer Masse im Westernblot sichtbar (Abb. 4.33). Die Rho-GAP-Domäne von ExoS wirkt ebenfalls auf Rac1, RhoA und Cdc42 (Krall *et al.*, 2002). Allerdings ist die Bandenintensität von Rac1 in den Membranfraktionen von *H. pylori*-infizierten Zellen in Abwesenheit oder in Gegenwart von ExoT sehr ähnlich. Die hier durchgeführten Experimente können allerdings nicht zwischen GTP- oder GDP-gebundenen Rac1 unterscheiden und es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass kleine Mengen an Rac1 inhibiert werden. In Gegenwart von ExoT sind H-Ras und Rac1 nicht ADP-ribosyliert, da die ADPRT-Domäne von ExoT spezifisch die Crk-Proteine ADP-ribosyliert. Allerdings ist die Menge an zytosolischem Rac1 in Gegenwart von ExoT erhöht. Dieses könnte zum einen auf die GAP-Aktivität von ExoT zurückzuführen sein und zum anderen eine Folge der Inaktivierung von CrkII durch ExoT sein. Frühere Arbeiten von anderen Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass phosphoryliertes CrkII die Membranlokalisierung von Rac bewirkt (Abassi und Vuori, 2002). Die *H. pylori*-induzierte CrkII-Phosphorylierung ist in Gegenwart von ExoT($G^{-}A^{+}$) aufgehoben (Abb. 4.32B). Diese Beobachtungen zeigen, dass die ADP-Ribosylierung von CrkII durch ExoT einen negativen Einfluss auf die CrkII-Phosphorylierung hat. Damit scheint neben der Inaktivierung von CrkII durch ExoT auch die Inaktivierung von Rac1 und H-Ras durch ExoS und ExoT für die Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps verantwortlich zu sein. Suzuki und Mitarbeiter (2005) hatten ebenfalls eine Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps in Gegenwart von ExoT beschrieben (Suzuki *et al.*, 2005).

Neben *P. aeruginosa* wurden weitere Pathogene, die die Aktivität der Rho-GTPasen durch T3SS-Effektorproteine oder sekretierte Toxine modifizieren, in der Ko-Infektion eingesetzt. Die eindeutige Interpretation der Daten erwies sich aber als sehr schwierig. *Yersinia* spp. injiziert beispielsweise über ein T3SS die Effektorproteine YopH, O, P, E,

M und T in die Wirtszelle. Dabei wirkt YopE als GAP mit erhöhter Spezifität für Rac (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Andor *et al.*, 2001). *Salmonella* spp. sekretiert neben SptB, welches als GAP wirkt, zusätzlich SopE und SopF, die als Guaninaustauschfaktoren für Rac und Cdc42 wirken, in die Wirtszelle (Hardt *et al.*, 1998; Friebel *et al.*, 2001). Ko-Infektionen mit *Yersinia* spp. oder *Salmonella* spp. führten zu einer kontaktabhängigen Blockade oder starken Reduzierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps. Auf der anderen Seite ist der *H. pylori*-induzierte Phänotyp in Gegenwart von *Bordetella* spp. verstärkt. *Bordetella* spp. sekretiert unter anderem das DNT-Toxin, das Rho, Rac und Cdc42 durch Transglutaminierung aktiviert (Masuda *et al.*, 2000, 2002). Mit dem hier beschriebenen Ko-Infektionsansatz konnte der Einfluss der Rho-GTPasen auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp analysiert werden. Damit stellt die Ko-Infektion ein wichtiges und nutzbares „Werkzeug“ für die Analyse der molekularen Mechanismen der *H. pylori*-induzierten zellulären Veränderungen dar.

Der Einfluss der kleinen Rho-GTPasen wurde in Folgeexperimenten mittels DN-Konstrukten, spezifischer siRNA und Toxine näher untersucht. Sowohl die Expression von DN Rac1 und DN H-Ras als auch von Rac1 und H-Ras siRNA blockierten den *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp (Abb. 4.34, 4.35). Eine Rac1-Aktivierung im Laufe der *H. pylori*-Infektion konnte bereits durch Churin und Mitarbeiter gezeigt werden (Churin *et al.*, 2001). Paluvuori und Mitarbeiter zeigten, dass aktives Rac an den *H. pylori*-induzierten Signalwegen beteiligt ist (Paluvuori *et al.*, 2000). Somit ist zum einen die Inaktivierung von Rac1 durch die Rho-GAP-Aktivität von ExoT und zum anderen die CrkII-Inaktivierung durch die ADPRT-Aktivität von ExoT eine mögliche Ursache für die Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps.

Die Verwendung gereinigter GTPase-modifizierender Toxine (C3-Toxin, Tcd-B, Tcd-BF, CNF-1, CNF-Y), mit bekannten Funktionen, diente der weiteren molekularen Analyse des *H. pylori*-induzierten Phänotyps. Die verwendeten Toxine sind in ihrer Wirkung auf die Rho-GTPasen bereits gut charakterisiert und werden deshalb oft als molekulare Werkzeuge verwendet (Barbieri *et al.*, 2002; Just und Gerhard, 2004; Hoffmann und Schmidt, 2004; Aktories und Barbieri, 2005; Abb. 1.8). So konnte der entstehende Phänotyp in Gegenwart dieser Toxine direkt auf die entsprechende GTPase bezogen werden. Auch hier hatte die Inaktivierung von Rac1 und H-Ras durch Tcd-B oder Tcd-BF eine Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps zur Folge. Weiterhin konnte durch die Verwendung des spezifischen Rac Inhibitors NSC23766 (Nassar *et al.*, 2006) eine direkte Beteiligung von aktivem Rac1 am *H. pylori*-induzierten Phänotyp bestätigt werden. Die beiden großen clostridialen Toxine Tcd-B und Tcd-BF unterscheiden sich in ihrer Spezifität, d.h. Tcd-BF glykolyisiert nur Rac und R-Ras aber nicht Rho und Cdc42 (Chaves-Olarte *et al.*, 1999, 2003; Huelsenbeck *et al.*, 2007). In Gegenwart von Tcd-BF war der *H. pylori*-induzierte Phänotyp blockiert. Die

Inhibierung von RhoA durch das C3-Toxin hatte keinen blockierenden Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp. Somit konnte die Beteiligung von aktivem Rac am *H. pylori*-induzierten Phänotyp durch die Verwendung von DN Rac1 Konstrukten, Rac1 siRNA und der Rac spezifischen Inhibitoren NSC23766 oder Toxine Tcd-B und Tcd-BF verifiziert werden. In den letzten Jahren wurde die Aktivierung von Rac für einige invasive Pathogene beschrieben. So führt die Invasion von *Campylobacter jejuni* (Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007) und *Clamidia* spp. (Carabeo *et al.*, 2007) zur Aktivierung von Rac. Für die Invasion von *Shigella* spp. konnte das Effektorprotein IpgB1 identifiziert werden (Ohya *et al.*, 2005). IpgB1 ahmt strukturell aktives Rac nach ohne dabei an GTP gebunden zu sein (Alto *et al.*, 2006). IpgB1 gehört somit zu einer neuen Klasse von T3SS-Effektorproteinen, die GTPase-Signaltransduktionen durch molekulares Mimikry auslösen.

Die kürzlich erschienene Arbeit von Bourzac *et al.*, 2007 beschreibt, dass die *H. pylori*-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen auf einen Defekt der koordinierten Zellbewegung zurückzuführen sind und dieser Cdc42, Rac1 und Arp2/3 unabhängig ist. Diese Ergebnisse scheinen zunächst im Widerspruch zu den in meiner Arbeit dargestellten Daten zu sein. In der Arbeit von Bourzac *et al.*, wurde allerdings lediglich ein *H. pylori* WT-Stamm verwendet. Des weiteren wurden die Experimente in Gegenwart von FCS-haltigen Medium durchgeführt, womit bereits eine basale Aktivität der GTPasen und auch anderer Signalmoleküle vorhanden ist (Palovuori *et al.*, 2000). Infektionen von AGS-Zellen mit *H. pylori* in Gegenwart von FCS führen zu einer Reduktion der Zellbewegung und Zellelongation (Moese *et al.*, 2004). Die durch *H. pylori* induzierte Zellbewegung und der Elongationsphänotyp sind zwei unterschiedliche zelluläre Prozesse, die parallel oder nacheinander ablaufen (Moese *et al.*, 2004).

Die in meiner Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen zweifelsfrei, dass die Rho-GTPasen Rac1 und H-Ras für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps essentiell sind. Unter Berücksichtigung der bereits dargestellten Ergebnisse und der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen konnte ein Modell der *H. pylori*-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen aufgestellt werden (Abb. 5.2). CagA wird über das T4SS in die Wirtszelle injiziert und dort zunächst durch die Src-Kinase phosphoryliert (Fischer *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2002). Die Src-Kinase wird innerhalb der ersten zwei Stunden der Infektion aktiviert und über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch Csk inhibiert (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003). In Folge der Src-Inaktivierung kommt es zur Dephosphorylierung von Cortactin, Ezrin und Vinculin (Selbach *et al.*, 2003, 2004; Moese *et al.*, 2007). Parallel zur Inaktivierung der Src-Kinase kommt es durch einen noch unbekanntem Faktor zur Aktivierung der Abl-Kinase und Phosphorylierung von CagA (Abb. 4.15; Poppe *et al.*,

2007). Die Abl-Kinase kann unter anderem durch die Src-Kinase aktiviert werden (Furstoss *et al.*, 2002). Die im Laufe der *H. pylori*-Infektion aktivierte Abl-Kinase führt zur Phosphorylierung von CrkII (Abb. 4.20). Phosphoryliertes CagA und CrkII bilden einen Komplex (Abb. 4.21; Suzuki *et al.*, 2005). In diesem Komplex konnte auch phosphoryliertes Abl nachgewiesen werden (Abb. 4.21). Phosphoryliertes CrkII bindet an DOCK180, einem GEF für Rac, und aktiviert Rac1 (Akakura *et al.*, 2005). Aktiviertes Rac führt zur Aktivierung des WAVE2>Arp2/3 Signalweges (Miki *et al.*, 1998; Rideley, 2001). Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch die WAVE-Proteine führt zur Aktinpolymerisierung (Takenawa und Miki, 2001). Die direkte Aktivierung von WAVE2 durch *H. pylori* konnte allerdings noch nicht dargestellt werden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass in Gegenwart von DN WAVE1/2 der *H. pylori*-induzierte Elongationsphänotyp reduziert ist (Suzuki *et al.*, 2005). Zukünftige Arbeiten müssen die Rolle von DOCK180 sowie des WAVE-Komplexes bei der *H. pylori*-induzierten Rac-Aktivierung detailliert untersuchen. WAVE2 ist ein Substrat der Abl-Kinase (Stuart *et al.*, 2006). Inwieweit die Abl-induzierte WAVE2-Aktivierung für den *H. pylori*-induzierten Phänotyp wichtig ist, muss allerdings in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

