

**Charakterisierung der Bindungseigenschaften des *Helicobacter pylori*
Adhäsins BabA und des vakuolisierenden Cytotoxins VacA**



DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

**der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Iris Barwig**

2009

Dissertation eingereicht am: 17.12.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

X. Sewald, B. Gebert-Vogel, S. Prassl, I. Barwig, E. Weiss, M. Fabbri, R. Osicka, M. Schiemann, D.H. Busch, M. Semmrich, B. Holzmann, P. Sebo R. Haas: Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host & Microbe*. 2008 Jan 17; 3(1):20-9

S. Odenbreit, K. Swoboda, I. Barwig, S. Ruhl, T. Borén, S. Koletzko, R. Haas: Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect. Immun.* 2009 Sep; 77(9):3782-90

J. Bugaytsova, S. Vikström, S. Eriksson, O. Björnham, M. Mendez, C. Aisenbrey, G. Bylund, J. Mahdavi, J. Ögren, D. Ilver, R. Sjöström, R. Gilman, A. Chowdhury, A. Mukhopadhyay, L. Engstrand, I. Barwig, S. Odenbreit, R. Haas, G. Gröbner, S. Schedin, D. Berg, A. Arnqvist, T. Borén: pH Regulated *H. pylori* Adherence: Implications for Persistent Infection and Disease.

in Vorbereitung

I. Barwig, S. Odenbreit, K. Engel, R. Haas: Identification of the Lewis^b binding epitope in the BabA protein of *Helicobacter pylori*.

in Vorbereitung

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1.	Entdeckung und Epidemiologie von <i>H. pylori</i>	8
1.2.	Pathogenese <i>H. pylori</i> -assoziierter Erkrankungen	9
1.3.	Eigenschaften und Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	11
1.4.	VacA als multifunktionales Toxin	16
1.5.	Interaktion von VacA mit eukaryotischen Zellen	18
1.6.	Adhärenz von <i>H. pylori</i> an Epithelzellen	19
1.7.	Das Blutgruppen-bindene Adhesin BabA	20
1.8.	Adaptationsmechanismen von <i>H. pylori</i> an den Wirt	22
1.9.	Genetische Arbeiten mit <i>H. pylori</i>	23
1.10.	Ziele dieser Arbeit	23
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Material	25
2.1.1.	Zelllinien	25
2.1.2.	Bakterienstämme	25
2.1.2.1.	<i>Escherichia coli</i> - Stämme	25
2.1.2.2.	<i>Helicobacter pylori</i> - Stämme	26
2.1.3.	Plasmide und Vektoren	26
2.1.4.	Oligonukleotide	27
2.1.5.	Antikörper	29
2.1.5.1.	Primäre Antikörper	29
2.1.5.2.	Sekundäre Antikörper	29
2.1.6.	Nährmedien und Puffer für Bakterien und Zellkultur	29
2.1.7.	Antibiotika und Zusätze in Selektivplatten und -medien	30
2.1.8.	Puffer und Lösungen	30
2.1.8.1.	Puffer für die Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	30
2.1.8.2.	Puffer und Lösungen für DNA-Präparationen	30
2.1.8.3.	Puffer für analytische und präparative Auftrennung von DNA	31
2.1.8.4.	Puffer für Enzymreaktionen	31
2.1.8.5.	Puffer und Lösungen für Proteinmengenbestimmungen	31
2.1.8.6.	Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.1.8.7.	Puffer und Lösungen für Western-Blot	32
2.1.8.8.	Puffer und Lösungen für Membranpräparationen	32
2.1.8.9.	Puffer und Lösungen für Präzipitationen	32
2.1.8.10.	Puffer und Lösungen für Luciferase Messungen	33
2.1.8.11.	Puffer und Lösungen für Dot-Blot	33
2.1.8.12.	Puffer und Lösungen für Vakuolisierungsexperimente	33
2.1.9.	Enzyme und Proteine	33
2.1.10.	Molekulargewichtsmarker	33
2.1.11.	Chemikalien und Reagenzien	34
2.1.12.	Kommerzielle Analysen-Kits	34
2.1.13.	Hilfsmittel	35
2.1.14.	Apparaturen und Geräte	35
2.2.	Methoden	36
2.2.1.	Arbeiten mit Bakterien	36
2.2.1.1.	Bakterienkulturen	36
2.2.1.1.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	36

2.2.1.1.2.	Kultivierung von <i>Helicobacter pylori</i>	36
2.2.1.2.	Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.2.1.2.1.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen [87]	36
2.2.1.2.2.	Herstellung elektrokompenter Zellen	37
2.2.1.2.3.	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	37
2.2.1.2.4.	Transformation superkompetenter <i>E. coli</i> Top10-Zellen.....	37
2.2.1.2.5.	Elektroporation von <i>E. coli</i> Zellen	38
2.2.1.3.	Konjugation von <i>H. pylori</i> [94].....	38
2.2.2.	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	39
2.2.2.1.	Kultivierung von HeLa Zellen	39
2.2.2.2.	Kultivierung von AGS Zellen	39
2.2.2.3.	Kultivierung von Jurkat und EL-4 Zellen	39
2.2.2.4.	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	40
2.2.2.5.	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer.....	40
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.3.1.	Isolierung von DNA	41
2.2.3.1.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> nach Holmes und Quigley [99]	41
2.2.3.1.2.	Isolierung von konzentrierter, reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
2.2.3.1.3.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>H. pylori</i>	41
2.2.3.1.4.	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>H. pylori</i>	42
2.2.3.2.	DNA-Gelelektrophorese [187].....	42
2.2.3.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [185]	43
2.2.3.4.	Ortsspezifische Mutagenese	43
2.2.3.5.	DNA-Fragmentisolierung.....	44
2.2.3.6.	Zentrifugationsentsalzung	44
2.2.3.7.	DNA-Isolierung aus enzymatischen Reaktionen	45
2.2.3.8.	DNA-Fällung mit Ethanol.....	45
2.2.3.9.	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	45
2.2.3.10.	Phosphorylierung endständiger Nukleotide von DNA-Fragmenten	45
2.2.3.11.	Ligation	46
2.2.3.12.	Ligation von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning™	46
2.2.3.13.	DNA-Sequenzierung	46
2.2.4.	Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.4.1.	Proteinmengenbestimmung nach Bradford [23]	46
2.2.4.2.	Herstellung bakterieller Zelllysate	47
2.2.4.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
2.2.4.4.	Färbung von Proteinen mit Coomassie-Lösung	47
2.2.4.5.	Western Blot.....	47
2.2.4.5.1.	Transfer der Proteine auf die Membran	47
2.2.4.5.2.	Detektion der Proteine mittels Antikörper	48
2.2.4.6.	Entfernung von Immunkomplexen von PVDF-Membranen.....	48
2.2.4.7.	Membranpräparation	49
2.2.4.8.	Proteinpräzipitation mit magnetischen Kugeln	49
2.2.4.9.	Immunpräzipitation	50
2.2.4.10.	Färbung von Oberflächenproteinen für die Durchflusszytometrie	50
2.2.4.11.	Messung von Luciferase Aktivität	51
2.2.4.12.	Aufkonzentrierung von Bakterien-Kulturüberständen.....	51
2.2.4.13.	Anreicherung von VacA aus <i>H. pylori</i> Kulturüberständen	51
2.2.4.14.	Säureaktivierung von VacA	52
2.2.4.15.	Fluoreszenzmarkierung von VacA und Antikörpern	52
2.2.4.16.	Dot Blot - Analyse.....	53

2.2.5.	Infektionsexperimente	53
2.2.5.1.	Quantifizierung der VacA-induzierten Vakuolisierung	53
2.2.5.2.	Quantifizierung der VacA-Bindung an Zellen	54
2.2.5.3.	Quantifizierung der VacA-Aufnahme in Zellen	54
2.2.6.	Mikroskopie	54
2.2.6.1.	Immunfluoreszenzfärbung mit <i>H. pylori</i>	54
2.2.6.2.	Co -Lokalisationsexperimente von VacA und CD29	55
2.2.7.	Statistische Auswertung	56
3.	Ergebnisse	57
3.1.	Etablierung eines Shuttle-Vektor Systems	57
3.1.1.	Vorangegangene Arbeiten	57
3.1.2.	Beschreibung des Shuttle-Vektors	59
3.1.2.1.	Sequenzierung	59
3.1.2.2.	Promotoranalyse durch Expression eines Reportergens	60
3.2.	Charakterisierung der Lewis ^b -Binderegion von BabA	62
3.2.1.	Eingrenzung der Binderegion in Vorarbeiten	62
3.2.2.	Vergleich zweier <i>H. pylori</i> Stämme hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften und <i>babA</i> Sequenzen	64
3.2.3.	Konstruktion eines chimären BabA Fusionsproteins	66
3.2.3.1.	Insertion eines <i>H. pylori</i> P1 BabA-Fragments in <i>H. pylori</i> J99 BabA	66
3.2.3.2.	Produktion des chimären BabA Fusionsproteins	68
3.2.3.3.	Präsentation des chimären BabA Fusionsproteins auf der Bakterienoberfläche... ..	68
3.2.3.4.	Adhäsive Eigenschaften des chimären BabA Fusionsproteins	70
3.2.4.	Komplementation des chimären BabA Fusionsproteins	71
3.2.4.1.	Insertion von <i>H. pylori</i> J99 BabA-Fragmenten in das chimäre BabA Fusionsprotein	72
3.2.4.2.	Produktion der BabA Fusionsproteine	74
3.2.4.3.	Lokalisierung der Fusionsproteine auf der Bakterienoberfläche	75
3.2.4.4.	Bindeverhalten der BabA Fusionsproteine	77
3.2.5.	Gegenüberstellung der BabA Bindungsregionen verschiedener <i>H. pylori</i> Stämme bezüglich ihrer Sequenz	79
3.3.	Identifizierung von VacA-Rezeptoren auf eukaryotischen Zellen	81
3.3.1.	Interaktion von m2VacA mit CD18 auf T-Lymphocyten	81
3.3.1.1.	VacA Genotypisierung verschiedener <i>H. pylori</i> Stämme	81
3.3.1.2.	Aufreinigung von m2VacA aus <i>H. pylori</i> Kulturüberstand	83
3.3.1.3.	m2VacA-induzierte Vakuolisierung von T-Lymphocyten Zelllinien	84
3.3.2.	Co-Lokalisation von VacA und CD29 auf T-Lymphocyten	85
3.3.2.1.	Präsentation von CD29 auf Jurkat T-Zellen	85
3.3.2.2.	Lokalisation von VacA und CD29 auf Jurkat T-Zellen	87
3.3.3.	Direkte Interaktion von VacA und CD29	90
3.3.4.	Wechselwirkungen von VacA mit CD29 auf Epithelzellen	95
3.3.4.1.	CD29 ist essentiell für VacA-induzierte Vakuolisierung	95
3.3.4.2.	Bindung von VacA an Zellen abhängig von CD29	96
3.3.4.3.	VacA Aufnahme abhängig von CD29	97
4.	Diskussion	100
4.1.	Genetische Manipulation von <i>H. pylori</i>	100
4.2.	Charakterisierung der Bindungseigenschaften des BabA-Adhäsins	102
4.2.1.	Bakterielle Adhärenz	102
4.2.2.	Bedeutung der Adhärenz von <i>H. pylori</i> in der Pathogenese	103

4.2.3.	Eingrenzung der Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins von <i>H. pylori</i>	104
4.3.	Charakterisierung der Bindungseigenschaften des vakuolisierenden Zytotoxins VacA.....	108
4.3.1.	Effekte von VacA auf Epithelzellen und verschiedene Zellen des Immun- systems	108
4.3.2.	CD18 ist ein Rezeptor für s1m2VacA auf T-Lymphozyten	109
4.3.3.	CD29 ist ein Rezeptor für VacA	111
5.	Zusammenfassung.....	116
6.	Literaturverzeichnis.....	118
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	135

1. Einleitung

1.1. Entdeckung und Epidemiologie von *Helicobacter pylori*

Das gramnegative, polar begeißelte, gebogene bis spiralförmige Bakterium *Helicobacter pylori* kolonisiert den menschlichen Magen. Seine Assoziation mit dem menschlichen Wirt reicht dabei mehrere 10.000 Jahre zurück [62,77,31]. Die Verbreitung des Bakteriums erfolgte von Afrika aus und erstreckte sich auf die ganze Welt [123]. Heute sind ca. 50% der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert, wobei die geographische Region und der sozioökonomische Status für die Prävalenz einer Infektion eine wichtige Rolle spielen [10,127,128]. In den Industrieländern sind ca. 20% bis 50% der Erwachsenen mittleren Alters infiziert, in Entwicklungsländern dagegen liegt die Infektionsrate bei bis zu 90% [54] (Abb. 1). Damit stellt die Infektion mit *H. pylori* eine der häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit dar. Die Übertragung von *H. pylori* erfolgt hauptsächlich in der frühen Kindheit von der Mutter auf das Kind [54], wobei der genaue Übertragungsweg noch nicht geklärt werden konnte. Das gehäufte Auftreten von *H. pylori*-Infektionen, sowie die Isolierung von genetisch identischen Stämmen innerhalb von Familien weist auf eine oral-orale oder oral-fäkale Übertragung hin [17,52,53,59,139]. Zusätzlich könnte in Entwicklungsländern die Übertragung durch unbehandeltes Wasser und mit Abwasser kontaminiertem Obst und Gemüse eine Rolle spielen [79,80,204]. Eine häufig unterschätzte Infektionsgefahr stellte lange Zeit die iatrogene Übertragung durch kontaminierte Endoskope dar [107,118]. Diese kann jedoch bei Einhaltung der entsprechenden Hygienemaßnahmen weitgehend ausgeschlossen werden [179].

Bereits 1923 berichtete Konjetzney über das Auftreten von Magengeschwüren als Folge einer bakteriellen Infektion. Die Anzucht *in vitro* und eine genauere Beschreibung gelang jedoch nicht [111,112]. Damit hielt sich weiterhin die Lehrmeinung, der Magen sei aufgrund seiner unwirtlichen Bedingungen ein steriles Organ. Im Jahr 1983 wurde *H. pylori* das erste Mal als „*unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*“ beschrieben [132]. Marshall und Warren gelang es, das Bakterium aus Magenbiopsien von gastrokopisch untersuchten Patienten zu isolieren. In einem spektakulären Selbstversuch erfüllte Marshall schließlich die Koch'schen Postulate, indem er zeigte, dass das zunächst als *Campylobacter pyloridis* bezeichnete Bakterium nach der Kolonisierung des Magenepithels zu einer massiven Gastritis führt [130]. Dieser Beweis revolutionierte die damals vorherrschende Meinung, vor allem Stress und ungesunde Ernährung seien für Gastritis und Magengeschwüre verantwortlich. Jahre später wurde der Mikroorganismus durch 16S-rRNA Analysen

charakterisiert und als Vertreter einer neuen Gattung als *Helicobacter pylori* eingestuft (*helico* [gr.]: spiralförmig) [81,182]. Im Jahr 2005 erhielten Robin Warren und Barry Marshall schließlich den Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung dieses Bakteriums und seine Rolle bei der Entstehung von Gastritis und peptischen Ulzera [2].

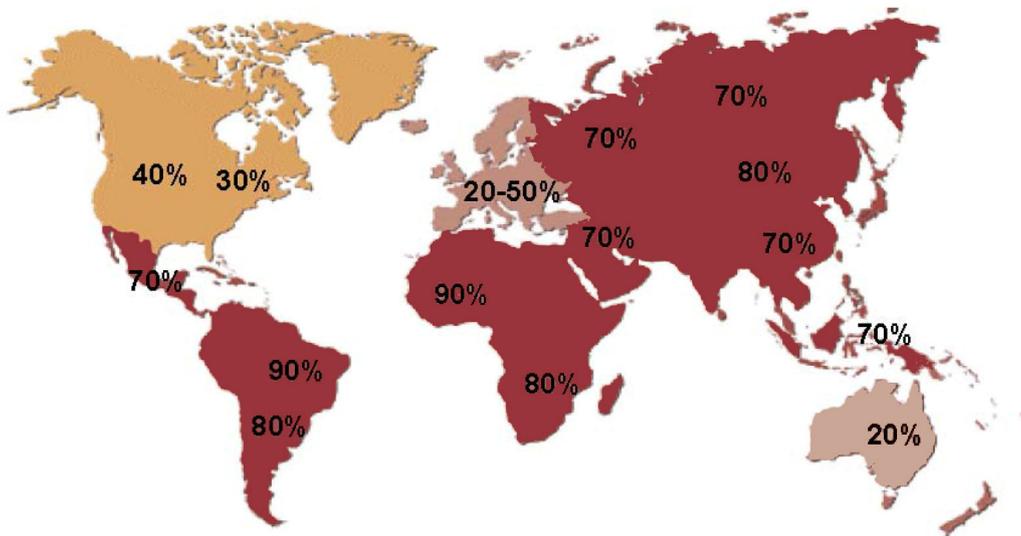


Abb. 1: Verteilung der Infektionsraten der Weltbevölkerung mit *Helicobacter pylori*
(nach www.helico.com)

1.2. Pathogenese *H. pylori*-assoziierter Erkrankungen

H. pylori besiedelt die Antrum- und Corpus-Region des menschlichen Magens (Abb. 2). Diese Infektion führt zu einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut (chronische Gastritis), die in 90% der Fälle symptomlos verläuft und ohne entsprechende Behandlung jahrzehnte- bis lebenslang bestehen kann. Bei ca. 15-20% der Infizierten kommt es zu einer chronisch aktiven Gastritis [150], in deren Folge vermehrt Entzündungsmediatoren (IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α) durch das Magenepithel sekretiert werden. Als Folge dieser chronischen Entzündung entstehen im Laufe der Jahre Folgeerkrankungen wie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, Magenkarzinome oder Magenlymphome, wobei der klinische Verlauf unter anderem von der anatomischen Lage der Gastritis abhängt. Eine Antrum-dominierende Gastritis führt zu vermehrter Säureproduktion, welche auch die Säurekonzentration im ersten Abschnitt des Duodenum (*Bulbus duodeni*) ansteigen lässt. In Folge dessen kann es zu einer gastralen Metaplasie kommen, d. h. durch die Säureeinwirkung zerstörte Zellen des Duodenum werden durch Epithelzellen des Magentyps ersetzt [228].

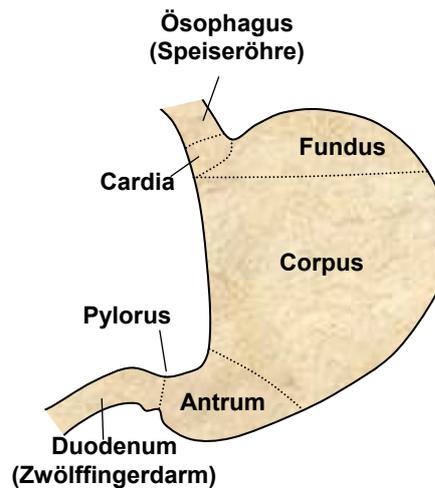


Abb. 2: Schematische Darstellung des Menschlichen Magens

H. pylori kolonisiert in der Regel Antrum- und Corpus-Region des menschlichen Magens.

Einer weiteren Infektion dieses Gewebes und einer damit einhergehenden Ausbreitung der Entzündung bis zum Dünndarm folgen Erosionen, die als Vorstufe eines Zwölffingerdarmgeschwürs (*Ulcus duodeni*) angesehen werden [49,239]. Eine Corpus-dominierende chronische Gastritis kann sich zu einer atrophischen Gastritis entwickeln. Diese ist gekennzeichnet durch eine allmähliche Rückbildung der Drüsenkörper der Mucosa als Folge einer permanent entzündeten Magenschleimhaut, wobei Säure-sekretierende Parietalzellen, Pepsinogen produzierende Hauptzellen und Mukus-produzierende Nebenzellen zerstört und durch intestinales Gewebe ersetzt werden. Diese intestinale Metaplasie gilt als Vorstufe eines Adenokarzinoms [40,41,168].

Da die Magenmucosa normalerweise durch eine dicke Mukusschicht und eine intakte Epithelzellschicht vor Antigenkontakt geschützt ist, ist nur wenig lymphatisches Gewebe vorhanden. Sind diese schützenden Schichten allerdings durch eine Infektion geschädigt, und es kommt zu einer Antigenexposition, kann dies in der Folge zu einer Akquisition von gastralem Gewebe führen, d. h. Lymphfollikel und lymphatische Aggregate treten in der Magenmucosa auf. Aus diesem lymphatischen Gewebe kann sich ein MALT-Lymphom (Marginalzonen-B-Zell-Lymphom vom *mucosa-associated lymphoid tissue*-Typ) entwickeln. 72-98% der Patienten mit MALT-Lymphom sind mit *H. pylori* infiziert [166,237].

Da das Risiko infolge einer *H. pylori*-Infektion an einem Magenkarzinom zu erkranken um den Faktor sechs erhöht ist, wurde *H. pylori* im Jahr 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zum Klasse-I-Karzinogen erklärt [1]. Nach neueren Studien wird die *H. pylori*-Infektion sogar nahezu als Bedingung für die Entwicklung des

nicht-kardialen Magenkrebses angesehen [24]. Das Magenadenokarzinom ist derzeit die zweithäufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle weltweit [29,232].

Der Verlauf einer *H. pylori*-Infektion hängt aber auch stark vom infizierenden Stamm und insbesondere von den vorhandenen Virulenzfaktoren ab. Pathogenitätsfaktoren wie die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) mit dem translozierten Protein CagA (Cytotoxin assoziiertes Gen A), das Vakuolisierende Cytotoxin A (VacA) und das Adhäsins BabA [22,102] sind dabei signifikant mit der Ausbildung einer atrophischen Gastritis verknüpft. Auch verschiedene Wirtsfaktoren wie genetische Prädispositionen und die Immunantwort haben Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Besitzt der Wirt Interleukin (IL) -1 β -Allele, die eine übermäßige IL-1 β Zytokin-Produktion fördern, ist die Entzündungsreaktion stärker und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer atrophischen Gastritis erhöht [56,58,78].

1.3. Eigenschaften und Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Nach der heutigen Systematik wird das gramnegative spiralförmige Stäbchenbakterium *H. pylori* zu den ϵ -Proteobakterien gezählt [225]. Die spiralförmigen Zellen zeigen nach dem Übergang in die späte stationäre Phase einen hohen Anteil an kokkoiden Zellen, welche zwar noch lebensfähig aber nicht mehr *in vitro* kultivierbar sind. Dieser Zustand stellt wahrscheinlich eine Art Dauerstadium dar, in dem der Stoffwechsel der Bakterien extrem reduziert wird [20].

H. pylori hat sich an die unwirtlichen Bedingungen seiner ökologischen Nische, den menschlichen Magen, ausgezeichnet adaptiert. Verschiedene Virulenzfaktoren ermöglichen es *H. pylori*, sowohl den extremen Umweltbedingungen wie dem niedrigen pH, dem abschliffen der Mukusschicht und der Nährstoffknappheit als auch dem Immunsystem des Wirts zu entgehen.

Der pH-Wert des menschlichen Magens liegt durchschnittlich bei pH 1,4 [212]. Ein wesentlicher Faktor für das Überleben von *H. pylori* im sauren Lumen des Magens ist die Produktion des Enzyms Urease, eines cytosolischen Ni²⁺-haltigen Enzyms [100], welches je nach Kulturbedingungen bis zu 10% des gesamten bakteriellen Proteins ausmachen kann [18]. Es besteht aus zwei Untereinheiten (UreA und UreB), sowie akzessorischen Proteinen, die für die Aufnahme und den Einbau von Ni²⁺ in das aktive Zentrum des Apo-Enzyms benötigt werden [115,141]. Durch einen protonengesteuerten Harnstoffkanal, welcher sich bei sinkendem pH-Wert öffnet, wird Harnstoff aufgenommen [231] und anschließend durch Urease in Ammoniak und Hydrogencarbonat gespalten. Ammoniak wird protoniert und puffert somit das Periplasma und die unmittelbare Umgebung von *H. pylori* [131,141,203].

Da Ammonium eine cytotoxische Substanz darstellt, wird in diesem Zusammenhang die Induktion von Epithelzellschäden diskutiert [136,200,209]. Ob jedoch die durch Urease produzierte Menge an Ammonium ausreicht, um Zell-Schäden zu induzieren, ist noch unklar. Auch die Induktion von Apoptose [63,101] und die Aktivierung von Neutrophilen und Monocyten durch Urease [88] wird diskutiert. Das Enzym stellt einen essentiellen Faktor für die Pathogenität von *H. pylori* dar, da im Tiermodell die Infektion mit einer Ureasemutante nicht mehr zur Kolonisierung des Magens führt [55,236].

H. pylori kann jedoch nur für kurze Zeit niedrige pH-Werte ($\text{pH} < 4$) tolerieren [184] und muss in sein eigentliches Habitat, die bicarbonatgepufferte Schleimschicht der Magenmucosa eindringen [190]. Das spiralförmige Stäbchenbakterium besitzt zwei bis elf unipolare Flagellen, welche aus dem Hauptflagellin (FlaA) und einer Nebenkompone (FlaB) aufgebaut sind [57,120,206]. Geschützt werden sie durch eine lipidhaltige Membranhülle vor der Depolymerisierung durch Säure und Proteasen [75]. Mit Hilfe der Flagellen ist *H. pylori* in der Lage, sich durch den viskosen Mukus zur Epithelschicht hinzubewegen. Dabei orientiert sich das Bakterium chemotaktisch an dem pH-Gradienten der Mukusschicht, der vom Lumen ($\text{pH} 2$) zur Epithelzelloberfläche ($\text{pH} 7$) verläuft. Die Fähigkeit zur aktiven Motilität ist für eine Kolonisierung im Tiermodell essentiell [57].

Des Weiteren ist auch die Bindung von *H. pylori* an Epithelzellen für das Überleben der Bakterien essentiell. Verluste durch die Peristaltik des Magens, sowie die Erneuerung der Magenmukosa werden damit vermieden. Die Bindung ist außerdem eine Grundvoraussetzung zur Translokation verschiedener Pathogenitätsfaktoren. Auch für die Gewinnung essentieller Membranbestandteile, wie z.B. Cholesterol [238], spielt Adhäsion eine zentrale Rolle. Vermittelt wird die Adhärenz an Epithelzellen über verschiedene Proteine der OMP (*outer membrane protein*) -Familie, wie BabA, SabA oder AlpA und AlpB. Das Blutgruppen-Antigen bindende Adhesin A (BabA) bindet an das Blutgruppenantigen Lewis^b (Abb. 3), welches bei Vorhandensein einer $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase (positiver Sekretor-Status) auf Magenepithelzellen als dominantes Antigen exprimiert wird [60,186]. Außerdem ist Lewis^b auf der Oberfläche des Mucins MUC5AC zu finden, wodurch die Adhäsion von *H. pylori* an den Mukus im Magen vermittelt wird [98,223]. Die Beobachtung, dass BabA-Mutanten nicht mehr an normales, allerdings an entzündetes Magengewebe adhären können, führte zur Identifikation von SabA als weiteres Adhäsion [125]. Das äußere Membranprotein SabA (*sialic acid binding adhesin A*) bindet an sialylierte Strukturen auf der Zelloberfläche, wie z. B. an die sialylierten Blutgruppenantigene Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a [125]. Diese kommen in einer gesunden Magenmukosa selten vor, im entzündeten

Gewebe werden sie aber verstärkt exprimiert [162]. Dort dienen sie als Rezeptoren für Selektine, welche die Migration der Leukozyten steuern und so die Immunantwort regulieren. Auch die Bindung an sialyliertes Laminin wird durch SabA induziert [229]. Weitere beschriebene Adhäsine von *H. pylori* sind die in einem Operon organisierten Proteine AlpA und AlpB (*adherence associated lipoproteins A und B*), welche Adhärenz an Magenepithelzellen vermitteln [158,159], deren Rezeptor auf eukaryotischer Seite allerdings noch nicht identifiziert wurde.

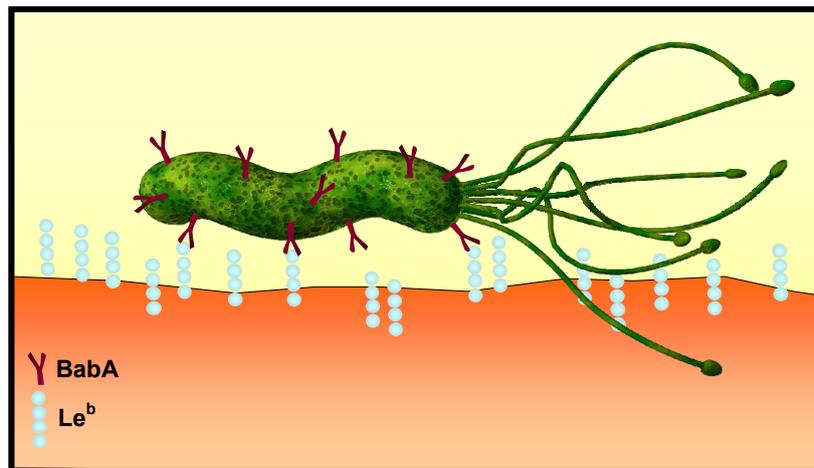


Abb. 3: Schematische Darstellung der Bindung von *H. pylori* an das Magenepithel

Das äußere Membranprotein BabA von *H. pylori* induziert die Bindung des Bakteriums an gastrointestinale Epithelzellen über das Blutgruppenantigen Lewis^b. (modifiziert nach Mahdavi et al., 2002)

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *H. pylori* ist das Cytotoxin assoziierte Antigen (CagA), welches über einen TypIV-Sekretionsapparat in die eukaryotische Zielzelle transloziert wird [156]. Das *cagA*-Gen liegt in einer 40kb großen Genregion [27], welche die typischen Merkmale einer Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) aufweist [85], wobei CagA das bisher einzige beschriebene Substrat des TypIV-Apparates darstellt. Einige Gene dieser *cag*-Pathogenitätsinsel zeigen signifikante Homologien zu Untereinheiten von TypIV-Sekretionssystemen anderer Bakterienspezies, wie z.B. dem VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens* [25,31]. CagA wird über dieses TypIV-Sekretionssystem direkt in die Zielzelle transloziert [15,156,201], lagert sich dort an der Zytoplasmamembran an [96] und wird durch eine Tyrosin-Kinase der Src-Familie phosphoryliert [9,218]. Dies führt unter anderem zu Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts [14,175], was sich in Zellkulturexperimenten im sogenannten *hummingbird*-Phänotyp äußert, bei dem es zu charakteristischen Ausläufern und dem Auseinanderweichen der Zellen kommt [28,95,192,219]. Des Weiteren wird die

Integrität von „*tight junctions*“ beeinträchtigt. Dadurch kann es zum Aufbrechen der Barrierefunktion des Magenepithels und zum Verlust der apikalbasolateralen Zellpolarität kommen [7,183]. Außerdem induzieren *cag*-PAI-positive Stämme durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB eine vermehrte Freisetzung des proinflammatorischen Cytokins IL-8, was zur massiven Infiltration von PMN's im Zuge der Infektion beiträgt [27,65,193,195].

Die Beobachtung, dass Kulturüberstände von *H. pylori* bei Kontakt mit Zellen die Ausbildung großer zytoplasmatischer Vakuolen induziert, führte 1988 zur Entdeckung des Vakuolisierenden Cytotoxins VacA [119]. 1992 gelang schließlich die Aufreinigung und Charakterisierung durch Cover und Blaser [34]. Kloniert wurde das *vacA*-Gen 1994 unabhängig in vier Arbeitsgruppen [39,169,189,210]. Es codiert für ein ~140 kDa Vorläuferprotein, welches über einen Sec-abhängigen Transportweg über die innere Membran transportiert und anschließend mit einer C-terminalen Autotransporter-Domäne über die äußere Membran sekretiert wird (TypV Sekretionsmechanismus). Es folgt die Abspaltung der Autotransporterdomäne, und das reife ~90 kDa Toxin wird in den Überstand abgegeben [39,149,189]. Dort lagert es sich zu hexameren Ringen zusammen, wobei jeweils zwei solcher Ringe hochmolekulare dodecamere Komplexe mit einer Masse von ~1 MDa bilden [35] (Abb. 4). Durch einen sauren (<4) oder alkalischen (>9) pH-Wert wird der Zerfall dieser Strukturen induziert. Das sekretierte 90 kDa VacA einiger Stämme kann an einer hydrophoben, Protease-sensitiven Schleife aus Wiederholungen von acht Aminosäuren gespalten werden. Es resultieren daraus zwei Fragmente mit einer molekularen Masse von 37 kDa (p37) und 55 kDa (p55), welche nicht mehr kovalent verbunden sind [210]. Die Bedeutung dieser Spaltung ist noch unbekannt [26,211]. Allerdings weisen die beiden Teilfragmente unterschiedliche Funktionen auf. Das p33-Fragment ist für die Ausbildung einer Membranpore nötig [226], wobei das p55-Fragment essentiell für die Bindung an die Zelloberfläche und die Oligomerisierung ist [105,163]. Die klassische Struktur eines AB-Toxins ist bei VacA jedoch nicht gegeben, da die ersten 100 Aminosäuren des p55-Fragments für die Ausbildung der Pore durch das p33-Fragment nötig sind, indem sie die Interaktion der Untereinheiten vermitteln. Obwohl alle bisher isolierten *H. pylori*-Stämme ein *vacA*-Gen besitzen, zeigen nicht alle eine vakuolisierende Aktivität [11,67]. Diesem Phänomen liegen Sequenzpolymorphismen zugrunde, aufgrund derer sich verschiedene VacA-Allele unterscheiden lassen. Dabei differenziert man zwischen drei Regionen, der sogenannten s-, m- und i-Region, in denen Sequenzvariationen vorkommen können. Der Bereich des 5'-Endes mit der Signalsequenz wird als s-Region bezeichnet und ein Bereich in

der Mitte des Toxins als m-Region [13,133]. Man unterscheidet je zwei Haupttypen der Allele s1 und s2 bzw. m1 und m2. Die Aminosäure-Identität liegt in der ca. 300 Aminosäuren umfassenden Mittelregion nur bei ca. 55%, bedingt durch eine Deletion von 30 Aminosäuren und einer Insertion von 23 Aminosäuren im m2-Allel [64]. Alle Kombinationen der s- und m-Allele sind theoretisch möglich, jedoch wurde ein s2m1-Typ noch nicht beobachtet. s1m1VacA-Proteine zeigen die stärkste Aktivität bei der Vakuolisierung von Epithelzellen. Man kann beobachten, dass m1VacA in allen Zellen Vakuolen induziert, m2VacA hingegen ist unter anderem nur bei primären Magenepithelzellen und der Kaninchen-Nierenkrebszelle rK13 in der Lage, die Bildung saurer Vakuolen zu induzieren. HeLa-Zellen sind nicht sensitiv gegenüber m2VacA [163]. Da der Hauptunterschied zwischen m1 und m2VacA in der p55-Domäne lokalisiert ist, und dieses Fragment für die Rezeptorbindung des VacA-Toxins verantwortlich gemacht wird, ist es wahrscheinlich, dass der Unterschied in der vakuolisierenden Aktivität bei verschiedenen Zelltypen in der Rezeptorbindung begründet ist [177]. Atherton *et al.* gelang es, eine weitere polymorphe Region in der p37-Domäne des VacA-Proteins zu identifizieren, die sogenannte i (*intermediate*) -Region [178]. Es konnte gezeigt werden, dass auch die i-Region mit der Zelltyp-spezifischen Vakuolisierung korreliert. VacA Allele mit der Domänen-Kombination s1i1m2 waren in der Lage, rK13-Zellen zu vakuolisieren, s1i2m2VacA hingegen nicht. Weitere Aspekte zur Charakterisierung funktioneller VacA-Regionen ergaben sich aus der Kristallstruktur des p55-Fragments. Die Struktur besteht aus einer langgestreckten β -helikalen und einer C-terminalen globulären Domäne, welche durch einen Knick von einander abgesetzt sind. Zwei konservierte Bereiche lassen auf eine Rezeptorbindetasche am C-Terminus und einen Bereich zur Interaktion mit dem p37-Fragment schließen [72].

H. pylori-Genotypen mit starker vakuolisierender Aktivität (s1m1VacA) sind meist mit der Anwesenheit des *cagA*-Gens assoziiert [220]. *cagA*/s1m1*vacA*-positive Stämme korrelieren mit schweren Krankheitsverläufen und dem Auftreten schwerwiegender Folgeerkrankungen wie Ulcus oder Magenkarzinom. Aufgrund dieser klinischen Relevanz werden sie als Typ-I-Stämme bezeichnet. Im Gegensatz dazu besitzen Typ-II-Stämme keine Pathogenitätsinsel mit CagA als Effektorprotein und wirken nur schwach vakuolisierend [240].

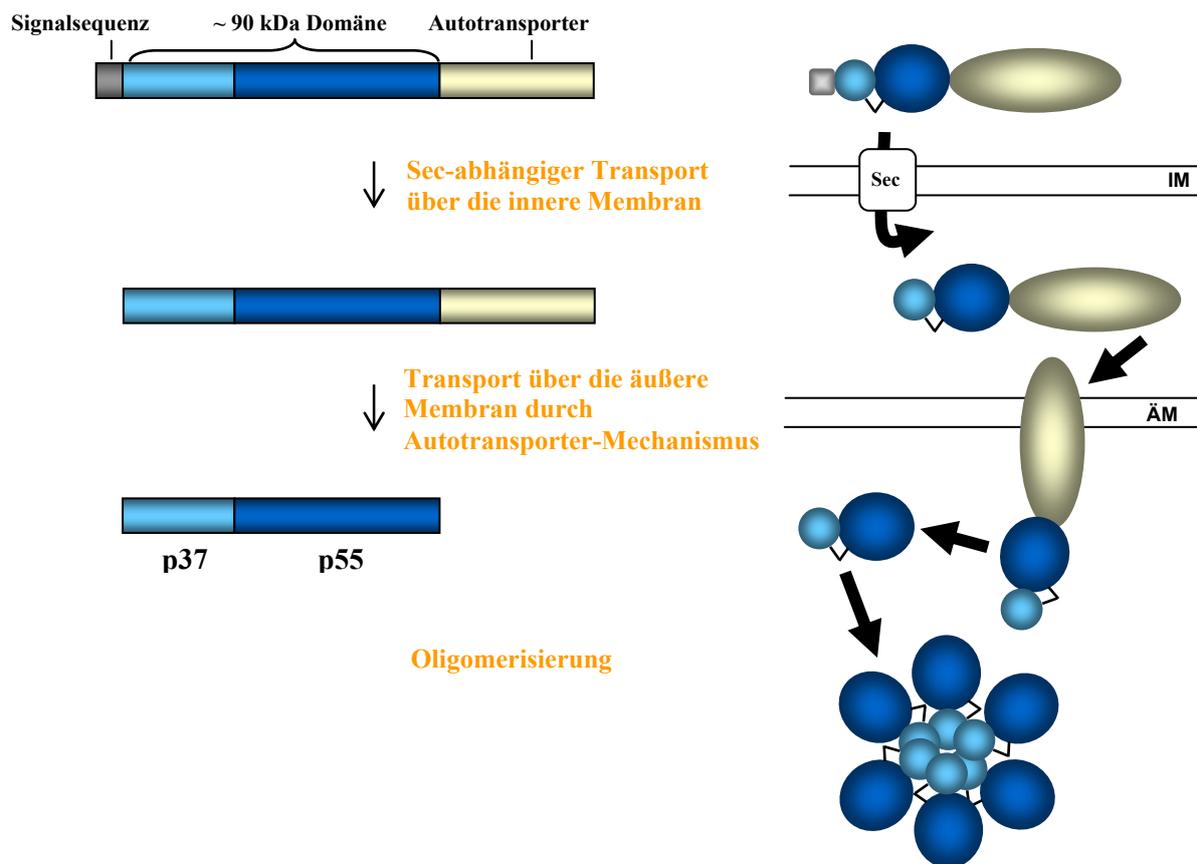


Abb. 4: Schematische Darstellung der Sekretion von VacA

VacA wird als Prä-Protoxin (140 kDa) produziert und besitzt eine N-terminal gelegene Signalsequenz und eine C-terminal gelegene Autotransporter-Domäne. Das Toxin wird Sec-abhängig über die innere Membran transportiert. Der Transport über die äußere Membran erfolgt anhand der Autotransporter-Domäne. Diese wird abgespalten und das reife Toxin (90 kDa) oligomerisiert im Kulturüberstand zu hexameren Ringen.

1.4. VacA als multifunktionales Toxin

VacA zeigt auf viele verschiedene eukaryotische Zelltypen, von Magenepithelzellen bis hin zu Zellen des Immunsystems, unterschiedliche Wirkungen, weshalb es als multifunktionelles Toxin beschrieben wurde [33].

Die Induktion von großen, sauren, cytoplasmatischen Vakuolen, welche dem Toxin seinen Namen verliehen haben [35,36], wird dabei heute nur noch als Nebeneffekt der Aufnahme von VacA gesehen. Er ist in den meisten Zelltypen zu beobachten, wobei schwache Basen wie Ammoniumchlorid *in vitro* unterstützend wirken. Das heutige Modell der Vakuolisierung geht von einer VacA Bindung an die Zytoplasmamembran der Zielzelle und einer anschließenden Aufnahme über das endosomale System aus [33,145]. Dabei bildet VacA

Anionen-spezifische Kanäle, welche zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen in das späte Endosom und somit zu einer Erhöhung der Chlorid-Konzentration führen. Dies führt zu einer Aktivierung der V-ATPase (vakuolären ATPase), welche daraufhin Protonen in die Vakuolen pumpt, um die negative Ladung auszugleichen. Schwache Basen wie z.B. Ammoniak, welches durch die Urease-Aktivität vorhanden ist, diffundieren in die Vakuolen, werden dort protoniert, und sind anschließend nicht mehr membrangängig. Dies hat einen osmotisch bedingten Einstrom von Wasser zur Folge, und löst damit das Anschwellen der Vakuolen aus [145].

Auch andere Änderungen des endosomalen Systems durch VacA können beobachtet werden. So führt es zum „Clustern“ des späten endosomalen Kompartiments [121] und zur Inhibition der Antigenpräsentation in der Raji B-Lymphozyten Zelllinie [144]. Dabei stört VacA die Prozessierung von Antigenen und somit die Antigenpräsentation für die Aktivierung von B- und T-Lymphocyten.

Außerdem wurde gezeigt, dass VacA in Epithelzellen Apoptose induzieren kann. Allerdings erfordert dieser Effekt sehr hohe VacA Konzentrationen [38,70,71,113,234,235]. Wird VacA intrazellulär exprimiert, co-lokalisiert es mit den Mitochondrien und induziert dort die Freisetzung von Cytochrom C, was den Caspase 3-abhängigen Apoptose-Signalweg aktiviert [71]. Der Vorteil der Induktion von Apoptose für *H.pylori* ist jedoch fraglich. Des Weiteren existieren konträre Daten im *Mongolian Gerbil*-Modell, in dem gezeigt wurde, dass *H. pylori* die Apoptose-Induktion verhindert [138].

Es wurde zudem die Induktion der Ca^{2+} -Oszillation durch VacA in eukaryotischen Zellen und die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 beschrieben [147]. VacA wirkt außerdem immunsupprimierend. Während der lebenslangen, meist chronischen Infektion wird *H. pylori* nicht durch das Immunsystem beseitigt. Ein Grund dafür liegt unter anderem, neben der bereits beschriebenen Inhibition der Antigenprozessierung, in der Suppression der T-Lymphocyten Proliferation [74,208]. Dieser Effekt ist eine Auswirkung der IL-2 Produktionshemmung durch VacA. Unter Normbedingungen wird die Produktion durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin induziert, indem sie zur Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT führt, worauf dieser in den Nukleus transloziert wird und die Expression des IL2-Gens initiiert [42] [43]. VacA verhindert die Dephosphorylierung von NFAT und wirkt somit inhibierend auf die IL-2 Produktion [21,74]. Neben der Produktion von IL-2 sind auch weitere Zytokine wie MIP-1 α und MIP-1 β betroffen [74].

1.5. Interaktion von VacA mit eukaryotischen Zellen

Um den Kontakt zu den Zielzellen herzustellen, ist es für VacA nötig, an Rezeptoren auf der eukaryotischen Seite zu binden und zu interagieren. Es wurden unterschiedliche Rezeptoren für VacA auf unterschiedlichen Zelltypen beschrieben. Neben Glycosphingolipiden und speziell Sphingomyelin als VacA-Rezeptoren [83,180] stellen die Glykoproteine Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase (RPTP) α und RPTP β den am besten charakterisierten Rezeptortyp dar [70,242,243]. In Epithelzellen führt die Bindung von VacA an RPTP β zur Tyrosin-Phosphorylierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase-Interaktors 1 (Git-1) [70]. Anhand von Magenepithelzellen von RPTP β - Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von VacA mit RPTP β für ein Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix verantwortlich ist. Auch die orale Gabe von VacA *in vivo* führte nur bei Wildtyp-Mäusen zu einem Ablösen der Epithelzellen von der Basalmembran, was morphologisch einem Magengeschwür beim Menschen ähnelt. Dieser Effekt ist unabhängig von der Aufnahme von VacA in die Zelle. Möglicherweise stört die Bindung von VacA an RPTP β Signalwege des RPTP β -Substrats Git-1 und nimmt somit Einfluss auf die Zelladhäsion und die Organisation des Zytoskeletts.

