

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl Bakteriologie

Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

**Typ IV-abhängige Translokation des CagA-Proteins von
Helicobacter pylori in Magenepithelzellen**

DISSERTATION
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Sabine Hohlfeld
aus Freiburg

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Haas

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schleicher

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. D. Rapaport

Prof. Dr. G. Enders

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Haas und PD Dr. W. Fischer im Zeitraum Dezember 2001 bis Oktober 2003 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Hohlfeld S., Pattis I., Püls J., Plano G.V., Haas R., Fischer W. (2006)

A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol* **59**, 1624-37.

Wolfgang Fischer, Sabine Hohlfeld and Rainer Haas (2002)

Using gene fusions and deletion mutants to define a translocation signal on the *Helicobacter pylori* CagA protein. (5th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* infections in Helsingor, Denmark)

Sabine Hohlfeld, Rainer Haas, Wolfgang Fischer (2004)

The *Helicobacter pylori* CagA protein requires both N-terminal and C-terminal signals for type IV secretion. (56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. in Münster, ausgezeichnet mit dem Posterpreis)

für meine Freunde und Familie

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
aa	Aminosäure
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AGS	<i>gastric adenocarcinoma</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AP1	<i>activator protein 1</i>
<i>aphA-3</i>	Kanamycinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>B. henselae</i>	<i>Bartonella henselae</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
bp	Basenpaare
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. suis</i>	<i>Brucella suis</i>
cagA	Cytotoxin-assoziiertes Gen A
CagA ^{P-Tyr}	Tyrosinphosphoryliertes CagA
Cam	Chloramphenicol
<i>cat</i>	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>cat</i> _{GC}	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase mit <i>opa</i> -Promotor aus Gonokokken und fd-Terminator
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
COX	Cyclooxygenase
DAP	Diaminopimelinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreit
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENA-78	<i>epithelial neutrophil-activating peptide 78</i>

ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-binding protein 2</i>
GSP	<i>general secretory pathway</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HP-NAP	<i>H. pylori neutrophil activating protein</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Ig der Klasse G
IL	Interleukin
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MEK	<i>MAP kinase kinase</i>
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(1-Morpholino)-propansulfonsäure
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NBT	Nitrotetrazoliumblaulchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NLS	Kernlokalisationssequenz
nt	Nucleotid(e)
NTA	Nickel-Nitritotriessigsäure
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x
OMP	Familie der <i>outer membrane proteins</i>
<i>ori</i> _{ColE1}	Replikationsursprung des ColE1-Plasmids
orf	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	<i>pathogenicity island</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>P</i> _{<i>flaA</i>}	Promotor des <i>flaA</i> Gens von <i>H. pylori</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Meerrettichperoxidase

P-Tyr	Phosphotyrosin
x ^R	x-resistent
<i>R. prowazekii</i>	<i>Rickettsia prowazekii</i>
Rif	Rifampicin
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src Homologieregion 2
SHP-2	Tyrosinphosphatase mit SH2-Domäne
spp.	<i>species</i>
SSM	<i>slipped strand mispairing</i>
STM	<i>signature tag mutagenesis</i>
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TER	Transepithelialer Widerstand
Tet	Tetracyclin
Tn	Transposon
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-isothiocyanat
UV	ultraviolett
VacA	Vacuolating cytotoxin A
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Bedeutung der Infektionskrankheiten	1
2	Allgemeines zu <i>Helicobacter pylori</i>	1
3	Epidemiologie, Diagnostik und Therapie	4
4	Pathogenese und Immunantwort des Wirts	5
5	Virulenzfaktoren	9
6	Die <i>cag</i>-Pathogenitätsinsel und das cytotoxin-assoziierte Gen <i>cagA</i>	12
7	Typ IV-Proteinsekretionssysteme	16
8	Zielsetzung	18
II	Material und Methoden	20
1	Material	20
1.1	Bakterienstämme	20
1.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	20
1.1.2	<i>Helicobacter pylori</i> -Stämme	20
1.2	Zelllinie	20
1.3	Plasmide	21
1.4	Oligonukleotide	22
1.5	Antikörper	23
1.5.1	primäre Antikörper.....	23
1.5.2	sekundäre Antikörper	23
1.6	Enzyme und Proteine	24
1.7	Molekulargewichtsmarker	24
1.8	Nährmedien und Platten	24
1.9	Antibiotika und Zusätze.....	25
1.10	Puffer und Lösungen	25

1.11	Chemikalien	29
1.12	Geräte und Apparaturen	30
2	Methoden	31
2.1	Arbeiten mit Bakterien.....	31
2.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	31
2.1.2	Bestimmung der optischen Dichte von Flüssigkulturen.....	31
2.1.3	Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.1.3.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode	32
2.1.3.2	Chemische Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode	32
2.1.3.3	Herstellung elektrokompeter <i>E.coli</i> -Zellen	32
2.1.3.4	Elektroporation von <i>E.coli</i> -Zellen.....	33
2.1.3.5	Transformation von superkompetenten <i>E.coli</i> TOP10-Zellen	33
2.1.4	Transformation von <i>H. pylori</i>	33
2.1.4.1	Transformation von <i>H. pylori</i> (nach Haas et al., 1993).....	33
2.1.4.2	Transformation nach <i>in vitro</i> -Methylierung (nach Donahue et al., 2000).....	34
2.1.4.3	Transformation durch Elektroporation (nach Segal und Tompkins, 1993).....	35
2.1.5	Konjugation von <i>H. pylori</i> (nach Heuermann und Haas, 1998)	35
2.2	Arbeiten mit Zellkulturen	36
2.2.1	Kultivierung von AGS-Zellen.....	36
2.2.2	Infektionsexperimente mit <i>H. pylori</i>	36
2.2.2.1	Infektion für Phosphotyrosin-Assay	37
2.2.2.2	Infektion für Immunfluoreszenz-Mikroskopie	37
2.3	Arbeiten mit DNA.....	37
2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	37
2.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach der Koch-Methode (Holmes and Quigley, 1981)	37
2.3.1.2	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit dem „Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN)	38

2.3.1.3	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit dem „QIAprep Spin Miniprep“ (QIAGEN)	38
2.3.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>H. pylori</i>	38
2.3.3	Präparation von chromosomaler DNA aus <i>H. pylori</i>	39
2.3.4	DNA-Gelelektrophorese	39
2.3.5	DNA-Fragmentisolierung.....	39
2.3.6	Restriktion	40
2.3.6.1	Restriktion mit dem Erase-a-Base™-System (Promega)	40
2.3.7	Dephosphorylierung linearer DNA.....	41
2.3.8	Zentrifugationsentsalzung	41
2.3.9	Ligation	42
2.3.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.3.10.1	PCR mit dem ExSite™ Mutagenesis Kit (Stratagene)	43
2.3.11	Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning™ (Invitrogen)	43
2.3.12	DNA-Fällung mit Ethanol.....	44
2.3.13	DNA-Sequenzierung.....	44
2.4	Arbeiten mit Protein	45
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford ,1976)	45
2.4.2	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	45
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.4.3.1	Probenvorbereitung	46
2.4.3.2	Durchführung der Gelelektrophorese	46
2.4.4	Western Blot.....	47
2.4.4.1	Allgemeiner Western Blot-Assay.....	47
2.4.4.2	Phosphotyrosin-Assay	48
2.5	<i>in vitro</i> -Phosphorylierung (verändert nach Asahi et al., 2000)	49
2.6	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	49
2.6.1	Immunfluoreszenz mit ganzen Bakterien	49
2.6.2	Doppelimmunfluoreszenz zum Nachweis von Proteinen im AGS-Zellplasma	50

III	Ergebnisse	51
1	Translokation eines Typ IV-unabhängigen Proteins mittels <i>cagA</i>	51
1.1	Herstellung N-terminaler und C-terminaler Fusionen des CagA-Proteins mit GFP.....	51
1.2	Fusionen mit der Cre-Rekombinase	55
1.3	Fusionen mit dem M45- <i>Tag</i>	57
2	Lokalisation des Translokationssignals	59
2.1	<i>in-vitro</i> -Phosphorylierung	60
2.2	C-terminale Deletionen	61
2.2.1	Zufällige Deletionen durch Exonuclease III-Verdau.....	61
2.2.2	Definierte Deletionen durch PCR	62
2.3	N-terminale Deletionen	65
3	Charakterisierung der C-terminalen Signalsequenz	67
3.1	Sequenzvergleich verschiedener Typ IV-sezernierter Proteine	67
3.2	Austausch der C-terminalen Aminosäuren von CagA gegen die von MobA	68
3.3	Einfluss des KXXXXK-Motivs auf die Sekretierbarkeit.....	70
IV	Diskussion	71
1	Vergleich von bakteriellen Sekretionssystemen	71
2	Das Typ IV-Sekretionssignal	73
3	Die mögliche Rolle von <i>Chaperonen</i> bei der Typ IV-Sekretion	77
4	Translokationsmechanismus	79
V	Zusammenfassung	85
VI	Literaturverzeichnis	87

I Einleitung

1 Bedeutung der Infektionskrankheiten

Seuchen und Epidemien haben die Menschen schon seit jeher heimgesucht. Sie wurden meist als natürlich hingenommen oder auf die Einwirkung höherer Mächte, wie Götter oder Dämonen, zurückgeführt. Die Existenz lebender Ansteckungsstoffe wurde bereits im 16. Jahrhundert postuliert, die Geschichte der Mikrobiologie im eigentlichen Sinne beginnt jedoch erst mit der Entwicklung des Mikroskops durch Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723). In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts konnte der französische Chemiker Louis Pasteur zeigen, dass gewisse Krankheiten durch Bakterien hervorgerufen werden. Später begann er die Herstellung von Impfstoffen mit Hilfe abgeschwächter Krankheitskeime. Mit der Entwicklung des Henle-Koch-Postulats wurde die Kausalität zwischen Mikroorganismus und Infektionskrankheit wissenschaftlich begründet.

Trotz aller medizinischer Fortschritte stellen Infektionserkrankungen auch im 21. Jahrhundert eine ernstzunehmende Bedrohung für die Menschheit dar – eine Tatsache, die uns bereits der Ausbruch von SARS (*severe acute respiratory syndrome*) im Jahre 2003 vor Augen führte. Noch immer sind Infektionskrankheiten weltweit die häufigste Todesursache (World Health Report der WHO, 1997). Die Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen und Impfstoffe bleibt Anliegen der wissenschaftlichen Forschung, und angesichts der Möglichkeit einer Grippe-Pandemie, vor der die Medien derzeit warnen, wird ihr sogar besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

2 Allgemeines zu *Helicobacter pylori*

Im Oktober 2005 erhielten die australischen Wissenschaftler Robin Warren und Barry Marshall den Nobelpreis für Medizin. Sie wurden ausgezeichnet für die Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori* und dessen Rolle bei der Entstehung von Gastritis und peptischen Ulzera, welche die Behandlung dieser Erkrankungen revolutionierte. Obwohl der Italiener Bizzozero bereits im Jahre 1893 ein spiralförmiges Bakterium beschrieb, welches die Magenschleimhaut von Hunden besiedelte, und diese Beobachtung einige Jahre später auch von den Deutschen

Salomon und Krienitz bestätigt wurde (Bizzozero, 1893; Salomon, 1896; Krienitz, 1906), galt der Magen aufgrund seines niedrigen pH-Wertes lange Zeit als lebensfeindliches Milieu. Zudem war *H. pylori* Anfang des 20. Jahrhunderts so weit verbreitet, dass Gastritis und Neoplasien des Magens als natürlicher Alterungsprozess angesehen wurden. Seitdem hat die Prävalenz des Keimes in den industrialisierten Staaten rapide abgenommen, die Endoskopie wurde als bildgebendes Verfahren in der Medizin etabliert und die Elektronenmikroskopie entwickelt (Parsonnet, 2005). Als Warren und Marshall 1982 bei der histopathologischen Untersuchung von Magenbiopsien bei Gastritispatienten spiralförmige, Gram-negative Bakterien auf der antralen Schleimhaut entdeckten und es ihnen gelang, diese zu kultivieren, wurde die bisherige These der Sterilität des Magens in Frage gestellt (Warren and Marshall, 1983). Die Kultivierung dieser Bakterien bei Patienten mit chronischer Gastritis, Magen- und Duodenalulzera sprach ausserdem für einen ätiologischen Zusammenhang – entgegen der bisherigen Annahme, dass Magengeschwüre allein durch Stress, Rauchen und falsche Ernährung ausgelöst würden. Das Bakterium wurde zunächst der Gattung *Campylobacter* zugeordnet und als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet (Marshall and Goodwin, 1987), später aber angesichts einiger besonderer Charakteristika als erster Vertreter einer neuen Gattung in *Helicobacter pylori* umbenannt (Goodwin et al., 1989). In der Folge der Entdeckung von *H. pylori* beim Menschen wurden bei einer Reihe von Tieren weitere Vertreter der Gattung *Helicobacter* gefunden. Dabei kolonisieren nicht alle Spezies ausschließlich den Magen, sondern besiedeln auch andere Bereiche des Gastrointestinaltraktes (Solnick and Schauer, 2001). *H. pylori* konnte bisher jedoch einzig aus dem menschlichen Magen isoliert werden.

Helicobacter pylori ist ein schwierig zu isolierendes Bakterium, das in serum- oder blutsupplementierten Komplexmedien unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C wächst. Es handelt sich um ein Gram-negatives, gebogenes oder spiralförmiges Stäbchenbakterium, das unipolar 2-6 Flagellen aufweist. Daneben kommen bei längerer Kultivierung kokkoide Formen vor, welche möglicherweise degenerierten Zellen entsprechen, die zwar lebensfähig aber nicht mehr kultivierbar sind. Es könnte sich dabei auch um Bakterien handeln, die in der Lage sind in einem Ruhezustand mit minimalem Stoffwechsel zu überleben, und durch ihre Persistenz eine Quelle von Rückfällen nach Antibiotikatherapie darstellen (Gribbon and Barer, 1995). Die Rolle

dieser kokkoiden Form bei der Übertragung der Infektion und bei Therapieversagern ist noch unklar (Bode et al., 1992; Bode et al., 1993).

Vieles spricht dafür, dass bereits vor tausenden von Jahren die meisten Menschen Träger von *H. pylori* waren und dass der Säugetiermagen das natürliche Habitat der *Helicobacter* Spezies darstellt (Blaser and Berg, 2001; Falush et al., 2003; Blaser and Atherton, 2004). Einmal in den menschlichen Magen eingedrungen, kann *H. pylori* über Jahre persistieren. Während dieser Persistenz kommt es zu einer Interaktion zwischen Wirt und Mikrobe (z.B. durch bakterielle Toxine, Faktoren des Immunsystems und die Säuresekretion des Magens), welche zu einer Selektion und Anpassung führt, die letztlich beiden Organismen ein langfristiges Überleben erlaubt (Blaser and Berg, 2001; Blaser and Atherton, 2004). Solch eine Koexistenz legt die Vermutung nahe, dass auch der Wirt von der Infektion profitiert oder diese zumindest gut toleriert. *H. pylori* stellt zwar einen Risikofaktor bei der Entstehung von Adenokarzinomen, der Ulkus-Krankheit und MALT-Lymphomen dar, meist verläuft die Infektion jedoch asymptomatisch. Gleichzeitig sinkt das Risiko für eine gastroösophageale Refluxkrankheit und den damit assoziierten Barrett-Ösophagus sowie das Adenokarzinom des Ösophagus (Blaser, 1999). Auch bietet die Besiedelung mit *H. pylori* einen gewissen Schutz vor gastrointestinalen Infektionen mit anderen Erregern (Rothenbacher et al., 2000).

Das *H. pylori*-Genom weist eine vergleichbar hohe genetische Diversität auf (Majewski and Goodwin, 1988; Jiang et al., 1996; Kuipers et al., 2000). Der Sequenzvergleich verschiedener *H. pylori*-Isolate nichtverwandter Individuen zeigte darüber hinaus die Existenz zahlreicher stammspezifischer Gene, die im vorliegenden Fall etwa 7% des Genoms ausmachten (Alm et al., 1999). Diese genetische Variabilität beruht zum einen auf hohen Mutationsraten (Wang et al., 1999), zum anderen auf der Rekombination von DNA-Fragmenten zwischen verschiedenen *H. pylori*-Stämmen (Suerbaum et al., 1998). Des weiteren werden einige Gene über den Regulationsmechanismus des *slipped strand mispairing* (SSM), der auch bei anderen pathogenen Spezies vorkommt, phasenvariabel exprimiert (Weiser et al., 1989). Diese Dynamik befähigt eine Population, sich an verschiedenste Bedingungen anzupassen. Durch Rekombination könnten dabei jedoch Genotypen entstehen, die wesentliche Vorteile gegenüber der restlichen Population aufweisen (zum Beispiel besonders virulente Stämme) und sich daher auf Kosten der Diversität durchsetzen. Zudem käme es durch die nachhaltige

Schädigung des Wirts letztlich wahrscheinlich zu einer Zerstörung des eigenen Habitats. Restriktionsbarrieren zwischen verschiedenen *H. pylori*-Stämmen wurden möglicherweise deshalb selektioniert, um genetische Veränderungen zu verlangsamen und so auch auf lange Sicht die Variabilität zu erhalten und zu maximieren (Dubois et al., 1999; Xu et al., 2000; Blaser and Berg, 2001).

3 Epidemiologie, Diagnostik und Therapie

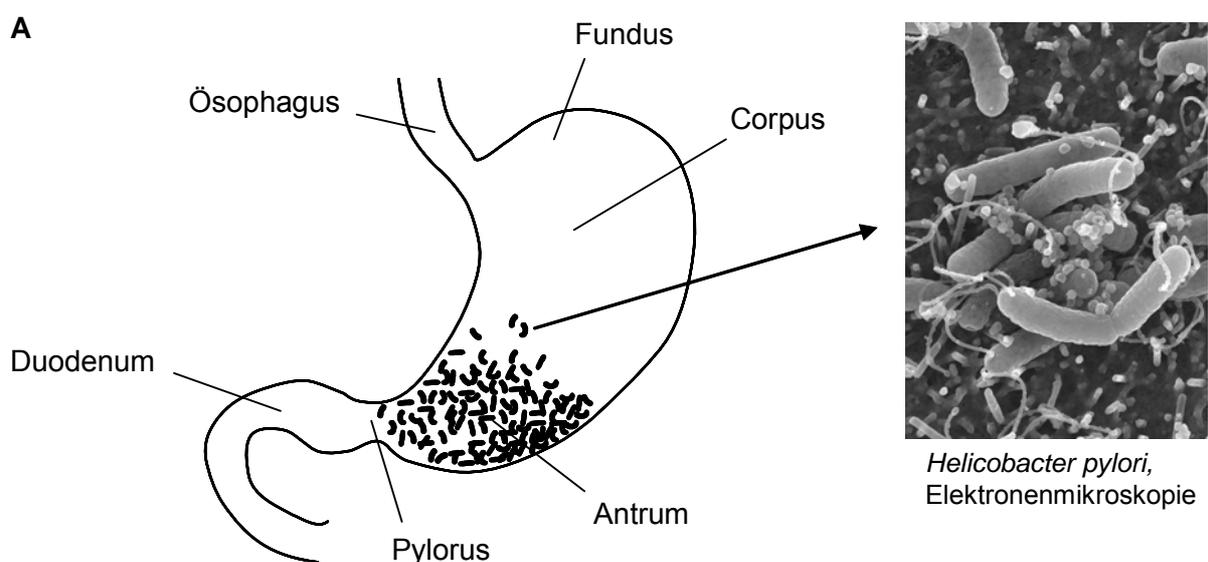
Epidemiologische Studien zeigen, dass die Besiedelung mit *H. pylori* zu den häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten zählt und weltweit auftritt, wobei die Prävalenz stark mit dem sozioökonomischen Status korreliert (Malaty et al., 1992; Malaty and Graham, 1994). Während in Industrieländern ca. 20-50% der Erwachsenen mittleren Alters infiziert sind, sind es in den Entwicklungsländern 80% der Bevölkerung (Suerbaum and Michetti, 2002), wobei die Prävalenz sinkt. Doch selbst unter Berücksichtigung des sozioökonomischen Hintergrundes sind die Infektionsraten bei bestimmten Bevölkerungsgruppen, wie z.B. den Lateinamerikanern, und bei der männlichen Bevölkerung höher. Grund hierfür sind möglicherweise bisher unbekannte genetische Prädispositionen, die eine Infektion begünstigen (Replogle et al., 1995; Covacci et al., 1999). Da bisher der Mensch als einziges Erregerreservoir angesehen wird, erscheint eine Übertragung von Mensch zu Mensch wahrscheinlich. Diese erfolgt vermutlich durch die orale Aufnahme des Bakteriums während der frühen Kindheit über Familienmitglieder, wobei oral-orale und fäkal-orale Kontakte in Betracht kommen (Lambert et al., 1995; Rowland et al., 1999). Die Häufung von Infektionen innerhalb einer Familie und das Auffinden von *H. pylori*-Stämmen mit identischem genetischem Fingerabdruck bei verschiedenen Familienmitgliedern, sind weitere Indizien für diesen Übertragungsweg (Drumm et al., 1990; Bamford et al., 1993; Mitchell et al., 1993). Das Neuinfektionsrisiko im Erwachsenenalter ist dagegen gering (Mitchell et al., 1998).

Zu den empfohlenen Methoden der *H. pylori*-Diagnostik gehören sowohl nicht-invasive Tests wie der ¹³C-Harnstoff-Atemtest, der Stuhlantigennachweis und Antikörper-Tests, als auch invasive Methoden. Zu den letztgenannten gehören der Ureaseschnelltest, die Histologie und die Kultivierung, welche eine endoskopische Biopsie-Entnahme erfordern (Malfertheiner et al., 2004).

Asymptomatische Träger von *H. pylori* werden in der Regel nicht behandelt. Dies vermindert das Risiko der Entstehung von Antibiotikaresistenzen. Bei Patienten, die an einer Ulkus-Krankheit, symptomatischer Gastritis oder einem MALT-Lymphom leiden und mit *H. pylori* infiziert sind, ist eine Eradikationstherapie indiziert, ebenfalls bei Patienten nach partieller Magenresektion. Zusätzlich empfohlen wird die Eradikation bei funktioneller Dyspepsie, der gastroösophagealen Refluxkrankheit und vor einer Therapie mit Nicht-steroidalen Antirheumatika (Malfertheiner et al., 2004). Behandlung der Wahl ist eine Tripeltherapie aus einem Protonenpumpenhemmer und zwei Antibiotika, wobei Amoxicillin, Clarithromycin und Metronidazol in Frage kommen. Die Eradikationsquote beträgt dabei über 90%.

4 Pathogenese und Immunantwort des Wirts

Die Kolonisierung des Magenepithels mit *H. pylori* bewirkt zunächst die Entstehung einer akuten Gastritis, die histologisch durch die Infiltration neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten gekennzeichnet ist, und von einer vorübergehenden Hypochlorhydrie begleitet wird (Sobala et al., 1991). Diese akute Phase der Infektion verläuft in der Regel subklinisch und geht meist innerhalb von Monaten in eine chronische Entzündung über, wenn der Wirt nicht in der Lage ist, den Keim vollständig zu eradizieren. In Abb. I.1 sind Infektion und Entzündungsreaktion dargestellt.



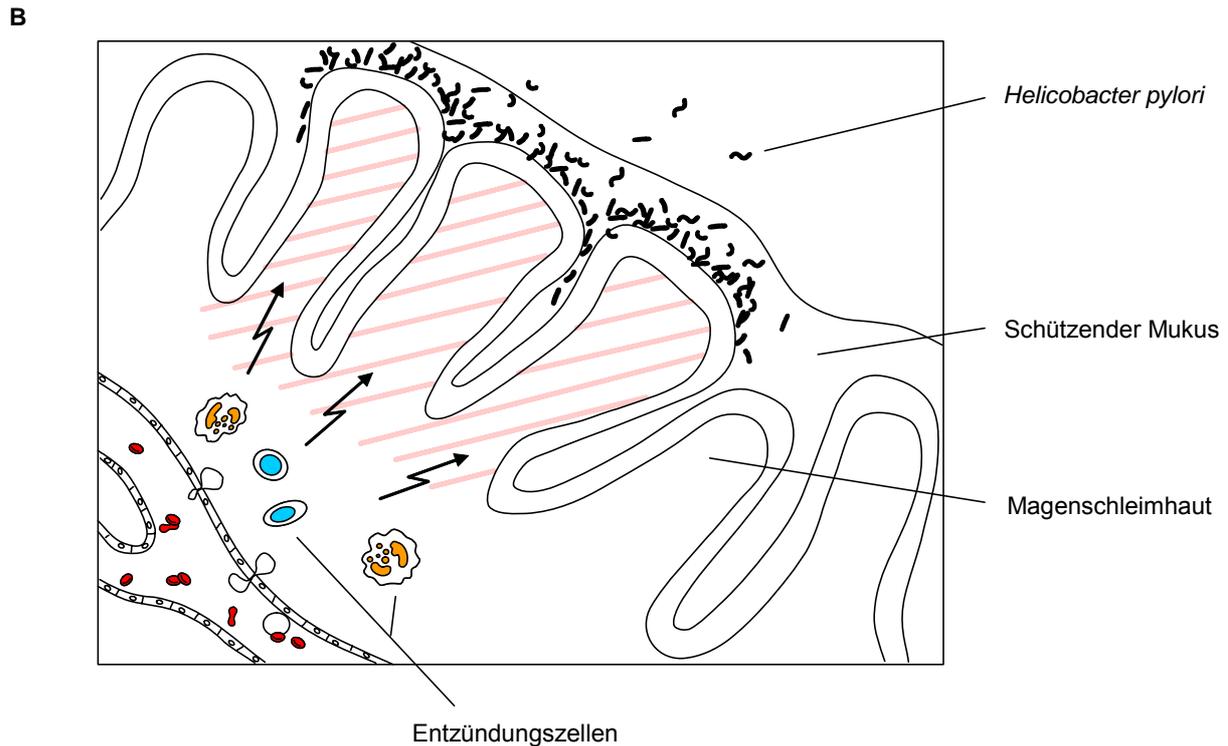


Abb. I.1: Kolonisierung des Magenepithels mit *H. pylori* und dadurch bedingte Entzündungsreaktion (verändert nach <http://www.sodbrennen-welt.de/news/200510-nobelpreis-fuer-helicobacter-pylori-entdeckung.htm>).

A *H. pylori* infiziert meist den unteren Magenanteil (Antrum). Die Elektronenmikroskopie zeigt die Bakterien, die sich an die Magenmucosa anlagern (von M. Rohde, Braunschweig).

B Im Verlauf der Infektion kommt es zu einer – oft beschwerdelosen – Entzündung der Magenschleimhaut (Gastritis).

Chronische Gastritiden können mittels ätiologischer und histologischer Kriterien in drei Klassen eingeteilt werden. Die Autoimmungastritis (TypA), welche mit etwa 5% den geringsten Anteil der chronischen Gastritiden ausmacht, ist durch den Schwund der Belegzellen in der Corpusregion und eine damit einhergehende Anazidität gekennzeichnet. TypC-Gastritiden werden durch chemische Noxen (z.B. Medikamente) oder einen Gallereflux verursacht und liegen in ca. 10% der Fälle vor. *H. pylori* ist Auslöser der mit etwa 85% am häufigsten vorkommenden TypB-Gastritis. Das Magenepithel infizierter Personen zeigt dabei eine vermehrte Bildung von Zytokinen wie den Interleukinen IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 und TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) (Crabtree et al., 1994; Yamaoka et al., 1997), die als Signalproteine an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Von den genannten scheint das IL-8, welches neutrophile Granulozyten anlockt und aktiviert, eine zentrale Rolle zu spielen (Yamaoka et al., 1997). Des Weiteren werden verschiedene *Toll-like* Rezeptoren stimuliert (Schmausser et al., 2004) und die Cyclooxygenase (COX)-2 hochreguliert

(Yu et al., 2004). Die entzündlich bedingte Schädigung des Epithels scheint dem Bakterium zu einer besseren Versorgung mit Nährstoffen zu verhelfen.

Auf Seiten der adaptiven Immunantwort bewirkt das Bakterium zum einen die Bildung von Antikörpern durch B-Lymphozyten, zum anderen eine T_H1 -polarisierte T-Zell-Antwort (Bamford et al., 1998). Diese spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen produzieren $IFN-\gamma$ (Interferon gamma) und IL-2, nicht jedoch IL-4 (Sommer et al., 1998), und unterstützen somit die zellvermittelte Immunität und die Aktivierung von Makrophagen. Gleichzeitig korreliert die T_H1 -Antwort jedoch mit einer stärkeren Gewebsschädigung (Mohammadi et al., 1997), wohingegen T_H2 -Zytokine protektiv gegenüber einer Entzündung wirken (Smythies et al., 2000). Patienten mit einer Kombination aus T_H1 - und T_H2 -Antwort sind damit weniger häufig von schweren Verläufen und Komplikationen (z.B. *Ulcus ventriculi*) betroffen (D'Elios et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* durch die phasenvariable Expression von Lewis-Blutgruppenantigenen, wie Le^x oder Le^y (Aspinall and Monteiro, 1996), in der Lage ist, dendritische Zellen zu binden. Auf diese Weise wird die Differenzierung von T-Zellen zu T_H1 -Zellen unterdrückt und eine gemischte T_H1/T_H2 -Immunantwort induziert (Bergman et al., 2004). So kann *H. pylori* einer übermäßigen Schädigung des Wirts entgegenwirken, was dem Bakterium selbst zugute kommt (Bergman et al., 2006).

Die adaptive Immunantwort kann auch Autoimmunreaktionen zur Folge haben, ausgelöst werden diese durch den Mechanismus des molekularen Mimikry. *H. pylori*-Antigene, welche strukturelle Ähnlichkeit mit Epitopen der H^+K^+ -ATPase gastrischer Parietalzellen aufweisen, führen zu einer Kreuzreaktion aktivierter $CD4^+$ - T_H1 -Zellen mit körpereigenem Gewebe (D'Elios et al., 2004). Diese Autoimmunreaktion kann bei entsprechender genetischer Disposition eine atrophische Gastritis verursachen.

Manifestation und Ausmaß der durch *H. pylori* ausgelösten Entzündung sind sowohl von stammspezifischen als auch von wirtsspezifischen Faktoren abhängig. Auch Umweltfaktoren wie Alkohol- und Zigarettenkonsum oder Stress spielen eine Rolle. Die chronische TypB-Gastritis verläuft zu 80-90% asymptomatisch, kann jedoch in Abhängigkeit von den oben genannten Faktoren zur Ausbildung klinisch relevanter Erkrankungen führen. Hierzu zählt das Auftreten von Ulzera, wobei je nach Lokalisation der Gastritis im Antrum- oder Corpusbereich bevorzugt ein duodenales oder ventrikuläres Ulkus entsteht (Suerbaum and Michetti, 2002).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass *H. pylori* das Risiko der Entwicklung von Adenokarzinomen stark erhöht, weshalb das Bakterium 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Typ I- (definitives) Karzinogen eingestuft wurde (Forman et al., 1991; Parsonnet et al., 1991a; Parsonnet et al., 1991b). Die Eradikation von *H. pylori* kann das Risiko der Entstehung eines Magenkarzinoms senken und mindert auch die Rezidivrate nach endoskopischer Resektion bei Patienten mit einem frühen Stadium von Magenkrebs (Uemura et al., 1997; Uemura et al., 2001). Auch im Tiermodell konnten Adenokarzinome durch Infektion mit *H. pylori* induziert werden (Fox, 1998). Pathogenetisch kommt es zunächst zu einer atrophischen Gastritis mit Zerstörung des Drüsengewebes. Die anschließende intestinale Metaplasie, welche eine Umwandlung des Magenepithels in Dick- oder Dünndarmschleimhaut darstellt, gilt als Vorstufe des Adenokarzinoms (Craanen et al., 1992).

Die chronische *H. pylori*-Infektion führt nicht nur zu einer generalisierten Immunantwort mit Bildung von Antikörpern im Serum, sondern auch zu einer Ansammlung von Lymphfollikeln in der Magenschleimhaut. Zudem ist sie mit der Entstehung des MALT (*Mucosa-associated lymphoid tissue*)-Lymphoms assoziiert (Parsonnet et al., 1994). Zwischen 72% und 98% der Patienten mit einem gastrischen MALT-Lymphom sind gleichzeitig mit *H. pylori* infiziert und in vielen Fällen führte eine alleinige Eradikation zur Regression des Lymphoms, was den kausalen Zusammenhang bestätigt. Bei Lymphomen, die nicht auf eine Eradikations-Therapie ansprachen, handelte es sich häufig um Tumoren, die sich zu hochgradigen Lymphomen weiterentwickelt hatten (Bayerdorffer et al., 1995). Abb. I.2 zeigt die Krankheitsbilder, die sich im Verlauf einer Ansteckung mit *H. pylori* entwickeln können.