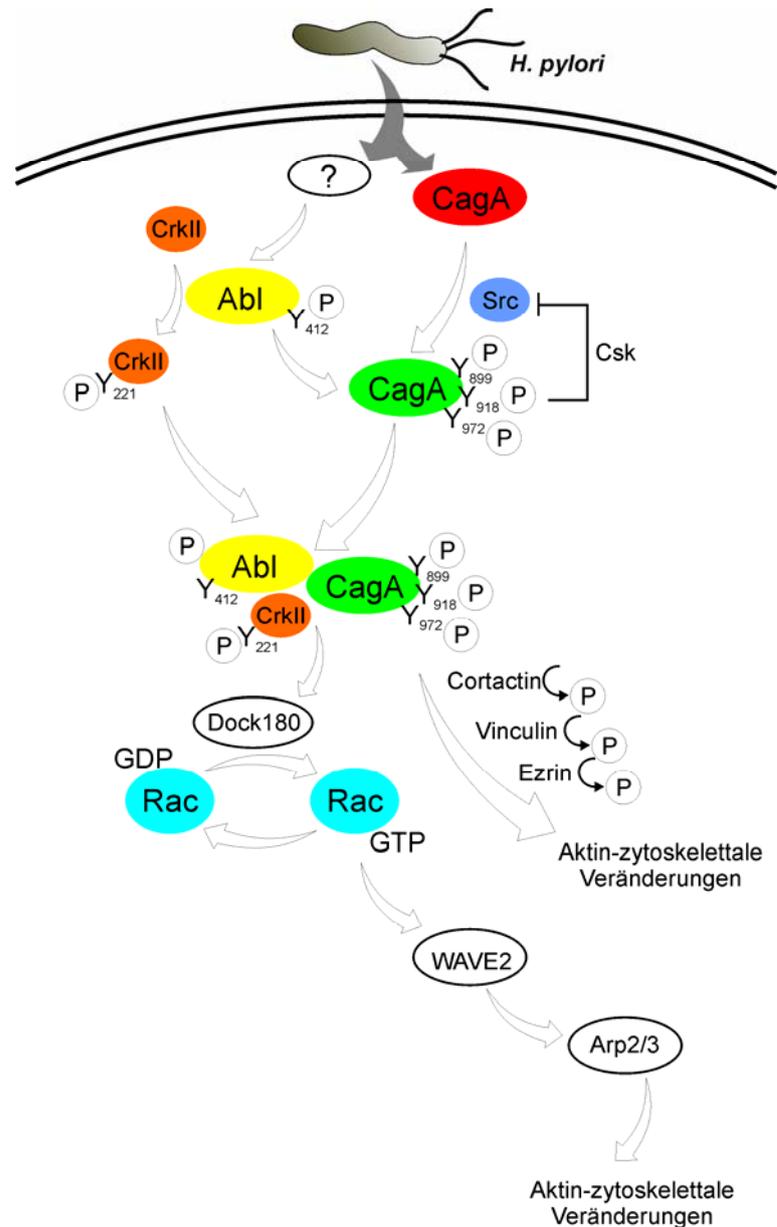


Abb. 5.2: **Schematisches Modell der CagA-induzierten Aktin-zytoskelettalen Veränderungen.** *Helicobacter pylori* injiziert CagA über das T4SS in die Zielzelle und dieses wird dort im Laufe der ersten beiden Stunden durch die Src-Kinase an den EPIYA-Motiven tyrosinphosphoryliert. Die Src-Kinase wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wieder inaktiviert. Ein bisher noch unbekannter bakterieller Faktor aktiviert c-Abl und dieses phosphoryliert CrkII und CagA. So ist eine kontinuierliche Phosphorylierung von CagA gewährleistet. Phosphoryliertes c-Abl (Abl^{PY412}), phosphoryliertes CrkII (CrkII^{PY221}) und phosphoryliertes CagA (CagA^{PY899/918/972}) bilden einen Komplex. Die Inaktivierung von Src durch CagA^{PY} führt zur Dephosphorylierung zahlreicher zellulärer Proteine, wie Cortactin, Ezrin und Vinculin, und führt somit zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen. Ein weiterer möglicher Signalweg könnte die Aktivierung von DOCK180, einem GEF für Rac, durch CrkII^{PY221} sein. Aktiviertes Rac führt daraufhin zur Aktivierung von WAVE2 und induziert über den Arp2/3-Komplex die Aktin-zytoskelettalen Veränderungen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Helicobacter pylori ist ein extrazelluläres Pathogen mit einer bedeutenden Rolle in der Entstehung von chronischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren oder der Ausbildung maligner Tumore des Magens. Die Pathogenese der *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen ist von einem funktionellen T4SS und dem Effektorprotein CagA abhängig. Ziel dieser Arbeit war es, die *H. pylori*-induzierten Signalwege, die zu den bereits beschriebenen Aktin-zytoskelettalen Veränderungen und der IL-8-Sekretion führen, zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende wichtige Ergebnisse erzielt:

- I. Ein neuer CagA-induzierter Signalweg wurde beschrieben. Unabhängig von der Phosphorylierung kann CagA den Transkriptionsfaktor NF- κ B über den Ras>Raf>Mek>Erk Signalweg aktivieren. Die CagA-induzierte IL-8-Sekretion ist zeit- und stammabhängig. Es konnten hoch- und niedriginduzierende-Stämme identifiziert werden, die durch genetischen Austausch des *cagA*-Gens ineinander umgewandelt werden können.
- II. Eine weitere CagA-phosphorylierende Kinase wurde identifiziert. Die Verwendung von spezifischen Abl-Kinase-Inhibitoren und der *knockdown* von Abl und Arg durch sh/siRNA führte zu einer Blockierung der CagA-Phosphorylierung und der Aktin-zytoskelettalen Veränderungen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Abl-Kinase im Laufe einer *H. pylori*-Infektion schnell und kontinuierlich tyrosinphosphoryliert (Y412) und aktiviert wird. Die bisher als Substrate der Src-Kinase bekannten Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in den EPIYA-Motiven im CagA-Protein (Y899; Y918 und Y972) konnten auch als Substrate der Abl-Kinase identifiziert werden.
- III. Das Adapterprotein CrkII wurde als eine wichtige Komponente des CagA-induzierten Signalweges dargestellt. CrkII ist ein Substrat der Abl-Kinase und wird durch *H. pylori*-aktiviertes Abl am Tyrosin 221 (Y221) *in vivo* phosphoryliert. *In vivo* Untersuchungen konnten zeigen, dass phosphoryliertes CagA einen Komplex mit Abl und aktiviertem (phosphoryliertem) CrkII bildet. Auch die Expression von phosphorylierungsdefizienten CrkII führt zur Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die ADP-Ribosylierung von CrkII durch ExoT die Phosphorylierung von CrkII blockiert.
- IV. Die kleinen Rho-GTPasen Rac und H-Ras sind als essentielle Bestandteile des *H. pylori*-induzierten Phänotyps identifiziert worden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abassi, Y. A. and Vuori, K. (2002) Tyrosine 221 in Crk regulates adhesion-dependent membrane localization of Crk and Rac and activation of Rac signaling. *EMBO J* **21**: 4571-4582.
- Abercrombie, M., Heaysman, J. E., and Pegrum, S. M. (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. II. "RRuffling". *Exp Cell Res* **60**: 437-444.
- Abercrombie, M., Heaysman, J. E., and Pegrum, S. M. (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* **59**: 393-398.
- Abercrombie, M., Heaysman, J. E., and Pegrum, S. M. (1971) The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res* **67**: 359-367.
- 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.
- Akakura, S., Kar, B., Singh, S., Cho, L., Tibrewal, N., Sanokawa-Akakura, R., Reichman, C., Ravichandran, K. S., and Birge, R. B. (2005) C-terminal SH3 domain of CrkII regulates the assembly and function of the DOCK180/ELMO Rac-GEF. *J Cell Physiol* **204**: 344-351.
- Akanuma, M., Maeda, S., Ogura, K., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ikenoue, T., Otsuka, M., Watanabe, T., Yamaji, Y., Yoshida, H., Kawabe, T., Shiratori, Y., and Omata, M. (2002) The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian gerbil infection model. *J Infect Dis* **185**: 341-347.
- Akira, S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**: 5-11.
- Akopyants, N. S., Eaton, K. A., and Berg, D. E. (1995) Adaptive mutation and cocolonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **63**: 116-121.
- Aktories, K., Ankenbauer, T., Schering, B., and Jakobs, K. H. (1986) ADP-ribosylation of platelet actin by botulinum C2 toxin. *Eur J Biochem* **161**: 155-162.
- Aktories, K. and Hall, A. (1989) Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: a new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 415-418.
- Aktories, K., Wilde, C., and Vogelsang, M. (2004) Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 1-22.
- Aktories, K. and Barbieri, J. T. (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* **3**: 397-410.
- Alaoui-El-Azher, M., Jia, J., Lian, W., and Jin, S. (2006) ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis through a Fas receptor/caspase 8-independent pathway in HeLa cells. *Cell Microbiol* **8**: 326-338.
- 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., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F., and Trust, T. J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**: 176-180.
- Alto, N. M., Shao, F., Lazar, C. S., Brost, R. L., Chua, G., Mattoo, S., McMahon, S. A., Ghosh, P., Hughes, T. R., Boone, C., and Dixon, J. E. (2006) Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* **124**: 133-145.
- 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.

- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Strobe, K. L., Barrett, S. L., Cookson, B. T., Logan, S. M., and Aderem, A. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9247-9252.
- Ando, T., Peek, R. M., Jr., Lee, Y. C., Krishna, U., Kusugami, K., and Blaser, M. J. (2002) Host cell responses to genotypically similar *Helicobacter pylori* isolates from United States and Japan. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**: 167-175.
- Andor, A., Trulzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J., and Aepfelbacher, M. (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**: 301-310.
- Aspenstrom, P., Fransson, A., and Saras, J. (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* **377**: 327-337.
- Atherton, J. C., Peek, R. M., Jr., Tham, K. T., Cover, T. L., and Blaser, M. J. (1997) Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **112**: 92-99.
- Azuma, T., Yamazaki, S., Yamakawa, A., Ohtani, M., Muramatsu, A., Suto, H., Ito, Y., Dojo, M., Yamazaki, Y., Kuriyama, M., Keida, Y., Higashi, H., and Hatakeyama, M. (2004) Association between diversity in the Src homology 2 domain--containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis* **189**: 820-827.
- 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.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., and Meyer, T. F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **42**: 631-644.
- Backert, S., Schwarz, T., Miehle, S., Kirsch, C., Sommer, C., Kwok, T., Gerhard, M., Goebel, U. B., Lehn, N., Koenig, W., and Meyer, T. F. (2004) Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* **72**: 1043-1056.
- Backert, S., Kwok, T., Schmid, M., Selbach, M., Moese, S., Peek, R. M., Jr., Konig, W., Meyer, T. F., and Jungblut, P. R. (2005) Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **5**: 1331-1345.
- Backert, S. and Selbach, M. (2005) Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol* **13**: 476-484.
- Backert, S. and Konig, W. (2005) Interplay of bacterial toxins with host defence: molecular mechanisms of immunomodulatory signalling. *Int J Med Microbiol* **295**: 519-530.
- Backert, S. and Meyer, T. F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**: 207-217.
- Backert, Steffen, Kwok, Terry, and Konig, Wolfgang (2005) Conjugative plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori* mediated by chromosomally encoded relaxase and TraG-like proteins. *Microbiology* **151**: 3493-3503.
- Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., and Amieva, M. R. (2005) *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16339-16344.
- Baldari, C. T., Lanzavecchia, A., and Telford, J. L. (2005) Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol* **26**: 199-207.
- Barbieri, A. M., Sha, Q., Bette-Bobillo, P., Stahl, P. D., and Vidal, M. (2001) ADP-ribosylation of Rab5 by ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* affects endocytosis. *Infect Immun* **69**: 5329-5334.
- Barbieri, J. T., Riese, M. J., and Aktories, K. (2002) Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 315-344.

- Barbieri, J. T. and Sun, J. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 79-92.
- Barnes, P. J. and Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**: 1066-1071.
- Bartles, J. R. (2000) Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 72-78.
- Basseres, D. S. and Baldwin, A. S. (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* **25**: 6817-6830.
- Beinke, S. and Ley, S. C. (2004) Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* **382**: 393-409.
- Ben Ami, G., Ozeri, V., Hanski, E., Hofmann, F., Aktories, K., Hahn, K. M., Bokoch, G. M., and Rosenshine, I. (1998) Agents that inhibit Rho, Rac, and Cdc42 do not block formation of actin pedestals in HeLa cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**: 1755-1758.
- Bernards, A. and Settleman, J. (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**: 377-385.
- Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**: 257-263.
- Bishop, A. L. and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-255.
- Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N., and Nomura, A. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* **55**: 2111-2115.
- Blaser, M. J. (1999) Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis* **179**: 1523-1530.
- Blaser, M. J. and Berg, D. E. (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* **107**: 767-773.
- Blaser, M. J. and Atherton, J. C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* **113**: 321-333.
- Bliss, C. M., Jr., Golenbock, D. T., Keates, S., Linevsky, J. K., and Kelly, C. P. (1998) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemoattractant protein 1 by human monocytes. *Infect Immun* **66**: 5357-5363.
- Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. (1998) Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* **391**: 285-288.
- Boland, A. and Cornelis, G. R. (1998) Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* **66**: 1878-1884.
- Bommarius, B., Maxwell, D., Swimm, A., Leung, S., Corbett, A., Bornmann, W., and Kalman, D. (2007) Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir is an SH2/3 ligand that recruits and activates tyrosine kinases required for pedestal formation. *Mol Microbiol* **63**: 1748-1768.
- Bordo, D. and Argos, P. (1991) Suggestions for "safe" residue substitutions in site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* **217**: 721-729.
- 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.
- Bougneres, L., Girardin, S. E., Weed, S. A., Karginov, A. V., Olivo-Marin, J. C., Parsons, J. T., Sansonetti, P. J., and Van Nhieu, G. T. (2004) Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *J Cell Biol* **166**: 225-235.

- Bourzac, K. M. and Guillemin, K. (2005) Helicobacter pylori-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* **7**: 911-919.
- Bourzac, K. M., Botham, C. M., and Guillemin, K. (2007) Helicobacter pylori CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infect Immun* **75**: 1203-1213.
- 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.
- Brandt, S., Shafikhani, S., Balachandran, P., Jin, S., Hartig, R., Konig, W., Engel, J., and Backert, S. (2007) Use of a novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII phosphorylation in Helicobacter pylori-induced host cell actin cytoskeletal rearrangements. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**: 190-205.
- Brisslert, M., Enarsson, K., Lundin, S., Karlsson, A., Kusters, J. G., Svennerholm, A. M., Backert, S., and Quiding-Jarbrink, M. (2005) Helicobacter pylori induce neutrophil transendothelial migration: role of the bacterial HP-NAP. *FEMS Microbiol Lett* **249**: 95-103.
- Bumann, D., Meyer, T. F., and Jungblut, P. R. (2001) Proteome analysis of the common human pathogen Helicobacter pylori. *Proteomics* **1**: 473-479.
- Burne, R. A. and Chen, Y. Y. (2000) Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect* **2**: 533-542.
- Burton, E. A., Plattner, R., and Pendergast, A. M. (2003) Abl tyrosine kinases are required for infection by Shigella flexneri. *EMBO J* **22**: 5471-5479.
- Burton, E. A., Oliver, T. N., and Pendergast, A. M. (2005) Abl kinases regulate actin comet tail elongation via an N-WASP-dependent pathway. *Mol Cell Biol* **25**: 8834-8843.
- Burton, E. A., Pendergast, A. M., and Aballay, A. (2006) The Caenorhabditis elegans ABL-1 tyrosine kinase is required for Shigella flexneri pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5043-5051.
- Bühl, A. and Zöfel, P. (1995) *SPSS für Windows Version 6.1 - Praxisorientierte Einführung in die modernen Datenanalyse*. Boston: Addison-Wesley Publishing Company.
- 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.
- Censini, S., Stein, M., and Covacci, A. (2001) Cellular responses induced after contact with Helicobacter pylori. *Curr Opin Microbiol* **4**: 41-46.
- Chang, Y. J., Wu, M. S., Lin, J. T., Sheu, B. S., Muta, T., Inoue, H., and Chen, C. C. (2004) Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by Helicobacter pylori involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* **66**: 1465-1477.
- Chaves-Olarte, E., Low, P., Freer, E., Norlin, T., Weidmann, M., Eichel-Streiber, C., and Thelestam, M. (1999) A novel cytotoxin from Clostridium difficile serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem* **274**: 11046-11052.
- Chaves-Olarte, E., Freer, E., Parra, A., Guzman-Verri, C., Moreno, E., and Thelestam, M. (2003) R-Ras glucosylation and transient RhoA activation determine the cytopathic effect produced by toxin B variants from toxin A-negative strains of Clostridium difficile. *J Biol Chem* **278**: 7956-7963.
- Cho, S. O., Kim, K. H., and Kim, H. (2007) Extracellular signal-regulated kinase induces phosphorylation of IkappaBalpha in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial AGS cells. *Inflammopharmacology* **15**: 26-30.
- Chow, W. H., Blaser, M. J., Blot, W. J., Gammon, M. D., Vaughan, T. L., Risch, H. A., Perez-Perez, G. I., Schoenberg, J. B., Stanford, J. L., Rotterdam, H., West, A. B., and Fraumeni, J. F., Jr. (1998) An inverse relation between cagA+ strains of Helicobacter pylori infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* **58**: 588-590.

- Churin, Y., Kardalidou, E., Meyer, T. F., and Naumann, M. (2001) Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection. *Mol Microbiol* **40**: 815-823.
- Churin, Y., Al Ghouli, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W., and Naumann, M. (2003) *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol* **161**: 249-255.
- Coburn, J. and Gill, D. M. (1991) ADP-ribosylation of p21ras and related proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* **59**: 4259-4262.
- Conlin, V. S., Curtis, S. B., Zhao, Y., Moore, E. D., Smith, V. C., Meloche, R. M., Finlay, B. B., and Buchan, A. M. (2004) *Helicobacter pylori* infection targets adherens junction regulatory proteins and results in increased rates of migration in human gastric epithelial cells. *Infect Immun* **72**: 5181-5192.
- Contreras, M., Thiberge, J. M., Mandrand-Berthelot, M. A., and Labigne, A. (2003) Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **49**: 947-963.
- Cooper, J. A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**: 1473-1478.
- Cornelis, G. R. and Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861-867.
- Cossart, P. and Sansonetti, P. J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Cottet, S., Corthesy-Theulaz, I., Spertini, F., and Corthesy, B. (2002) Microaerophilic conditions permit to mimic in vitro events occurring during in vivo *Helicobacter pylori* infection and to identify Rho/Ras-associated proteins in cellular signaling. *J Biol Chem* **277**: 33978-33986.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrone, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., and . (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5791-5795.
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**: 1328-1333.
- Covacci, A. and Rappuoli, R. (2000) Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med* **191**: 587-592.
- 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. and Blanke, S. R. (2005) *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* **3**: 320-332.
- Craanen, M. E., Dekker, W., Blok, P., Ferwerda, J., and Tytgat, G. N. (1992) Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. *Gut* **33**: 16-20.
- Crabtree, J. E., Taylor, J. D., Wyatt, J. I., Heatley, R. V., Shallcross, T. M., Tompkins, D. S., and Rathbone, B. J. (1991) Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* **338**: 332-335.
- Crabtree, J. E., Xiang, Z., Lindley, I. J., Tompkins, D. S., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1995) Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* **48**: 967-969.
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G., and Way, M. (1995) Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* **378**: 636-638.
- Cullen, B. R. (2002) RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol* **3**: 597-599.
- Cussac, V., Ferrero, R. L., and Labigne, A. (1992) Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol* **174**: 2466-2473.

- 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.
- Deng, Q., Sun, J., and Barbieri, J. T. (2005) Uncoupling Crk signal transduction by *Pseudomonas* exoenzyme T. *J Biol Chem* **280**: 35953-35960.
- Dixon, M. F. (1994) Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl* **201**: 7-10.
- Dorey, K., Engen, J. R., Kretschmar, J., Wilm, M., Neubauer, G., Schindler, T., and Superti-Furga, G. (2001) Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase. *Oncogene* **20**: 8075-8084.
- Dossumbekova, A., Prinz, C., Gerhard, M., Brenner, L., Backert, S., Kusters, J. G., Schmid, R. M., and Rad, R. (2006) *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation. *Gut* **55**: 1360-1361.
- Dossumbekova, A., Prinz, C., Mages, J., Lang, R., Kusters, J. G., van Vliet, A. H., Reindl, W., Backert, S., Saur, D., Schmid, R. M., and Rad, R. (2006) *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis* **194**: 1346-1355.
- Dragneva, Y., Anuradha, C. D., Valeva, A., Hoffmann, A., Bhakdi, S., and Husmann, M. (2001) Subcytotoxic attack by staphylococcal alpha-toxin activates NF-kappaB and induces interleukin-8 production. *Infect Immun* **69**: 2630-2635.
- Dramsi, S., Levi, S., Triller, A., and Cossart, P. (1998) Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect Immun* **66**: 4461-4468.
- Dramsi, S. and Cossart, P. (1998) Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 137-166.
- 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. and Krakowka, S. (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **62**: 3604-3607.
- Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C., and Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* **64**: 2445-2448.
- Engel, J.N. (2001) In *Molecular pathogenesis of acute Pseudomonas aeruginosa infections. Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa*. Hauser & Rello (ed.) New York City: Kluwer/Academic/Plenum Press, pp. 201-230.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635.
- Evans, D. J., Jr., Evans, D. G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H. C., Graham, D. Y., Granger, D. N., and Kvietys, P. R. (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* **63**: 2213-2220.
- Everhart, J. E. (2000) Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* **29**: 559-578.
- Feller, S. M., Knudsen, B., and Hanafusa, H. (1994) c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J* **13**: 2341-2351.
- Feller, S. M. (2001) Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* **20**: 6348-6371.
- 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.