Skibinski und Kollegen zeigten, dass auf HeLa-Zellen neben RPTP β mindestens ein weiterer VacA-Rezeptor vorkommen muss [199]. Ob VacA als Monomer oder Oligomer an die Membran bindet, ist noch unklar. Für die Aufnahme von gereinigtem VacA ist allerdings eine kurze Inkubation der VacA-Oligomere bei pH2 erforderlich [45], bei der die Oligomere zu Monomeren dissoziieren [37,144] was vermutlich zu einer Exposition hydrophober Bereiche auf der Proteinoberfläche führt. Bakterien-assoziiertes VacA oder in den bakteriellen Überstand sekretiertes VacA bedarf keiner Aktivierung mit Säure [119], was darauf schließen lässt, dass VacA *in vivo* als Monomer vorliegt.

VacA wird nach der Bindung an die Zielzelle in diese aufgenommen. Dies erfolgt über spezifische Membrandomänen, sogenannte „lipid rafts“. Die Bindung von VacA an RPTP β induziert ein „clustern“ des Komplexes in Cholesterin-reichen Regionen der Membran [146]. Auch das Zytoskelett spielt als weitere Komponente eine Rolle bei der VacA Aufnahme, wobei der Aufnahmemechanismus von den kleinen GTPasen Cdc42 und Rac-1 reguliert wird [73].

Nach der Aufnahme ist VacA in einem intermediären Kompartiment lokalisiert, welches sich von späten Endosomen ableitet [32,165]. Es handelt sich um ein Hybridkompartiment, welches sowohl Marker der späten Endosomen (Rab7) als auch der frühen Lysosomen (LAMP1) besitzt [143,164]. Es ist noch nicht klar, ob VacA in diesem Kompartiment

verbleibt, oder ob es in das Zytoplasma ausströmt, um dort seine Wirkung auf die zellulären Ziele zu entfalten.

1.6. Adhärenz von *H. pylori* an Epithelzellen

Adhärenz von pathogenen Erregern an die eukaryotische Zielzelle ist bei einer Infektion oft der erste Schritt, mit dem sich ein Bakterium im Wirtsorganismus etabliert. Dabei spielen sogenannte Adhäsine, bakterielle Faktoren zur Anheftung an Rezeptoren der Wirtszelle, eine ausschlaggebende Rolle. Adhäsine können ihrem Aufbau nach grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilt werden: Polypeptid- und Polysaccharid-Adhäsine. In der Gruppe der Polypeptid-Adhäsine unterscheidet man weiterhin zwischen sogenannten Fimbrien, filamentösen Strukturen gram-negativer Bakterien, über die sie eukaryotische Rezeptoren binden. Und der zweiten großen Gruppe, den Nicht-Fimbrien-Adhäsinen, die sowohl bei gram-positiven, wie auch -negativen Bakterien eine Rolle spielen. Bei gram-negativen Bakterien sind die Nicht-Fimbrien-Adhäsine als integrale Proteine in der äußeren Membran verankert und werden deshalb als „*outer membrane proteins*“ (OMPs) bezeichnet [50,137,151].

Die Adhärenz des humanpathogenen Bakteriums *H. pylori* wird als substanzielle Grundvoraussetzung für eine erste Kolonisierung und die lebenslange Persistenz im menschlichen Magen gesehen. *H. pylori* besitzt dabei ein außerordentlich großes Repertoire an äußeren Membranproteinen, wobei die Rolle der einzelnen Proteine bei der Infektion noch nicht sehr gut verstanden ist. Durch Genomanalysen konnten mehr als 60 OMPs identifiziert werden [214]. Zwei Gruppen, die sogenannten Hops „*Helicobacter outer membrane porins*“ und Hors „*Hop-related proteins*“, bilden eine große paraloge Familie mit 33 Mitgliedern [5]. Die wichtigsten Adhäsine von *H. pylori*, BabA, SabA, AlpA, AlpB und HopZ sind aufgrund ausgeprägter Sequenzhomologien über große Bereiche phylogenetisch in der Hop-Unterfamilie angehäuft (Abb. 5).

BabA ist ein Adhäsine, welches an das Blutgruppenantigen Lewis^b von Epithelzellen und der Magenmucosa bindet [22,102]. Das Sialylsäure-bindende Adhäsine SabA bindet an sialylierte Kohlenhydratstrukturen, die im entzündeten Gewebe als Teil von Gangliosiden stärker präsentiert werden [25]. Von den homologen äußeren Membranproteinen AlpA und AlpB weiß man, dass sie in die Adhärenz von *H. pylori* an Gewebeschnitte involviert sind [158,159]. Der genaue Rezeptor dieser Proteine konnte allerdings noch nicht identifiziert werden. Die Rolle des HopZ-Proteins bei der Adhärenz von *H. pylori* ist noch unklar [152]. Es bestehen widersprüchliche Daten über die Rolle dieses Proteins bei der Bindung von *H. pylori* an AGS-Zellen [155,167]. Des Weiteren konnte auch eine Bindung von *H. pylori* an

die extrazellulären Matrix Proteine Laminin und Kollagen TypIV beobachtet werden [217]. Dabei ist für die Bindung von Laminin SabA als Adhäsion identifiziert worden. Eine *H. pylori*-Bindung an Fibronectin und Lactoferrin ist jedoch unabhängig vom Status der BabA und SabA Proteine [229]. Die Bindung von *H. pylori* an diese Matrix-Proteine dürfte aber von Bedeutung sein, da sie bei einer Studie mit 200 klinischen Isolaten bei jedem untersuchten Stamm zu detektieren war [157].

Die Adhärenz an sialylierte Strukturen von Speichelproteinen könnte bei der Persistenz von *H. pylori* in der Mundhöhle und der damit verbundenen Gefahr als Ansteckungsquelle für eine Reinfektion eine Rolle spielen [51,140,172].

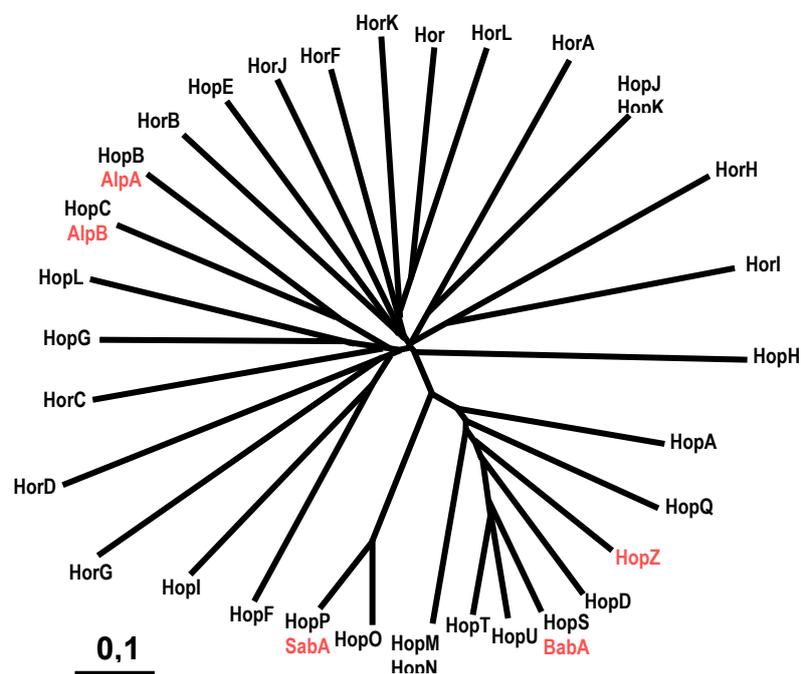


Abb. 5: Phylogenetische Einteilung der äußeren Membranproteine nach Alm *et al.* [5]

Pylogenetischer Stammbaum der äußeren Membran Protein-Familie Hop und Hor von *H. pylori*.

1.7. Das Blutgruppenantigen-bindene Adhesin BabA

1993 wurde das Blutgruppenantigen Lewis^b als Rezeptor für *H. pylori* identifiziert [22]. Durch Rezeptor-Affinitäts-Aufreinigungen konnte das entsprechende Adhäsion identifiziert werden. Es wurde nach seiner Funktion BabA (*blood group antigen binding adhesion A*) benannt [102]. Lewis^b ist das dominante Antigen auf der Magenmucosa von Personen mit einem positiven Sekretor-Status, welcher durch die Produktion einer α 1,2-Fucosyltransferase charakterisiert ist [122,186]. Dieses Enzym fukosyliert das subterminale N-Acetylamin des H-Blutgruppenantigens [82] und bestimmt somit die Präsentation eines Lewis^b und Lewis^a Phänotyps (Abb. 6).

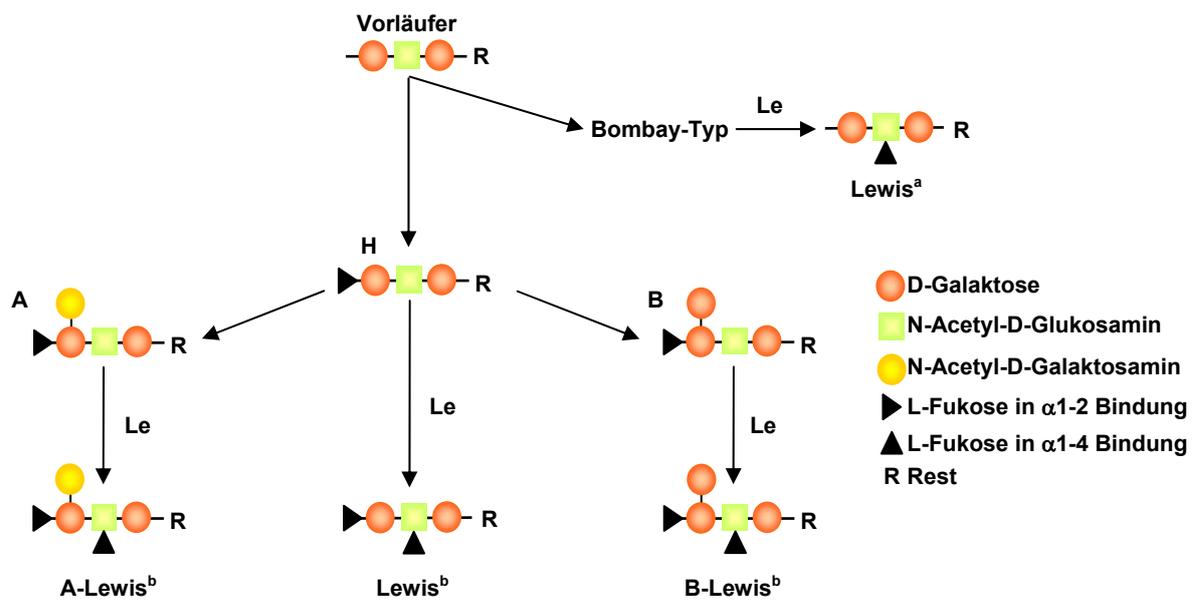


Abb. 6: Biogenese der ABO und Lewis Blutgruppenantigene

Das Allel *Le* codiert eine sogenannte Lewis-Transferase (α 1,4-Fucosyltransferase), welche eine Fucose an das subterminale N-Acetyl-Glukosamin der Blutgruppenantigen H, A, B und Bombay-Typ hängt, und somit die Präsentation eines Lewis^b, A-Lewis^b, B-Lewis^b oder Lewis^a Phänotyps bestimmt.

BabA-Adhäsine werden in zwei Untergruppen, sogenannte „Spezialisten“ und „Generalisten“ eingeteilt. Diese Einordnung beruht auf ihrer Fähigkeit, verschiedene Lewis^b-Antigene zu binden [10]. Dabei sind „Generalisten“ in der Lage, die Blutgruppenantigene Lewis^b, A-Lewis^b und B-Lewis^b unabhängig von ihrer terminalen Modifikation zu binden. „Spezialisten“ zeigen hingegen nur eine Bindung an Lewis^b. Durchschnittlich sind 95% der BabA-Proteine zur Untergruppe der „Generalisten“ zuzuordnen. Eine besondere Anhäufung von „Spezialisten“-BabA findet man mit 60% in der indigenen südamerikanischen Bevölkerung. Diese Bindungs-Spezialisierung koinzidiert mit einer einzigartigen Dominanz der Blutgruppe 0 in der Bevölkerung [10]. Es ist anzunehmen, dass Selektion für eine verbesserte Adhärenz der Bakterien in dieser Blutgruppe 0 dominanten Bevölkerung zu einer allmählichen Verdrängung der generalisierten Bindung durch eine spezialisierte Bindung an Lewis^b allein geführt hat.

Die Assoziation eines BabA-positiven Status mit diversen Krankheitsverläufen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert [152]. Zwei Studien mit deutschen Patienten zeigten eine Korrelation des *babA*-Status mit Duodenalulcus, Magenkarzinom und einem starken Ausprägungsgrad der Entzündung des Magens [76,174]. Yamaoka und Kollegen haben des Weiteren bei nicht-europäischen Patienten mit Magengeschwüren eine

höhere Rate an *babA*-positiven Isolaten (83.96%) gegenüber Gastritis Patienten (71-89%) gefunden [245]. Allerdings ist durch die hohe Anzahl der *babA*-positiven Stämme in der Gastritis-Gruppe die Relevanz von BabA als Risikofaktor fraglich. Andere Untersuchungen zeigten zudem, dass das Vorhandensein von Lewis^b nicht mit einer *H. pylori*-Infektion oder einer durch das Bakterium induzierten Krankheiten korreliert [109,198,221].

1.8. Adaptationsmechanismen von *H. pylori* an den Wirt

Eine charakteristische Eigenheit von *H. pylori* ist die hohe Plastizität seines Genoms. Diese wird hervorgerufen durch eine hohe Mutationsrate und zusätzlich durch einen starken Austausch von genetischem Material, was eine hohe Rekombinationsrate von Genen zur Folge hat [207,230]. Die hohe Variabilität zwischen *H. pylori* Stämmen basiert somit auf Mikro- (Ebene der Gene) und Makro-Diversität (Ebene des Genoms) [154]. Diese Eigenschaften von *H. pylori* stellen einen wichtigen Faktor für die Adaption an den Wirt und an die sich ändernden Umweltbedingungen im Verlauf von Entzündungsprozessen dar [154,205]. Die genetische Heterogenität wird dabei am Beispiel der Adhäsine besonders deutlich. Hierbei spielen unterschiedliche Strategien zur Erlangung einer hohen Diversität eine Rolle.

Einen solchen Mechanismus stellt das „*slipped strand mispairing*“ (SSM) dar. Dabei kommt es zur Insertion oder Deletion von Nukleotiden in homopolymeren CT-Bereichen, welche in der Promotor-Region oder dem 5'-Ende von Genen lokalisiert sind [202]. Von fünf verschiedenen *H. pylori* OMP-Genen sind solche Dinukleotid-Wiederholungen bekannt. Darunter befinden sich auch das *sabA*- und *babA*-Gen. Dies erlaubt dem Bakterium eine Adaption bezüglich der Adhärenz an Änderungen der Umweltbedingungen, wie den Entzündungsstatus des Gewebes in einem kurzen zeitlichen Rahmen [214].

Aber auch die natürliche Transformations-Kompetenz oder intragenomische Rekombinationen spielen bei *H. pylori* eine wichtige Rolle beim Ein- und Aus-Schalten diverser OMP-Gene. Dies trifft besonders auf die *bab*-Gene *babA*, *babB* und *babC* zu. Diese Gruppe von Genen zeigt große Homologien in den 5'- und 3'-terminalen Regionen, wobei der Mittelteil stark variabel ist [173,214]. Dabei kann es zu Rekombinationsereignissen zwischen *babB* und einem stillen *babA* kommen. Die daraus resultierenden BabA/B Chimären sind fähig, Lewis^b zu binden. Dies trägt zur Heterogenität einer vorher uniformen Bakterienpopulation bei. Es hat den Vorteil, dass eine Population einerseits aus Bakterien besteht die an das Epithel binden, und andererseits aus solchen, die der Immunantwort entgehen [16].

Somit finden hoch dynamische Prozesse und Veränderungen bei der Expression der Adhäsins-Gene während der Adaption von *H. pylori* an das Magenmilieu statt.

1.9. Genetische Arbeiten mit *H. pylori*

Eine bedeutende Eigenschaft von *H. pylori* ist seine natürliche Transformations-Kompetenz, wodurch er in der Lage ist, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen [148]. Die Fähigkeit zur DNA-Übertragung zwischen verschiedenen Bakterien durch Konjugation ist für *H. pylori* ebenfalls ein wichtiger Faktor, um Fremd-DNA aufzunehmen und zu replizieren, exprimieren oder in das Genom einzubauen.

Ewa 60% aller *H. pylori*-Stämme verfügen über kryptische Plasmide [126], deren Funktion bis heute teilweise unbekannt ist. Auf Basis dieser Plasmide wurde versucht, Shuttle-Vektoren für Klonierungsarbeiten und die anschließende Re-Insertion von *H. pylori*-Genen in *E. coli* herzustellen. Basierend auf dem natürlichen *H. pylori* Plasmid pHel1 [93] wurden die Vektoren pHel2 und pHel3 konstruiert, welche verschiedene Selektionsmarker tragen [94]. Mit diesen Vektoren können jedoch nicht alle *H. pylori*-Gene problemlos in *E. coli* kloniert werden, da viele der Proteine wie z.B. verschiedene äußere Membranproteine einen toxischen Effekt im heterologen System induzieren [66].

1.10. Ziele dieser Arbeit

Die Infektion mit *H. pylori* ist eine der häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit. Dabei besiedelt *H. pylori* mit dem menschlichen Magen eine ganz spezielle, durch ihre extremen Bedingungen lebensfeindliche ökologische Nische, welche lange Zeit als „steril“ galt. Aufgrund verschiedener Anpassungen ist es dem Mikroorganismus *H. pylori* jedoch gelungen, diesen unwirtlichen Lebensraum zu erobern.

Zu den wichtigsten Virulenzfaktoren zählen dabei unter anderem die zwei *H. pylori*-Proteine VacA und BabA. Um das grundlegende Verständnis für die Aktivität und Aufgabe dieser Proteine während einer *H. pylori*-Infektion zu erweitern, sollten die Bindungseigenschaften dieser Virulenzfaktoren näher bestimmt werden.

Die Interaktion von VacA mit T-Lymphocyten und Epithelzellen sollte durch die Identifizierung weiterer Rezeptoren auf diesen Zelltypen näher charakterisiert werden. Die Kenntnis weiterer Rezeptoren könnte helfen, die Wirkungen von VacA auf verschiedene Zelltypen besser zu verstehen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung der Lewis^b-Binderegion des BabA-Adhäsins. Bereits 2001 hatten Pride und Kollegen [173] versucht,

durch Sequenzvergleiche bei 42 *H. pylori*-Stämmen einen entscheidenden Faktor für die Lewis^b-Bindung in den *babA*-Genen zu finden. Allerdings gelang eine Identifizierung bis heute nicht. In dieser Arbeit sollte nun die Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins anhand von Mutagenisierungen des entsprechenden Gens und anschließenden Adhärenz-Tests eingegrenzt und näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

HeLa	humane Cervixkarzinom-Zelllinie (DSMZ ACC 57)
AGS	humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739)
Jurkat E6.1	humane T-Zelllinie (ATCC TIB-152)
Jurkat- β 2.7	Jurkat; produzieren kein CD11a (C. Weber; Uniklinik Aachen)
Jurkat- β 2.7/CD11a	Jurkat- β 2.7; komplementiert mit CD11a (B. Holzmann; TU München)
EL-4	murine T-Zelllinie (ATCC TIB-39)
GE11	murine Epithel-ähnliche Embryonalzelllinie, ITGB1 -/- (R. Fässler, MPI Martinsried)
GE11 β	murine Epithel-ähnliche Embryonalzelllinie, hITGB1 in trans (R. Fässler, MPI Martinsried)
β -2-4 (-/-)	murine Fibroblasten-ähnliche Embryonalzelllinie, ITGB1 -/- (R. Fässler, MPI Martinsried)
β -2-4-8 (+/+)	murine Fibroblasten-ähnliche Embryonalzelllinie, ITGB1 +/+ (R. Fässler, MPI Martinsried)

2.1.2. Bakterienstämme

2.1.2.1. *Escherichia coli* - Stämme

Top10	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAargF)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> (<i>str</i> ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen)
DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAargF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , λ <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Invitrogen)
β 2150	auxotroph für Diaminopimelinsäure [46]
β 2150[pRK2013]	auxotroph für Diaminopimelinsäure, <i>tra</i> -Gene für Konjugationsapparat kodiert auf Plasmid [46]

2.1.2.2. *Helicobacter pylori* - Stämme

J99	<i>H. pylori</i> , mit publizierter Genomsequenz [6]
26659	<i>H. pylori</i> , mit publizierter Genomsequenz [214]
P1	Kl.Isolat 69A der Universität Amsterdam [84]
P1 Δ <i>alpAB</i>	P1 transformiert mit pMu140a, <i>alpA::cat</i> [158]
P1(<i>babA</i>)	P1 transformiert mit pDP501, <i>babA::kan</i> [173]
P76	P1, Str ^R
60190	<i>H. pylori</i> Isolat [38]
P12	Kl.Isolat 888-0 der Universität Hamburg [189]
B128	Mongolian Gerbil adaptierter <i>H. pylori</i> -Stamm [134]
P49	Mausadaptierter <i>H. pylori</i> -Stamm (bezogen von Kleanthous <i>et al.</i>)
P92	Mausadaptierter <i>H. pylori</i> -Stamm
P217	Klinisches Isolat (bezogen von Backert <i>et al.</i>)
Tx30a	<i>H. pylori</i> Isolat [11]
QIRIV	Re-Isolat aus Mongolian Gerbil [108] entspricht P149
256	Klinisches Isolat [170]
256RI	Maus Re-Isolat des Stamms 256
#167	Kl.Isolat des Klinikum Innenstadt der LMU-München [157]
#184	Kl.Isolat des Klinikum Innenstadt der LMU-München [157]
#216a	Kl.Isolat des Klinikum Innenstadt der LMU-München [157]
#222a	Kl.Isolat des Klinikum Innenstadt der LMU-München [157]

2.1.3. Plasmide und Vektoren

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)
pBlueskriptSK	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1}</i> (+), <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse Primerbindungsstellen Amp ^R , (Stratagene)
pHel3	<i>H. pylori</i> / <i>E. coli</i> -Shuttle-Vektor, Kan ^R [94]
pSO97	<i>alpAB</i> -Operon in Shuttle-Vektor pHel3
pSO209	<i>babA</i> -Fragment (P1) in pBlueskriptSK
pKP71	Vektor mit <i>luc</i> -Gen
pET-SH3	<i>ori_{colE1}</i> [106]
pIB4	<i>babA</i> aus <i>H. pylori</i> J99 in Shuttle-Vektor pIB6
pIB6	<i>alpA</i> Promotor-Region in Shuttle-Vektor pHel3

pIB25	<i>babA</i> (J99) mit <i>alpA</i> -Promotor in pBlueskriptSK
pIB26	<i>babA</i> (Chimäre J99/P1) mit <i>alpA</i> -Promotor in pBlueskriptSK
pIB28	<i>babA</i> (Chimäre J99/P1) in Shuttle-Vektor pIB6
pIB35	<i>babA</i> (pIB28-Chimäre mit Re-Insertion) in Shuttle-Vektor pIB6
pIB36	<i>babA</i> (pIB28-Chimäre mit Re-Insertion) in Shuttle-Vektor pIB6
pIB39	<i>luc</i> in pIB6

2.1.4. Oligonukleotide

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' nach 3')</u>	<u>Bindung an Zielregion / Verwendungszweck</u>
M13fw	GTAAAACGACGGCCAGT	
M13rev	AACAGCTATGACCATG	
BG9	ATGGAAATACAACAAACACAC	<i>vacA</i> s-Region (nach Atherton) [11]
BG10	GGTCAAATGCGGTCATGG	m1 <i>vacA</i> (nach Atherton) [11]
BG11	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	m1 <i>vacA</i> (nach Atherton) [11]
BG12	CATAACTAGCGCCTTGAC	m2 <i>vacA</i> (nach Atherton) [11]
BG13	GGAGCCCCAGGAAACATTG	m2 <i>vacA</i> (nach Atherton) [11]
IB9	GATCCATATGAAAAACACATCCTTTCATTAAC	5'- <i>babA</i> (J99)
IB10	CAAGGCGGCCGCTTAATAAGCGAACACGTAATTC	3'- <i>babA</i> (J99)
IB31	CCTGARACCGTTCCTACAGC	<i>vacA</i> s-Region (nach van Doorn) [224]
IB32	CATTATCGTCTTGGTAG	<i>ori</i> _(colE1) Region von pIB6
IB33	GAAGGGAGAAAGGCGGACAG	<i>aphA-3</i> Gen von pIB6
IB35	TATTAGCACGGAAAAACGGGC	<i>babA</i>

IB51	CAATCTGTCCAATCAAGCGAGCGGG <i>vacA</i> (m-Region)
IB52	CTAGGCGCTCTTTGAATTGCTC <i>vacA</i> (m-Regeion)
IB53	P-AGTAGAGAATTTTGGGGCGTTAGCCTCACTACTATTACTAGCATG GAAATACGG <i>babA</i> (Mutagenese von P1 nach J99)
IB54	P-ACTACTGGGAAAATATGCGGC <i>babA</i> (P1)
IB55	P-GCCATTGTTATTTCCCACCGGAGTCGTTTGTTCATGCTCGTT <i>babA</i> (Muagenese von P1 nach J99)
IB56	P-AAGCCTTTCAACCCTTTCACG <i>babA</i> (P1)
IB57	GTTGGGATTGGGGGAATGCCG <i>vacA</i> i-Region [178]
IB58	TTAATTTAACGCTGTTTGAAG <i>vacA</i> i-Region [178]
IB59	GATCAACGCTCTGATTTGA <i>vacA</i> i-Region [178]
IB65	GTCACATATGGAAGACGCCAAAAACATAAG <i>luc</i> in pKP71
IB66	CAGTGCGGCCGCTTACAATTTGGACTTTCC <i>luc</i> in pKP71
IB70	CCTGGATACTACGGCCCTATG <i>babA</i> (P1)
IB72	CAAGCCACAGGTGTAAACAA <i>babA</i> (#222a)
IB92	ACAAGTGAGTGTAAGCTAC <i>babA</i> (#184)
IB93	CAGCCAATGGATCTAATG <i>babA</i> (#167)

2.1.5. Antikörper

2.1.5.1. Primäre Antikörper

α -BabA (AK 277)	polyklonales Antiserum gegen ein BabA-Fusionsprotein (<i>H. pylori</i> 1243) (Kaninchen)
α -VacA (AK197)	polyklonales Antiserum gegen VacA von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)
α -CD18-PE	monoklonaler PE markierter Antikörper gegen CD18 (BD Pharmingen, Kat.No.555005)
α -CD29-FITC	monoklonaler FITC markierter Antikörper gegen CD29 (BD Pharmingen, Kat.No.555924)
α -CD29 (AIIB2)	monoklonaler Antikörper gegen CD29 [233]
α -ITGB1 (AB1952)	monoklonaler Antikörper gegen cytoplasmatische Domäne von CD29 (Chemicon)
α -Alexa488	monoklonaler Antikörper gegen Alexa488 Fluorophor (Molecular Probes)

2.1.5.2. Sekundäre Antikörper

α -Kaninchen IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG (Ziege), (Dianova)
α -Kaninchen IgG-Alexa488	Alexa488-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG (Ziege), (Molecular Probes)
α -Ratte IgG-Alexa555	Alexa555-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen Ratte IgG (Ziege), (Invitrogen)

2.1.6. Nährmedien und Puffer für Bakterien und Zellkultur

LB-Medium	20g/l Lennox-L-Broth (Gibco), autoklaviert
LB-Platten	32g/l Lennox-L-Agar (Gibco), autoklaviert
Serumplatten	36 g/l GC-Agar-Base, autoklaviert, Zugabe von 10 ml/l Vitaminmix, 80 ml/l Pferdeserum (Gibco), 10 mg/l Vancomycin, 1 mg/l Nystatin, 5 mg/l Trimethoprim
Vitaminmix	100 g/l α -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l NAD, 10 mg/l Vitamin B ₁₂ ,

	1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil, sterilfiltriert
Brucella-Medium	28 g/l Brucella-Broth, autoklaviert
Einfriermedium	
für <i>H. pylori</i>	Brucella-Medium, 20% Glycerin, 10% FCS
für <i>E. coli</i>	LB-Medium, 20% Glycerin
PBS	0,2 g/l KCl, 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2
RPMI-Medium	RPMI 1640 Medium (Gibco)
DMEM-Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit Natriumpyruvat und Pyridoxin (Gibco)

2.1.7. Antibiotika und Zusätze in Selektivplatten und -medien

Ampicillin (Amp)	100 mg/l	(LB-Medium/-Platten)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/l	(LB-Medium/-Platten)
	6 mg/l	(Serumplatten)
Kanamycin (Kan)	50 mg/l	(LB-Medium/-Platten)
	8 mg/l	(Serumplatten)
DAP	14 mg/l	(LB-Platten)
X-Gal	40 mg/l	(LB-Platten)

2.1.8. Puffer und Lösungen

2.1.8.1. Puffer für die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

TFB I	30 mM K-Acetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MgCl ₂ , 15% Glycerin, pH 5,2 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert
TFB II	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15% Glycerin, pH 6,5 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert

2.1.8.2. Puffer und Lösungen für DNA-Präparationen

STET-Puffer	8% Saccharose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym in STET-Puffer

2.1.8.3. Puffer für analytische und präparative Auftrennung von DNA

TAE-Puffer	4,84 g/l Tris-Base, 1,14 ml/l Eisessig, 1 mM EDTA
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser
Ethidiumbromidfärbebad	1 mg/l Ethidiumbromid
Methylenblaulösung	1 g/l Methylenblau
GEBS-Puffer	20% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 50 mM EDTA, 0,5% N-Laurylsarkosin

2.1.8.4. Puffer für Enzymreaktionen**Für Restriktionsenzyme:**

10x A-Puffer (Roche)	330 mM Tris-Acetat, 100 mM Magnesiumacetat, 660 mM Kaliumacetat, 0,5 mM DTT, pH 7,9
10x B-Puffer (Roche)	100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0
10x H-Puffer (Roche)	500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 10 mM DTE, pH 7,5
10x M-Puffer (Roche)	100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 500 M NaCl, 10 mM DTT, pH 7,5
10x L-Puffer (Roche)	100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, pH 7,5

Für andere Enzyme:

10x Ligase-Puffer (Roche)	660 mM Tris-HCl, 50mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 10 mM ATP, pH7,5
10x Polynukleotidkinase-Puffer (Roche)	500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin, pH 8,2

2.1.8.5. Puffer und Lösungen für Proteinmengenbestimmungen

Bradfordreagenz	0,01% Coomassie Brilliant Blue G250, 5% Ethanol, 10% Phosphorsäure (85%ig)
-----------------	---

2.1.8.6. Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

2x SDS-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau
Acrylamidlösung	29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Sammelgel	125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED
Trenngel	375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04-0,06% TEMED
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
Coomassie-Lösung	0,275% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärbelösung	10% Methanol, 10% Ethanol, 7,5% Essigsäure

2.1.8.7. Puffer und Lösungen für Western-Blot

Western-Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
TTBS	TBS, 0,5% Tween 20
Absättigungspuffer	TBS, 3% BSA
Detektionslösung	0,1 M Tris-HCl, 7 mM MgCl ₂ , 0,1 g/l NBT, 50 mg/l BCIP, pH 9,6

2.1.8.8. Puffer und Lösungen für Membranpräparationen

Saccharose-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 200 mM Saccharose
HSL-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,005 % Triton, 4 mM MgCl, 3 mM MnCl ₂ 150 mM NaCl
HSL-Waschpuffer	25 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,005 % Triton, 4 mM MgCl, 3 mM MnCl ₂ , 300 mM NaCl

2.1.8.9. Puffer und Lösungen für Präzipitationen

MES-Puffer	0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfon Säure, pH 5,0
Blockierungspuffer	25 mM Tris-HCl pH 7,4 mit 0,05 % Na-Azid
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 0,25% Na-Desoxycholat

2.1.8.10. Puffer und Lösungen für Luciferase Messungen

Lyse-Puffer	14 g/l K ₂ HPO ₄ , 2,67 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,74 g/l EDTA, 5 g/l BSA, 1 g/l TritonX-100, pH 7,8
Luciferin-Lösung	20 mM Tricin, 1,07 mM (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O, 0,1mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270M Li ₃ -CoenzymA, 470 M Luciferin, 530 M Mg-ATP, pH 7,8

2.1.8.11. Puffer und Lösungen für Dot-Blot

TBS-DB	150 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH 7,5
PBS-DB	8,5 g/l NaCl, 0,77 g/l NaH ₂ PO ₄ , 4,84 g/l Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O
Absättigungspuffer-DB	TBS-DB, 5% BSA, 0,1% CaCl ₂ , 0,1% MgCl ₂
Waschpuffer-DB	TBS-DB, 0,05% Tween 20, 0,1% CaCl ₂ , 0,1% MgCl ₂

2.1.8.12. Puffer und Lösungen für Vakuolisierungsexperimente

Neutralrot-Lösung	0,008% Neutralrot in Zellkulturmedium
Waschpuffer	PBS, 0,5% BSA
Extraktions-Lösung	70% EtOH, 0,37% HCl

2.1.9. Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A (Sigma), Expand High Fidelity *Taq*-Polymerase (Roche), *Takara*-*Taq*-Polymerase (TaKaRa Bio Inc.), Fötale Kälberserum (FCS) (PAA), Pferdeserum (Invitrogen), Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma), Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL), ProteinG-Agarose (Roche), Laminin aus humaner Placenta (Sigma), Lewis^b-HSA (Glycorex), Lactoferrin aus humaner Milch (Sigma), Lysozym (Roche), Neuraminidase (Fluca), Polynukleotidkinase (Roche), Proteinase K (Merck), Restriktionsenzyme (Roche bzw. NEB), RNase (Qiagen), T4-DNA-Ligase (Roche), *Pfu*-Polymerase (Roche), Integrin $\alpha_5\beta_1$ gereinigt (Chemicon), Integrin $\alpha_1\beta_1$ gereinigt (Chemicon)

2.1.10. Molekulargewichtsmarker

DNA-Gelelektrophorese	GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas) GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)
-----------------------	--

Polyacrylamid-Gelelektrophorese Prestained High Range (Bio-Rad, 161-0373)
 Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI
 Fermentas, SM0441)
 Prestained Ultra-Low Range (Sigma-Aldrich, M3546)

2.1.11. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%) (Roth), Agarose (Sigma), Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), Alexa Fluor 555 (Molecular Probes), Ammoniumsulfat (Roth), Ampicillin (Sigma), ATP (Roche), 5-Brom-3-chlor-3-indolyolphosphat-p-toluidinsalz (BCIP) (Roth), Bromphenolblau (Serva), Brucella-Medium (Becton Dickinson), Chloramphenicol (Serva), Cholesterol (Gibco), CMC 1-cyclohexyl-3(2-morpholinoethyl)carbodiimidmetho-p-toluensulfonat (Chemicell), DAP (Sigma), Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat Mix (dNTPs) (Roche), DMSO (Sigma), EDTA (Sigma), Eindeckmedium mit DAPI (Vector Laboratories), Ethidiumbromid (Sigma), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) (Fluka Chemie), FluoroprepTM (BioMérieux), GC-Agar (Remel), Glycerin (Roth), Kanamycin (Merck), Lennox-L-LB-Agar (Invitrogen), Leupeptin (Sigma), Luciferin (Sigma), Methylenblau (Serva), Natriumlaurylsulfat (SDS) (Roth), NNN'N'Tetramethyldiamid (TEMED) (Sigma), Nitrotetrazoliumblanchlorid (NBT) (Roth), PBS Dulbecco's (Invitrogen), Pepstatin (Sigma), PFA (Paraformaldehyd) (Sigma), PMSF (Sigma), Poly-L-Lysin (Sigma), RPMI 1640-Medium mit Glutamin (Invitrogen), Sephadex G-20 (Sigma), Tetracyclin (Roche), Tris-Base (Roth), Trimethoprim (Sigma), Trypan Blau (Invitrogen), Tween20 (Serva), Vancomycin (Sigma), Western LightningTM-Detektionsreagenz (Perkin Elmer Life Science), X-Gal (Sigma)

Alle weiteren organischen und anorganischen Chemikalien wurden von Merck, Roth oder Sigma bezogen.

2.1.12. Kommerzielle Analysen-Kits

E.Z.N.A. [®] Gel Extraction Kit	PEQLAB
illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE-Healthcare
QIAprep Spin Miniprep Kit TM	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit TM	Qiagen
TOPO-TA-Cloning TM -Kits mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor	Invitrogen
Wizard [®] Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega

2.1.13. Hilfsmittel

Anaerobentöpfe (Friz Göbner GmbH), Deckgläser (Menzel), Dialyse Kassette *Slide-A-Lyzer* 30 kDa (ThermoScientific), Einfrierröhrchen (Nalgene), Elektroporationsküvetten (Eurogenetec), Eppendorfgefäße (Eppendorf), ELISA Maxisorp Platten (Nunc), Expositionskassetten für Röntgenfilme (Kodak), Falcon Röhrchen 15ml, 50ml (Falcon, BD), Filtrationseinheit *Ultra Centrifugal Filter* 100 kDa (Amicon), Filterpapiere (Whatman), Gelfiltration Sephacryl S300 16/60-Säule FPLC (Amersham), Glasperlen silikonisiert, Petrischalen (Greiner), Probenplatten für Luminometer (Costar), PVDF-Membran (Bio-Rad), Magnetische Kugeln *SiMAG-Carboxyl magnetic beads* (Chemicell), Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schüll), Nitrocellulose-Filter (Millipore), Objektträger (Langenbrinck), Röntgenfilme (Fuji), Qick-SealTM-Röhrchen (Beckmann), Röntgenfilme (Fujifilm), Zellkulturflaschen/-schalen (BD Falcon), 0,2 µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH),

2.1.14. Apparaturen und Geräte

Agarosegelkammern (Bio-Rad), Brutschränke (Binder, Scholzen), Durchflusszytometer (BD), ELISA-Reader (Tecan), Fluoreszenzmikroskop Leitz MDRD (Leica), Fluoreszenzscanner FLA-3000 (Fujifilm), -80°C Gefriertruhe (Heraeus), Gelelektrophoresesystem Mini-Protean IIITM (Bio-Rad), Gene PulserTM (Bio-Rad), Heizblöcke (Techne), Konfokales Laserscanning-Mikroskop (Leica SP5), Kühlschrank (Liebherr), Luminometer Microlumat Plus LB 96V (Berthold Technologies), Magnetrührer (Heidolph), Mikrowelle (AEG), PCR-Gerät T3-Thermocycler (Biometra), PH-Meter (WTW), Photometer Libra S12 (Biochrom), Rollmischer (Assistent), Schüttelinkubatoren (GFL), Schüttler (Eppendorf), Spannungsquellen (Biotec Fischer, Delta Elektronika), Speed-Vac (Savant), Sterile Werkbank (BDK), UV-Transluminator (Kaiser), Video-Geldokumentationsanlage (Bio-Rad), Vortex (Scientific Industries), Waagen (Fischer), Wasserbäder (GFL), Western Blot-Apparatur (Biotec Fischer), Zentrifugen (Heraeus, Beckmann, Sorvall)

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1. Bakterienkulturen

2.2.1.1.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde auf Luria-Bertani (LB)-Platten oder in LB-Flüssigmedium kultiviert, welche bei Bedarf entsprechende Antibiotika enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer dicht bewachsenen Platte in 1 ml LB-Medium mit 20% Glycerin suspendiert und bei -70°C eingefroren.

2.2.1.1.2. Kultivierung von *Helicobacter pylori*

H. pylori wurde auf Serumplatten, die bei Bedarf mit entsprechenden Antibiotika versetzt waren, kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Brucella-Medium angesetzt, welches je nach Bedarf mit 10% FCS oder Cholesterol (1:250, Gibco) supplementiert wurde. Alle Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85%N₂) bei 37°C für ein bis zwei Tage in Anaeroben-Brutschränken oder Anaerobentöpfen inkubiert.

Stämme aus der Gefrierkultur (-70°C) wurden nach dem Ausstreichen auf Serumplatten für drei Tage bei 37°C bebrütet. Nach Überimpfen auf neue Serumplatten wurden die Bakterien weitere ein bis zwei Tage kultiviert, bevor sie für das entsprechende Experiment eingesetzt wurden.

Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer dicht bewachsenen Platte in 1 ml Brucella-Medium mit 20% Glycerin und 10% FCS suspendiert und bei -70°C eingefroren.

2.2.1.2. Transformation von *E.coli*

2.2.1.2.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen [87]

Zur Herstellung von kompetenten Zellen für die chemische Transformation wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml 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 5 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 2200 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 20 ml TFBI resuspendiert und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen

wurden erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, dann in 4 ml TFBII aufgenommen und 15 Minuten auf Eis gekühlt. Abgefüllt in Aliquots von 50 µl wurden sie auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.1.2.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation wurde 1 Liter LB-Flüssigmedium mit 10 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (15 min, 2200 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 1 Liter eiskühlem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 ml eiskühlem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend mit 20 ml eiskalter Glycerinlösung (10%) gewaschen. Danach wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 3-4 ml Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots zu je 50 µl auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.1.2.3. Hitzeschock-Transformation von *E. coli* Zellen

Für die Hitzeschock-Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 4 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und anschließend eine Minute auf Eis gelagert. Zu dem Transformationsansatz wurde 1 ml LB-Medium gegeben. Die Zellen wurden zur Ausbildung der Resistenz eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf geeignete LB-Selektivplatten ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (2 min, 10000 x g) und das Sediment in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht bebrütet.

2.2.1.2.4. Transformation superkompetenter *E. coli* Top10-Zellen

Um eine höhere Transformationseffizienz zu erzielen, wurden käufliche superkompetente *E. coli* Top10-Zellen von Invitrogen verwendet.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 4 µl Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C erfolgte eine erneute Lagerung auf Eis für eine Minute. Zu dem Transformationsansatz wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen zur Ausbildung der Resistenz eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf geeigneten LB-Selektivplatten ausplattiert. Der Rest

wurde zentrifugiert (2 min, 10000 x g) und das Sediment in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht bebrütet.

2.2.1.2.5. Elektroporation von *E. coli* Zellen

Für die Elektroporation von *E. coli* wurde ein Aliquot elektrokompenter Zellen von -70°C langsam auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mittels des Gene Pulser™ Geräts (Biorad) bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Die Zellen wurden sofort mit 1 ml LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C zur Ausbildung der Resistenz geschüttelt. Danach wurden 100 µl des Ansatzes auf entsprechende LB-Selektivplatten ausplattiert. Der Rest wurde zentrifugiert (2 min, 10000 x g) und das Sediment in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht bebrütet.

2.2.1.3. Konjugation von *H. pylori* [94]

Zur Übertragung verschiedener Shuttle-Vektoren von *E. coli* auf *H. pylori* wurden sogenannte Donor-, Mobilisator- und Akzeptorstämme verwendet.

Als Donorstamm diente der *E. coli*-Stamm β2150 mit dem entsprechenden zu konjugierenden Shuttle-Vektor. Als Mobilisatorstamm diente der *E. coli*-Stamm β2150[pRK2013], welcher auf seinem Plasmid die für die Konjugation notwendigen *tra*-Gene für den Konjugationsapparat kodiert. Als Akzeptorstamm dienten die jeweils benötigten *H. pylori*-Stämme. In einem ersten Schritt wird das Plasmid pRK2013 vom Mobilisator auf den Donor via Konjugation übertragen, wodurch der Donor selbst zu einem Konjugationskompetenten Stamm wird, und den Shuttle-Vektor in einer zweiten Konjugation an den Akzeptorstamm weitergeben kann.

Das Zellmaterial einer Platte wurde jeweils in 1 ml Brucella-Broth mit 10% FCS suspendiert und eine OD₅₅₀=10 eingestellt. Akzeptor, Mobilisator und Donor wurden in den relativen Mengen 10:1:1 für die Konjugation eingesetzt, d.h. 250 µl Akzeptor, 25 µl Mobilisator und 25 µl Donor wurden zusammen in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (2 min, 10000 x g) und das Bakteriensediment in ca. 50 µl Brucella-Broth resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf einen auf einer Serumplatte liegenden Nitrozellulosefilter aufgetropft und für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Bakterien mit 1 ml Brucella-Broth vom Filter ab gespült und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. 200 µl des Konjugationsansatzes wurden auf die entsprechenden

Serumselektivplatten ausplattiert. Der Rest wurde zentrifugiert (2 min, 10000 x g) und das Sediment in 100 µl Brucella-Broth resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden anschließend unter mikroaerophilen Bedingungen für 4-6 Tage bei 37°C bebrütet. Durch die Abwesenheit von Diaminopimelinsäure (DAP) in den Serumplatten wurde ausgeschlossen, dass unerwünschte *E. coli* Kolonien wachsen konnten, da die verwendeten Stämme durch eine Defizienz im Gen der DAP-Aminotransferase auxotroph für Diaminopimelinsäure sind.