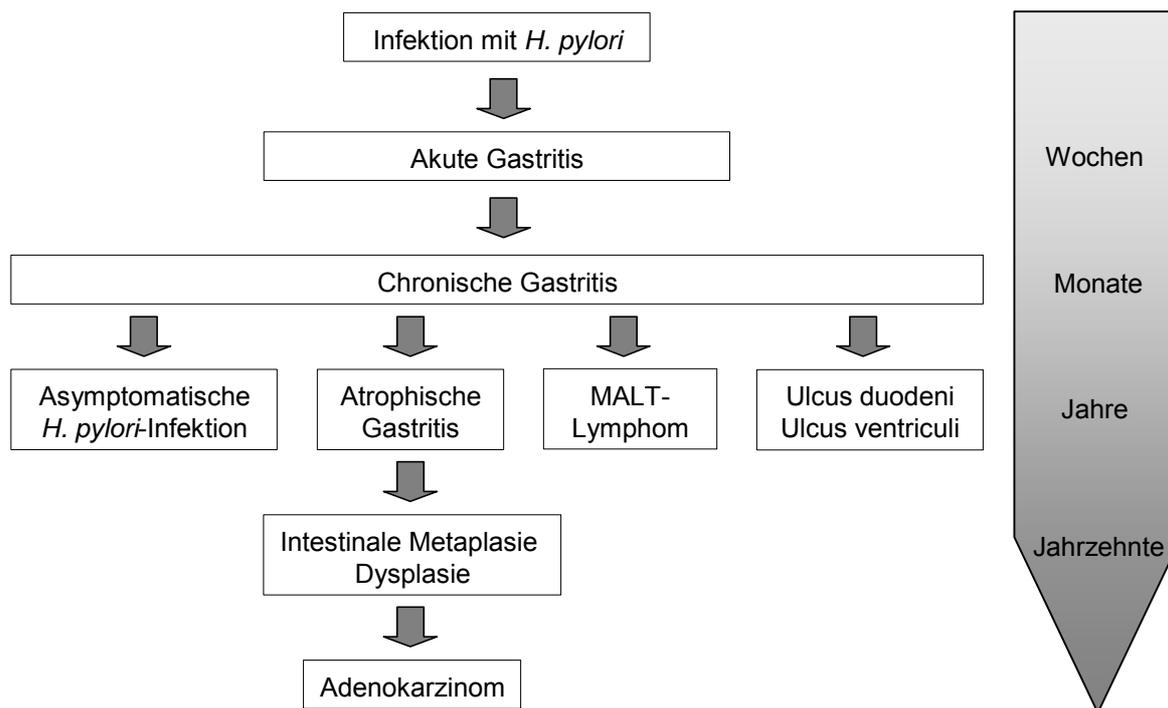


Abb. I.2: Pathogenese einer Infektion mit *H. pylori* (Telford et al., 1997). Erläuterungen siehe Text.

5 Virulenzfaktoren

H. pylori zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, über Jahre im Wirt zu persistieren. Um das Überleben in einem lebensfeindlichen Habitat wie dem menschlichen Magen zu gewährleisten, ist das Bakterium mit einer Reihe von Virulenzfaktoren ausgestattet, die der Gewebsschädigung und der Kolonisierung des Magens dienen. Eine entscheidende Bedeutung kommt dabei der Urease zu, einem aus den Untereinheiten UreA und UreB bestehenden Enzym, welches die Umsetzung von Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak katalysiert (Labigne et al., 1991). Der Einstrom von Harnstoff in die Bakterienzelle wird dabei durch einen pH-abhängigen Harnstoffkanal reguliert, der von dem Membranprotein Urel gebildet wird (Weeks et al., 2000). Die bei der Hydrolyse entstehenden Produkte können Protonen abfangen und auf diese Weise einen konstant neutralen pH-Wert im Zellinneren aufrechterhalten, was zumindest zeitweilig das Überleben im sauren Lumen erlaubt (Stingl et al., 2002). Dementsprechend sind Ureasemutanten im Gegensatz zu

Wildtyp-Bakterien nicht mehr in der Lage, *Mongolian Gerbils* zu infizieren (Wirth et al., 1998; Kavermann et al., 2003).

Durch seine Begeißelung, die sich für eine erfolgreiche Kolonisierung ebenfalls als essentiell herausgestellt hat (Eaton et al., 1992), ist *H. pylori* sehr beweglich. Das Bakterium erreicht mittels Chemotaxis, unter anderem entlang des pH-Gradienten, die das Epithel schützende Schleimschicht, wo ein bicarbonat-gepuffertes Milieu mit einem pH-Wert von 6-7 vorherrscht (Yoshiyama et al., 1999). Die Flagellen, aus den Untereinheiten FlaA und FlaB aufgebaut (Leying et al., 1992), und seine spiralige Form ermöglichen es dem Keim, in den viskösen Mukus vorzudringen.

Der größte Teil der Bakterien bewegt sich frei schwimmend in der Schleimschicht, bevorzugt in den Krypten der Antrumschleimhaut, die einen gewissen Schutz vor Säure und Proteasen bieten. Nur etwa 20% der Zellen ist mit der Epitheloberfläche assoziiert (Hessey et al., 1990), wobei Adhärenz die Bakterien vor der Ausscheidung mit der vom Körper produzierten Magensäure schützt. Ein bakterielles Adhäsins, welches die Bindung an die Mukosa vermittelt, ist BabA – ein äußeres Membranprotein, das an die Lewis^b-Antigene humaner Zellen bindet (Boren et al., 1993; Ilver et al., 1998). Ebenfalls der OMP (*outer membrane protein*)-Familie zugehörige Proteine sind SabA, das im Verlauf der Gastritis mit Sialyl-Lewis^x-Molekülen auf der Oberfläche von entzündetem Magengewebe interagiert (Mahdavi et al., 2002), sowie AlpA und AlpB. Letztere zeigen eine Lewis^b-unabhängige Adhärenz mit bisher unbekanntem eukaryontischem Rezeptor (Odenbreit et al., 1999). Daneben existieren Adhäsine, welche die in der Basalmembran vorkommenden Proteine Laminin und Kollagen Typ IV binden (Trust et al., 1991). Die Fähigkeit, an Epithelzellen zu adhären, ist für *H. pylori* unverzichtbar, doch die genaue Differenzierung der essentiellen Faktoren ist schwierig, da es sich um ein Zusammenspiel vieler Interaktionen handelt und der Ausfall eines einzelnen Adhäsins im Tiermodell meist zu keinem detektierbaren Adhärenzdefekt führt (Montecucco and Rappuoli, 2001; Covacci and Rappuoli, 2003).

Das NapA-Protein (HP-NAP, *H. pylori neutrophil activating protein*) scheint ebenfalls maßgeblich an der Entwicklung der Gastritis beteiligt zu sein (Evans, Jr. et al., 1995). Eine spezifische Immunantwort gegen HP-NAP war in vielen Fällen beim Menschen nachweisbar, auch konnten Mäuse durch Impfung mit Antikörpern gegen HP-NAP vor Infektion mit *H. pylori* geschützt werden (Satin et al., 2000). Das Protein bildet Polymere von 150kDa und vermag Granulozyten und andere Entzündungszellen

anzulocken. In diesen Zellen aktiviert es die NADPH-Oxidase und damit die Freisetzung aggressiver Sauerstoffradikale, die einen sogenannten *oxidative burst* bewirken (Satin et al., 2000). Zum Schutz vor Sauerstoffradikalen ist *H. pylori* mit einer Superoxiddismutase ausgerüstet (Spiegelhalder et al., 1993), des weiteren verfügt das Bakterium über eine Katalase, die das von Phagozyten freigesetzte Wasserstoffperoxid unschädlich macht (Ramarao et al., 2000b).

Daneben wurden noch zahlreiche weitere Gene, die für eine Kolonisierung von *Mongolian Gerbils* essentiell sind, in einem **Signature Tag Mutagenesis** (STM)-Verfahren identifiziert (Kavermann et al., 2003). Dazu gehört unter anderem eine sekretierte Kollagenase, über deren Aufgabe bisher nur spekuliert werden konnte. Da vom Körper produziertes Kollagen eine wichtige Rolle bei der Heilung von Ulzera spielt, könnte die Kollagenase die Heilung verzögern (Gillesen et al., 1995). Alternativ besteht die Möglichkeit, dass das Enzym der Bereitstellung von Aminosäuren oder Peptiden für das Bakterium dient, oder eine Zerstörung von wichtigen Komponenten des angeborenen oder erworbenen Immunsystems bewirkt (Kavermann et al., 2003).

Die oben beschriebene genetische Variabilität von *H. pylori* führt dazu, dass verschiedene Genotypen mit unterschiedlicher Virulenz auftreten. So fand man 1988 eine zytotoxische, vakuolisierende Aktivität im Kulturüberstand einiger, aber nicht aller *H.pylori*-Isolate (Leunk et al., 1988). Als verantwortlicher Virulenzfaktor, der mit der Schädigung des Magenepithels in Verbindung gebracht wird, wurde VacA (**vacuolating cytotoxin A**) identifiziert, wobei die verschiedenen Allele des *vacA*-Gens ein unterschiedliches Maß an Zytotoxizität bedingen (Cover et al., 1994; Atherton et al., 1995). Das Toxin induziert *in vitro* die Bildung zytoplasmatischer Vakuolen in Epithelzellen (Cover et al., 1992), wobei die genaue biologische Funktion noch unklar ist. Bisher konnten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Magengeschwürs in *Mongolian Gerbils* (Ogura et al., 2000) und eine Korrelation von Krankheitsverlauf und *vacA*-Genotyp beobachtet werden.

Das sekretierte VacA-Protein von etwa 95 kDa (Schmitt and Haas, 1994) wird nach Bindung an die Zelloberfläche von Epithelzellen internalisiert und führt dort zu einer Reihe von Veränderungen. VacA gelangt über den endozytotischen Weg in V-Typ ATPase-positive späte Endosomen und wirkt dort als anionenselektiver Kanal (Szabo et al., 1999; Tombola et al., 1999). In Anwesenheit schwacher Basen – den durch die Urease von *H. pylori* gebildeten Ammoniak eingeschlossen – generiert die

Protonenpumpe einen elektrochemischen Gradienten; der resultierende Wassereinstrom führt zur Vakuolenbildung (Papini et al., 1996; Ricci et al., 1997). Zu den *in vitro* gezeigten Effekten des Zytotoxins gehört auch die Herabsetzung des transepithelialen Widerstandes (TER). Dieser Widerstand wird in polarisierten Epithelien durch eine Abdichtung benachbarter Zellen mittels Zell-Zell-Kontakten wie *Tight junctions* aufrechterhalten, ein Absinken des TER und die dadurch erhöhte Permeabilität für Ionen könnte dem Bakterium als Nahrungsquelle dienen (Papini et al., 1998; Pelicic et al., 1999). VacA inhibiert sowohl den intrazellulären Vesikeltransport (Montecuccio et al., 1996; Satin et al., 1997) als auch die Antigenpräsentation in B-Zellen, indem es die proteolytische Antigenprozessierung stört (Molinari et al., 1998). Außerdem ist eine Apoptoseinduktion durch VacA beschrieben (Kuck et al., 2001) und es konnte gezeigt werden, dass das Toxin die IL-2-Sekretion in T-Zellen über ein Eingreifen in den Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Signalweg hemmt (Gebert et al., 2003).

H. pylori-Genotypen mit starker vakuolisierender Aktivität sind meist mit der Anwesenheit des *cagA*-Gens korreliert (Tummuru et al., 1993), welches aus diesem Grund als *cytotoxin-associated gene* bezeichnet wurde (Covacci et al., 1993). Das immundominante CagA-Protein stellt – neben VacA – einen der wichtigsten Virulenzfaktoren dar (Rieder et al., 2005) und ist auf der sogenannten *cag*-Pathogenitätsinsel kodiert, auf welche im nächsten Kapitel näher eingegangen wird. Wegen der besonderen klinischen Relevanz *cagA/vacA*-positiver Stämme wurden diese als TypI-Stämme bezeichnet, die doppelt negativen Stämme als TypII-Stämme (Xiang et al., 1995).

6 Die *cag*-Pathogenitätsinsel und das cytotoxin-assoziierte Gen *cagA*

Der Begriff *pathogenicity island* (PAI) wurde 1990 von Hacker et al. für große, instabile Regionen im Chromosom uropathogener *E. coli*-Stämme, die einige Virulenzgene kodieren, geprägt (Hacker et al., 1990). Allgemein besitzen solche Inseln, die auch bei anderen bakteriellen Pathogenen wie *Salmonella* und *Yersinia* vorkommen, meist einen im Vergleich zum restlichen Genom unterschiedlichen GC-Gehalt. Dies wird als Hinweis dafür angesehen, dass sie als Fremd-DNA durch horizontalen Gentransfer aufgenommen wurden (Hacker et al., 1997). Bei den

2001), wobei eine beschriebene Phagozytose-Resistenz (Ramarao et al., 2000a) jedoch nicht bestätigt werden konnte (Odenbreit et al., 2001). Die Größenvariabilität des Proteins in verschiedenen Bakterienstämmen, deren Funktion bisher ungeklärt ist, beruht auf der Duplikation von internen Gensequenzen (Covacci et al., 1993). In der Wirtszelle wird das Protein, welches ein oder mehrere Tyrosinphosphorylierungsmotive (sog. EPIYA-Motive) enthält, durch eine Protein-Tyrosin-Kinase der Src-Familie erkannt und phosphoryliert (Backert et al., 2001; Selbach et al., 2002; Püls et al., 2002; Stein et al., 2002). Mit der Phosphorylierung von CagA (CagA^{P-tyr}) geht die Dephosphorylierung verschiedener Wirtszellproteine wie Cortactin einher (Odenbreit et al., 2000; Selbach et al., 2002; Selbach et al., 2003; Selbach et al., 2004). Zudem beeinträchtigt CagA^{P-tyr} die Integrität epithelialer Zell-Zell-Kontakte (sog. *Tight junctions*) (Amieva et al., 2003) und führt zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts. Dabei entstehen zum einen charakteristische Zellausläufer, ein Phänotyp, der als *hummingbird*-Phänotyp bezeichnet wurde (Segal et al., 1999; Backert et al., 2001), zum anderen kommt es zu einem Auseinanderweichen der Epithelzellen, dem sogenannten *cell scattering* (Backert et al., 2001; Churin et al., 2001; Tsutsumi et al., 2003; Churin et al., 2003; Higashi et al., 2004; Suzuki et al., 2005). Bisher konnten die Mechanismen, die zu den genannten Veränderungen führen, noch nicht eindeutig geklärt werden. In Betracht kommen unter anderem Interaktionen des CagA-Proteins mit SHP-2, einer Phosphatase (Higashi et al., 2002), und mit dem Adaptor-Protein Grb2 (Mimuro et al., 2002). In Abb. I.4 sind die beschriebenen Veränderungen schematisch dargestellt.

TypI-Stämme mit *cag*-Pathogenitätsinsel sind mit einer stärkeren Induktion von IL-8 in Magenepithelzellen assoziiert. Mutationsanalysen ergaben, dass für diesen Effekt zwar viele *cag*-PAI-Gene essentiell sind, er jedoch nicht an die Anwesenheit des *cagA*-Gens gebunden ist (Crabtree et al., 1995; Sharma et al., 1995; Segal et al., 1997). Die Daten von Fischer et al. sprechen außerdem gegen ein IL-8-induzierendes transloziertes Effektorprotein. Somit ist die Sekretion von IL-8 wohl eher auf die Anwesenheit eines intakten Sekretionsapparates zurückzuführen (Fischer et al., 2001). Neben IL-8 werden weitere Chemokine wie ENA-78 (*epithelial neutrophil activating peptide 78*) (Bliss, Jr. et al., 1998), GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) (Beales and Calam, 1997) und TNF- α (Tumor- nekrosefaktor-alpha) (Klausz et al., 2003) induziert, wobei ein direkter Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle die Voraussetzung ist (Rieder et al.,

1997), unter der es zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B (Sharma et al., 1998; Glocker et al., 1998; Foryst-Ludwig and Naumann, 2000) oder AP1 (Naumann et al., 1999) kommt.

Möglicherweise existieren neben dem CagA-Protein weitere, bisher nicht bekannte translozierte Effektorproteine, die durch die *cag*-PAI kodiert werden.

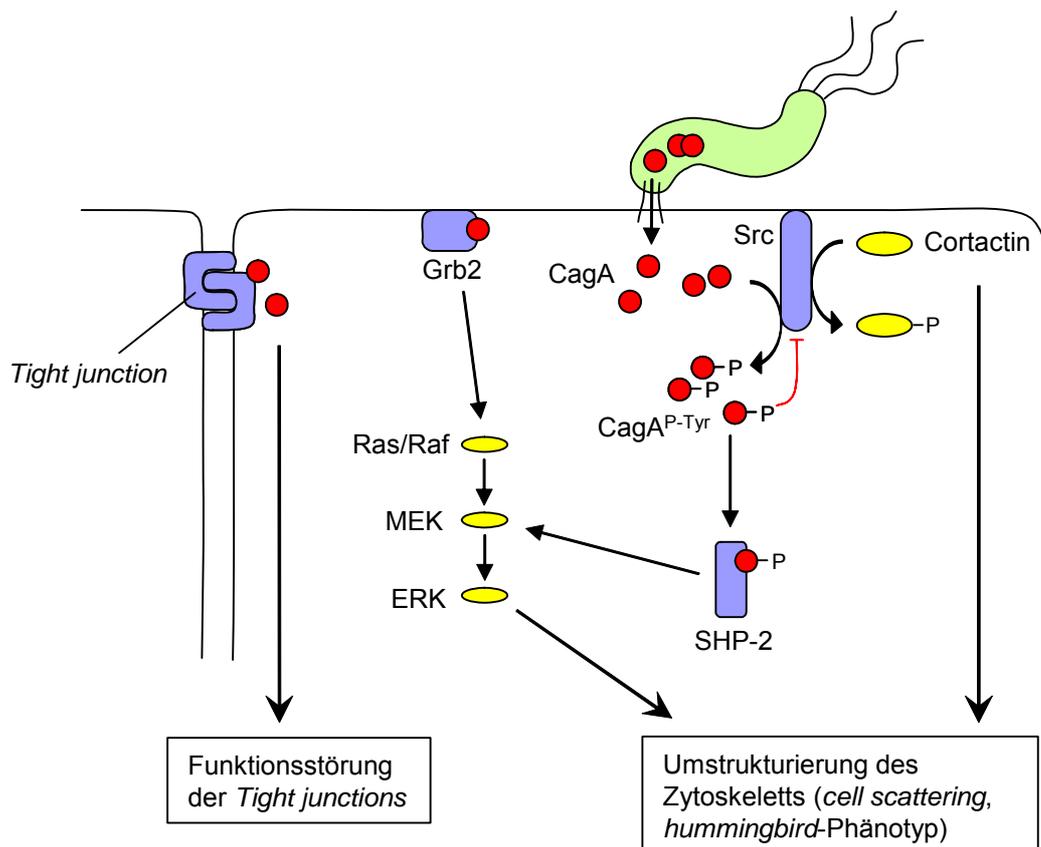


Abb. I.4: Auswirkungen der CagA-Translokation auf die zellulären Prozesse der Wirtszelle, verändert nach (Rieder et al., 2005; Bourzac and Guillemin, 2005).

Das translozierte CagA-Protein wird durch die zelleigene Src-Kinase phosphoryliert und hemmt die Kinase seinerseits durch eine negative Feedback-Schleife. Die Inaktivierung der Src-Kinase resultiert in einer Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen, u.a. Cortactin, welches die Vernetzung von Aktinfilamenten beeinflusst. CagA bzw. CagA^{P-Tyr} interagieren zudem mit Grb2 und SHP-2 und aktivieren so die Ras/MEK/ERK-Signalkaskade, wodurch es zu den charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie kommt. Des Weiteren führt die Anlagerung des CagA-Proteins an Komponenten der *Tight junctions* zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere. (SHP-2: *tyrosine phosphatase containing Src-homology 2 domain*, Grb2: *growth factor receptor-binding protein 2*, MEK: *MAP kinase kinase*, ERK: *extracellular signal-regulated kinase*).

7 Typ IV-Proteinsekretionssysteme

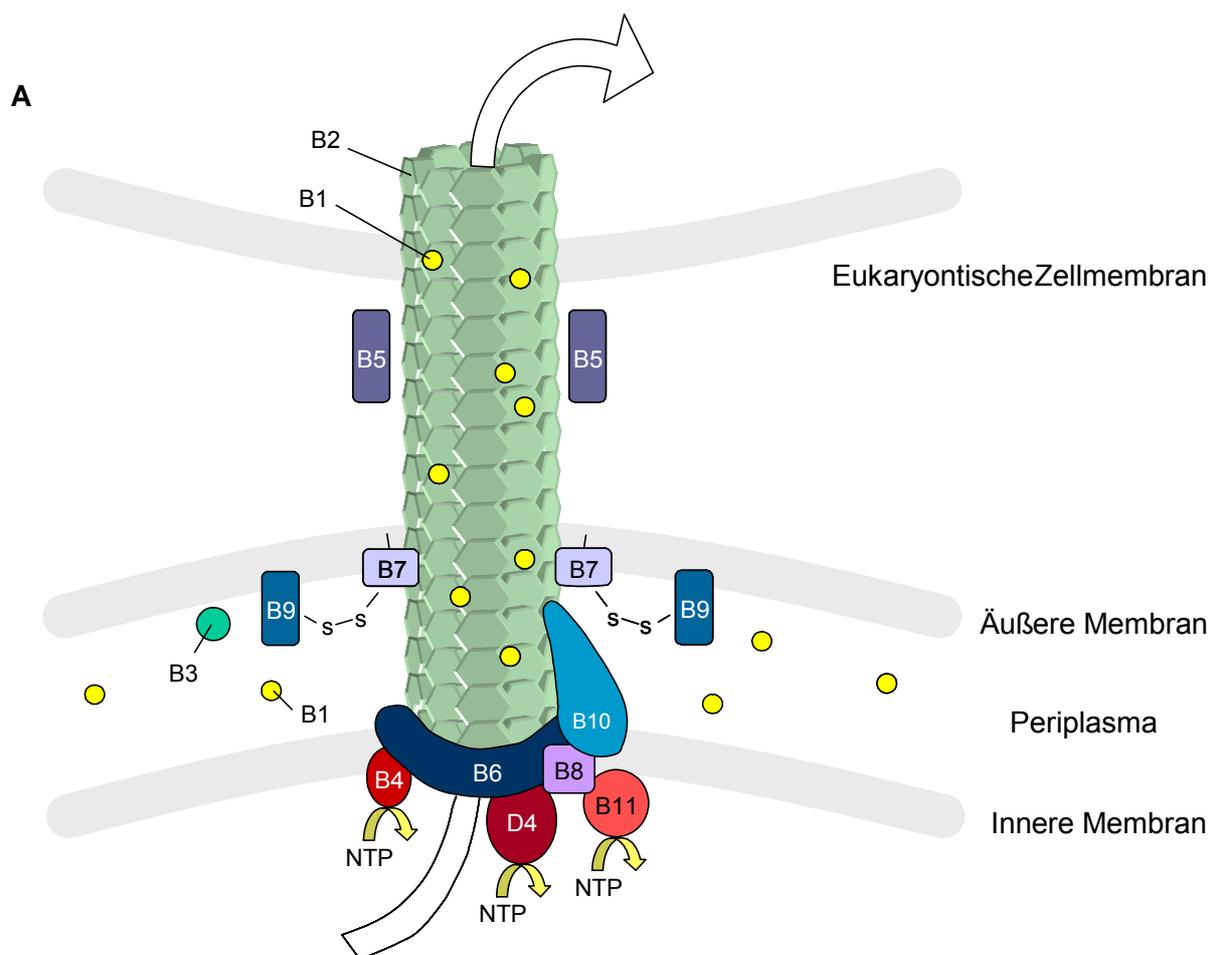
Viele Bakterien haben spezielle Sekretionssysteme entwickelt, um pathogenetisch relevante Proteine durch die bakterielle Membran in die extrazelluläre Umgebung oder in andere Zellen zu transferieren. Bei Gram-negativen Bakterien beinhaltet dieser Sekretionsprozess einen Transport über die innere und äußere Membran und kann in ein oder zwei Schritten ablaufen. Die Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien wurden als Typ I- bis Typ V-Sekretionssysteme klassifiziert, entsprechend ihrem Transportweg über die äußere Membran (Thanassi and Hultgren, 2000).

Unterschieden werden ABC (**ATP-binding cassette**)- oder Typ I-Transporter (Binet et al., 1997; Linton and Higgins, 1998), Sec-abhängige Typ II-Sekretionssysteme, auch als **general secretory pathway** (GSP) bezeichnet (Sandkvist, 2001), die zu Flagellenexportsystemen homologen Typ III-Sekretionsapparate (Plano et al., 2001), Typ IV-Sekretionssysteme und Typ V-Autotransporter (Henderson et al., 2000). Typ IV-Sekretionssysteme, zu denen auch Konjugationssysteme gehören (Christie and Vogel, 2000), kommen bei einer Reihe pathogener Bakterien wie *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Brucella suis*, *Rickettsia prowazekii*, *Bartonella henselae* und *Helicobacter pylori* vor. Während *B. pertussis* auf diese Weise das humanpathogene Pertussistoxin sekretiert (Winans et al., 1996) und *L. pneumophila* das DotA-Protein sekretiert, sowie die Proteine RalF und LidA transloziert (Nagai and Roy, 2001; Nagai et al., 2002; Conover et al., 2003), sind die Effektoren des intrazellulären Pathogens *Brucella spp.* noch unbekannt.

Das am besten charakterisierte Typ IV-Sekretionssystem ist jedoch das VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens*. Das Bakterium exportiert einzelsträngige DNA, auch als T-DNA bezeichnet, über beide bakterielle Membranen in Pflanzenzellen. Dort wird die DNA in das Genom der Zielzelle integriert und führt zur Bildung von Tumoren (Zhu et al., 2000; Zupan et al., 2000). Die Proteine, die am Aufbau des Apparates beteiligt sind, lassen sich in drei funktionelle Gruppen unterteilen. Im Zytoplasma befinden sich membranassoziierte ATPasen, die für die Bereitstellung der Energie benötigt werden. Daneben existieren Proteine, die einen die Membranen überbrückenden Kanal ausbilden und exozelluläre Komponenten, aus denen der Pilus aufgebaut ist. Dieser vermittelt vermutlich die Adhäsion (Christie and Vogel, 2000; Cascales and Christie, 2003).

In *H. pylori* dient das Typ IV-Sekretionssystem der Translokation des CagA-Proteins, das in der Wirtszelle eine Reihe von Effekten hervorruft (siehe oben). Es wurde jedoch ein weiteres Typ IV-Transportsystem gefunden, dem eine Rolle bei der Aufnahme von DNA während der natürlichen Transformation zukommt (Hofreuter et al., 2001).

Die Abb. I.5 zeigt den putativen Aufbau des Typ IV-Sekretionsapparates von *A. tumefaciens* und die bisher ermittelten Homologien zwischen den Komponenten bakterieller Typ IV-Sekretionssysteme. Dennoch sind längst nicht alle am Aufbau von Sekretionssystemen beteiligten Proteine homolog zu denen des Apparates von *A. tumefaciens*. Bei *H. pylori* beispielsweise, sind es nur acht der 14 *cag*-PAI-kodierten Proteine, welche den Sekretionsapparat bilden – die Aufgaben der anderen Genprodukte sind noch nicht vollständig geklärt.



B

Organismus	System	Proteine											
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	D4
<i>A. tumefaciens</i>	vir	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	D4
<i>H. pylori</i>	cag	523			544			532	530	528	527	525	524
<i>B. pertussis</i>	ptl		A	B	C		D	I	E	F	G	H	
<i>B. suis</i>	vir		B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
<i>E. coli/pKM101</i>	tra	L	M	A	B	C	D	N	E	O	F	G	J
<i>L. pneumophila</i>	dot/icm										IcME	DotE	
<i>R. prowazekii</i>	RP ORF				103				287	290	291	292	293

Abb. I.5: Modell des Typ IV-Sekretionsapparats von *A. tumefaciens* mit Aufstellung homologer und analoger Gene verschiedener Bakterien (Covacci et al., 1999; Cascales and Christie, 2003).

A Schematische Darstellung der hypothetischen Anordnung der Proteine VirB1-VirB11 und VirD4 im Typ IV-Sekretionsapparat von *A. tumefaciens*. Die Proteine VirB4, VirB11 und VirD4 besitzen Walker A-Motive, die für ATPasen charakteristisch sind. Der große Pfeil beschreibt den Weg der sezernierten Komponente über die bakteriellen Membranen in die Wirtszelle.

B Tabelle homologer Typ IV-Sekretionsapparats-Proteine der Organismen *A. tumefaciens* (Vir-Proteine), *H. pylori* (cag PAI-kodierte Proteine), *B. pertussis* (Ptl-Proteine), *B. suis* (Vir-Proteine), *E. coli* (Tra-Proteine; Konjugationssystem des Plasmids pKM101), *L. pneumophila* (Dot/Icm-Proteine) und *R. prowazekii* (RP-Proteine). Homologe Proteine sind untereinander angeordnet.

8 Zielsetzung

Die spezifische Sekretion pathogenetisch relevanter Proteine stellt einen wichtigen Virulenzfaktor vieler Bakterien dar. Die Gruppe der Typ IV-Sekretionssysteme könnte daher Ansatzpunkte bei der Erforschung neuer Therapiestrategien liefern, zum Beispiel als Angriffspunkt für Antibiotika oder als Vektor für den Transport therapeutischer Substanzen.

Der Aufbau des Sekretionsapparates vieler dieser Systeme ist bereits bekannt, wohingegen man über die Einzelheiten der Sekretionssignale der Substrate bislang wenig weiß. Erst kürzlich konnten jedoch bei drei der Typ IV-Systeme Translokationssignale charakterisiert werden. Die sezernierten Proteine VirE2 und VirF aus *A. tumefaciens* beispielsweise, besitzen C-terminale Domänen, die für die Sekretion notwendig und auch hinreichend sind (Vergunst et al., 2000; Vergunst et al., 2003; Vergunst et al., 2005). Sequenzvergleiche mit dem ebenfalls sekretierten VirD2 sowie umfangreiche Mutationsanalysen ließen ein konserviertes Motiv

erkennen, das als Translokationssignal in Frage kam. Aufgrund dieser Annahme konnten VirE3 und VirD5 als weitere Effektorproteine identifiziert werden (Schrammeijer et al., 2003; Vergunst et al., 2005). Die Translokation des RalF-Proteins aus *L. pneumophila* durch das Icm/Dot-System erfordert ebenfalls eine kurze C-terminale Region (Nagai et al., 2005) und Substrate des VirB-Systems von *B. henselae* benötigen sowohl einen positiv geladenen C-Terminus, als auch eine zusätzliche konservierte Domäne (Schulein et al., 2005).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist das CagA-Protein das einzig bekannte Effektorprotein, das von *H. pylori* mittels Typ IV-Sekretion transloziert wird. Die bekannten Homologien zu Komponenten des VirB/D4-Systems sind in Abb. I.3B dargestellt. Obwohl sich 18 Gene der *cag*-PAI als essentiell für die CagA-Translokation herausgestellt haben, kodieren von diesen nur 14 für Apparatsproteine, weswegen sie für die IL-8 Induktion in Epithelzellen essentiell sind (Fischer et al., 2001). Von den vier weiteren Proteinen weist das Cag β (HP524) Homologien zu dem in *A. tumefaciens* vorkommenden Kopplungsprotein VirD4 auf, bei einem anderen (CagF/HP543) konnte eine Interaktion mit dem CagA-Protein gezeigt werden, so dass diesem möglicherweise eine Rolle als *Chaperon* zukommt (I. Pattis, E. Weiss, R. Haas und W. Fischer, eingereicht). Trotz Kenntnis der für die CagA-Translokation notwendigen Gene ist über das Translokationssignal und den eigentlichen Vorgang der Sekretion bisher wenig bekannt. Die Charakterisierung des Translokationsmechanismus des CagA-Proteins auf molekularer Ebene ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis dieses wesentlichen Pathogenitätsfaktors von *H. pylori*.