- Fixman, E. D., Fournier, T. M., Kamikura, D. M., Naujokas, M. A., and Park, M. (1996) Pathways downstream of Shc and Grb2 are required for cell transformation by the tpr-Met oncoprotein. *J Biol Chem* **271**: 13116-13122.
- Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997) Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**: 729-733.
- Foryst-Ludwig, A. and Naumann, M. (2000) p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in Helicobacter pylori infection. *J Biol Chem* **275**: 39779-39785.
- Frasca, F., Vigneri, P., Vella, V., Vigneri, R., and Wang, J. Y. (2001) Tyrosine kinase inhibitor STI571 enhances thyroid cancer cell motile response to Hepatocyte Growth Factor. *Oncogene* **20**: 3845-3856.
- Fraylick, J. E., Riese, M. J., Vincent, T. S., Barbieri, J. T., and Olson, J. C. (2002) ADP-ribosylation and functional effects of Pseudomonas exoenzyme S on cellular RalA. *Biochemistry* **41**: 9680-9687.
- Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., and Hardt, W. D. (2001) SopE and SopE2 from Salmonella typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* **276**: 34035-34040.
- Frischknecht, F. and Way, M. (2001) Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol* **11**: 30-38.
- Furge, K. A., Kiewlich, D., Le, P., Vo, M. N., Faure, M., Howlett, A. R., Lipson, K. E., Woude, G. F., and Webb, C. P. (2001) Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10722-10727.
- Furstoss, O., Dorey, K., Simon, V., Barila, D., Superti-Furga, G., and Roche, S. (2002) c-Abl is an effector of Src for growth factor-induced c-myc expression and DNA synthesis. *EMBO J* **21**: 514-524.
- Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J. C., Contamin, S., de, Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E., and Boquet, P. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* **19**: 6361-6370.
- Ganesan, A. K., Frank, D. W., Misra, R. P., Schmidt, G., and Barbieri, J. T. (1998) Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem* **273**: 7332-7337.
- Ganesan, A. K., Vincent, T. S., Olson, J. C., and Barbieri, J. T. (1999) Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange. *J Biol Chem* **274**: 21823-21829.
- Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Zeh, K., and Vuori, K. (1999) Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation. *Oncogene* **18**: 7775-7786.
- Garrity-Ryan, L., Kazmierczak, B., Kowal, R., Comolli, J., Hauser, A., and Engel, J. N. (2000) The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of Pseudomonas aeruginosa by epithelial cells and macrophages. *Infect Immun* **68**: 7100-7113.
- Garrity-Ryan, L., Shafikhani, S., Balachandran, P., Nguyen, L., Oza, J., Jakobsen, T., Sargent, J., Fang, X., Cordwell, S., Matthay, M. A., and Engel, J. N. (2004) The ADP ribosyltransferase domain of Pseudomonas aeruginosa ExoT contributes to its biological activities. *Infect Immun* **72**: 546-558.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003) Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**: 1099-1102.
- Geiser, T. K., Kazmierczak, B. I., Garrity-Ryan, L. K., Matthay, M. A., and Engel, J. N. (2001) Pseudomonas aeruginosa ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cell Microbiol* **3**: 223-236.
- Genth, H., Hofmann, F., Selzer, J., Rex, G., Aktories, K., and Just, I. (1996) Difference in protein substrate specificity between hemorrhagic toxin and lethal toxin from Clostridium sordellii. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 370-374.

- Gerhard, M., Schmees, C., Volland, P., Endres, N., Sander, M., Reindl, W., Rad, R., Oelsner, M., Decker, T., Mempel, M., Hengst, L., and Prinz, C. (2005) A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. *Gastroenterology* **128**: 1327-1339.
- Gewirtz, A. T., Yu, Y., Krishna, U. S., Israel, D. A., Lyons, S. L., and Peek, R. M., Jr. (2004) *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* **189**: 1914-1920.
- Gilmore, T. D. (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**: 6680-6684.
- Girardin, S. E., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* **10**: 193-199.
- Glupczynski, Y., Megraud, F., Lopez-Brea, M., and Andersen, L. P. (2001) European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**: 820-823.
- Gobert, A. P., McGee, D. J., Akhtar, M., Mendz, G. L., Newton, J. C., Cheng, Y., Mobley, H. L., and Wilson, K. T. (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13844-13849.
- Goosney, D. L., DeVinney, R., and Finlay, B. B. (2001) Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun* **69**: 3315-3322.
- Gouin, E., Egile, C., Dehoux, P., Villiers, V., Adams, J., Gertler, F., Li, R., and Cossart, P. (2004) The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* **427**: 457-461.
- Graziani, A., Gramaglia, D., Cantley, L. C., and Comoglio, P. M. (1991) The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **266**: 22087-22090.
- Graziani, A., Gramaglia, D., dalla, Zonca P., and Comoglio, P. M. (1993) Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates the Ras-guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem* **268**: 9165-9168.
- Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G. D., Pawson, T., and Finlay, B. B. (2001) Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* **3**: 856-859.
- Gruenheid, S. and Finlay, B. B. (2003) Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* **422**: 775-781.
- Guruge, J. L., Falk, P. G., Lorenz, R. G., Dans, M., Wirth, H. P., Blaser, M. J., Berg, D. E., and Gordon, J. I. (1998) Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3925-3930.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514.
- Han, S., Craig, J. A., Putnam, C. D., Carozzi, N. B., and Tainer, J. A. (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat Struct Biol* **6**: 932-936.
- Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., and Superti-Furga, G. (2003) A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* **112**: 845-857.
- Hantschel, O. and Superti-Furga, G. (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 33-44.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., and Galan, J. E. (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**: 815-826.
- Hashimoto, Y., Katayama, H., Kiyokawa, E., Ota, S., Kurata, T., Gotoh, N., Otsuka, N., Shibata, M., and Matsuda, M. (1998) Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **273**: 17186-17191.
- Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* **4**: 688-694.

- Hauser, A. R. and Engel, J. N. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. *Infect Immun* **67**: 5530-5537.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**: 2195-2224.
- Hayward, R. D. and Koronakis, V. (1999) Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J* **18**: 4926-4934.
- Hazell, S. L., Evans, D. J., Jr., and Graham, D. Y. (1991) *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol* **137**: 57-61.
- Heczko, U., Smith, V. C., Mark, Meloche R., Buchan, A. M., and Finlay, B. B. (2000) Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes Infect* **2**: 1669-1676.
- Heinrich, M. C., Griffith, D. J., Druker, B. J., Wait, C. L., Ott, K. A., and Zigler, A. J. (2000) Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **96**: 925-932.
- Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D., Blanke, C. D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L. S., Chen, C. J., Van den Abbeele, A. D., Druker, B. J., Kiese, B., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Singer, S., Fletcher, C. D., Silberman, S., Dimitrijevic, S., and Fletcher, J. A. (2003) Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **21**: 4342-4349.
- Henriksson, M. L., Sundin, C., Jansson, A. L., Forsberg, A., Palmer, R. H., and Hallberg, B. (2002) Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. *Biochem J* **367**: 617-628.
- Hernandez, S. E., Krishnaswami, M., Miller, A. L., and Koleske, A. J. (2004) How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol* **14**: 36-44.
- Heuermann, D. and Haas, R. (1995) Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene* **165**: 17-24.
- 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., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2002) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14428-14433.
- Higashi, H., Nakaya, A., Tsutsumi, R., Yokoyama, K., Fujii, Y., Ishikawa, S., Higuchi, M., Takahashi, A., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Tanaka, S., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2004) *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* **279**: 17205-17216.
- Hoffmann, C. and Schmidt, G. (2004) CNF and DNT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 49-63.
- Horiguchi, Y., Inoue, N., Masuda, M., Kashimoto, T., Katahira, J., Sugimoto, N., and Matsuda, M. (1997) *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11623-11626.
- Howe, A. K., Hogan, B. P., and Juliano, R. L. (2002) Regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and interaction with Abl by protein kinase A and cell adhesion. *J Biol Chem* **277**: 38121-38126.
- Hubbard, S. R. (1999) Src autoinhibition: let us count the ways. *Nat Struct Biol* **6**: 711-714.
- Huelsenbeck, J., Dreger, S., Gerhard, R., Barth, H., Just, I., and Genth, H. (2007) Difference in the cytotoxic effects of toxin B from *Clostridium difficile* strain VPI 10463 and toxin B from variant *Clostridium difficile* strain 1470. *Infect Immun* **75**: 801-809.
- Hunter, T. (1987) A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell* **49**: 1-4.
- 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.

- Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. (2000) Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection. *Rev Immunogenet* **2**: 294-304.
- Izzard, C. S. and Lochner, L. R. (1976) Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci* **21**: 129-159.
- Izzard, C. S. and Lochner, L. R. (1980) Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. *J Cell Sci* **42**: 81-116.
- Jansson, A. L., Yasmin, L., Warne, P., Downward, J., Palmer, R. H., and Hallberg, B. (2006) Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is not able to induce apoptosis when cells express activated proteins, such as Ras or protein kinase B/Akt. *Cell Microbiol* **8**: 815-822.
- Josenhans, C. and Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605-614.
- Jungblut, P. R., Bumann, D., Haas, G., Zimny-Arndt, U., Holland, P., Lamer, S., Siejak, F., Aebischer, A., and Meyer, T. F. (2000) Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **36**: 710-725.
- Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M. R., Boquet, P., Hegenbarth, S., and Eichel-Streiber, C. (1994) Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* **269**: 10706-10712.
- Just, I. and Gerhard, R. (2004) Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 23-47.
- Kahn, R. A., Fu, H., and Roy, C. R. (2002) Cellular hijacking: a common strategy for microbial infection. *Trends Biochem Sci* **27**: 308-314.
- Kain, K. H. and Klemke, R. L. (2001) Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes. *J Biol Chem* **276**: 16185-16192.
- Kalman, D., Weiner, O. D., Goosney, D. L., Sedat, J. W., Finlay, B. B., Abo, A., and Bishop, J. M. (1999) Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol* **1**: 389-391.
- Kang, P. J., Hauser, A. R., Apodaca, G., Fleiszig, S. M., Wiener-Kronish, J., Mostov, K., and Engel, J. N. (1997) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. *Mol Microbiol* **24**: 1249-1262.
- Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B., and Galan, J. E. (1996) A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **21**: 633-641.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**: 301-310.
- Kather, H. and Aktories, K. (1983) [The cAMP system and bacterial toxins]. *Klin Wochenschr* **61**: 1109-1114.
- Kaufman, M. R., Jia, J., Zeng, L., Ha, U., Chow, M., and Jin, S. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of exoS. *Microbiology* **146** (Pt 10): 2531-2541.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O., and Small, J. V. (2002) Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 746-761.
- Kavermann, H., Burns, B. P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K., and Haas, R. (7-4-2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* **197**: 813-822.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., and Berche, P. (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**: 1709-1722.
- Keates, S., Hitti, Y. S., Upton, M., and Kelly, C. P. (1997) *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **113**: 1099-1109.