2.2.2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.2.1. Kultivierung von HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden in DMEM-Medium supplementiert mit 10% FCS und Glutamin kultiviert. Bevor die Zellen einen konfluenten Rasen gebildet hatten wurden sie verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend einige Minuten mit 3 ml Trypsinlösung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Sobald die Zellen vom Flaschenboden abgelöst waren, wurde das Trypsin durch Zugabe von 5 ml DMEM-Medium mit 10% FCS inaktiviert. Ein Teil der Zellen wurde in eine frische Flasche mit DMEM, 10% FCS umgesetzt. Die frische Kultur wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.2.2. Kultivierung von AGS Zellen

AGS Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37°C unter 5 % CO₂ kultiviert und vor Bildung eines konfluenten Rasens verdünnt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend einige Minuten mit 3 ml Trypsinlösung inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde nach einigen Minuten mikroskopisch kontrolliert und das Trypsin durch Zugabe von 5 ml Medium mit FCS inaktiviert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit Medium umgesetzt.

2.2.2.3. Kultivierung von Jurkat und EL-4 Zellen

Jurkat und EL-4 T-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei Tage 1:7 (Jurkat) bzw. 1:20 (EL-4) verdünnt. Da diese Zelllinien nicht adhärent wachsen, wurden die Zellen zur Entfernung des alten Mediums 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und anschließend in neuem Medium resuspendiert.

2.2.2.4. Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Auftauen

Die in Kryoampullen bei -180°C aufbewahrten Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und zunächst auf Eis transportiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in 10 ml vorbereitetes, der Zelllinie entsprechendes, Medium mit 10 % FCS überführt. Danach wurde 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen über Nacht in Zellkulturmedium, supplementiert mit 10 % FCS, kultiviert. Die Vitalität und Dichte der Zellen wurde am nächsten Tag überprüft und diese, falls erforderlich, verdünnt.

Einfrieren

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 75cm^2 -Zellkulturflasche wurden in zwei Kryoröhrchen eingefroren. Dazu wurden die Einfrierröhrchen auf Eis gekühlt, die Zellen mit Hilfe von Trypsin in Suspension gebracht und 10 min bei $200 \times g$ abzentrifugiert. Das in 5 ml Medium gewaschene Zellpellet wurde auf Eis in 1,5 ml gekühltem Medium mit 20 % FCS resuspendiert. Anschließend wurde tropfenweise die gleiche Menge Einfriermedium (DMEM oder RPMI, 20% FCS, 15%DMSO) zugegeben und in 1,5 ml Aliquots portioniert. Das Einfrieren erfolgte zunächst bei -70°C für 24 h, anschließend erfolgte die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -180°C .

2.2.2.5. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot einer Zellsuspension 1:10 mit Trypan Blau (Invitrogen) verdünnt. Durch Trypan Blau wurden lebende Zellen von nicht intakten unterschieden. In der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in vier Quadranten ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl pro ml errechnete sich nach folgender Formel:

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

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Isolierung von DNA

2.2.3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach Holmes und Quigley [99]

Eine Impföse Zellmaterial wurde in 300 µl STET-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde der Ansatz 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Aufkochen für eine Minute bei 100°C wurden die Zellen lysiert. Chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 10000 x g) sedimentiert und anschließend mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde mit 200 µl Isopropanol versetzt und 10 Minuten bei -20°C gefällt. Anschließend wurde sie durch 10 minütiges Zentrifugieren (10000 x g) sedimentiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Lyophilisierung in einer Vakuumzentrifuge wurde die Plasmid-DNA in 50 µl H₂O_{bide}st. aufgenommen.

2.2.3.1.2. Isolierung von konzentrierter, reiner Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Aufreinigung von konzentrierter Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep KitTM von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Dabei wurde eine Impföse Zellmaterial in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 lysiert. Nach erfolgter Lyse (5 min) wurden 350 µl Puffer N3 zugegeben. Denaturierte Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (10 min, 10000 x g) gefällt. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spin Miniprep KitTM DNA-Bindesäule aufgetragen und zentrifugiert (1 min, 10000 x g). Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde wieder verworfen und die Säule erneut zentrifugiert um verbliebenen Wasch-Puffer vollständig zu entfernen. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde durch Zentrifugation (1 min, 10000 x g) mit 50 µl Nuklease freiem Wasser eluiert.

2.2.3.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori*

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *H. pylori* erfolgte mit dem Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System von Promega nach Angaben des Herstellers.

Dabei wurde eine Impföse Zellmaterial in 250 µl Resuspensions-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl Lyse-Puffer lysiert. Nach erfolgter Lyse wurden 10 µl Protease-Lösung zugegeben und für fünf Minuten inkubiert. Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zusatz von 350 µl Neutralisierungs-Puffer und anschließender Zentrifugation (10 min,

10000 x g) gefällt. Der Überstand wurde auf eine Wizard® Plus SV Minipreps DNA-Bindesäule aufgetragen. Nach Zentrifugation (1 min, 10000 x g) wurde der Durchlauf verworfen und die Säule zweimal mit 750 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend noch einmal ohne Puffer zentrifugiert, um verbliebenen Puffer vollständig zu entfernen. Die in der Säule gebundene DNA wurde durch Zentrifugation (1 min, 10000 x g) mit 100 µl Nuklease freiem Wasser eluiert.

2.2.3.1.4. Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. pylori*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori* erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit™ von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Das Zellmaterial einer Impföse wurde in 180 µl Puffer ATL suspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Protease K-Lösung erfolgte die Inkubation der Zellen bei 56°C bis zur vollständigen Lyse. Danach wurde der Ansatz mit 200 µl Puffer AL versetzt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl reinem Ethanol wurde die Probe in eine Qiagen-Säule überführt und 1 min bei 6000 x g zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säule nacheinander mit jeweils 500 µl AW1 und AW2 Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 150 µl sterilem Wasser erfolgte eine Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur. Die Säule wurde bei 6000 x g eine Minute zentrifugiert und die DNA in einem sterilen Eppendorf-Gefäß aufgefangen.

2.2.3.2. DNA-Gelelektrophorese [187]

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte mit Agaroseflachbettgelen der Agarosekonzentration 0,8-2%. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit ¼ Volumen GEBS-Puffer versetzt. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Auftrennung erfolgte bei 75V für ca. 50 Minuten.

Im Zuge der analytischen Auftrennung wurden die DNA-Banden anschließend im Ethidiumbromidbad (1 mg/l) angefärbt. Die Dokumentation erfolgte mittels eines Videosystems der Firma Bio-Rad unter UV-Licht (260nm).

Für präparative Zwecke wurde das Gel mit einer 0,1%igen Methylenblaulösung für ca. 10 min angefärbt. Anschließend wurde die Agarose in einem Wasserbad wieder so weit entfärbt, bis die DNA als blaue Bande sichtbar wurde. Diese wurde auf einem Durchlichttisch ausgeschnitten.

2.2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [185]

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können ausgewählte Gene oder Genabschnitte eines DNA-Moleküls amplifiziert werden. Dafür werden zwei 18-25 bp lange Oligonukleotide synthetisiert, welche nach der Hitzedenaturierung jeweils mit einem der Einzelstränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts in gegenläufiger Richtung hybridisieren. Sie dienen als Primer für die hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase). Die Polymerase katalysiert nach Zugabe der vier Desoxyribonukleotide die Verlängerung des Einzelstrangs vom 3'-Ende der Oligonukleotide aus. Beim folgenden Denaturierungsschritt trennen sich die entstandenen Doppelstränge und können erneut mit den Oligonukleotiden hybridisieren. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA.

Zur Klonierung und zum Nachweis von Genen aus *H. pylori* oder *E. coli* wurde eine PCR mit Takara-*Taq*-Polymerase und dem dazugehörigen Puffersystem durchgeführt. Als Matrize wurde eine adäquate Menge chromosomale DNA (1:25 verdünnt) oder Plasmid-DNA (1:100) eingesetzt. Je nach Anwendung wurden die PCR-Ansätze in einem Gesamtvolumen von 50 oder 100 µl durchgeführt. Pro 50 µl Ansatz wurden 1 µl verdünnte DNA, je 100 pmol Oligonukleotide, je 20 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP und 2 U *Taq*-Polymerase verwendet. Die Matrizen-DNA wurde zunächst für 3 min bei 94°C in einem Thermocycler denaturiert; die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments erfolgte dann in 30 wiederkehrenden Zyklen: 30 sec Denaturieren bei 94 °C, 30 sec Hybridisierung bei 48-52°C, 30 sec - 4 min (je nach Länge der zu amplifizierenden DNA) Kettenverlängerung bei 72°C. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach Zugabe von GEBS-Puffer (¼ des Volumens) auf einem TAE-Agarosegel analysiert.

2.2.3.4. Ortsspezifische Mutagenese

Bei der Ortsspezifischen Mutagenese (engl. *site-directed mutagenesis*) können gezielt einzelne Nukleinbasen eines Gens ausgetauscht oder deletiert werden.

Zu diesem Zweck wurde das zu mutagenisierende Gen in einen Shuttle-Vektor kloniert. Anschließend wurden Oligonukleotide für die PCR entworfen, welche in entgegengesetzter Richtung an der zu mutagenisierenden Stelle auf dem Gen binden. Die Oligonukleotide sind am 5'-Ende phosphoryliert und beinhalteten die gewünschten Sequenzveränderungen. Während einer Polymerase-Kettenreaktion erfolgte die Amplifikation des gesamten Shuttle-Vektors. Zu 21,5 µl des Reaktionsprodukts wurden, zusammen mit dem entsprechenden Puffer, 20 U des Enzyms *DpnI* (NEB) zugegeben und für 30 Minuten auf 37°C erhitzt. Dieses

Restriktionsenzym schneidet die DNA an der palindromischen Sequenz GATC, wobei diese nur im methylierten Zustand von dem Enzym erkannt wird. Somit wurde differenziell nur der Ausgangsvektor, welcher in der PCR-Reaktion eingesetzt wurde, zerschnitten. Die PCR-Produkte mit dem neu veränderten Gen blieben dagegen in dem Reaktionsgemisch bestehen. Das durch die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase entstandene Poly-A am 3'-Ende der PCR-Produkte wurde mit Hilfe der Exonuklease Aktivität der *Pfu*-Polymerase wieder entfernt. Dazu wurden zu dem Reaktionsgemisch 2,5 U *Pfu*-Polymerase und 20 nmol dNTP's zugegeben und anschließend für 30 Minuten bei 72°C inkubiert. Es folgte die Ligation der glatten Enden, indem zu 10 µl des Ansatzes 1U T4-DNA Ligase und 1,2 µl Ligationspuffer (10x) zugegeben wurde. Für die nachfolgende Transformation in *E. coli* wurde 1-5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.2.3.5. DNA-Fragmentisolierung

DNA-Fragmente wurden aus einem präparativen Agarosegel mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit von PEQLAB nach Angaben des Herstellers isoliert.

Dabei wurde die DNA-Bande aus dem präparativen Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Agarose wurde mit dem gleichen Volumen Binde-Puffer versetzt und bei 55°C vollständig gelöst. Die DNA/Agaroselösung wurde auf eine HiBind[®]-Zentrifugensäule pipettiert. Nach der Zentrifugation (1 min, 10000 x g) wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde dreimal gewaschen, zuerst mit 300 µl Bindepuffer und danach zweimal mit 750 µl SPW-Waschpuffer. Die Säule wurde anschließend durch einminütiges Zentrifugieren bei 10000 x g vollständig getrocknet. Die in der Säule gebundene DNA wurde durch Zentrifugation (1 min, 10000 x g) mit 40 µl Elutionspuffer eluiert.

2.2.3.6. Zentrifugationsentsalzung

Die Zentrifugationsentsalzung diente als ausschlusschromatographische Reinigungsmethode zur Entfernung von Salzen, dNTPs, denaturierten Proteinen oder anderen niedermolekularen Bestandteilen aus DNA-haltigen Lösungen.

Als Säulen dienten 1,5 ml Eppendorfgefäße, deren Boden mit einer heißen Kanüle perforiert und anschließend mit 20 µl silikonisierten Glasperlen und 1,5 ml Sephadex G-20 (in wässriger Lösung) gefüllt worden waren. Zur Äquilibration wurde die Säule zentrifugiert (1 min, 10000 x g) und mit 100 µl sterilem Wasser gewaschen. Danach wurde die Probe auf die trockene Säule aufgetragen und durch Zentrifugation (2 min, 10000 x g) in ein neues Eppendorfgefäß eluiert.

2.2.3.7. DNA-Isolierung aus enzymatischen Reaktionen

Zur Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionsgemischen wurde das illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit von GE-Healthcare genutzt.

Dabei wurde die DNA-Probe mit 500 µl Binde-Puffer versetzt und auf eine GFX MicroSpinTM Säule gegeben. Nach Zentrifugation (1 min, 10000 x g) wurde der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend durch einminütiges Zentrifugieren bei 10000 x g vollständig getrocknet. Die Elution der in der Säule gebundenen DNA erfolgte nach Zugabe von 50 µl H₂O und einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch erneute Zentrifugation.

2.2.3.8. DNA-Fällung mit Ethanol

Die Aufkonzentrierung und Entsalzung DNA-haltiger Lösungen erfolgte mittels Ethanolfällung. Dazu wurde die DNA-Lösung mit einem Zehntel ihres Volumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung, und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und anschließend 30 Minuten bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 x g) und einem Waschschrift mit 70%-igem Ethanol erfolgte die Lyophilisierung der DNA unter Vakuum.

2.2.3.9. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für analytische Zwecke wurden üblicherweise 0,1-0,5 µg DNA in einem 15 µl Gesamtvolumen mit Restriktionsenzymen und den dazu passenden Puffern von Roche geschnitten. Dabei wurden jeweils ca. 2,5-5,0 U Restriktionsenzym eingesetzt und der Ansatz für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Präparative Restriktionsverdauungen wurden in einem 30 µl Ansatz mit 2-5 µg DNA und 10-15 U Restriktionsenzym durchgeführt. Dieser wurde ca. 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Spaltung der DNA wurden die Enzyme durch Zugabe von GEBS (¼ des Ansatzvolumens) inaktiviert und anhand einer Agarosegelelektrophorese analysiert bzw. aufgereinigt.

2.2.3.10. Phosphorylierung endständiger Nukleotide von DNA-Fragmenten

Für die Phosphorylierung der 5'-endständigen Nukleotide von Oligonukleotiden wurde ein Ansatz mit je 200 pM der Oligonukleotide, 10 U/µl Polynukleotidkinase, 1 mM ATP, und 10x Polynukleotidkinase-Puffer für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 95°C erhitzt.

2.2.3.11. Ligation

Für Ligationen wurden in 12 µl Gesamtvolumen 1,2 µl Ligationspuffer (10x) und 1 U T4-DNA-Ligase sowie das zu klonierende DNA-Fragment in einem vierfachen Überschuss zu der geschnittenen Vektor-DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die nachfolgende Transformation in *E. coli* wurde 1-5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.2.3.12. Ligation von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning™

Schwer zu klonierende PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning™-Kits mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor von Invitrogen ligiert. Dabei wird die Sequenz-unspezifische terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase genutzt. Diese hängt bei jeder Kettenverlängerung Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende eines PCR-Produkts an. Der linearisierte pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt einen überhängenden 3'-Desoxythymidin-Rest (T) und eine kovalent gebundene Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus, wodurch eine effektive Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor vermittelt wird.

Für die Ligation wurden 0,5 µl des pCR2.1-TOPO-Vektors mit 1,5 µl DNA-Fragment und 0,5 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) behutsam gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* TOP-10 Zellen.

2.2.3.13. DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, D) durchgeführt. Zur Sequenzierung des gewünschten DNA-Abschnittes wurden entweder Standardprimer (bei käuflichen Plasmiden) oder selbst gewählte Oligonukleotide eingesetzt.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Proteinmengenbestimmung nach Bradford [23]

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurden 100 µl der Probe (gegebenenfalls verdünnt in PBS) mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion der Probe gegen einen entsprechenden Blindwert bei 595 nm gemessen. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen aufgenommen.

2.2.4.2. Herstellung bakterieller Zellysate

Zur Herstellung von Lysaten wurden die Bakterien in PBS suspendiert und eine OD₅₅₀ von 10 eingestellt. Dabei wurde die Suspension abzentrifugiert (3200 x g) und die pelletierten Bakterien im entsprechenden Volumen SDS-Probenpuffer mit 5% Mercaptoethanol aufgenommen. Die Zellysate wurden 10 min bei 96°C aufgeköcht und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine können in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [116] durch das Anlegen eines elektrischen Feldes nach der Größe aufgetrennt werden und anschließend mit Hilfe von Antikörpern oder durch Färbung sichtbar gemacht werden.

Damit die Auftrennung ausschließlich nach der Größe erfolgt, werden die Proteine mit SDS, einem stark amphiphatischen Detergenz vorbehandelt. Dieses denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung.

Zur Auftrennung von Proteinen wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem Mini-Protean IIITM von Biorad benutzt. Standardmäßig wurden 10%-ige oder 6%-ige Trenngele und 5%-ige Sammelgele aus einer 30% Acrylamidstammllösung gegossen. Trenn- und Sammelgele wurden nach Sambrook *et al.* [187] angesetzt. In der Regel wurden 50 µg der in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteinproben aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte bei einer Spannung von 100-130 V für ca. 80 min. Das Gel wurde anschließend entweder mit Coomassie-Lösung gefärbt oder auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran geblottet.

2.2.4.4. Färbung von Proteinen mit Coomassie-Lösung

Nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen für 10-15 Minuten mit Coomassie-Lösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel so lange in Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteine deutlich blau sichtbar wurden.

2.2.4.5. Western Blot

2.2.4.5.1. Transfer der Proteine auf die Membran

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach Towbin *et al.* [215] im Trockenblotverfahren mit Hilfe einer Elektrobloßapparatur mit zwei Graphitelektroden auf eine PVDF- oder Nitrocellulosemembran übertragen.

Dazu wurden auf die Anode zwei dicke und zwei dünne in Western-Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Darauf wurde zuerst die Nitrocellulosemembran und anschließend das SDS-Trenngel gebettet. Um einen ungehinderten Stromfluss zu gewährleisten, wurden vorhandene Luftblasen vorsichtig entfernt. Den Kontakt zwischen dem Gel und der Kathode stellten zwei dünne und zwei dicke in Western-Transferpuffer getränkte Filterpapiere her. Der Proteintransfer erfolgte bei $1,25 \text{ mA/cm}^2$ für eine Stunde.

2.2.4.5.2. Detektion der Proteine mittels Antikörper

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF- bzw. Nitrocellulosemembran wurden die nicht besetzten Bindungsstellen auf der Membran für 30 min mit 5 ml TBS/3%BSA abgesättigt. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht rollend bei 4°C . Das Antiserum wurde je nach Titer in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:10000 in TBS/3%BSA zugegeben. Dreimaliges Waschen der Membran mit TBS/0,5%Tween20 für je 10 min entfernte nicht gebundenes Antiserum. Für die Kopplungsreaktion wurde entweder eine an Protein A gekoppelte alkalische Phosphatase (1:2000), oder eine an einen sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase (1:7000) in TBS zugegeben und eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/0,5%Tween20 erfolgte die Detektion der Proteine.

Bei Verwendung von an Protein A gekoppelter alkalischer Phosphatase wurde der Blot durch Schwenken in 10 ml Detektionslösung gefärbt, und die Reaktion anschließend in H_2O abgestoppt.

Schwach produzierte Proteine wurden mit einer an einen sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase und dem Western LightningTM-Detektionsreagenz von Perkin Elmer Life Science über Chemilumineszenz detektiert. Anhand der Chemilumineszenz der Proteinbanden wurde ein aufgelegter Röntgenfilm in einer lichtundurchlässigen Expositions-kammer belichtet. Anschließend wurde der Film entwickelt und die Proteinbanden wurden als schwarze Banden sichtbar.

2.2.4.6. Entfernung von Immunkomplexen von PVDF-Membranen

Peroxidase entwickelte Western Blot-Membranen können nach Entfernung der gebundenen Antikörper erneut zur Immundetektion eingesetzt werden.

Hiefür wurden die Western Blot-Membranen zunächst 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit H_2O gewaschen, um Reste der Detektionslösung zu entfernen. Zum Aufbrechen der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte eine 30-40 minütige Inkubation in 50 mM NaOH bei RT. Dadurch wurden die Antikörper von den immobilisierten Proteinen auf der Membran gelöst.

Anschließend wurden die PVDF-Membranen 5 min in H₂O gewaschen, und bei RT getrocknet. Die so behandelten Membranen können trocken über mehrere Monate gelagert werden. Durch erneutes Benetzen mit Methanol wird eine Wiederholung der Immundetektion möglich.

2.2.4.7. Membranpräparation

Das gesamte Zellmaterial von 4 konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflaschen wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 200 x g wurden die Zellen in 1,5 ml Saccharose-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 200 mM Saccharose) aufgenommen. Zusätzlich wurden die Protease-Inhibitoren PMSF (1 mM), Pepstatin (1 µM) und Leupeptin (1 µM) zugegeben. Die Zell-Lyse erfolgte mit Ultraschall. Nach 10 minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis wurden die Zell-Fragmente durch Zentrifugation bei 900 x g für 10 min (4°C) entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und für 75 min bei 45000 rpm (4°C) zentrifugiert (TLA100.3 Rotor, Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman). Das Sediment wurde in HSL-Puffer, versetzt mit Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF, 1 µM Pepstatin, 1 µM Leupeptin), resuspendiert. Über Nacht wurde die Präparation bei 4°C in einem Eppendorfgefäß rotierend gelagert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt.

2.2.4.8. Proteinpräzipitation mit magnetischen Kugeln

Die Präzipitation von VacA mit Integrin $\alpha_5\beta_1$ oder $\alpha_1\beta_1$ wurde mit Hilfe von *SiMAG-Carboxyl magnetic beads* von Chemicell durchgeführt.

Die Kopplung von aufgereinigtem Integrin $\alpha_5\beta_1$ oder $\alpha_1\beta_1$ (Chemicon) an die magnetischen Kugeln erfolgte über die Carbodiimide Methode. Hierfür wurde das Integrin, welches in einem Tris-Puffer vorlag, über Nacht gegen PBS mit 0,2% Triton dialysiert. 10 mg der *SiMAG-Carboxyl* Kugeln wurden zweimal mit MES-Puffer im Magnetfeld gewaschen. Danach wurden die Kugeln in 250 µl MES-Puffer mit 10 mg CMC (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimidmetho-p-toluensulfonat) resuspendiert. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden 50 µg des Integrins in 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Kugeln dreimal im Magnetfeld mit PBS gewaschen, in Blockierungspuffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Für die Proteinpräzipitation von VacA mit CD29 wurde 2 µg VacA säureaktiviert (siehe Säureaktivierung von VacA) und anschließend in 1 ml HSL-Puffer aufgenommen. 5 µl der mit Integrin gekoppelten magnetischen Kugeln wurden zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nach drei maligem Waschen im Magnetfeld mit HSL-Waschpuffer wurden die Kugeln mit den gekoppelten Proteinen in 5 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer und 10 minütigem Aufkochen der Probe wurden die Kugeln kurz abzentrifugiert und der Überstand für eine Protein-Auftrennung im SDS-Gel verwendet.

2.2.4.9. Immunpräzipitation

Zur Präzipitation von VacA mit der Integrin-Untereinheit CD29 wurden Membranpräparationen verschiedener Zelllinien verwendet.

Dazu wurden 150 µg der Membranen mit HSL-Puffer und den Protease Inhibitoren PMSF (1mM), Pepstatin (1 µM) und Leupeptin (1 µM) auf ein Endvolumen von 270 µl verdünnt. Nach 1 stündiger Inkubation bei 4°C wurde dem Ansatz säureaktiviertes VacA zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht in einem rotierenden Eppendorfgefäß. Nach 24 Stunden wurden 20 µl Protein G Agarose (Roche) und 180 µg Antikörper AB1952 (Chemicon) gegen die cytoplasmatische Domäne von CD29 zugegeben. Der Ansatz wurde 2 Stunden rotierend bei 4°C gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit HSL-Waschpuffer wurde der Überstand verworfen und die verbleibenden 20 µl Protein G Agarose in zwei 10 µl Aliquots aufgeteilt. In separaten Western Blots sollten sowohl VacA als auch CD29 detektiert werden. Hierfür wurde der VacA Ansatz mit SDS-Probenpuffer und 5% Mercaptoethanol, der CD29 Ansatz mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min gekocht und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt

2.2.4.10. Färbung von Oberflächenproteinen für die Durchflusszytometrie

Der Nachweis der Integrin-Untereinheiten CD18 und CD29 erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS). $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in 200 µl PBS verdünnt und in je eine Vertiefung einer 96-Napf-Platte gegeben. Es wurden jeweils Doppelansätze für die Färbung von CD18 bzw. CD29 und für die Negativkontrolle angesetzt. Zu jeweils einem der Ansätze wurden 2,5 µl eines Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen CD18 (PE labeled anti-human CD18, BD Pharmingen) oder 1 µl eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers gegen CD29 (FITC hamster anti rat CD29, BD Pharmingen) gegeben. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden sie mit PBS gewaschen und im

Durchflusszytometer analysiert. Es wurden standardmäßig 10000 Zellen gezählt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität.

2.2.4.11. Messung von Luciferase Aktivität

Die Expression des *luc*-Reportergens wurde durch die Messung der Luciferase-Aktivität von 50 µl einer Bakteriensuspension der OD₅₅₀=10 überprüft. Zunächst wurde den Bakterien die gleiche Menge Lyse-Puffer zugegeben und diese anschließend bis zur vollständigen Lyse bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Luciferin-Lösung wurde die Emission von Photonen im Luminometer gemessen (MicroLumat Plus LB 96V, Berthold).

2.2.4.12. Aufkonzentrierung von Bakterien-Kulturüberständen

Für *H. pylori*-Flüssigkulturen wurde das gesamte Zellmaterial einer dicht bewachsenen Platte abgenommen und in 40 ml Flüssigmedium mit Cholesterol (1:250, Gibco) über Nacht bei leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension auf 200 ml verdünnt und weitere zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2500 x g, 20 min, 4°C) und die Überstände durch einen Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) filtriert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden durch Versetzen mit gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung ausgefällt. Danach wurden sie durch Zentrifugation im SS34-Rotor (20 min, 20000 x g, 4°C) (Sorvall) sedimentiert und das erhaltene Präzipitat in 1 ml PBS aufgenommen. Zur Entfernung des Ammoniumsulfats aus der Probe wurde sie über Nacht gegen PBS dialysiert.

2.2.4.13. Anreicherung von VacA aus *H. pylori* Kulturüberständen

Die *H. pylori* Stämme 60190 und P76 wurden in Brucella-Medium mit Cholesterol (1:250; Gibco) unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO₂ / 85% N₂ / 5% O₂) bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (6000 rpm, 20 min, 4°C) und der Kulturüberstand sterilfiltriert. Durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung ((NH₄)₂SO₄ gesättigt) wurden die Proteine über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren präzipitiert. Im Anschluss wurden die gefällten Proteine bei 20000 x g für 30 min (4°C) sedimentiert, in 15-30 ml PBS resuspendiert und, um eine ausreichende Löslichkeit zu gewährleisten, über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die anschließende Gelfiltration wurde das Volumen mit einer Filtrationseinheit (Amicon Ultra Centrifugal Filter, 100 kDa Ausschlußgröße, Millipore) auf 4 ml eingengt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer Größe über Gelfiltration.

Es wurde eine Sephacryl S300 16/60-Säule verwendet, deren Auftrennungsvermögen zwischen 100-1000 kDa liegt. Für die Chromatographie wurde entweder eine HPLC oder FPLC Methode mit 100 mM NaCl, 50 mM NaPO₄ (pH 7,4) als Laufpuffer verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung der Proteine mit Coomassie-Lösung und Western Blot-Analyse auf den Grad der Anreicherung getestet. Das in den Fraktionen enthaltene VacA wurde mit einer Filtrationseinheit (100 kDa Ausschlußgröße) auf eine Proteinkonzentration von 0,5-1 mg/ml eingengt. Die Qualität der VacA-Anreicherung wurde durch Vakuolisierung von HeLa Zellen kontrolliert.

2.2.4.14. Säureaktivierung von VacA

Gereinigtes VacA wurde durch Zugabe des 0,2-fachem Ausgangsvolumens mit 0,3 M HCl angesäuert, für 18 min bei 37°C inkubiert und vor Verwendung mit dem gleichen Volumen an 0,3 M NaOH wieder neutralisiert. Diese sogenannte „Säureaktivierung“ wurde standardmäßig vor jedem Experiment durchgeführt. VacA wurde nach der Aktivierung auf Eis gelagert und unverzüglich eingesetzt.

2.2.4.15. Fluoreszenzmarkierung von VacA und Antikörpern

Angereichertes VacA wurde durch kovalente Bindung des Fluoreszenz-Farbstoffes Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) an primäre Aminogruppen markiert. Die Reaktion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

VacA wurde dafür mit PBS auf ~200 µg/ml verdünnt und der pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Na-Carbonat (Endkonzentration 0,1 M) auf pH ~8 eingestellt. Je Reaktion wurden 0,25 mg Alexa Fluor-Succinimidyl Esther, gelöst in 25 µl DMSO, zugegeben und im Dunkeln für 1,5 h bei Raumtemperatur rollend inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde durch Dialyse gegen 1 x PBS über Nacht (4°C) entfernt (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette cut off 30 kDa, ThermoScientific). Die Proteinkonzentration von Fluoreszenz-markiertem VacA (VacA-Alexa) erfolgte mittels Bradford-Proteinbestimmung. Der Markierungsgrad wurde nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt und lag durchschnittlich bei 15-20 mol Alexa Fluor pro mol VacA. Die Funktionalität von markiertem VacA wurde durch Vakuolisierung von HeLa Zellen bestimmt.

Monoklonale Antikörper wurden, wie für VacA beschrieben mit Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 555 markiert

2.2.4.16. Dot Blot - Analyse

Der Dot Blot-Versuch nach Walz [229] ermöglicht die Untersuchung verschiedener *H. pylori*-Stämme in Bezug auf ihr unterschiedliches Adhärenzverhalten an definierte Antigene, die punktförmig auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht werden.

Hierzu wurde Lactoferrin, Lewis^b-HSA und Laminin in einer Konzentration von 1-2 µg/µl auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht. Die Membran (2,5 x 2,5 cm²) wurde kurz in TBS-DB geschwenkt und anschließend 1,5 Stunden bei 4°C in 2,5 ml Absättigungspuffer-DB gelagert. Zur Markierung der Bakterien mit FITC wurde 1 ml der Bakteriensuspension einer OD₅₅₀ von 6 mit 10 µl FITC-Lösung (10 ng /ml in DMSO) für 30 min unter Lichtschutz inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien (7 min, 2500 x g) erfolgten drei Waschschrte mit PBS-DB. Die Bakterien wurden anschließend in 1 ml Absättigungspuffer-DB suspendiert und zu der vorbehandelten Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 4°C unter Lichtabschluss erfolgten drei Waschschrte mit je 7 ml Waschpuffer-DB. Danach wurden die Membranen getrocknet und das Bindungsmuster der FITC-markierten, adhärennten Bakterien mit dem Fluoreszenzscanner FLA3000 von Fujifilm dokumentiert.

2.2.5. Infektionsexperimente

2.2.5.1. Quantifizierung der VacA-induzierten Vakuolisierung

Die vakuolisierende Aktivität des Zytotoxins VacA wurde nach Cover *et al.* [35] bestimmt. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen mit säureaktiviertem VacA unterschiedlicher Konzentrationen für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluß wurde NH₄Cl in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben und die Ansätze für 0,5-1 Stunden inkubiert. Vakuolisierung wurde mittels Neutralrot-Färbung quantifiziert. Dazu wurden die Zellen zentrifugiert und mit 0,008% Neutralrot in entsprechendem Zellkulturmedium für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschrten mit je 1 ml PBS 0,5% BSA wurde das Neutralrot mit 70% Ethanol und 0,37% HCl aus den Zellen extrahiert und die Ansätze in eine 96-Napf-Platte übertragen. Das Neutralrot wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 534 nm (Referenz: 405 nm) quantifiziert (Tecan Sunrise).

2.2.5.2. Quantifizierung der VacA-Bindung an Zellen

Zur Quantifizierung der Bindung von VacA an verschiedene Zelllinien wurde Fluoreszenzmarkiertes VacA (VacA-Alexa488) verwendet.

Die Zellen wurden zunächst 2 mal in PBS gewaschen, ausgezählt und dann $2,5 \times 10^5$ Zellen in 200 μ l PBS in je eine Vertiefung einer 96-Napf-Platte gegeben. Gleichzeitig wurden 250 ng VacA-Alexa488 pro Ansatz säureaktiviert, anschließend zu den Zellen gegeben und gemischt. Es folgte eine 20 minütige Inkubation bei 4°C. Die Ansätze wurden mit PBS gewaschen und die Zellen mittels FACS analysiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität.

2.2.5.3. Quantifizierung der VacA-Aufnahme in Zellen

Zur Quantifizierung der Aufnahme von VacA in verschiedene Zelllinien wurde Fluoreszenzmarkiertes VacA (VacA-Alexa488) verwendet.

Die Zellen wurden mit PBS auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen pro 200 μ l eingestellt. Zu den Zellen wurde 500 ng säureaktiviertes VacA-Alexa488 gegeben und gemischt. Zunächst erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei 4°C, das überschüssige VacA wurde anschließend durch einen Waschschrift mit PBS aus der Probe entfernt, danach erfolgte eine Umstellung auf 37°C und 5 % CO₂ für 40 Minuten. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine weitere Aufnahme von VacA in die Zellen zu unterbinden. Es wurden je $2,5 \times 10^5$ Zellen in die Vertiefungen einer 96-Napf-Platte gegeben und zweimal mit PBS gewaschen. Zu je einem der Doppelansätze wurden 4 μ g eines anti-Alexa488 Antikörpers zugegeben. Dadurch wurde die Fluoreszenz der noch an der Oberfläche gebundenen VacA-Moleküle unterdrückt. Alle Ansätze wurden für weitere 20 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Proben wurden mittels FACS-Analyse untersucht. Für die Quantifizierung wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität verwendet.

2.2.6. Mikroskopie

2.2.6.1. Immunfluoreszenzfärbung mit *H. pylori*

Oberflächenproteine von *H. pylori* wurden anhand einer Immunfluoreszenzfärbung im Mikroskop sichtbar gemacht. Hierfür wurde 1 ml einer Bakteriensuspension der OD₅₅₀=0,02 in einer 24-Napf-Schale bei 2500 x g für 5 min auf ein Deckglas zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Deckglas dreimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Bakterien erfolgte mit 4% PFA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend

wurde das PFA durch zwei Waschschr tte mit PBS wieder entfernt. Es folgte eine Absättigung mit 10% FCS in PBS für 2 Stunden bei 37°C. Der Antikörper gegen das Oberflächenprotein wurde in entsprechender Verdünnung in 10% FCS/PBS zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 maligem Waschen mit PBS wurde für 45 min bei Raumtemperatur ein gegen die entsprechende Spezies des ersten Antikörpers gerichteter Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Es folgte ein Waschschr tt mit PBS. Das Deckglas wurde anschließend auf einen Objektträger in ein DAPI beinhaltendes Eindeckmedium (Vector Laboratories) gebettet. Bis zur Mikroskopie wurde das Präparat bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mittels eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Leica). Die Bilder wurden digital abgespeichert und mit den Softwarepaketen Adobe Photoshop und MetaMorph bearbeitet.

2.2.6.2. Co -Lokalisationsexperimente von VacA und CD29

Um eine Lokalisation der zwei Proteine VacA und CD29 in räumlicher Nähe mikroskopisch darzustellen, wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierfür wurde eine 24-Napf-Platte mit runden Deckgläschen bestückt, und diese für 20 min bei Raumtemperatur mit Poly-L-Lysin (Sigma)  berschichtet. In der gleichen Zeit wurden verschiedene Zelllinien mit jeweils 5×10^5 Zellen in 0,5 ml PBS in die Vertiefungen einer weiteren 24-Napf-Platte verteilt. Alexa488 gekoppeltes VacA wurde säureaktiviert, jeweils 0,5 μg zu den Ansätzen gegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Temperatur für alle weiteren Arbeiten auf 4°C herabgesetzt. Die Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie auf die Deckgläschen überführt und bei 145 x g für 5 min zentrifugiert. Den Ansätzen wurde 10% PFA zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die PFA Konzentration durch Zugabe des doppelten Volumens an PBS herabgesetzt und die Präparate bis zur Mikroskopie im Kühlschrank gelagert. Vor der Mikroskopie wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und AIIB2 [233], ein Antikörper gegen CD29, in der Verdünnung 1/100 zugegeben. Es folgte eine einst ndige Inkubation bei 4°C und ein anschließender Waschschr tt mit PBS. Ein gegen die Spezies des ersten Antikörpers gerichteter Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper (Alexa fluor 555 goat anti rat IgG, Invitrogen) in der Verdünnung 1/1000 wurde für eine weitere Stunde bei 4°C auf den Deckglasern inkubiert. Anschließend wurde das Präparat erneut gewaschen und mit FluoroprepTM auf einem Objektträger fixiert. Die Mikroskopie wurde an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica SP5) durchgeführt. Zur Anregung der

Fluorophore wurden Laser der Wellenlänge 488 nm und 561 nm verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels LAS AF (Leica) und Adobe Photoshop.

2.2.7. Statistische Auswertung

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student t-Test oder Mann-Whitney U-Test bestimmt und ist für das entsprechende Experiment angegeben. Die Werte sind in beiden Fällen normalverteilt und zweiteilig.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines Shuttle-Vektor Systems

Genetische Arbeiten mit *H. pylori* gestalten sich oft schwierig, wenn es darum geht, verschiedene Gene in *E. coli* zu klonieren. Denn viele der *H. pylori* Genprodukte zeigen bei ihrer Produktion in *E. coli* eine extreme Toxizität für diesen Organismus. Das gilt vor allem für die äußeren Membranproteine von *H. pylori*, welche daher nicht mit den herkömmlichen *E. coli* / *H. pylori* Shuttle-Vektor Systemen kloniert und komplementiert werden können [66]. Dadurch erweisen sich die Möglichkeiten zur Klonierung von *H. pylori* DNA in *E. coli* als begrenzt. Deshalb sollte ein Shuttle-Vektor konstruiert werden, der die Klonierung von *H. pylori*-Genen in *E. coli* erlaubt, ohne in diesem heterologen System exprimiert zu werden.

3.1.1. Vorangegangene Arbeiten

Im Zuge der Anfertigung der Diplomarbeit erfolgte die Konstruktion eines Shuttle-Vektors auf der Grundlage des bereits existierenden *H. pylori* / *E. coli* Shuttle-Vektors pHel3 [94]. Ausgangspunkt für die Arbeiten war das Plasmid pSO97, welches die Gene *alpA* und *alpB* von *H. pylori* im Vektor pHel3 enthält. In der Promotorregion dieser beiden, in einem Operon organisierten Gene war keine Promotorkonsensussequenz gefunden worden [159], was vermuten ließ, dass es sich bei dem Promotor eventuell um einen *H. pylori*-spezifischen Promotor handelt. Die Überprüfung der AlpA Produktion der Stämme DH5 α [pSO97] und P1 Δ *alpAB*[pSO97] zeigte, dass der *E. coli* Stamm DH5 α [pSO97] kein AlpA produziert, der *H. pylori* Stamm P1 Δ *alpAB*[pSO97] hingegen schon. Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, dass der *alpA*-Promotor des Plasmids pSO97 nur spezifisch in *H. pylori*, nicht jedoch in *E. coli* aktiv ist.

Durch eine inverse PCR-Reaktion wurden die Gene *alpA* und *alpB* aus dem Plasmid eliminiert, wobei die stromaufwärts-Region von *alpA* mit dem *H. pylori*-spezifischen *alpA*-Promotor im Vektor verblieb. Anschließend wurde ein Oligolinker mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme hinter den *alpA* Promotor eingebaut. Das daraus resultierende Plasmid pIB6 (Abb. 7) wurde mit Hilfe des Reportergens *gfp* (pIB3) auf seine Funktion überprüft. Im Westernblot war mit einem GFP spezifischen-Antikörper zu erkennen, dass von *E. coli* β 2150[pIB3] kein GFP produziert wird, von *H. pylori* P76[pIB3] hingegen schon. Anhand von Fluoreszenz-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass das in *H. pylori* produzierte GFP in funktioneller Form vorliegt, wohingegen bei dem *E. coli* Stamm keine Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Weiterhin gelang die funktionelle Komplementation des äußeren Membranproteins BabA mit Hilfe des Shuttle-Vektors. Das *babA*-Gen wurde hinter den *alpA*-Promotor ligiert und anschließend die Produktion des Proteins in *E. coli* und *H. pylori* im Westernblot überprüft. Nachfolgend wurde die funktionelle Komplementation der *H. pylori* Stämme P1 und P76 mit einem funktionellen *babA*-Gen aus J99 nachgewiesen. Hierfür wurde die Bindung des Membranproteins an das Blutgruppenantigen Lewis^b überprüft. Die mit dem Shuttle-Vektor komplementierten Stämme P1(*babA*)[pIB4] und P76[pIB4] binden über BabA an Lewis^b. Es wurde somit gezeigt, dass mit Hilfe des neu konstruierten Shuttle-Vektors äußere Membranproteine von *H. pylori* funktionell komplementiert werden können.

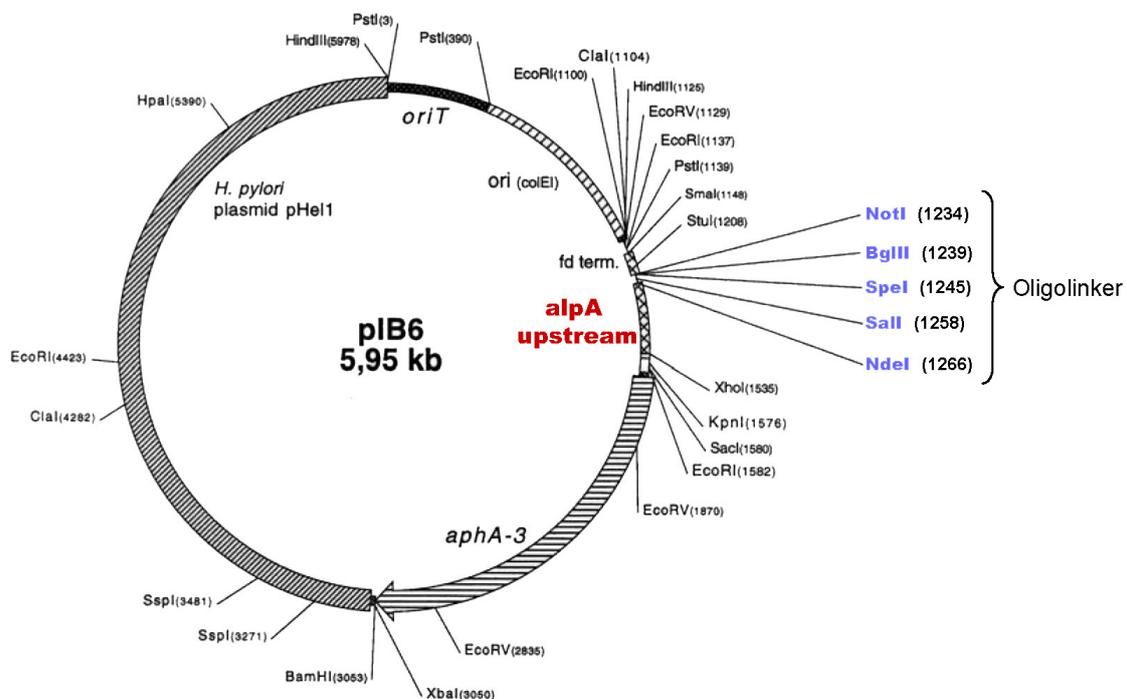


Abb. 7: Shuttle-Vektor pIB6

Der Shuttle- Vektor pIB6 wurde auf Basis des Plasmids pHel3 konstruiert. Er enthält einen Anteil eines kryptischen *H. pylori*-Plasmids, eine Kanamycin-Resistenz, einen *oriT* für die Konjugation, einen *ori*_(colEI) als Replikationsursprung in *E. coli*, die stromaufwärts-Region und den Promotor der *H. pylori*-Gene *alpA* und *alpB* und einen Oligolinker mit den Restriktionssequenzen für die Enzyme *NdeI*, *SalI*, *SpeI*, *BglII* und *NotI*.

3.1.2. Beschreibung des Shuttle-Vektors

Da sich der Shuttle-Vektor für genetische Manipulationen von *H. pylori* hervorragend eignet, sollte er weiter charakterisiert und beschrieben werden.