Ziel dieser Arbeit war es, durch gezielte Mutationen des *cagA*-Gens Aussagen über die Lokalisation eines Sekretionssignals zu treffen. Neben der Charakterisierung von für die Translokation notwendigen Genabschnitten sollte auch versucht werden, eine für die Translokation hinreichende Sequenz zu bestimmen. Zu diesem Zweck sollte ein Fremdprotein mit Hilfe eines fusionierten CagA-Proteins in die Wirtszelle geschleust werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Bakterienstämme

1.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

DH5 α (E142)	F ⁻ , (ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15) Δ (<i>lacZYAargF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r κ^- , m κ^+), <i>supE44</i> , λ^- <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Gibco BRL)
TOP10	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYAargF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen)
β 2155	<i>thrB1004 pro thi strA hsdS lacZ</i> Δ M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacI</i> ^A <i>traD36 proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺) Δ <i>dapA::erm</i> (Erm ^r) <i>pir::RP4</i> [:: <i>kan</i> (Km ^r) from SM10] (Dehio and Meyer, 1997)

1.1.2 *Helicobacter pylori*-Stämme

P1	Klinisches Isolat 69A der Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universität Amsterdam
P12	Klinisches Isolat 888-0 der Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg (Schmitt and Haas, 1994)
P12 Δ <i>cagA</i>	(Püls et al., 2002)
P17	P12 <i>cagA</i> ⁻ , Cam ^R , hergestellt mit pWS30 (Schmitt and Haas, 1994; Püls et al., 2002)
P76	P1, Strep ^R (R. Haas und W. Fischer, unveröffentlicht)
26695	komplett sequenzierter Stamm (Tomb et al., 1997); 3 Bezugsquellen: (1) K. Melchers, Konstanz, (2) T. Borén, Uméa, (3) American Type Culture Collection ATCC

1.2 Zelllinie

Es wurde die humane Magenkarzinomzelllinie AGS (ATCC CRL 1739) verwendet.

1.3 Plasmide

pBluescript II KS+	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1(+)}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse-Primerbindungsstellen, Amp ^R (Stratagene)
pCR2.1-TOPO	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/reverse- und T7-Promotor-Primerbindungsstellen, Amp ^R , Kan ^R (Invitrogen)
pM301	(W.-D. Hardt, unveröffentlicht)
pHel2	pDH26: pHel1, <i>ori_{colE1}</i> , <i>oriT</i> , <i>cat_{GC}</i> , Cam ^R (Heuermann and Haas, 1998)
pDH80	pHel2 mit <i>gfp</i> (Heuermann and Haas, 1998), Cam ^R
pWS122	pHel2 mit P _{cagA} , <i>cagA(5′)-gfp</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Cam ^R
pWS130	pHel2 mit P _{fla} , <i>gfp-cagA(3′)</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> 26695, Cam ^R
pWS144	pHel2 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 6-26 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Cam ^R
pWS159-12	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1161-1214 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS159-13	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1151-1214 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS159-21	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1123-1214 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS164	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1211-1214 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS171	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 2-23 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS173	pHel2 mit P _{fla} , <i>cre-cagA(3′)</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> 26695, Cam ^R
pWS174	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA(5′)-cre</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS175	pHel2 mit P _{fla} , <i>cre(NLS)-cagA(3′)</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> 26695, Cam ^R
pWS177	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1210-1214 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS178	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1195-1214 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS181	pJP99 mit P _{fla} , <i>cre-cagA(3′)</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS182	pJP99 mit P _{fla} , <i>cre(NLS)-cagA(3′)</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS183	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA(5′)-cre(NLS)</i> , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pWS210	pHel2 mit P _{fla} , <i>m45-cagA</i> (Codons 1-613 deletiert) aus <i>Hp</i> 26695, Cam ^R
pWS218	pHel2 mit P _{fla} , <i>m45-cagA</i> (Codons 1-732 deletiert) aus <i>Hp</i> 26695, Cam ^R
pWS220	pHel2 mit P _{fla} , <i>m45-cagA</i> (Codons 1-1019 deletiert) aus <i>Hp</i> 26695, Cam ^R
pWS221	pHel2 mit P _{fla} , <i>cagA</i> (Codons 1-351 deletiert) aus <i>Hp</i> P12, Cam ^R
pWS228	pHel2 mit P _{cagA} , <i>m45-cagA</i> (Codons 1-613 deletiert) aus <i>Hp</i> 26695, Cam ^R

pJP66	pHel2 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Cam ^R
pJP78	pBluescript mit <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R
pJP99	pBA, <i>recA</i> (5'), Kan ^R , <i>recA</i> (3'), Amp ^R
pJP104	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pSH2	pJP78 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1194-1214 deletiert und durch Codons 686-709 aus <i>mobA</i> ersetzt) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R
pSH3	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (Codons 1194-1214 deletiert und durch Codons 686-709 aus <i>mobA</i> ersetzt) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R
pSH8	pJP99 mit P _{cagA} , <i>cagA</i> (K1203L, K1208I) aus <i>Hp</i> P12, Amp ^R , Kan ^R

1.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
HK3	CGGGATCCGTCGACTTAAGATTTTTGGAAACCAC
JP28	ACCGCTCGAGGGTAAAAATGTGAATCGT
JP67	GGCCGAGCTCGGTACCTTAAGATTTTTGGAAACCAC
WS79	GTAGATCTAAGTAAAGGAGAAGAACTT
WS80	GGGTACCTTATTTGTATAGTTCATC
WS81	GAAGATCTATCGATAAAGCCCTTTAAAAT
WS89	CGAGATCTTTTTGTATAGTTCATCCAT
WS125	GGTTTCGTTAGTCATTGTTTCTCC
WS126	GTGGCTTTTCTTAAAGTTAATAAC
WS158	CCATCGATGGTAAAAATGTGAATCGT
WS174	ACCGCTCGAGCTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCCAATTTACTGA CCGTAC
WS175	ACCGCTCGAGCTTTAAGAAGGAGATATACATATGCCTAAGAAAAAGA GGAAAGTGTCCAATTTACTGACCGTAC
WS176	AGAGATCTCCATCTTCCAGCAGGC
WS177	GGGTACCTTAACCTTTTGTATTAACATTC
WS178	CTGGTACCTTACGCCAAGCAGTAATATCCT
WS179	CGGGATCCTGAAAAATCTCTAAAGAAAC
WS180	CGGGATCCTAATCGCCATCTTCCAGCAG
WS191	CGAGGCATGGACAGGGGCGGGCCAGATTTTCAGCATGTAAGTCGAC GGATCCACTAGT
WS192	CTGCCTCGGCGCTGGTGCTCTAGCCAATTCGGCTCTTGCCAAGCAG TAATATCCTG
WS219	TATGGATAGGAGCAGGGATCGTTTGCCGCCTTTTGAACAGAAACCA GGATCTTA

WS220	GATCTAAGATCCTGGTTTCTGTTTCAAAGGCGGCAAACGATCCCTG CTCCTATCCA
WS226	GCGGTACCTTAAGATTTTTGGAAACCACCTATTGTATTAACATTCAAG ATTCCATGCTC
WS228	GCGGATCCAGAATGGATTTCAAAG
WS242	ACCGCTCGAGCATATGTTCTCCTTACTAAGTTTC

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

1.5 Antikörper

1.5.1 Primäre Antikörper

α -CagA (AK257)	Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale CagA-Hälfte von <i>Hp</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer)
α -CagA (AK268)	Polyklonales Antiserum gegen die N-terminale CagA-Hälfte von <i>Hp</i> P12 (Kaninchen) (J. Püls)
α - <i>Hp</i> (AK175)	Polyklonales Antiserum gegen ganze <i>H. pylori</i> -Zellen (Kaninchen) (R. Haas)
α -RecA	Polyklonales Antiserum gegen RecA von <i>Hp</i> P1 (Kaninchen) (W. Fischer)
α -M45	Monoklonales Antiserum gegen M45 (Maus) (P. Hearing, State University of New York)
α -P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper (IgG _{2b}) gegen Phosphotyrosin (Maus) (Santa Cruz Biotechnologies)

1.5.2 Sekundäre Antikörper

Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova)

Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Dianova)

Fluorescein (FITC)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova)

Rhodamin (TRITC)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Dianova)

RPMI-Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco BRL)
SOC-Medium	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Hefe-Extrakt; 8,5mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgSO ₄ ; 10mM MgCl ₂ ; pH 7,0 mit NaOH eingestellt, autoklaviert; Zugabe von 20mM (Endkonzentration) Glucose

1.9 Antibiotika und Zusätze

Ampicillin (Amp)	100mg/l (LB-Medium/-Platte)
Chloramphenicol (Cam)	30mg/l (LB-Medium/-Platte) 6mg/l (Serum-Platte)
Kanamycin (Kan)	50mg/l (LB-Medium/-Platte) 8mg/l (Serum-Platte)
Tetracyclin (Tet)	15mg/l (LB-Medium/-Platte)
Vancomycin	10mg/l (Serum-Platte)
Trimethoprim (Tmp)	1mg/l (Serum-Platte)
Nystatin	0,5mg/l (Serum-Platte)
Diaminopimelinsäure (DAP)	0,2mM (LB-Platte)

1.10 Puffer und Lösungen

Puffer zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

TFBI	30mM K-Acetat; 100mM RbCl; 10mM CaCl ₂ ; 50mM MnCl ₂ ; 15% Glycerin; pH 5,2 mit 0,2M Essigsäure eingestellt; sterilfiltriert
TFBII	10mM MOPS; 75mM CaCl ₂ ; 10mM RbCl; 15% Glycerin; pH 6,5 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert

Puffer für die Transformation von *H. pylori*

Extraktionspuffer	20mM Tris-Acetat pH 7,9; 50mM Kalium-Acetat; 5mM Na ₂ EDTA; 1mM DTT; Inhibitor-Mix
Elektroporationspuffer	272mM Saccharose; 15% (v/v) Glycerin; 2,43mM K ₂ HPO ₄ ; 0,57mM KH ₂ PO ₄

Puffer für die Zellkultur

PBS	0,2g/l KCl; 8g/l NaCl; 0,2g/l KH ₂ PO ₄ ; 1,44g/l Na ₂ HPO ₄
PBS*	PBS mit Inhibitor-Mix
Inhibitor-Mix	(hemmt Proteasen und Phosphatasen): 1mM Na-Orthovanadat; 1mM PMSF; 1µM Leupeptin; 1µM Pepstatin
Trypsin-EDTA-Lösung	PBS; 5mM Glucose; 50mM EDTA; 0,25% (w/v) Trypsin; pH 7,2

Puffer und Lösungen für DNA-Präparationen

STET-Puffer	50mM Tris-HCl; 50mM EDTA; 8% (w/v) Saccharose; 5% (v/v) Triton X-100; pH 8,0
TE-Puffer	10mM Tris-HCl; 1% (w/v) SDS; pH 8,0
P1-Puffer	50mM Tris-HCl; 10mM EDTA; 100mg/ml RNase A; pH 8,0
P2-Puffer	200mM NaOH; 1% (w/v) SDS
P3-Puffer	3M Kalium-Acetat-Essigsäure; pH 4,8
QBT-Puffer	50mM MOPS-NaOH; 750mM NaCl; 15% (v/v) Ethanol; 0,15% (v/v) TritonX-100; pH 7,0
QC-Puffer	50mM MOPS-NaOH; 1M NaCl; 15% (v/v) Ethanol; pH 8,5
QF-Puffer	50mM Tris-HCl; 1,25M NaCl; 15% (v/v) Ethanol; pH 8,5
Cell Lysis Solution	0,2M NaOH; 1% (w/v) SDS
Neutralization Solution	4,09M Guanidin-Hydrochlorid; 0,759M Kalium-Acetat; 2,12M Eisessig; pH 4,2

Wash Solution 60mM Kalium-Acetat; 8,3mM Tris-HCl pH 7,5; 40 μ M EDTA; 60% (v/v) Ethanol; pH 8,0

Cell Resuspension Solution 50mM Tris-HCl; 10mM EDTA; 100 μ g/ml RNase A; pH 7,5

Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

GEBS-Puffer 50mM EDTA; 20% (v/v) Glycerin; 0,5% (w/v) N-Laurylsarkosin; 0,05% (w/v) Bromphenolblau

TAE-Puffer 40mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 7,5

TBE-Puffer 10mM Tris-HCl; 10mM Borsäure; 0,25mM EDTA; pH 8,5

Ethidiumbromidfärbebad 1mg/l Ethidiumbromid in Wasser

Puffer für Enzymreaktionen

10x A-Puffer (Roche) 33mM Tris-Acetat; 10mM Magnesiumacetat; 66mM Kaliumacetat; 0,5mM DTT; pH 7,9

10x B-Puffer (Roche) 10mM Tris-HCl; 5mM MgCl₂; 100mM NaCl; 1mM 2-Mercaptoethanol; pH 8,0

10x H-Puffer (Roche) 50mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂; 100mM NaCl; 1mM DTE; pH 7,5

10x M-Puffer (Roche) 100mM Tris-HCl; 100mM MgCl₂; 500mM NaCl; 10mM DTT; pH 7,5

10x L-Puffer (Roche) 10mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂; 10mM DTT; pH 7,5

S1 Nuclease Mix 40,5mM Kalium-Acetat pH 4,6; 0,3M NaCl; 2,3mM ZnSO₄; 45% (v/v) Glycerin; 30U/100 μ l S1 Nuclease

S1 Nuclease Stop Puffer 0,3M Tris Base; 0,05M EDTA

Klenow Mix 20mM Tris-HCl pH 8,0; 100mM MgCl₂; 3-5U/30 μ l Klenow DNA Polymerase

10x Exo III-Puffer 660mM Tris-HCl pH 8,0; 6,6mM MgCl₂

CIP-Puffer 10mM Tris-HCl; 1mM ZnCl₂; 1mM MgCl₂; pH 8,3

Ligationspuffer 66mM Tris-HCl; 5mM MgCl₂; 1mM DTT; 1mM ATP; pH 7,5

PCR-Puffer	OptiPerform™ Buffer II (10x): 500mM Opti-Perform-KOH; 160mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,1% Tween
10x Mutagenese-Puffer	200mM Tris-HCl pH 8,8; 100mM KCl; 100mM (NH ₄)SO ₄ ; 20mM MgSO ₄ ; 1% (v/v) TritonX-100; 1mg/ml BSA

Lösung für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bradford-Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 5% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Phosphorsäure (85%ig)
------------------	--

Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Probenpuffer (2x)	50mM Tris-HCl; 100mM DTT; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8
Acrylamidlösung	29% (w/v) Acrylamid; 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngelpuffer	1,5M Tris-HCl; pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,0M Tris-HCl; pH 6,8
Elektrophoresepuffer	25mM Tris-HCl; 250mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3

Puffer und Lösungen für Western Blot

Western-Transferpuffer	25mM Tris-HCl; 192mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol; pH 8,3
TBS	20mM Tris-HCl; 150mM NaCl; pH 7,5
Detektionslösung	0,1M Tris-HCl; 7mM MgCl ₂ ; 0,1g/l NBT; 50mg/l BCIP; pH 9,6
Anodenpuffer 1	0,3M Tris-HCl; 10% (v/v) Methanol; pH 10,4
Anodenpuffer 2	25mM Tris-HCl; 10% (v/v) Methanol; pH 10,4
Kathodenpuffer	25mM Tris-HCl; 10% (v/v) Methanol; 40mM 6-Amino-n-Caprinsäure oder Glycin; pH 9,4

Waschpuffer	10mM Tris-HCl; 0,9% (w/v) NaCl; 0,2% (v/v) Tween20; pH 7,4
Absättigungspuffer	50mM Tris-HCl; 200mM NaCl; 5% (w/v) Magermilchpulver; 0,1% (v/v) Tween20; pH 7,4
Verdünnungspuffer	Waschpuffer + 1% (w/v) Magermilchpulver

Puffer für die *in vitro*-Phosphorylierung

RIPA-Puffer	150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% (w/v) NP-40-Puffer; 0,25% (w/v) Natrium-Desoxycholat; 50mM Tris-HCl pH 7,4; Inhibitor-Mix
1% NP-40-Puffer	20mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1mM Na ₃ VO ₄
10x Phosphorylation Reaction Buffer	250mM Tris-HCl pH 7,2; 400μM ATP; 62,5mM MnCl ₂ ; 312,5mM MgCl ₂ ; 625μM Na ₃ VO ₄

Lösung für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Blockierungslösung	3% (w/v) BSA in PBS
--------------------	---------------------

1.11 Chemikalien

Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%) (Roth); Agarose (Sigma); 5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) (Roth); Bromphenolblau (Serva); Brucella-Broth (Becton Dickinson); Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-)Mix (MBI Fermentas); EDTA; Ethidiumbromid (Sigma); Fluoroprep (BioMerieux); Formalin 37%; GC-Agar (Creatogen); Glutaraldehyd 25%; Lennox-L-Agar (Gibco); Lennox-L-Broth (Gibco); Leupeptin; Methyleneblau; N, N, N', N'-Tetramethyldiamid (TEMED) (Sigma); Natrium-Orthovanadat; Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT) (Roth); Paraformaldehyd (PFA); PBS Dulbecco's; Pepstatin; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Merck); RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin (Gibco BRL); SDS; Sephadex

G-50 (Pharmacia); TritonX-100; Tween20; Western Lightning oxidizing und enhanced luminol reagent (PerkinElmer); X-Gal (Sigma)

Alle weiteren Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse p.a.“ von Merck, Roth oder Sigma bezogen.

1.12 Geräte und Apparaturen

0,2µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH); Agarosegelkammern (BioRad); Anaerobentöpfe (Fritz Gössner GmbH); Brutschränke (Binder, Scholzen); Einfrierröhrchen (Nalgene); Elektroporationsküvetten (Eurogentec); Filterpapiere (Whatman); Fluoreszenzmikroskop DM RD mit Digitalkamera (Leitz); Gefriertruhe (Heraeus); Gene Pulser (BioRad); Heizblöcke (Techne); konfokales Laserscanning-Mikroskop (Leica); Kühlschrank (Liebherr); Magnetrührer (Heidolph); Mikrowelle (AEG); Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schüll); PAGE-Mini-Gelapparaturen (BioRad); PCR-Gerät (PerkinElmer Cetus); pH-Meter (WTW); Photometer (Hach); PVDF-Membran (BioRad); Rollmischer (Assistent); Röntgenfilm und Expositionskassetten (Fudji und Kodak); Schüttelinkubatoren (GFL); Schüttler (Eppendorf); Spannungsquellen (Biotec Fischer, Delta Elektronik); SpeedVac (Savant); Sterile Werkbank (BDK); Ultraschallgerät (Branson); UV-Transluminator (Kaiser); Video-Geldokumentationsanlage (Herolab); Vortex (Scientific Industries); Waagen (Fischer); Wasserbäder (GFL); Western Blot-Apparatur (Biotec Fischer); Zellkulturflaschen/-schalen (Nunc); Zellschaber (Falcon); Zentrifugen (Heraeus, Beckman, Sorvall)

2 Methoden

2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden Luria-Bertani- (LB-) Platten oder LB-Flüssigmedien verwendet, denen gegebenenfalls entsprechende Antibiotika zur Selektion zugesetzt wurden. Die Bakterien wurden nach Bedarf bei 28°C oder 37°C im Brutschrank bzw. Schüttelinkubator angezogen. Für die Stammhaltung wurden die Bakterien einer halben Platte in 1ml LB-Flüssigmedium/20% Glycerin resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

H. pylori wurde auf Serum-Platten oder antibiotikahaltigen Serum-Selektivplatten kultiviert. Die Platten wurden hierzu bei 37°C in Anaerobentöpfen oder im Brutschrank unter mikroaerophilen Bedingungen (Begasung mit 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) für ein bis zwei Tage inkubiert.

Zur Stammhaltung wurden die Bakterien einer dicht bewachsenen Platte in 1ml Brucella-Medium/20% Glycerin/10% FCS resuspendiert und bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen aus Gefrierkultur wurden die Bakterien zunächst für drei Tage bei 37°C bebrütet und anschließend auf neue Platten überimpft bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

2.1.2 Bestimmung der optischen Dichte von Flüssigkulturen

Die Bakterien wurden mit einem Wattestäbchen von der Platte abgenommen und im gewünschten Medium resuspendiert. Die optische Dichte wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=550\text{nm}$ (OD₅₅₀) gegen das unbeimpfte Medium gemessen.

2.1.3 Transformation von *E. coli*

2.1.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode

Wie von Hanahan (Hanahan, 1983) und Messing (Messing and Vieira, 1982) beschrieben wurden zur Herstellung kompetenter Zellen für die chemische

Transformation 100ml LB-Medium mit 5ml Übernacht-Kultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 5min auf Eis gekühlt, zentrifugiert (2200g, 15min, 4°C) und das Sediment dann in 20ml TFBI resuspendiert und 5min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (2200g, 15min, 4°C), in 4ml TFBII aufgenommen, nach 15min Inkubation auf Eis in Aliquots von 50-100µl abgefüllt, auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.1.3.2 Chemische Transformation von *E. coli*-Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode

Zur chemischen Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, wahlweise mit 3-5µl Ligationsansatz oder 1-2µl Plasmid-DNA versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 90s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen, bevor sie wieder für 1min auf Eis gestellt wurden. Nach Zugabe von 500µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1h bei 37°C geschüttelt, anschließend in geeigneten Aliquots auf Selektionsplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.3.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Liter LB-Medium wurde mit 10ml einer *E. coli*-Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,8 inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (2200g, 15min, 4°C), das Zellsediment in 1l eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 500ml eiskaltem Wasser resuspendiert, die Zellen wieder abzentrifugiert und anschließend mit 20ml 10%iger eiskalter Glycerinlösung gewaschen. Dann wurden die Bakterienzellen in einem Gesamtvolumen von 3-4ml 10%iger eiskalter Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots zu je 40µl auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.1.3.4 Elektroporation von *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis langsam aufgetaut, 0,8-1µl DNA zugegeben und der Ansatz dann in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mittels einer *Gene Pulser*TM Apparatur (Bio Rad) bei einer Spannung von 2,5kV, einer Kapazität von 25µF und einem Widerstand von 200Ω. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1ml LB-Medium suspendiert und 1h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden Verdünnungen des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.3.5 Transformation von superkompetenten *E. coli* TOP10-Zellen

Falls eine erhöhte Transformationseffizienz erwünscht war, wurden käufliche superkompetente *E. coli* TOP10-Zellen (Invitrogen) verwendet.

Die Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 2µl Ligationsansatz vermischt und weitere 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 30s bei 42°C im Wasserbad geschockt und wieder für 1min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium wurden die Zellen für 1h bei 37°C geschüttelt und anschließend in verschiedenen Verdünnungen auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.4 Transformation von *H. pylori*

H. pylori verfügt zwar über eine natürliche Transformationskompetenz, für die keine Vorbehandlung der Bakterien notwendig ist (Haas et al., 1993). Die Transformationseffizienz variierte aber abhängig vom jeweiligen Konstrukt stark, so dass in manchen Fällen zusätzlich weitere Formen der Transformation durchgeführt wurden.

2.1.4.1 Transformation von *H. pylori* (nach Haas et al., 1993)

Zur Herstellung des Transformationsansatzes wurden die Bakterien mit einem Wattestäbchen von der Platte abgenommen, in Brucella-Medium/10% FCS suspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 0,2-0,3 eingestellt. Anschließend wurde jeweils 1ml dieser Suspension zusammen mit 1-3µg DNA in einen Napf einer 24-Napf-

Zellkulturschale pipettiert und für 4-8h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf entsprechende Serum-Selektivplatten ausplattiert und unter Standardbedingungen 5 Tage inkubiert (Haas et al., 1993).

2.1.4.2 Transformation nach *in vitro*-Methylierung (nach Donahue et al., 2000)

Die ortsspezifische *in vitro*-Methylierung von Plasmid-DNA durch einen zellfreien *H. pylori*-Extrakt vor der Transformation soll die DNA vor stammspezifischen Restriktionsenzymen schützen und somit die Transformation erleichtern (Donahue et al., 2000).

Dafür wurde zunächst *H. pylori*-Extrakt hergestellt, indem die Zellen einer Flüssigkultur (OD₅₅₀ = 0,6-0,9) abzentrifugiert (2200g, 5min) wurden und das Bakterienpellet in 5ml Extraktionspuffer suspendiert wurde. Die Zellen wurden dann auf Eis mittels Ultraschall lysiert und der Ansatz zentrifugiert (15000g, 5min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und darin die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (siehe II 2.4.1).

Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 50µl) enthielt 12µg Plasmid-DNA aus einer QIAGEN-Midi-Präparation (siehe II 2.3.1.2), 25µl *H. pylori*-Extrakt (300-400µg Protein), 10µl Extraktionspuffer sowie 200µM SAM und wurde 1h lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe II 2.4.2) und eine Ethanol-fällung (siehe II 2.3.12) der Plasmid-DNA durchgeführt.

Für die nachfolgende Transformation wurden die Bakterien von Platte abgenommen und in Brucella-Medium suspendiert. Zu 25µl dieser Zellsuspension (ca. 10¹⁰-10¹¹ Zellen) wurde 1µg der behandelten Plasmid-DNA gegeben, der Ansatz in die Mitte einer Serum-Platte getropft und diese 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluß daran wurden 100µl Brucella-Medium auf den eingetrockneten Tropfen pipettiert und mit dem Glasspatel auf der Serum-Platte verteilt. Nachdem die Platte noch einmal bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert worden war, konnte der Bakterienrasen mit einem Wattestäbchen abgenommen und in 1ml Brucella-Medium suspendiert werden. Nach Zentrifugation (2200g, 5min) wurden geeignete Verdünnungen auf Selektivplatten ausplattiert.

2.1.4.3 Transformation durch Elektroporation (nach Segal und Tompkins, 1993)

Für die Transformation mittels Elektroporation (Segal and Tompkins, 1993) wurden die *H. pylori*-Zellen einer dicht bewachsenen Serum-Platte in Brucella-Medium suspendiert und durch Messung der OD₅₅₀ eine Zellsuspension mit ca. 10⁹ Zellen hergestellt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (2200g, 5min), dreimal mit je 1ml Elektroporationspuffer gewaschen und dann in 40µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde mit 2µg Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte in einer Gene Pulser™ Apparatur (Bedingungen wie in II 2.1.3.4). Anschließend wurden sofort 950µl PBS zugegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2200g, 5min) und Aliquots auf Serum-Platten ausplattiert, welche über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet wurden. Am nächsten Tag wurde der Bakterienrasen mittels Wattestäbchen abgenommen, in Brucella-Medium resuspendiert, die Zellen wie oben beschrieben abzentrifugiert und Aliquots auf Serum-Selektivplatten ausplattiert.

2.1.5 Konjugation von *H. pylori* (nach Heuermann und Haas, 1998)

Der Shuttle Vektor pHel2, der sowohl in *E. coli* als auch in *H. pylori* replizieren kann, ist im allgemeinen schlecht transformierbar und wurde deshalb mittels Konjugation vom *E. coli*-Donorstamm β2155 auf den *H. pylori*-Akzeptorstamm übertragen (Heuermann and Haas, 1998). Dazu wurden Donor- und Akzeptorstamm auf geeignete LB- bzw. Serum-Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in 1ml Brucella-Medium/10% FCS resuspendiert und die OD₅₅₀ der Bakteriensuspensionen bestimmt. Donor- und Akzeptorstamm wurden im gewünschten Gesamtvolumen im Verhältnis 1:10 gemischt und der Konjugationsansatz dann abzentrifugiert (2200g, 5min). Der Überstand wurde bis auf ca. 30µl verworfen, die Bakterien im Restmedium resuspendiert und anschließend auf einen Nitrozellulose-Filter, der auf eine Serum-Platte gelegt worden war, pipettiert. Nach 3-4h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Bakterien mit 1ml Brucella-Medium von dem Filter in ein steriles 15ml-Röhrchen gespült. Der Ansatz wurde auf entsprechende Serum-Selektivplatten ausplattiert und 5 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Nur der *H. pylori*-

Akzeptorstamm kann auf den Serumplatten wachsen, da der *E. coli*-Donorstamm DAP-haltige Platten benötigt.

2.2 Arbeiten mit Zellkulturen

2.2.1 Kultivierung von AGS-Zellen

Die Kultivierung der humanen Magenkarzinomzelllinie AGS erfolgte in 75cm²-Zellkulturflaschen in RPMI-Medium (supplementiert mit 10% FCS) bei 37°C und 5% CO₂. Von einer konfluent gewachsenen Kultur wurde das Medium abgesaugt und die adhärenzte Zellschicht einmal mit 5ml PBS-Dulbecco's gewaschen, um Mediumreste und abgelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für etwa 10min bei 37°C und 5% CO₂ mit 2ml Trypsin-EDTA-Lösung (1x) inkubiert, was das Ablösen der Zellen von der Unterlage bewirkt. Sobald alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst waren (mikroskopische Kontrolle), wurde die Protease durch Zugabe von 2ml RPMI-Medium inaktiviert und 1ml der Zellsuspension zu 10ml frischem Kulturmedium in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Bei einer Verdopplungszeit der AGS-Zellen von 24h wurde dieser Vorgang jeden zweiten Tag wiederholt.

Für Infektionsexperimente wurden die AGS-Zellen je nach Bedarf in 6-Napf-Zellkulturschalen (10cm² Grundfläche und 2ml Medium pro Napf), 24-Napf-Zellkulturschalen (2cm² Grundfläche und 1ml Medium pro Napf) oder 75cm² -Zellkulturflaschen (25ml Medium) angezogen. Zellsuspension und Zellkulturmedium wurden entsprechend der verwendeten Zellkulturschale gemischt, in die Nöpfe pipettiert und dann bei 37°C und 5% CO₂ bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert.

2.2.2 Infektionsexperimente mit *H. pylori*

Die Bakterien wurden mit einem Wattestäbchen von einer dicht bewachsenen Platte abgenommen und in Brucella-Medium resuspendiert, anschließend wurde die OD₅₅₀ gemessen.

Vor Infektion der AGS-Zellen mit den *H. pylori*-Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

2.2.2.1 Infektion für Phosphotyrosin-Assay

Auf die konfluent gewachsene AGS-Zellschicht einer 6-Napf-Zellkulturschale (ca. 1×10^6 Zellen) wurde die *H. pylori*-Suspension pipettiert, so dass die OD_{550} im Infektionsansatz 0,1 betrug, was in etwa einer m.o.i. (*multiplicity of infection*) von 100 entspricht. Der Ansatz wurde 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, danach wurde die Schale auf Eis gestellt und die Zellen 4x mit 1ml PBS pro Napf gewaschen. Dann wurde jeder Napf mit 1ml PBS* gefüllt und die Zellen mit einem Zellkulturschaber vom Schalenboden abgelöst. Die infizierten Zellen wurden nun abzentrifugiert (1000g, 10min, 4°C), das Sediment in 30µl PBS* aufgenommen und die Proben dann im Verhältnis 1:2 mit SDS-Probenpuffer (2x) gemischt, bevor sie wie unter II 2.4.3.1 beschrieben weiterbehandelt wurden.

2.2.2.2 Infektion für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

AGS-Zellen wurden auf Glas-Deckgläsern in einer 24-Napf-Zellkulturschale bis zu einer Konfluenz von ca. 50% kultiviert (ca. 1×10^5 Zellen pro Deckglas) und mit der *H. pylori*-Suspension versetzt (End- OD_{550} = 0,05; m.o.i. = 100). Die Infektionszeit betrug je nach Experiment zwischen 30 und 240min bei 37°C und 5% CO₂, im Anschluss daran wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie (siehe II 2.6.2) vorbereitet.

2.3 Arbeiten mit DNA

Die meisten der in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden gehen auf Sambrook et al. zurück (Sambrook and Russell, 2001).

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der Koch-Methode (Holmes and Quigley, 1981)

Diese Methode eignet sich besonders zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *endA1*-*E. coli*-Stämmen, wohingegen bei *endA1*⁺-Stämmen die isolierte Plasmid-DNA zwar für eine anschließende Transformation, nicht aber für eine Restriktionsanalyse verwendet werden kann.

Von einer Einzelkolonie, die auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C oder 28°C gewachsen war, wurde eine Impföse Zellmaterial in 300µl STET-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 15µl Lysozym-Lösung wurde die Zellsuspension kurz gemischt und für 5min auf Eis gestellt. Die Proben wurden dann für 1min im Wasserbad gekocht und anschließend abzentrifugiert (20000g, 15min). Das Sediment, bestehend aus Zelltrümmern und gefällter chromosomaler DNA, wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 200µl Isopropanol und 10-minütiger Inkubation bei -20°C gefällt und dann abzentrifugiert (20000g, 10min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen, bevor die Plasmid-DNA schließlich in einer Vakuumzentrifuge 15min getrocknet und dann in 50µl sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen wurde.