- Keates, S., Keates, A. C., Warny, M., Peek, R. M., Jr., Murray, P. G., and Kelly, C. P. (1999) Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- Helicobacter pylori. *J Immunol* **163**: 5552-5559.
- Keates, S., Sougioultzis, S., Keates, A. C., Zhao, D., Peek, R. M., Jr., Shaw, L. M., and Kelly, C. P. (2001) cag+ Helicobacter pylori induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Biol Chem* **276**: 48127-48134.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A., and Finlay, B. B. (1997) Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.
- Kenny, B. (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**: 1229-1241.
- Kerkela, R., Grazette, L., Yacobi, R., Iliescu, C., Patten, R., Beahm, C., Walters, B., Shevtsov, S., Pesant, S., Clubb, F. J., Rosenzweig, A., Salomon, R. N., Van Etten, R. A., Alroy, J., Durand, J. B., and Force, T. (2006) Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* **12**: 908-916.
- Kikuchi, S., Crabtree, J. E., Forman, D., and Kurosawa, M. (1999) Association between infections with CagA-positive or -negative strains of Helicobacter pylori and risk for gastric cancer in young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma Among Young Adults. *Am J Gastroenterol* **94**: 3455-3459.
- Kim, H., Lim, J. W., and Kim, K. H. (2001) Helicobacter pylori-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor-kappaB. *Scand J Gastroenterol* **36**: 706-716.
- Kim, J. G., Lee, S. J., and Kagnoff, M. F. (2004) Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* **72**: 1487-1495.
- Kim, S. Y., Lee, Y. C., Kim, H. K., and Blaser, M. J. (2006) Helicobacter pylori CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cell Microbiol* **8**: 97-106.
- Klinghoffer, R. A., Sachsenmaier, C., Cooper, J. A., and Soriano, P. (1999) Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J* **18**: 2459-2471.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992) L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521-531.
- Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**: 289-305.
- Kolch, W. (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 827-837.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K. J., and Barbieri, J. T. (2002) In vivo rho GTPase-activating protein activity of Pseudomonas aeruginosa cytotoxin ExoS. *Infect Immun* **70**: 360-367.
- Krause-Gruszczynska, M., Rohde, M., Hartig, R., Genth, H., Schmidt, G., Keo, T., Konig, W., Miller, W. G., Konkel, M. E., and Backert, S. (2007) Role of the small Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in host cell invasion of Campylobacter jejuni. *Cell Microbiol*.
- Krejs, G. J. (2000) [Helicobacter pylori and stomach cancer]. *Acta Med Austriaca* **27**: 129-130.
- Krienitz W. (1906) Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr* 1200-1201.
- Krueger, S., Hundertmark, T., Kuester, D., Kalinski, T., Peitz, U., and Roessner, A. (2007) Helicobacter pylori alters the distribution of ZO-1 and p120ctn in primary human gastric epithelial cells. *Pathol Res Pract* **203**: 433-444.
- Kuipers, E. J., Perez-Perez, G. I., Meuwissen, S. G., and Blaser, M. J. (1995) Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* **87**: 1777-1780.

- Kurreck, J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* **270**: 1628-1644.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H., and Kuipers, E. J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**: 449-490.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, Y. P., Yang, J. C., Lin, T. Z., Lin, J. T., and Wang, J. T. (2006) *Helicobacter pylori* infection and CagA protein translocation in human primary gastric epithelial cell culture. *Helicobacter* **11**: 451-459.
- Lara-Tejero, M. and Galan, J. E. (2004) A new twist in the hijacking of the actin-nucleating machinery. *Mol Cell* **15**: 495-497.
- Lee, A. (1998) Animal models for host-pathogen interaction studies. *Br Med Bull* **54**: 163-173.
- Lee, S. K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S. I., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2003) *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect* **5**: 1345-1356.
- Lewis, J. M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M. A., and Wang, J. Y. (1996) Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15174-15179.
- MacDonald, T. T. and Pettersson, S. (2000) Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Inflamm Bowel Dis* **6**: 116-122.
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K. E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B. B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L., and Boren, T. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578.
- Makrithatis, A., Rokita, E., Labigne, A., Willinger, B., Rotter, M. L., and Hirschl, A. M. (1998) Highly significant role of *Helicobacter pylori* urease in phagocytosis and production of oxygen metabolites by human granulocytes. *J Infect Dis* **177**: 803-806.
- Malaty, H. M., Evans, D. G., Evans, D. J., Jr., and Graham, D. Y. (1992) *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology* **103**: 813-816.
- Malaty, H. M., Engstrand, L., Pedersen, N. L., and Graham, D. Y. (1994) *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med* **120**: 982-986.
- 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.
- Malfertheiner, P. (1996) In *Helicobacter pylori: Von der Grundlage zur Therapie*. New York: Georg Thieme Verlag.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**: 459-465.
- Mandell, L., Moran, A. P., Cocchiarella, A., Houghton, J., Taylor, N., Fox, J. G., Wang, T. C., and Kurt-Jones, E. A. (2004) Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun* **72**: 6446-6454.
- 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.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y., and Horiguchi, Y. (2000) Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *EMBO J* **19**: 521-530.
- Masuda, M., Minami, M., Shime, H., Matsuzawa, T., and Horiguchi, Y. (2002) In vivo modifications of small GTPase Rac and Cdc42 by *Bordetella dermonecrotic* toxin. *Infect Immun* **70**: 998-1001.

- Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T., and Shibuya, M. (1992) Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Mol Cell Biol* **12**: 3482-3489.
- Mayer, B. J., Hamaguchi, M., and Hanafusa, H. (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* **332**: 272-275.
- McGee, D. J., Radcliff, F. J., Mendz, G. L., Ferrero, R. L., and Mobley, H. L. (1999) Helicobacter pylori rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J Bacteriol* **181**: 7314-7322.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D., and Koronakis, V. (2001) Cooperation between actin-binding proteins of invasive Salmonella: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J* **20**: 2131-2139.
- Medzhitov, Ruslan (2001) TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. *Nat Rev Immunol* **1**: 135-145.
- Megraud, F. (1989) [Bacteriologic methods for the diagnosis of Campylobacter pylori]. *Gastroenterol Clin Biol* **13**: 31B-36B.
- Megraud, F. (1993) Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Gastroenterol Clin North Am* **22**: 73-88.
- Megraud, F. (1995) Transmission of Helicobacter pylori: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**: 85-91.
- Mendez, G. L., Holmes, E. M., and Ferrero, R. L. (1998) In situ characterization of Helicobacter pylori arginase. *Biochim Biophys Acta* **1388**: 465-477.
- Meyer-ter-Vehn, T., Covacci, A., Kist, M., and Pahl, H. L. (2000) Helicobacter pylori activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem* **275**: 16064-16072.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* **17**: 6932-6941.
- 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.
- 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.
- Mitchell, H. and Megraud, F. (2002) Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* **7 Suppl 1**: 8-16.
- Mobley, H. (2001) Helicobacter pylori Urease. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington DC: ASM Press.
- Moder, KA., Layer, F., König, W., and König, B. (2007) Rapid screening of clarithromycin resistance in Helicobacter pylori by pyrosequencing. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 47371-47377.
- Moese, S., Selbach, M., Kwok, T., Brinkmann, V., König, W., Meyer, T. F., and Backert, S. (2004) Helicobacter pylori induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun* **72**: 3646-3649.
- Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., Karlas, A., Haimovich, B., Backert, S., and Meyer, T. F. (2007) The Helicobacter pylori CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cell Microbiol* **9**: 1148-1161.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C. (5-1-1998) Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA. *J Exp Med* **187**: 135-140.
- Monack, D. M., Meccas, J., Ghori, N., and Falkow, S. (1997) Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10385-10390.
- Monack, D. M., Mueller, A., and Falkow, S. (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* **2**: 747-765.

- Montecucco, C. and Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 457-466.
- Muenzner, P., Naumann, M., Meyer, T. F., and Gray-Owen, S. D. (2001) Pathogenic *Neisseria* trigger expression of their carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1; previously CD66a) receptor on primary endothelial cells by activating the immediate early response transcription factor, nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **276**: 24331-24340.
- Munter, S., Way, M., and Frischknecht, F. (2006) Signaling during pathogen infection. *Sci STKE* **2006**: re5.
- Muotiala, A., Helander, I. M., Pyhala, L., Kosunen, T. U., and Moran, A. P. (1992) Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* **60**: 1714-1716.
- Nagar, B., Bornmann, W. G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D. R., Miller, W. T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* **62**: 4236-4243.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2003) Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* **112**: 859-871.
- Nakayama, M., Kimura, M., Wada, A., Yahiro, K., Ogushi, K., Niidome, T., Fujikawa, A., Shirasaka, D., Aoyama, N., Kurazono, H., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T. (2004) *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J Biol Chem* **279**: 7024-7028.
- Naldini, L., Vigna, E., Ferracini, R., Longati, P., Gandino, L., Prat, M., and Comoglio, P. M. (1991) The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **11**: 1793-1803.
- Nassar, N., Cancelas, J., Zheng, J., Williams, D. A., and Zheng, Y. (2006) Structure-function based design of small molecule inhibitors targeting Rho family GTPases. *Curr Top Med Chem* **6**: 1109-1116.
- Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R., and Meyer, T. F. (1999) Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem* **274**: 31655-31662.
- Naumann, M. (2000) Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochem Pharmacol* **60**: 1109-1114.
- 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.
- Newsome, T. P., Weisswange, I., Frischknecht, F., and Way, M. (2006) Abl collaborates with Src family kinases to stimulate actin-based motility of vaccinia virus. *Cell Microbiol* **8**: 233-241.
- Nhieu, G. T., Enninga, J., Sansonetti, P., and Grompone, G. (2005) Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating *Shigella* invasion. *Curr Opin Microbiol* **8**: 16-20.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**: 1235-1244.
- Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P. H., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J. (1994) *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* **120**: 977-981.
- Nomura, A. M., Perez-Perez, G. I., Lee, J., Stemmermann, G., and Blaser, M. J. (2002) Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* **155**: 1054-1059.
- Nozawa, Y., Nishihara, K., Peek, R. M., Nakano, M., Uji, T., Ajioka, H., Matsuura, N., and Miyake, H. (2002) Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol* **64**: 21-30.
- O'Toole, P. W., Lane, M. C., and Porwollik, S. (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* **2**: 1207-1214.