3.1.2.1. Sequenzierung

Der Shuttle Vektor wurde über die zwei Oligonukleotide IB32 (bindet in *ori*_(colEI) Region des Vektors) und IB33 (bindet im *aphA-3* Gen des Vektors) sequenziert. Der Vergleich der *alpA*-Promotorregion des Shuttle-Vektors mit der Ursprungssequenz von *H. pylori* P1 anhand des Programms ClustalW zeigte nur wenige Veränderungen, die sich im Verlauf der Klonierungsarbeiten ereignet hatten (Abb. 8). Insgesamt kam es zum Verlust einer Base und zum Austausch zweier Basen. Diese Veränderungen scheinen allerdings keinen Einfluss auf die Eigenschaften des Promotors in *H. pylori* zu haben. Im Bereich des Transkriptionsstarts (+1) und der Polymerase Erkennungssequenz (-10 Box) ist die Sequenzfolge im Vergleich zur P1 Ursprungssequenz erhalten geblieben. Es kann keine Konsensus-Sequenz stromaufwärts des Starts der mRNA erkannt werden, was typisch für verschiedene virulenz-assoziierte Gene in *H. pylori* ist [30,159,189]. Die stromaufwärts-Region ist sehr AT reich und könnte an der Regulierung des Promotors beteiligt sein.

		XhoI	
pIB6	<i>alpA</i> -upstream	CTCGAGCCCCAAAAATTTAAGGCTAATCCCTATGAAATCCCGTTTTTTTTTTTT-GTA	59
P1	<i>alpA</i> -upstream	TAAAAACCCCAAAAAATTTAAGGCTAAACCCCTATGAAATCCCGTTTTTTTTTTTTTTGTA	60
		* *****	***
pIB6	<i>alpA</i> -upstream	AAAAACGCTCCAATTGCTGTAACCTTTATTCCTTGATAAGGGGTTTTTAAGGGGATTTTT	119
P1	<i>alpA</i> -upstream	AAAAACGCTCCAATTGCTGTAACCTTTATTCCTTGATAAGGGGTTTTTAAGGGGATTTTT	120
		*****	*****
		-10 Box +1	
pIB6	<i>alpA</i> -upstream	AAGGTTAGTTTAATTTTCATTATGTGAAAATATCACAAATTACATCTAACAATTCGTATTA	179
P1	<i>alpA</i> -upstream	AAGGTTAGTTTAATTTTCATTATGTGAAAATATCACAAATTACATCTAACAATTCGTATTA	180
		*****	*****
pIB6	<i>alpA</i> -upstream	CTAACATTATTTACAGCTCTGATGTAATTTACAAGCTCTGATGTAACCTAAATCCCAA	239
P1	<i>alpA</i> -upstream	CTAACATTATTTACAGCTCTGATGTAATTTACAAGCTCTGATGTAACCTAAATCCCAA	240
		*****	*****
		NotI SalI SpeI	
pIB6	<i>alpA</i> -upstream	TTAATCTCAATCAAGGAGCATCCCATTGATAAGGAAACATATGTCGACATTGGTAACT	299
P1	<i>alpA</i> -upstream	TTAATCTCAATCAAGGAGCATCCCATTGATAAGGAAATATG--- alpA ---	284
		*****	***
		BglII NdeI	
pIB6	<i>alpA</i> -upstream	AGTAGATCTGCGGCCGC	316
P1	<i>alpA</i> -upstream	→	

Abb. 8: Sequenzvergleich der *alpA*-Promotorregion von pIB6 und P1wt

Die *alpA* stromaufwärts-Regionen von pIB6 und P1 wurden mit Hilfe des Programms ClustalW verglichen. Es offenbaren sich 2 Nukleotid-Austausche und eine Nukleotid-Deletion zwischen den zwei Versionen. Dieser Promotor-Region folgt im P1 Chromosom das *alpA*-Gen, in der des pIB6 Plasmids ein Oligolinker für Klonierungen.

Promotoranalyse durch Expression eines Reportergens

Für die Überprüfung und die Quantifizierung der Funktion des neuen Shuttle-Vektors mit dem *H. pylori*-spezifischen Promotor wurde das Reportergen *luc* verwendet. Um Promotoranalysen durchzuführen, eignet sich das Luciferase System besonders gut, da es sehr sensitiv ist. Luciferasen können zusammen mit Luciferinen zum hochspezifischen und für minimale Mengen geeigneten qualitativen und quantitativen Nachweis der Aktivität von Promotoren genutzt werden. Dabei reagieren die Luciferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen. Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Lumineszenz. Außerdem hat das Reportergen *luc* den Vorteil, dass die Produktion des Proteins im heterologen System nicht toxisch für diesen Organismus ist.

Das *luc*-Gen wurde über PCR von dem Plasmid pKP71 mit den Primern IB65 und IB66 amplifiziert. Nach der Isolierung des Fragments aus einem Agarose-Gel wurde es mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *NotI* geschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pIB6 hinter den *alpA*-Promotor ligiert. Das daraus entstandene Plasmid pIB39 (Abb. 9) wurde in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach Isolierung des Plasmids aus DH5 α und der Überprüfung der Klonierung durch entsprechende Restriktionsanalysen wurde es in den DAP-auxotrophen *E. coli* Stamm β 2150 transformiert und in *H. pylori* P76 konjugiert. Die Reisolierung des Plasmids aus P76[pIB39] zeigte, dass die Konjugation erfolgreich war.

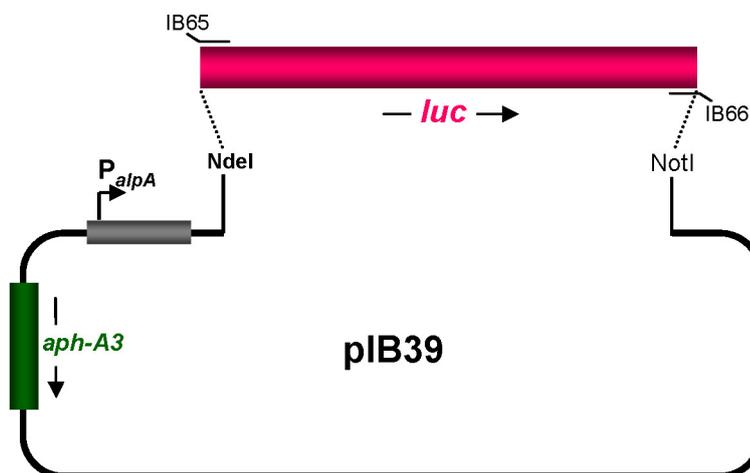


Abb. 9: Plasmid pIB39

Das Reportergen *luc* wurde mit den Primern IB65 und IB66 aus dem Plasmid pKP71 amplifiziert. Das Gen wurde über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NdeI* und *NotI*, welche in IB65 bzw. IB66 enthalten sind, in den Shuttle-Vektor pIB6 hinter den *alpA*-Promotor kloniert.

Die Aktivität des *alpA*-Promotors wurde anhand der Messung der Luciferase Aktivität überprüft. Hierzu wurden 50 μ l einer Bakteriensuspension ($OD_{550}=10$) lysiert und anschließend mit Luciferin-Lösung versetzt. Das Maß der Lumineszenz wurde quantitativ in einem Lumineszenz-Messgerät (Berthold) detektiert (Abb. 10).

Der Vergleich der durch das Plasmid pIB39 hervorgerufenen Luciferase Aktivität zeigt deutlich, dass der *alpA*-Promotor in *H. pylori* eine weitaus stärkere Expression des Reportergens als in *E. coli* bewirkt. Dabei ist zu beachten, dass in *H. pylori* jeweils nur 10-15 Kopien des Shuttle-Plasmids in einer Bakterienzelle vorliegen, in *E. coli* hingegen induziert der Replikationsursprung *ori*_(colEI) eine Kopienzahl von 300-500 Plasmiden pro Zelle. Setzt man diese Plasmid-Mengen ins Verhältnis zu der Luciferaseproduktion, folgt daraus eine etwa 250x starke Produktion des Proteins in *H. pylori* als in *E. coli*. In *E. coli* ist der *alpA*-Promotor nahezu stillgelegt. Er besitzt allerdings immer noch eine, wenn auch sehr geringe, Restaktivität.

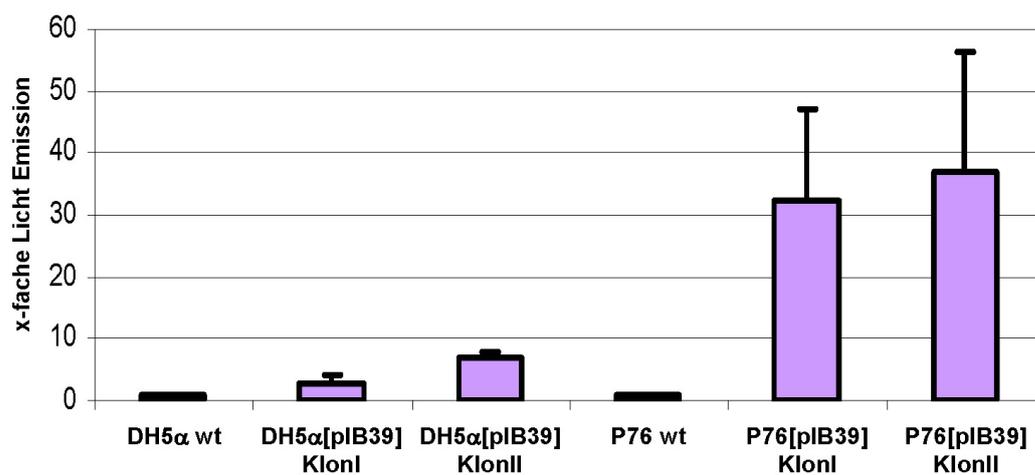


Abb. 10: Messung der Luciferase Aktivität

Das Zellmaterial einer Bakteriensuspension (50 μ l, $OD_{550}=10$) der *E. coli* Stämme DH5 α wt, DH5 α [pIB39] KlonI und KlonII und der *H. pylori* Stämme P76 wt, P76[pIB39] KlonI und KlonII wurde in jeweils 50 μ l Lysepuffer lysiert. Nach Zugabe von 50 μ l Luciferin-Lösung wurde die Luciferase-Aktivität quantifiziert. Die Werte der Wildtypstämme wurden für die jeweiligen Spezies als 1-fach gesetzt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2. Charakterisierung der Lewis^b-Binderegion von BabA

Das äußere Membranprotein BabA von *H. pylori* ermöglicht die Bindung des Bakteriums an das menschliche Mageneithel und stellt somit einen wichtigen Virulenzfaktor dar [102]. Dabei bindet das Protein an das Blutgruppenantigen Lewis^b, welches bei Menschen mit einem positiven Sekretor-Status das dominierende Antigen auf Mageneithelzellen und dem Mukus darstellt [152]. Um diese Interaktion genauer zu verstehen, sollte die Binderegion des BabA-Proteins für Lewis^b identifiziert werden.

3.2.1. Eingrenzung der Binderegion in Vorarbeiten

In Vorarbeiten von Kirstin Engel wurde die BabA-Bindungsdomäne durch einen AIDA Autodisplay-Mechanismus eingegrenzt. Zu diesem Zweck wurden verschieden lange BabA-Fragmente mit dem Autotransporterprotein AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*) von *E. coli* fusioniert. Die BabA-Fragmente reichten jeweils vom N-Terminus des Proteins unterschiedlich weit in die variable Mittelregion (Abb. 11a). Die daraus resultierenden *E. coli* Stämme wurden der BabA-Fragmentgröße nach P1920, P1921, P1922, P1923 und P1924 genannt. Nachdem die Präsentation der Hybridproteine mit den verschiedenen BabA-Fragmenten an der Bakterienoberfläche von *E. coli* mittels Immunfluoreszenz überprüft worden war, wurde deren Bindungseigenschaft an Lewis^b getestet. Dies erfolgte mittels Dot Blot - Analyse. Hierfür wurden Lewis^b-HSA Konjugate auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft. Anschließend wurden diese mit FITC-markierten Bakterien überschichtet, eine Stunde inkubiert und gewaschen. Die Bakterien, welche Lewis^b gebunden hatten, wurden in einem Fluoreszenzscanner sichtbar gemacht. Wie in Abb. 11b zu erkennen ist, waren nur die BabA-Fragmente der *E. coli* Stämme P1922 und P1923 in der Lage, an Lewis^b zu binden. Das BabA-Fragment des Stamms P1922 induziert dabei nur eine sehr schwache Bindung an Lewis^b. Das 342 Aminosäuren lange BabA-Fragment des Stamms P1923 hingegen zeigt eine sehr starke Lewis^b-Bindung.

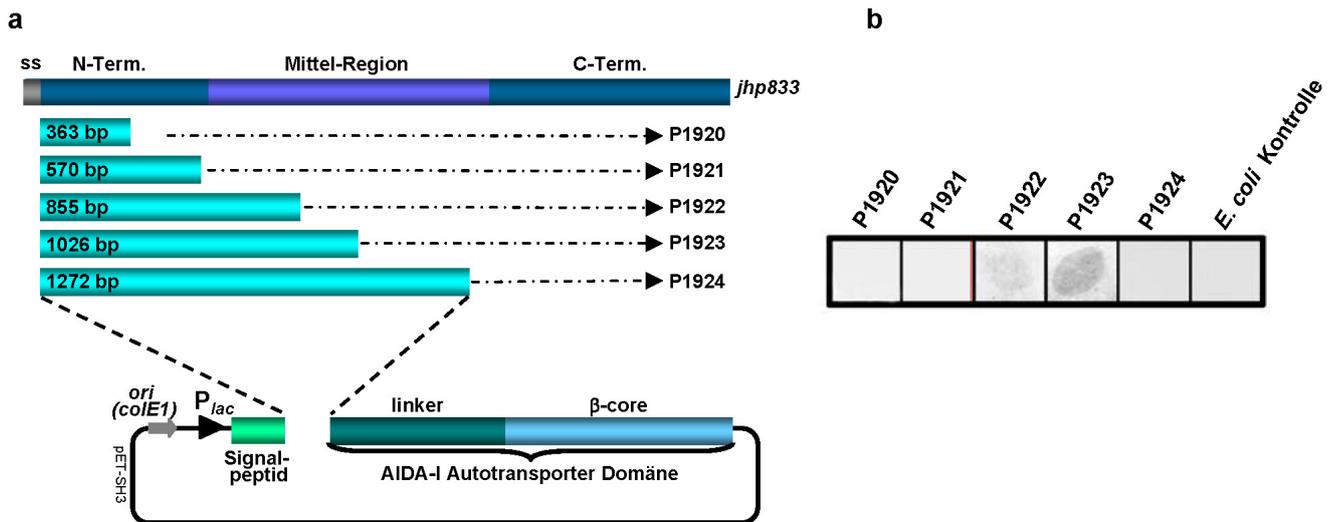


Abb. 11a: Fusion verschiedener *babA*-Fragmente mit *aida*

Fünf verschieden lange 5' *babA*-Fragmente von *jhp833* aus dem *H. pylori* Stamm J99 wurden amplifiziert und in den Vektor pET-SH3 kloniert. Dieser Vektor verfügt über einen *lac*-Promotor, ein Signalpeptid der Untereinheit B des Cholera-toxins und eine AIDA-I Autotransporterdomäne, welche aus einer *linker*-Region und einem β -core besteht. Die nach der Transformation der Konstrukte resultierenden *E. coli* Stämme wurden P1920, P1921, P1922, P1923 und P1924 benannt.

Abb. 11b: Adhäsion der *E. coli* Mutanten an Lewis^b

Auf eine Nitrozellulosemembran wurden je 4 μ g Lewis^b-Antigen aufgetragen. Die Membran wurde mit 1 ml einer FITC-markierten Bakteriensuspension der $OD_{550}=6$ für 1 Stunde inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Bakterien mittels eines Fluoreszenzscanners.

Daraus lässt sich ableiten, dass die Lewis^b-Binderegion des BabA Proteins in der Region zwischen den Aminosäuren 21 und 362 des Proteins lokalisiert sein muss. Des Weiteren können durch den Vergleich der induzierten Bindeintensitäten der BabA-Fragmente von P1923 und P1924 weitere Rückschlüsse auf die Binderegion gezogen werden. In Abb. 12 ist ein BabA Aminosäure-Sequenzvergleich der *H. pylori* Stämme J99, 26659 und P1 zu sehen. Er schließt die variable Mittel-Region des BabA-Proteins von Aminosäure 218 bis 407 mit ein. Das BabA-Fragment des Stamms P1922 reicht bis zur Aminosäureposition 285, jenes des Stamms P1923 bis zur Position 342. Wie in Abb. 11b zu erkennen ist, wird durch die Verlängerung des BabA-Fragments von AS 285 nach AS 342 eine auffällige Verstärkung der Lewis^b-Bindung hervorgerufen. Diese 57 Aminosäuren lange Region war deshalb für die Analyse der BabA-Binderegion besonders interessant und wurde als Grundlage für die folgende Identifikation verwendet.

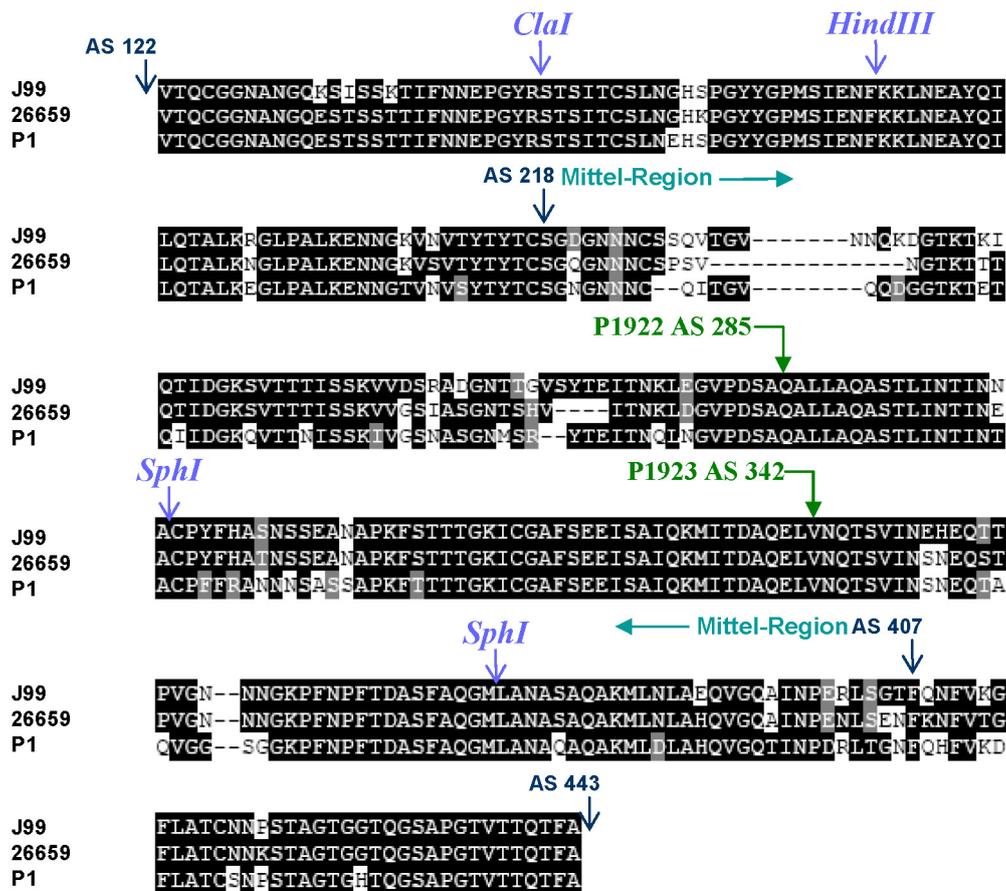


Abb. 12: Sequenzvergleich verschiedener BabA-Proteine

Teilbereiche von BabA-Proteinen der *H. pylori* Stämme J99, 26659 und P1 wurden verglichen. Die variable Mittel-Region des Proteins reicht von Aminosäure 218 bis 407. An den Aminosäure-Positionen 285 und 342 sind die jeweiligen C-terminalen Enden der BabA-Fragmente aus den *E. coli* Stämmen P1922 und P1923, welche die entsprechenden BabA-AIDA Fusionsproteine produzieren, eingezeichnet. Die Positionen der Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Clal*, *HindIII* und *SphI* wurden entsprechend der Nukleotidsequenz der *babA*-Gene eingefügt.

3.2.2. Vergleich zweier *H. pylori* Stämme hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften und *babA* Sequenzen

Unter den *H. pylori* Stämmen, die BabA produzieren, gibt es gravierende Unterschiede in deren Fähigkeit, Lewis^b zu binden [92]. So lässt sich unter anderem bei dem Stamm P1 ein Ausbleiben der Lewis^b-Bindung trotz BabA-Produktion beobachten (Abb. 13). Dieses BabA-Protein wird deshalb als „inaktiv“ beschrieben, im Gegensatz zu dem BabA-Protein von J99, welches „aktiv“ ist und Adhärenz an Lewis^b vermittelt.

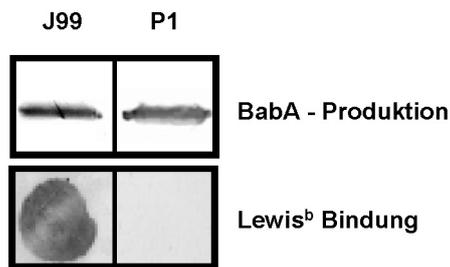


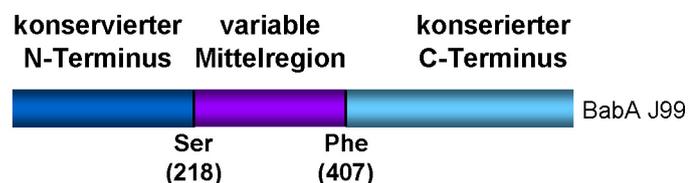
Abb. 13: Produktion und Bindeverhalten des BabA-Proteins der *H. pylori* Stämme J99 und P1

Im Western Blot kann die Produktion des BabA Proteins bei den *H. pylori* Stämme J99 und P1 mittels des Antiserums AK277 nachgewiesen werden. Eine Bindung des Bakteriums an Lewis^b-HSA Glycokonjugat im Zuge einer Dot Blot-Analyse ist allerdings nur mit dem Stamm J99 möglich. Der Stamm P1 bindet trotz BabA Produktion nicht an Lewis^b.

Vergleichende Sequenzanalysen der BabA-Proteine von P1 und J99 zeigten große Homologien der Proteine untereinander, welche in der C-terminalen Hälfte der Proteine sehr stark ausgeprägt waren. Abweichungen traten vornehmlich in einem daraufhin als variable Mittelregion bezeichneten Bereich auf, der sich an den weitgehend konservierten N-Terminus anschließt (Abb. 14).

Abb. 14: Homologien der BabA-Proteine von J99 und P1

Schematisch vergleichende Darstellung der BabA-Proteine von J99 und P1. Zwischen einem konservierten N- und C-Terminus liegt eine variable Mittelregion.



Wie im vorherigen Absatz beschrieben, lassen die unterschiedlichen Binde-Eigenschaften verschieden langer BabA-Fragmente auf eine Lokalisation der Lewis^b-Bindungsdomäne in der variablen Mittelregion des BabA-Adhäsins schließen, weshalb diese in den näheren Fokus weiterer Sequenzanalysen rückte. In Abb. 15 ist der Abgleich der BabA Mittelregionen der Stämme J99 und P1 zu sehen. In dieser Region weist das P1 BabA Protein 5 Aminosäuren weniger auf als jenes von J99. Außerdem unterscheiden sich die beiden Proteine teilweise relativ stark in ihrer Aminosäuresequenz. Diese Sequenzabweichungen zwischen einem „aktiven“ und einem „inaktiven“ BabA-Protein sollten im Folgenden für die Lokalisation der Lewis^b-Binderegion herangezogen werden.

<i>jhp0833</i>	QILQ TALKRGLPALKENNGKVNVTYTYTCSG DGN NNCSSQVTGVNNQKDGTKTKIQTIDG	240
<i>babA P1</i>	QILQ TALKEGLPALKENNGTVNVSYTYTCSGNGN NNC--QITGVQ-QDGGTKTETQIIDG	237
	*****.*****.***:*****:***** *:*:* :*..*****: * * * *	
<i>jhp0833</i>	KSVTTT ISSKV VDSRADGNTTGVSYTEITNKLEGV PDSAQALLAQASTLINTINNACPYF	300
<i>babA P1</i>	KQVTTNISSKIVGSNAGNMS--RYTEITNQLNGVPDSAQALLAQASTLINTINTACPF	295
	*.***.***:*.*.*.* : *****:*:*:*****.***:*	
<i>jhp0833</i>	HASNSSEANAPKFSTTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINEHEQTPVGN	360
<i>babA P1</i>	RANSSASSAPKFTTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINSNEQTAQVGG	355
	:*.*.* :.***:*****.***:*****.***:***: *..	
<i>jhp0833</i>	NGKPFNPF TDASFAQGLANASQAQAKMLNLAEQVQAINPERLSGTFQNFVKGFLATC	420
<i>babA P1</i>	GGKPFNPF TDASFAQGLANAQAQAKMLDLAHQVGTINPDRLTGNFQHFVKDFLATCS	415
	.*****.*****.***:***:***:***: *.*:*:*.*.*****.*	

Abb. 15: Sequenzvergleich der BabA Mittelregionen von J99 und P1

Die Aminosäuresequenzen der BabA Mittelregionen von AS 218 bis 407 (*jhp0833*) der *H. pylori* Stämme J99 und P1 wurden mit Hilfe des Programms ClustalW abgeglichen. Innerhalb dieser Region befinden sich auf DNA-Ebene zwei Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *SphI*.

3.2.3. Konstruktion eines chimären BabA Fusionsproteins

Um die Bindungsregion von BabA innerhalb der Mittelregion lokalisieren zu können, sollte das unterschiedliche Bindungsverhalten verschiedener BabA-Proteine ausgenutzt werden. Dabei lag das Hauptaugenmerk vorerst auf den Proteinen der *H. pylori* Stämme J99 und P1. P1 produziert ein sogenanntes „inaktives“ BabA-Protein, wohingegen J99 ein voll funktionsfähiges Adhäsins auf seiner Oberfläche präsentiert. Die Konstruktion eines chimären Fusionsproteins aus beiden *H. pylori* Stämmen sollte Aufschluss darüber geben, welcher Teil des Proteins für die Lewis^b-Bindung verantwortlich ist.

3.2.3.1. Insertion eines *H. pylori* P1 BabA-Fragments in *H. pylori* J99 BabA

Betrachtet man den Abgleich der BabA Sequenzen aus Abb. 15 bieten sich die zwei natürlich vorliegenden *SphI* Erkennungssequenzen für eine Klonierung an.

Hierfür wurde zunächst das J99 *babA*-Gen aus dem Vektor pIB4, bei dem es sich um den Shuttle-Vektor pIB6 mit dem J99 *babA*-Gen handelt, mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* und *NotI* zusammen mit *alpA*-Promotor herausgeschnitten und in den Klonierungsvektor pBlueskriptSK eingefügt. Das neu entstandene Plasmid wurde pIB25 genannt. Dieses, sowie das Plasmid pSO209, welches einen Teil des P1 *babA*-Gens enthält, wurden mit dem Restriktionsenzym *SphI* geschnitten. Dadurch fiel aus dem J99 *babA*-Gen ein 247 Basenpaar langes Fragment heraus. Der Vektor wurde dephosphoryliert, um eine Religation über die zwei *SphI* Schnittstellen zu verhindern. Gleichzeitig wurde das 247 Basenpaar-Fragment aus dem P1 *babA*-Gen über ein Agarose-Gel aufgereinigt und daraus extrahiert. Es folgte die Ligation der *babA*-Fragmente von J99 und P1. Das resultierende Plasmid pIB26 wurde in

E. coli transformiert und mittels PCR mit den Primern IB9 und IB35 auf die Ausrichtung des P1 *SphI*-Fragments hin untersucht. Ein Klon, bei dem das Fragment in Leserichtung eingebaut worden war, wurde zusätzlich mittels Sequenzierung auf die vollständige Richtigkeit der eingefügten Sequenz überprüft. Weiterhin wurde das chimäre *babA*-Gen über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NdeI* und *NotI* aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten und in den Shuttle-Vektor pIB6 übertragen (Abb. 16). Das resultierende Plasmid pIB28 wurde mittels Transformation in DH5 α übertragen, re-isoliert und erneut überprüft. Das Plasmid wurde daraufhin in den DAP-auxotrophen *E. coli* Stamm β 2150 transformiert und in die *H. pylori* Mutante P1(*babA*) konjugiert.

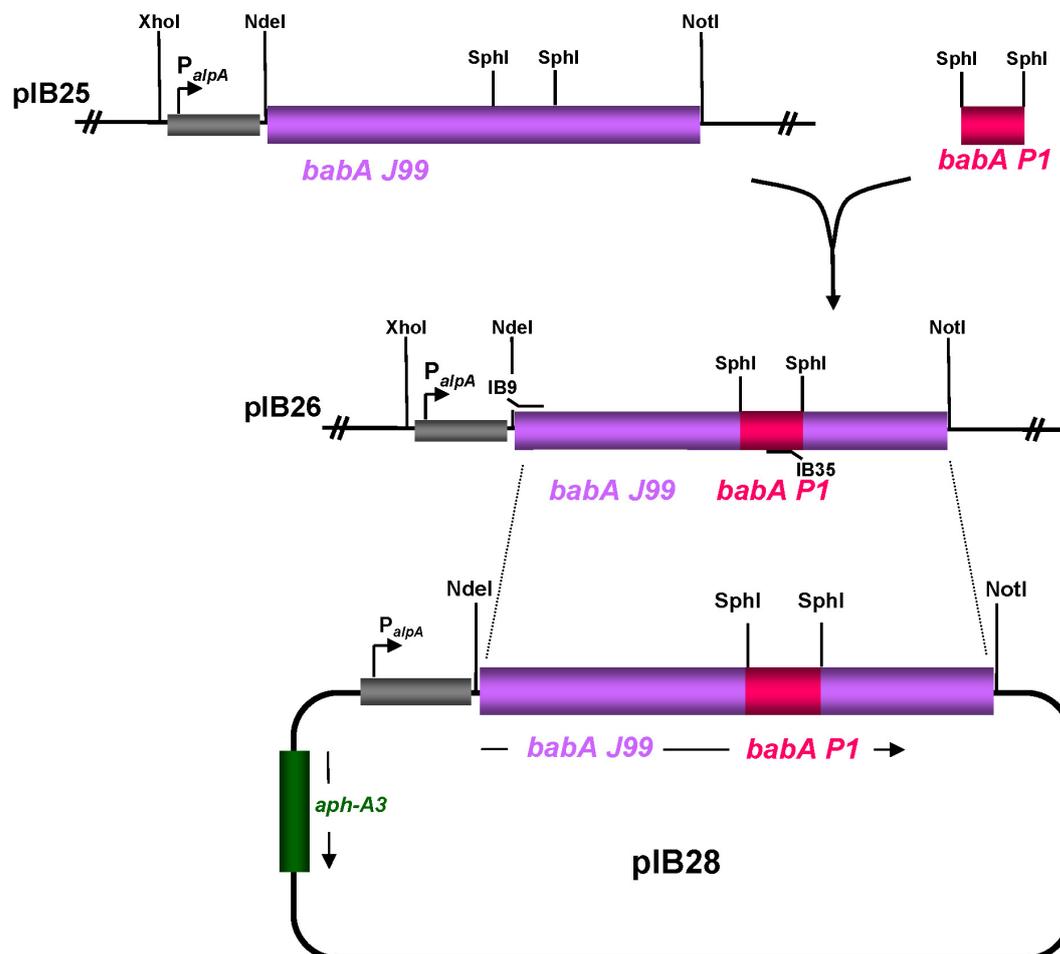


Abb. 16: Erstellung des Plasmids pIB28 - Klonierungsschema eines chimären *babA*-Gen

Das funktionelle *babA*-Gen des *H. pylori*-Stamms J99 aus dem Plasmid pIB4 wurde über die Schnittstellen *XhoI* und *NotI* in das entsprechend geschnittene Plasmid pBluescriptSK überführt (pIB25). Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym *SphI* geschnitten und anschließend mit einem ebenfalls mit *SphI* geschnittenen Fragment des nicht Lewis^b bindenden *babA*-Gens von P1 ligiert (pIB26). Die Ligation wurde mit dem Primerpaar IB9 und IB35 durch eine PCR überprüft. Das chimäre *babA*-Gen wurde anschließend über die Schnittstellen für *NdeI* und *NotI* in den entsprechend geschnittenen *H. pylori* Shuttle-Vektor pIB6 hinter den *alpA*-Promotor kloniert.

3.2.3.2. Produktion des chimären BabA Fusionsproteins

Die Produktion des chimären BabA-Proteins wurde zunächst im Western Blot mit Hilfe eines BabA-spezifischen Antikörpers (AK277) untersucht (Abb. 17). In *H. pylori* P1 wird ein nicht Lewis^b bindendes BabA produziert, welches im Western-Blot detektiert wird. Es ist zu erkennen, dass die Mutante P1(*babA*) hingegen kein BabA mehr produziert. Die komplementierten P1(*babA*)[pIB28] Klone zeigen eine deutliche BabA-Produktion. Dabei handelt es sich um das chimäre Fusionsprotein aus den BabA-Proteinen der zwei *H. pylori* Stämme P1 und J99. Das Fusionsprotein wird im gleichen Umfang produziert wie das Wildtyp-BabA von P1.

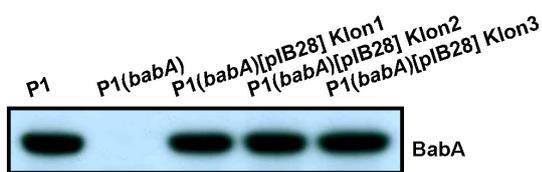


Abb. 17: Produktion des chimären BabA Fusionsproteins
Zellysate mit einer $OD_{550}=10$ der Stämme P1, P1(*babA*) und P1(*babA*)[pIB28] wurden mittels eines 10% SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. BabA wurde mit einem spezifischen Antikörper (AK277) detektiert.

3.2.3.3. Präsentation des chimären BabA Fusionsproteins auf der Bakterienoberfläche

Von dem natürlich vorkommenden BabA-Protein wird aufgrund typischer Sequenzmerkmale angenommen, dass es nach der Produktion im Cytoplasma über die innere Membran in das Periplasma geschleust wird. Der C-Terminus bildet eine Pore in der äußeren Membran (β -Barrel), durch die der N-Terminus nach außen geführt und anschließend an der Oberfläche präsentiert wird.

Weitergehend sollte überprüft werden, ob das in *H. pylori* produzierte BabA Fusionsprotein in funktioneller Form hergestellt und über die Membran an die Oberfläche gebracht wird. Denn von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Proteins ist, ob das chimäre BabA Fusionsprotein auch in der äußeren Membran verankert ist und der N-Terminus auf der Oberfläche präsentiert wird.

Um die Lokalisierung des Fusionsproteins näher zu untersuchen, wurde der N-Terminus einer BabA Komplementante nach Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper durch ein Epifluoreszenz-Mikroskop detektiert (Abb. 18).

Das auf der Oberfläche exponierte BabA bzw. BabA Fusionsprotein konnte bei *H. pylori* P1 und den Komplementanten P1(*babA*)[pIB4] und P1(*babA*)[pIB28] durch grüne Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden. Bei der Mutante P1(*babA*) erfolgte keine

Anfärbung. *H. pylori* P1wt diente als Positivkontrolle für ein auf die Oberfläche exportiertes BabA.

In der Komplementante P1(*babA*)[pIB28] wurde das chimäre BabA Fusionsprotein auf der Oberfläche präsentiert und konnte durch Immunfluoreszenz detektiert werden. Dadurch war eine wichtige Voraussetzung der Funktionsfähigkeit des chimären BabA Fusionsproteins erfüllt.

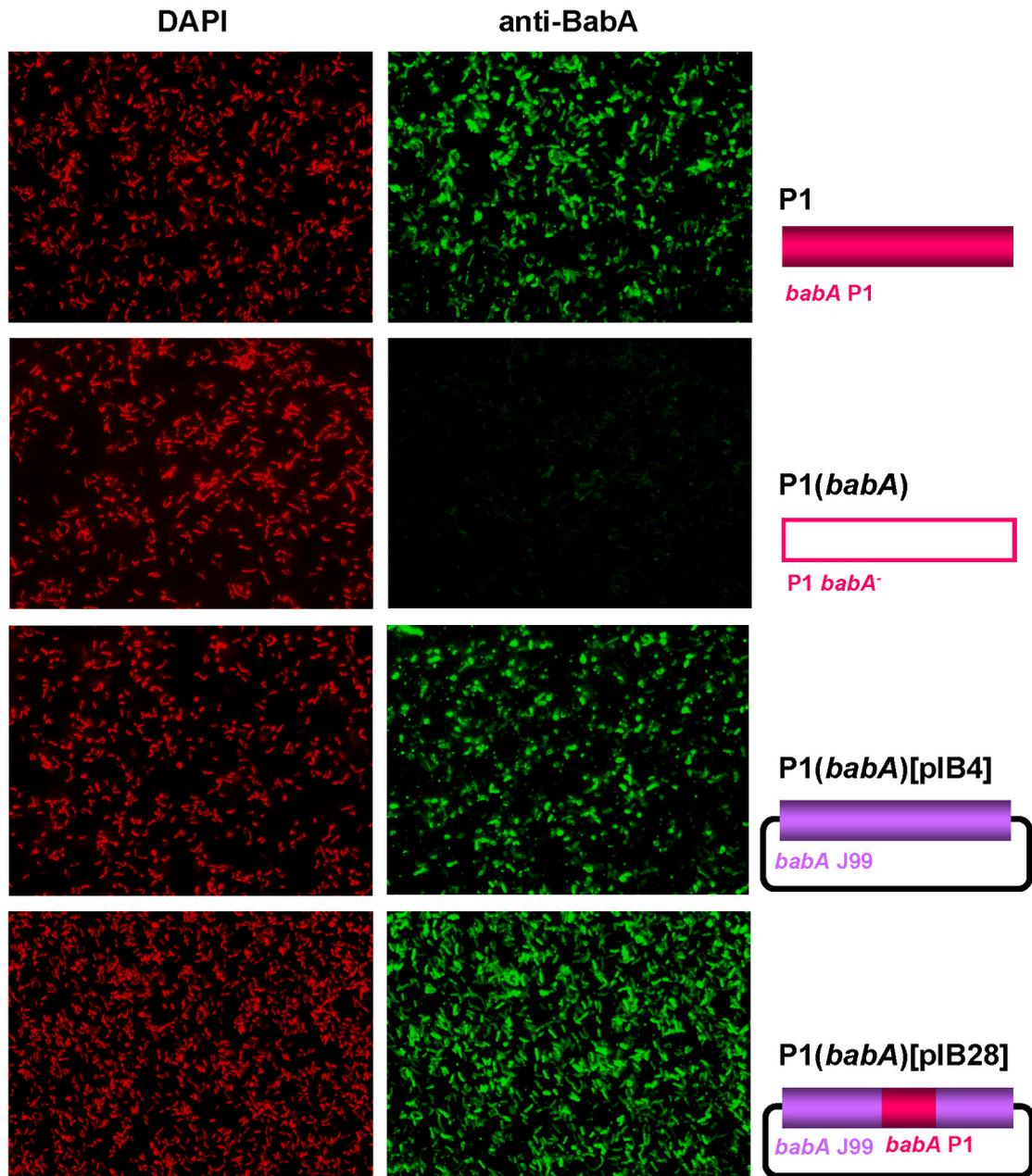


Abb. 18: Oberflächenlokalisierung von BabA

Die BabA Proteine der *H. pylori* Stämme P1, P1(*babA*)[pIB4] und P1(*babA*)[pIB28] wurden durch Zugabe eines anti-BabA Antikörpers (AK277) und anschließend eines gegen Kaninchen gerichteten Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht (dargestellt in grün). Zur Gegenfärbung der Bakterien für die Epifluoreszenz-Mikroskopie wurde DAPI verwendet (dargestellt in rot). *H. pylori* P1 und die Mutante P1(*babA*) wurden als Kontrollstämme verwendet.

3.2.3.4. Adhäsive Eigenschaften des chimären BabA Fusionsproteins

Nachdem die korrekte Lokalisierung des chimären BabA Fusionsproteins in den Komplementanten mit Immunfluoreszenz nachgewiesen worden war, sollten im weiteren Verlauf die adhäsiven Eigenschaften untersucht werden. In einem Dot Blot - Assay wurden FITC-markierte Bakterien der *H. pylori* Stämme J99, P1, P1(*babA*), P1(*babA*)[pIB4] und P1(*babA*)[pIB28] auf ihr Bindungsvermögen an Lewis^b-Antigen untersucht (Abb. 19).

Sowohl der *H. pylori* Wildtypstamm J99 als auch eine P1(*babA*)[pIB4] Mutante, welche mit dem gesamten funktionellen J99 *babA*-Gen komplementiert worden war, waren in der Lage, Lewis^b-Antigen zu binden. Der Wildtypstamm P1 und auch die Mutante P1(*babA*) alleine waren hingegen nicht fähig, Lewis^b zu binden. Obwohl das chimäre BabA Fusionsprotein des *H. pylori* Stammes P1(*babA*)[pIB28] korrekt auf der Bakterienoberfläche präsentiert wurde, konnte keine Adhärenz an Lewis^b nachgewiesen werden.

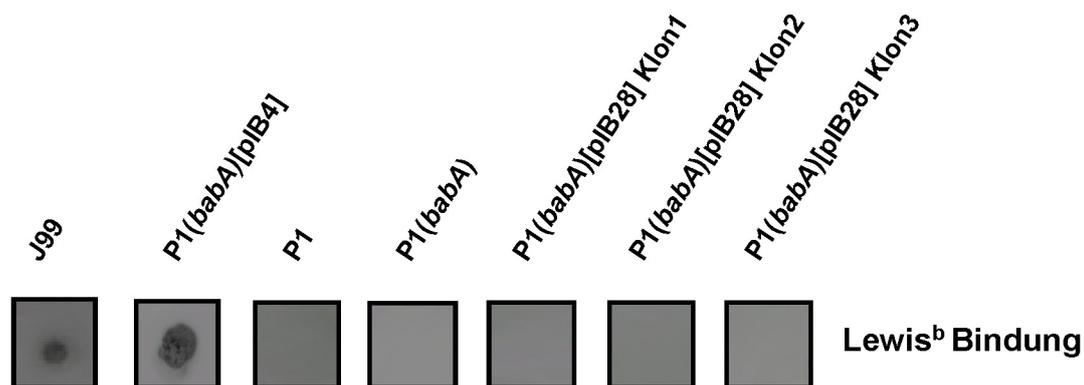


Abb. 19: Adhärenz des chimären BabA Fusionsproteins an Lewis^b

FITC-markierte Bakterien der *H. pylori* Stämme J99, P1, P1(*babA*), P1(*babA*)[pIB4] und P1(*babA*)[pIB28] wurden in einem Dot Blot Versuch mit Lewis^b, welches zuvor auf einer Nitrocellulosemembran fixiert worden war, inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die adhärenenten Bakterien mittels eines Fluoreszenzscanners detektiert. Als Positivkontrolle diente der Stamm J99, welcher über ein aktives BabA-Protein verfügt und deshalb an Lewis^b-Antigene bindet.

Um zu klären, ob eine Punktmutation oder eine Leserasterverschiebung in den Komplementanten P1(*babA*)[pIB28] stattgefunden hatte, welche Einfluss auf den funktionellen Status des Fusionsproteins haben könnte, wurde das Gen inklusive der Ligationsstellen, über die pIB28 zusammengesetzt worden war, erneut sequenziert. Das Gen hatte allerdings keine Veränderungen in der Sequenz.

Somit muss der Verlust der Bindungsfähigkeit des Lewis^b Antigens durch BabA mit den Unterschieden in den BabA-Proteinen aus P1(*babA*)[pIB4] und P1(*babA*)[pIB28] zu

3.2.4.1. Insertion von *H. pylori* J99 BabA-Fragmenten in das chimäre BabA Fusionsprotein

Durch eine ortsspezifische Mutagenese sollten in zwei Austauschreaktionen Fragmente des J99 BabA in das P1 Fragment des chimären Fusionsproteins inseriert werden.

Hierfür wurden in einer inversen PCR-Reaktion mit den Primerpaaren IB53 und IB54 sowie IB55 und IB56 von dem Plasmid pIB28 die Vorlagen für zwei neue Plasmide pIB35 und pIB36 synthetisiert (Abb. 21). Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und die noch im Ansatz vorliegende Matrizen-DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* zerschnitten. Mit Hilfe einer *Pfu*-Polymerase wurden Poly-A-Überhänge der PCR-Reaktion entfernt. Es folgte eine Ligation der Plasmide pIB35 und pIB36 über glatte Enden, anschließend wurden die Plasmide in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach einer Plasmidisolierung wurden diese sequenziert und auf die Richtigkeit der Austauschreaktionen hin überprüft.