2.3.1.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit dem „Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN)

Um Plasmid-DNA in größerer Menge bzw. größerer Reinheit (etwa für eine Sequenzierung, siehe II 2.3.13) zu gewinnen, wurde das „Plasmid Midi Kit“ von QIAGEN verwendet und die DNA säulenchromatographisch aufgereinigt.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.3.1.3 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN)

Das „QIAprep Miniprep“ von QIAGEN diente der Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA, die anschließend für eine Sequenzierung im Max von Pettenkofer-Institut (siehe II 2.3.13) verwendet wurde und erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *H. pylori*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori* wurde das „WizardTM Plus SV Minipreps DNA-Purifikationssystem“ von Promega verwendet.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.3.3 Präparation von chromosomaler DNA aus *H. pylori*

Die Präparation von chromosomaler DNA aus *H. pylori* erfolgte mit Hilfe des „QIAamp Tissue Kit“ von QIAGEN.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Für analytische Gelelektrophoresen wurden Horizontalgele mit einer Agarosekonzentration von 0,8-2,0% (w/v) je nach gewünschtem Auftrennungsbereich eingesetzt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1xTBE-Puffer gelöst und nach Abkühlung auf ca. 50°C in eine 11,5 x 15cm² große Gelkassette gegossen. Ein eingesetzter Kamm diente der Bildung von Probestaschen. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben (je nach Kopienzahl des Plasmids zwischen 1-5µl einer Koch-Präparation, siehe II 2.3.1.1) mit ¼ Volumen GEBS versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 100V mit 1xTBE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel 10-15min lang in einer Ethidiumbromidlösung (1mg/l) gefärbt und die DNA-Banden durch UV-Licht (260nm) sichtbar gemacht. Für die Dokumentation wurde ein Videosystem der Firma Polaroid/Intas verwendet.

Die präparative Gelelektrophorese erfolgte mit 1xTAE-Puffer als Gel- und Laufpuffer und wurde bei 50V für 3h oder bei 12V über Nacht durchgeführt. Die DNA wurde durch 10-minütiges Schwenken des Gels in einer 0,1%igen (w/v) Methyleneblau-Lösung gefärbt. Nach anschließendem Wässern konnten die Banden auf einem Durchlichttisch ausgeschnitten und dann mittels des „Ultra Clean™ 15 Kit“ von Mo Bio Laboratories aus der Agarose herausgelöst werden (siehe II 2.3.5).

2.3.5 DNA-Fragmentisolierung

Um DNA-Fragmente nach einer präparativen Gelelektrophorese aus dem Agarosegel herauszulösen, wurde das „Ultra Clean™ 15 Kit“ von Mo Bio Laboratories herangezogen. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.3.6 Restriktion

Die Restriktion von DNA wurde üblicherweise in einem Volumen von 10µl für analytische bzw. 50-80µl für präparative Zwecke durchgeführt. Puffer- und Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen richteten sich dabei nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Es wurden 0,1-1µg DNA und eine Enzymmenge von etwa 1-2U/µg DNA eingesetzt. Wenn bei Restriktionen mit mehreren Enzymen nicht ein und derselbe Puffer verwendet werden konnte, wurde zwischen den einzelnen Reaktionsschritten eine Zentrifugationsentsalzung vorgenommen. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde jeweils ¼ Volumen GEBS zugegeben und 10min bei 70°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf analytischen Agarosegelen (siehe II 2.3.4) überprüft und vor einer Ligation (siehe II 2.3.9) durch Zentrifugationsentsalzung oder präparative Agarosegele gereinigt (siehe II 2.3.4).

2.3.6.1 Restriktion mit dem Erase-a-Base™-System (Promega)

10µg Plasmid-DNA wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Eines der Enzyme muß dabei einen 3'-Überhang, der nicht von Exonuclease III verdaut werden kann, erzeugen, das andere einen 5'-Überhang oder *blunt ends*. Da die Exonuclease III bereits durch kleine Mengen NaCl inhibiert wird, musste die geschnittene Plasmid-DNA zunächst durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und dann mit Ethanol gefällt werden. In einem Gesamtvolumen von 60µl wurden 5µg DNA mit 6µl 10x Exo III-Puffer und H₂O vermischt und 300-500U/µg DNA Exonuclease III zugegeben. Die Reaktion wurde bei 4°C durchgeführt, was einer Geschwindigkeit des Verdaus von 25bp/min entspricht. In Abständen von jeweils 1min wurden 5µl des Ansatzes abgenommen und zu 15µl eisgekühltem S1-Nuclease Mix pipettiert, wodurch die Reaktion abgestoppt wurde. Gleichzeitig entfernt die S1-Nuclease verbleibende Einzelstränge. Dann wurden die Proben 30min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich die S1-Nuclease durch Zugabe von 1µl S1-Nuclease Stop Puffer und Inkubation für 10min bei 70°C inaktiviert. Nach Ethanol-Fällung wurde die DNA in 9µl TE-Puffer resuspendiert und mit 1µl Klenow Mix versetzt, die darin enthaltene DNA-Polymerase erzeugt *blunt ends*. Nach 3-minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde 1µl dNTPs zugegeben und für

weitere 5min bei 37°C inkubiert. Der Klenow Mix wurde dann durch Inkubation für 10min bei 65°C inaktiviert. Die Fragmente konnten nun ligiert und in *E. coli* transformiert werden, um anschließend die entstandenen Deletionen durch Sequenzierung zu verifizieren.

2.3.7 Dephosphorylierung linearer DNA

Um die Ligationseffizienz von DNA-Fragmenten mit Vektoren, die nur mit einem Enzym linearisiert worden waren, zu erhöhen, wurde das 5'-Ende des Vektors dephosphoryliert und damit die Anzahl der Rückliganden stark vermindert. Der entsalzte Restriktionsansatz wurde mit CIP-Puffer und 1U/μg DNA CIP (alkalische Phosphatase) versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS und EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,5% (w/v) bzw. 5mM beendet. Die Phosphatase wurde anschließend durch 30-minütige Inkubation mit 0,1mg Proteinase K bei 56°C verdaut. Der Ansatz wurde mit 10μl GEBS versetzt und 10min bei 65°C inaktiviert. Der Vektor konnte dann nach Durchführung einer Zentrifugationsentsalzung für die Ligation eingesetzt werden.

2.3.8 Zentrifugationsentsalzung

Die Zentrifugationsentsalzung wurde als ausschlusschromatographisches Verfahren zur schnellen Abtrennung von Salzen, Nukleotiden, denaturierten Proteinen und kleinen DNA-Fragmenten eingesetzt. In ein 1,5ml Eppendorfgefäß, dessen Boden mit einer Kanüle durchbohrt worden war, wurde zunächst ein Tropfen silikonisierter Glasperlen gegeben, die der Abdichtung des Loches dienten. Anschließend wurden 1,5ml des Säulenmaterials Sephadex G-50 (in wässriger Lösung) zupipettiert. Zur Äquilibrierung wurde die Säule zentrifugiert (1300g, 2min), nachfolgend mit 100μl destilliertem Wasser beladen und wieder wie oben beschrieben zentrifugiert. Die zu entsalzende Probe wurde mit ¼ Volumen GEBS gemischt, auf die Säule aufgetragen und nach erneuter Zentrifugation (1300g, 2min) in einem frischen Eppendorfgefäß aufgefangen.

2.3.9 Ligation

Ligationen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 10µl bei einer Temperatur von 4°C über Nacht oder über 4h bei 14°C. Hierzu wurden üblicherweise 1µl Ligationspuffer (10x) und 1U T4-DNA-Ligase sowie das zu klonierende DNA-Fragment in einem 3-4fachen Überschuss zu der geschnittenen Vektor-DNA eingesetzt.

2.3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) erlaubt die effektive und selektive Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Die Spezifität der Reaktion für die ausgesuchte Sequenz wird durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden erreicht, die sich nach Hitzedenaturierung der DNA an die Einzelstränge anlagern und als Primer für DNA-Polymerasen thermophiler Bakterien dienen. Die hitzestabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* katalysiert nach Zusetzen der vier Desoxyribonukleotide die Verlängerung des Einzelstrangs vom 3'-Ende aus. Beim nachfolgenden Denaturierungsschritt trennen sich die entstandenen Doppelstränge wieder. Dieser Zyklus kann in einem Reaktionsansatz mehrfach wiederholt werden und die im Überschuß vorhandenen Oligonukleotide können dadurch nicht nur an die parenteralen, sondern auch an die neusynthetisierten DNA-Stränge hybridisieren. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der Ausgangs-DNA.

Ein Reaktionsansatz mit 100µl Gesamtvolumen enthielt üblicherweise 1-2ng der Matrizen-DNA (das entspricht in etwa 2µl einer 1:25 verdünnten chromosomalen DNA bzw. einer 1:100 verdünnten Plasmid-DNA), je 100pmol der Oligonukleotide, je 0,2mM aller dNTPs, PCR-Puffer und 1-2U Expand Taq-Polymerase.

In der Regel wurde der folgende Reaktionszyklus 25mal wiederholt: Denaturierung der DNA für 1min bei 94°C, Hybridisierung der Oligonukleotide für 2min bei 42-52°C und Polymerisation für 2min bei 72°C.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf einem TBE-Agarosegel analysiert und die PCR-Fragmente durch eine präparative Gelelektrophorese aufgereinigt, bevor sie zur Sequenzierung oder Klonierung eingesetzt wurden.

2.3.10.1 PCR mit dem ExSite™ Mutagenesis Kit (Stratagene)

Dieses Kit diente der Herstellung spezifischer Mutationen in doppelsträngiger DNA. Nach erfolgter PCR (bei der darauf zu achten ist, dass mindestens einer der beiden Primer am 5'-Ende phosphoryliert ist, um eine ausreichende Ligationseffizienz zu erreichen), wurde das PCR-Produkt über eine präparative Gelelektrophorese aufgereinigt und anschließend aus dem Gelfragment isoliert. 15µl der in Wasser gelösten DNA wurden mit 7,5µl H₂O und 2,5µl Mutagenese-Puffer gemischt. Dann wurden 1µl der Endonuklease *DpnI* (10U/µl) zugegeben, welche nur methylierte DNA (also das Ursprungsplasmid) schneidet, sowie 0,5µl *Pfu*-DNA-Polymerase (2,5U/µl), die *blunt ends* erzeugt. Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C und für weitere 30min bei 72°C inkubiert und schließlich mit 100µl destilliertem, sterilem H₂O, 10µl 10x Mutagenese-Puffer und 5µl 10mM rATP versetzt. 10µl davon wurden durch Zugabe von 1µl T4-DNA-Ligase ligiert.

2.3.11 Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning™ (Invitrogen)

Der Vorteil der Ligation von PCR-Produkten mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) mittels des TOPO-TA-Cloning™-Kits liegt in der hohen Effizienz dieser Ligation auch bei sehr langen PCR-Produkten. Grund dafür ist die Sequenz-unspezifische terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, welche bei jeder Kettenverlängerung Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt. Der linearisierte pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt einen überhängenden 3'-Desoxythymidin-Rest (T) und eine kovalent gebundene Topoisomerase I aus dem *Vaccinia Virus*, wodurch die effektive Ligation vermittelt wird.

Nach der Ligation erfolgt die Transformation in die – ebenfalls im Kit enthaltenen – superkompetenten *E. coli* TOP10-Zellen (siehe). Transformanten, welche das PCR-Produkt enthalten, können kein LacZ mehr bilden. Sie sind daher durch fehlende Blaufärbung zu erkennen, weil das Substrat X-Gal, das vorher auf der Platte ausplattiert wurde, nicht mehr umgesetzt werden kann.

2.3.12 DNA-Fällung mit Ethanol

Diese Methode wurde, z.B. vor einer nachfolgenden Sequenzierung, zur Konzentrierung und Entsalzung DNA-haltiger Lösungen angewendet. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 3M Natriumacetat-Lösung und dem 2,5fachen Volumen Ethanol versetzt und das Gemisch 30min lang bei -70°C inkubiert. Die DNA wurde abzentrifugiert (20000g, 10min) und nach Verwerfen des Überstands mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und dann entweder zum Sequenzieren verschickt, oder in gewünschtem Volumen destilliertem Wasser aufgenommen.

2.3.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA nach Sanger, auch Kettenabbruchreaktion genannt, erlaubt die präzise Bestimmung der Basenabfolge. Das Verfahren entspricht einer Polymerase-Kettenreaktion, wobei der Reaktionsansatz zusätzlich fluoreszent markierte Nukleotid-Analoga (Terminatoren) enthält, deren Einbau in die DNA zum Kettenabbruch führt. Auf diese Weise entsteht ein Gemisch verschieden langer neu synthetisierter Stränge, an deren 3'-Ende sich jeweils ein fluoreszierender Terminator befindet (verschiedene Fluoreszenzmarker für die vier verschiedenen Basen). Werden die Produkte der Sequenzierungsreaktion auf einem Gel der Größe nach aufgetrennt, entsteht ein Bandenmuster, aus welchem auf die Position der einzelnen Basen in der Sequenz geschlossen werden kann.

DNA-Sequenzierungen wurden im Max von Pettenkofer-Institut und in Zusammenarbeit mit MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt – in diesem Fall wurden PCR-Produkte vorher mit Ethanol gefällt und eingesetzte Plasmid-DNA über Qiagen-Säulen isoliert und gereinigt (siehe II 2.3.12 und 2.3.1.2).

Für Sequenzierungen, die im Max von Pettenkofer-Institut angefertigt wurden, musste zunächst die Sequenzierungs-PCR angesetzt werden. Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20 μl) hierfür enthielt 100ng DNA (PCR-Produkt) bzw. 200-500ng Plasmid-DNA aus einer QIAprep Spin Miniprep (siehe II 2.3.1.3) als Matrize, 4 μl T Mix (Big Dye) und 1 μl Primer (5pmol/ μl). Die Denaturierung der DNA erfolgte 10s lang bei 96°C , es folgten 5s Hybridisierung des Primers bei $45-60^{\circ}\text{C}$ und 4min

Polymerisation bei 60°C. Dieser Reaktionszyklus wurde 25mal wiederholt und der Reaktionsansatz anschließend mit Ethanol gefällt bevor die Sequenzierung erfolgte.

2.4 Arbeiten mit Protein

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Der Farbbindungstest nach Bradford diente der Abschätzung der Konzentration proteinhaltiger Lösungen.

Es wurden 100µl der proteinhaltigen Lösung nach Zugabe von 1ml Bradford-Reagenz für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Extinktion der Probe gegen einen entsprechenden Blindwert bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit BSA erstellt.

2.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Extraktion ist für die Entfernung von Proteinen aus einer Lösung geeignet.

Dazu wird die Probe zunächst mit gleichem Volumen Phenol versetzt, gut gemischt und 5min bei 60°C im Heizblock inkubiert. Danach werden die Phasen durch 5-minütige Inkubation auf Eis entmischt. Nach Zentrifugation (20000g, 2-3min) kann die wässrige (obere) Phase entnommen und in ein neues Gefäß überführt werden. Es wird gleiches Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und die Probe zur Phasentrennung wieder auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (20000g, 2-3min) kann die wässrige Phase abgenommen werden.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durch das Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt und nachfolgend färberisch oder mit Hilfe von spezifischen Antikörpern dargestellt werden (Laemmli, 1970). Die denaturierten und mit SDS (einem anionischen Detergenz) behandelten Proteine liegen als Anionen mit gleicher Ladungsdichte vor, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld proportional dem

Molekulargewicht ist. Der Gehalt (%) an Acrylamid bestimmt dabei den Auftrennungsbereich des Geles.

2.4.3.1 Probenvorbereitung

Zur Herstellung bakterieller Lysate wurde eine Impföse Zellmaterial von Platte abgenommen, in 150µl Wasser suspendiert und 150µl SDS-Probenpuffer (2x) zugegeben. Vor dem Auftragen wurden die Proben 10min bei 95°C gekocht und abzentrifugiert (20000g, 2min).

2.4.3.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Analytische Gelelektrophoresen wurden mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-ProteallTM von BioRad durchgeführt. Das Trenngel (je nach Anwendung 6, 8, 10 oder 12%ig) wurde bis 3cm unter den Rand in die Glaskassette gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das überstehende Wasser abgezogen und das zuvor angesetzte Sammelgel (5%) eingefüllt. Das Sammelgel diente als obere Phase des Geles dem besseren Einlaufen und dem Konzentrieren der Proteine an der Gelgrenzfläche. Zur Ausbildung von Geldaschen wurde ein Kamm eingesetzt, der nach erfolgter Polymerisation entfernt wurde. Die Gelkassette wurde in die Elektrophoresegelkammer eingesetzt, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Taschen gründlich gespült. Anschließend wurden 5-10µl der Proteinproben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte ca. 2h bei einer Spannung von 120V.

	Trenngel (für 5ml) [ml]				Sammelgel (für 1ml) [ml]
	6%	8%	10%	12%	5%
Acrylamid/Bis (30%)	1,0	1,3	1,7	2,0	0,17
Trenngelpuffer	1,3	1,3	1,3	1,3	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	0,13
H ₂ O	2,6	2,3	1,9	1,6	0,68
SDS (10%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01
APS (10%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01
TEMED	0,004	0,003	0,002	0,002	0,001

2.4.4 Western Blot

Es wurde ein Blotverfahren nach Towbin (1979) durchgeführt. Dabei werden geelektrisch aufgetrennte Proteine (siehe II 2.4.3.2) vom Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen übertragen (Towbin et al., 1979). In diesem Fall erfolgt der Transfer mittels eines Semi-Dry-Graphitplattensystems. Auf den Trägermembranen erfolgt dann der Nachweis einzelner Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

2.4.4.1 Allgemeiner Western Blot-Assay

Auf die Graphitanode wurde ein Stapel aus zwei dicken und zwei dünnen Filterpapieren sowie die Nitrozellulose-Membran gelegt, wobei alle Schichten vorher in Western-Transferpuffer getränkt worden waren. Nachdem das Gel aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und das Sammelgel entfernt worden war, wurde es (luftblasenfrei) auf die Membran gelegt. Es folgten wiederum zwei dünne und zwei dicke in Transferpuffer getränkte Filterpapiere, dann wurde die Graphitkathode aufgebracht. Der Proteintransfer erfolgte 1h bei $1\text{mA}/\text{cm}^2$.

Um unbesetzte Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese für mindestens 30min in 5ml TBS/3% (w/v) BSA (in 50ml-Röhrchen) geschwenkt. Dann wurde der erste Antikörper in entsprechender Menge appliziert und die Membran über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit 5ml TBS/0,5% (v/v) Tween20 (3x für je 5min) entfernt. Anschließend konnte der zweite Antikörper (POX-gekoppelt) bzw. Protein A (AP-gekoppelt) zugegeben werden. Nach 1h Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal 5min lang wie oben beschrieben gewaschen.

Entwicklung mit AP-Konjugaten

Die Membran wurde in einer Plastikschaale in 10ml Detektionslösung geschwenkt. Sobald die Proteinbanden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion durch ausgiebiges Waschen mit Wasser gestoppt.

Entwicklung mit POX-Konjugaten

Wenn mit POX-Konjugaten gearbeitet wird, können Western Lightning™ Detektionsreagenzien für Western Blot (PerkinElmer Life Sciences) verwendet werden, die eine sensitivere Detektion von Proteinbanden über Chemilumineszenz ermöglichen.

Dazu wurden je 3ml der beiden Detektionslösungen (Western Lightning™ *oxidizing* bzw. *enhanced luminol reagent*) in eine Plastikschaale pipettiert und die Membran für 1min darin geschwenkt. Dann wurde die getränkte Membran in eine Expositionskassette gelegt und eine durchsichtige Folie luftblasenfrei darübergeklebt, so dass keine Flüssigkeit mehr austreten konnte. In der Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm über die Membran in der Expositionskassette gelegt und 10, 30 oder 60s lang belichtet, bevor der Film entwickelt wurde.

2.4.4.2 Phosphotyrosin-Assay

Zum Nachweis tyrosinphosphorylierter Proteine wurde ein Phosphotyrosin-Assay mit α -P-Tyr mAK PY99 durchgeführt.

Der Blotaufbau entspricht dem in II 2.4.3.1, jedoch wurden die beiden unteren dicken Filterpapiere in Anodenpuffer 1 getränkt, die folgenden dünnen Filterpapiere in Anodenpuffer 2. Die anstelle der Nitrozellulose-Membran verwendete PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol befeuchtet und dann ebenfalls in Anodenpuffer 2 getränkt, die oberen Lagen Filterpapier alle in Kathodenpuffer. Der Transfer erfolgte 1½h bei 1mA/cm².

Zur Blockierung unbesetzter Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht in 5ml Absättigungspuffer inkubiert. Dieser Puffer wurde anschließend verworfen und der Antikörper PY99 1:1000 in 5ml Verdünnungspuffer gegeben. Nach 1½h Hybridisierung wurde 2h lang gewaschen, wobei der Waschpuffer alle 15min gewechselt wurde. Danach wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper α -Maus-IgG-POX (1:2500 in 5ml Verdünnungspuffer) 1h auf dem Rollmischer inkubiert. Schließlich wurde dreimal je 10min gewaschen und mit der Western Lightning™ Detektionsreagenz von PerkinElmer entwickelt (siehe II 2.4.3.1).

2.5 *In vitro*-Phosphorylierung (verändert nach Asahi et al., 2000)

Bei Deletionsmutanten wurde die Phosphorylierbarkeit ihrer verkürzten CagA-Proteine *in vitro* überprüft (Asahi et al., 2000). Die AGS-Zellen zweier 75cm² Zellkulturflaschen (ca. 2×10^7 Zellen) wurden mit PBS* gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgekratzt und nach Überführung in ein steriles Röhrchen abzentrifugiert (1000g, 5min, 4°C). Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in 300µl eisgekühltem RIPA-Puffer lysiert. Die *H. pylori*-Zellen wurden mit einem Wattestäbchen von der Platte abgenommen, in Brucella/10% FCS suspendiert und die OD₅₅₀ entsprechend einer Zellzahl von ca. 3×10^9 /ml eingestellt. Die $1,5 \times 10^8$ Bakterien wurden nach Zentrifugation (2200g, 5min) in 22,5µl eisgekühltem RIPA-Puffer lysiert und anschließend 22,5µl des AGS-Zellysats und 5µl 10x Phosphorylation Reaction Buffer zugegeben und der Ansatz 60min bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde noch SDS-Probenpuffer (5x) zugegeben, bevor die Proben wie in II 2.3.4.1 weiterbehandelt wurden.

2.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

2.6.1 Immunfluoreszenz mit ganzen Bakterien

Die Näpfe einer 24-Napf-Zellkulturschale wurden mit runden Deckgläsern versehen. Je 1ml der Bakteriensuspension in PBS (OD₅₅₀ = 0,01) wurden zugegeben, dann wurden die Bakterien auf die Deckgläser zentrifugiert (3000g, 5min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen 30min bei Raumtemperatur mit 3% (w/v) PFA (in PBS) fixiert. Es wurde zweimal mit je 1ml PBS gewaschen, dann erfolgte die Zugabe von 1ml Blockierungslösung pro Napf (Einwirkdauer 15min bei RT). Auf Parafilm wurden 50µl-Tropfen des ersten Antikörpers vorgelegt und die Deckgläser mit Hilfe einer Pinzette – mit der Bakterienseite nach unten – auf die Tropfen aufgebracht. Bei Raumtemperatur wurde 1h inkubiert, wobei der Ansatz durch Abdeckung mit einer Schachtel vor Verdunstung geschützt war. Nach dreimaligem Waschen in je einem 250µl-Tropfen PBS wurden die Deckgläser auf einen 50µl-Tropfen des zweiten Antikörpers gelegt (1h, RT). Danach wurde erneut dreimal gewaschen und die Deckgläser schließlich mit der Bakterienseite nach unten auf je einen kleinen Tropfen Fluoprep (auf einem Glasobjektträger) gedrückt. Die

Proben wurden ca. 1h bei RT im Dunkeln getrocknet und konnten dann mittels eines Immunfluoreszenz-Mikroskops (Leica) mit Kameraaufsatz beurteilt werden.

2.6.2 Doppelimmunfluoreszenz zum Nachweis von Proteinen im AGS-Zellplasma

Die Doppelimmunfluoreszenz bietet die Möglichkeit mit Hilfe zweier Antikörper mit unterschiedlicher Fluoreszenz verschiedene Proteinstrukturen gleichzeitig sichtbar zu machen. Falls die Antikörper aus verschiedenen Tieren stammen, kann die Inkubation in einem Ansatz erfolgen, sonst müssen die Reaktionen nacheinander durchgeführt werden.

Wie unter II 2.2.2.2 beschrieben wurden die AGS-Zellen für Infektionsexperimente mit anschließender Immunfluoreszenz-Mikroskopie in 24-Napf-Zellkulturschalen auf Deckgläsern kultiviert und infiziert. Die nicht an AGS-Zellen haftenden Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit je 1ml PBS entfernt und anschließend die Zellen und adhärennten Bakterien durch Zugabe von 0,5ml 3% (w/v) PFA (in PBS) fixiert (1h, 4°C). Um intrazelluläre Proteine für den Antikörper zugänglich zu machen und somit nachweisen zu können, wurden die Zellen nach erneutem dreimaligem Waschen mit je 1ml PBS mit 0,5ml 0,1% (v/v) TritonX-100 (in PBS) 10min permeabilisiert. Danach wurde dreimal mit je 1ml PBS gewaschen und zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 0,5ml Blockierungslösung 5min inkubiert. Jedes Deckglas wurde auf einen auf Parafilm vorgelegten 50µl-Tropfen des ersten Antikörpers (α -M45 1:50, α -Hp (AK175) 1:500) gelegt (Bakterienseite nach unten) und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in je einem 250µl-Tropfen PBS wurden die Deckgläser auf je einen 50µl-Tropfen des zweiten Antikörpers (TRITC-gekoppelter α -Maus-IgG 1:500, FITC-gekoppelter α -Kaninchen-IgG 1:500) gebracht (1h, RT). Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurden die Deckgläser auf einen Tropfen Fluoprep (auf Glasobjektträgern) gelegt und angedrückt. Die Objektträger wurden ca. 1h lang im Dunkeln getrocknet und dann mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet.

III Ergebnisse

1 Translokation eines Typ IV-unabhängigen Proteins mittels *cagA*

Bei der Untersuchung eines möglichen Sekretionssignals stellt sich nicht nur die Frage nach Sequenzen, die für die Translokation notwendig sind, sondern auch welcher Teil des Proteins hierfür hinreichend ist, d.h. ob beispielsweise die C- oder N-terminale Hälfte allein bereits den intrazellulären Transport zum Sekretionsapparat erlaubt und die Translokation des Proteins gewährleistet. Zu diesem Zweck sollte versucht werden, ein bakterienfremdes, Typ IV-unabhängiges Protein durch Fusion mit einer CagA-Hälfte in eine AGS-Zelle zu translozieren, wobei das bakterienfremde Protein als Reporterprotein fungieren sollte.

1.1 Herstellung N-terminaler und C-terminaler Fusionen des CagA-Proteins mit GFP

Um einen ersten Eindruck davon zu bekommen, welche Rolle der N-, bzw. der C-Terminus des CagA-Proteins beim Transport zum Typ IV-Sekretionsapparat oder der Translokation selbst spielt, wurden Fusionen des CagA-Proteins mit dem GFP (*green fluorescent protein*) angefertigt. In einigen Sekretionssystemen erwiesen sich Fusionen mit GFP als translozierbar (Jacobi et al., 1998). Dieses Protein, das als Marker für die Genexpression oder als *Tag* für die Bestimmung der Lokalisation von Proteinen verwendet werden kann, kann durch Fluoreszenz-Mikroskopie einfach detektiert werden und eignet sich daher als Reporterprotein.

Zur Herstellung der Fusionen wurden translationale Fusionen des *cagA*-Gens mit dem *gfpmut2*-Gen (Cormack, 1996) erzeugt, welches das Grün Fluoreszierende Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* kodiert. Dieses mutierte GFP hat ein im Vergleich zum Wildtyp-GFP verschobenes Maximum der Anregungswellenlänge und in *E. coli* zusätzlich eine effizientere Faltung. Beides trägt dazu bei, dass die Fluoreszenz dieses Proteins gegenüber dem Wildtyp-GFP um ein vielfaches gesteigert ist, was die Detektion erleichtert.

Von dem *gfpmut2*-Plasmid (Cormack, 1996) wurde das *gfpmut2*-Gen in einer PCR mit Hilfe der Primer WS79 und WS80 ohne Startcodon amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt über *Bgl*II und *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pJP66 eingesetzt, wodurch das Plasmid pWS122 entstand (siehe Abb. III.1). Die *cagA*(5′)-*gfp*-Fusion wurde dabei hinter den *cagA*-Promotor (P_{cagA}) kloniert.

Um das *gfpmut2*-Gen an die hintere *cagA*-Hälfte zu fusionieren und somit *gfp-cagA*(3′) zu erzeugen, musste ein DNA-Fragment amplifiziert werden, welches einen Promoter sowie das *gfpmut2*-Gen ohne Stopcodon enthielt. Dazu wurden das Primerpaar WS81 und WS89 und als *Template* pDH80 (Heuermann et al. 1998) verwendet und das PCR-Produkt mit *Cl*aI und *Bgl*II verdaut. Auf diese Weise wird die *gfp-cagA*(3′)-Fusion unter der Kontrolle des Flagellin-Promotors (P_{fla}) aus *H. pylori* exprimiert (siehe Abb. III.1). Da das P12-*cagA*-Gen des Vektors pJP66 mehrere *Bgl*II-Schnittstellen enthält, musste das PCR-Produkt stattdessen in pJP55 kloniert werden. Es resultierte pWS130. Das Plasmid pJP55 enthält das *cagA*-Gen des komplett sequenzierten Stammes 26695 (Tomb et al., 1997) mit nur einem *Bgl*II-Schnitt.

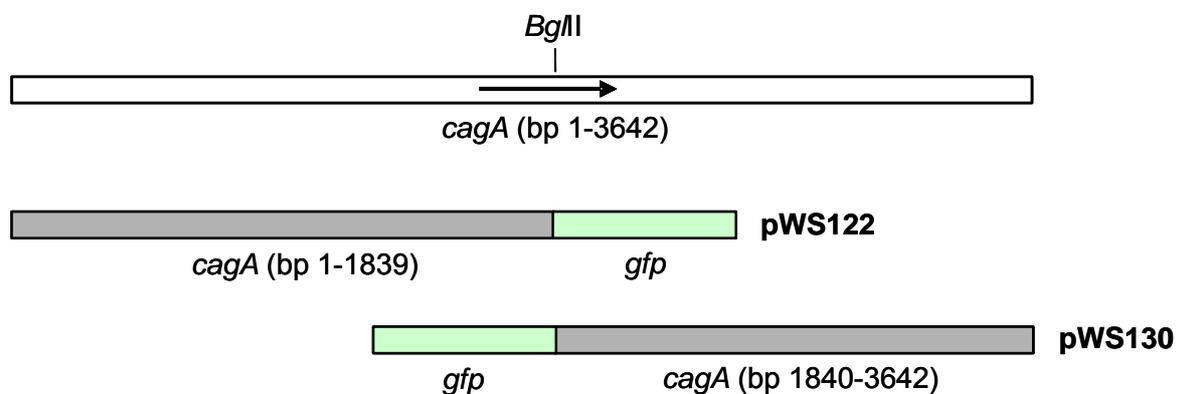


Abb. III.1: Aufbau der Genfusionen von *cagA* mit *gfp*.

Das *gfpmut2*-Gen wurde nach PCR über einen im *cagA*-Gen gelegenen *Bgl*II-Schnitt an das 3′ bzw. 5′-Ende des *cagA*-Gens fusioniert. Auf diese Weise entstanden das Plasmid pWS122, in dem die *cagA-gfp*-Fusion unter der Kontrolle des *cagA*-Promotors steht und pWS130, welches den *fla*-Promotor besitzt.

Die Konstrukte wurden nach Transformation in *E. coli* zur Kontrolle mit *Pst*I und *EcoRV* restringiert. Im Western Blot zeigte sich eine stabile Produktion der Fusionsproteine und die grüne Fluoreszenz der Bakterien auf Platte war deutlich erkennbar.

Nachdem die Shuttle-Plasmide pWS122 und pWS130 mittels Konjugation in eine *H. pylori-cagA*-Mutante übertragen worden waren, fand wiederum eine Analyse der Expression der Fusionsproteine im Western Blot statt. Beide Fusionsproteine wurden in *H. pylori* gebildet (siehe Abb. III.2).