- Odenbreit, S., Wieland, B., and Haas, R. (1996) Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol* **178**: 6960-6967.
- 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.
- Odenbreit, S., Kavermann, H., Puls, J., and Haas, R. (2002) CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from alpAB, HopZ and bab group outer membrane proteins. *Int J Med Microbiol* **292**: 257-266.
- Oh, J. D., Kling-Backhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R. S., Fulton, L. A., Cordum, H. S., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., Mardis, E. R., Engstrand, L. G., and Gordon, J. I. (2006) The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9999-10004.
- Ohya, K., Handa, Y., Ogawa, M., Suzuki, M., and Sasakawa, C. (2005) IpgB1 is a novel *Shigella* effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. *J Biol Chem* **280**: 24022-24034.
- Okada, S. and Pessin, J. E. (1996) Interactions between Src homology (SH) 2/SH3 adapter proteins and the guanylnucleotide exchange factor SOS are differentially regulated by insulin and epidermal growth factor. *J Biol Chem* **271**: 25533-25538.
- Olofsson, B. (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 545-554.
- Ottemann, K. M. and Lowenthal, A. C. (2002) *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* **70**: 1984-1990.
- Otto, H., Tezcan-Merdol, D., Girisch, R., Haag, F., Rhen, M., and Koch-Nolte, F. (2000) The spvB gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Mol Microbiol* **37**: 1106-1115.
- Pahl, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**: 6853-6866.
- Palmer, L. E., Hobbie, S., Galan, J. E., and Bliska, J. B. (1998) YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* **27**: 953-965.
- Palovuori, R., Perttu, A., Yan, Y., Karttunen, R., Eskelinen, S., and Karttunen, T. J. (2000) *Helicobacter pylori* induces formation of stress fibers and membrane ruffles in AGS cells by rac activation. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 247-253.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., and Sibley, R. K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* **325**: 1127-1131.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A. B., Warnke, R. A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J. H., and Friedman, G. D. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* **330**: 1267-1271.
- Parsonnet, J. (1995) The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**: 45-51.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N., and Vogelman, H. (1997) Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **40**: 297-301.
- Parsons, J. T., Martin, K. H., Slack, J. K., Taylor, J. M., and Weed, S. A. (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* **19**: 5606-5613.
- Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M. V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* **36**: 737-748.

- Pederson, K. J., Krall, R., Riese, M. J., and Barbieri, J. T. (2002) Intracellular localization modulates targeting of ExoS, a type III cytotoxin, to eukaryotic signalling proteins. *Mol Microbiol* **46**: 1381-1390.
- Peek, R. M., Jr., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Zhao, X., Atherton, J. C., and Blaser, M. J. (1995) Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* **73**: 760-770.
- Peek, R. M., Jr., Thompson, S. A., Donahue, J. P., Tham, K. T., Atherton, J. C., Blaser, M. J., and Miller, G. G. (1998) Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, iceA, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* **110**: 531-544.
- Peek, R. M., Jr. and Blaser, M. J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* **2**: 28-37.
- Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pelicci, P. G., and . (1995) The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* **10**: 1631-1638.
- Pendergast, A. M., Quilliam, L. A., Cripe, L. D., Bassing, C. H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K. M., Der, C. J., Schlessinger, J., and . (1993) BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* **75**: 175-185.
- Pendergast, A. M. (2002) The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* **85**: 51-100.
- Perez-Perez, G. I., Shepherd, V. L., Morrow, J. D., and Blaser, M. J. (1995) Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* **63**: 1183-1187.
- Phillips, N., Hayward, R. D., and Koronakis, V. (2004) Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat Cell Biol* **6**: 618-625.
- Philpott, D. J., Yamaoka, S., Israel, A., and Sansonetti, P. J. (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* **165**: 903-914.
- Pistor, S., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E., and Wehland, J. (1994) The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J* **13**: 758-763.
- Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K. A., Kazlauskas, A., and Pendergast, A. M. (1999) c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* **13**: 2400-2411.
- Plattner, R., Irvin, B. J., Guo, S., Blackburn, K., Kazlauskas, A., Abraham, R. T., York, J. D., and Pendergast, A. M. (2003) A new link between the c-Abl tyrosine kinase and phosphoinositide signalling through PLC-gamma1. *Nat Cell Biol* **5**: 309-319.
- Pluk, H., Dorey, K., and Superti-Furga, G. (2002) Autoinhibition of c-Abl. *Cell* **108**: 247-259.
- Pomorski, T., Meyer, T. F., and Naumann, M. (2001) *Helicobacter pylori*-induced prostaglandin E(2) synthesis involves activation of cytosolic phospholipase A(2) in epithelial cells. *J Biol Chem* **276**: 804-810.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla, Zonca P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P. M. (1994) A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* **77**: 261-271.
- Popoff, M. R. and Boquet, P. (1988) Clostridium spiroforme toxin is a binary toxin which ADP-ribosylates cellular actin. *Biochem Biophys Res Commun* **152**: 1361-1368.
- Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M., and Boquet, P. (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. *Infect Immun* **56**: 2299-2306.
- Poppe, M., Feller, S. M., Romer, G., and Wessler, S. (2007) Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* **26**: 3462-3472.

- Precht, M. and Kraft, R. (1992) *Bio - Statistik I*. München/ Wien: R. Oldenburger Verlag.
- Rad, R., Gerhard, M., Lang, R., Schoniger, M., Rosch, T., Schepp, W., Becker, I., Wagner, H., and Prinz, C. (2002) The Helicobacter pylori blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* **168**: 3033-3041.
- Ramarao, N., Gray-Owen, S. D., and Meyer, T. F. (2000) Helicobacter pylori induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol Microbiol* **38**: 103-113.
- Reeves, P. M., Bommarius, B., Lebeis, S., McNulty, S., Christensen, J., Swimm, A., Chahroudi, A., Chavan, R., Feinberg, M. B., Veach, D., Bornmann, W., Sherman, M., and Kalman, D. (2005) Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat Med* **11**: 731-739.
- Ren, R., Ye, Z. S., and Baltimore, D. (1994) Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev* **8**: 783-795.
- Renshaw, M. W., Lewis, J. M., and Schwartz, M. A. (2000) The c-Abl tyrosine kinase contributes to the transient activation of MAP kinase in cells plated on fibronectin. *Oncogene* **19**: 3216-3219.
- Reyes-Leon, A., Atherton, J. C., Argent, R. H., Puente, J. L., and Torres, J. (2007) Heterogeneity in the activity of Mexican Helicobacter pylori strains on gastric epithelial cells and its association with diversity in the cagA gene. *Infect Immun*.
- Rickes, S., Schultze, U., Monkemuller, K., and Malfertheiner, P. (2006) [Walter Krienitz--his life and intuitive description of bacteria in the stomach]. *Dtsch Med Wochenschr* **131**: 1341-1343.
- Ridley, A. J. (2001) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* **2**: 303-310.
- Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P., and Antonny, B. (2003) Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem* **278**: 4756-4762.
- Rocha, C. L., Rucks, E. A., Vincent, D. M., and Olson, J. C. (2005) Examination of the coordinate effects of Pseudomonas aeruginosa ExoS on Rac1. *Infect Immun* **73**: 5458-5467.
- Rodrigues, G. A. and Park, M. (1994) Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **9**: 2019-2027.
- Rosen, M. K., Yamazaki, T., Gish, G. D., Kay, C. M., Pawson, T., and Kay, L. E. (1995) Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein. *Nature* **374**: 477-479.
- Rosenberger, C. M., Scott, M. G., Gold, M. R., Hancock, R. E., and Finlay, B. B. (2000) Salmonella typhimurium infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J Immunol* **164**: 5894-5904.
- Rothenbacher, D., Blaser, M. J., Bode, G., and Brenner, H. (2000) Inverse relationship between gastric colonization of Helicobacter pylori and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study. *J Infect Dis* **182**: 1446-1449.
- Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Kohler, S., Heesemann, J., and Rouot, B. (1998) Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* **187**: 1069-1079.
- Rucks, E. A., Fraylick, J. E., Brandt, L. M., Vincent, T. S., and Olson, J. C. (2003) Cell line differences in bacterially translocated ExoS ADP-ribosyltransferase substrate specificity. *Microbiology* **149**: 319-331.
- Rugge, M., Busatto, G., Cassaro, M., Shiao, Y. H., Russo, V., Leandro, G., Avellini, C., Fabiano, A., Sidoni, A., and Covacci, A. (1999) Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: Helicobacter pylori genotype and associated gastritis phenotype. *Cancer* **85**: 2506-2511.
- Sakkab, D., Lewitzky, M., Posern, G., Schaeper, U., Sachs, M., Birchmeier, W., and Feller, S. M. (2000) Signaling of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) to the small GTPase Rap1 via the large docking protein Gab1 and the adapter protein CRKL. *J Biol Chem* **275**: 10772-10778.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Laboratory Press.
- Satin, B., Del Giudice G., Della Bianca, V., Dusi, S., Laudanna, C., Tonello, F., Kelleher, D., Rappuoli, R., Montecucco, C., and Rossi, F. (2000) The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* **191**: 1467-1476.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R. M., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**: 2959-2969.
- Schering, B., Barmann, M., Chhatwal, G. S., Geipel, U., and Aktories, K. (1988) ADP-ribosylation of skeletal muscle and non-muscle actin by *Clostridium perfringens* iota toxin. *Eur J Biochem* **171**: 225-229.
- Schesser, K., Spiik, A. K., Dukuzumuremyi, J. M., Neurath, M. F., Pettersson, S., and Wolf-Watz, H. (1998) The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* **28**: 1067-1079.
- Schlessinger, J. and Lemmon, M. A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* **2003**: RE12.
- Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K. (1997) Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* **387**: 725-729.
- Schmidt, G. and Aktories, K. (1998) Bacterial cytotoxins target Rho GTPases. *Naturwissenschaften* **85**: 253-261.
- 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., Nguyen, T. H., Stuben, M., and Scheid, P. (2000) Demonstration of a pH gradient in the gastric gland of the acid-secreting guinea pig mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G597-G604.
- 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.
- Schreiber, S., Buckner, R., Groll, C., Azevedo-Vethacke, M., Garten, D., Scheid, P., Friedrich, S., Gattermann, S., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2005) Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect Immun* **73**: 1584-1589.
- Scott, D. R., Marcus, E. A., Weeks, D. L., and Sachs, G. (2002) Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **123**: 187-195.
- Segal, E. D., Shon, J., and Tompkins, L. S. (1992) Characterization of *Helicobacter pylori* urease mutants. *Infect Immun* **60**: 1883-1889.
- 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.
- Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F., and Backert, S. (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **277**: 6775-6778.
- Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C. R., Meyer, T. F., and Backert, S. (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* **22**: 515-528.
- Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P. R., and Meyer, T. F. (2004) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics* **4**: 2961-2968.
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W., and Dixon, J. E. (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575-588.