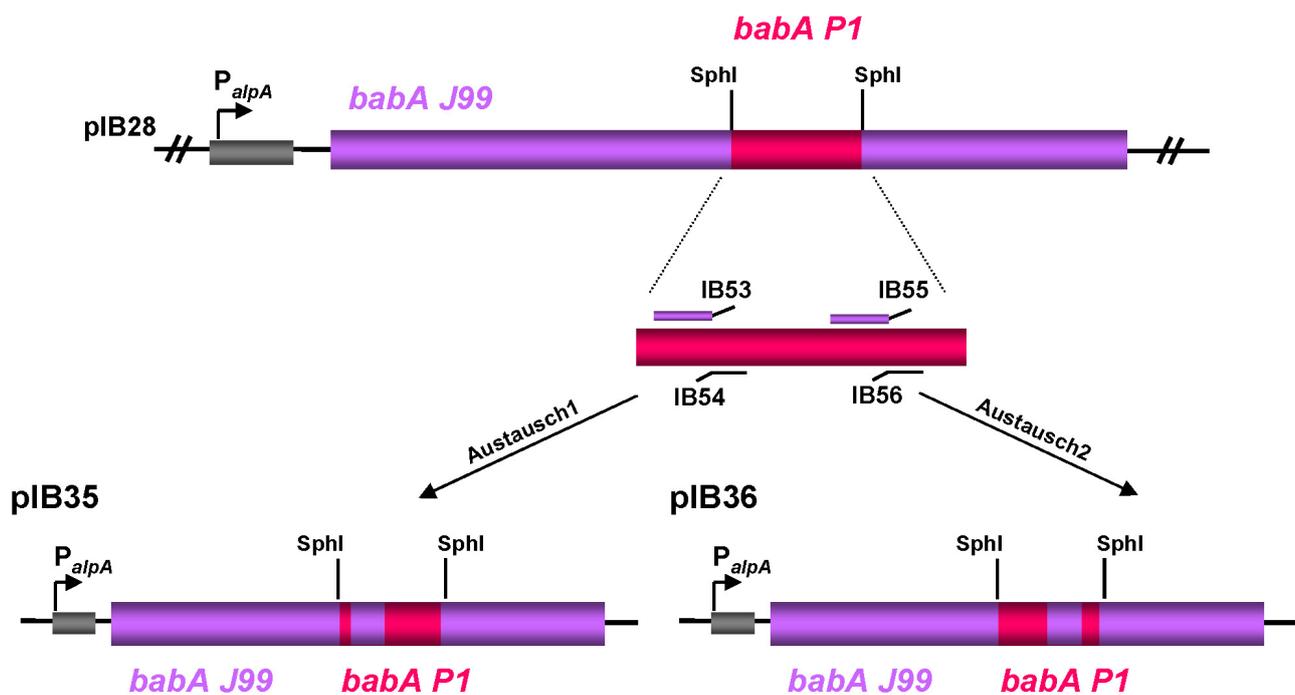


Abb. 21: Erstellung der Plasmide pIB35 und pIB36

Das Plasmid pIB28 wurde in zwei inversen PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren IB53 und IB54 sowie IB55 und IB56 amplifiziert. Die Oligonukleotide IB53 und IB55 stimmen dabei jeweils mit der Nukleotidsequenz des J99 babA-Gens an entsprechender Position überein. Die PCR-Produkte wurden über glatte Enden zu den Plasmiden pIB35 und pIB36 ligiert.

Plasmid pIB35 enthält ein *babA*-Gen aus dem *H. pylori* Stamm J99, wobei die Nukleotidsequenz für die Aminosäuren an Position 350, 351, 355, 356, 359, 360 und 361 dem des *babA*-Gens von *H. pylori* P1 entspricht. Plasmid pIB36 hingegen enthält das *babA*-Gen aus J99 mit der Nukleotidsequenz von P1 für die Aminosäurepositionen 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 (Abb. 22).

Die Plasmide wurden in den DAP-auxotrophen *E. coli* Stamm β 2150 transformiert und in die *H. pylori* Mutante P1(*babA*) konjugiert.

J99	ACPYFHASNSSEANAPKFS	TTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINEHEQTT	60
P1	ACPFFRANSSASSAPKFT	TTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINSNEQTA	60
	:*.*.	:.****:*****	
J99	PVGNNNGKPFNPFTDASFAQGM		82
P1	QVGGSGGKPFNPFTDASFAQGM		82
	...***		



Austausch 1

J99	ACPYFHASNSSEANAPKFS	TTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINEHEQTT	60
Fusionsprotein pIB35	ACPYFHASNSSEANAPKFS	TTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINSNEQTA	60
	*****	:.****:	
J99	PVGNNNGKPFNPFTDASFAQGM		82
Fusionsprotein pIB35	QVGGSGGKPFNPFTDASFAQGM		82
	...***		

Austausch 2

J99	ACPYFHASNSSEANAPKFS	TTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINEHEQTT	60
Fusionsprotein pIB36	ACPFFRANSSASSAPKFT	TTTGKICGAFSEEISAIQKMITDAQELVNQTSVINEHEQTT	60
	:*.*.	:.****:*****	
J99	PVGNNNGKPFNPFTDASFAQGM		82
Fusionsprotein pIB36	PVGNNNGKPFNPFTDASFAQGM		82

Abb. 22: Aminosäure Re-Insertionen in den Plasmiden pIB35 und pIB36

Durch ortsspezifische Mutagenese konnten die Nukleotidsequenzen des J99 *babA*-Gens in die Sequenz des chimären Fusionsproteins von pIB28 inseriert werden. Dabei wurden in zwei Austauschreaktionen jeweils eine Gruppe von 7 Aminosäuren von „P1 Aminosäuren“ wieder zu „J99 Aminosäuren“ umgewandelt.

Abb. 23 zeigt einen schematischen Vergleich der genetischen Grundlage verschiedener *H. pylori* Stämme, welche zur Aufklärung der BabA Bindungsregion generiert und verwendet wurden.

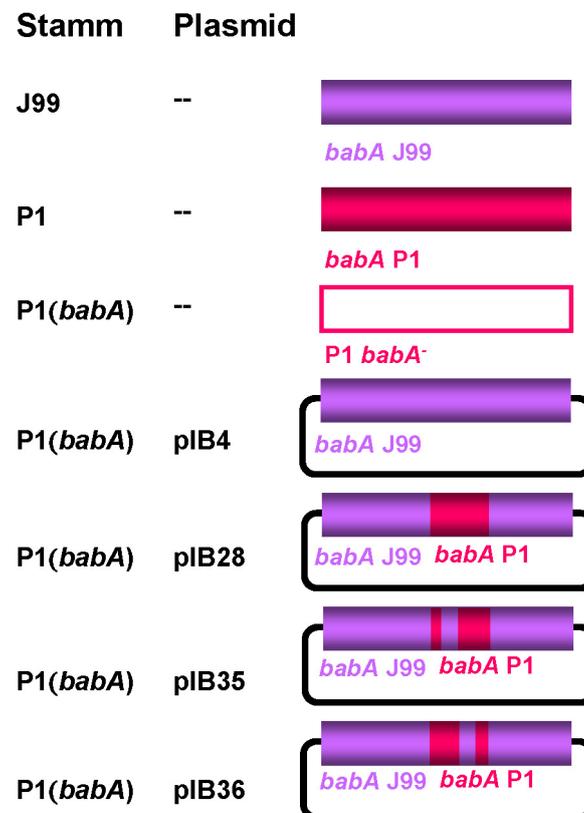


Abb. 23: Schematische Darstellung der genetischen Grundlage verschiedener *H. pylori* Stämme bezüglich ihres *babA* Status

Die Wildtypstämme J99 und P1 besitzen individuelle *babA*-Gene. Der Mutante P1(*babA*) fehlt das *babA*-Gen. Bei dem Stamm P1(*babA*)[pIB4] handelt es sich um den P1(*babA*) Stamm, welcher mit dem Plasmid pIB4 komplementiert wurde. Dieses Plasmid enthält das *babA*-Gen des J99 Wildtypstamms. Bei P1(*babA*)[pIB28] handelt es sich um einen P1(*babA*) Stamm mit einem, auf dem Plasmid pIB28 codierten *babA*-Hybridgen. Bei den Stämmen P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] wurde dieses Hybridgen durch Re-Insertionen von J99 Nukleotiden weiter verändert. In Plasmid pIB35 wurden die Nukleotide für die Aminosäurepositionen 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 ausgetauscht, und in Plasmid pIB36 die Nukleotide für die Aminosäurepositionen 350, 351, 355, 356, 359, 360 und 361.

3.2.4.2. Produktion der BabA Fusionsproteine

Die Produktion der BabA Fusionsproteine der Plasmide pIB35 und pIB36 wurde im Western-Blot mit Hilfe eines BabA-spezifischen Antikörpers (AK277) untersucht (Abb.24). Der *H. pylori* Wildtypstamm P1 produziert ein inaktives BabA, welches allerdings im Western-Blot detektiert wird. Die Mutante P1(*babA*) produziert kein BabA. Der komplementierte Stamm P1(*babA*)[pIB4] zeigt eine deutliche BabA-Produktion, sowie auch P1(*babA*)[pIB28],

bei dem das chimäre Fusionsprotein erkannt wird. Bei Klonen der Stämme P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] wurde ebenso die Produktion der Fusionsproteine über eine Detektion mit dem Antikörper AK277, nachgewiesen.

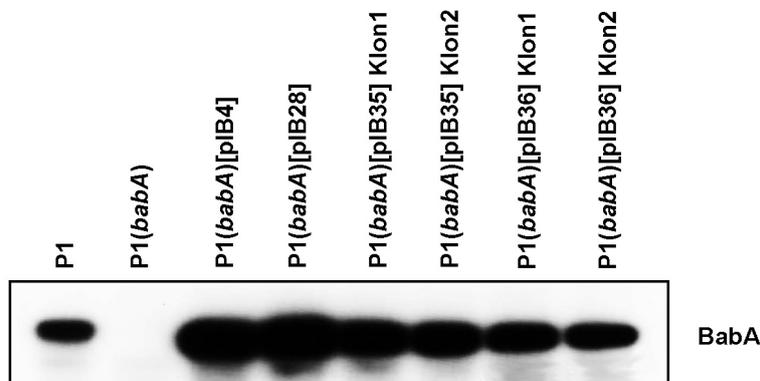


Abb. 24: Produktion der BabA Fusionsproteine von pIB35 und pIB36

Zelllysate mit einer $OD_{550}=10$ der Stämme P1, P1(*babA*), P1(*babA*)[pIB4], P1(*babA*)[pIB28], P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] wurden mittels eines 10% SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. BabA wurde mit einem spezifischen Antikörper (AK277) detektiert.

3.2.4.3. Lokalisierung der Fusionsproteine auf der Bakterienoberfläche

Die Präsentation der BabA-Proteine auf der äußeren Membran ist Grundvoraussetzung für deren Bindung von Lewis^b. Um die adhäsiven Eigenschaften von verschiedenen Fusionsproteinen untersuchen zu können, ist es deshalb absolut notwendig, diese auf ihre Lokalisation hin zu überprüfen.

Wie bereits bei dem chimären Fusionsprotein sollte nun auch bei den BabA-Proteinen mit der Re-Insertion der J99 Fragmente überprüft werden, ob diese an die Bakterienoberfläche gebracht und dort präsentiert werden. Hierfür wurde das BabA verschiedener *H. pylori* Stämme nach Anfärbung mit einem Alexa488-markierten Antikörper durch ein Epifluoreszenz-Mikroskop detektiert. Durch grüne Fluoreszenzsignale konnte bei folgenden Stämmen ein oberflächenexponiertes BabA nachgewiesen werden: P1, P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36]. Dabei diente *H. pylori* P1 als Positivkontrolle für ein an die Oberfläche exportiertes BabA. Bei der Mutante P1(*babA*) erfolgte keine Anfärbung (Abb. 25).

Durch Immunfluoreszenz war bei den Komplementanten P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] die Präsentation der jeweiligen BabA Fusionsproteine an der Oberfläche nachgewiesen worden, wodurch eine wichtige Voraussetzung der Funktionsfähigkeit der BabA Fusionsproteine erfüllt war.

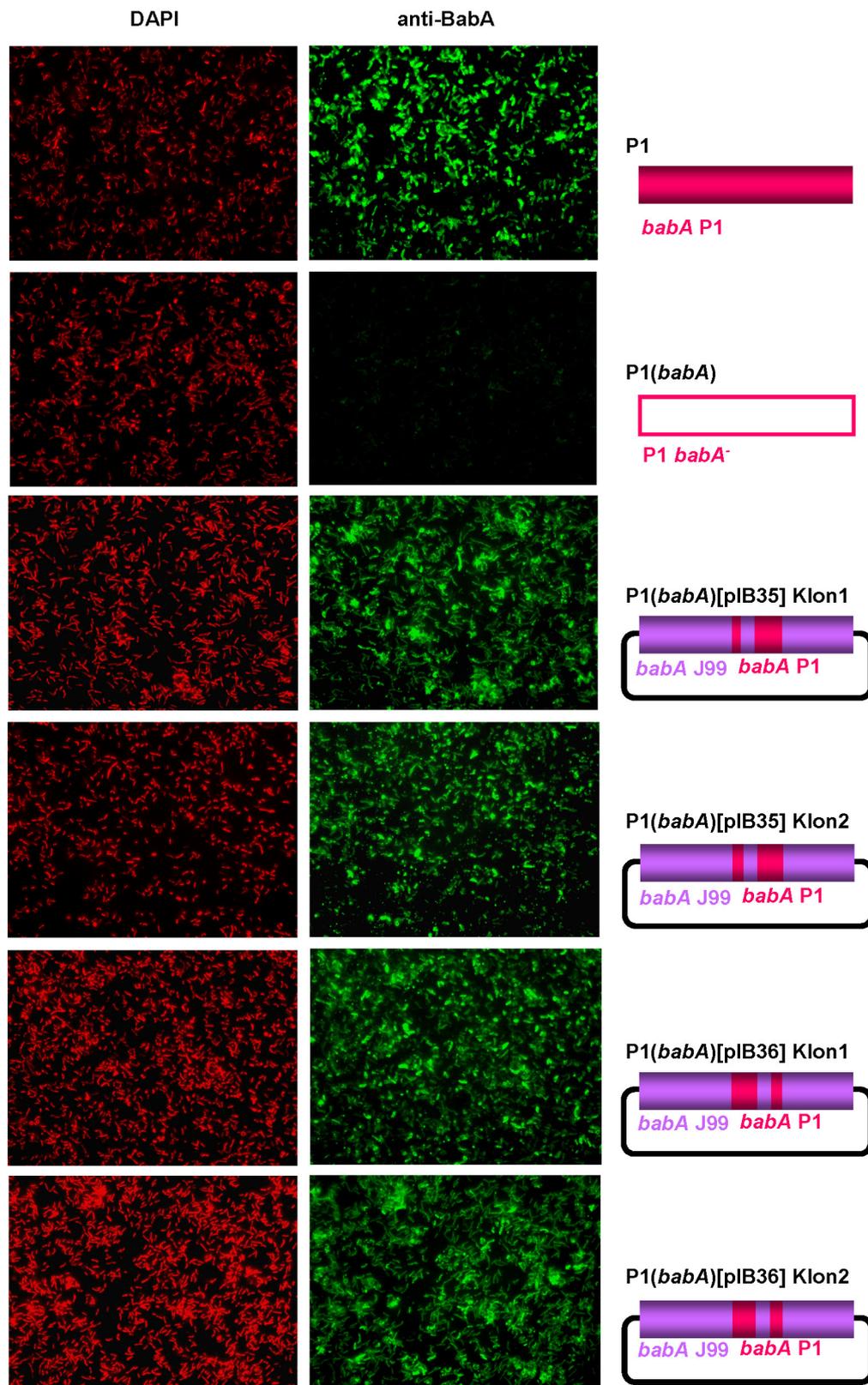


Abb. 25: Oberflächenlokalisierung von BabA Fusionsproteinen

Die Zugabe eines anti-BabA Antikörpers (AK277) und anschließend eines gegen Kaninchen gerichteten Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörpers ermöglichte die Lokalisation von BabA im Epifluoreszenz-Mikroskop bei den *H. pylori* Stämmen P1, P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] (dargestellt in grün). Zur Gegenfärbung der Bakterien wurde DAPI verwendet (dargestellt in rot). Die Mutante P1(*babA*) wurden als Negativ-Kontrolle verwendet.

3.2.4.4. Bindeverhalten der BabA Fusionsproteine

Mit dem Nachweis der korrekten Lokalisation der BabA Fusionsproteine an der Bakterienoberfläche war die Grundvoraussetzung für die Funktionalität der neu geschaffenen chimären Adhäsine gegeben. Die Überprüfung der jeweiligen adhäsiven Eigenschaften erfolgte mittels Dot Blot - Analyse. Dabei wurden jeweils 1 ml FITC-markierte Bakterien ($OD_{550}=6$) auf eine Nitrozellulose-Membran gegeben, auf welche zuvor gereinigtes Lewis^b-HSA und Lactoferrin als Positivkontrolle aufgetropft worden waren.

Es wurde das Bindeverhalten der *H. pylori* Stämme J99, P1, P1(*babA*), P1(*babA*)[pIB4], P1(*babA*)[pIB28], P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] untersucht, indem das Bindungsmuster der FITC-markierten, adhärenen Bakterien mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners erfasst wurde.

In Abb. 26 ist ein solches Bindungsmuster exemplarisch abgebildet. Dabei lässt sich erkennen, dass alle *H. pylori* Stämme an die Positivkontrolle Lactoferrin binden, unabhängig ihres BabA Status. Die Bindung an Lewis^b ist bei dem Wildtyp Stamm J99 und der mit einem J99-BabA komplementierten Mutante P1(*babA*)[pIB4] deutlich zu erkennen. Der Stamm P1(*babA*)[pIB28], welcher ein chimäres BabA-Protein mit einem J99-Grundgerüst und einem P1-Teilfragment produziert, bindet nicht an Lewis^b. Die Mutante P1(*babA*)[pIB35], welche auf dem Stamm P1(*babA*)[pIB28] basiert, dessen *babA*-Gen allerdings im P1-Teilbereich durch eine ortsspezifische-Mutagenese in 7 Aminosäuren an das J99-BabA angeglichen wurde, bindet wieder an Lewis^b. Der Stamm P1(*babA*)[pIB36], welcher ähnlich zu P1(*babA*)[pIB35] verändert wurde, allerdings in 7 anderen Aminosäuren, bindet nicht oder nur schwach an Lewis^b.

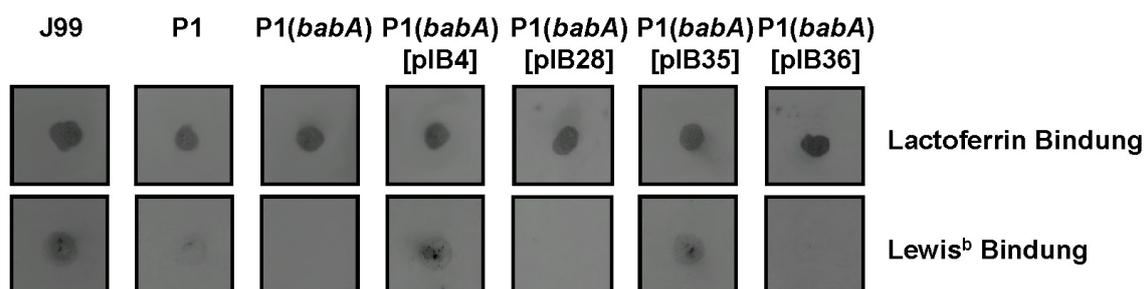


Abb. 26: Lewis^b-Bindungsmuster in der Dot Blot - Analyse von BabA Fusionsproteinen

In einem Dot Blot Versuch wurde eine Nitrozellulosemembran, auf welcher zuvor die Glycoproteine Lewis^b-HSA und Laktoferrin fixiert worden waren, mit 1 ml FITC-markierten Bakterien ($OD_{550}=6$) der *H. pylori* Stämme J99, P1, P1(*babA*), P1(*babA*)[pIB4], P1(*babA*)[pIB28], P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden die adhärenen Bakterien mittels eines Fluoreszenzscanners detektiert. Als Positivkontrolle diente der Stamm J99, welcher über ein aktives BabA-Protein verfügt und deshalb an Lewis^b-Antigene bindet.

Die Quantifizierung der sich durch das Bindungsmuster ergebenden Menge der adhärenenten Bakterien erfolgte anhand des Programms *AIDA Image Analyzer*. Es folgte der Vergleich der Intensität der Lewis^b-Bindung gegenüber der Lactoferrin-Bindung für jeden Versuch und für jeden *H. pylori* Stamm. Das Glycoprotein Lactoferrin wurde als Positivkontrolle für eine 100% positive *H. pylori* Bindung verwendet, da Walz *et al.* [229] bereits bei der Veröffentlichung der Dot Blot - Analyse nachgewiesen hatten, dass die Bindung von *H. pylori* an Lactoferrin unabhängig von den äußeren Membranproteinen BabA und SabA stattfindet.

Abb. 27 zeigt diese Quantifizierung der Lewis^b-Bindungen. Es ist dabei zu erkennen, dass die Bindung von J99 an Lewis^b bei 62,5% der Intensität im Vergleich zur Lactoferrin-Bindung liegt. Die Stämme P1(*babA*)[pIB4] und P1(*babA*)[pIB35] konnten auf ein ähnlich hohes Binde-Niveau komplementiert werden. Das Bindeverhalten dieser Stämme ist eindeutig positiv gegenüber Lewis^b. Die Bindung von P1(*babA*)[pIB36] an Lewis^b kann als tendenziell positiv beschrieben werden. Der Unterschied zwischen P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] kann an den unterschiedlichen Stellen der veränderten Aminosäuresequenzen festgemacht werden. Bei P1(*babA*)[pIB35] wurden die Aminosäuren des BabA-Proteins an den Positionen 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 von einer P1-Abfolge in eine J99-Abfolge verändert, bei P1(*babA*)[pIB36] handelt es sich um die Aminosäuren an den Positionen 350, 351, 355, 356, 359, 360 und 361. Dabei scheinen die Aminosäuren der Positionen 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 eine wirklich ausschlaggebende Rolle für der Bindung von BabA an Lewis^b zu spielen. Wo zuvor keine Bindung durch das BabA-Protein des Plasmids pIB28 nachgewiesen werden konnte, zeigt sich durch den Austausch von 7 Aminosäuren im Plasmid pIB35 eine ähnlich starke Bindung wie bei dem Wildtypstamm J99. Der schwach positive Bindungseinfluss der Aminosäuren 350, 351, 355, 356, 359, 360 und 361 kann eventuell mit einer verbesserten Konformation des BabA-Proteins in der Bindungsregion erklärt werden, wobei allerdings die wirklich ausschlaggebenden Bindungsmotive fehlen.

Das nicht ganz negative Bindungsverhalten des Stamms P1 deutet auf das Vorkommen eines *babB*-Gens in seinem Genom hin. Schon für andere Stämme wurde beschrieben, dass es durch Rekombinationen zwischen den Genen *babA* und *babB* zur Produktion funktioneller Adhäsine kommen kann [102,173]. Da dies allerdings nur spontan bei einzelnen Klonen einer Kultur stattfindet, zeigt der Durchschnitt der Bakterien wie der ursprüngliche Stamm ein negatives Verhalten in seiner Lewis^b-Bindung. Es kann allerdings zu einer leichten Heterogenität in einer vorher uniformellen Bakterienpopulation kommen [16].

Somit konnte die Bindungsregion von BabA noch einmal näher eingegrenzt werden. Die Aminosäuren an Position 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 bezüglich des J99 BabA Proteins induzieren eine Lewis^b-Bindung eines vorher Bindungs-negativen BabA Protein. Die Aminosäuren 350, 351, 355, 356, 359, 360 und 361 zeigen einen positiven Einfluss auf die Lewis^b-Bindung, sind aber nicht alleine ausschlaggebend.

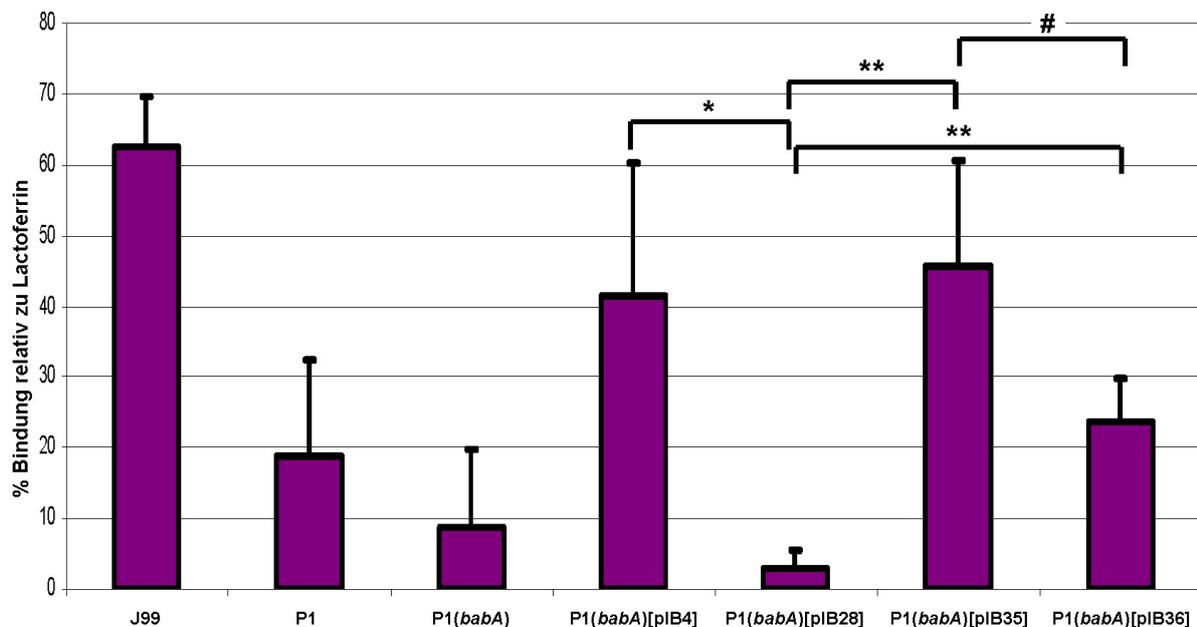


Abb. 27: Adhärenz von BabA Fusionsproteinen an Lewis^b

Die Quantifizierung der Bindungsintensität verschiedener *H. pylori* Stämme (J99, P1, P1(*babA*), P1(*babA*)[pIB4], P1(*babA*)[pIB28], P1(*babA*)[pIB35], P1(*babA*)[pIB36]) an Lewis^b erfolgte über die Auswertung mehrerer Dot Blot Versuche anhand der *AIDA Image Analyzer* Software. Der prozentuale Anteil der Lewis^b-Bindung ist relativ zur Bindung an Laktoferrin dargestellt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Student-t-Test bestimmt. ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$); # (nicht signifikant)

3.2.5. Gegenüberstellung der BabA Bindungsregionen verschiedener *H. pylori* Stämme bezüglich ihrer Sequenz

Um die Relevanz der identifizierten Bindungsregion näher zu untersuchen, wurden von verschiedenen klinischen *H. pylori* Isolaten, deren Bindungsverhalten an Lewis^b genau charakterisiert worden war, Sequenzierungen der Binderegion durchgeführt.

Die klinischen Isolate #167, #184, #216a und #222a waren mittels Dot Blot - Analyse auf ihre Bindungseffizienz an Lewis^b getestet worden. Die drei *H. pylori* Stämme #184, #216a und #222a sind nicht in der Lage, trotz nachgewiesener Produktion eines BabA-Proteins, an Lewis^b zu binden. Stamm #167 hingegen produziert ein aktives BabA-Protein und bindet

Lewis^b [157]. Es wurde die chromosomale DNA der klinischen Isolate isoliert und *babA* mit den Starteroligonukleotiden IB9 und IB10 mittels PCR amplifiziert. Nach der Überführung der Gene in TOPO-Vektoren wurden sie mit den Standard-Oligonukleotiden M13fw und M13rev sequenziert. Anschließend wurden aus diesen Sequenzinformationen spezifische Oligonukleotide für die Bindungsregion jedes Gens konstruiert. Es folgte eine erneute Sequenzierungsreaktion, wobei für Stamm #222a das Oligonukleotid IB72, für Stamm #216a das Oligonukleotid IB93, für Stamm #167 das Oligonukleotid IB70 und für Stamm #184 das Oligonukleotid IB92 verwendet wurde.

Sequenzvergleiche der klinischen Isolate mit den für die vorherigen Analysen verwendeten *H. pylori* Stämmen J99 und P1 zeigen deutliche Abweichungen in den für die Lewis^b-Bindung wichtigen Regionen (Abb. 28). Vor allem die Region zwischen den Aminosäuren 299 und 313 ist bei den nicht Lewis^b bindenden klinischen Isolaten von Deletionen und Insertionen betroffen. Dies deutet darauf hin, dass es durch diese Unregelmäßigkeiten zu einer Störung der Konformation an der Bindungsdomäne von BabA kommt, und somit als Folge die Bindung von Lewis^b nicht möglich ist.

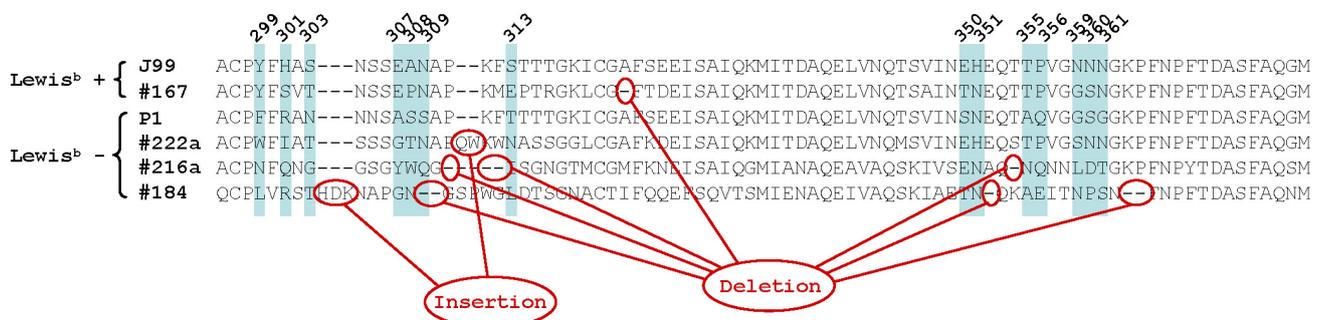


Abb. 28: Sequenzvergleich verschiedener BabA-Bindungsregionen

Die Sequenz der BabA-Bindungsregion der *H. pylori* Stämme J99 und P1 wurde mit den entsprechenden Sequenzdaten der klinischen *H. pylori* Isolate #167, #184, #216a und #222a [157] verglichen. Die blauen Balken markieren Aminosäuren, welche sich zwischen den Stämmen J99 und P1 unterscheiden. Aminosäure-Insertionen und -Deletionen wurden durch rote Kreise hervorgehoben. Die Stämme J99 und #167 sind in der Lage, Lewis^b zu binden. Die Stämme P1 #222a, 216a und #184 produzieren ein inaktives BabA-Protein, welches nicht an Lewis^b bindet.

3.3. Identifizierung von VacA-Rezeptoren auf eukaryotischen Zellen

Bei der Charakterisierung des vakuolisierenden Cytotoxins VacA von *H. pylori* konzentrierte man sich zunächst auf die durch das Toxin hervorgerufene Bildung von großen cytoplasmatischen Vakuolen. Doch inzwischen weiß man, dass es sich bei VacA um ein multifunktionelles Toxin handelt, welches ein großes Wirkungsspektrum in verschiedenen Zelltypen besitzt [33]. Um den Zugang zu entsprechenden zellulären Kompartimenten zu ermöglichen, bedarf es der Interaktion des vakuolisierenden Cytotoxins VacA mit Membranbestandteilen auf der Oberfläche der Zielzellen.

Auf Epithelzellen wurden bereits diverse Rezeptoren für VacA beschrieben. Unter anderem bindet das Toxin an Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase (RPTP) α und RPTP β [242,243], Glycosphingolipide [180] und speziell an Sphingomyelin [83]. Xaver Sewald gelang der Nachweis, dass CD18 als Rezeptor für m1VacA auf T-Lymphocyten fungiert [194].

3.3.1. Interaktion von m2VacA mit CD18 auf T-Lymphocyten

Von Xaver Sewald wurde die Integrin Untereinheit CD18 als m1VacA-Rezeptor auf humanen T-Lymphocyten identifiziert. Dabei handelt es sich um die β_2 -Untereinheit Leukozyten-spezifischer Integrine. Das auf Immunzellen dominierende Integrin LFA-1, bestehend aus den Untereinheiten β_2 (CD18) und α_L (CD11a), stellt somit einen zentralen Rezeptor für VacA auf verschiedenen Immunzellen dar. Die funktionelle Aufnahme von m1VacA führt unter anderem zur Ausbildung von sauren Vakuolen. Im Zuge dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob dieses Prinzip auch für m2VacA besteht.

3.3.1.1. VacA Genotypisierung verschiedener *H. pylori* Stämme

Alle bisher untersuchten *H. pylori*-Isolate produzieren VacA, doch die Proteine unterscheiden sich in ihrem Bindungsverhalten an eukaryotische Zellen und ihrer Vakuolisierungsaktivität gegenüber verschiedenen Zelllinien. Dabei sind deutliche Variationen in der Sequenz erkennbar. Aufgrund der verschiedenen Sequenz-Polymorphismen lassen sich unterschiedliche *vacA*-Allele unterscheiden. VacA-Polymorphismen treten im Bereich des N-Terminus (s-Region), des mittleren Bereichs (m-Region) sowie in einem intermediären Bereich (i-Region) auf [178] (Abb. 29).

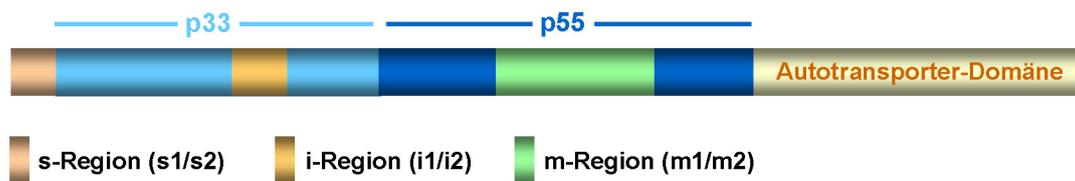


Abb. 29: Domänen von VacA

Das reife VacA-Protein besteht aus den Domänen p33 und p55. Die Signalsequenz (s-Region) ist verantwortlich für den Transport des Toxins über die innere Membran. Die C-terminal gelegene Autotransporterdomäne katalysiert die Translokation über die äußere Membran. Polymorphismen treten in der s-Region der mittleren (m-) Region und der intermediären (i-) Region auf.

Da diese sich in ihrer Aktivität und dem Spektrum sensibler Zellen unterscheiden, wurden die *vacA*-Allele verschiedener *H. pylori* Stämme näher untersucht. Es wurden die Stämme 60190, P76, P12, P1, B128, P49, P92, P217, Tx30a, QIRV, 256 und 256RI (Re-Isolat aus Maus) analysiert, wobei der *vacA*-Genotyp nach der Methode von Atherton [11] und van Doorn [224] bestimmt wurde. Hierbei werden mittels PCR die s1/s2 bzw. m1 oder m2 Region des *vacA*-Gens amplifiziert. Für die Amplifikation der s1/s2-Region wurden die Starteroligonukleotide IB31 und BG9 verwendet, was bei einer s1-Region ein Transkript von 176 bp, bei einer s2-Region von 203 bp liefert. Die Oligonukleotide BG10 und BG11 amplifizieren die m1-Region und liefern ein Transkript von 290 bp, während die Oligonukleotide BG12 und BG13 die m2-Region mit 352 bp amplifizieren. Die intermediäre Region wurde mit dem Oligonukleotidpaar IB57 und IB58 für eine i1-Region und dem Oligonukleotidpaar IB57 und IB59 für eine i2-Region amplifiziert (Abb. 30).

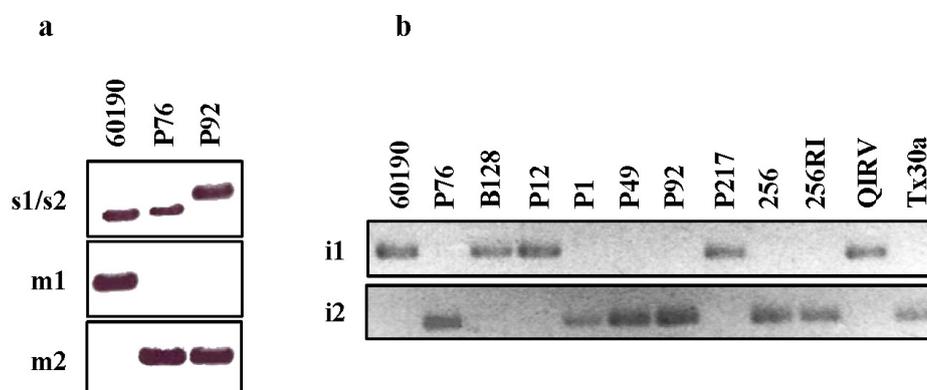


Abb. 30: Beispielhafte Darstellung der Analyse von *vacA*-Genotypen

Abbildung a: Zur Analyse der *vacA* s- und m-Region der *H. pylori* Stämme 60190, P76 und P92 wurde eine PCR mit der chromosomalen DNA der jeweiligen Stämme als Matrize und den Oligonukleotid-Paaren IB31/BG9, BG10/BG11 und BG12/BG13 durchgeführt.

Abbildung b: Die Analyse der intermediären Region von *vacA* der Stämme 60190, P76, B128, P12, P1, P49, P92, P217, 256, 256RI, QIRV und Tx30a erfolgte anhand einer PCR-Reaktion mit den Primerpaaren IB57/IB58 und IB57/IB59.

In Abb. 31 sind die Ergebnisse der *vacA*-Genotypisierung für verschiedene *H. pylori* Stämme dargestellt. Der *H. pylori* Stamm P76 wurde zusätzlich anhand einer Sequenzierung der *vacA*-Mittelregion mit den Primern IB51 und IB52 dahingehend überprüft, ob er sich in das von Telford [105] definierte Schema der Sequenzfolge von m1/m2*vacA* einteilen lässt. Die Auswertung der Sequenz-Daten zeigte, dass P76 eine m2-Region besitzt, bei der die essentiellen Aminosäuren für m2*vacA* vorhanden und die Aminosäuren zur Unterscheidung von m1*vacA* abweichend sind. Der Stamm P76 produziert somit ein s1i2m2VacA.

Stamm	<i>vacA</i>
60190	s1 i1 m1
P76	s1 i2 m2
P1	s1 i2 m2
P12	s1 i1 m1
B128	s1 i1 m2
P49	s1 i2 m2
P92	s2 i2 m2
P217	s1 i1 m2
256	s1 i2 m2
256RI	s1 i2 m2
Tx30a	s2 i2 m2

Abb. 31: *vacA*-Genotypen

Die *H. pylori* Stämme 60190, P76, P12, P1, B128, P49, P92, P217, Tx30a, 256 und 256RI wurden vollständig auf ihren *vacA*-Status überprüft. Sowohl die N-Terminale s-Region, die intermediäre i-Region, als auch die Mittelregion wurden bei den einzelnen Stämmen bestimmt.

3.3.1.2. Aufreinigung von m2VacA aus *H. pylori* Kulturüberstand

VacA wird von *H. pylori* als Prä-Protoxin gebildet und nach dem Transport über die innere Membran durch einen Autotransporter über die äußere Membran sekretiert. Das Toxin (95 kDa) oligomerisiert nach Abspaltung der Autotransporter-Domäne zu dodecameren Komplexen, welche in ihrer Form einer Blüte ähneln [34]. Die Bildung dieser hochmolekularen Strukturen der Masse von ca. 1 MDa macht man sich für die Reinigung von VacA aus *H. pylori* Kulturüberstand zunutze.

Für die Aufreinigung wurde der *H. pylori* Stamm P76 verwendet. Er produziert ein s1i2m2 VacA-Protein. Der Stamm wurde in Brucella-Medium mit Cholesterol (1:250) kultiviert. Die Proteine aus dem Kulturüberstand wurden mittels Ammoniumsulfat gefällt und hochmolekulare VacA-Komplexe über Gelfiltration (Sephacryl S300-Säule) aufgereinigt. Die

Fraktionen mit der höchsten Proteinmenge wurden in einer SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt und auf den Grad der Anreicherung getestet. VacA war als Signal bei ca. 100 kDa zu erkennen. Die Fraktionen mit den höchsten VacA Konzentrationen wurden erneut vereint und aufkonzentriert. Zur abschließenden Proteinmengenbestimmung wurde VacA erneut über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend eine Bestimmung nach Bradford durchgeführt. Neben VacA befinden sich noch VacA-Spaltprodukte und andere Proteinkontaminationen in der Präparation. Deren Mengenanteil ist allerdings so gering, dass der Grad der Toxin-Anreicherung für weitere Verwendungen ausreicht. Die Qualität der VacA-Anreicherung wurde durch Vakuolisierung von HeLa-Zellen überprüft.

3.3.1.3. m2VacA-induzierte Vakuolisierung von T-Lymphozyten Zelllinien

Um die Funktion von LFA-1 bezüglich der funktionellen Aufnahme von m2VacA zu untersuchen, wurden Vakuolisierungsexperimente mit den T-Zelllinien Jurkat und EL-4 durchgeführt. Es wurde zudem eine LFA-1 negative Jurkat T-Zelllinie (Jurkat- β 2.7) verwendet, welche kein CD11a produziert, wodurch als Folge kein funktionelles LFA-1 an der Oberfläche lokalisiert ist. Integrine werden nur als Heterodimere, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit, an die Oberfläche transportiert [97]. Außerdem wurde zusätzlich eine mit CD11a komplementierte Zelllinie (Jurkat- β 2.7/CD11a) verwendet.

Für die Interaktionsstudien wurde die Bildung saurer Vakuolen mittels Neutralrotfärbung quantifiziert. Die Zelllinien Jurkat, Jurkat- β 2.7, Jurkat- β 2.7/CD11a und EL-4 wurden mit 1 μ g/ml säureaktiviertem m2VacA des *H. pylori* Stamms P76 und zum Vergleich mit m1VacA des Stamms 60190 versetzt um die gebildeten Vakuolen mit Neutralrot zu quantifizieren.

Es zeigte sich, dass m1 und m2VacA ähnlich starke Vakuolisierungsreaktionen hervorrufen (Abb. 32). Dabei bilden die Zelllinien Jurkat und Jurkat- β 2.7/CD11a deutlich mehr Vakuolen aus, als die LFA-1 negative Zelllinie Jurkat- β 2.7. Die Aufnahme von m2VacA in T-Lymphocyten und deren Vakuolisierung ist folglich abhängig von der Präsenz des Rezeptors LFA-1. Dass auch LFA-1 negative Zellen ein geringes Maß an Vakuolisierung aufwiesen, deutet auf weitere, LFA-1 unabhängige Aufnahmewege für VacA hin.

In der murinen T- Zelllinie EL-4 wird im Vergleich zu der humanen T-Zelllinie Jurkat keine VacA-induzierte Vakuolisierung hervorgerufen. Für m1VacA war dieses Phänomen bereits von Xaver Sewald [194] beschrieben worden. Im Zuge dieser Arbeit wird des Weiteren die Resistenz muriner T-Lymphocyten auch gegenüber m2VacA deutlich.