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte die GFP-Fluoreszenz der mit N- bzw. C-terminalen GFP-Fusionen komplementierten *H. pylori*-Stämme einen reproduzierbaren Unterschied in der Verteilung innerhalb der Bakterien. Während das GFP-CagA(C-term.)-Fusionsprotein gleichmäßig im gesamten Zytoplasma der Bakterienzelle verteilt war, wiesen die Zellen mit der CagA(N-term.)-GFP-Fusion punktförmige Fluoreszenzen auf. Diese Beobachtung könnte auf ein N-terminal lokalisiertes Translokationssignal hindeuten. Auch eine Interaktion zwischen den N-terminalen Regionen von CagA-Proteinen wäre denkbar (siehe Abb. III.2).

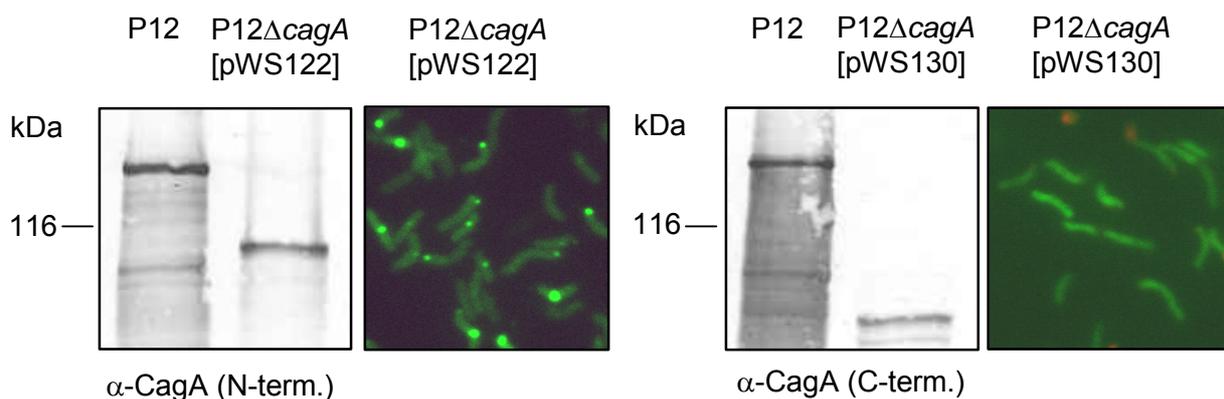


Abb. III.2: CagA-GFP-Fusionen werden stabil produziert und weisen eine charakteristische intrazelluläre Verteilung auf.

Mit Zellsaten der *Hp*-Stämme P12ΔcagA[pWS122] und P12ΔcagA[pWS130] wurde ein Western Blot durchgeführt, wobei als Antikörper einmal der gegen den N-Terminus und einmal der gegen den C-Terminus gerichtete α -CagA-Antikörper eingesetzt wurden.

Die Bilder der Fluoreszenzmikroskopie zeigen die unterschiedliche Verteilung der beiden Fusionsproteine in *H. pylori*. Während das GFP-CagA-Fusionsprotein gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt ist, zeigt das CagA'-GFP-Fusionsprotein punktförmige Anhäufungen.

AGS-Zellen wurden mit den *H. pylori*-Stämmen, die die Plasmide pWS122 und pWS130 enthielten, infiziert und anschließend im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Es konnte jedoch keine GFP-Fluoreszenz in den Epithelzellen festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Möglicherweise verhindern die starre β -Fass-Tertiärstruktur des GFP-Proteins oder dessen chemisch-physikalische Eigenschaften die Translokation der Fusionsproteine.

Das warf die Frage auf, ob die Fusionsproteine auch mit der Translokation des Wildtyp-CagA-Proteins interferieren würden. Die Konstrukte pWS122 und pWS130 wurden in den Wildtyp-Stamm P1 transferiert, um eine Koexpression der *cagA*(5′)-*gfp*- bzw. *gfp-cagA*(3′)-Fusionen und des Wildtyp *cagA*-Gens zu erreichen. Abb. III.3 demonstriert, dass jeweils beide Proteine in vergleichbarer Menge produziert wurden. Wie aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse der Fluoreszenz-Mikroskopie zu erwarten war, konnte keines der beiden Fusionsproteine nach AGS-Zellinfektion in phosphorylierter Form nachgewiesen werden. Interessanterweise übte die GFP-CagA(C-term.)-Fusion – nicht jedoch die CagA(N-term.)-GFP-Fusion – zusätzlich einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation und Tyrosinphosphorylierung des Wildtyp-CagA-Proteins aus. Angenommen dieser dominant-negative Effekt beruht auf der Blockierung des Sekretionsapparates durch das GFP-Protein, so spricht dies (im Gegensatz zu der obigen Beobachtung) für ein C-terminal gelegenes Translokationssignal.

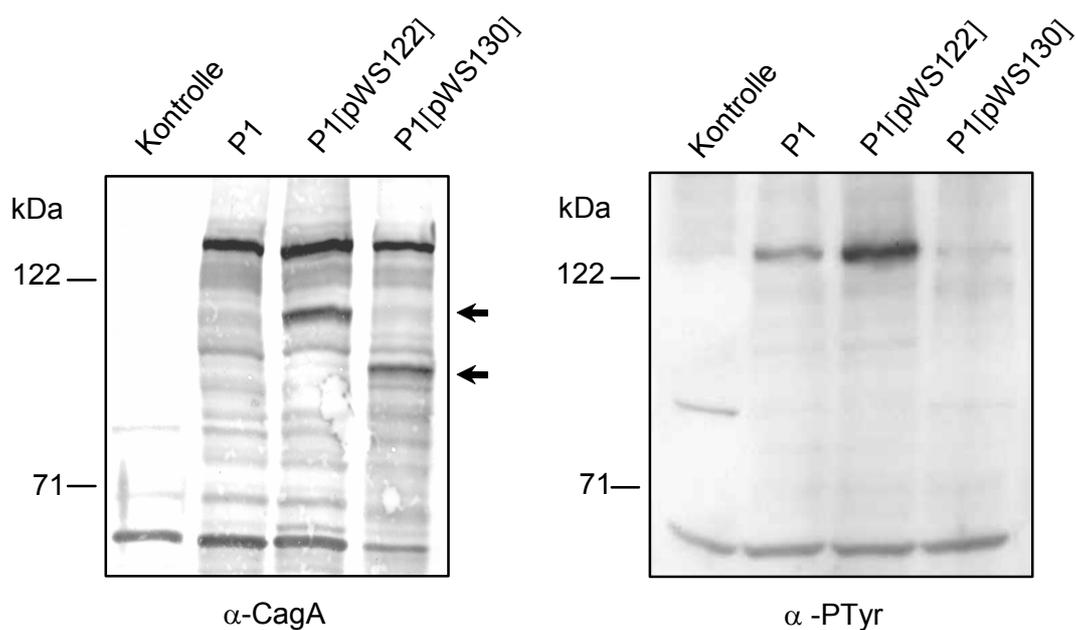


Abb. III.3: Die GFP-CagA-Fusion übt einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation des Wildtyp-CagA-Proteins aus.

Der in der Abbildung links dargestellte Western Blot, der mit einem α -CagA-Antikörper durchgeführt wurde zeigt, dass beide Fusionsproteine (Pfeile) sowie das Wildtyp-CagA in vergleichbaren Mengen produziert werden. AGS-Zellen wurden mit dem Wildtyp-Stamm P1 bzw. einem das Plasmid pWS122 oder pWS130 enthaltenden P1-Stamm infiziert. Bei der Kontrolle wurden die Zellen nicht infiziert. In dem anschließend durchgeführten Western Blot, bei dem der Phosphotyrosin-Antikörper PY99 verwendet wurde stellte sich heraus, dass lediglich die GFP-CagA-Fusion, nicht jedoch die CagA-GFP-Fusion einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation des Wildtyp-CagA-Proteins ausübt.

1.2 Fusionen mit der Cre-Rekombinase

Nachdem sich gezeigt hatte, dass eine Translokation des GFP über das Typ IV-Sekretionssystem von *H. pylori* nicht möglich ist, sollte die Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 zusammen mit einer Kern-Lokalisationssequenz eingesetzt werden. Dieses Reporterprotein funktioniert nur in der Eukaryontenzelle, nicht jedoch in Bakterien. Bei erfolgreicher Translokation eines Cre-CagA-Fusionsproteins sollte dieses in den Kern der Zielzelle (eine AGS-Zelle mit entsprechender chromosomaler Reporter-gen-Insertion) transportiert werden und dort als ortsspezifische Rekombinase fungieren, die durch Exzision eines durch sog. *lox*-Sequenzen flankierten DNA-Fragments ein Luziferase-Reporter-gen aktiviert.

Die Cre-Rekombinase konnte bereits erfolgreich über das Typ IV-Sekretionssystem von *A. tumefaciens* in eine Wirtszelle geschleust werden (Vergunst, 1998). Durch Fusionen des Reporterproteins mit den Effektorproteinen VirE2, VirE3 und VirF konnte die C-terminale Region dieser Proteine als für die Sekretion unerlässlich charakterisiert werden (Vergunst, 2000; Schrammeijer 2003). Des Weiteren wurde gefunden, dass die 50 C-terminalen Aminosäuren von VirE2 und VirE3 für die Translokation des Reporterproteins ausreichen (Vergunst, 2003).

Zur Herstellung der *cre-cagA(3')*-Fusion wurde das *cre*-Gen mittels PCR ohne Stopcodon amplifiziert. Der Vektor pM301 (W. D. Hardt, unveröffentlicht) diente dabei als Matrize. Als Primer wurden einmal WS174 und WS176 und in einem zweiten Ansatz WS175 und WS176 eingesetzt, wobei WS175 mit einer Kernlokalisationssequenz versehen war, die später den Transport des Fusionsproteins in den Kern der Zielzelle erleichtern sollte. Die Plasmide pWS173 und pWS175 entstanden durch Ligation der *NdeI/BglII* geschnittenen PCR-Produkte mit dem Vektor pWS130.

Mit Hilfe der Primerpaare WS174/WS180 bzw. WS175/WS180 (ohne bzw. mit Kernlokalisationssequenz) wurde das *cre*-Gen vom Vektor pM301 mitsamt des Stopcodons amplifiziert und das PCR-Produkt über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in das Plasmid pJP104 kloniert. Auf diese Weise entstanden pWS174 und pWS183, welche die *cagA(5')*-*cre*-Fusion enthalten.

Nachdem die Konjugation dieser Shuttle-Plasmide in die *H. pylori-cagA*-Mutante trotz mehrfacher Versuche scheiterte, wurden die Plasmide pWS173 und pWS175 über *BamHI* und *NdeI* in den *recA*-Integrationsvektor pWS171 (siehe III 1.2) umklontiert

(pWS181, 182). Doch auch die Transformation von *H. pylori* mit diesen Plasmiden erwies sich als schwierig, selbst Transformationen nach *in vitro*-Methylierung (siehe II 2.1.4.2) oder mittels Elektroporation (siehe II 2.1.4.3) blieben erfolglos. Da als mögliche Ursache eine für die *H. pylori*-Zellen schädliche Funktion der gebildeten Cre-Rekombinase in Betracht kam, wurde das *cre*-Gen des Plasmids pWS173 durch Einführung eines *frame shifts* inaktiviert. Zu diesem Zweck wurde pWS173 mit dem Restriktionsenzym *PvuI* verdaut, da diese Schnittstelle nur im *cre*-Gen enthalten ist. Die 3'-überhängenden Enden wurden anschließend durch eine T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und die entstandenen *blunt ends* ligiert. Die auf diese Weise herbeigeführte Änderung des Leserahmens verhinderte die Expression des *cre*-Gens, was im Western Blot gezeigt werden konnte (siehe Abb. III.4).

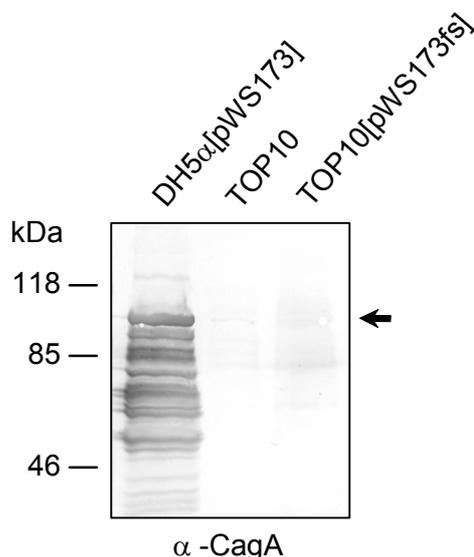


Abb. III.4: Kontrolle des in das Plasmid pWS173 eingeführten *frame shifts* zur Inaktivierung von *cre*. Es wurde ein Western Blot mit dem α -CagA-Antikörper AK257 durchgeführt. Aufgetragen wurden (von links): das Lysat des *E. coli*-Stammes DH5 α [pWS173], das Lysat eines *E. coli* TOP10-Stammes ohne Plasmid (als Kontrolle) sowie mit pWS173 nach Einführung des *frame shifts*. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verschiebung des Leserahmens erfolgreich war und in diesem Stamm kein Cre-CagA-Fusionsprotein mehr gebildet wird.

Nach Konjugation des neuen Konstruktes in *H. pylori* waren nun bis zu 180 Chloramphenicol-resistente Klone nachweisbar, ein deutliches Zeichen dafür, dass die Cre-Rekombinase tatsächlich einen toxischen Effekt auf die *H. pylori*-Zellen gehabt hatte und dieser durch die Inaktivierung des *cre*-Gens beseitigt worden war. Bei einigen der Konjuganten wurde zur Kontrolle das Plasmid mittels des WizardTM Plus SV Minipreps DNA-Purifikationssystem von Promega (siehe II 2.3.2) reisoliert und das Verschwinden der *PvuI*-Schnittstelle nochmals in einem Restriktionsverdau mit *PvuI/HindIII* überprüft.

Die Cre-Fusionen fanden aufgrund der Toxizität der Cre-Rekombinase folglich keine weitere Verwendung bei Versuchen zur Translokation eines bakterienfremden Proteins mittels des CagA-Proteins.

1.3 Fusionen mit dem M45-Tag

In Versuchen mit *Salmonella typhimurium* konnte der M45-Tag zur Detektion von Typ III-abhängig translozierten Proteinen eingesetzt werden (Rüssmann et al., 2001). Dieses Epitop, das vom E4-6/7-Protein aus dem Adenovirus abgeleitet wurde und aus einer Sequenz von nur 18 Aminosäuren besteht, sollte durch seine geringe Größe den Vorteil haben, auch den Typ IV-Sekretionsapparat passieren zu können. Nach erfolgter Translokation sollte das Fusionsprotein durch den spezifischen Antikörper α -M45 (Obert et al., 1994) in einer Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht werden.

Durch Hybridisierung der Primer WS219 und WS220 entstand die M45-Sequenz mit überhängenden Enden. Diese wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BglII* nachgeschnitten und der Tag in das Plasmid pWS130 eingesetzt. Das auf diese Weise hergestellte Plasmid pWS210 enthält eine durch den *flaA*-Promotor kontrollierte *m45-cagA*(3′)-Fusion, wobei die *cagA*-Hälfte (bp 1840-3642) aus *Hp* 26695 stammt. Um zusätzlich ein vom *cagA*-Promotor reguliertes Fusionsprotein zu erhalten, wurde der *cagA*-Promotor von chromosomaler P12-DNA in einer PCR mit den Primern WS158 und WS242 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *Clal/NdeI* in pWS130 kloniert und ersetzt im entstandenen Vektor pWS228 den *flaA*-Promotor (siehe Abb. III.5).

Des weiteren wurde pWS218 erzeugt, welches im Gegensatz zu den oben genannten Plasmiden pWS210 und pWS228 das *cagA*-Gen (bp 2195-3642) aus dem *H. pylori*-Stamm P12 enthält. Zu diesem Zweck wurde eine PCR mit dem Primerpaar WS228/JP67 und chromosomaler DNA aus *Hp* P12 als Matrize durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit *BamHI* und *KpnI* verdaut und in das *BglII/KpnI* restringierte Plasmid pWS210 ligiert (siehe Abb. III.5).

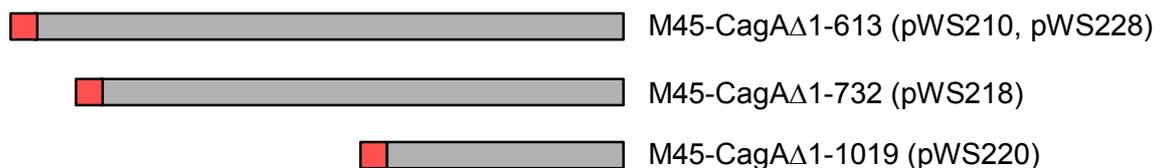


Abb. III.5: Graphische Darstellung der M45-CagA-Fusionsproteine.

Angegeben ist die Lokalisation des deletierten Bereiches (als in der Sequenz fehlende Aminosäuren) sowie die zugehörigen Plasmide.

Schließlich wurde mit pWS220 eine *m45-cagA*(3′)-Fusion mit noch kürzerem *cagA*-Fragment (bp 3057-3642) hergestellt. Hierfür wurde dieses Fragment mittels *Bgl*I und *Kpn*I aus dem Vektor pWS218 herausgeschnitten und in pWS210 kloniert (siehe Abb. III.5).

Sämtliche entstandenen Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert und zur Kontrolle in Restriktionsanalysen untersucht. Die Lysate korrekter *E. coli*-Stämme wurden im Western Blot sowohl mit dem α -CagA als auch mit dem α -M45-Antikörper getestet. Dabei zeigte sich, dass die Fusionsproteine in *E. coli* gebildet werden und das M45-Epitop vom α -M45-Antikörper erkannt wird (Ergebnisse nicht dargestellt).

Nach Übertragung der Plasmide in *H. pylori* (P76 bzw. P12 Δ *cagA*) wurde erneut ein Western Blot mit beiden Antikörpern durchgeführt und auch in diesem Fall konnte die Expression der *m45-cagA*(3′)-Fusionen gezeigt werden (Abb. III.6).

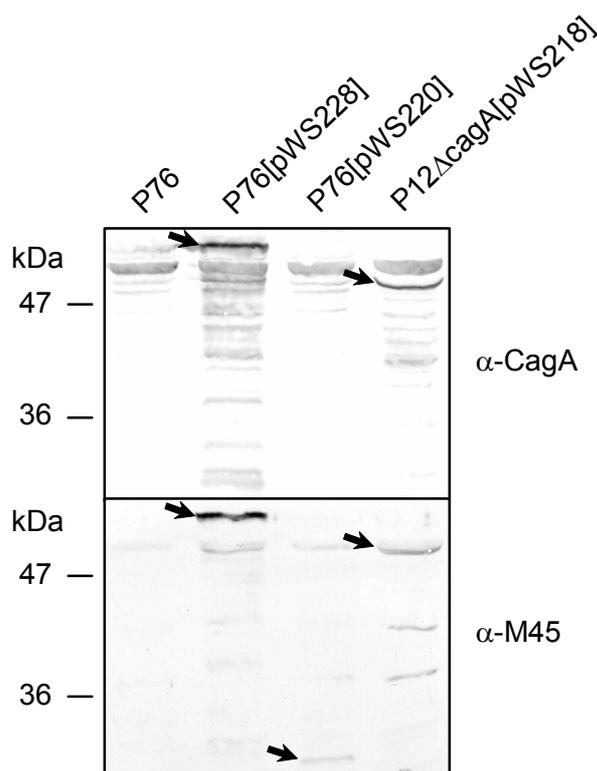


Abb. III.6: Nachweis der Produktion der M45-CagA-Fusionen.

Zellysate der die Plasmide pWS228, 220 und 218 enthaltenden *H. pylori*-Stämme P76 und P12 Δ *cagA* wurden in einem Western Blot sowohl mit dem α -CagA-Antikörper AK257 als auch mit dem α -M45-Antikörper behandelt. Während die sehr kurze M45-CagA(Δ 1-1019)-Fusion von pWS220 nur von dem α -M45-Antikörper erkannt wird, lässt sich die Expression der anderen beiden Fusionsproteine mit beiden Antikörpern nachweisen.

Es wurde eine Immunfluoreszenz mit den mit M45-markierten *cagA*-Deletionsmutanten und dem Wildtyp-Stamm *Hp* P12 als Kontrolle durchgeführt. Nach erfolgter Translokation sollte das verkürzte CagA als rote Fluoreszenz in den AGS-Zellen sichtbar sein, die Bakterien wurden zusätzlich mit dem α -*Hp*-Antikörper AK175 gegengefärbt. Es waren jedoch keine rot fluoreszierenden Bereiche außerhalb der

Bakterien erkennbar. In späteren Versuchen konnte bei einem kompletten CagA-Protein, das an seinem N- bzw. C-Terminus den M45-Tag enthielt, die Translokation mit dieser Methode nachgewiesen werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die N-terminalen Deletionsmutanten nicht mehr transloziert werden können. Weitere Versuche, zum Beispiel mit einem im mittleren Bereich des Proteins eingefügten *Tag*, könnten mehr Aufschluss bringen.

2 Lokalisation des Translokationssignals

Um genauere Aussagen zur Lokalisation des Translokationssignals auf dem CagA-Protein machen zu können, wurden gezielte *in frame*-Deletionen des *cagA*-Gens erzeugt und in *H. pylori* zur Expression gebracht. Die Bakterien mit den so veränderten CagA-Proteinen wurden dann auf ihre Fähigkeit untersucht, CagA noch zu translozieren, wobei die in der Wirtszelle stattfindende Tyrosinphosphorylierung als Nachweis für die Translokation diente. Um bei fehlender Tyrosinphosphorylierung die Möglichkeit einer Translokation ohne nachfolgende Phosphorylierung in der Epithelzelle auszuschließen, wurde in einer *in vitro*-Phosphorylierung die Phosphorylierbarkeit der CagA-Mutanten überprüft (siehe III 2.1).

Als Ausgangskonstrukte für die Herstellung der *cagA*-Deletionen dienten verschiedene Plasmide (pJP66, pJP78 und pJP104 – in der Arbeitsgruppe bereits vorliegend), die das *cagA*-Gen aus dem *H. pylori*-Stamm P12 enthalten. Zur Herstellung dieser Vektoren war das *cagA*-Gen, nachdem es durch die Primer JP28 und HK3 in einer PCR amplifiziert worden war, über die Restriktionsschnittstellen *XhoI/BamHI* entweder in den *E. coli-H. pylori* Shuttle-Vektor pHel2 (Heuermann und Haas, 1998) oder in den Vektor pBluescript II KS+ (Stratagene) eingesetzt worden, woraus pJP66 bzw. pJP78 resultierten. Des weiteren war pJP104 durch Integration des *cagA*-Gens in den Vektor pJP99 (Püls, 2002) entstanden, ein Suizid-Vektor, der für die Komplementation von *H. pylori cagA*-Mutanten entwickelt worden war. Der Vektor, der eine *aphA-3*-Resistenzgenkassette zwischen *recA*-Genbereichen enthält, dient der homologen Rekombination von Genen (siehe Abb. III.7).

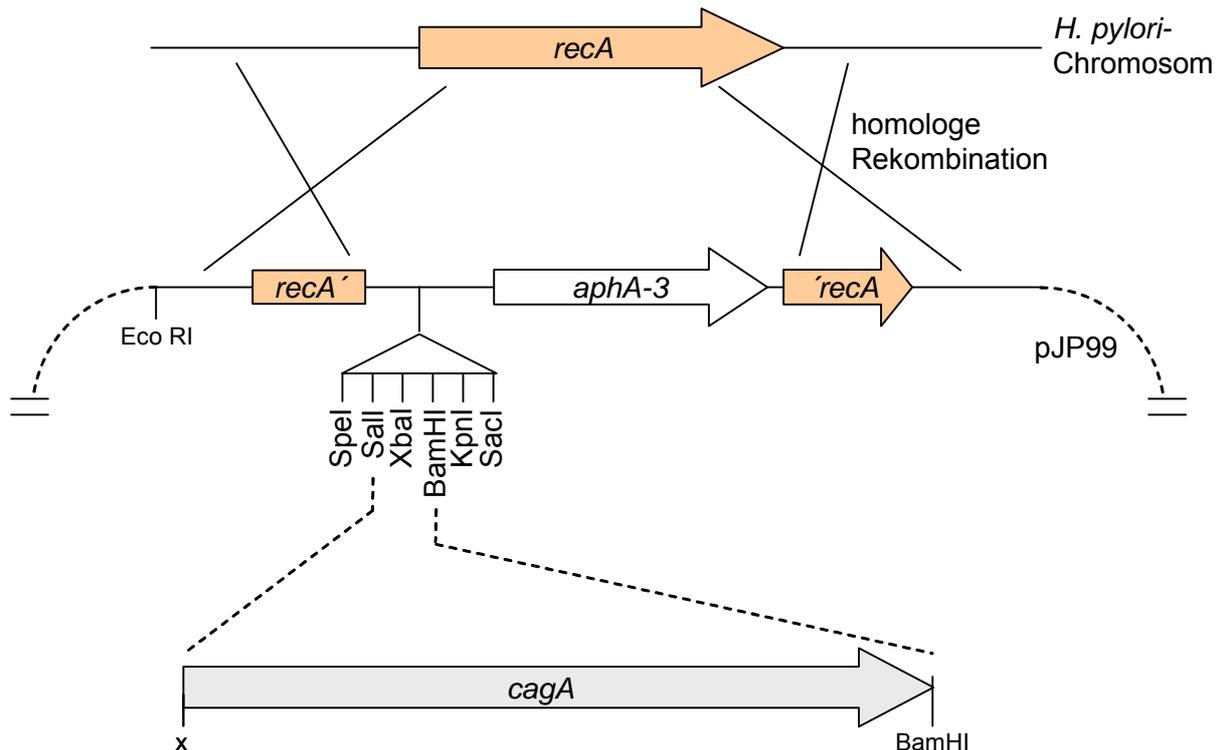


Abb. III.7: Schema zur Funktionsweise des Plasmids pJP99 zur chromosomalen Integration von Genen.

Über die Restriktionsschnittstellen im Polylinker von pJP99 können entsprechend restringierte *cagA*-Varianten einligiert werden. Nach Transformation der entstehenden Plasmide in *Hp* kann das veränderte *cagA*-Gen (zusammen mit der *aphA-3*-Resistenzkassette) über homologe Rekombination in das *recA*-Gen auf dem *Hp* Chromosom übertragen werden.

Der *recA*-Lokus ist für die chromosomale Integration besonders geeignet, da bei der Inaktivierung dieses Genortes rekombinationsdefiziente und damit genetisch stabilere Stämme entstehen. Zudem kann die Inaktivierung des *recA*-Gens mit dem α -RecA-Antikörper im Western Blot überprüft werden.

2.1 *in vitro*-Phosphorylierung

In Abb. III.8 sind die CagA-Tyrosinphosphorylierungsmotive dargestellt, an denen das Protein nach erfolgter Translokation phosphoryliert wird. Es handelt sich dabei um das Phosphorylierungsmotiv TPM-C (Püls et al., 2002) sowie die sog. EPIYA-Motive, die aus 5 Aminosäuren bestehen. Diese Motive befinden sich im C-terminalen Bereich des Proteins (Selbach et al., 2002; Stein et al., 2002), weswegen bei fehlender Tyrosinphosphorylierung nach Infektion von AGS-Zellen nicht automatisch davon ausgegangen werden kann, dass keine Translokation des

deletierten CagA-Proteins stattgefunden hat. Eine ausbleibende Phosphorylierung in der Epithelzelle ist ebenfalls denkbar.

Um letztere Möglichkeit ausschließen zu können, wurde eine *in vitro*-Phosphorylierung der CagA-Varianten mit AGS-Zellysat durchgeführt (siehe II 2.5). Wenn bei verkürzten CagA-Proteinen, die *in vitro* phosphoryliert werden können, im Phosphotyrosin-Assay nach Infektion keine Bande auftritt, kann von einem Verlust der Translokationsfähigkeit gesprochen werden.

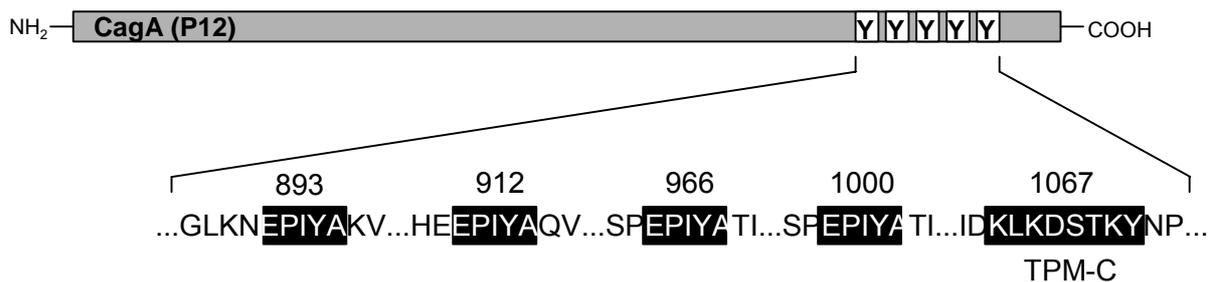


Abb. III.8: Lage der Phosphorylierungsstellen im CagA-Protein des Stammes P12 (nach Selbach *et al.*, 2002, Püls *et al.*, 2002).

Dargestellt sind die Aminosäurepositionen der 4 EPIYA-Motive sowie des TPM-C-Motivs.

2.2 C-terminale Deletionen

Durch einen Exonuclease III-Verdau bzw. mittels PCR wurden sowohl zufällige als auch definierte 3'-Deletionen des *cagA*-Gens in unterschiedlicher Länge hergestellt.

2.2.1 Zufällige Deletionen durch Exonuclease III-Verdau

Mit Hilfe des Erase-a-BaseTM-Systems von Promega können durch Verdau mit Exonuclease III unterschiedlich lange Fragmente eines Gens erzeugt werden (siehe II 2.3.6.1).

Zur Herstellung dieser randomisierten C-terminalen Deletionen wurde der das *cagA*-Gen enthaltende Suizid-Vektor pJP104 zunächst durch die Restriktionsenzyme *SacI* und *SalI* geschnitten, dann folgte die Inkubation mit der Exonuclease III. Dieses Enzym schneidet nur die 5'-überhängenden Enden (*SalI*) und erzeugt somit unidirektionale Deletionen. Auf diese Weise entstanden je nach Inkubationsdauer verschieden lange Fragmente.

Nach Transformation wurde die Expression der *cagA*-Varianten in *E. coli* überprüft und die entstandenen Plasmide wurden sequenziert, um die genaue Länge der Deletionen zu bestimmen. Die in Abb. III.9 dargestellten Varianten mit 4 (pWS164) bzw. 54, 64 und 92 deletierten Aminosäuren (pWS159-12,13 und 21) wurden dann in den *H. pylori*-Stamm P17 transformiert. Diese *cagA*-Mutante wurde durch Insertion einer *cat*_{GC}-Kassette in den Wildtyp-Stamm P12 hergestellt. Die stabile Expression der Varianten durch die nach Transformation erhaltenen Klone wurde erneut im Western Blot getestet (siehe Abb. III.10A).

Schließlich erfolgte die Infektion von AGS-Zellen und die Anfertigung eines Phosphotyrosin-Assays, um festzustellen, ob eine Translokation stattgefunden hatte. Wie Abb. III.10A zeigt, konnte lediglich das CagA-C Δ 4 noch in die Wirtszelle transportiert und dort phosphoryliert werden, nicht jedoch CagA-C Δ 54, 64 oder 92. Die *in vitro*-Phosphorylierung konnte dagegen die Phosphorylierbarkeit auch der letztgenannten verkürzten Proteine nachweisen, so dass bei diesen von einem Verlust der Translokationskompetenz gesprochen werden kann (siehe Abb. III.10B).

2.2.2 Definierte Deletionen durch PCR

Um die Anzahl der zur Translokation notwendigen C-terminalen Aminosäuren weiter eingrenzen zu können, wurden des weiteren definierte Deletionen durch PCR eingeführt.

Bei der PCR mit chromosomaler DNA aus P12 und den Primerpaaren WS179/WS177 bzw. WS179/WS178 wurden *cagA*-Fragmente erzeugt, bei denen die letzten 5 bzw. 20 Codons fehlen (siehe Abb. III.9).