- 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.
- 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.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., and Holden, D. W. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2593-2597.
- Shi, Z. Q., Lu, W., and Feng, G. S. (1998) The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **273**: 4904-4908.
- Shimoyama, T., Everett, S. M., Dixon, M. F., Axon, A. T., and Crabtree, J. E. (1998) Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis. *J Clin Pathol* **51**: 765-770.
- Sionov, R. V., Moallem, E., Berger, M., Kazaz, A., Gerlitz, O., Ben Neriah, Y., Oren, M., and Haupt, Y. (1999) c-Abl neutralizes the inhibitory effect of Mdm2 on p53. *J Biol Chem* **274**: 8371-8374.
- Sionov, R. V., Coen, S., Goldberg, Z., Berger, M., Bercovich, B., Ben Neriah, Y., Ciechanover, A., and Haupt, Y. (2001) c-Abl regulates p53 levels under normal and stress conditions by preventing its nuclear export and ubiquitination. *Mol Cell Biol* **21**: 5869-5878.
- Small, J. V. (1988) The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev* **1**: 155-174.
- Small, J. V., Rottner, K., and Kaverina, I. (1999) Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 54-60.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* **12**: 112-120.
- Small, J. V. and Resch, G. P. (2005) The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 517-523.
- Smith, J. M., Katz, S., and Mayer, B. J. (1999) Activation of the Abl tyrosine kinase in vivo by Src homology 3 domains from the Src homology 2/Src homology 3 adaptor Nck. *J Biol Chem* **274**: 27956-27962.
- Smith, J. M. and Mayer, B. J. (2002) Abl: mechanisms of regulation and activation. *Front Biosci* **7**: d31-d42.
- Smoot, D. T., Resau, J. H., Naab, T., Desbordes, B. C., Gilliam, T., Bull-Henry, K., Curry, S. B., Nidiry, J., Sewchand, J., Mills-Robertson, K., and . (1993) Adherence of *Helicobacter pylori* to cultured human gastric epithelial cells. *Infect Immun* **61**: 350-355.
- Solnick, J. V., Chang, K., Canfield, D. R., and Parsonnet, J. (2003) Natural acquisition of *Helicobacter pylori* infection in newborn rhesus macaques. *J Clin Microbiol* **41**: 5511-5516.
- Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E., and Kist, M. (1993) Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun* **61**: 5315-5325.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W. J., and Covacci, A. (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* **43**: 971-980.
- Stingl, K., Altendorf, K., and Bakker, E. P. (2002) Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol* **10**: 70-74.
- Stradal, T., Courtney, K. D., Rottner, K., Hahne, P., Small, J. V., and Pendergast, A. M. (2001) The Abl interactor proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia. *Curr Biol* **11**: 891-895.

- Stuart, J. R., Gonzalez, F. H., Kawai, H., and Yuan, Z. M. (2006) c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J Biol Chem* **281**: 31290-31297.
- Suerbaum, S., Josenhans, C., and Labigne, A. (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* **175**: 3278-3288.
- Suerbaum, S. (1995) The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol* **3**: 168-170.
- Suerbaum, S. and Michetti, P. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**: 1175-1186.
- Suerbaum, S. and Josenhans, C. (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* **5**: 441-452.
- Sun, J. and Barbieri, J. T. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* **278**: 32794-32800.
- Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T., and Sasakawa, C. (2005) Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J Exp Med* **202**: 1235-1247.
- Suzuki, T., Miki, H., Takenawa, T., and Sasakawa, C. (1998) Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*. *EMBO J* **17**: 2767-2776.
- Svitkina, T. M. and Borisy, G. G. (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* **145**: 1009-1026.
- Swimm, A., Bommarius, B., Li, Y., Cheng, D., Reeves, P., Sherman, M., Veach, D., Bornmann, W., and Kalman, D. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Mol Biol Cell* **15**: 3520-3529.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**: 153-208.
- Takenawa, T. and Miki, H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* **114**: 1801-1809.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2001) Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* **1**: 625-635.
- Tammer, I., Brandt, S., Hartig, R., Konig, W., and Backert, S. (2007) Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* **132**: 1309-1319.
- Tani, K., Sato, S., Sukezane, T., Kojima, H., Hirose, H., Hanafusa, H., and Shishido, T. (2003) Abl interactor 1 promotes tyrosine 296 phosphorylation of mammalian enabled (Mena) by c-Abl kinase. *J Biol Chem* **278**: 21685-21692.
- Tanis, K. Q., Veach, D., Duewel, H. S., Bornmann, W. G., and Koleske, A. J. (2003) Two distinct phosphorylation pathways have additive effects on Abl family kinase activation. *Mol Cell Biol* **23**: 3884-3896.
- Telford, J. L., Covacci, A., Rappuoli, R., and Chiara, P. (1997) Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Immunol* **9**: 498-503.
- 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., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., and Venter, J. C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.

- Traxler, P., Bold, G., Buchdunger, E., Caravatti, G., Furet, P., Manley, P., O'Reilly, T., Wood, J., and Zimmermann, J. (2001) Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials. *Med Res Rev* **21**: 499-512.
- 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.
- Tummuru, M. K., Cover, T. L., and Blaser, M. J. (1993) Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* **61**: 1799-1809.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**: 2295-2322.
- van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Sanna, R., Pena, S., Midolo, P., Ng, E. K., Atherton, J. C., Blaser, M. J., and Quint, W. G. (1998) Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J Clin Microbiol* **36**: 2597-2603.
- van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Waidner, B., Davies, B. J., de Vries N., Penn, C. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Kist, M., Bereswill, S., and Kusters, J. G. (2001) Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect Immun* **69**: 4891-4897.
- 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., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J., and Ferrero, R. L. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**: 1166-1174.
- Vicari, J. J., Peek, R. M., Falk, G. W., Goldblum, J. R., Easley, K. A., Schnell, J., Perez-Perez, G. I., Halter, S. A., Rice, T. W., Blaser, M. J., and Richter, J. E. (1998) The seroprevalence of cagA-positive *Helicobacter pylori* strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* **115**: 50-57.
- Wagner, S., Beil, W., Mai, U. E., Bokemeyer, C., Meyer, H. J., and Manns, M. P. (1994) Interaction between *Helicobacter pylori* and human gastric epithelial cells in culture: effect of antiulcer drugs. *Pharmacology* **49**: 226-237.
- Wang, J. Y. (2000) Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* **19**: 5643-5650.
- Warren, J. R. (1984) Spiral bacteria of the gastric antrum. *Med J Aust* **141**: 477-478.
- Weidner, K. M., Sachs, M., Riethmacher, D., and Birchmeier, W. (1995) Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2597-2601.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**: 105-108.
- Wennerberg, K. and Der, C. J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**: 1301-1312.
- Williams, C. L., Preston, T., Hossack, M., Slater, C., and McColl, K. E. (1996) *Helicobacter pylori* utilizes urea for amino acid synthesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **13**: 87-94.
- Wirth, H. P., Beins, M. H., Yang, M., Tham, K. T., and Blaser, M. J. (1998) Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* **66**: 4856-4866.
- Wolle, K., Leodolter, A., and Malfirtheiner, P. (2002) [Epidemiology and pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection]. *Wien Med Wochenschr* **152**: 117-122.
- Wood, W. and Martin, P. (2002) Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 726-730.
- Woodring, P. J., Hunter, T., and Wang, J. Y. (2003) Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J Cell Sci* **116**: 2613-2626.

- Woodring, P. J., Meisenhelder, J., Johnson, S. A., Zhou, G. L., Field, J., Shah, K., Bladt, F., Pawson, T., Niki, M., Pandolfi, P. P., Wang, J. Y., and Hunter, T. (2004) c-Abl phosphorylates Dok1 to promote filopodia during cell spreading. *J Cell Biol* **165**: 493-503.
- Wotherspoon, A. C., Doglioni, C., Diss, T. C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M., and Isaacson, P. G. (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **342**: 575-577.
- Wotherspoon, A. C. (1998) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *Br Med Bull* **54**: 79-85.
- Wurtele, M., Wolf, E., Pederson, K. J., Buchwald, G., Ahmadian, M. R., Barbieri, J. T., and Wittinghofer, A. (2001) How the *Pseudomonas aeruginosa* ExoS toxin downregulates Rac. *Nat Struct Biol* **8**: 23-26.
- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1995) Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* **63**: 94-98.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T., and Frank, D. W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13899-13904.
- Yamaoka, Y., Kwon, D. H., and Graham, D. Y. (2000) A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7533-7538.
- Yamaoka, Y., Kikuchi, S., el Zimaity, H. M., Gutierrez, O., Osato, M. S., and Graham, D. Y. (2002) Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* **123**: 414-424.
- Yamaoka, Y., Kudo, T., Lu, H., Casola, A., Brasier, A. R., and Graham, D. Y. (2004) Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* **126**: 1030-1043.
- Yamaoka, Y., Yamauchi, K., Ota, H., Sugiyama, A., Ishizone, S., Graham, D. Y., Maruta, F., Murakami, M., and Katsuyama, T. (2005) Natural history of gastric mucosal cytokine expression in *Helicobacter pylori* gastritis in Mongolian gerbils. *Infect Immun* **73**: 2205-2212.
- Yamazaki, S., Yamakawa, A., Ito, Y., Ohtani, M., Higashi, H., Hatakeyama, M., and Azuma, T. (2003) The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J Infect Dis* **187**: 334-337.
- Yuan, Z. M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y. Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1999) p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* **399**: 814-817.
- Zhang, G. and Ghosh, S. (2001) Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* **107**: 13-19.
- Zhou, D., Mooseker, M. S., and Galan, J. E. (1999) Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**: 2092-2095.