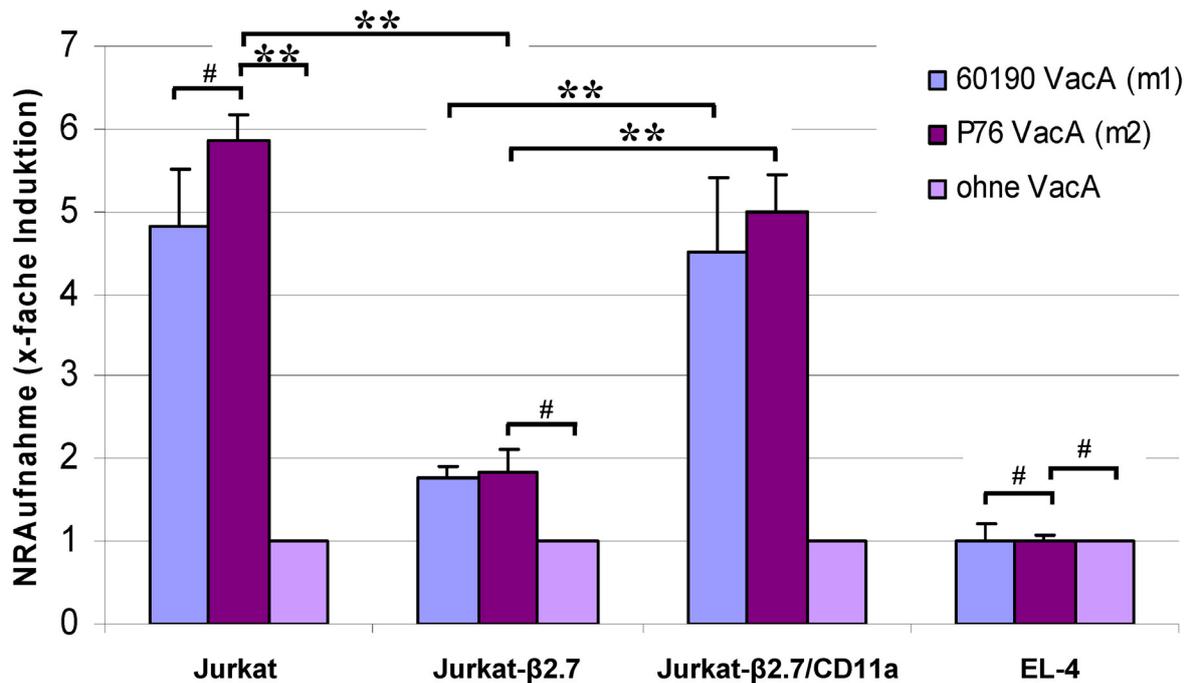


Abb. 32: Abhängigkeit der durch m2VacA induzierten Vakuolisierung von T-Lymphocyten Zelllinien von funktionellem CD18 auf der Zelloberfläche (nach Sewald *et al.*,2008 [280])

Die VacA induzierte Vakuolisierung von Jurkat Wildtyp Zellen, Jurkat-β2.7 Zellen mit einer Defizienz der Integrinuntereinheit CD18 an der Zelloberfläche, CD11a komplementierten Jurkat-β2.7 Zellen und murinen EL-4 T-Zellen wurde durch die Quantifizierung der Neutralrot(NR)-Aufnahme gemessen. Die Vakuolisierungsrate ist dargestellt in x-facher Induktion im Vergleich mit Zellen ohne VacA Behandlung. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Student-t-Test bestimmt. ** ($p < 0,01$); # (nicht signifikant)

3.3.2. Co-Lokalisation von VacA und CD29 auf T-Lymphocyten

Um weitere Rezeptoren von VacA auf der Oberfläche der Zielzellen zu identifizieren, wurden zunächst Co-Lokalisationsstudien an T-Lymphocyten durchgeführt. Dabei wurden die, neben den dominierenden β_2 -Integrinen, ebenso vorliegenden β_1 -Integrine (CD29) genauer untersucht. β_1 -Integrine bilden die größte Gruppe der durch Kombination von α - und β -Ketten zugrundeliegenden Integrin-Familie. Zu dieser Gruppe gehören die meisten Rezeptoren für extrazelluläre Matrix-Proteine, so auch die für Laminin und Collagen.

3.3.2.1. Präsentation von CD29 auf Jurkat T-Zellen

Zunächst sollte geklärt werden, ob die bisher verwendeten T-Zelllinien Jurkat, Jurkat-β2.7 und Jurkat-β2.7/CD11a β_1 -Integrine produzieren und diese auf der Oberfläche präsentieren. Bei den bisherigen Arbeiten mit diesen Zelllinien war lediglich das Vorkommen von

β_2 -Integrin regelmäßig überprüft worden. Da aber auch β_2 -Integrin-negative Zellen durch VacA in einem geringen Maß zur Bildung von Vakuolen induziert werden, deutet dies auf einen weiteren, β_2 -Integrin unabhängigen Aufnahmeweg für VacA bei diesen Zellen hin.

Jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden in einem Doppelansatz für die Färbung von CD29 und für die Negativkontrolle eingesetzt. Es wurde ein Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen CD29 (FITC hamster anti rat CD29, BD Pharmingen) zugegeben und 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen im Durchflusszytometer ermittelt (Abb. 33). Dabei war erkennbar, dass bei allen drei Zelllinien in großem Umfang β_1 -Integrine an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Die Zelllinie Jurkat- $\beta_2.7$, welche LFA-1 defizient ist, zeigt zwar eine geringere Menge CD29 an der Zelloberfläche als die Jurkat Wildtyp-Zelllinie, dennoch ist bei ihr eine deutliche Präsentation von CD29 zu erkennen. Deshalb sollte in weiteren Versuchen eine mögliche Interaktion von VacA mit CD29 untersucht werden.

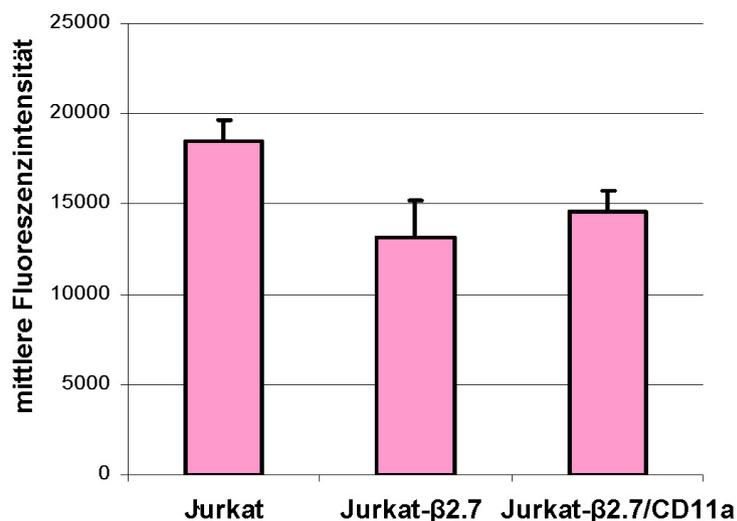


Abb. 33: Oberflächenpräsentation von CD29

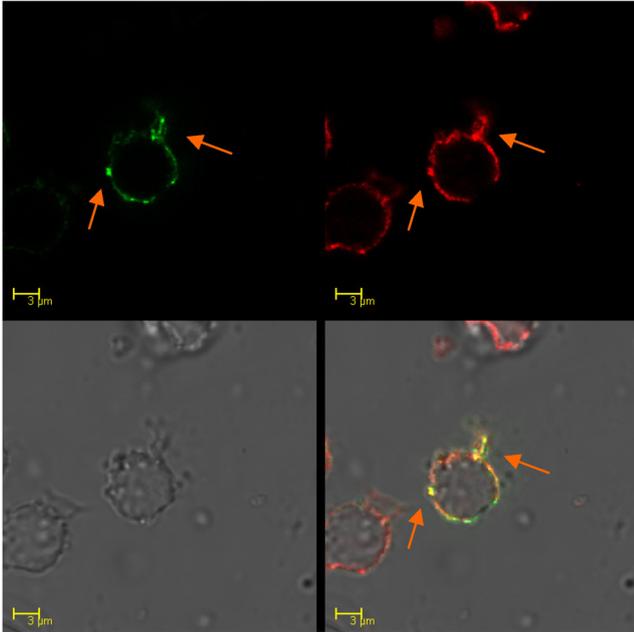
Jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen der Zelllinien Jurkat, Jurkat- $\beta_2.7$ und Jurkat- $\beta_2.7/CD11a$ wurden in 200 μ l PBS mit 1 μ l eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers gegen CD29 (FITC hamster anti rat CD29, BD Pharmingen) für 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Es wurden standardmäßig 10.000 Zellen im Durchflusszytometer gezählt und die mittlere Fluoreszenzintensität quantifiziert. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.2.2. Lokalisation von VacA und CD29 auf Jurkat T-Zellen

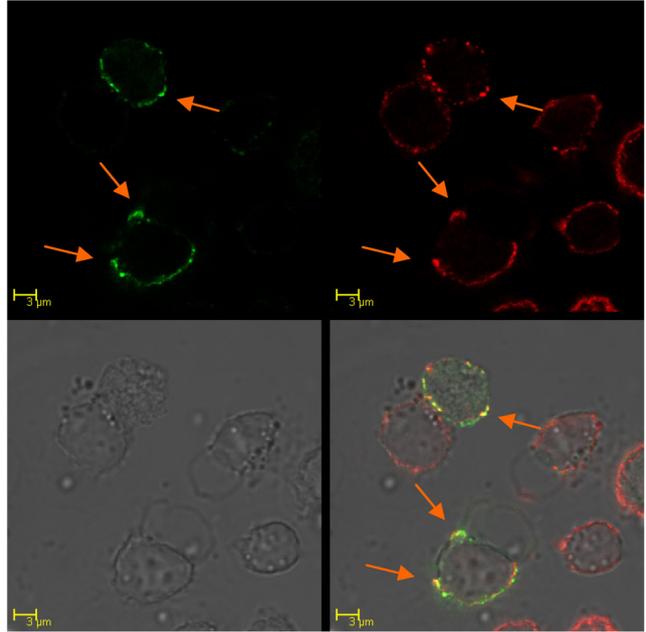
Um eine mögliche Interaktion von CD29 mit VacA zu überprüfen, sollte die Lokalisation von CD29 und VacA auf den T-Lymphocyten Zelllinien Jurkat, Jurkat- β 2.7 und Jurkat- β 2.7/CD11a mikroskopisch untersucht werden. Für die Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen wurden jeweils 5×10^5 Zellen mit $0,5 \mu\text{g}$ Alexa488-gekoppeltem, säureaktiviertem VacA versetzt und für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei kommt es zur Bindung von VacA an die Zellen. Eine Aufnahme von VacA wurde durch das Heruntersetzen der Temperatur auf 4°C verhindert. Die Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin überschichtete Deckgläschen zentrifugiert und anschließend mit PFA fixiert. Der gegen CD29 gerichtete Antikörper AIIB2 [233] wurde zugegeben und 1 Stunde bei 4°C auf den Zellen belassen. Anschließend wurde das Präparat mit dem Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper *Alexa-fluor555 goat-anti-rat IgG* (Invitrogen) gefärbt. Die Mikroskopie wurde an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica SP5) bei den Wellenlängen 488 nm und 561 nm durchgeführt. Als Kontrollen wurden Präparate, denen kein Antikörper AIIB2 oder kein VacA zugegeben worden war, verwendet.

Es zeigte sich eine deutliche Überlagerung von VacA (grün) und CD29 (rot) an der Zelloberfläche (Abb. 34). Dabei galt eine besondere Aufmerksamkeit der CD18 defizienten Zelllinie Jurkat- β 2.7, da bei diesen Zellen der bereits identifizierte Rezeptor für VacA CD18 nicht vorhanden ist. Doch auch in diesem Fall kommt es zu einer massiven Bindung von VacA, welche sich größtenteils in einer Überlagerung mit CD29 äußert. Es ist jedoch auch zu erkennen, dass VacA nicht ausschließlich an CD29 oder CD18 bindet.

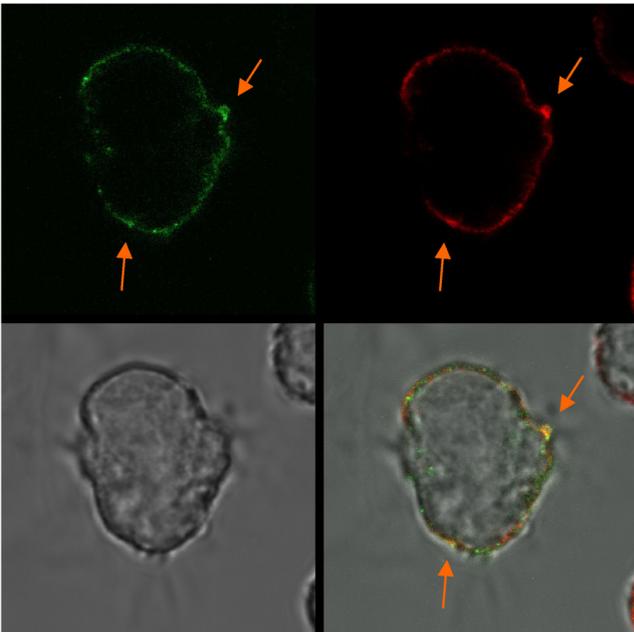
Jurkat



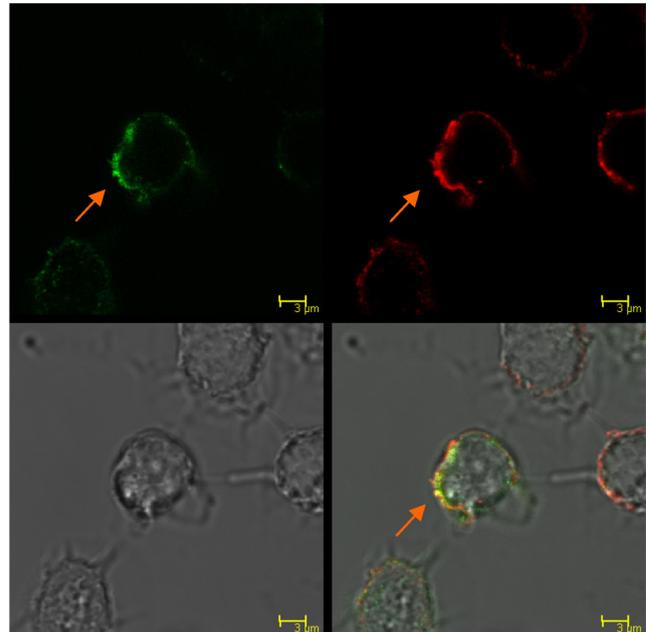
Jurkat



Jurkat-β2.7



Jurkat-β2.7



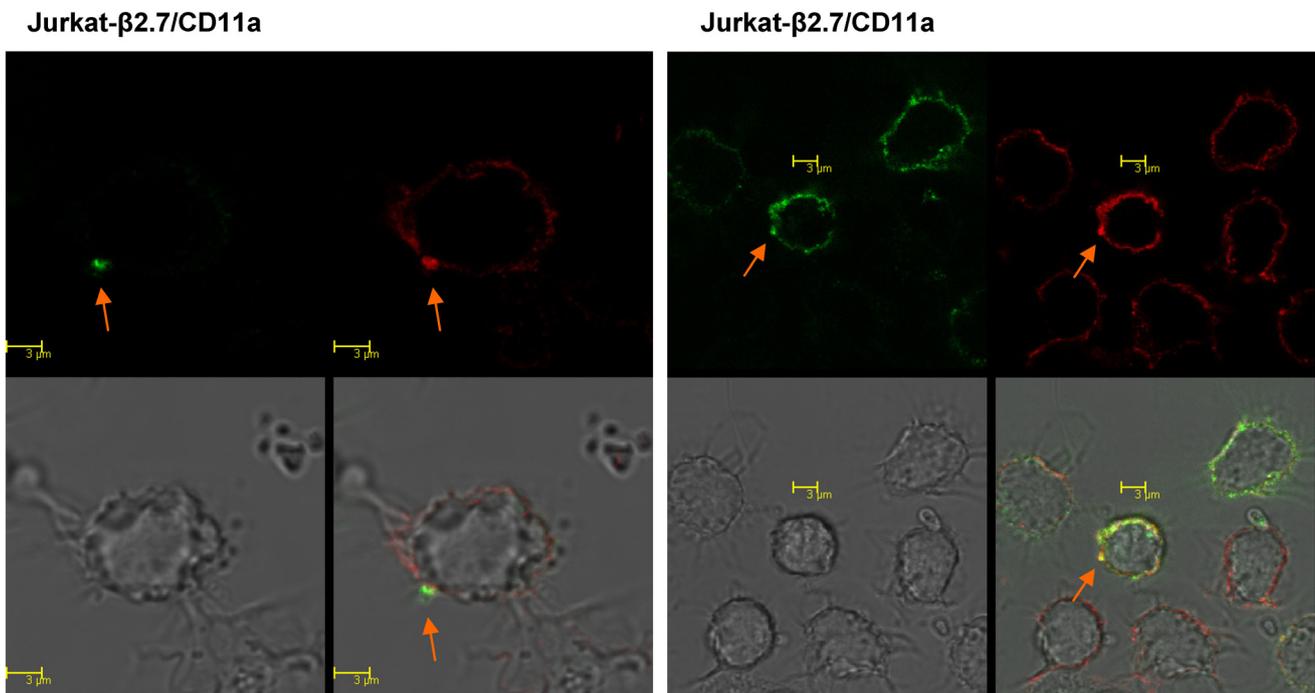


Abb. 34: Co-Lokalisation von VacA und CD29

Den T-Lymphocyten Zelllinien Jurkat, Jurkat-β2.7 und Jurkat-β2.7/CD11a wurde VacA-Alexa488 zugegeben und für 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gegen CD29 gerichtete Antikörper AIB2 zugefügt und mittels eines Alexa555-gekoppelten Sekundärantikörpers gefärbt. Die Zellen wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei den Wellenlängen 488 nm und 561 nm mikroskopiert. In der Abbildung sind die Phasenkontrast-Bilder, CD29 (rot), VacA (grün) und die überlagerten Bilder dargestellt. Bereiche starker Co-Lokalisation von VacA und CD29 sind mit orangen Pfeilen hervorgehoben.

3.3.3. Direkte Interaktion von VacA und CD29

Bisher konnte gezeigt werden, dass VacA auf Jurkat Wildtyp und Jurkat CD18 defizienten T-Zelllinien in räumlicher Nähe zu CD29 lokalisiert ist. Ob CD29 jedoch neben CD18 einen Rezeptor für VacA darstellt, muss durch den Nachweis einer direkten Interaktion zwischen VacA und CD29 erbracht werden. Dies sollte durch eine Präzipitation von VacA mit CD29 mittels Western-Blot Analyse geklärt werden.

Zu diesem Zweck wurde aufgereinigtes Integrin $\alpha_5\beta_1$ (Chemicon) an magnetische Kugeln (*SiMAG-Carboxyl magnetic beads*, Chemicell) gekoppelt. Je 2 μg säureaktiviertes VacA der *H. pylori* Stämme 60190 (m1VacA) und P76 (m2VacA) wurden in HSL-Puffer zu den Integrin Ansätzen gegeben. Nach einer Inkubationsphase wurden die Ansätze gewaschen und das an Integrin $\alpha_5\beta_1$ gekoppelte VacA durch Kochen in SDS-Probenpuffer abgelöst. Es folgte der Nachweis von VacA über eine Auftrennung im SDS-Gel und anschließender Detektion durch den VacA-spezifischen Antikörper AK197. Als Kontrollen wurden Proben mit magnetischen Kugeln ohne gekoppeltes Integrin mitgeführt. Wie in Abb. 35 zu erkennen ist, konnte mit Integrin $\alpha_5\beta_1$ spezifisch VacA co-präzipitiert werden. Dabei konnte eine direkte Bindung von sowohl m1VacA als auch von m2VacA an Integrin $\alpha_5\beta_1$ gezeigt werden. In dem Kontroll-Ansatz des m1VacA ist eine sehr schwache Bande im Western-Blot zu erkennen. Dabei handelt es sich allerdings lediglich um Proteinrückstände, welche während der Waschschrte nicht vollständig aus der Probe herausgelöst wurden.

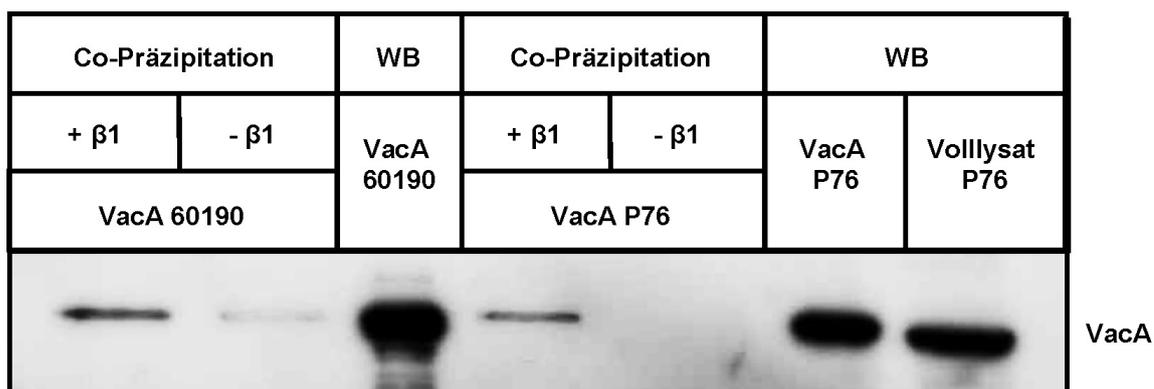


Abb. 35: Direkte Interaktion von VacA mit aufgereinigtem Integrin $\alpha_5\beta_1$

Gereinigtes Integrin $\alpha_5\beta_1$ wurde kovalent an magnetische Kugeln über die Carbodiimide Methode gekoppelt. Zu den Ansätzen wurden 2 μg säureaktiviertes VacA der *H. pylori* Stämme 60190 (m1VacA) und P76 (m2VacA) zugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Über das Waschen der Proben im Magnetfeld wurden nicht gebundene Proteine entfernt. Verbleibendes VacA wurde anschließend mittels Western-Blot Analyse detektiert. Als Kontrollen dienen Lysate von P76-Zellen, 60190 VacA und P76 VacA.

Es war in dieser Versuchsdurchführung nicht möglich, in einem weiteren Western-Blot auch Integrin $\alpha_5\beta_1$ nachzuweisen, da dieses über eine kovalente Bindung an die magnetischen Kugeln gekoppelt worden war, welche sich nicht durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer lösen lässt.

Deshalb sollte in einem weiteren Präzipitationsversuch die direkte Anlagerung von VacA an Integrin auf der Grundlage von Membranpräparationen nachgewiesen werden. Dazu wurden Membranen der Zelllinien GE11 und GE11 β über Ultraschall solubilisiert und mittels Ultrazentrifugation präpariert. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um murine epithelähnliche Integrin β_1 Knockout Embryonalzellen, wobei GE11 β -Zellen mit humanem Integrin β_1 komplementiert wurden. Säureaktiviertes VacA der *H. pylori* Stämme 60190 (m1) und P76 (m2) wurde den Membranen zugegeben. Die Präzipitation erfolgte mit Hilfe des Antikörpers AB1952 (Chemicon), welcher an die cytoplasmatische Domäne von CD29 bindet, und Protein G Agarose (Roche). Mittels Western-Blot Analyse wurde die Fällung von CD29 und VacA in den Proben überprüft. In Abb. 36 ist zu erkennen, dass VacA spezifisch mit Integrin β_1 co-präzipitiert werden kann, auch wenn dieses nicht aufgereinigt sondern im Membranverband vorliegt. In den Ansätzen mit Membranen der Kontrollzelllinie GE11, welche kein Integrin β_1 produziert, konnte kein VacA nachgewiesen werden. Membranpräparationen der Zelllinie GE11 β hingegen ermöglichen eine Bindung und anschließende Fällung von sowohl m1 also auch m2VacA.

Anhand der Präzipitations-Versuche konnte eine direkte Bindung von VacA an Integrin β_1 nachgewiesen werden.

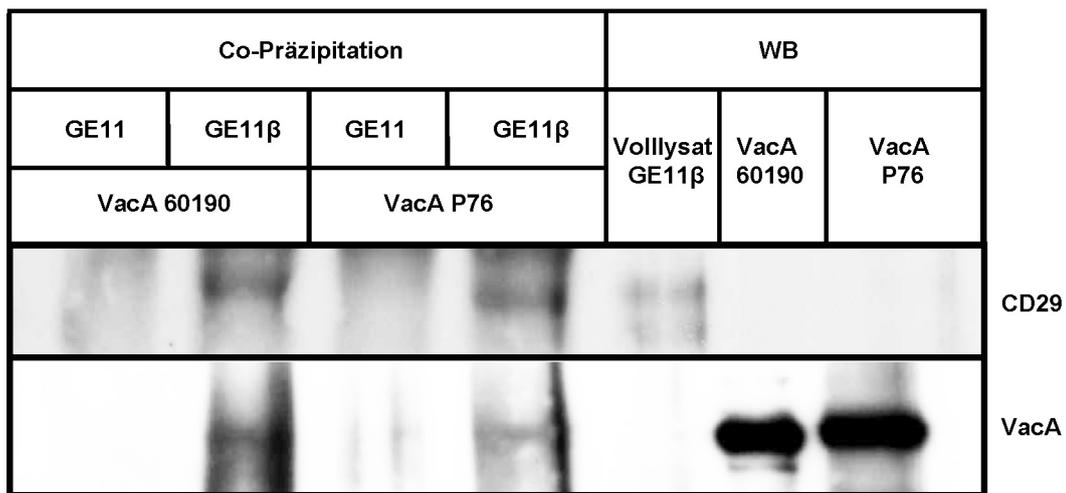


Abb. 36: Direkte Interaktion von VacA mit Integrin β_1 aus Membranpräparationen

Membranen der Zelllinien GE11 und GE11 β wurden solubilisiert und mittels Ultrazentrifugation präpariert. Zu den Ansätzen wurde 1 μ g säureaktiviertes VacA der *H. pylori* Stämme 60190 (m1VacA) und P76 (m2VacA) über Nacht zugegeben. CD29 und daran gebundenes VacA wurden mit Hilfe des Antikörpers AB1952 und Protein G Agarose präzipitiert und die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde VacA und CD29 mittels Western-Blot Analyse detektiert. Als Kontrollen wurden Lysate von GE11 β -Zellen, 60190 VacA und P76 VacA mit aufgetragen.

VacA oligomerisiert im Kulturüberstand zu hexameren Ringen, welche sich zu dodecameren Komplexen zusammenlagern. Im Folgenden sollte überprüft werden, inwieweit VacA-Oligomere zur Bindung an CD29 befähigt sind. Da ein saurer (pH<4) oder alkalischer pH-Wert (pH>9) zum Zerfall des VacA-Komplexes führt [37,142], wurde für die folgenden Präzipitationsversuche die obligatorische Säureaktivierung des VacA unterlassen. Gereinigtes, an magnetische Kugeln gekoppeltes Integrin $\alpha_5\beta_1$ wurde mit je 2 μ g nicht säureaktiviertem und säureaktiviertem VacA der Stämme 60190 (m1) und P76 (m2) inkubiert. Nachdem überschüssiges VacA weggewaschen worden war, folgte der Nachweis von VacA über eine Auftrennung im SDS-Gel und anschließender Western-Blot Analyse (Abb. 37). Als Kontrollen wurden Proben mit magnetischen Kugeln ohne gekoppeltes Integrin mitgeführt. VacA bindet in der hexameren und dodecameren Form sehr viel schlechter an CD29 als die, durch einen sauren pH-Wert hervorgerufene monomere Form. Das heißt, die Interaktion von CD29 und VacA ist effizienter wenn VacA in seiner monomeren Form vorliegt.

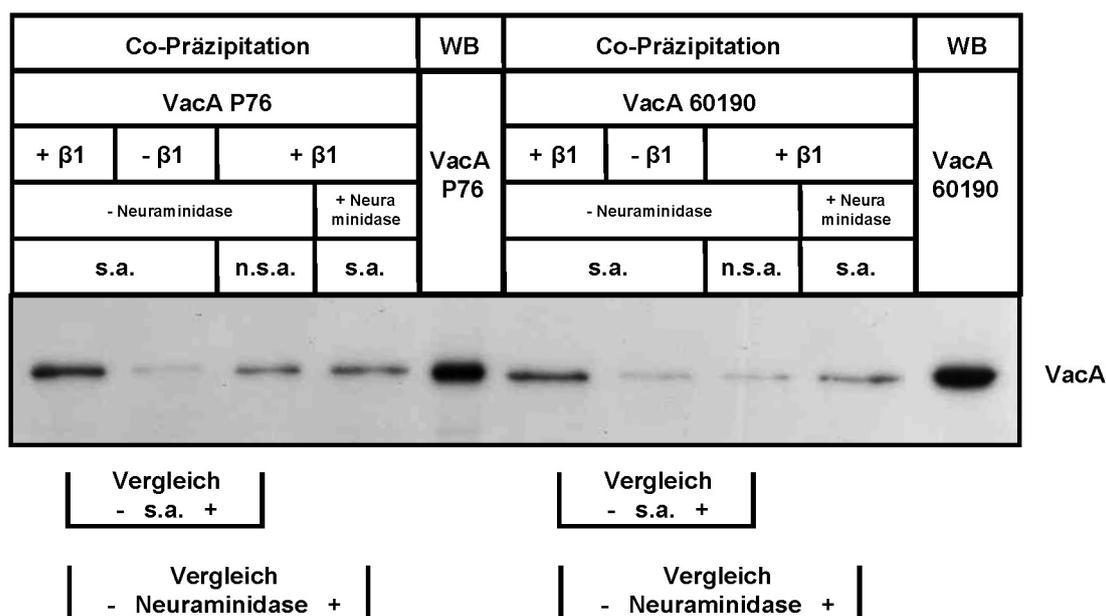


Abb. 37: Interaktion von VacA und CD29 unter den Gesichtspunkten der VacA-Oligomerisierung und der CD29-Glycolisierung

Magnetische Kugeln mit gekoppeltem Integrin $\alpha_5\beta_1$ wurden mit 4 mU Neuraminidase behandelt. 2 μ g/ml säureaktiviertes und nicht-säureaktiviertes VacA der *H. pylori* Stämme 60190 und P76 wurde zu den Ansätzen der behandelten und unbehandelten Kugeln gegeben. Nach einer 1 stündigen Inkubationsphase wurde überschüssiges Protein aus den Ansätzen durch mehrmaliges Waschen im Magnetfeld entfernt. Präzipitiertes VacA wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und über Western-Blot Analyse mit dem Anti-VacA-Antikörper AK197 detektiert. Als Kontrollen dienten Lysate von 60190 VacA und P76 VacA. (s.a. = säureaktiviert; n.s.a. = nicht säureaktiviert)

Für die Bindung von VacA an die Rezeptoren RPTP α und RPTP β von Epithelzellen wurde gezeigt, dass sie auf einer Interaktion von VacA und Oligosacchariden beruht [244]. Sialyl-Reste spielen dabei eine entscheidende Rolle. So führt eine Abspaltung von Oligosacchariden mit dem Enzym Neuraminidase zur Inhibierung der direkten Bindung von VacA an RPTP α und RPTP β . Eine Deletion der glycolisierten Aminosäure-Reste von RPTP α und RPTP β entspricht demselben Effekt. Auch Integrine sind Glycoproteine, bei denen die heterodimere Form der Verbindung zweier Glykoprotein-Ketten entspricht. Die Wirkung einer Neuraminidase Behandlung von CD29 auf die Interaktion mit VacA sollte im folgenden Teil untersucht werden. Dabei wurden magnetische Kugeln mit gekoppeltem Integrin $\alpha_5\beta_1$ zuerst in Neuraminidase-Puffer gewaschen und anschließend in diesem aufgenommen. Neuraminidase (Fluca) wurde zugegeben und der Ansatz 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Puffer abgenommen und durch HSL-Puffer ersetzt. 2 μ g säureaktiviertes VacA der

Stämme 60190 (m1) und P76 (m2) wurde zu den Ansätzen gegeben. Der Nachweis von gefälltem VacA folgte über eine Western-Blot Analyse (Abb. 37). Als Kontrollen wurden magnetische Kugeln mit unbehandeltem Integrin $\alpha_5\beta_1$ und ohne gekoppeltes Integrin mitgeführt.

Wie sich zeigte, wird das Bindevermögen von VacA an CD29 durch eine Neuraminidase-Behandlung des Integrins reduziert. VacA wird nicht mehr im gleichen Umfang präzipitiert wie es bei der Vergleichskontrolle mit unbehandeltem Integrin der Fall ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung von VacA an CD29 über Oligosaccharide erfolgt, und somit der VacA-Bindung an RPTP α und RPTP β gleicht.

Um auszuschließen, dass VacA in den vorangegangenen Experimenten an die α_5 -Untereinheit des gereinigten und auf den Zelllinien GE11 und GE11 β vorkommenden Integrins $\alpha_5\beta_1$ bindet, wurden weitere Präzipitationen mit gereinigtem Integrin $\alpha_1\beta_1$ (Chemicon) durchgeführt. Es wurde wie bereits für $\alpha_5\beta_1$ -Integrin beschrieben, an magnetische Kugeln gekoppelt und mit 2 μ g säureaktiviertem VacA des *H. pylori* Stamms 60190 inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit HSL-Puffer gewaschen und das gekoppelte VacA durch Kochen in SDS-Probenpuffer abgelöst. Es folgte der Nachweis von VacA über eine Western-Blot Analyse mit dem VacA-spezifischen Antikörper AK197 (Abb.38). Als Kontrollen wurden Proben mit magnetischen Kugeln ohne gekoppeltes Integrin mitgeführt.

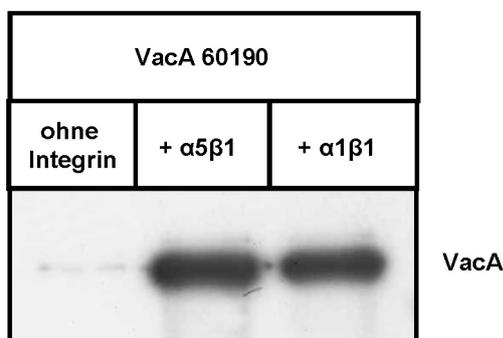


Abb. 38: Direkte Interaktion von VacA mit aufgereinigtem Integrin $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_1\beta_1$

Gereinigtes Integrin $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_1\beta_1$ wurde kovalent an magnetische Kugeln gekoppelt. Zu den Ansätzen wurde 2 μ g säureaktiviertes VacA des *H. pylori* Stamms 60190 zugegeben und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden anschließend über das Waschen der Proben im Magnetfeld entfernt. Verbleibendes VacA wurde mittels Western-Blot Analyse detektiert.

3.3.4. Wechselwirkungen von VacA mit CD29 auf Epithelzellen

Nachdem für Epithelzellen neben den bereits bekannten Rezeptoren RPTP α und RPTP β ein weiterer Rezeptor für VacA postuliert worden war [199], sollte nun im Zuge dieser Arbeit überprüft werden, ob CD29 eine solche Rolle übernehmen kann. Wie Skibinski und Kollegen bereits 2005 schlussfolgerten, muss es neben den bis dahin bekannten, für die Vakuolisierung von HeLa Zellen nicht essentiellen Rezeptoren, mindestens einen weiteren VacA-Rezeptor geben.

Die Rolle der Interaktion von CD29 mit VacA auf Epithelzellen wurde in den nächsten Abschnitten unter den Gesichtspunkten der Vakuolisierungseffizienz, der VacA-Bindung und der Aufnahme von VacA in die Zielzelle näher untersucht.

3.3.4.1. CD29 ist essentiell für VacA-induzierte Vakuolisierung

Ob CD29 die funktionelle Aufnahme in Epithelzellen und somit die Vakuolisierung ermöglicht, sollte mittels der CD29-negativen GE11 und β -2-4 (-/-) Zelllinien und ihren CD29-positiven Komplementanten GE11 β und β -2-4-8 (+/+) gezeigt werden. Bei den Zelllinien GE11 und GE11 β handelt es sich, wie bereits in einem vorherigen Kapitel beschrieben, um murine Epithelzell-ähnliche Integrin β_1 Knockout Embryonalzellen, wobei GE11 β -Zellen mit einer humanen Integrin β_1 Untereinheit komplementiert wurden. Die Zelllinien β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) sind charakterisiert als murine Fibroblasten-ähnliche Integrin β_1 Knockout Embryonalzellen. β -2-4-8 (+/+) -Zellen wurden mit murinem Integrin β_1 komplementiert.

Für die Interaktionsstudien wurde die Bildung saurer Vakuolen mittels Neutralrotfärbung quantifiziert. Hierfür wurden die Zellen jeweils mit 1 μ g/ml säureaktiviertem VacA versetzt, nach 4 stündiger Inkubation Ammoniumchlorid zugegeben und anschließend mit Neutralrot angefärbt. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese lysiert und die Menge des aufgenommenen Neutralrots quantifiziert. Wie in Abb. 39 zu sehen ist, zeigten die mit Integrin β_1 komplementierten Zelllinien GE11 β und β -2-4-8 (+/+) ein höheres Vakuolisierungsniveau als ihre jeweiligen CD29 defizienten Ausgangszelllinien GE11 und β -2-4 (-/-). Die Vakuolisierungseffizienz in diesen Zelllinien ist grundsätzlich eher gering. Die Ermittlung der Signifikanz anhand des Mann-Whitney-U-Tests zeigte aber, dass die Unterschiede in den Vakuolisierungsraten der CD29-positiven zu den CD29-negativen Zelllinien signifikant sind. Dies zeigt deutlich, dass CD29 für eine funktionelle Aufnahme zur Vakuolisierung der Zielzelle durch VacA nötig ist.

Gleichzeitig stellt dieses Ergebnis einen Kontrast zur Wirkung von VacA auf murinen T-Zellen dar, welche eine Resistenz gegenüber VacA zeigen. Murines Integrin β_1 auf Epithelzellen induziert hingegen die Bildung saurer Vakuolen in Epithelzellen durch VacA.

Dass auch CD29-negative Zellen ein geringes Maß an Vakuolisierung aufweisen, kann auf einen weiteren CD29-unabhängigen Aufnahmeweg für VacA hinweisen.

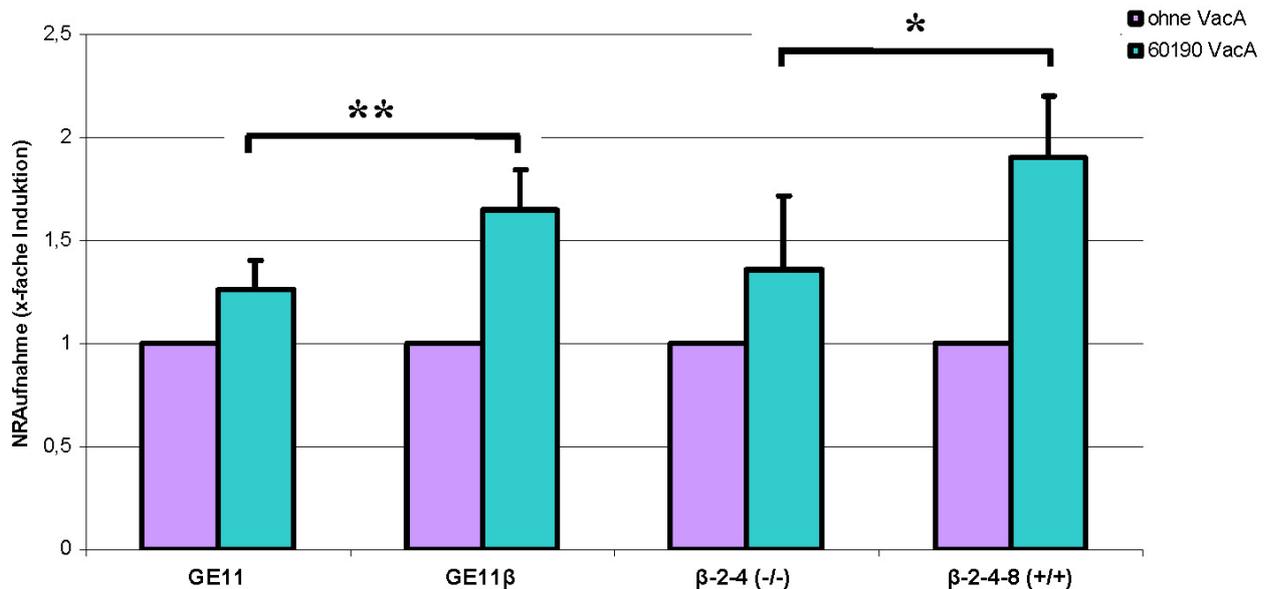


Abb. 39: CD29 abhängige Vakuolisierung von Epithelzellen

Die Zelllinien GE11, GE11 β , β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) wurden jeweils mit 1 μ g/ml säureaktiviertem VacA inkubiert. Nach Zugabe von Ammoniumchlorid wurden die gebildeten sauren Vakuolen mit Neutralrot gefärbt. Nach Lyse der Zellen wurde die Menge an Neutralrot, welche sich in den Vakuolen angesammelt hatte, freigesetzt und bei einer Wellenlänge von 495 nm quantifiziert. Die Werte der Ansätze ohne VacA wurden als 1-fach gesetzt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$)

3.3.4.2. Bindung von VacA an Zellen abhängig von CD29

Im nächsten Schritt sollte die Bindung von VacA an die CD29-negativen GE11 und β -2-4 (-/-) Zelllinien und ihren CD29-positiven Komplementanten GE11 β und β -2-4-8 (+/+) untersucht werden.

Zu jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen der Zelllinien HeLa, GE11, GE11 β , β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) wurden 250 ng im Vorfeld säureaktiviertes Alexa488-gekoppeltes VacA zugegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit dem Toxin für 20 Minuten bei 4°C, wobei durch die niedrige Temperatur eine Aufnahme von VacA verhindert wurde. Anschließend wurde die Bindung

von VacA-Alexa488 mittels FACS-Analyse quantifiziert. Dabei wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von jeweils 10.000 Zellen gemessen.

Vergleicht man die Mengen von zellgebundenem VacA relativ zu der Vergleichszelllinie HeLa (Abb. 40), sieht man, dass die VacA-Bindung an die CD29-defizienten Epithelzellen GE11 und β -2-4 (-/-) nicht reduziert ist.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Erkenntnissen über bereits bekannte VacA-Rezeptoren für Epithelzelllinien. So bindet VacA unter anderem an den Rezeptor RPTP β , dieser ist allerdings für die Vakuolisierungsaktivität in HeLa-Zellen nicht essentiell [199]. Deshalb sind zwischen den CD29-negativen und -positiven Epithelzelllinien keine Unterschiede in der VacA Bindung zu erwarten.

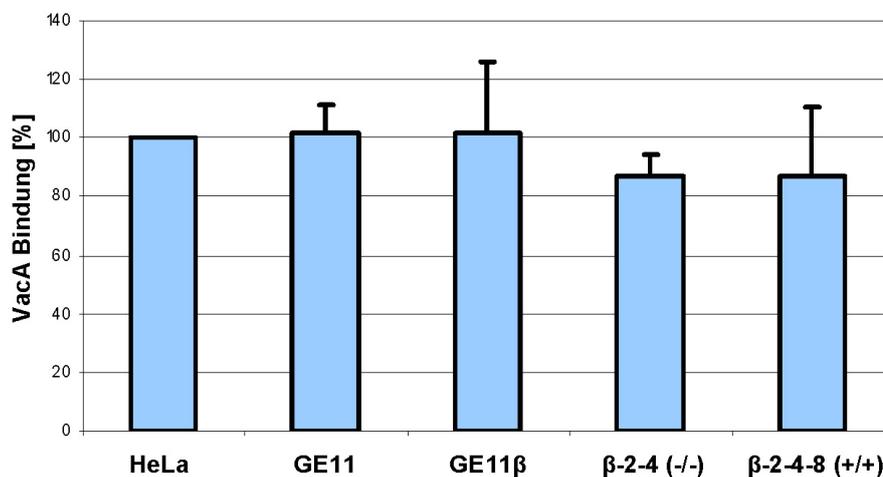


Abb. 40: Quantifizierung der VacA-Bindung an Epithelzellen

Jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen der Zelllinien HeLa, GE11, GE11 β , β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) wurden mit 250 ng säureaktiviertem VacA-Alexa488 bei 4°C für 20 min inkubiert. Die Ansätze wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und die Fluoreszenz mittels FACS-Analyse quantifiziert. Der Wert von gebundenem VacA an die HeLa-Vergleichszelllinie wurde als 100% gesetzt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.4.3. VacA Aufnahme abhängig von CD29

Im Folgenden sollte nun die Aufnahme von VacA durch Zellen der Zelllinien GE11, GE11 β , β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) untersucht werden. Mittels FACS-Analyse wurde dieser Mechanismus quantifiziert. Dabei wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen mit 250 ng säureaktiviertem VacA-Alexa488 für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, um eine anfängliche Bindung von VacA zu ermöglichen. Ungebundenes VacA wurde anschließend durch einen Waschschrift mit PBS entfernt. Danach erfolgte eine weitere Inkubationsphase für 40 Minuten

bei 37°C. Während dieser Zeit wurde das gebundene VacA in die Zellen aufgenommen. Die Fluoreszenz von oberflächen-gebundenem VacA-Alexa488 wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen Alexa488 unterdrückt, so dass nur aufgenommenes VacA-Alexa488 quantifiziert wurde. Die „Quenching“-Effizienz des Antikörpers lag bei ~80% (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenz der CD29-negativen Zellen wurde jeweils als 100% gesetzt.

In Abb. 41 ist zu sehen, dass bei GE11 β -Zellen keine vermehrte VacA-Aufnahme im Vergleich zu der Ursprungszelllinie ohne Integrin β_1 GE11 besteht. Hingegen ist zwischen den Integrin β_1 -positiven und -negativen Zelllinien β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) ein deutlicher Unterschied in der VacA-Aufnahme zu erkennen. VacA wird durch β -2-4-8 (+/+) -Zellen ca. 0,5-fach besser aufgenommen als durch die CD29-defiziente Ursprungszelllinie. Dabei ist auch die absolute Menge an gebundenem und aufgenommenem VacA (VacA total) höher. Allerdings in ähnlicher Effizienz wie nach dem „Quenching“ des oberflächen-gebundenem VacA-Alexa488, was darauf hindeutet, dass in der verwendeten Versuchsanordnung sehr speziell die Aufnahme von VacA in die Zielzelle beobachtet und quantifiziert werden kann.