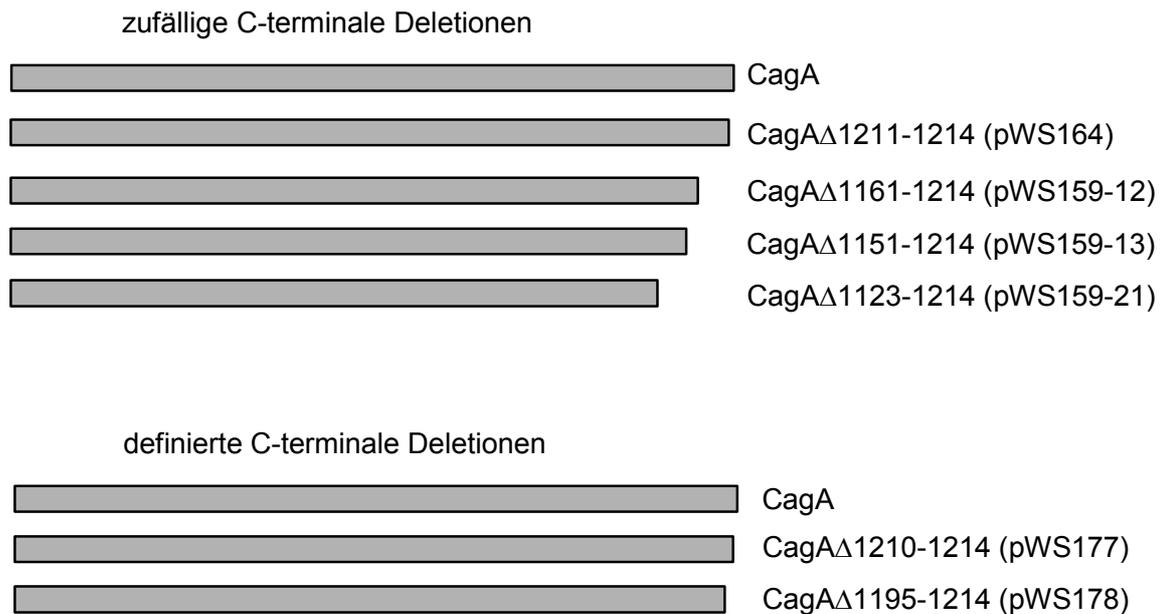


Abb. III.9: Graphische Darstellung der C-terminal deletierten CagA-Proteine.

Angegeben ist die Lokalisation des deletierten Bereiches (als in der Sequenz fehlende Aminosäuren) sowie die zugehörigen Plasmide.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden über die Schnittstellen *KpnI* und *XbaI* in das Plasmid pJP104 kloniert, wodurch die Plasmide pWS177 und pWS178 entstanden. Nach Transformation in *E. coli* wurde die Korrektheit der Plasmide durch Restriktionsverdau überprüft und die Bildung der verkürzten CagA-Proteine im Western Blot bestätigt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Konstrukte konnten mittels homologer Rekombination in die *cagA*-Mutante P17 überführt werden. Die Western Blot Analyse zeigte auch hier eine stabile Expression. (siehe Abb. III.10A). Wieder wurde die Fähigkeit der Deletionsmutanten zur Translokation ihres veränderten CagA-Proteins in einem Phosphotyrosin-Assay untersucht. Ein Entfernen der 5 C-terminalen Aminosäuren wird noch toleriert, die Deletion von 20 C-terminalen Aminosäuren verhindert jedoch bereits die Translokation (siehe Abb. III.10A). Da eine Phosphorylierung *in vitro* dagegen möglich ist (siehe Abb. III.10B), lässt sich daraus schließen, dass der C-terminale Teil für die Translokation notwendige Informationen enthält.

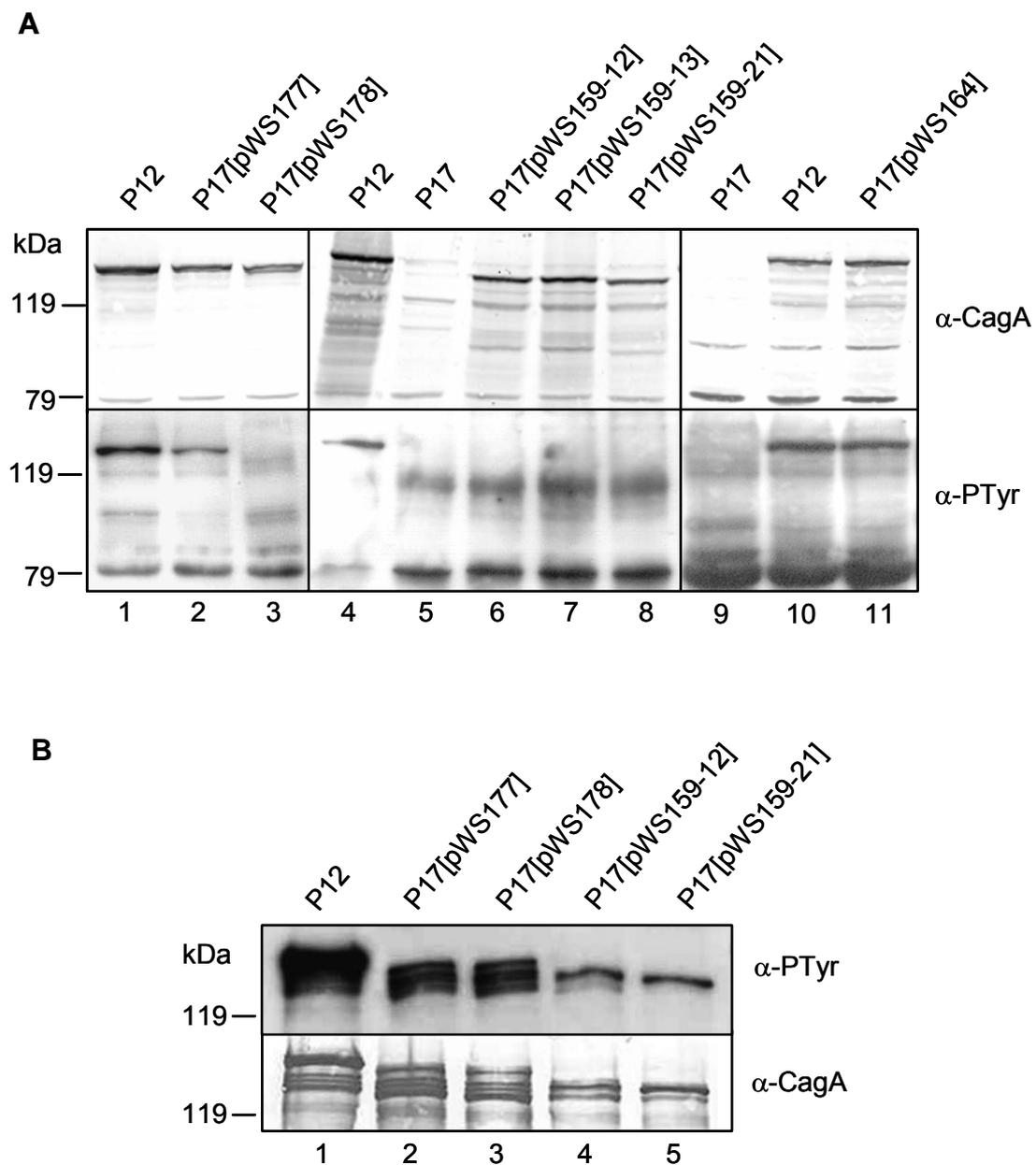


Abb. III.10: Die Bedeutung einer C-terminalen Domäne für die CagA-Translokation.

A Der mit AK257 angefertigte Western Blot konnte die stabile Produktion der C-terminal deletierten CagA-Proteine in der *cagA*-Mutanten P17 nachweisen. Der darunter abgebildete Phosphotyrosin-Assay zeigt, dass von den Konstrukten jedoch nur die CagA-Varianten mit einer Deletion von 4 oder 5 Aminosäuren noch transloziert werden konnten (pWS164, Spur 11 und pWS177, Spur 2). Konstrukte mit größeren Deletionen waren dagegen nicht in AGS-Zellen nachweisbar (pWS178, Spur 3 und pWS159-12, 13 und 21, Spuren 6,7 und 8).

B Bei der als Kontrollexperiment durchgeführten *in vitro*-Phosphorylierung ist zu erkennen, dass die C-terminalen CagA-Deletionsmutanten durch Inkubation mit AGS-Zellysat phosphoryliert werden können (dargestellt für die Konstrukte pWS177, 178, 159-12 und 159-21). Das bestätigt, dass die in A beobachteten Ergebnisse auf einem Verlust der Translokationsfähigkeit beruhen.

2.3 N-terminale Deletionen

Unter Verwendung des ExSite™ PCR Mutagenese-Kits von Stratagene (siehe II 2.3.10.1) wurde eine inverse PCR mit dem Primerpaar WS125/WS126 und pJP78 als Matrize durchgeführt. Auf diese Weise wurden im *cagA*-Gen spezifische Deletionen ohne Rasterverschiebung erzeugt (von 21 bzw. 22 Codons, die N-terminalen Aminosäuren 6-26 bzw. 2-23 kodierend). Das Konstrukt mit 21 deletierten Codons wurde in pJP66 kloniert, wobei pWS144 entstand; das andere in pJP99, was zu pWS171 führte (siehe Abb. III.11).



Abb. III.11: Graphische Darstellung der N-terminal deletierten CagA-Proteine.

Angegeben ist die Lokalisation des deletierten Bereiches (als in der Sequenz fehlende Aminosäuren) sowie die zugehörigen Plasmide.

Nach Konjugation bzw. Transformation der entstandenen Plasmide pWS144 und pWS171 in *H. pylori* (P12 Δ *cagA* bzw. P17) stellte sich jedoch heraus, dass diese N-terminal verkürzten Proteine in *H. pylori* kaum gebildet werden (siehe Abb. III.12), so dass keine Aussagen über eine Translokation gemacht werden konnten. Die schwache Expression deutet möglicherweise auf eine Stabilisierungsfunktion der N-terminalen Region hin, z.B. im Sinne einer *Chaperon*-Bindungsstelle, oder könnte Hinweis geben auf eine Translations-Initiations-Region der *cagA*-mRNA, die eine *downstream box* innerhalb des kodierenden Abschnitts enthält (Etchegaray and Inouye, 1999).

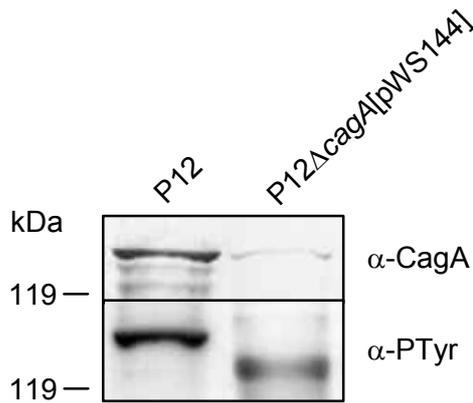


Abb. III.12: Die N-terminal verkürzten Proteine werden in *H. pylori* teilweise kaum gebildet.

Der Western Blot, der mit dem α -CagA-Antikörper AK257 durchgeführt wurde, lässt erkennen, dass die durch spezifische PCR hergestellten N-terminal verkürzten Proteine kaum gebildet werden. Beispielhaft ist die schwache Expression des *cagA*-Gens mit einer Deletion der Codons für die Aminosäuren 6-26 (Plasmid pWS144) dargestellt. Der ebenfalls abgebildete Phosphotyrosin-Assay lässt dementsprechend keine Aussage über die Translokation zu.

Eine weitere N-terminale Deletionsmutante wurde durch Subklonierung eines durch die Enzyme *NdeI* und *BamHI* restringierten 3' *cagA*-Fragmentes aus pJP66 in pWS130 erzeugt. Dabei entstand das Plasmid pWS221 (siehe Abb. III.11). Dieses Konstrukt mit der wesentlich größeren N-terminalen Deletion (Δ 1-351) wurde erstaunlicherweise sowohl in *E. coli* als auch nach Konjugation in *H. pylori* exprimiert, ähnlich der unter III.1.3 beschriebenen M45-CagA(Δ 1-613)-Fusion (siehe Abb. III.13A). Über den Grund für die stabile Bildung dieses Konstruktes im Gegensatz zu den oben genannten lässt sich nur mutmaßen. Es befindet sich allerdings in diesem Fall die Shine-Dalgarno-Sequenz des Gens X des Phagen T7 im *upstream*-Bereich des Gens.

Da das CagA(Δ 1-351) nach Infektion von AGS-Zellen keine Phosphorylierung aufwies (Ergebnisse nicht dargestellt), wohl aber bei der *in vitro*-Phosphorylierung (siehe Abb. III.13A), kann dieses Protein offensichtlich nicht mehr transloziert werden. Deshalb kann man davon ausgehen, dass nicht der C-Terminus allein, sondern auch der N-Terminus des CagA-Proteins bei dessen Translokation über den TypIV-Sekretionsapparat eine entscheidende Rolle spielt.

Überraschenderweise konnte bei der Koexpression von pWS221 (CagA Δ 1-351), nicht jedoch von pWS210 (M45-CagA Δ 1-613) mit dem Wildtyp-*cagA* ein dominant-negativer Effekt auf die Translokation des Wildtyp-CagA-Proteins festgestellt werden (siehe Abb. III.13B).

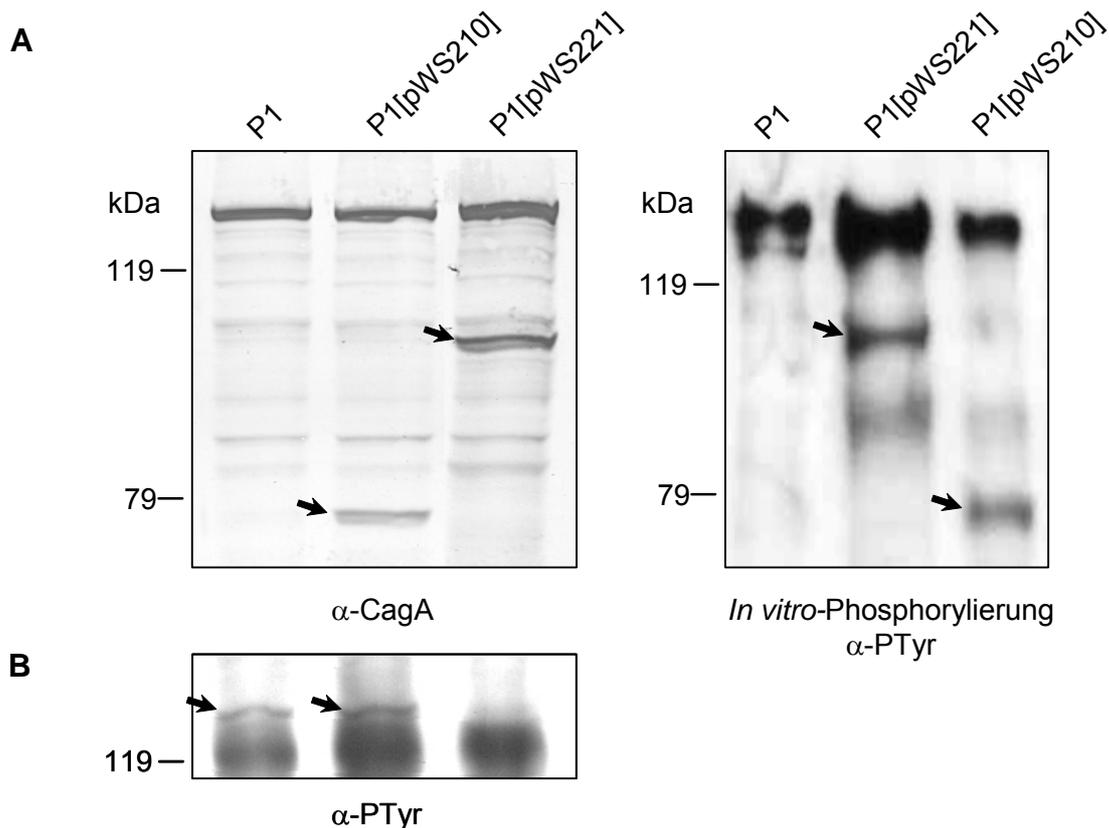


Abb. III.13: Die Bedeutung einer N-terminalen Domäne für die Translokation.

A Die Proteine mit größeren N-terminalen Deletionen wie das von pWS221 kodierte CagA Δ 1-351 oder das Fusionsprotein M45-CagA Δ 1-613 von pWS210 werden dagegen stabil produziert. Der Western Blot, bei dem AK257 verwendet wurde (links), zeigt die Bildung der verkürzten Proteine (Pfeile) in *Hp* P1 sowie die Bildung des Wildtyp-*cagA*. Keines der beiden verkürzten Proteine wird transloziert, denn obwohl sie *in vitro* phosphoryliert werden (Phosphotyrosin-Assay rechts), war eine Tyrosinphosphorylierung nach Infektion von AGS-Zellen nicht nachweisbar (Ergebnis nicht dargestellt).

B CagA Δ 1-351 (pWS221), nicht jedoch das Fusionsprotein M45-CagA Δ 1-613 (pWS210), übte ausserdem einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation des Wildtyp-CagA-Proteins aus.

3 Charakterisierung der C-terminalen Signalsequenz

3.1 Sequenzvergleich verschiedener Typ IV-sezernierter Proteine

Die Homologien bei Typ IV-Sekretionssystemen legten die Vermutung nahe, dass auch die Translokationssignale verschiedener Typ IV-sezernierter Proteine Ähnlichkeiten in der Primärstruktur aufweisen könnten. Um nach Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zu suchen, wurde die C-terminale CagA-Sequenz mit den entsprechenden Sequenzen von VirE2, VirE3, VirD2, VirF (*Agrobacterium tumefaciens*), sowie RalF (*Legionella pneumophila*) und MobA (Substrat für

verschiedene Konjugationssysteme aus dem Plasmid RSF1010) verglichen (siehe Abb. III.14).

RalF	...	332	-DLIKAYDNQKLLITIE	RNLALK	·	EGVPKDP	·	DAEMQK	·	EKGRQLKF	-374							
VirE2	...	486	-PADAAGVLGEAADKYS	RDFV	·	RPEPASR	·	PISDSRRIYES	RPRS	QSVNSF	-533							
VirE3	...	633	-LNQLLSVPLPIPSKPK	·	SA	·	RSMIFE	·	GSRPRE	·	STSRGF	-672						
VirD2	...	381	-PVSASIGTEQPEASPK	RP	·	RDH	D	GELGGRKRARGN	RRDDG	RGGT	-424							
VirF	...	165	-EVMAEVRPIARSIKTAHDD	A	·	RAELMSA	·	·	·	·	DRPRST	RG	L	-202				
MobA	...	664	-ADYIERTVSKVMGLPSVQL	A	·	RAELA	·	RA	·	PAPRQ	RG	·	MD	RG	PDFSM	-709		
CagA	...	1173	-SGFTQFLTNAFSTASYCIA	R	·	ENAEHG	·	·	·	·	IKNVNT	KG	G	F	Q	K	S	-1214

Abb. III.14: Vergleich von Aminosäuresequenzen der C-terminalen Region verschiedener Typ IV-sezernerter Proteine.

Dargestellt sind neben dem CagA-Protein aus *H. pylori* das Dot/Icm-Substrat RalF aus *L. pneumophila*, die VirB/D4-Substrate VirD2, VirE2, VirE3 und VirF aus *A. tumefaciens* und die MobA-Relaxase des Plasmids RSF1010. Positiv geladene Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, negativ geladene sind grau hinterlegt. Stark konservierte Bereiche sind rot dargestellt.

Bei dieser Sequenzanalyse konnte zwar kein streng konserviertes Motiv gefunden werden, es waren jedoch Ähnlichkeiten erkennbar, wie z.B. ein hoher Anteil basischer Aminosäuren in der C-terminalen Region der Proteine. Diese positiv geladenen Aminosäuren kamen bei allen untersuchten Proteinen mindestens einmal in der Abfolge (R/K)XXX(R/K) oder (R/K)XXXX(R/K) vor und zwischen einzelnen Sequenzen konnten auch weitere homologe Regionen ausgemacht werden. Die Bedeutung dieser C-terminalen Region als für die Translokation notwendige Sequenz zeigt sich darin, dass eine Deletion der 5 C-terminalen Aminosäuren des CagA-Proteins toleriert wird, wohingegen bei einer Deletion von 20 Aminosäuren keine Translokation mehr stattfindet (wie unter III 1.2.2. gezeigt). Ähnlich verhält es sich beim VirE2-Protein aus *A. tumefaciens*, bei dem die 5 C-terminalen Aminosäuren ohne Verlust der Translokationsfähigkeit entfernt werden können, während eine Deletion von 18 Aminosäuren bereits die Translokation verhindert (Simone, 2001).

3.2 Austausch der C-terminalen Aminosäuren von CagA gegen die von MobA

Der Sequenzvergleich zeigte insbesondere eine Ähnlichkeit der C-terminalen Aminosäuresequenzen von CagA und MobA, einer Relaxase des Plasmids

RSF1010, welche eine entscheidende Rolle als „Pilot“-Protein bei der Translokation von DNA während einer Konjugation spielt.

Um der Frage nachzugehen, ob die Fähigkeit zur Translokation bei der CagA-C Δ 20-Deletionsmutante durch eine Fusion mit der entsprechenden Sequenz aus MobA wiederhergestellt werden kann, wurden die 21 C-terminalen Aminosäuren des CagA gegen die 25 C-terminalen Aminosäuren von MobA ausgetauscht.

Dazu wurde zunächst mit dem ExSiteTM PCR mutagenesis Kit von Stratagene eine PCR mit pJP78 als Matrize durchgeführt. Die Primer, WS191 und WS192, enthielten jeweils Teile der 3' *mobA*-Sequenz: WS191 enthielt 39 Nukleotide, WS192 36 Nukleotide.

Das nach Ligation entstandene Plasmid pSH2 wurde in *E. coli* transformiert, die Korrektheit des Plasmids durch Restriktionsanalysen mit *PvuI* bzw. *SaI* und *SphI* überprüft und durch Sequenzierung gesichert. Das im Western Blot getestete Lysat eines Klons zeigte eine stabile Expression.

Um das Konstrukt in *H. pylori* überführen zu können, musste es zunächst auf einen geeigneten Vektor übertragen werden. Dafür wurde pSH2 nach Verdau durch die Restriktionsenzyme *BamHI* und *XhoI* in den Suizid-Vektor pJP99 umklont, wodurch pSH3 entstand. Dieses konnte in den *H. pylori*-Stamm P17 transformiert werden und wurde dort produziert (Ergebnis nicht dargestellt).

Im nachfolgenden Infektionsexperiment mit anschließendem Phosphotyrosin-Assay konnte gezeigt werden, dass der Ersatz der 21 C-terminalen Aminosäuren des CagA-Proteins durch die entsprechenden Aminosäuren von MobA zu einer Wiederherstellung der Translokationskompetenz führte (Abb. III.15).

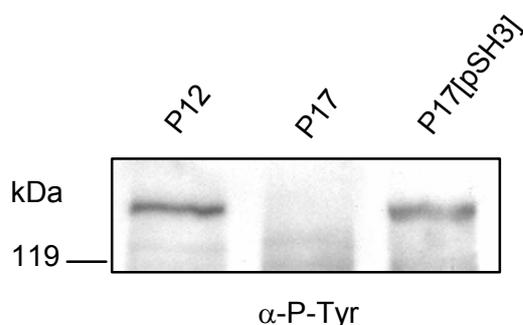


Abb. III.15: Austausch C-terminaler Translokationssignale.

Die das Signal enthaltende C-terminale Region des CagA-Proteins (Aminosäuren 1191-1214) wurde gegen die entsprechende Region des MobA-Proteins von RSF1010 ausgetauscht. Der das so entstandene Plasmid pSH3 enthaltende *Hp*-Stamm P12 Δ cagA[pSH3] ist in der Lage, das veränderte CagA-Protein zu translozieren, wie der abgebildete Phosphotyrosin-Assay demonstriert.

3.3 Einfluss des KXXXXK-Motivs auf die Sekretierbarkeit

Wie bereits oben erwähnt, befindet sich eine Anhäufung basischer Aminosäuren in der C-terminalen Sequenz einiger Typ IV-sezernerter Proteine. Um die Rolle dieser positiv geladenen Aminosäuren als Teil des Translokationssignals zu untersuchen, wurde eine ortsspezifische Mutagenese durchgeführt, indem zwei C-terminal gelegene Lysinreste durch die hydrophoben Aminosäuren Leucin bzw. Isoleucin ersetzt wurden.

Unter Verwendung der Primer WS179 und WS226 und chromosomaler DNA aus dem *H. pylori*-Wildtyp-Stamm P12 als Matrize, wurde in einer PCR das *cagA*-Gen amplifiziert und dabei das Codon für Lysin an Position 1203 gegen das Codon für ein Leucin ausgetauscht. Das an Position 1208 gelegene Codon „AAA“ wurde durch „CGA“ ersetzt, wodurch statt einem Lysin ein Isoleucin eingebaut wird.

Nach Transformation in *E. coli* wurde bei einem Klon durch Sequenzierung des entstandenen Plasmids die erfolgreiche Mutagenese kontrolliert. Das *cagA*-Konstrukt wurde dann durch Verdau mit *KpnI* und *XbaI* wieder aus dem pCR2.1-TOPO-Vektor isoliert und mit pJP104 ligiert.

Das entstandene Suizid-Plasmid pSH8 wurde zur Transformation des *H. pylori*-Stammes P17 eingesetzt. Das Lysat eines Kanamycin-resistenten Klons wurde im Western Blot auf *cagA*-Expression untersucht (Ergebnis nicht dargestellt).

Die auf diese Weise komplementierte CagA-Mutante war trotz des beschriebenen Austausches von Aminosäuren im mutmaßlichen Translokationssignal zur Translokation des CagA-Proteins in AGS-Zellen fähig. Die Translokation war dabei zwar geringfügig vermindert, aber eine positive Ladung dieser Aminosäurereste scheint nicht essentiell zu sein für den Aufbau des Sekretionssignals (siehe Abb. III.16).

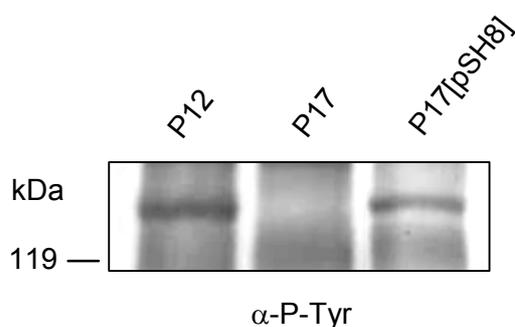


Abb. III.16: Ortsspezifische Mutagenese zur Untersuchung der Bedeutung C-terminal gelegener positiv geladener Aminosäurereste auf die Translokation.

Die Lysine an den Positionen 1203 und 1208 der CagA-Sequenz wurden durch hydrophobe Aminosäuren ersetzt. Die Translokation des CagA-Proteins in AGS-Zellen wurde dadurch nicht wesentlich herabgesetzt, wie der abgebildete Phosphotyrosin-Assay zeigt.

IV Diskussion

Typ IV-Sekretionssysteme stellen einen wichtigen Virulenzfaktor vieler pathogener Gram-negativer Bakterien dar. Für einige Erreger, wie z.B. den intrazellulär vorkommenden Keim *Legionella pneumophila*, ist ein funktionierendes Icm/Dot-Typ IV-System für das Überleben sogar essentiell. Durch die Übertragung von DNA während der Konjugation sowie durch Aufnahme freier DNA, ermöglichen Typ IV-Sekretionssysteme den genetischen Austausch zwischen Bakterien und damit die Anpassung an verschiedene Lebensbedingungen. Zugleich dienen sie auch dem Transport von Effektormolekülen in eukaryontische Zielzellen (Cascales and Christie, 2003). Dabei unterscheiden sich sowohl die Substrate als auch die Mechanismen der Substraterkennung verschiedener Bakterien erheblich voneinander.

Die Charakterisierung des Translokationsmechanismus dieser Effektorproteine auf molekularer Ebene ist Gegenstand der Forschung, da die Aufklärung des Translokationssignals bei der Suche nach weiteren translozierten Effektorproteinen helfen sollte. Zudem erhofft man sich Fortschritte in der Entwicklung pharmakologisch wirksamer Substanzen, die die Proteintranslokation und die damit verbundenen Effekte inhibieren. Typ III-Sekretionssysteme aus *Salmonella* konnten bereits genutzt werden, um Antigene direkt in antigenpräsentierende Zellen zu befördern und auf diese Weise eine Immunantwort hervorzurufen (Rüssmann et al., 1998). Die Durchführung einer solchen Impfung wäre auch mit Typ IV-Sekretionssystemen denkbar.

1 Vergleich von bakteriellen Sekretionssystemen

Für manche Typen Gram-negativer Sekretionssysteme ist der Sekretionsmechanismus bereits bekannt. Proteine, die über ein Typ I-Sekretionssystem in einem Schritt durch beide Membranen hindurch exportiert werden, besitzen ein C-terminales Signal, an dem die letzten 60 Aminosäuren beteiligt sind. Das Signal besteht dabei nicht aus einer spezifischen Aminosäuresequenz, sondern hat vermutlich eher strukturelle Eigenschaften (Binet et al., 1997).

Proteintransport über das Typ II-Sekretionssystem erfolgt dagegen stufenweise – zunächst wird das N-terminal mit einer Signalsequenz versehene Protein über das Sec- oder Tat-System ins Periplasma befördert (Mori and Ito, 2001; Voulhoux et al.,

2001), um anschließend auch die äußere Membran zu passieren. Für den letzten Schritt scheint die Konformation entscheidend zu sein (Lu et al., 1993; Voulhoux et al., 2000).

Bei Typ III-Systemen sind zwei hintereinander gelegene Signale am N-Terminus des Substrates vorhanden, von denen das eine als Sekretionssignal, das andere als Translokationssignal fungiert. Letzteres wird dabei von spezifischen *Chaperon*-Molekülen erkannt (Lloyd et al., 2001a; Lloyd et al., 2001b), wobei nicht jedes Effektorprotein ein *Chaperon* benötigt. Möglicherweise verleiht die *Chaperon*-Bindung dem Effektorprotein eine gewisse Priorität bei der Translokation (Parsot et al., 2003). Was die Eigenschaften des Translokationssignals bei Typ III-Systemen angeht, so existieren derzeit zwei Hypothesen. Die eine Hypothese geht von einem im Bereich der ersten 15 Aminosäuren liegenden und aus abwechselnd polaren und hydrophoben Aminosäuren bestehenden Signal aus, die andere von einem Signal auf der mRNA, die für die entsprechenden Aminosäuren kodiert (Ramamurthi and Schneewind, 2003).

In der Gruppe der Typ V-Sekretionssysteme, auch Autotransporter genannt, verfügen die Proteine über eine N-terminale Signalsequenz zum Transport über die zytoplasmatische Membran (Henderson et al., 2000) und eine C-terminale Domäne, die durch Ausbildung einer fassähnlichen Pore die Sekretion über die äußere Membran vermittelt. Eventuell sind intramolekulare *Chaperon*-Domänen an der Faltung des Passagier-Proteins beteiligt (Oliver et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, ist die Gruppe der Typ IV-Sekretionssysteme sehr vielfältig und dementsprechend variabel sind auch die Substrate. Kleine Proteine, wie das VirF-Protein aus *A. tumefaciens* (22kDa), können ebenso transportiert werden wie das CagA-Protein aus *H. pylori* (130kDa) oder die sogar noch größeren Substrate des Icm/Dot-Systems von *L. pneumophila*, welche teilweise über 200kDa groß sind (Luo and Isberg, 2004). Darüber hinaus transportieren diese Systeme auch Nukleoprotein-Komplexe wie den T-DNA-Komplex oder Relaxosomen. Die Funktionsweise ist dabei zwar weitgehend analog, die Homologien zwischen Komponenten verschiedener Typ IV-Sekretionssysteme sind jedoch nur schwach. Diese Tatsache und die Diversität ihrer Effektormoleküle lassen daher erhebliche Unterschiede auch im Bereich des Translokationsmechanismus erwarten, was die Suche nach einem Translokationssignal erschwert.

2 Das Typ IV-Sekretionssignal

Während der Aufbau des Sekretionsapparates für viele dieser Systeme bereits wohldefiniert ist, sind Einzelheiten in Bezug auf die Sekretionssignale der Effektorproteine häufig noch unbekannt.