8 ANHANG

Tab. 8.1: **Zusammenfassende Darstellung und Charakterisierung von bakteriellen Toxinen und Effektorproteinen die Aktin-zytoskelettale Veränderungen in Wirtszellen hervorrufen.**

| Toxin/ Effektorprotein (Pathogen) | Mechanismus | Referenzen |
|--|---|---|
| <u>Effektorproteine, die die Aktin-Polymerisierung modifizieren</u> | | |
| Tir (EPEC) | Aktivierung des Arp2/3-Komplexes | Kalman <i>et al.</i> , 1999 |
| ActA (<i>Listeria</i> spp.) | Aktivierung des Arp2/3-Komplexes | Kocks <i>et al.</i> , 1992 Pistor <i>et al.</i> , 1994 Welch <i>et al.</i> , 1998 |
| RickA (<i>Rickettsia conorii</i>) | Aktivierung des Arp2/3-Komplexes | Gouin <i>et al.</i> , 2004 |
| SipA (<i>Salmonella</i> spp.) | Bündelung von Aktin-Filamenten, Verhinderung der Aktin Depolymerisierung | Zhou <i>et al.</i> , 1999 |
| SipC (<i>Salmonella</i> spp.) | Aktinpolymerisierung und Bündelung | Hayward und Koronakis, 1999 McGhie <i>et al.</i> , 2001 |
| IcsA (<i>Shigella flexneri</i>) | N-WASP Bindung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes | Suzuki <i>et al.</i> , 1998 |
| A36R (<i>Vaccinia virus</i>) | Aktivierung des Arp2/3 Komplexes nach Nck- und N-WASP-Bindung | Cudmore <i>et al.</i> , 1995 Frischknecht und Way, 2001 |
| <u>Aktin ADP-ribosylierende Toxine</u> | | |
| C2 Toxin (<i>Clostridium botulinum</i>) | ADP-Ribosylierung von Aktin (Arg ₁₇₇) | Aktorics <i>et al.</i> , 1986 |
| Iota Toxin (<i>Clostridium perfringens</i>) | ADP-Ribosylierung von Aktin (Arg ₁₇₇) | Schering <i>et al.</i> , 1988 |
| Spiroform Toxin (<i>Clostridium spiroforme</i>) | ADP-Ribosylierung von Aktin (Arg ₁₇₇) | Popoff und Boquet, 1988 |
| VIP Toxin (<i>Bacillus cereus</i>) | ADP-Ribosylierung von Aktin (Arg ₁₇₇) | Han <i>et al.</i> , 1999 |
| CDT Toxin (<i>Clostridium difficile</i>) | ADP-Ribosylierung von Aktin (Arg ₁₇₇) | Popoff <i>et al.</i> , 1988 |
| SpvB (<i>Salmonella</i> spp.) | ADP-Ribosylierung von Aktin (Arg ₁₇₇) | Otto <i>et al.</i> , 2000 |

Toxine die die Aktivität Rho-GTPasen modifizieren

| | | |
|---|---|--|
| SopE, SopE2 (<i>Salmonella</i> spp.) | GEF-Aktivität | Hardt <i>et al.</i> , 1998 |
| SptP (<i>Salmonella</i> spp.) | GAP-Aktivität | Kaniga <i>et al.</i> , 1996 |
| ExoS/ ExoT <i>P. aeruginosa</i>) | GAP Aktivität und ADP-Ribosylierung | Henriksson <i>et al.</i> , 2002 Barbierie und Sun, 2004 |
| YopE (<i>Yersinia</i> spp.) | GAP-Aktivität | Pawel-Rammingen <i>et al.</i> , 2000 |
| CNF1/2 (<i>E. coli</i>) | Deaminierung von Rho-GTPasen | Schmidt <i>et al.</i> , 1997 |
| CNFY (<i>Y. pseudotuberculosis</i>) | Deaminierung von Rho-GTPasen | Flatau <i>et al.</i> , 1997 |
| DNT (<i>Bordetella</i> spp.) | Transglutaminierung von Rho-GTPasen | Horiguchi <i>et al.</i> , 1997 |
| C3 Exotoxine (<i>Clostridium</i> spp., <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i>) | ADP-Ribosylierung | Aktories und Hall, 1989 Aktories <i>et al.</i> , 2004 |
| Toxin A/B (<i>Clostridium</i> spp.) | Glykolyisierung von Rho-GTPasen | Just <i>et al.</i> , 1994 Genth <i>et al.</i> , 1996 |
| <u>Toxine die als Proteasen wirken</u> | | |
| YopT (<i>Yersinia enterocolitica</i>) | schneiden des C-terminalen isoprenylierten Cysteins | Shao <i>et al.</i> , 2002 |

Tab. 8.2: Zusammenfassende Darstellung der Ko-Infektionen von *H. pylori* mit anderen Pathogenen.

| <i>H. pylori</i> (MOI=100) ko-infiziert mit | | | Phänotyp ^a | | |
|---|-------------------|---------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| Pathogen | Samml-bezeichnung | Getestete MOI | CagA-Phosphorylierung | Elongations-phänotyp | Inhibierende MOI |
| I | | | | | |
| <i>EPEC</i> | E2348/96 | 5-100 | +++ | - | 40 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | ATCC9610 | 1-50 | +++ | - | 5 |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | YP3 | 1-50 | +++ | - | 10 |
| <i>Vibrio cholerae</i> | TCB5 | 5-20 | ++ | - | 5 |
| <i>Clostridium difficile</i> | ATCC13124 | 5-40 | ++ | + | 10 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | NCTC10662 | 1-100 | +++ | - | 40 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | ATCC25285 | 5-40 | + | - | 40 |
| <i>Shigella sonnei</i> | ATTC25931 | 20-200 | +++ | + | 40 |
| II | | | | | |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ^b | 1543-01 | 5-200 | +++ | + | 200 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ^b | 81-176 | 5-200 | +++ | + | 200 |
| <i>Campylobacter fetus</i> ^b | 97-3574 | 5-200 | +++ | + | 200 |
| <i>EHEC</i> ^c | NCTC12900 | 5-160 | +++ | ++ | 80 |
| <i>Salmonella enterica</i> | SL3261 | 10-160 | ++ | + | 80 |
| <i>Shigella flexneri</i> | SF01 | 10-200 | +++ | ++ | 160 |
| III | | | | | |
| <i>Bordetella pertussis</i> | ATCC9797 | 1-20 | +++ | +++ | - |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | ATCC15311 | 10-100 | +++ | +++ | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | EGD-e | 10-50 | +++ | +++ | - |
| IV | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | HB101 | 5-100 | +++ | +++ | - |
| <i>Escherichia coli</i> ^d | UR4176 | 5-100 | +++ | +++ | - |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | N505 | 5-100 | +++ | +++ | - |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ^e | ST3046 | 5-200 | +++ | +++ | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | MRSA01 | 5-100 | +++ | +++ | - |

a Phänotypanalyse 4 h nach Infektion; I vollständige Inhibition des *H. pylori*-induzierten Phänotyp (- 10-15 % Phänotyp); II moderate Blockierung des *H. pylori*-induzierten Phänotyps (+ 15-40 % Phänotyp; ++ 40-50 % Phänotyp); III verstärkender Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp (++++ mehr als 80 % Phänotyp); IV kein Einfluss auf den *H. pylori*-induzierten Phänotyp (+++ 60-80 % Phänotyp); Westernblot-Analyse der CagA-Phosphorylierung unter Verwendung des α -PY99 Antikörpers (+++ starke- bzw. ++ schwächere- bzw. + schwache-CagA-Phosphorylierung)

b CDT-positiv; **c** Shigatoxin-1- und -2-positiv; **d** Hämolyse-positiv; **e** CDT-negativ

DANKSAGUNG

Zunächst möchte Ich mich bei dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang König für die sehr guten Arbeitsbedingungen sowie für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen zu präsentieren ganz herzlich bedanken.

Mein größter Dank gilt Herrn PD Dr. Steffen Backert für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute fachliche Betreuung, die immer offene Tür sowie für die Korrektur der Arbeit. Neben den stets regen Diskussionen über die Ergebnisse war auch der Fußball bei uns beiden ein beliebtes Thema, obwohl wir dabei nur bei den Farben (blau/weiß) einer Meinung waren. Danke für die sehr gute Betreuung!

Ich möchte auch dem gesamten Institut der Medizinischen Mikrobiologie für die stets freundliche Unterstützung danken. Dabei sind besonders unsere beiden TA's Diana Schmidt und Dana Zabler für die stetige Hilfsbereitschaft im Laboralltag und für den Spaß am Rande hervorzuheben. In dieser Aufzählung darf aber auch unser Herr Kraska nicht fehlen, der es nicht immer leicht mit unseren Computerwünschen und der schnellen Reparatur unserer defekten Geräte hatte.

Besonders möchte ich mich bei Franziska Layer bedanken, die immer ein offenes Ohr und eine volle Kaffeetasse für mich hatte. Nicht selten haben wir unsere Diskussionen in der Kneipe fortgesetzt, wo diese dann nicht mehr ganz so fachlich endeten. An dieser Stelle möchte ich mich aber auch bei Ruth Wittelsberger, Gosia Krause-Gruszczynska, Nicole Tegtmeyer, Dr. Steffi Gieseler und Anita Marquardt bedanken.

Herrn Dr. Roland Hartig möchte Ich für die enthusiastische aber auch kritische Einführung in die Welt der modernen Mikroskopie danken.

Ich danke allen unseren Kooperationspartnern für die zur Verfügung gestellten Bakterienstämme, Konstrukte, Antikörper und Zelllinien.

Für das kritische Lesen meiner Arbeit möchte ich mich bei Dr. med. Hans Lauf, Dr. Ullrich Arnold und Dr. Katrin Drögemüller bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt natürlich meinem Freund Andreas, der so manchen Abend oder manches Wochenende auf mich verzichten musste und mir mit Lösungen bei Computerproblemen unterstützend zur Seite stand. Danke!

Zu guter letzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern, meinem Bruder sowie allen Freunden bedanken, die ich hier nicht alle bei Namen nennen kann. Jeder hat ein Stück zu dieser Arbeit beigetragen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Sabine Brandt
Geburtsdatum: 27.09.1979
Geburtsort: Bernburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Weitlingstrasse 5, 39104 Magdeburg

Schulische Ausbildung

09.1986 bis 07.1991: Oberschule Ilberstedt
09.1992 bis 07.1998: Friedericken Gymnasium Bernburg
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10.1998 bis 09.2003 Diplom-Biochemie Studium an der Universität Potsdam
01.2003 bis 06.2003 MPI für molekulare Pflanzenphysiologie Golm
Diplomarbeit: *Funktionelle Charakterisierung des Proteins MLO3 aus der Spaltheife Schizosaccharomyces pombe*
Abschluss: Diplom-Biochemikerin

Berufserfahrung

09.2000 Technische Universität Stettin/ Polen
Praktikantin
Isolation und Identifikation von Lipiden aus Naturstoffen

03.2002 bis 04.2002 Universität Neuchatel/ Schweiz
Praktikantin
Untersuchung der Interaktionen von TWD1 und AtMRP1

11.2000 bis 12.2002 MPI für molekulare Pflanzenphysiologie Golm
Studentische Hilfskraft

seit 10.2003 Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Promotionsarbeit: *Untersuchungen zu CagA-induzierten Signalkaskaden während der Infektion mit H. pylori*

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema: „Untersuchungen zu CagA-induzierten Signalkaskaden während der Infektion mit *Helicobacter pylori*“ selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalim (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 28.08.2007