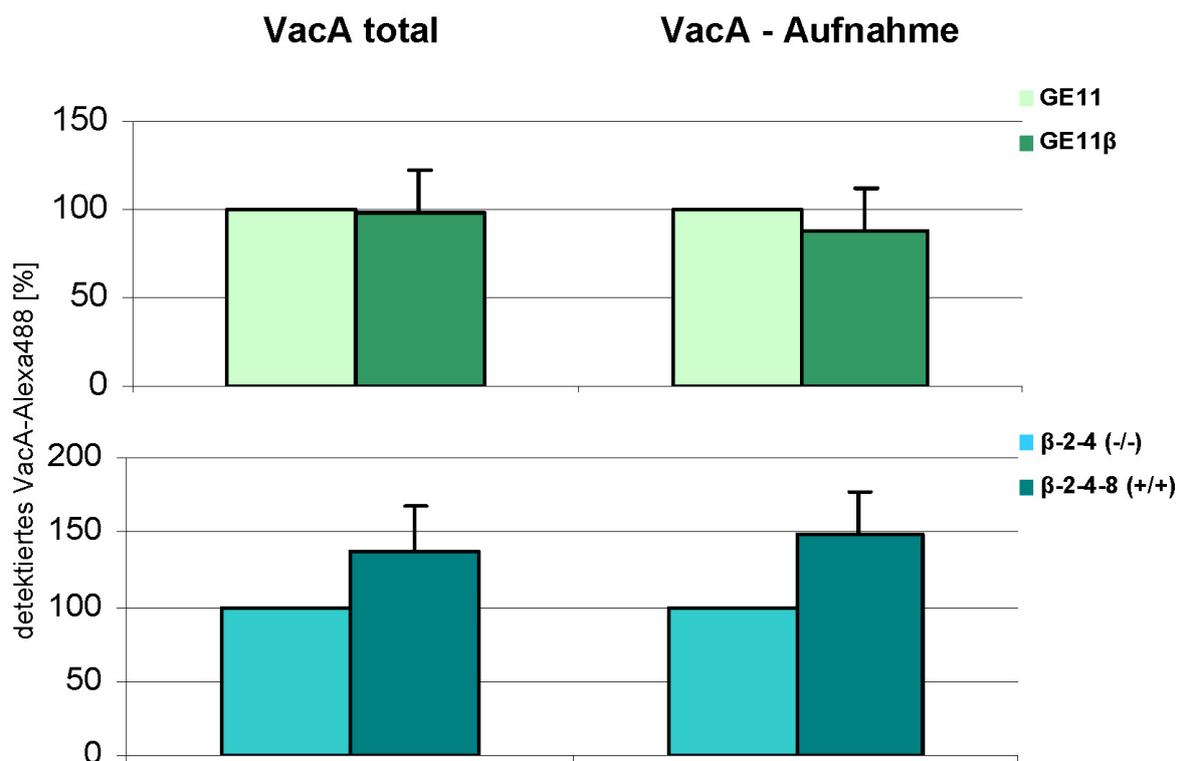


Abb. 41: Quantifizierung der VacA-Aufnahme

Jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen der Zelllinien GE11, GE11 β , β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) wurden in 100 μ l PBS verdünnt. Zu den Zellen wurde 250 ng säureaktiviertes VacA-Alexa488 gegeben. Es folgte eine 20 minütige Inkubation bei 4°C. Ungebundenes VacA wurde durch einen Waschschrift mit PBS entfernt. Eine weitere Inkubationsphase für 40 Minuten bei 37°C ermöglichte die Aufnahme von VacA in die

Zellen. Die Fluoreszenz von oberflächen-gebundenem VacA wurde für die Messung der VacA-Aufnahme mit einem monoklonalen Antikörper gegen Alexa488 (Molecular Probes) unterdrückt. Aufgenommenes und gebundenes VacA-Alexa488 wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die Fluoreszenz der CD29-negativen Zellen wurde für „VacA total“ und „VacA-Aufnahme“ jeweils als 100% gesetzt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

4. Diskussion

Im Verlaufe seiner langen Assoziation mit dem Menschen als Wirt [123] hat es das Bakterium *H. pylori* geschafft, sich perfekt an seine ökologische Nische, den menschlichen Magen, anzupassen. Dabei gelingt es dem Bakterium in beeindruckender Weise, sich in seiner Nische zu etablieren und gleichzeitig dem Immunsystem über Jahre bis Jahrzehnte zu entgehen. Zu diesem Zweck besitzt *H. pylori* eine Reihe von Virulenzfaktoren, welche ihm helfen, das unwirtliche Milieu des Magens dauerhaft zu besiedeln.

Dazu gehören unter anderem eine Reihe von Adhäsinen aus der Gruppe der äußeren Membranproteine. Das Polypeptid-Adhäsin BabA bindet dabei an das Blutgruppenantigen Lewis^b, welches zu den dominanten Antigenen des menschlichen Magenepithels und der Magenmucosa gehört. So verhindert *H. pylori* sein Auswaschen aus dem Magenlumen und entgeht zudem dem dort vorherrschenden sauren pH-Wert.

Außerdem führen von *H. pylori* produzierte Faktoren zur Modulation oder gar Hemmung der Immunreaktion. Das sekretierte Cytotoxin VacA stört die Antigenpräsentation von B-Lymphocyten [144] und greift zudem hemmend in die T-Lymphocyten Proliferation durch eine Störung der IL2-Produktion ein [21,74,208]. Dies findet auf Ebene der Transkription statt, indem VacA die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT in den Kern verhindert [21,74]. Für eine lebenslange Persistenz des Bakteriums im Menschen ist es offensichtlich von äußerster Wichtigkeit, der Immunantwort des Wirts zu entgehen.

4.1. Genetische Manipulation von *H. pylori*

Um bestimmte Virulenzfaktoren von *H. pylori* besser charakterisieren zu können und dabei mehr über ihre Funktionen und ihre Interaktionen mit Zellen zu erfahren, stellt die Komplementation von Genen eine allgemein wichtige Methode dar. Dabei hat die episomale Komplementation gegenüber der chromosomalen Komplementation einige Vorteile. So ist die korrekte Rekombination der Gene in das bakterielle Chromosom eine Grundvoraussetzung der chromosomalen Komplementation. Da dies allerdings nicht immer ohne Schwierigkeiten und Folgeschäden im Chromosom, besonders in Operonstrukturen, zu erreichen ist, bietet hier die Gen-Expression von nicht-integrativen Vektoren eine brauchbare Alternative.

Zu diesem Zweck wurden die *E. coli* / *H. pylori* Shuttle-Vektoren pHel2 und pHel3 auf der Grundlage von kryptischen *H. pylori*-Plasmiden konstruiert [94]. Sie ermöglichen eine Klonierung von Genen in *E. coli* und eine anschließende Übertragung durch Konjugation oder Transformation in *H. pylori*. In einigen Fällen konnte dieses Verfahren erfolgreich angewandt

werden [94,181,246], jedoch treten bei vielen *H. pylori*-spezifischen Proteinen Schwierigkeiten auf. Denn die Shuttle-Vektoren pHel2 und pHel3 haben den Nachteil, dass die klonierten Gene im heterologen System exprimiert werden. Vor allem die äußeren Membranproteine von *H. pylori* zeigen dabei einen toxischen Effekt auf *E. coli*. In der Vergangenheit wurde für solche Klonierungsarbeiten das so genannte *shuttle-vector-based-OMP-expression-system* (SOMPES) genutzt [66]. Es basiert auf zwei Vektoren, die jeweils Teilfragmente des zu klonierenden Gens enthalten und durch Rekombination von überlappenden Sequenzabschnitten in *H. pylori* wieder ein funktionelles Gen bilden. Da dieses System allerdings sehr umständlich ist und nicht für alle OMP's funktioniert, war es nötig in einem neuen Lösungsansatz einen neuartigen *E. coli* / *H. pylori* Shuttle-Vektor zu konstruieren. In diesem Sinne entstand der Shuttle-Vektor pIB6, welcher die Klonierung von *H. pylori*-Genen in *E. coli* erlaubt, ohne in diesem heterologen System exprimiert zu werden. Dies wird über den *H. pylori*-spezifischen *alpA*-Promotor ermöglicht, der nur in *H. pylori* aktiv, in *E. coli* aber inaktiv ist. Im Zuge früherer Untersuchungen war in der stromaufwärts gelegenen Region des *alpA*-Gens keine Promotorkonsensussequenz gefunden worden [159]. Möglicherweise spielt bei der Expression dieses Gens ein alternativer σ -Faktor eine Rolle, welcher in *E. coli* nicht erkannt wird.

Die Funktionalität des Shuttle-Vektors pIB6 wurde anhand der Integration eines *luc*-Gens hinter den *alpA*-Promotor überprüft. Das Enzym Luciferase wird als Reporterprotein genutzt, um sehr sensitive quantitative Aussagen über die Aktivität von Promotoren machen zu können. Es zeigte sich, dass es sich bei dem *alpA*-Promotor in der Tat um einen *H. pylori*-spezifischen Promotor handelt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sich auch äußere *H. pylori* Membranproteine mit diesem Vektor problemlos komplementieren lassen.

Damit wurde anhand dieses neuen Vektorsystems ein wertvolles Werkzeug etabliert, welches genetische Arbeiten mit *H. pylori* deutlich vereinfacht.

4.2. Charakterisierung der Bindungseigenschaften des BabA-Adhäsins

4.2.1. Bakterielle Adhärenz

Die Adhärenz pathogener Erreger an die Wirtszelle ist oft der erste Schritt bei der Etablierung einer Infektion. Dabei binden bakterielle Faktoren, welche aus Polypeptiden oder Polysacchariden aufgebaut sein können, an Oberflächenstrukturen der Wirtszelle. Für den Wirt ist deshalb die Hemmung dieser initialen Bindung des Bakteriums von enormer Bedeutung. Unspezifische Abwehrmechanismen wie Flüssigkeitsströme in der Mundhöhle und dem Urogenitaltrakt, die Peristaltik und die ständige Erneuerung des Epithels und des Mukus im Gastrointestinaltrakt spielen dabei eine wichtige Rolle [61].

Durch die adhäsинvermittelte Kolonisation von pathogenen Mikroorganismen können eine Reihe von biologischen Prozessen initiiert werden, die für den Fortgang der Infektion eine große Bedeutung haben. So kann es zur Bildung von Mikrokolonien und Biofilmen kommen, wie im Falle von *Pseudomonas aeruginosa* [124]. Außerdem kann eine Signaltransduktion in der Wirtszelle ausgelöst werden, wie es durch die Bindung von Integrinen als Rezeptoren erfolgt [103]. Eine weitere mögliche Folge sind die Induktion von Invasionsvorgängen und die Induktion von bakteriellen Signaltransduktionsvorgängen, wie bei der P-Fimbrienvermittelten Siderophorinduktion von *E. coli* [3].

H. pylori ist mit einer außerordentlich großen Gruppe von äußeren Membranproteinen ausgestattet, von denen einige bereits als Adhäsine identifiziert werden konnten. In einer Studie mit 200 klinischen Isolaten wurde versucht, die OMP-Profile mit den Adhärenzeigenschaften der Stämme und ihrer Fähigkeit, IL-8 zu induzieren, zu korrelieren [157]. Die Produktion von acht verschiedenen OMP's, AlpA, AlpB, BabA, BabB, BabC, HP0277, SabA und OipA wurde durch Immunoblots untersucht. Auch die Produktion von CagA wurde Stamm-spezifisch nachgewiesen. Die Anzahl und die Menge der produzierten OMP's variierte stark zwischen den verschiedenen Isolaten. Die Proteine AlpA und AlpB wurden in allen 200 Stämmen in ähnlicher Menge produziert, was ihre Relevanz für *H. pylori* unterstreicht. Die anderen Proteine wurden in variabler Zahl produziert, wobei BabA, BabB, HP0227, OipA und CagA von 60-70% der Isolate produziert wurden. BabC und SabA wurden hingegen nur von einem Drittel der Stämme produziert. Auch die Adhärenz-Eigenschaften für Lewis^b, Laminin Fibronectin und Kollagen TypIV wurden untersucht. Dabei zeigte sich, dass drei von 92 klinischen Isolaten, trotz der Produktion von BabA, nicht in der Lage waren Lewis^b zu binden. Auch die Bindung von Laminin war bei zwei Stämmen trotz der Produktion von SabA nicht gegeben. Dies zeigt, dass einige *H. pylori* Stämme BabA- und

SabA-immunoreaktive Produkte besitzen, welche nicht in der Lage sind, an ihre bisher identifizierten Rezeptoren zu binden [157].

4.2.2. Bedeutung der Adhärenz von *H. pylori* in der Pathogenese

Über die klinische Relevanz der verschiedenen Adhäsine von *H. pylori* liegen bisher nur wenige fundierte Ergebnisse vor. Das bis heute am besten untersuchte Adhäsine ist das 1998 von Ilver und Kollegen aufgereinigte BabA-Protein [102]. In früheren Studien waren vornehmlich Typ-I-Stämme, das heißt *H. pylori* Stämme welche CagA und s1m1VacA produzieren, mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen wie einem Duodenalulcus und Magenkarzinom in Verbindung gebracht worden [12,19,241]. Weitere Studien zeigten allerdings, dass ein dreifach positiver Status der Proteine CagA, s1m1VacA und BabA für die Schwere der hervorgerufenen Gastritis und weitere Folgeerkrankungen ausschlaggebend ist [76,160,174,176,213]. Yamaoka und Kollegen [245] wiesen einen höheren Prozentsatz von *babA*-positiven *H. pylori*-Stämmen in Ulcus-Patienten (83-96%) als in Gastritis-Patienten (71-89%) nach. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass eine Korrelation zwischen einem positiven Sekretor-Status der Patienten für Lewis^b und der Kolonisierungsdichte mit *babA*-positiven *H. pylori* besteht [196]. Allerdings konnte eine andere klinische Untersuchung keinen Zusammenhang eines positiven Sekretor-Status des Wirts und der Dichte der Besiedlung mit *H. pylori* in der Magenmukosa nachweisen [91]. Auch konnte keine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Lewis^b-Antigenen und einer *H. pylori*-Infektion oder *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen in verschiedenen unabhängigen Untersuchungen festgestellt werden [89,109,198,221].

Aller Wahrscheinlichkeit nach sind auch noch andere Adhäsine neben BabA bei der Kolonisierung der menschlichen Magenmukosa beteiligt, denn nur ca. 20% der europäischen und nord-amerikanischen Bevölkerung besitzen einen positiven Sekretor-Status für Lewis^b [129]. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass BabA/SabA doppelt-negative Stämme trotzdem noch in der Lage sind, in einer AlpA- und AlpB-abhängigen Reaktion an Magengewebe zu binden [153].

Dennoch kommt dem BabA-Protein von *H. pylori* enorme Aufmerksamkeit zu, denn anhand dieses Adhäsins können grundsätzliche adhäsive Eigenschaften von *H. pylori* und pathogenen Erregern allgemein untersucht werden. So weiß man heute, dass BabA eine Säure-abhängige Bindung an Lewis^b aufweist, welche es dem Bakterium höchstwahrscheinlich erlaubt, die Bindung von abgeschilferten Epithelzellen zu lösen, um in den Mukus zurückzuschwimmen und so einem Auswaschen aus dem Magenlumen zu entgehen [Borén *et al.*, in Vorbereitung].

4.2.3. Eingrenzung der Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins von *H. pylori*

Seit durch Rezeptoraffinitätschromatographie-Studien BabA als Adhäsins des Blutgruppenantigens Lewis^b identifiziert wurde [102], und in weiteren Studien Lewis^b auf der Oberfläche des Glycoproteins MUC5AC nachgewiesen wurde [122], wird diese Mucinkomponente als primärer Rezeptor für *H. pylori* im Magen postuliert [122,222,223].

Aufgrund der Beobachtung inaktiver, das heißt nicht Lewis^b-bindender BabA-Proteine verschiedener *H. pylori*-Stämme in dieser Arbeit sowie in anderen Studien [92,102,157,161], stellt sich die Frage nach den Bindeeigenschaften und der Lokalisation der Bindedomäne des BabA-Adhäsins.

Vergleichende Sequenzanalysen verschiedener BabA-Proteine ergaben große Homologien in den C- und N-terminalen Hälften. Eine von Aminosäure 218 (Ser) bis 407 (Phe) definierte Mittelregion hingegen lässt immense Aminosäureabweichungen zwischen den BabA-Proteinen verschiedener *H. pylori* Stämmen erkennen [6,173,214].

In Vorarbeiten durch Kirstin Engel *et al.* war es gelungen, *aida/babA*-Hybridgene zu konstruieren und diese auf der *E. coli* Bakterienoberfläche zu präsentieren. Die Bindung der verschiedenen langen BabA-Fragmente an Lewis^b konnte mittels Dot Blot - Analyse überprüft werden. Dabei zeigte sich, dass ein 342 Aminosäuren langes BabA-Fragment eine starke Bindung an Lewis^b induziert. Diese primäre Eingrenzung der BabA-Binderegion wurde nun für weitere Untersuchungen des BabA-Proteins genutzt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins anhand von Mutagenisierungen des entsprechenden Gens und anschließenden Adhärenz-Tests einzugrenzen und näher zu charakterisieren. Dabei wurde im ersten Schritt ein chimäres BabA-Fusionsprotein der *H. pylori*-Stämme J99 und P1 geschaffen. P1 produziert ein sogenanntes „inaktives“, das heißt ein nicht an Lewis^b bindendes BabA-Protein, wohingegen J99 ein voll funktionsfähiges Adhäsins auf seiner Oberfläche präsentiert. Es wurde ein P1 *babA*-Fragment über zwei *SphI* Restriktionsenzym-Schnittstellen (Aminosäure 296 bis 377) in das *babA*-Gen des *H. pylori* Stamms J99 integriert. Diese Klonierungen erfolgten in dem *E. coli* / *H. pylori* Shuttle-Vektor pIB6, welcher in vorangegangenen Untersuchungen eigens für solche Komplementationsexperimente etabliert worden war. Nachdem die Produktion des chimären Proteins durch eine *H. pylori* P1(*babA*)-Mutante im Western Blot nachgewiesen worden war, wurde das Protein mittels Immunfluoreszenz auf der Bakterienoberfläche detektiert. Es konnte für dieses chimäre BabA-Protein jedoch keine Adhärenz an Lewis^b nachgewiesen werden. Der Verlust der Bindungsfähigkeit des Lewis^b Antigens muss somit in den Unterschieden des bindenden originalen J99 BabA-Proteins und

des chimären J99/P1 BabA-Proteins begründet sein. Das heißt, der ausschlaggebende Unterschied in der Bindung der zwei BabA Typen ist folglich in der 82 Aminosäuren großen, inserierten P1-Region festzumachen. Betrachtet man den Aminosäureabgleich dieser Region zwischen den Stämmen J99 und P1, kann man erkennen, dass sie sich nur in 14 Aminosäuren unterscheiden. Diese Aminosäuren an Position 299, 301, 303, 307, 308, 309, 313, 350, 351, 355, 356, 359, 360 und 361 bezüglich des J99 BabA Proteins wurden daraufhin in zwei Untergruppen zu je 7 Aminosäuren zusammengefasst (299, 301, 303, 307, 308, 309, 313 und 350, 351, 355, 356, 359, 360, 361) und weiteren Mutageneseexperimenten unterzogen. Durch eine Re-Insertion von J99 Sequenzen in das P1 Fragment des chimären Fusionsproteins wurde untersucht, ob sich eine erneute Lewis^b Bindefähigkeit des Fusionsproteins wiederherstellen lässt. Hierfür wurden anhand zweier ortsspezifischer Mutagenesereaktionen jeweils 7 J99 BabA-Aminosäuren in die P1-Region eingefügt. Nach Überprüfung der Produktion und der Präsentation auf der Bakterienoberfläche wurden die adhäsiven Eigenschaften der Fusionsproteine anhand von Dot Blot - Analysen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass der Stamm, dessen *babA*-Gen in den 7 Aminosäuren an Position 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 wieder an die J99-Sequenz angeglichen worden war, erneut in der Lage war, Lewis^b zu binden. Dies zeigt, dass diese 7 Aminosäuren allein ausschlaggebend sind, um das Bindevermögen des gesamten BabA-Proteins herzustellen. Der Stamm mit den Re-Insertionen der J99- Aminosäuren an Position 350, 351, 355, 356, 359, 360 und 361 zeigte keine oder in manchen Fällen eine nur sehr schwache Bindung an Lewis^b. Es ist zu diskutieren, ob dies mit einer verbesserten Konformation des BabA-Proteins in der Bindungsregion erklärt werden kann, wobei die wirklich ausschlaggebenden Bindungsmotive allerdings fehlen. Es ist anzunehmen, dass BabA in dieser Region eine Art Bindetasche für das Lewis^b-Antigen formt, deren Sterik und Konformation durch die Aminosäuren an Position 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 soweit beeinflusst wird, dass diese bei Veränderungen durch Austausch oder Mutationen eine Bindung an Lewis^b verhindern können. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Gegenüberstellung von Sequenzanalysen dieser BabA-Binderegion verschiedener *H. pylori*-Isolate. Bei Stämmen mit einem BabA-Protein welches nicht an Lewis^b bindet, ist die Region zwischen den Aminosäuren 299 und 313 massiv von Deletionen und Insertionen betroffen. Diese führen aller Wahrscheinlichkeit nach zu Konformationsabweichungen in der Binderegion und inhibieren somit die Bindung von *H. pylori* an Lewis^b.

Diese Daten konnten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Borén an der Universität von Umeå in Schweden, anhand eines Radio-Immuno-Assays (RIA) erfolgreich

bestätigt werden (Abb. 42). Die Auswertung des RI-Assays zeigt die gleichen Tendenzen in den Bindeaktivitäten der verschiedenen BabA-Proteine, wie zuvor die Dot Blot - Analysen. Der *H. pylori* Wildtypstamm J99 bindet sehr stark an Lewis^b. Im Gegensatz dazu bindet der *H. pylori* Stamm P1(*babA*), welcher kein BabA-Protein produziert, nicht an Lewis^b. Wird dieser Stamm mit einem J99 *babA*-Gen aus pIB4 komplementiert, erfolgt eine erneute Bindung an Lewis^b. Das BabA-Protein des Plasmids pIB28 zeigt diesen Effekt nicht, es handelt sich dabei um ein chimäres Hybridprotein zwischen den Stämmen J99 und P1. Der Stamm P1(*babA*)[pIB35], in dessen *babA*-Gen auf Grundlage des pIB28 Plasmids eine Re-Insertion eines J99 BabA-Fragments im vorderen variablen Abschnitt stattgefunden hat, zeigt eine erneute Bindung an Lewis^b. Der Stamm P1(*babA*)[pIB36] hingegen, dessen *babA*-Gen äquivalent im hinteren variablen Abschnitt verändert wurde, bindet fast nicht an das Lewis^b-Antigen. Dieses Ergebnis bestätigt die ausschlaggebende Rolle der Aminosäuren 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 des BabA Proteins bei der Bindung des Blutgruppenantigens Lewis^b.

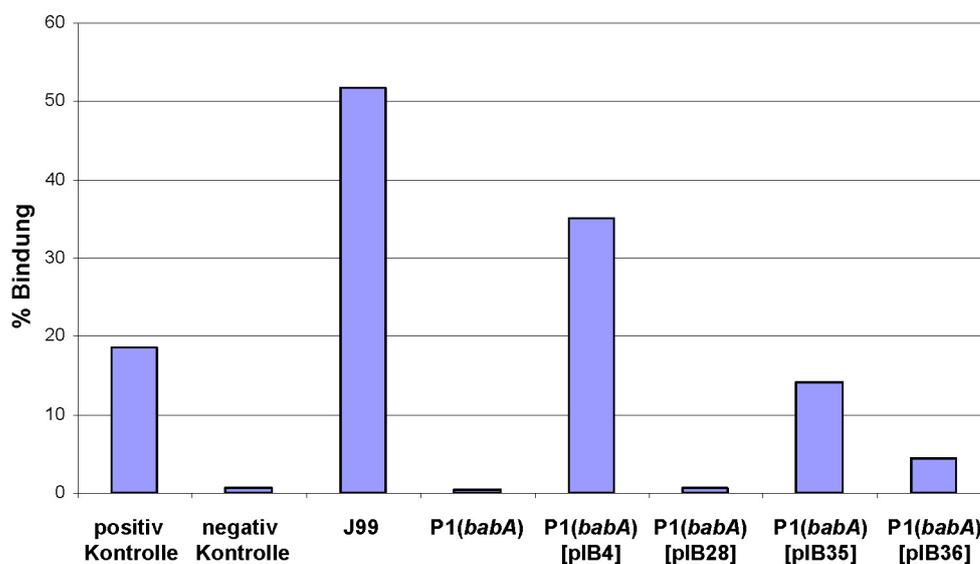


Abb. 42: Radio-Immuno-Assay (RIA) zur Bindung von Lewis^b durch verschiedene BabA-Proteine

Zu den Bakteriensuspensionen der *H. pylori* Stämme J99, P1(*babA*), P1(*babA*)[pIB4], P1(*babA*)[pIB28], P1(*babA*)[pIB35] und P1(*babA*)[pIB36] (1 ml, OD₆₀₀ = 0,1) wurden jeweils 300 ng eines Lewis^b-HSA und ¹²⁵I-markierten Lewis^b-HSA Gemisches gegeben. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Bakterien für 15 Minuten bei 20000 x g abzentrifugiert. Die Strahlungsaktivität des Pellets und des Überstandes wurde mit Hilfe eines Gamma-Szintillationszählers (Wallace, Oy, Finnland) gemessen. Als Kontrollen dienten *H. pylori* Stämme mit bekannten BabA-Bindungseigenschaften. Stamm 17875 wurde als Positivkontrolle und die daraus generierte *babA1/babA2*-Doppelmutante als Negativkontrolle verwendet. Der RI-Assay wurde jeweils in 2 unabhängigen Experimenten wiederholt und war in hohem Maße reproduzierbar.

Mit der Eingrenzung der Lewis^b-Binderegion des BabA-Proteins ist es gelungen jahrelange Bemühungen zur Charakterisierung dieses Adhäsins und seines Bindeverhalten ein großes Stück weiterzubringen. Es ist zu erwarten, dass diese Ergebnisse das Verständnis der Rolle von Adhäsion durch *H. pylori* an die Magenmucosa in erheblichem Maße vorantreiben werden.

In weiterführenden Studien kann nun der Versuch unternommen werden, die genauen Eigenschaften und Besonderheiten dieser Bindungsregion noch präziser zu erfassen. Durch weitere Mutagenisierungsexperimente, die den Austausch kleinerer Fragmente und verschiedene Kombinationen ausgetauschter Aminosäuren beinhalten, könnte geklärt werden, welchen Aminosäuren des BabA-Proteins eine tragende Rolle bei der Adhäsion an Lewis^b zukommt, und in welcher Form sie zur Konformation des Gesamtproteins oder von potentiellen Bindungstaschen beitragen.

Noch immer sind die genaue dreidimensionale Konformation des BabA-Proteins und daraus eventuell resultierende Bindungseigenschaften des Adhäsins nicht bekannt. Bis heute ist es nicht gelungen eine Kristallstruktur des BabA-Proteins anzufertigen. Mit dem Wissen um die Lokalisation der Lewis^b Bindungsstelle, besteht nun die Möglichkeit sich in weiteren Kristallisationsversuchen explizit auf diese Region zu konzentrieren, um die Bindungsstudien mit diesem Virulenzfaktor von *H. pylori* voranzutreiben. Dabei können die Daten dieser Arbeit, über die Expression verschiedener BabA-Fragmente und vor allem deren funktionelle Konformation im heterologen System wertvolle Informationen darstellen.

4.3. Charakterisierung der Bindungseigenschaften des vakuolisierenden Zytotoxins VacA

4.3.1. Effekte von VacA auf Epithelzellen und verschiedene Zellen des Immunsystems

Ist die Kolonisierung des Magens durch die Adhärenz an Epithelzellen und Mukosa erfolgreich verlaufen, laufen verschiedene Prozesse an, um eine Manifestation des Bakteriums zu garantieren. Eines dieser Ereignisse, welches als ein wichtiger Faktor in der Virulenz gesehen wird, ist die Sekretion des vakuolisierenden Zytotoxins VacA durch *H. pylori*. Das VacA-Toxin war eines der ersten Virulenzfaktoren, die für *H. pylori* beschrieben wurden [34,119]. Ursprünglich wurde es bezeichnet nach den charakteristischen sauren Vakuolen deren Bildung es im Zytoplasma von Zellen induziert, doch heute betrachtet man es als multifunktionelles Toxin, welches eine Anzahl von Auswirkungen auf verschiedene Zelltypen hat [33].

So moduliert es unter anderem den endosomalen Transport in der Zielzelle und induziert dadurch verschiedene Folgereaktionen. Neben der oben bereits genannten Induktion von großen zytoplasmatischen Vakuolen kommt es weiterhin zur Inhibition des intrazellulären Abbaus von EGF („*epidermal growth factor*“) [188], zur Inhibition der Reifung von Procathepsin D [188], dem „*Clustern*“ des späten endosomalen Kompartiments [121], und zur Inhibition der Antigenpräsentation in der B-Lymphocyten Zelllinie Raji [144].

Außerdem löst VacA Veränderungen in den Mitochondrien aus, wobei es zur Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials und der Freisetzung von CytochromC kommt. Überdies induziert VacA eine Reduktion der intrazellulären ATP-Konzentration und eine Beeinträchtigung der Zell-Zyklus Abfolge [110]. Die Expression von *vacA* in transfektierten Zellen führt daneben zu einer Aktivierung von Caspase-3 [71]. Übereinstimmend mit den Effekten der Freisetzung von CytochromC und der Aktivierung von Caspase-3 induziert die Intoxikation von AGS-Zellen mit VacA Apoptose [38,113]. Dies bedarf allerdings einer außerordentlich hohen Konzentration von VacA.

Neben diesen langsam induzierten Prozessen durch VacA, kommt es auch zu schnellen Veränderungen in der Zelle aufgrund des Eingreifens in zelluläre Signaltransduktionswege. So werden die MAP-Kinasen p38 und ERK1/2, sowie der ATF2 („*activating transcription factor 2*“) Signalweg durch VacA aktiviert [21,147]. VacA führt in Epithelzellen nach Bindung an RPTPβ zur Tyrosin-Phosphorylierung des Git-1 Proteins [70]. Außerdem wurden VacA induzierte Veränderungen der zytosolischen Kalzium-Konzentration gemessen [44]. Diese Effekte bedürfen keiner Aufnahme von VacA in die Zelle, was darauf schließen lässt,

dass eine Bindung von VacA an Oberflächen-Rezeptoren der Zelle ausschlaggebend für die Modulation dieser Signalwege ist.

VacA ist außerdem durch verschiedene Effekte an der Immunevasion, und somit an der Etablierung einer lebenslangen Persistenz beteiligt. Es wurde beschrieben, dass VacA-produzierende *H. pylori* nach der Phagozytose durch Makrophagen in sogenannten Megasomen lokalisiert sind, welche nicht mit Lysosomen verschmelzen und so nicht zu Phagosomen reifen [4,247]. Auch die Antigenpräsentation von B-Lymphocyten wird durch VacA gestört [144]. Das VacA-Toxin hemmt die Proliferation und Zytokin-Produktion von T-Lymphocyten durch Interferenz mit dem Calcineurin-NFAT Weg [21,74,208].

All diese Effekte durch VacA bedürfen spezifischer Rezeptoren auf zellulärer Seite, durch deren Interaktion es zur Aufnahme von VacA oder zur Induktion bestimmter Signalwege kommt. Besonders schnelle durch VacA eingeleitete Modulationen in der Zelle beruhen wohl eher auf der bloßen Interaktion von VacA mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche als auf durch die Aufnahme des Toxins induzierten Veränderungen. Über solche Rezeptorstrukturen konnten bisher allerdings noch keinerlei Informationen gewonnen werden. Es ist weiterhin anzunehmen, dass auf verschiedenen Zelltypen verschiedene Rezeptoren eine Rolle für die VacA Bindung, Aufnahme und Interaktion spielen. Im Falle der Interaktion mit T-Lymphocyten gelang es Sewald *et al.* erst kürzlich, CD18 als einen wichtigen Rezeptor zu identifizieren [194].

Im Zuge dieser Arbeit konnten genauere Informationen über die initiale Interaktion von VacA mit verschiedenen Zielzellen gewonnen werden. Es gelang dabei, CD29 als einen völlig neuen Rezeptor für VacA auf Epithelzellen und T-Lymphocyten zu identifizieren. Ein wesentliches Augenmerk lag aber auch auf dem neu identifizierten T-Lymphocyten Rezeptor CD18.

4.3.2. CD18 ist ein Rezeptor für s1m2VacA auf T-Lymphocyten

Um den Mechanismus der Inhibition der IL-2-Expression und der T-Zell Proliferation zu verstehen, ist das Verständnis der Interaktion von VacA mit T-Zellen von zentraler Bedeutung. In dieser Arbeit wurde die Vakuolisierung von T-Lymphocyten durch s1m2VacA untersucht. Dabei konnte CD18 als Rezeptor von s1m2VacA auf T-Zellen identifiziert werden. Dies erfolgte über Vakuolisierungsexperimente mit einer LFA-1-defizienten Jurkat T-Zelllinie. Xaver Sewald war es zuvor gelungen, CD18 als einen wichtigen Rezeptor für s1m1VacA auf T-Lymphocyten zu identifizieren [194]. CD18 ist die β -Untereinheit Leukozyten-spezifischer Integrine. Dabei handelt es sich bei dem aus den

Untereinheiten α_L (CD11a) und β_2 (CD18) bestehenden LFA-1 um das dominierende Integrin auf Zellen des Immunsystems. Aber auch Mac-1 (α_M/β_2) und andere β_2 -Integrine wie α_X/β_2 und α_D/β_2 werden auf Leukozyten präsentiert. Der Bindung von VacA an CD18 kommt somit eine Schlüsselrolle bei der Intoxikation von Immunzellen zu. Sewald *et al.* konnte mikroskopisch zeigen, dass VacA mit LFA-1 co-lokalisiert. In weiteren Experimenten wurde über die Expression von $\alpha_L\beta_2$, α_M/β_2 und α_X/β_2 in CHO-Zellen geklärt, dass bei der Bindung von VacA die α -Untereinheit der Integrine keine Rolle spielt. Die Sensitivität gegenüber VacA war für alle Integrin-Typen gleich und wurde nur über die Expressionstärke reguliert [194]. Die Aufnahme von VacA und dessen Effekte auf zelluläre Funktionen sind dabei abhängig von der Präsenz des Rezeptors CD18 und dessen Internalisierung.

Die Nutzung von CD18 als Rezeptor macht VacA zu einem Immunmodulin, welches durch die Herabsetzung der IL-2 Produktion und der T-Zell Aktivierung, Einfluss auf die Immunantwort des Wirts und somit auf die Etablierung einer chronischen *H. pylori* Infektion nimmt.

Auch andere bakterielle Toxine nutzen β_2 -Integrine für ihre Aufnahme in den Wirt. So spielt LFA-1 (CD11a/CD18) eine Rolle als Rezeptor für RTX-Toxine wie das α -Hämolysin von *E. coli* oder das Leukotoxin von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [47,48,117,117]. CD11b/CD18 dient dem Adenylatcyclase Toxin von *Bordetella pertussis* als Rezeptor für die Aufnahme in Immunzellen, wo das Toxin durch seine enzymatische Aktivität das adaptive Immunsystem moduliert [227].

Sowohl für m1 als auch für m2VacA konnte ein Unterschied in deren Wirkung auf murine oder humane T-Zellen festgestellt werden. Murine T-Zellen scheinen resistent gegenüber der Aufnahme von VacA über CD18 zu sein. Dies lässt einen hochspezifischen Aufnahmeweg von VacA über humanes β_2 -Integrin vermuten [194]. Dieses Ergebnis stellt das Maus-Modell für Untersuchungen von *H. pylori*-Infektionen in Frage, da des Weiteren auch die Präsenz des *cag*-TypIV-Sekretionssystem im Maus-Modell nicht stabil ist [170].

Das Integrin CD18 ist ein Immunzellen-spezifischer VacA-Rezeptor. Eine Anzahl weiterer Rezeptoren für VacA wurden bereits beschrieben, allerdings nur im Rahmen von Epithelzell-Studien [242,243]. Diese Oberflächenstrukturen spielen als Rezeptoren auf T-Zellen allerdings keine Rolle. Bettina Gebert-Vogel konnte RPTP α und RPTP β als mögliche VacA-Rezeptoren auf T-Lymphocyten ausschließen.

4.3.3. CD29 ist ein Rezeptor für VacA

Da VacA fähig ist an LFA-1-defiziente Jurkat- β 2.7-Zellen zu binden [194], handelt es sich bei CD18 offensichtlich nicht um den einzigen Rezeptor für dieses Toxin auf T-Lymphozyten. Auch ist bei dieser Zelllinie noch eine gewisse Restaktivität von VacA auf Ebene der Vakuolisierung und der IL-2 Inhibition zu beobachten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CD29 als ein weiterer VacA-Rezeptor fungiert. Bei dem „Clusters of Differentiation“-Antigen CD29 handelt es sich um eine β -Untereinheit der Integrin-Familie.

Diese Gruppe von heterodimeren Transmembranproteinen umfasst 28 bekannte Mitglieder. Sie bestehen jeweils aus zwei miteinander verbundenen Glycoproteinketten, einer α - und β -Untereinheit, wobei diese nur in Kombination funktionell sind. Ihre Struktur umfasst eine zytoplasmatische Domäne (20-60 Aminosäuren), eine kurze transmembrane Domäne und einen sehr viel größeren extrazellulären Anteil (700-900 Aminosäuren) [216]. Integrine spielen eine wichtige Rolle bei vielen Prozessen innerhalb des Organismus. So sind sie unter anderem für die Zell/Zell- und Zell/Matrix-Interaktion und -Kommunikation zuständig. Dabei übertragen sie nicht nur Signale von außen in die Zelle, sie sind vielmehr auch in der Lage, Veränderungen innerhalb der Zelle mit Umstrukturierungen auf der Außenseite zu beantworten und so die Bindung verschiedener Liganden zu beeinflussen [171]. Das erste näher charakterisierte Mitglied dieser Familie war der sogenannte Fibronectin-Rezeptor, welcher heute als $\alpha_5\beta_1$ -Integrin bezeichnet wird [191]. Bei der β -Untereinheit CD29 handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches auf allen Säugetier-Zellen, mit Ausnahme der Erythrocyten, vorhanden ist. Das macht es zu einem hervorragend geeigneten Molekül um Zugang zu vielen verschiedenen Zelltypen, unabhängig von ihrem Ursprung und ihrer Funktion, zu ermöglichen. Das VacA-Toxin von *H. pylori* nutzt CD29 als Rezeptor für die Bindung und die Aufnahme.

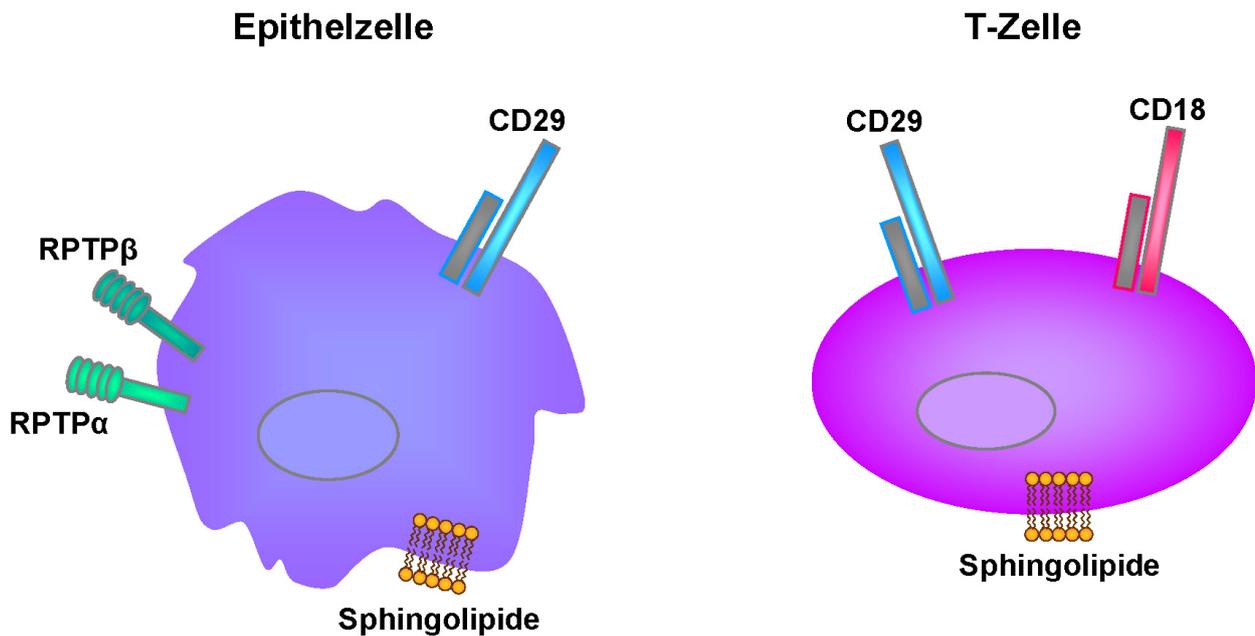


Abb. 43: VacA-Rezeptoren auf Epithel- und T-Zellen

Auf Epithelzellen wurden bisher RPTP α und RPTP β [242,243] sowie Sphingolipide [83,180] als VacA Rezeptoren identifiziert. Auf T-Zellen fungiert neben Sphingolipiden die Integrin Untereinheit CD18 [194] als VacA-Rezeptor. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Integrin-Untereinheit CD29 um einen universellen VacA-Rezeptor handelt, welcher auf allen Zelltypen mit Ausnahme von Erythrocyten vorkommt.

Die Identifikation von CD29 als VacA-Rezeptor erfolgte zunächst über mikroskopische Co-Lokalisationsstudien. Bei der LFA-1-defizienten T-Lymphocyten Zelllinie Jurkat- β 2.7 war eine Bindung von VacA an die Zelloberfläche, trotz der Abwesenheit des bereits identifizierten VacA-Rezeptors CD18 zu beobachten. Es konnte bei dieser Zelllinie wie auch bei der Ausgangszelllinie (Jurkat) und der Komplementante (Jurkat- β 2.7/CD11a) eine Co-Lokalisation von VacA und CD29 festgestellt werden. Die daraufhin durchgeführten Präzipitationen von VacA mit CD29 zeigten eine direkte Bindung von VacA und CD29. Da unter diesen Versuchsbedingungen mit definierten Reagenzien ohne FCS gearbeitet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine direkte Interaktion, ohne die Verknüpfung der Partner über Brückenproteine wie z. B. Fibronectin, handelt.

Vakuolisierungs- und Aufnahme-Experimente mit VacA und den Zelllinien GE11, GE11 β , β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) zeigten, dass VacA nur bei Anwesenheit der Integrin-Untereinheit CD29 zur Induktion von sauren Vakuolen fähig war. Außerdem konnte in den

Zelllinien β -2-4 (-/-) und β -2-4-8 (+/+) ein Unterschied in der Aufnahme des Toxins beobachtet werden.

Es ist zu beachten, dass VacA neben der Bindung an humanes auch zur Bindung an murines CD29-Protein fähig ist. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu dem bereits identifizierten VacA-Rezeptor CD18 dar, bei dem es sich gleichfalls um eine β -Untereinheit der Integrin-Familie handelt, welcher aber in der murinen Form keine Interaktion mit VacA zeigt.

Der Unterschied in der VacA-Aufnahme zwischen den Zelllinien GE11 β mit einer humanen β ₁-Untereinheit und β -2-4-8 (+/+) mit einer murinen β ₁-Untereinheit liegt wahrscheinlich in ihrem unterschiedlichen Aufbau begründet. Bei beiden Ursprungszelllinien handelt es sich um murine Integrin β ₁ Knockout Embryonalzellen. GE11 β -Zellen wurden mit humanem Integrin β ₁ komplementiert. Es wurde zwar beschrieben, dass die normalen Signalkaskaden durch die Stimulierung von Integrin β ₁ aktiviert würden und die Zusammenarbeit mit der murinen α -Untereinheit problemlos verlaufen würde (persönliche Mitteilungen R. Fässler und L. Jimenez-Soto), dennoch kann es zu einer nicht ganz einwandfreien Interaktion zwischen dem humanen und murinen System der Zelle und des Rezeptors kommen. Eventuell ist die Signalweiterleitung, welche zur Aufnahme von VacA über Integrin β ₁ führt, gestört. Auch der Aufnahmemechanismus selbst kann durch das Zusammenwirken von humanem und murinem System beeinträchtigt sein. β -2-4-8 (+/+) -Zellen hingegen besitzen murines Integrin β ₁, welches optimal mit den Komponenten auf zellulärer Ebene zusammenarbeiten kann, weshalb bei dieser Zelllinie die Integrin β ₁ abhängige VacA Aufnahme sehr gut beobachtet werden kann. Der Unterschied in der Aufnahme von VacA bei den Zelllinien GE11 β und β -2-4-8 (+/+) ist deshalb wahrscheinlich nicht auf abweichende Bindungseigenschaften dieser aus verschiedenen Organismen stammenden Rezeptoren zurückzuführen.