Erst kürzlich konnten jedoch bei einigen Organismen Fortschritte bei der Charakterisierung möglicher Sekretionssignale erzielt werden. Anhand von Fusionsproteinen mit der Cre-Rekombinase konnte in *Agrobacterium tumefaciens* gezeigt werden, dass die C-terminale Region der Effektorproteine VirD2, VirD5, VirE2, VirE3 und VirF einen für die Sekretion notwendigen Bereich enthält und dass positiv geladene Argininreste hierbei eine wichtige Rolle spielen (Vergunst et al., 2000; Schrammeijer et al., 2003; Vergunst et al., 2003; Vergunst et al., 2005). Die 19 C-terminalen Aminosäuren des VirF-Proteins waren bereits ausreichend um eine – wenn auch um 75% verminderte – Translokation des Fusionsproteins zu erreichen. Im Falle des VirE2-Proteins konnten 5 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt werden, ohne dadurch die Sekretion zu verhindern; dagegen machte das Entfernen der letzten 18 Aminosäuren eine Translokation unmöglich (Simone et al., 2001).

Die Bep-Effektorproteine des VirB-Systems von *Bartonella henselae* besitzen ebenfalls C-terminale Translokationssignale, die positiv geladen sind (Schulein et al., 2005). In diesem System ist der C-Terminus allein jedoch nicht in der Lage, die Cre-Rekombinase zu transportieren. Vielmehr ist hierfür eine zusätzliche Domäne aus 140 Aminosäuren – als BID (**B**ep **i**ntracellular **d**elivery)-Domäne bezeichnet – notwendig. Eine ähnliche Region wurde auch in konjugativen Relaxasen gefunden, wohingegen sie beim CagA-Protein fehlt.

Ebenfalls durch Fusionen mit der Cre-Rekombinase wurde kürzlich eine Reihe von Substraten des Icm/Dot-Typ IV-Sekretionssystems von *Legionella pneumophila* identifiziert (Luo and Isberg, 2004). Aufgrund der Beobachtung, dass sie eine an ihren N-Terminus fusionierte Cre-Rekombinase durch Konjugation in andere Bakterienzellen schleusen konnten, ist die Existenz eines C-terminalen Signals auch hier wahrscheinlich. Zwei weitere Substrate desselben Systems – die Proteine LepA und LepB – wurden jedoch durch Fusion ihres C-Terminus an eine Adenylatcyclase gefunden (Chen et al., 2004). Es ist nicht klar, welche Konsequenzen sich daraus für ein C-terminales Signal ergeben. Das RalF-Protein toleriert ein Entfernen von maximal zwei Aminosäuren von seinem C-Terminus und 15 C-terminale Aminosäuren reichen aus, um den Adenylatcyclase-Reporter (CyaA) zu translozieren

(Nagai et al., 2005). Obwohl auch das RaIF-Protein ein KXXXXK-Motiv enthält (wie unter III 3.1 beschrieben), weisen Mutationsanalysen darauf hin, dass ein hydrophober Aminosäurerest an Position –3 essentiell ist für die Translokation dieses Proteins.

In den meisten Fällen ist der genaue Aufbau des Sekretionssignals nicht bekannt. Im Gegensatz zu der eindeutig abgrenzbaren N-terminalen Sequenz, die den Transport über die innere Membran ins Periplasma vermittelt, bleiben bei der Substraterkennung und dem Transport über die äußere Membran (oder beide Membranen) noch Fragen offen. Daran könnten Signale beteiligt sein, die auf der Ebene der Primärsequenz nicht ohne weiteres erkennbar sind. Dass die von uns beschriebene schwache Homologie verschiedener Typ IV-sezernerter Proteine dazu herangezogen werden kann, weitere Effektorproteine zu identifizieren, ist unwahrscheinlich, da die „konservierten“ basischen Aminosäuren des CagA-Proteins für ein funktionsfähiges Translokationssignal weder essentiell sind, noch ausreichen um ein funktionelles Signal zu bilden (siehe unten). Die Tatsache, dass C-terminale Regionen solcher Proteine jedoch ausgetauscht werden können, ohne dass dadurch die Translokation beeinflusst wird, deutet darauf hin, dass zumindest Teile des Sekretionsprozesses universell ablaufen. Die erheblichen Unterschiede in der Primärsequenz verschiedener Typ IV-sezernerter Proteine sind möglicherweise Hinweis dafür, dass das Sekretionssignal strukturelle Eigenschaften beinhaltet ähnlich dem Typ I-Sekretionssystem, dessen Substrate ein C-terminales Signal besitzen, welches nicht aus einer bestimmten Primärsequenz aufgebaut ist, sondern durch entsprechende Regionen anderer Substrate funktionell ersetzt werden kann ((Binet et al., 1997; Delepelaire, 2004). Das Austauschen solcher Domänen stellt somit eine weitere Möglichkeit dar, nach funktionellen Typ IV-Sekretionssignalen zu suchen. Allerdings ist zu bedenken, dass auch andere Faktoren – wie beispielsweise Kopplungsproteine – dem Sekretionsvorgang Spezifität verleihen. Dagegen ist das Sekretionssignal des MobA-Proteins des Plasmids RSF1010, das von vielen verschiedenen Typ IV-Systemen erkannt wird, vielleicht weniger spezifisch als etwa das von VirE3 oder CagA.

Das Cag-System von *H. pylori* weist zwar Ähnlichkeiten mit dem VirB/D4-System aus *A. tumefaciens* auf, weswegen beide auch als Mitglieder der Typ IVA-Sekretionssysteme eingeteilt werden, Aufbau und Komponenten der Systeme unterscheiden sich dennoch merklich (R. Buhrdorf, W. Schneider-Brachert, R. Haas

und W. Fischer, eingereicht). Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten C-terminalen *cagA*-Deletionsmutanten stellte sich – ähnlich den Ergebnissen von Simone et al., 2001 – heraus, dass ein Entfernen der 5 C-terminalen Aminosäuren des CagA-Proteins von *H. pylori* noch toleriert wird, die Deletion von 20 Aminosäuren die Translokation jedoch bereits verhindert. Somit werden die letzten 20 Aminosäuren des C-Terminus des CagA-Proteins für dessen Translokation in die Wirtszelle benötigt. Diese Beobachtung veranlasste uns, in diesem Bereich nach einem Sekretionssignal zu suchen, zumal ein Sequenzvergleich verschiedener Typ IV-sezernierter Substrate Ähnlichkeiten in der C-terminalen Region (insbesondere einen hohen Anteil basischer Aminosäuren) dieser Proteine erkennen liess. Wie sich herausstellte, sind die positiv geladenen Aminosäurereste an Position –7 und –12 des CagA-Proteins für die Translokation jedoch nicht essentiell. Eine durch die hydrophoben Aminosäuren Leucin und Isoleucin komplementierte Mutante war trotz des beschriebenen Austausches im mutmaßlichen Sekretionssignal zur Translokation fähig, wie unter III.3.3 beschrieben. Bei späteren Versuchen wurde der C-Terminus des CagA-Proteins durch C-terminale Aminosäuren von CagO (Censini et al., 1996), CagS (HP534) bzw. CagF (HP543) ersetzt – *cag*-kodierte Proteine, die eine dem CagA-Protein vergleichbare Anordnung von Lysinresten und hydrophoben Aminosäuren aufweisen. Diese konnten das Translokationssignal des CagA-Proteins funktionell aber nicht ersetzen (Hohlfeld et al., 2006). Somit sind die positiv geladenen Aminosäuren in der C-terminalen Region des CagA-Proteins weder essentiell, noch hinreichend um eine Translokation zu gewährleisten. Auch die Notwendigkeit eines hydrophoben Aminosäurerests, wie beim RalF-Protein beobachtet, kann wohl nicht als allgemeingültiges Kriterium von Typ IV-Signalen angesehen werden.

Versuche mit N-terminalen *cagA*-Deletionsmutanten erwiesen sich als schwierig, da manche Konstrukte in *H. pylori* kaum exprimiert wurden. Daher war in einigen Fällen keine zuverlässige Beurteilung der Phosphotyrosin-Assays möglich. Von einem CagA-Protein mit einer großen Deletion von 351 Aminosäuren am 5'-Ende, das ausreichend in *H. pylori* gebildet wurde, konnte jedoch gezeigt werden, dass es nicht mehr transloziert wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass – anders als bei *A. tumefaciens* oder dem RalF-Protein aus *L. pneumophila* – bei *H. pylori* neben dem C-Terminus auch der N-Terminus an der Translokation beteiligt ist.

Neben der Suche nach Sequenzen, die für eine Translokation des CagA-Proteins notwendig sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit auch der Frage nachgegangen werden, welche Teile des Proteins für diesen Prozess hinreichend sind. Bei *H. pylori* durchgeführte Versuche mit der Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1, entsprechend den Experimenten von Vergunst et al., scheiterten jedoch daran, dass Fusionen des *cagA*-Gens mit diesem Reporter gen weder durch Konjugation noch Transformation in *H. pylori* eingebracht werden konnten. Selbst Transformationen nach *in vitro*-Methylierung, die den Zweck haben stammspezifische Restriktionsbarrieren dadurch zu umgehen, daß die DNA bereits vorher durch zellfreie *H. pylori*-Extrakte an spezifischen Stellen methyliert wird, um nicht als Fremd-DNA erkannt zu werden, blieben erfolglos. Dieses Phänomen ist vermutlich auf einen toxischen Effekt des Enzyms auf *H. pylori*-Zellen zurückzuführen, denn nach Inaktivierung des *cre*-Gens durch Einführung eines *frame shifts* war die Konjugation des Plasmids möglich.

Fusionen des *cagA*-Gens mit *gfp* wurden zwar in *H. pylori* exprimiert, eine GFP-Fluoreszenz in infizierten Epithelzellen ließ sich aber nicht nachweisen. Das GFP-Protein scheint die Typ IV-Sekretion zu behindern.

Des weiteren wurden Fusionen des *cagA*-Gens mit dem M45-Tag aus dem Adenovirus hergestellt, in der Annahme, dass der Tag aufgrund seiner geringen Größe von nur 18 Aminosäuren in der Lage sein sollte, den Typ IV-Sekretionsapparat zu passieren. Die Fusionsproteine werden in *H. pylori* stabil gebildet und der α -M45-Antikörper erkannte das M45-Epitop im Western Blot. Dennoch war die Darstellung eines so markierten Fusionsproteins in Epithelzellen nach deren Infektion lange Zeit nicht möglich. Als Ursache kam in Betracht, dass der Antikörper in zu geringer Konzentration eingesetzt worden war, um in der Immunfluoreszenz sichtbar zu werden. Später konnte der Antikörper jedoch in der Arbeitsgruppe durch Abnahme des Überstandes der entsprechenden Hybridoma-Zelllinie gewonnen werden und entsprechend große Konzentrationen eingesetzt werden. Fusionsproteine aus N-terminal deletierten CagA-Proteinen und dem M45-Tag konnten trotzdem nicht in der Immunfluoreszenz detektiert werden. Diese Beobachtung bestätigt die Notwendigkeit N-terminaler Regionen für die Translokation. Da ein an den N-Terminus eines vollständigen CagA-Proteins fusionierter Tag die Translokation nicht behindert, scheint der N-Terminus jedoch nicht frei zugänglich sein zu müssen. Ebenso kann ein am C-Terminus um die 18

Aminosäuren des *Tags* verlängertes CagA-Protein in Epithelzellen geschleust werden. Mittlerweile wurde auch ein phosphorylierbarer *Tag* als Reporterprotein eingesetzt, mit dem wiederum gezeigt werden konnte, dass bereits eine Deletion der 39 N-terminalen Aminosäuren ausreicht, um eine Translokation des Fusionsproteins zu verhindern (Hohlfeld et al., 2006).

3 Die mögliche Rolle von *Chaperonen* bei der Typ IV-Sekretion

Ein charakteristisches Merkmal von Typ III-Sekretionssystemen ist, dass die Substratproteine häufig mit spezifischen *Chaperonen* assoziiert sind (Wattiau et al., 1996). So konnte für das Effektorprotein SptP aus *Salmonella typhimurium* SicP als *Chaperon* identifiziert werden (Fu and Galan, 1998). Bei dem Bakterium *Yersinia* spp., sind es die Proteine SycE oder SycH, welche die translozierten Yop-Proteine YopE und YopH binden (Wattiau et al., 1994), und auf diese Weise vermutlich den Sekretionsprozess unterstützen und/oder den vorzeitigen Abbau ihrer Substrate verhindern (Parsot et al., 2003). Bei den Typ IV-Sekretionssystemen konnte dem VirE1-Protein aus *A. tumefaciens* eine Funktion als *Chaperon* zugeschrieben werden (Sundberg et al., 1996; Deng et al., 1999; Sundberg and Ream, 1999; Zhou and Christie, 1999). VirE1 ist ein im Zytosol vorkommendes Protein, das die Translation des VirE2-Proteins reguliert und eine Anhäufung und Aggregation dieses Proteins verhindert (Deng et al., 1999; Zhou and Christie, 1999).

Chaperone, die meist in unmittelbarer Umgebung ihrer Substratproteine kodiert sind, weisen nur geringe Homologien ihrer Primärsequenzen auf, besitzen allerdings strukturelle Gemeinsamkeiten. So handelt es sich in der Regel um kleine Proteine (<20kDa) mit niedrigem isoelektrischen Punkt und vorausgesagten α -Helices in der Sekundärstruktur (Wattiau et al., 1996).

Mögliche Kandidaten für eine *Chaperon*-Bindung des CagA-Proteins von *H. pylori* sind u.a. die von der *cag*-PAI kodierten Proteine HP526 und HP542. Diese Proteine erfüllen einerseits die oben genannten strukturellen Eigenschaften, zum anderen führt eine Mutation ihrer Gene zu einem Verlust der Translozierbarkeit von CagA (Fischer et al., 2001). Die Mutanten sind aber noch in der Lage, IL-8 zu induzieren, was gegen eine Beteiligung der Proteine am Aufbau des Sekretionsapparates spricht.

Um die Proteine auf eine Interaktion mit dem CagA-Protein zu überprüfen, wurden die Gene *hp526* und *hp542* auf einen pGEX-Vektor kloniert (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieser Vektor enthält das Gen für eine Glutathion S-Transferase (GST), mit deren Hilfe die Fusionsproteine nach Überexpression in *E. coli* über Chromatographie mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden können. Da das Fusionsprotein GST-HP542 in *E. coli* jedoch abgebaut wurde, konnten die nachfolgenden Versuche nur mit der GST-HP526-Fusion durchgeführt werden. Des Weiteren wurde in einem GST-Pulldown-Assay das Lysat eines Wildtyp-Stammes über das an eine Sepharose-Matrix gebundene GST-HP526 gegeben. Ließe sich nach dem Waschen der Sepharose CagA eluieren, so würde das für eine Bindung an HP526 sprechen. In beiden Versuchen war jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp-Stamm und *hp526*-Mutante erkennbar. Auch ein *Far Western* Blot, bei dem die Proteine auf der Membran renaturiert und anschließend mit GST-HP526 inkubiert wurden, blieb ohne Ergebnis. Die Versuche konnten die vermutete Funktion der Proteine HP526 und HP542 als *Chaperone* demnach nicht bestätigen.

In später durchgeführten Experimenten war jedoch eine Interaktion der C-terminalen Region des CagA-Proteins mit dem auf der *cag*-PAI kodierten CagF (HP543) nachweisbar (I. Pattis, E. Weiss, R. Haas und W. Fischer, eingereicht). Auch dieses Protein ist für die Translokation des CagA-Proteins, nicht aber für den Aufbau des Sekretionsapparates essentiell. Zudem besitzt es die oben genannten typischen Eigenschaften eines *Chaperon*-Proteins, wobei es mit einer Größe von 34kDa ungewöhnlich groß ist. Die Interaktion mit dem CagA-Protein findet an der zytoplasmatischen Membran statt und zwar unabhängig von der Anwesenheit eines funktionstüchtigen Typ IV-Sekretionsapparates. Da das CagA-Protein aber auch in Abwesenheit des CagF-*Chaperones* stabil ist, unterscheidet sich dessen Funktion vermutlich erheblich von der des oben beschriebenen VirE1-Proteins. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung des CagF-Proteins der Erkennung des CagA-Translokationssignals vorausgeht, und möglicherweise der Kontrolle der Integrität bzw. der korrekten Faltung des Proteins dient.

4 Translokationsmechanismus

Neben der Frage nach der Lokalisation des Translokationssignals bleibt auch zu klären, durch welche Faktoren des Proteinsekretionssystems dieses dann erkannt wird. Betrachtet man verschiedene mit der Typ IV-Sekretion assoziierte Proteine, scheinen die sogenannten Kopplungsproteine am ehesten für die Erkennung von Signalsequenzen bestimmt zu sein (Gomis-Ruth et al., 2004; Christie et al., 2005). Dazu gehören das TrwB- und TraG-Protein der konjugativen Plasmide R388 bzw. RP4 sowie das VirD4-Protein aus *A. tumefaciens* (Llosa et al., 2002; Cascales and Christie, 2003; Christie et al., 2005). Von diesen Proteinen wird angenommen, dass sie den zugehörigen Relaxosomen-Komplex binden und dem Sekretionsapparat zuführen, und dem Sekretionsprozess somit Spezifität verleihen. Ferner konnte eine Interaktion der Kopplungsproteine mit der jeweiligen VirB10-homologen Komponente des Sekretionsapparates nachgewiesen werden (Llosa et al., 2003; Gilmour et al., 2003). Interessanterweise ist für den Transport des Pertussis-Toxins aus *B. pertussis*, welches kein C-terminales Sekretionssignal enthält, auch kein Kopplungsprotein notwendig.

In *A. tumefaciens* interagiert das Kopplungsprotein VirD4 auch ohne die Anwesenheit von T-DNA oder Relaxosom mit dem Typ IV-abhängig sezernierten Substrat VirE2 (Atmakuri et al., 2003). Das VirD4-Protein ist in *A. tumefaciens* an den bakteriellen Zellpolen lokalisiert (Kumar and Das, 2002). Demzufolge kommt es auch bei GFP-VirE2-Fusionsproteinen, die den C-Terminus des VirE2-Proteins enthalten, zu einer Anhäufung an den Zellpolen (Atmakuri et al., 2003). In *H. pylori* ist das zu VirD4 homologe HP524-Protein (Cag β) für die CagA-Translokation essentiell, nicht jedoch für die Cag-abhängige IL-8-Induktion und damit den Aufbau des Sekretionsapparates (Fischer et al., 2001). Eine Interaktion mit dem CagA-Protein entsprechend der zwischen VirD4 und VirE2 erscheint somit naheliegend. Die Lokalisation von HP524 in der Bakterienzelle ist nicht bekannt, jedoch zeigte die Fluoreszenzmikroskopie eine gleichmäßige Verteilung des GFP-CagA(C-term.)-Fusionsproteins in der Zelle. Ein reproduzierbarer Effekt ist auch die fokale Anhäufung der CagA(N-term.)-GFP-Fusionen. Dies könnte eine Anhäufung und Bildung von Aggregaten bei fehlender *Chaperon*-Bindung darstellen oder durch einen unspezifischen Effekt des GFP-Proteins bedingt sein.

Der von uns beobachtete dominant-negative Effekt des GFP-CagA(C-term.)-Fusionsproteins auf die Translokation von Wildtyp-CagA ließe sich wiederum durch

ein C-terminal gelegenes Signal, das den Transport und Zugang zum Typ IV-Apparat vermittelt, erklären. Die Translokation würde dann entweder durch die sperrige Tertiärstruktur des GFP-Proteins bzw. dessen chemisch-physikalische Eigenschaften verhindert, oder weil das Protein nicht in einem ungefalteten Zustand gehalten werden kann. Ob ein solcher ungefalteter Zustand bzw. das Vorliegen eines Monomers allerdings erforderlich ist, ist fraglich. Das Pertussistoxin beispielsweise wird im Periplasma zusammengesetzt und anschließend als Holotoxin, d.h. in vollständig assemblierter Form, sekretiert (Farizo et al., 2000; Farizo et al., 2002). Der Transport von gefalteten Substraten über das Typ IV-Sekretionssystem sollte also nicht von vornherein ausgeschlossen werden. Wenn GFP-Fusionen jedoch grundsätzlich den Typ IV-Sekretionskanal blockieren, könnte die Untersuchung von GFP-Fusionen ein geeignetes *Screening*-Verfahren zur Identifizierung weiterer Proteine mit Typ IV-Sekretionssignalen darstellen.

Wie bereits oben erwähnt, ist für die Translokation des CagA-Proteins aber auch der N-Terminus notwendig. Überraschenderweise konnte das N-terminal deletierte CagA(Δ 1-351) jedoch nicht nur nicht mehr transloziert werden, sondern es übte zusätzlich einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation des Wildtyp-CagA-Proteins aus. Eine Erklärung dafür konnte bisher nicht gefunden werden. Dominant-negative Effekte werden häufig der Bildung und Anhäufung nicht funktionstüchtiger Proteinkomplexe zugeschrieben. Das deletierte CagA(Δ 1-351) wäre dementsprechend noch in der Lage Komplexe zu bilden, die jedoch nicht mehr translozierbar sind. Eine solche Komplexbildung als Ursache für den hier auftretenden dominant-negativen Effekt vorausgesetzt, wäre die Interaktionsdomäne möglicherweise zwischen den Aminosäuren 352 und 613 lokalisiert. Denn die kürzeren, M45-markierten N-terminalen Deletionsmutanten beeinflussen die Translokation des Wildtyp-Proteins nicht. Interessanterweise enthält diese Region des CagA-Proteins mindestens zwei *coiled-coil* Domänen, welche bei Typ III-Sekretionssystemen an der Ausbildung von Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind (Delahay and Frankel, 2002).

Abb. IV.1 zeigt die durch unsere Versuche als wahrscheinlich erachtete Lokalisation von Domänen, die an der Translokation beteiligt sind. Neben dem C-Terminus, der vermutlich dem Transport zum Sekretionsapparat dient, kommt auch dem N-Terminus eine entscheidende Rolle zu, möglicherweise als Teil eines 2-Stufen-Mechanismus mit vorgeschalteter Sekretion ins Periplasma (siehe unten). Eine nahe

dem C-terminalen Signal gelegene Domäne interagiert mit dem *Chaperon*-Protein CagF (I. Pattis, E. Weiss, R. Haas und W. Fischer, eingereicht).

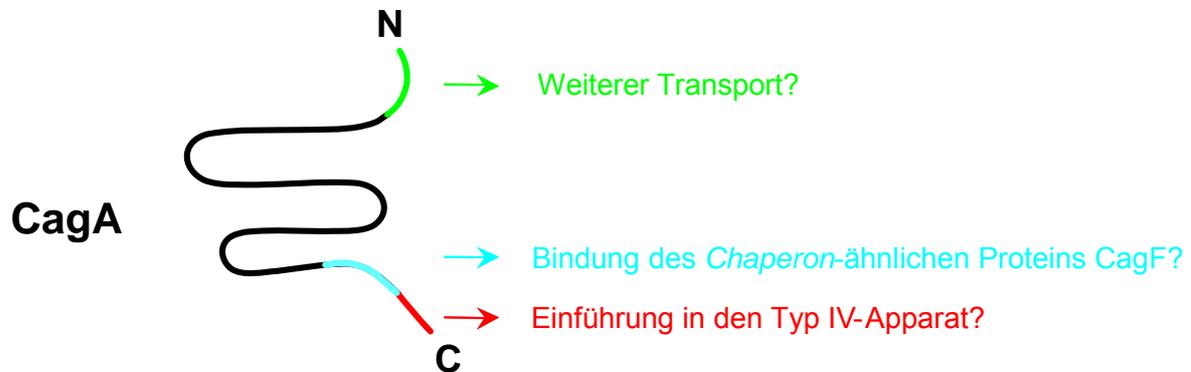


Abb. IV.1: Modell funktioneller Domänen für die CagA-Translokation.

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des CagA-Proteins. Der C-Terminus (rot dargestellt) dient vermutlich der Erkennung durch sog. Kopplungsproteine und der Hinführung des Proteins zum Typ IV-Sekretionsapparat. Der N-Terminus (grün dargestellt) könnte dann für den weiteren Transport zuständig sein. Die Ergebnisse von Pattis et al. zeigen zudem die Interaktion einer C-terminalen Region mit dem CagF-Protein (blau dargestellt). Die Bindung dieses Proteins, das die Eigenschaften eines Chaperon-Proteins aufweist, dient möglicherweise der Kontrolle der Integrität bzw. der korrekten Faltung des CagA-Proteins vor dessen Translokation (I. Pattis, E. Weiss, R. Haas und W. Fischer, eingereicht).

Verschiedene Modelle können als Erklärung dafür herangezogen werden, dass im Falle des CagA-Proteins sowohl N- als auch C-Terminus für die Translokation benötigt werden. Im Gegensatz dazu, sind weniger als 20 C-terminale Aminosäuren des VirF- oder RalF-Proteins bereits ausreichend, um die Cre-Rekombinase oder die Adenylatzyklase CyaA zu translozieren (Vergunst et al., 2005; Nagai et al., 2005). Dieser Umstand scheint also eine Besonderheit des Cag-Systems bzw. des CagA-Proteins darzustellen. Es bleibt zu erwähnen, dass der C-Terminus des VirE2-Proteins aus *A. tumefaciens* ebenso in der Lage ist, die Cre-Rekombinase zu translozieren (Vergunst et al., 2003), während für die Translokation des VirE2-Proteins als solches mehr als nur der C-Terminus benötigt wird. Grund hierfür ist, dass für die Stabilität des VirE2-Proteins – welche durch die Bindung des VirE1-*Chaperon*-Proteins vermittelt wird – N-terminale Regionen unverzichtbar sind (Zhao et al., 2001). Mit Ausnahme der instabilen Proteine mit sehr kurzen N-terminalen Deletionen werden ähnliche Phänomene bei CagA-Varianten aber nicht beobachtet.

Denkbar ist, dass das CagA-Protein über kein lineares, sondern ein konformationelles Signal verfügt, an dessen Aufbau der N-Terminus beteiligt ist. Solche dreidimensionalen Signale wurden für mehrere Typ II-sekretierte Proteine vorgeschlagen (Sauvonnnet and Pugsley, 1996; Voulhoux et al., 2000; Palomaki et al., 2002), obwohl die Beschaffenheit dieser Signale noch unklar bleibt (Filloux, 2004). Im Falle des CagA-Proteins ist das Vorhandensein eines konformationellen Signals aber eher unwahrscheinlich. Der dominant-negative Effekt der GFP-CagA(C-term.)-Fusion auf die Translokation des Wildtyp-CagA-Proteins deutet eher darauf hin, dass der C-Terminus ausreicht, um das Protein in den Sekretionsapparat zu schleusen. Das Fusionsprotein wird jedoch nicht sekretiert, vielleicht weil es nicht in einem translokationsfähigen Zustand gehalten werden kann. Möglicherweise wird die Bindung des *Chaperons* durch das GFP-Protein verhindert.

Eine alternative Erklärung für die Beteiligung beider Termini bietet das Modell eines zweistufigen Translokationsprozesses, bei dem das CagA-Protein zunächst in das Periplasma geschleust würde, um anschließend auch die äußere Membran zu überwinden. Ein solcher Mechanismus wird auch bei anderen Typ IV-Systemen vermutet bzw. konnte in einigen Fällen beobachtet werden (Pantoja et al., 2002; Cascales and Christie, 2003; Burns, 2003). Abb. IV.2 zeigt zwei mögliche Translokationsmechanismen, von Cascales und Christie als Kanal- bzw. Kolbenmodell bezeichnet (Cascales and Christie, 2003). In beiden Fällen wäre ein 2-Stufen-Mechanismus möglich, im zweiten Fall sogar erforderlich.

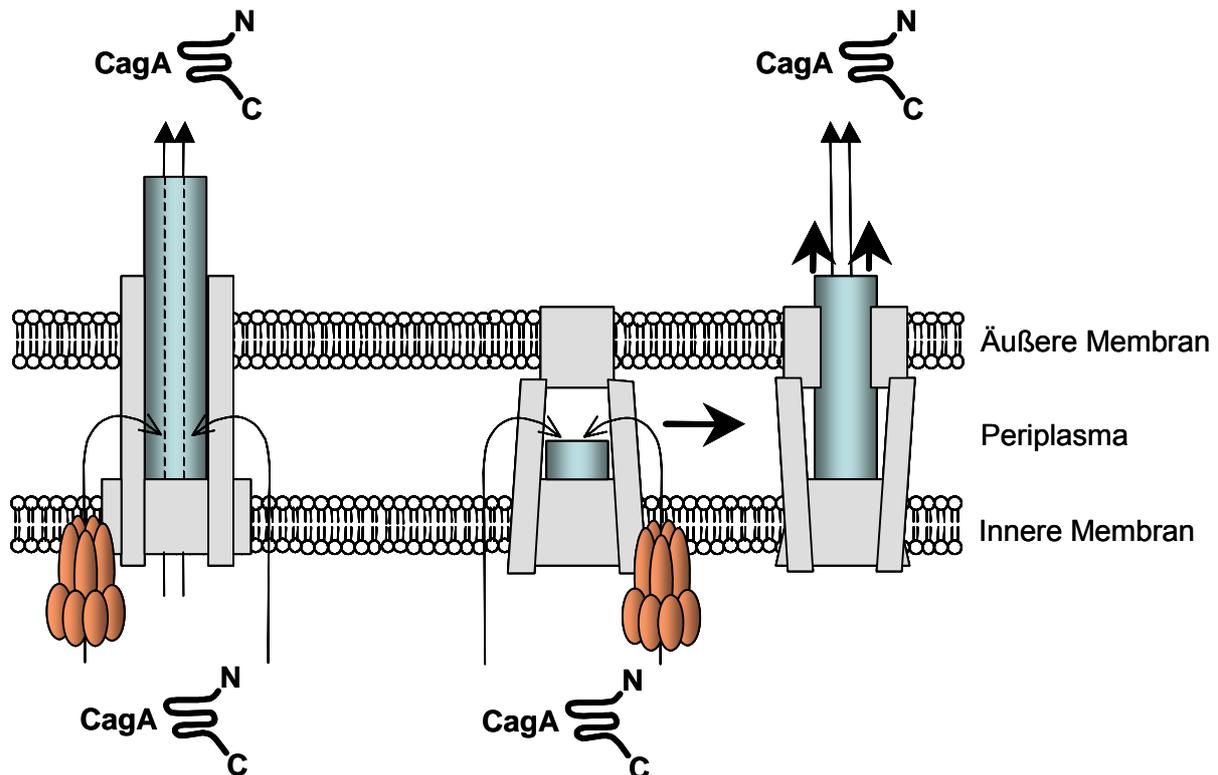


Abb. IV.2: Modell der Typ IV-Sekretion (Cascales and Christie, 2003).

Im „Kanalmodell“ (links) fungiert der Pilus als Kanal durch den die Substrate die beiden Zellmembranen überwinden. Beim alternativen „Kolbenmodell“ (rechts) werden die Substrate zunächst ins Periplasma befördert. In einem zweiten Schritt werden sie vom Pilus ins extrazelluläre Medium oder in die Wirtszelle geschoben. Die Wege, die die Substrate hierbei beschreiben sind als Pfeile dargestellt.

Als Beispiel für eine vorgeschaltete Sekretion in den periplasmatischen Raum kann der Translokationsmechanismus der Untereinheiten des Pertussistoxins aus *B. pertussis* (Burns, 2003) und des DotA-Proteins von *L. pneumophila* (Nagai and Roy, 2001) genannt werden. Diese Proteine besitzen N-terminale (Sec-abhängige) Signalsequenzen, mit denen sie zunächst ins Periplasma gelangen, bevor sie durch den Typ IV-Translokationskanal über die äußere Membran geschleust werden. Ein C-terminales Signal ist dort nicht beschrieben. Somit könnten N-terminal und C-terminal gelegene Signale zwei Alternativen beim Erreichen des Typ IV-Translokationskanals darstellen.

Auch im Falle von *A. tumefaciens* wird ein solcher 2-Stufen-Mechanismus diskutiert. Geringe Mengen der Typ IV-Substrate sind im Periplasma nachweisbar (Chen et al., 2000), wo sie mit dem im Periplasma lokalisierten VirJ-Protein interagieren (Pantoja et al., 2002). Dieser Hypothese zufolge, würde die C-terminale Signalsequenz zum

Erreichen des Sekretionsapparates benötigt und eventuell zusätzlich dem Transport über die zytoplasmatische Membran dienen. Der N-Terminus hingegen wäre an darauffolgenden Schritten und letztlich der Translokation über die äußere Membran beteiligt. Interessanterweise scheint das VirB9-Protein von *A. tumefaciens*, welches eine Apparatskomponente der äußeren Membran darstellt, eine Domäne zu besitzen, welche der Substraterkennung und Selektion dient (Jakubowski et al., 2005). Es ist zwar noch nicht klar, welche Regionen der VirD2-Relaxase erkannt werden, vorstellbar ist jedoch, dass neben dem C-Terminus auch hier noch weitere Erkennungssignale vorhanden sind.

Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich also sagen, dass im Falle von *H. pylori* N- und C-terminale Regionen des CagA-Effektorproteins für die Translokation notwendig sind, wobei die Termini hierfür nicht frei zugänglich sein müssen. Zur genauen Charakterisierung des Translokationsmechanismus bedarf es jedoch weiterer Experimente.

V Zusammenfassung

Gram-negative Bakterien haben unterschiedliche Sekretionssysteme entwickelt, um verschiedene molekulare Komplexe durch die bakterielle Membran in die extrazelluläre Umgebung oder in andere Zellen zu transferieren. Typ IV-Sekretionssysteme werden als Konjugationssysteme für den horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien verwendet, sie stellen aber auch einen wichtigen Virulenzfaktor Gram-negativer Bakterien dar. So vielseitig diese Sekretionssysteme sind, so verschieden sind auch die von ihnen transportierten Substrate. Sowohl kleine Proteine als auch große Nukleoproteinkomplexe gehören dazu, die wenig gemein zu haben scheinen. Bisher durchgeführte Untersuchungen an Typ IV-sezernierten Proteinen legten die Vermutung nahe, dass die Sekretion dieser Proteine durch ein C-terminal gelegenes Sekretionssignal erfolgt. Über die Eigenschaften eines solchen Signals und die Verbreitung eines konservierten Motivs bei unterschiedlichen Systemen ist jedoch wenig bekannt.

Das von der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierte CagA-Protein aus *H. pylori*, ein immundominantes Antigen von 130kDa, ist das bisher einzig bekannte Effektorprotein, das durch den Cag Typ IV-Sekretionsapparat in verschiedene eukaryontische Zellen transloziert wird. Dort wird es anschließend an Tyrosinresten phosphoryliert und löst in der Zielzelle eine Reihe von Effekten aus. Die auf molekularer Ebene ablaufenden Folgeerscheinungen sind zwar bisher wenig verstanden, spielen aber mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Magengeschwüren und -karzinomen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Translokationsprozess näher charakterisiert.

Von uns konstruierte Fusionen aus dem CagA-Protein und GFP (*green fluorescent protein*) wurden nicht in Epithelzellen transloziert, aber die Fusion von GFP an den C-Terminus des CagA-Proteins übte bei gleichzeitiger Bildung des Wildtyp-CagA-Proteins einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation des Wildtyp-Proteins aus. Diese Beobachtung spricht für ein C-terminales Signal. Wir konnten außerdem zeigen, dass die Translokation des CagA-Proteins die Anwesenheit der 20 C-terminalen Aminosäuren erfordert und dass verschiedene von Typ IV-Sekretionssystemen transportierte Substrate zu CagA homologe C-terminale Regionen aufweisen. Ein mutmaßliches konserviertes Motiv enthält eine Reihe positiv geladener Aminosäuren von denen jedoch gezeigt werden konnte, dass sie

nicht für die Translokation essentiell sind. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass durch den Austausch C-terminaler Domänen von CagA gegen entsprechende Domänen der MobA-Relaxase des Plasmids RSF1010 die Translokationsfähigkeit des CagA-Proteins wiederhergestellt werden kann.

Trotz diverser Homologien zum VirB/D4-Sekretionssystem von *Agrobacterium tumefaciens* unterscheidet sich der Sekretionsmechanismus bei *Helicobacter pylori* von erstgenanntem. Während die Substrate des VirB/D4-Sekretionssystems auch nach Entfernen des N-Terminus noch transloziert werden, ist die Sekretion des CagA-Proteins in diesem Fall nicht mehr möglich. Aufgrund dieser Tatsache ist für *H. pylori* auch ein 2-stufiger Mechanismus der Translokation denkbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Typ IV-Sekretionssysteme trotz ihrer Gemeinsamkeiten an ihre jeweilige Funktionen bzw. Organismen angepasst sind, was ihre Variabilität ausmacht.

Aufgrund der wichtigen Rolle, die die Typ IV-Sekretionssysteme bei der Pathogenese schwerwiegender Erkrankungen wie dem Magenulkus und –karzinom spielen, ist die Charakterisierung des Translokationsmechanismus von großem Interesse. Möglicherweise können die hier gewonnenen Erkenntnisse über das Translokationssignal des *Helicobacter*-Proteins CagA als Grundlage zur Entwicklung hochspezifischer Interventionstherapien dienen.

VI Literaturverzeichnis

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.

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.

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

Aspinall, G.O. and Monteiro, M.A. (1996) Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* **35**, 2498-2504.

Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Jr., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., and Cover, T.L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J.Biol.Chem.* **270**, 17771-17777.

Atmakuri, K., Ding, Z., and Christie, P.J. (2003) VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol.Microbiol.* **49**, 1699-1713.

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., 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.

Bamford, K.B., Bickley, J., Collins, J.S., Johnston, B.T., Potts, S., Boston, V., Owen, R.J., and Sloan, J.M. (1993) *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. *Gut* **34**, 1348-1350.

Bamford, K.B., Fan, X., Crowe, S.E., Leary, J.F., Gourley, W.K., Luthra, G.K., Brooks, E.G., Graham, D.Y., Reyes, V.E., and Ernst, P.B. (1998) Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* **114**, 482-492.

- Bayerdorffer, E., Neubauer, A., Rudolph, B., Thiede, C., Lehn, N., Eidt, S., and Stolte, M. (1995) Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet* **345**, 1591-1594.
- Beales, I.L. and Calam, J. (1997) *Helicobacter pylori* stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production from cultured antral biopsies and a human gastric epithelial cell line. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **9**, 451-455.
- Bergman, M., Del Prete, G., van Kooyk, Y., and Appelmek, B. (2006) *Helicobacter pylori* phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. *Nat.Rev.Microbiol* **4**, 151-159.
- Bergman, M.P., Engering, A., Smits, H.H., van Vliet, S.J., van Bodegraven, A.A., Wirth, H.P., Kapsenberg, M.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M., van Kooyk, Y., and Appelmek, B.J. (2004) *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J.Exp.Med.* **200**, 979-990.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. *Gene* **192**, 7-11.
- Bizzozero, G. (1893) Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch.Mikr.Anat.* **42**, 82-82.
- 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 Atherton, J.C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J.Clin.Invest* **113**, 321-333.
- Blaser, M.J. and Berg, D.E. (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J.Clin.Invest* **107**, 767-773.
- 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 chemotactic protein 1 by human monocytes. *Infect.Immun.* **66**, 5357-5363.
- Bode, G., Malfertheiner, P., Strohle, A., Mauch, F., Nilius, M., and Ditschuneit, H. (1992) [Polymorphism in *Helicobacter pylori*--a key function in recurrence of infection?]. *Med.Klin.(Munich)* **87**, 179-184.
- Bode, G., Mauch, F., and Malfertheiner, P. (1993) The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol.Infect.* **111**, 483-490.
- 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.

- Bourzac, K.M. and Guillemin, K. (2005) Helicobacter pylori-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* **7**, 911-919.
- 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.
- Buhrdorf, R., Forster, C., Haas, R., and Fischer, W. (2003) Topological analysis of a putative VirB8 homologue essential for the *cag* type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int.J.Med.Microbiol.* **293**, 213-217.
- Burns, D.L. (2003) Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.* **6**, 29-34.
- Cascales, E. and Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat.Rev.Microbiol.* **1**, 137-149.
- 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.
- Chen, J., de Felipe, K.S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G., and Shuman, H.A. (2004) *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**, 1358-1361.
- Chen, L., Li, C.M., and Nester, E.W. (2000) Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of *virB*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 7545-7550.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) Biogenesis, Architecture, and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu.Rev.Microbiol*
- Christie, P.J. and Vogel, J.P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**, 354-360.
- 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.
- 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.
- Conover, G.M., Derre, I., Vogel, J.P., and Isberg, R.R. (2003) The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol.Microbiol.* **48**, 305-321.
- 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. and Rappuoli, R. (2003) *Helicobacter pylori*: after the genomes, back to biology. *J.Exp.Med.* **197**, 807-811.

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

Cover, T.L., Halter, S.A., and Blaser, M.J. (1992) Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. *Hum.Pathol.* **23**, 1004-1010.

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

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., Wyatt, J.I., Trejdosiewicz, L.K., Peichl, P., Nichols, P.H., Ramsay, N., Primrose, J.N., and Lindley, I.J. (1994) Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J.Clin.Pathol.* **47**, 61-66.

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.

D'Elios, M.M., Appelmelk, B.J., Amedei, A., Bergman, M.P., and Del Prete, G. (2004) Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol.Med.* **10**, 316-323.

D'Elios, M.M., Manghetti, M., Almerigogna, F., Amedei, A., Costa, F., Burroni, D., Baldari, C.T., Romagnani, S., Telford, J.L., and Del Prete, G. (1997) Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. *Eur.J.Immunol.* **27**, 1751-1755.

Dehio, C. and Meyer, M. (1997) Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **179**, 538-540.

Delahay, R.M. and Frankel, G. (2002) Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol.Microbiol.* **45**, 905-916.

Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim.Biophys.Acta* **1694**, 149-161.

Deng, W., Chen, L., Peng, W.T., Liang, X., Sekiguchi, S., Gordon, M.P., Comai, L., and Nester, E.W. (1999) VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol.Microbiol* **31**, 1795-1807.

- Donahue, J.P., Israel, D.A., Peek, R.M., Blaser, M.J., and Miller, G.G. (2000) Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of *Helicobacter pylori*. *Mol.Microbiol.* **37**, 1066-1074.
- Drumm, B., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J., and Sherman, P.M. (1990) Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N.Engl.J.Med.* **322**, 359-363.
- Dubois, A., Berg, D.E., Incecik, E.T., Fiala, N., Heman-Ackah, L.M., Del Valle, J., Yang, M., Wirth, H.P., Perez-Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1999) Host specificity of *Helicobacter pylori* strains and host responses in experimentally challenged nonhuman primates. *Gastroenterology* **116**, 90-96.
- Eaton, K.A., Morgan, D.R., and Krakowka, S. (1992) Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J.Med.Microbiol.* **37**, 123-127.
- Etchegaray, J.P. and Inouye, M. (1999) A sequence downstream of the initiation codon is essential for cold shock induction of *cspB* of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **181**, 5852-5854.
- 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.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., Yamaoka, Y., Megraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M., and Suerbaum, S. (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**, 1582-1585.
- Farizo, K.M., Fiddner, S., Cheung, A.M., and Burns, D.L. (2002) Membrane localization of the S1 subunit of pertussis toxin in *Bordetella pertussis* and implications for pertussis toxin secretion. *Infect.Immun.* **70**, 1193-1201.
- Farizo, K.M., Huang, T., and Burns, D.L. (2000) Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect.Immun.* **68**, 4049-4054.
- Filloux, A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim.Biophys.Acta* **1694**, 163-179.
- 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.
- Forman, D., Newell, D.G., Fullerton, F., Yarnell, J.W., Stacey, A.R., Wald, N., and Sitas, F. (1991) Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* **302**, 1302-1305.
- 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.
- Fox, J.G. (1998) Review article: *Helicobacter* species and in vivo models of gastrointestinal cancer. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **12 Suppl 1**, 37-60.
- Fu, Y. and Galan, J.E. (1998) Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **180**, 3393-3399.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**, 1099-1102.
- Gillessen, A., Shahin, M., Pohle, T., Foerster, E., Krieg, T.H., and Domschke, W. (1995) Evidence of de novo collagen synthesis in healing human gastric ulcers. *Scand.J.Gastroenterol.* **30**, 515-518.
- Gilmour, M.W., Gunton, J.E., Lawley, T.D., and Taylor, D.E. (2003) Interaction between the IncH11 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol.Microbiol.* **49**, 105-116.
- Glocker, E., Lange, C., Covacci, A., Bereswill, S., Kist, M., and Pahl, H.L. (1998) Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappaB activation. *Infect.Immun.* **66**, 2346-2348.
- Gomis-Ruth, F.X., Sola, M., de la, C.F., and Coll, M. (2004) Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr.Pharm.Des* **10**, 1551-1565.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnel, W., and Harper, W.E.S. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **39**, 397-405.
- Gibbon, L.T. and Barer, M.R. (1995) Oxidative metabolism in nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**, 3379-3384.
- Haas, R., Meyer, T.F., and van Putten, J.P. (1993) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol.Microbiol.* **8**, 753-760.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., and Goebel, W. (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb.Pathog.* **8**, 213-225.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., and Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol.Microbiol.* **23**, 1089-1097.

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Henderson, I.R., Cappello, R., and Nataro, J.P. (2000) Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion: response. *Trends Microbiol.* **8**, 534-535.
- Hessey, S.J., Spencer, J., Wyatt, J.I., Sobala, G., Rathbone, B.J., Axon, A.T., and Dixon, M.F. (1990) Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* **31**, 134-138.
- Heuermann, D. and Haas, R. (1998) A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol.Gen.Genet.* **257**, 519-528.
- 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.
- 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.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., and Haas, R. (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol.Microbiol.* **41**, 379-391.
- Hohlfeld, S., Pattis, I., Puls, J., Plano, G.V., Haas, R., and Fischer, W. (2006) A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol.Microbiol* **59**, 1624-1637.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* **114**, 193-197.
- 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.
- Jacobi, C.A., Roggenkamp, A., Rakin, A., Zumbihl, R., Leitritz, L., and Heesemann, J. (1998) In vitro and in vivo expression studies of *yopE* from *Yersinia enterocolitica* using the *gfp* reporter gene. *Mol.Microbiol.* **30**, 865-882.
- Jakubowski, S.J., Cascales, E., Krishnamoorthy, V., and Christie, P.J. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol.* **187**, 3486-3495.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K., and Taylor, D.E. (1996) Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol.Microbiol.* **20**, 833-842.

- Kavermann, H., Burns, B.P., Angermüller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K., and Haas, R. (2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J.Exp.Med.* **197**, 813-822.
- Kersulyte, D., Chalkauskas, H., and Berg, D.E. (1999) Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol.Microbiol.* **31**, 31-43.
- Klausz, G., Tiszai, A., Tizslavicz, L., Gyulai, Z., Lenart, Z., Lonovics, J., and Mandi, Y. (2003) Local and peripheral cytokine response and CagA status of *Helicobacter pylori*-positive patients with duodenal ulcer. *Eur.Cytokine Netw.* **14**, 143-148.
- Krienitz, W. (1906) Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei carcinoma ventriculi. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **22**, 872-872.
- Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P.H., Stremmel, W., and Rudi, J. (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect.Immun.* **69**, 5080-5087.
- Kuipers, E.J., Israel, D.A., Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Weel, J., van Der, E.A., Der Hulst, R.W., Wirth, H.P., Hook-Nikanne, J., Thompson, S.A., and Blaser, M.J. (2000) Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J.Infect.Dis.* **181**, 273-282.
- Kumar, R.B. and Das, A. (2002) Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol.Microbiol.* **43**, 1523-1532.
- Labigne, A., Cussac, V., and Courcoux, P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J.Bacteriol.* **173**, 1920-1931.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lambert, J.R., Lin, S.K., Sievert, W., Nicholson, L., Schembri, M., and Guest, C. (1995) High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *Am.J.Gastroenterol.* **90**, 2167-2171.
- Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G., and Morgan, D.R. (1988) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J.Med.Microbiol.* **26**, 93-99.
- Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., and Haas, R. (1992) Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol.Microbiol.* **6**, 2863-2874.
- Linton, K.J. and Higgins, C.F. (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol.Microbiol.* **28**, 5-13.
- Llosa, M., Gomis-Ruth, F.X., Coll, M., and de la Cruz, F.F. (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol.Microbiol.* **45**, 1-8.

- Llosa, M., Zunzunegui, S., and de la, C.F. (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 10465-10470.
- Lloyd, S.A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Francis, M.S. (2001a) Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.* **9**, 367-371.
- Lloyd, S.A., Norman, M., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (2001b) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol.Microbiol.* **39**, 520-531.
- Lu, H.M., Mizushima, S., and Lory, S. (1993) A periplasmic intermediate in the extracellular secretion pathway of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *J.Bacteriol.* **175**, 7463-7467.
- Luo, Z.Q. and Isberg, R.R. (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 841-846.
- 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.
- Majewski, S.I. and Goodwin, C.S. (1988) Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J.Infect.Dis.* **157**, 465-471.
- 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. and Graham, D.Y. (1994) Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**, 742-745.
- Malferteiner, P., Peitz, U., Wolle, K., and Treiber, G. (2004) [*Helicobacter pylori* infection--an update for 2004]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **129**, 1821-1826.
- Marshall, B.J. and Goodwin, C.S. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **37**, 68-
- Messing, J. and Vieira, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene* **19**, 269-276.
- 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.M., Bohane, T., Hawkes, R.A., and Lee, A. (1993) *Helicobacter pylori* infection within families. *Zentralbl.Bakteriol.* **280**, 128-136.

- Mitchell, H.M., Hu, P., Chi, Y., Chen, M.H., Li, Y.Y., and Hazell, S.L. (1998) A low rate of reinfection following effective therapy against *Helicobacter pylori* in a developing nation (China). *Gastroenterology* **114**, 256-261.
- Moese, S., Selbach, M., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., and Backert, S. (2001) Identification of a tyrosine-phosphorylated 35 kDa carboxy-terminal fragment (p35CagA) of the *Helicobacter pylori* CagA protein in phagocytic cells: processing or breakage? *Proteomics*. **1**, 618-629.
- Mohammadi, M., Nedrud, J., Redline, R., Lycke, N., and Czinn, S.J. (1997) Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter infection*: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* **113**, 1848-1857.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C. (1998) Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J.Exp.Med.* **187**, 135-140.
- Montecucco, C., Papini, E., and Schiavo, G. (1996) Bacterial protein toxins and cell vesicle trafficking. *Experientia* **52**, 1026-1032.
- Montecucco, C. and Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 457-466.
- Mori, H. and Ito, K. (2001) The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* **9**, 494-500.
- Nagai, H., Cambronne, E.D., Kagan, J.C., Amor, J.C., Kahn, R.A., and Roy, C.R. (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *PNAS*
- Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A., and Roy, C.R. (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**, 679-682.
- Nagai, H. and Roy, C.R. (2001) The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J.* **20**, 5962-5970.
- 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.
- Obert, S., O'Connor, R.J., Schmid, S., and Hearing, P. (1994) The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol.Cell Biol.* **14**, 1333-1346.
- Odenbreit, S., Gebert, B., Puls, J., Fischer, W., and Haas, R. (2001) Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol.* **3**, 21-31.

- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**, 1497-1500.
- 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.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y., and Omata, M. (2000) Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J.Exp.Med.* **192**, 1601-1610.
- Oliver, D.C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S., and Fernandez, R.C. (2003) A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol.Microbiol.* **47**, 1367-1383.
- Palomaki, T., Pickersgill, R., Riekkki, R., Romantschuk, M., and Saarilahti, H.T. (2002) A putative three-dimensional targeting motif of polygalacturonase (PehA), a protein secreted through the type II (GSP) pathway in *Erwinia carotovora*. *Mol.Microbiol* **43**, 585-596.
- Pantoja, M., Chen, L., Chen, Y., and Nester, E.W. (2002) *Agrobacterium* type IV secretion is a two-step process in which export substrates associate with the virulence protein VirJ in the periplasm. *Mol.Microbiol.* **45**, 1325-1335.
- Papini, E., Gottardi, E., Satin, B., De Bernard, M., Massari, P., Telford, J., Rappuoli, R., Sato, S.B., and Montecucco, C. (1996) The vacuolar ATPase proton pump is present on intracellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori*. *J.Med.Microbiol.* **45**, 84-89.
- Papini, E., Satin, B., Norais, N., De Bernard, M., Telford, J.L., Rappuoli, R., and Montecucco, C. (1998) Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J.Clin.Invest* **102**, 813-820.
- Parsonnet, J. (2005) Clinician-discoverers--Marshall, Warren, and H. pylori. *N.Engl.J Med* **353**, 2421-2423.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., and Sibley, R.K. (1991a) *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., Vandersteen, D., Goates, J., Sibley, R.K., Pritikin, J., and Chang, Y. (1991b) *Helicobacter pylori* infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J.Natl.Cancer Inst.* **83**, 640-643.
- Parsot, C., Hamiaux, C., and Page, A.L. (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr.Opin.Microbiol.* **6**, 7-14.

- Pelicic, V., Reyrat, J.M., Sartori, L., Pagliaccia, C., Rappuoli, R., Telford, J.L., Montecucco, C., and Papini, E. (1999) *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology* **145** (Pt 8), 2043-2050.
- Plano, G.V., Day, J.B., and Ferracci, F. (2001) Type III export: new uses for an old pathway. *Mol.Microbiol.* **40**, 284-293.
- Püls, J., Fischer, W., and Haas, R. (2002) Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells. *Mol.Microbiol.* **43**, 961-969.
- Ramamurthi, K.S. and Schneewind, O. (2003) Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol.Microbiol.* **50**, 1095-1102.
- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Backert, S., and Meyer, T.F. (2000a) *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Mol.Microbiol.* **37**, 1389-1404.
- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., and Meyer, T.F. (2000b) *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol.Microbiol.* **38**, 103-113.
- Repogle, M.L., Glaser, S.L., Hiatt, R.A., and Parsonnet, J. (1995) Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *Am.J.Epidemiol.* **142**, 856-863.
- Ricci, V., Sommi, P., Fiocca, R., Romano, M., Solcia, E., and Ventura, U. (1997) *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J.Pathol.* **183**, 453-459.
- Rieder, G., Fischer, W., and Haas, R. (2005) Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr.Opin.Microbiol* **8**, 67-73.
- Rieder, G., Hatz, R.A., Moran, A.P., Walz, A., Stolte, M., and Enders, G. (1997) Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect.Immun.* **65**, 3622-3630.
- 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.
- Rowland, M., Kumar, D., Daly, L., O'Connor, P., Vaughan, D., and Drumm, B. (1999) Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. *Gastroenterology* **117**, 336-341.
- Rüssmann, H., Igwe, E.I., Sauer, J., Hardt, W.D., Bubert, A., and Geginat, G. (2001) Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J.Immunol.* **167**, 357-365.

- Rüssmann, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y., Galan, J.E., and Donis, R.O. (1998) Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* **281**, 565-568.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salomon, H. (1896) Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentralbl.Bakteriol.* **19**, 433-441.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. **3rd**,
- Sandkvist, M. (2001) Biology of type II secretion. *Mol.Microbiol.* **40**, 271-283.
- Satin, B., Del Giudice, G., Della, B., 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.
- Satin, B., Norais, N., Telford, J., Rappuoli, R., Murgia, M., Montecucco, C., and Papini, E. (1997) Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J.Biol.Chem.* **272**, 25022-25028.
- Sauvonnet, N. and Pugsley, A.P. (1996) Identification of two regions of *Klebsiella oxytoca* pullulanase that together are capable of promoting beta-lactamase secretion by the general secretory pathway. *Mol.Microbiol* **22**, 1-7.
- Schmausser, B., Andrulis, M., Endrich, S., Lee, S.K., Josenhans, C., Muller-Hermelink, H.K., and Eck, M. (2004) Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin.Exp.Immunol.* **136**, 521-526.
- 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.
- Schrammeijer, B., Dulk-Ras, A., Vergunst, A.C., Jurado, J.E., and Hooykaas, P.J. (2003) Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Res.* **31**, 860-868.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C., Carena, I., and Dehio, C. (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*
- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 14559-14564.

- Segal, E.D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L.S., and Falkow, S. (1997) Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 7595-7599.
- Segal, E.D. and Tompkins, L.S. (1993) Transformation of *Helicobacter pylori* by electroporation. *Biotechniques* **14**, 225-226.
- 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.
- 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.
- Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., and Kerr, L.D. (1998) Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J.Immunol.* **160**, 2401-2407.
- Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Miller, G.G., and Blaser, M.J. (1995) Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect.Immun.* **63**, 1681-1687.
- 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.
- Simone, M., McCullen, C.A., Stahl, L.E., and Binns, A.N. (2001) The carboxy-terminus of VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* is required for its transport to host cells by the *virB*-encoded type IV transport system. *Mol.Microbiol.* **41**, 1283-1293.
- Smythies, L.E., Waites, K.B., Lindsey, J.R., Harris, P.R., Ghiara, P., and Smith, P.D. (2000) *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J.Immunol.* **165**, 1022-1029.
- Sobala, G.M., Crabtree, J.E., Dixon, M.F., Schorah, C.J., Taylor, J.D., Rathbone, B.J., Heatley, R.V., and Axon, A.T. (1991) Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* **32**, 1415-1418.
- Solnick, J.V. and Schauer, D.B. (2001) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin.Microbiol.Rev.* **14**, 59-97.
- Sommer, F., Faller, G., Konturek, P., Kirchner, T., Hahn, E.G., Zeus, J., Rollinghoff, M., and Lohoff, M. (1998) Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect.Immun.* **66**, 5543-5546.

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.

Suerbaum, S. and Michetti, P. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N.Engl.J.Med.* **347**, 1175-1186.

Suerbaum, S., Smith, J.M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E., Dyrek, I., and Achtman, M. (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 12619-12624.

Sundberg, C., Meek, L., Carroll, K., Das, A., and Ream, W. (1996) VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J Bacteriol.* **178**, 1207-1212.

Sundberg, C.D. and Ream, W. (1999) The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. *J Bacteriol.* **181**, 6850-6855.

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.

Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and Zoratti, M. (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* **18**, 5517-5527.

Telford, J.L., Covacci, A., Rappuoli, R., and Chiara, P. (1997) Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr.Opin.Immunol.* **9**, 498-503.

Thanassi, D.G. and Hultgren, S.J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr.Opin.Cell Biol.* **12**, 420-430.

Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., 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., Venter, J.C., and . (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.

Tombola, F., Carlesso, C., Szabo, I., De Bernard, M., Reytrat, J.M., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and Zoratti, M. (1999) *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys.J.* **76**, 1401-1409.

- 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.
- Trust, T.J., Doig, P., Emody, L., Kienle, Z., Wadstrom, T., and O'Toole, P. (1991) High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect.Immun.* **59**, 4398-4404.
- 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.
- Uemura, N., Mukai, T., Okamoto, S., Yamaguchi, S., Mashiba, H., Taniyama, K., Sasaki, N., Haruma, K., Sumii, K., and Kajiyama, G. (1997) Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **6**, 639-642.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., and Schlemper, R.J. (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N.Engl.J Med* **345**, 784-789.
- Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J., and Hooykaas, P.J. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**, 979-982.
- Vergunst, A.C., van Lier, M.C., Dulk-Ras, A., Grosse Stuve, T.A., Ouwehand, A., and Hooykaas, P.J. (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*
- Vergunst, A.C., van Lier, M.C., Dulk-Ras, A., and Hooykaas, P.J. (2003) Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. *Plant Physiol* **133**, 978-988.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A. (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* **20**, 6735-6741.
- Voulhoux, R., Taupiac, M.P., Czjzek, M., Beaumelle, B., and Filloux, A. (2000) Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* **182**, 4051-4058.
- Wang, G., Humayun, M.Z., and Taylor, D.E. (1999) Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* **7**, 488-493.
- Warren, J.R. and Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1273-1275.

- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T., and Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 10493-10497.
- Wattiau, P., Woestyn, S., and Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol.Microbiol.* **20**, 255-262.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., and Sachs, G. (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**, 482-485.
- Weiser, J.N., Love, J.M., and Moxon, E.R. (1989) The molecular mechanism of phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *Cell* **59**, 657-665.
- Winans, S.C., Burns, D.L., and Christie, P.J. (1996) Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.* **4**, 64-68.
- 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.
- 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.
- Xu, Q., Morgan, R.D., Roberts, R.J., and Blaser, M.J. (2000) Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 9671-9676.
- Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Kashima, K., and Imanishi, J. (1997) Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* **41**, 442-451.
- Yoshiyama, H., Nakamura, H., Kimoto, M., Okita, K., and Nakazawa, T. (1999) Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J.Gastroenterol.* **34 Suppl 11**, 18-23.
- Yu, L.Z., Gao, H.J., Bai, J.F., Sun, G., Zhao, H.L., Sun, L., Miu, K., and Zhao, Z.Q. (2004) Expression of COX-2 proteins in gastric mucosal lesions. *World J.Gastroenterol.* **10**, 292-294.
- Zhao, Z., Sagulenko, E., Ding, Z., and Christie, P.J. (2001) Activities of virE1 and the VirE1 secretion chaperone in export of the multifunctional VirE2 effector via an *Agrobacterium* type IV secretion pathway. *J Bacteriol.* **183**, 3855-3865.
- Zhou, X.R. and Christie, P.J. (1999) Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 single-stranded DNA-binding protein identifies regions required for self-association and interaction with VirE1 and a permissive site for hybrid protein construction. *J Bacteriol.* **181**, 4342-4352.

Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K., and Winans, S.C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J.Bacteriol.* **182**, 3885-3895.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., and Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* **23**, 11-28.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Wolfgang Fischer, für seine unermüdliche Geduld, seinen Beistand und Rat bei Experimenten, Seminaren, Computerfragen... und dafür, dass er sich immer Zeit genommen hat. Eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen. Gleichmaßen möchte ich Prof. Dr. Rainer Haas für die Ermöglichung und Unterstützung dieser Arbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima im „Haasen-Labor“ danken.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Arbeit möchte ich dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München meinen Dank aussprechen und ganz besonders Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, der sich mit großem Engagement für das Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ eingesetzt hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den lieben Kolleginnen und Kollegen, die das Arbeiten im Labor so angenehm gemacht haben: Anja, Claudia, Daniela, Gabi, Herbert, Isabelle, Jürgen, Kistin, Luisa, Michaela, Sarika, Stefan, Tina und Xaver. Besonderer Dank geht außerdem an die „Stückchenrunde“ (Wolfgang, Holger und Arno), in der immer viel diskutiert und gelacht wurde, an Evelyn und Conny für ihre große Hilfsbereitschaft, an Friederike, die stets ein offenes Ohr für die größeren und kleineren Katastrophen des Alltags hatte, sowie an Renate, die mir während der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Den Doktoranden des Promotionsstudiums sei gedankt für viele motivierende Gespräche, Barbara Heiden für ihre Hilfe bei der Formatierung und Gregor Leicht für die Durchsicht des Manuskripts.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Familie und Thibaut bedanken, die immer für mich da waren und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben – auch wenn sie es nicht immer leicht mit mir hatten... ;-)

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name, Vorname: Hohlfeld, Sabine
Geburtsdatum: 24. Januar 1979
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Kontaktadresse: Lutherstrasse 2, CH-8004 Zürich
Tel.: 0041-43 333 1861

AUSBILDUNG

1985-1987 Gemeinschaftsgrundschule im Dahlacker, Düsseldorf
1987-1989 Holmes Elementary School, Rochester/Minnesota (USA)
1989-1998 Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg/München
06/1998 Abitur (Note: 1,6)
1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
08/2000 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,33)
08/2001 1. Staatsexamen (Note: 2)
04/2004 2. Staatsexamen (Note: 1,66)
11/2005 Ärztliche Prüfung (Note: 1, Gesamtbenotung: „sehr gut“)

PRAKTISCHES JAHR (08/2004-08/2005)

Innere Medizin Städtisches Krankenhaus München-Harlaching (Abteilung für Onkologie, Hämatologie und Palliativmedizin); Chefarzt Dr. L. Lutz
Chirurgie Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt, LMU München (Ambulanz); Chefarzt Prof. Dr. W. Mutschler

St Thomas Hospital, University of London (Abteilung für Gefäßchirurgie); Chefarzt Prof. Dr. K. Burnand

Neurologie Vancouver General Hospital, University of British Columbia;
Betreuer: Prof. Dr. J. Oger

FAMULATUREN

Innere Medizin (2001) Stiftsklinik Augustinum, München (Abteilung Kardiologie);
Chefarzt Prof. Dr. M. Blumenstein

Allgemeinmedizin (2002) Praxis Dr. F.X. Kühnel, München

Allgemeinmedizin (2002) Praxis Dr. E. Leicht, Bissingen

Gynäkologie (2003) Städt. Krankenhaus München-Harlaching;
Chefarzt Prof. Dr. D. Grab

DISSERTATION

Die Doktorarbeit mit dem Titel „Typ IV-abhängige Translokation des CagA-Proteins von *Helicobacter pylori* in Mageneithelzellen“ wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München mit einem Stipendium gefördert.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Haas und PD Dr. W. Fischer im Zeitraum Dezember 2001 bis Oktober 2003 angefertigt.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich an keiner anderen Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

München, März 2006

Sabine Hohlfeld