Für die VacA-Rezeptoren CD18 und RPTP β wurde eine über Oligosaccharide vermittelte Bindung beschrieben [244], [Sewald *et. al.* unveröffentlichte Daten]. Auch im Fall des Rezeptors CD29 konnte in dieser Arbeit anhand erster Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Behandlung des Integrins mit Neuraminidase die Bindungsfähigkeit von VacA heruntersetzt. Das Abspalten von Sialyl-Resten des Glycoproteins CD29 führt in Präzipitationsexperimenten zur Reduktion der VacA-Bindung. Dies lässt vermuten, dass die Bindung von VacA an CD29 ebenfalls über Oligosaccharide erfolgt, und damit der VacA-Bindung an CD18 und RPTP β gleicht.

Auch andere Toxine nutzen β ₁-Integrine als Rezeptoren für die Bindung und Aufnahme in verschiedene Zellen. So nutzt das Invasin-Protein von *Yersinia spp.* INTG β ₁ als Rezeptor [86,103], ebenso wie das Intimin-Protein von enteropathogenen *E. coli* [69]. Das NadA-

Protein von *Neisseria meningitidis* wurde als CD29 Ligand identifiziert [Naegele *et al.* in Vorbereitung] und *Staphylococcus aureus* bindet über extrazelluläre Matrixproteine an INTG β 1 [68,197]. Außerdem wurde durch Kwok *et al.* gezeigt, dass ein weiteres *H. pylori* Protein $\alpha_5\beta_1$ -Integrin als Rezeptor nutzt. Es handelt sich dabei um das CagL-Protein, welches einen Bestandteil des TypIV-Sekretionsapparatus ausmacht, mit dem CagL aus dem Bakterium herausgeschleust wird [114]. Des Weiteren gelang Luisa Jemenez-Soto und Kollegen kürzlich der Nachweis, dass die *H. pylori* Proteine CagA, CagY und CagI der *cag*-Pathogenitätsinsel mit Integrin β_1 interagieren. Auf diesen Daten aufbauend entwickelten sie ein Modell, bei dem Konformationsänderungen des Integrin-Heterodimers die Basis für eine CagA Translokation durch das TypIV-Sekretionssystem darstellen [Luisa Jemenez-Soto *et al.* PLoS Pathogens, im Druck].

Da somit zwei von einander unabhängige wichtige *H. pylori* Virulenzfaktoren als Bindungspartner von CD29 identifiziert wurden, stellt sich die Frage, ob sich die Virulenzfaktoren VacA und CagA bei der Bindung dieses Rezeptors gegenseitig beeinflussen. In einer Studie von Argent *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Virulenzfaktoren VacA und CagA eine funktionelle Abhängigkeit zeigen [8]. In den aktuellen Untersuchungen dieser Arbeit wurde dieser Aspekt noch nicht näher berücksichtigt, allerdings sollten zukünftige vergleichende Bindungs-Studien Aufklärung zu dieser Fragestellung bringen. Es ist jedoch nicht zwangsläufig anzunehmen, dass es zu einer Konkurrenz-Reaktion der Proteine VacA und CagA kommt. Denn es ist möglich, dass die zwei Toxine an unterschiedliche Bindungsstellen des CD29-Proteins binden. Außerdem wurde noch nicht aufgeklärt, zu welchen Zeitpunkten die jeweiligen Proteine *in vivo* durch das Bakterium sekretiert werden. Eventuell wird durch einen Zeitunterschied bei der Abgabe der Proteine garantiert, dass jedes freien Zugang zu dem Rezeptor-Protein CD29 erlangt.

Die Bindung des VacA-Proteins an β_1 -Integrin aktiviert vermutlich neben der Aufnahme des Toxins auch verschiedene Signalkaskaden. Es ist bekannt, dass die Stimulierung von verschiedenen β_1 -Integrinen zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und Erk1/2 führt [90,104]. Wie von Nakayama und Kollegen beschrieben wurde, führt die Stimulierung von Zellen mit VacA *in vitro* zur vermehrten Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der Kinase-Aktivität von sowohl p38 als auch Erk1/2. Dabei wurde ein von der Vakuolisierungsaktivität des VacA-Toxins unabhängiger Reaktionsweg postuliert [21,147]. Inwieweit diese Effekte mit der Bindung von VacA an CD29 und der möglichen Aktivierung von entsprechenden Signalwegen zusammenhängt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Einen weiteren interessanten Aspekt für weiterführende Untersuchungen stellt das Wirkungsspektrum des m2VacA-Proteins dar. In zahlreichen Epithelzelllinien, welche β_1 -Integrin produzieren, ist m2VacA nicht in der Lage einen Vakuolisierungseffekt hervorzurufen [163]. In dieser Arbeit konnte jedoch anhand von Präzipitationsversuchen gezeigt werden, dass m2VacA des Stammes P76 *in vitro* direkt β_1 -Integrin bindet. Eine denkbare Erklärung wie diese Daten miteinander vereinbar sind, wäre dass VacA vor der Bindung des Integrins an einen Co-Rezeptor bindet, welcher in einer Folgereaktion VacA an β_1 -Integrin übergibt. Wäre dieser Co-Rezeptor mit m2VacA nicht kompartibel, könnte dies eine Erklärung für die fehlende Vakuolisierungsaktivität in bestimmten Zelllinien sein. Die Theorie eines Co-Rezeptors wurde auch schon für Integrin β_2 von Sewald und Kollegen als sogenannter Faktor X postuliert [194]. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass m2VacA zwar in der Lage ist β_1 -Integrin zu binden, jedoch nicht die nötigen Transduktionen für Vakuolisierungs- und Aufnahme-Vorgänge hervorruft. Weitergehende Studien sollten den Aspekt des Zusammenspiels zwischen β_1 -Integrin und m2VacA näher beleuchten.

Generell lässt sich feststellen, dass es durch die Identifikation der β_1 -Integrin Untereinheit CD29 als Bindungspartner des VacA-Toxins von *H. pylori* gelungen ist, einen universellen Rezeptor zu identifizieren, welcher auf allen Zelltypen mit Ausnahme von Erythrocyten vorkommt. Die Untersuchungen der genauen Bindungsstelle des VacA-Toxins an CD29 und die Aufklärung der Folgereaktionen sind Schwerpunkte für zukünftige Studien.

5. Zusammenfassung

Das gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* kolonisiert dauerhaft den menschlichen Magen und ruft dort eine chronische Entzündung hervor, welche zu Gastritis, Magengeschwüren, Magenkarzinomen oder MALT-Lymphomen führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion verschiedener Virulenzfaktoren von *H. pylori* mit ihren eukaryotischen Rezeptoren hinsichtlich ihrer Bindung genauer untersucht. Hierbei wurden sowohl das Blutgruppen bindende Adhäsions-Protein BabA als auch das vakuolisierende Cytotoxin VacA näher betrachtet.

Als eine wichtige Voraussetzung der initialen Kolonisierung und der chronischen Persistenz des Erregers *H. pylori* wird die Adhärenz an die Magenepithelzellen angesehen. Das Bakterium widersetzt sich dadurch unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus und entgeht der Gefahr, zusammen mit Mukus aus dem Magen geschwemmt zu werden. Bereits seit 1998 ist das Blutgruppenantigen Lewis^b als Rezeptor des Oberflächenproteins BabA von *H. pylori* bekannt. Bei Personen mit einem positiven Sekretorstatus stellt es das dominierende Antigen auf den Epithelzellen und der Mukusschicht des Magens dar und vermittelt so die Adhärenz von *H. pylori* an das Magenepithel. Im Zuge dieser Arbeit wurde das Bindungsepitop des BabA-Proteins für Lewis^b näher identifiziert. Die Grundlage hierfür stellten vergleichende Bindungsstudien von BabA-Proteinen verschiedener *H. pylori*-Stämme dar. Der Stamm J99 produziert ein funktionelles BabA-Protein, welches Lewis^b bindet. Der Stamm P1 hingegen produziert ein inaktives BabA-Protein, welches keine Bindung an Lewis^b zeigt. Durch die Herstellung von BabA-Hybridchimären dieser beiden Stämme gelang es die Lewis^b-Bindungsstelle des BabA-Proteins auf sieben Aminosäuren einzugrenzen. Es handelt sich dabei um die, in der variablen Mittelregion des Proteins gelegenen Aminosäuren an Position 299, 301, 303, 307, 308, 309 und 313 bezüglich des J99 BabA-Proteins.

Einen weiteren wichtigen Virulenzfaktor von *H. pylori* stellt das vakuolisierende Cytotoxin VacA dar, welches von dem Bakterium über einen Autotransportermechanismus in das umgebende Milieu sekretiert wird. VacA induziert unter anderem die Bildung von sauren cytoplasmatischen Vakuolen in der Zielzelle. Weitere Effekte des Toxins stellen die Modulation der Immunantwort durch die Inhibition der IL-2 Produktion von T-Lymphocyten, die Störung des endosomalen Transports in der Zielzelle, das Auslösen von Veränderungen in den Mitochondrien wie die Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Freisetzung von CytochromC sowie die Induktion von Apoptose dar. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von VacA und seinen Zielzellen genauer untersucht. Im Fokus stand dabei die Identifizierung von VacA-Rezeptoren auf T-Lymphocyten und Epithelzellen. Es konnte

gezeigt werden, dass der bereits für m1VacA identifizierte T-Zell-Rezeptor CD18 auch für m2VacA einen funktionellen Rezeptor darstellt. Außerdem gelang die Identifizierung von CD29 als universellen Rezeptor für VacA auf verschiedenen Zielzellen. Dabei wurde anhand von CD29-negativen Knock-Out Zelllinien eine verminderte Aufnahme von VacA und eine verminderte Bildung von cytoplasmatischen Vakuolen beobachtet. Diese Erkenntnisse über neue VacA-Rezeptoren in Bezug zu den Auswirkungen von VacA auf Zielzellen zu setzen, macht einen Schwerpunkt zukünftiger Studien aus.

6. Literaturverzeichnis

1. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum. *61*: 1-241.
2. (2009). http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html.
3. Abraham S.N., Jonsson A.B., and Normark S. (1998). Fimbriae-mediated host-pathogen cross-talk. *Curr. Opin. Microbiol.* *1*: 75-81.
4. Allen L.A., Schlesinger L.S., and Kang B. (2000). Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp. Med* *191*: 115-128.
5. Alm R.A., Bina J., Andrews B.M., Doig P., Hancock R.E., and Trust T.J. (2000). Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect. Immun.* *68*: 4155-4168.
6. Alm R.A., Ling L.S., Moir D.T., King B.L., Brown E.D., Doig P.C., Smith D.R., Noonan B., Guild B.C., deJonge B.L. et al. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* *397*: 176-180.
7. 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.
8. Argent R.H., Thomas R.J., Letley D.P., Rittig M.G., Hardie K.R., and Atherton J.C. (2008). Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J. Med. Microbiol.* *57*: 145-150.
9. Asahi M., Azuma T., Ito S., Ito Y., Suto H., Nagai Y., Tsubokawa M., Tohyama Y., Maeda S., Omata M. et al. (2000). *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* *191*: 593-602.
10. Aspholm-Hurtig M., Dailide G., Lahmann M., Kalia A., Ilver D., Roche N., Vikstrom S., Sjostrom R., Linden S., Backstrom A. et al. (2004). Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* *305*: 519-522.
11. 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.
12. Atherton J.C., Peek R.M., Jr., Tham K.T., Cover T.L., and Blaser M.J. (1997). Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* *112*: 92-99.
13. Atherton J.C., Sharp P.M., Cover T.L., Gonzalez-Valencia G., Peek R.M., Jr., Thompson S.A., Hawkey C.J., and Blaser M.J. (1999). Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr. Microbiol.* *39*: 211-218.
14. 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.

15. 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.
16. Backstrom A., Lundberg C., Kersulyte D., Berg D.E., Boren T., and Arnqvist A. (2004). Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 16923-16928.
17. 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.
18. Bauerfeind P., Garner R., Dunn B.E., and Mobley H.L. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* 40: 25-30.
19. Blaser M.J. (1996). The bacteria behind ulcers. *Sci. Am.* 274: 104-107.
20. Bode G., Mauch F., and Malfertheiner P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect* 111: 483-490.
21. Boncristiano M., Paccani S.R., Barone S., Olivieri C., Patrussi L., Ilver D., Amedei A., D'Elisio M.M., Telford J.L., and Baldari C.T. (2003). The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J. Exp. Med.* 198: 1887-1897.
22. 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.
23. 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.
24. Brenner H., Arndt V., Stegmaier C., Ziegler H., and Rothenbacher D. (2004). Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am. J Epidemiol.* 159: 252-258.
25. 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.
26. Burrone D., Lupetti P., Pagliaccia C., Reyat J.M., Dallai R., Rappuoli R., and Telford J.L. (1998). Deletion of the major proteolytic site of the *Helicobacter pylori* cytotoxin does not influence toxin activity but favors assembly of the toxin into hexameric structures. *Infect. Immun.* 66: 5547-5550.
27. 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.
28. 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.
29. Correa P. (1996). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5: 477-481.

30. Covacci A., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burroni D., Macchia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N. et al. (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.
31. Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., and Rappuoli R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science 284: 1328-1333.
32. Cover T.L. (1996). The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 20: 241-246.
33. Cover T.L. and Blanke S.R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat. Rev. Microbiol 3: 320-332.
34. Cover T.L. and Blaser M.J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol. Chem. 267: 10570-10575.
35. Cover T.L., Dooley C.P., and Blaser M.J. (1990). Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect Immun. 58: 603-610.
36. 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.
37. Cover T.L., Hanson P.I., and Heuser J.E. (1997). Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. J. Cell Biol. 138: 759-769.
38. Cover T.L., Krishna U.S., Israel D.A., and Peek R.M., Jr. (2003). Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. Cancer Res 63: 951-957.
39. 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.
40. Craanen M.E., Blok P., Dekker W., and Tytgat G.N. (1994). *Helicobacter pylori* and early gastric cancer. Gut 35: 1372-1374.
41. 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.
42. Crabtree G.R. (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. J. Biol. Chem. 276: 2313-2316.
43. Crabtree G.R. and Olson E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. Cell 109 Suppl: S67-S79.
44. de B.M., Cappon A., Pancotto L., Ruggiero P., Rivera J., Del G.G., and Montecucco C. (2005). The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. Cell Microbiol. 7: 191-198.
45. de B.M., Papini E., de F., V, Gottardi E., Telford J., Manetti R., Fontana A., Rappuoli R., and Montecucco C. (1995). Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. J. Biol. Chem. 270: 23937-23940.

46. 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.
47. Dileepan T., Kachlany S.C., Balashova N.V., Patel J., and Maheswaran S.K. (2007). Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun.* *75*: 4851-4856.
48. Dileepan T., Kannan M.S., Walcheck B., and Maheswaran S.K. (2007). Integrin-EGF-3 domain of bovine CD18 is critical for *Mannheimia haemolytica* leukotoxin species-specific susceptibility. *FEMS Microbiol. Lett.* *274*: 67-72.
49. Dixon M.F. (2001). Prospects for intervention in gastric carcinogenesis: reversibility of gastric atrophy and intestinal metaplasia. *Gut* *49*: 2-4.
50. Sonnenberg M.S. (2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* *406*: 768-774.
51. Dowsett S.A. and Kowolik M.J. (2003). Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? *Crit Rev. Oral Biol. Med.* *14*: 226-233.
52. Drumm B. (1990). *Helicobacter pylori*. *Arch. Dis. Child* *65*: 1278-1282.
53. 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.
54. Dunn B.E., Cohen H., and Blaser M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev.* *10*: 720-741.
55. Eaton K.A., Brooks C.L., Morgan D.R., and Krakowka S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* *59*: 2470-2475.
56. 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.
57. Eaton K.A., Suerbaum S., Josenhans C., and Krakowka S. (1996). Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun.* *64*: 2445-2448.
58. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H., McColl K.E., Bream J.H., Young H.A., Herrera J., Lissowska J., Yuan C.C., Rothman N. et al. (2000). Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* *404*: 398-402.
59. Elitsur Y., Adkins L., Saeed D., and Neace C. (1999). *Helicobacter pylori* antibody profile in household members of children with H. pylori infection. *J Clin. Gastroenterol.* *29*: 178-182.
60. Evans D.J., Jr. and Evans D.G. (2000). *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter* *5*: 183-195.
61. Falk P., Boren T., and Normark S. (1994). Characterization of microbial host receptors. *Methods Enzymol.* *236*: 353-374.
62. Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard J.K., Stephens M., Kidd M., Blaser M.J., Graham D.Y., Vacher S., Perez-Perez G.I. et al. (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* *299*: 1582-1585.

63. Fan X.J., Chua A., Shahi C.N., McDevitt J., Keeling P.W., and Kelleher D. (1994). Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H pylori* colonisation. *Gut* 35: 1379-1384.
64. Fischer W. (2000). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Bacterial Protein Toxins.*, pp. 489-507.
65. 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.
66. Fischer W., Schwan D., Gerland E., Erlenfeld G.E., Odenbreit S., and Haas R. (1999). A plasmid-based vector system for the cloning and expression of *Helicobacter pylori* genes encoding outer membrane proteins. *Mol. Gen. Genet.* 262: 501-507.
67. Forsyth M.H., Atherton J.C., Blaser M.J., and Cover T.L. (1998). Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* 66: 3088-3094.
68. Fowler T., Wann E.R., Joh D., Johansson S., Foster T.J., and Hook M. (2000). Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 672-679.
69. Frankel G., Lider O., HersHKoviz R., Mould A.P., Kachalsky S.G., Candy D.C., Cahalon L., Humphries M.J., and Dougan G. (1996). The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J. Biol. Chem.* 271: 20359-20364.
70. Fujikawa A., Shirasaka D., Yamamoto S., Ota H., Yahiro K., Fukada M., Shintani T., Wada A., Aoyama N., Hirayama T. et al. (2003). Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat. Genet.* 33: 375-381.
71. Galmiche A., Rassow J., Doye A., Cagnol S., Chambard J.C., Contamin S., de T., V, Just I., Ricci V., Solcia E. et al. (2000). The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 19: 6361-6370.
72. Gangwer K.A., Mushrush D.J., Stauff D.L., Spiller B., McClain M.S., Cover T.L., and Lacy D.B. (2007). Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104: 16293-16298.
73. Gauthier N.C., Monzo P., Kaddai V., Doye A., Ricci V., and Boquet P. (2005). *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. *Mol. Biol. Cell* 16: 4852-4866.
74. Gebert B., Fischer W., Weiss E., Hoffmann R., and Haas R. (2003). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301: 1099-1102.
75. Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B., Leying H., and Opferkuch W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 38: 371-377.
76. Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Boren T., Rad R., Schepp W., Miehke S., Classen M., and Prinz C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 12778-12783.

77. Ghose C., Perez-Perez G.I., Dominguez-Bello M.G., Pride D.T., Bravi C.M., and Blaser M.J. (2002). East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 15107-15111.
78. Go M.F. (1997). What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology* 113: S15-S20.
79. Goodman K.J. and Correa P. (1995). The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol.* 24: 875-887.
80. Goodman K.J., Correa P., Tengana Aux H.J., Ramirez H., DeLany J.P., Guerrero P.O., Lopez Q.M., and Collazos P.T. (1996). *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am. J Epidemiol.* 144: 290-299.
81. Goodwin C.S., McConnell W., McCulloch R.K., McCullough C., Hill R., Bronsdon M.A., and Kasper G. (1989). Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J Clin. Microbiol* 27: 938-943.
82. Green C. (1989). The ABO, Lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1: 321-330.
83. Gupta V.R., Patel H.K., Kostolansky S.S., Ballivian R.A., Eichberg J., and Blanke S.R. (2008). Sphingomyelin functions as a novel receptor for *Helicobacter pylori* VacA. *PLoS. Pathog.* 4: e1000073.
84. Haas R., Meyer T.F., and van Putten J.P. (1993). A flagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol. Microbiol* 8: 753-760.
85. 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.
86. Hamzaoui N., Kerneis S., Caliot E., and Pringault E. (2004). Expression and distribution of beta1 integrins in in vitro-induced M cells: implications for *Yersinia* adhesion to Peyer's patch epithelium. *Cell Microbiol.* 6: 817-828.
87. Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol. Biol.* 166: 557-580.
88. Harris P.R., Mobley H.L., Perez-Perez G.I., Blaser M.J., and Smith P.D. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* 111: 419-425.
89. Hein H.O., Suadicani P., and Gyntelberg F. (1997). Genetic markers for peptic ulcer. A study of 3387 men aged 54 to 74 years: the Copenhagen Male Study. *Scand. J. Gastroenterol.* 32: 16-21.
90. Heino J. (2000). The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol.* 19: 319-323.
91. Heneghan M.A., Moran A.P., Feeley K.M., Egan E.L., Goulding J., Connolly C.E., and McCarthy C.F. (1998). Effect of host Lewis and ABO blood group antigen expression on *Helicobacter pylori* colonisation density and the consequent inflammatory response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20: 257-266.

92. Hennig E.E., Mernaugh R., Edl J., Cao P., and Cover T.L. (2004). Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA. *Infect. Immun.* 72: 3429-3435.
93. Heuermann D. and Haas R. (1995). Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene* 165: 17-24.
94. 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.
95. Higashi H., Nakaya A., Tsutsumi R., Yokoyama K., Fujii Y., Ishikawa S., Higuchi M., Takahashi A., Kurashima Y., Teishikata Y. et al. (2004). *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol. Chem.* 279: 17205-17216.
96. Higashi H., Yokoyama K., Fujii Y., Ren S., Yuasa H., Saadat I., Murata-Kamiya N., Azuma T., and Hatakeyama M. (2005). EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 280: 23130-23137.
97. Ho M.K. and Springer T.A. (1983). Biosynthesis and assembly of the alpha and beta subunits of Mac-1, a macrophage glycoprotein associated with complement receptor function. *J Biol. Chem.* 258: 2766-2769.
98. Ho S.B., Takamura K., Anway R., Shekels L.L., Toribara N.W., and Ota H. (2004). The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig. Dis Sci.* 49: 1598-1606.
99. Holmes D.S. and Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
100. Hu L.T. and Mobley H.L. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 58: 992-998.
101. Igarashi M., Kitada Y., Yoshiyama H., Takagi A., Miwa T., and Koga Y. (2001). Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun.* 69: 816-821.
102. 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.
103. Isberg R.R. and Leong J.M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60: 861-871.
104. Ivaska J., Reunanen H., Westermarck J., Koivisto L., Kahari V.M., and Heino J. (1999). Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* 147: 401-416.
105. Ji X., Fernandez T., Burrone D., Pagliaccia C., Atherton J.C., Reyrat J.M., Rappuoli R., and Telford J.L. (2000). Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Infect. Immun.* 68: 3754-3757.
106. Jose J., Jahnig F., and Meyer T.F. (1995). Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol. Microbiol.* 18: 378-380.

107. Katoh M., Saito D., Noda T., Yoshida S., Oguro Y., Yazaki Y., Sugimura T., and Terada M. (1993). *Helicobacter pylori* may be transmitted through gastrofiberscope even after manual Hyamine washing. *Jpn. J Cancer Res* 84: 117-119.
108. Kavermann H., Burns B.P., Angermuller 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.
109. Keller R., Dinkel K.C., Christl S.U., and Fischbach W. (2002). Interrelation between ABH blood group 0, Lewis(B) blood group antigen, *Helicobacter pylori* infection, and occurrence of peptic ulcer. *Z. Gastroenterol.* 40: 273-276.
110. Kimura M., Goto S., Wada A., Yahiro K., Niidome T., Hatakeyama T., Aoyagi H., Hirayama T., and Kondo T. (1999). Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb. Pathog.* 26: 45-52.
111. Konjetzny. (1923). Chronische Gastritis und Duodenitis als Ursache des Magenduodenalgeschwürs.), pp. 618.
112. Konjetzny. (1930). Die entzündliche Grundlage der typischen Geschwürsbildung im Magen und Duodenum.), pp. 184-332.
113. 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.
114. Kwok T., Zabler D., Urman S., Rohde M., Hartig R., Wessler S., Misselwitz R., Berger J., Sewald N., König W. et al. (2007). *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449: 862-866.
115. 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.
116. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
117. Lally E.T., Kieba I.R., Sato A., Green C.L., Rosenbloom J., Korostoff J., Wang J.F., Shenker B.J., Ortlepp S., Robinson M.K. et al. (1997). RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J. Biol. Chem.* 272: 30463-30469.
118. Langenberg W., Rauws E.A., Oudbier J.H., and Tytgat G.N. (1990). Patient-to-patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. *J Infect Dis* 161: 507-511.
119. 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.
120. 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.
121. Li Y., Wandinger-Ness A., Goldenring J.R., and Cover T.L. (2004). Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Mol. Biol. Cell* 15: 1946-1959.
122. Linden S., Nordman H., Hedenbro J., Hurtig M., Boren T., and Carlstedt I. (2002). Strain- and blood group-dependent binding of *Helicobacter pylori* to human gastric MUC5AC glycoforms. *Gastroenterology* 123: 1923-1930.

123. Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe S.W. et al. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445: 915-918.
124. Ma L., Jackson K.D., Landry R.M., Parsek M.R., and Wozniak D.J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J. Bacteriol.* 188: 8213-8221.
125. Mahdavi J., Sonden B., Hurtig M., Olfat F.O., Forsberg L., Roche N., Angstrom J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson K.A. et al. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297: 573-578.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. Marionneau S., Cailleau-Thomas A., Rocher J., Le Moullac-Vaidye B., Ruvoen N., Clement M., and Le P.J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83: 565-573.
130. Marshall B.J., Armstrong J.A., McGeachie D.B., and Glancy R.J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust.* 142: 436-439.
131. Marshall B.J., Barrett L.J., Prakash C., McCallum R.W., and Guerrant R.L. (1990). Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* 99: 697-702.
132. Marshall B.J. and Warren J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
133. McClain M.S., Cao P., Iwamoto H., Vinion-Dubiel A.D., Szabo G., Shao Z., and Cover T.L. (2001). A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *J Bacteriol.* 183: 6499-6508.
134. McClain M.S., Shaffer C.L., Israel D.A., Peek R.M., Jr., and Cover T.L. (2009). Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC. Genomics* 10: 3.
135. McNulty S.L., Mole B.M., Dailidienne D., Segal I., Ally R., Mistry R., Secka O., Adegbola R.A., Thomas J.E., Lenarcic E.M. et al. (2004). Novel 180- and 480-base-pair insertions in African and African-American strains of *Helicobacter pylori*. *J Clin. Microbiol* 42: 5658-5663.
136. Megraud F., Neman-Simha V., and Brugmann D. (1992). Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect Immun.* 60: 1858-1863.
137. Merz A.J. and So M. (2000). Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 423-457.

138. Mimuro H., Suzuki T., Nagai S., Rieder G., Suzuki M., Nagai T., Fujita Y., Nagamatsu K., Ishijima N., Koyasu S. et al. (2007). *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe* 2: 250-263.
139. Mitchell H.M., Bohane T., Hawkes R.A., and Lee A. (1993). *Helicobacter pylori* infection within families. *Zentralbl. Bakteriol.* 280: 128-136.
140. Miyabayashi H., Furihata K., Shimizu T., Ueno I., and Akamatsu T. (2000). Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 5: 30-37.
141. Mobley H.L., Cortesia M.J., Rosenthal L.E., and Jones B.D. (1988). Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 26: 831-836.
142. Molinari M., Galli C., de B.M., Norais N., Ruysschaert J.M., Rappuoli R., and Montecucco C. (1998). The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 334-340.
143. Molinari M., Galli C., Norais N., Telford J.L., Rappuoli R., Luzio J.P., and Montecucco C. (1997). Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J. Biol. Chem.* 272: 25339-25344.
144. Molinari M., Salio M., Galli C., Norais N., Rappuoli R., Lanzavecchia A., and Montecucco C. (1998). Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* 187: 135-140.
145. Montecucco C. and de B.M. (2003). Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes. Infect.* 5: 715-721.
146. Nakayama M., Hisatsune J., Yamasaki E., Nishi Y., Wada A., Kurazono H., Sap J., Yahiro K., Moss J., and Hirayama T. (2006). Clustering of *Helicobacter pylori* VacA in lipid rafts, mediated by its receptor, receptor-like protein tyrosine phosphatase beta, is required for intoxication in AZ-521 Cells. *Infect. Immun.* 74: 6571-6580.
147. Nakayama M., Kimura M., Wada A., Yahiro K., Ogushi K., Niidome T., Fujikawa A., Shirasaka D., Aoyama N., Kurazono H. et al. (2004). *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J. Biol. Chem.* 279: 7024-7028.
148. Nedenskov-Sorensen P., Bukholm G., and Bovre K. (1990). Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* 161: 365-366.
149. Nguyen V.Q., Caprioli R.M., and Cover T.L. (2001). Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect. Immun.* 69: 543-546.
150. Nomura A. and Stemmermann G.N. (1993). *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *J Gastroenterol. Hepatol.* 8: 294-303.
151. Novak R. and Tuomanen E. (1999). Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* 14: 209-217.
152. Odenbreit S. (2005). Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int. J Med Microbiol.* 295: 317-324.

153. Odenbreit S., Faller G., and Haas R. (2002). Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int J Med Microbiol* 292: 247-256.
154. Odenbreit S. and Haas R. (2002). *Helicobacter pylori*: impact of gene transfer and the role of the cag pathogenicity island for host adaptation and virulence. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 264: 1-22.
155. Odenbreit S., Kavermann H., Puls J., and Haas R. (2002). CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from alpAB, HopZ and bab group outer membrane proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 257-266.
156. 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.
157. Odenbreit S., Swoboda K., Barwig I., Ruhl S., Boren T., Koletzko S., and Haas R. (2009). Outer membrane protein (OMP) expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect. Immun.* 77: 3782-90
158. Odenbreit S., Till M., and Haas R. (1996). Optimized BlaM-transposon shuttle mutagenesis of *Helicobacter pylori* allows the identification of novel genetic loci involved in bacterial virulence. *Mol. Microbiol* 20: 361-373.
159. 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.
160. Olfat F.O., Zheng Q., Oleastro M., Voland P., Boren T., Karttunen R., Engstrand L., Rad R., Prinz C., and Gerhard M. (2005). Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44: 151-156.
161. Olfat F.O., Zheng Q., Oleastro M., Voland P., Boren T., Karttunen R., Engstrand L., Rad R., Prinz C., and Gerhard M. (2005). Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44: 151-156.
162. Ota H., Nakayama J., Momose M., Hayama M., Akamatsu T., Katsuyama T., Graham D.Y., and Genta R.M. (1998). *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch.* 433: 419-426.
163. Pagliaccia C., de Bernard M., Lupetti P., Ji X., Burrone D., Cover T.L., Papini E., Rappuoli R., Telford J.L., and Reyrat J.M. (1998). The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 10212-10217.
164. Papini E., Satin B., Bucci C., de B.M., Telford J.L., Manetti R., Rappuoli R., Zerial M., and Montecucco C. (1997). The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J.* 16: 15-24.
165. Papini E., Zoratti M., and Cover T.L. (2001). In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *Toxicon* 39: 1757-1767.
166. 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.

167. Peck B., Ortkamp M., Diehl K.D., Hundt E., and Knapp B. (1999). Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* *27*: 3325-3333.
168. Peek R.M., Jr. (2002). *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. *J Gastroenterol.* *37 Suppl 13*: 10-16.
169. Phadnis S.H., Ilver D., Janzon L., Normark S., and Westblom T.U. (1994). Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* *62*: 1557-1565.
170. Philpott D.J., Belaid D., Troubadour P., Thiberge J.M., Tankovic J., Labigne A., and Ferrero R.L. (2002). Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol.* *4*: 285-296.
171. Pozzi A. and Zent R. (2003). Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp. Nephrol.* *94*: e77-e84.
172. Prakobphol A., Boren T., Ma W., Zhixiang P., and Fisher S.J. (2005). Highly glycosylated human salivary molecules present oligosaccharides that mediate adhesion of leukocytes and *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* *44*: 2216-2224.
173. Pride D.T., Meinersmann R.J., and Blaser M.J. (2001). Allelic Variation within *Helicobacter pylori babA* and *babB*. *Infect Immun.* *69*: 1160-1171.
174. Prinz C., Schoniger M., Rad R., Becker I., Keiditsch E., Wagenpfeil S., Classen M., Rosch T., Schepp W., and Gerhard M. (2001). Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* *61*: 1903-1909.
175. Puls 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.
176. Rad R., Gerhard M., Lang R., Schoniger M., Rosch T., Schepp W., Becker I., Wagner H., and Prinz C. (2002). The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J. Immunol.* *168*: 3033-3041.
177. Reytrat J.M., Lanzavecchia S., Lupetti P., de B.M., Pagliaccia C., Pelicic V., Charrel M., Ulivieri C., Norais N., Ji X. et al. (1999). 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J. Mol. Biol.* *290*: 459-470.
178. Rhead J.L., Letley D.P., Mohammadi M., Hussein N., Mohagheghi M.A., Eshagh H.M., and Atherton J.C. (2007). A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* *133*: 926-936.
179. Ribeiro M.L., Godoy A.P., Benvengo Y.H., Ecclissato C.C., Mendonca S., and Pedrazzoli J., Jr. (2004). The influence of endoscopic procedures upon the contamination of *Helicobacter pylori* cultures. *Arq Gastroenterol.* *41*: 100-103.
180. Roche N., Ilver D., Angstrom J., Barone S., Telford J.L., and Teneberg S. (2007). Human gastric glycosphingolipids recognized by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA. *Microbes. Infect.* *9*: 605-614.
181. Rokita E. and Makristathis A. (2001). Genetic complementation of the urease-negative *Helicobacter pylori* mutant N6ureB::TnKm. *FEMS Immunol. Med Microbiol* *30*: 95-102.

182. Romaniuk P.J., Zoltowska B., Trust T.J., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R., and Stahl D.A. (1987). *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J Bacteriol.* **169**: 2137-2141.
183. Saadat I., Higashi H., Obuse C., Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y., Lu H., Ohnishi N., Azuma T., Suzuki A. et al. (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* **447**: 330-333.
184. Sachs G., Weeks D.L., Melchers K., and Scott D.R. (2003). The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Physiol* **65**: 349-369.
185. 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.
186. Sakamoto S., Watanabe T., Tokumaru T., Takagi H., Nakazato H., and Lloyd K.O. (1989). Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* **49**: 745-752.
187. Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2 edn. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
188. 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.
189. 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.
190. Schreiber S., Bucker R., Groll C., Azevedo-Vethacke M., Garten D., Scheid P., Friedrich S., Gatermann S., Josenhans C., and Suerbaum S. (2005). Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*. *Infect Immun.* **73**: 1584-1589.
191. Sczekan M.M. and Juliano R.L. (1990). Protease resistance of the beta subunit of the hamster fibronectin receptor. Evidence for differential cleavage of membrane-bound and soluble receptor. *Eur. J. Biochem.* **189**: 83-87.
192. 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.
193. 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.
194. Sewald X., Gebert-Vogl B., Prassl S., Barwig I., Weiss E., Fabbri M., Osicka R., Schiemann M., Busch D.H., Semmrich M. et al. (2008). Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host. Microbe* **3**: 20-29.
195. 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.

196. Sheu B.S., Sheu S.M., Yang H.B., Huang A.H., and Wu J.J. (2003). Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in *babA2* genopositive infection. *Gut* 52: 927-932.
197. Sinha B., Francois P.P., Nusse O., Foti M., Hartford O.M., Vaudaux P., Foster T.J., Lew D.P., Herrmann M., and Krause K.H. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol. 1*: 101-117.
198. Sipponen P., Aarynen M., Kaariainen I., Kettunen P., Helske T., and Seppala K. (1989). Chronic antral gastritis, Lewis(a+) phenotype, and male sex as factors in predicting coexisting duodenal ulcer. *Scand. J. Gastroenterol. 24*: 581-588.
199. Skibinski D.A., Genisset C., Barone S., and Telford J.L. (2006). The cell-specific phenotype of the polymorphic *vacA* midregion is independent of the appearance of the cell surface receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Infect. Immun. 74*: 49-55.
200. Sommi P., Ricci V., Fiocca R., Romano M., Ivey K.J., Cova E., Solcia E., and Ventura U. (1996). Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions induced by *Helicobacter pylori*: an in vitro study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion 57*: 299-304.
201. Stein M., Rappuoli R., and Covacci A. (2000). Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97*: 1263-1268.
202. Stern A., Brown M., Nickel P., and Meyer T.F. (1986). Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell 47*: 61-71.
203. 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.
204. Stone M.A. (1999). Transmission of *Helicobacter pylori*. *Postgrad. Med J 75*: 198-200.
205. Suerbaum S. and Josenhans C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat. Rev. Microbiol. 5*: 441-452.
206. Suerbaum S., Josenhans C., and Labigne A. (1993). Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae flaB* flagellin genes and construction of H. pylori *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol. 175*: 3278-3288.
207. 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.
208. Sundrud M.S., Torres V.J., Unutmaz D., and Cover T.L. (2004). Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101*: 7727-7732.
209. Suzuki M., Miura S., Suematsu M., Fukumura D., Kurose I., Suzuki H., Kai A., Kudoh Y., Ohashi M., and Tsuchiya M. (1992). *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am. J Physiol 263*: G719-G725.
210. Telford J.L., Covacci A., Ghiara P., Montecucco C., and Rappuoli R. (1994). Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. *Trends Biotechnol. 12*: 420-426.

211. Telford J.L., Ghiara P., Dell'Orco M., Comanducci M., Burroni D., Bugnoli M., Tecce M.F., Censini S., Covacci A., Xiang Z. et al. (1994). Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* 179: 1653-1658.
212. Teyssen S., Chari S.T., Scheid J., and Singer M.V. (1995). Effect of repeated boluses of intravenous omeprazole and primed infusions of ranitidine on 24-hour intragastric pH in healthy human subjects. *Dig. Dis. Sci.* 40: 247-255.
213. Thoreson A.C., Hamlet A., Celik J., Bystrom M., Nystrom S., Olbe L., and Svennerholm A.M. (2000). Differences in surface-exposed antigen expression between *Helicobacter pylori* strains isolated from duodenal ulcer patients and from asymptomatic subjects. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3436-3441.
214. Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Klenk H.P., Gill S., Dougherty B.A. et al. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.
215. Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-149.
216. Travis M.A., Humphries J.D., and Humphries M.J. (2003). An unraveling tale of how integrins are activated from within. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 192-197.
217. 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.
218. 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.
219. Tsutsumi R., Takahashi A., Azuma T., Higashi H., and Hatakeyama M. (2006). Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell Biol.* 26: 261-276.
220. 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.
221. Umlauf F., Keeffe E.B., Offner F., Weiss G., Feichtinger H., Lehmann E., Kilga-Nogler S., Schwab G., Propst A., Grussnewald K. et al. (1996). *Helicobacter pylori* infection and blood group antigens: lack of clinical association. *Am. J. Gastroenterol.* 91: 2135-2138.
222. Van de Bovenkamp J.H., Mahdavi J., Korteland-Van Male A.M., Buller H.A., Einerhand A.W., Boren T., and Dekker J. (2003). The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter.* 8: 521-532.
223. Van den Brink G.R., Tytgat K.M., Van der Hulst R.W., Van der Loos C.M., Einerhand A.W., Buller H.A., and Dekker J. (2000). *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* 46: 601-607.
224. van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Pena S., Midolo P., Ng E.K., Atherton J.C., Blaser M.J., and Quint W.G. (1998). Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin. Microbiol* 36: 2597-2603.

225. Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R., and De Ley J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst. Bacteriol.* 41: 88-103.
226. Vinion-Dubiel A.D., McClain M.S., Czajkowsky D.M., Iwamoto H., Ye D., Cao P., Schraw W., Szabo G., Blanke S.R., Shao Z. et al. (1999). A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J. Biol. Chem.* 274: 37736-37742.
227. Vojtova J., Kamanova J., and Sebo P. (2006). Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 69-75.
228. Walker M.M. and Dixon M.F. (1996). Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 1: 119-128.
229. Walz A., Odenbreit S., Mahdavi J., Boren T., and Ruhl S. (2005). Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology* 15: 700-708.
230. 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.
231. 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.
232. Welin M., Holmgren N.M., Nilsson P., and Enroth H. (2003). Statistical model of the interactions between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer development. *Helicobacter* 8: 72-78.
233. Werb Z., Tremble P.M., Behrendtsen O., Crowley E., and Damsky C.H. (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol.* 109: 877-889.
234. Willhite D.C. and Blanke S.R. (2004). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol.* 6: 143-154.
235. Willhite D.C., Cover T.L., and Blanke S.R. (2003). Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J. Biol. Chem.* 278: 48204-48209.
236. 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.
237. Wotherspoon A.C. (1998). *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *Br. Med Bull* 54: 79-85.
238. Wunder C., Churin Y., Winau F., Warnecke D., Vieth M., Lindner B., Zahringer U., Mollenkopf H.J., Heinz E., and Meyer T.F. (2006). Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat. Med.* 12: 1030-1038.
239. Wyatt J.I., Rathbone B.J., Sobala G.M., Shallcross T., Heatley R.V., Axon A.T., and Dixon M.F. (1990). Gastric epithelium in the duodenum: its association with *Helicobacter pylori* and inflammation. *J Clin. Pathol.* 43: 981-986.

240. 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.
241. 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.
242. Yahiro K., Niidome T., Kimura M., Hatakeyama T., Aoyagi H., Kurazono H., Imagawa K., Wada A., Moss J., and Hirayama T. (1999). Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J. Biol. Chem.* 274: 36693-36699.
243. Yahiro K., Wada A., Nakayama M., Kimura T., Ogushi K., Niidome T., Aoyagi H., Yoshino K., Yonezawa K., Moss J. et al. (2003). Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J. Biol. Chem.* 278: 19183-19189.
244. Yahiro K., Wada A., Yamasaki E., Nakayama M., Nishi Y., Hisatsune J., Morinaga N., Sap J., Noda M., Moss J. et al. (2004). Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol. Chem.* 279: 51013-51021.
245. Yamaoka Y., Soucek J., Odenbreit S., Haas R., Arnqvist A., Boren T., Kodama T., Osato M.S., Gutierrez O., Kim J.G. et al. (2002). Discrimination between cases of duodenal ulcer and gastritis on the basis of putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2244-2246.
246. Yeh Y.C., Lin T.L., Chang K.C., and Wang J.T. (2003). Characterization of a ComE3 homologue essential for DNA transformation in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 71: 5427-5431.
247. Zheng P.Y. and Jones N.L. (2003). *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol.* 5: 25-40.

7. Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BB	<i>Brucella Broth</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cam	Chloramphenicol
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Oberflächenmarker
CMC	1-cyclohexyl-3(2-morpholinoethyl)carbodiimidmetho-p-toluensulfonat
C-Terminus	Carboxyterminaler Teil eines Proteins
DAP	Diaminopimelinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreit
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EPEC	enteropathogener <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	und andere
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
(x)g	x-faches der Erdbeschleunigung
GAP	“ <i>guanine nucleotide exchange factor</i> ”
GEF	“ <i>GTPase activating protein</i> “

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
HSA	humanes Serumalbumin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LFA-1	„ <i>lymphocyte function-associated antigen-1</i> “, CD18/CD11a-Integrin
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfon Säure
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “; Anzahl der Bakterien/Viren pro Wirtszelle
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
NFAT	Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
NRU	„ <i>neutral red unit</i> “, Einheiten an Neutralrot
N-Terminus	Aminoterminaler Teil eines Proteins
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei Wellenlänge 550 nm
<i>orf</i>	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Meerrettichperoxidase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>spp.</i>	<i>sub species</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
U	Unit
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
F	Farad
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Mol pro Liter
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt

Danksagung

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

Für die unkomplizierte Übernahme der Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich herzlichst bei Prof. Dr. A. Hartmann.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer Haas für die Betreuung dieser Arbeit. Er stand mir mit seiner Erfahrung immer zur Seite und sorgte mit wertvollen Ratschlägen und seinem Engagement für das Gelingen dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Wolfgang Fischer, Dr. Xaver Sewald und Dr. Liusa Jemez-Soto für ihre Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, wodurch sie maßgeblich am erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beteiligt waren.

Herzlich bedanken möchte ich mich weiterhin bei meinen Kolleginnen und Freundinnen Andrea Kotz, Steffi Rohrer, Claudia Ertl, Tina Bauer und Beate Czech. Sie waren mir immer eine große Stütze, sowohl in fachlichen als auch privaten Dingen, und hatten immer ein offenes Ohr für die Probleme und Freuden des Laboralltags.

Außerdem danke ich den Mädels vom Mittagstisch für die Unterstützung in allen Lebens- und Gemütslagen.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Evelyn Weiss, der guten Seele des Labors bedanken. Durch ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft erleichterte sie immer wieder den Laboralltag.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Barbara und Horst Barwig, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung meine schulische und berufliche Bildung ermöglicht haben.

Besonders danke ich meinem Mann Marc Roeder für seine beständige Unterstützung, den Beistand und die Geduld, die er immer wieder für mich aufbrachte.