

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Die Funktion von Caveolin-1 in *Helicobacter pylori*-induzierter Entzündung des Magens

Ivana Hitkova

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. Priv.-Doz. Dr. R. Vogelmann
(Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg)

Die Dissertation wurde am 04.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.11.2013 angenommen.

Ein Teil dieser Dissertation wird in folgender Publikation veröffentlicht:

Hitkova, I., Yuan, G., Anderl, F., Gerhard, M., Kirchner, T., Reu, S., Röcken, C., Schäfer, C., Schmid, R.M., Vogelmann, R., Ebert, M.P.A., Burgermeister, E. (2013). Caveolin-1 protects B6129 mice against *Helicobacter pylori* gastritis. PLoS Pathogens (akzeptiert).

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
NOMENKLATUR	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 ENTDECKUNG UND EPIDEMIOLOGIE VON <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	1
1.2 <i>H. PYLORI</i>	1
1.2.1 Kolonisierungsfaktoren von <i>H. pylori</i>	2
1.2.2 Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	3
1.3 PATHOGENESE <i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTER ERKRANKUNGEN	4
1.4 IMMUNANTWORT AUF <i>H. PYLORI</i>	6
1.5 MAUS- UND ZELLADAPTIERTER <i>H. PYLORI</i>	9
1.6 CAVEOLEN UND CAVEOLINE	10
1.7 CAVEOLIN-1-PROTEIN	12
1.7.1 Caveolin-1-Interaktionspartner	13
1.7.2 Phosphorylierung von Caveolin-1	14
1.7.3 Regulation von Caveolin-1	15
1.8 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.2 Tiere	20
2.1.3 Zelllinien	20
2.1.4 Bakterienstämme	20
2.1.5 Plasmide	21
2.1.6 Oligonukleotide	21
2.1.7 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	22
2.1.8 Enzyme	24
2.1.9 Antibiotika	24
2.1.10 Zellkultur Medien Puffer und Zusätze	25
2.1.11 Nährmedien und Nährböden für Bakterien	25
2.1.12 Kits	25
2.1.13 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.14 Apparaturen und Geräte	26
2.1.15 Software	28
2.2 METHODEN	28
2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen	28
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	36

2.2.3	<i>Tierexperimentelle Methoden</i>	38
2.2.4	<i>Molekularbiologische und genetische Methoden</i>	39
2.2.5	<i>Proteinbiochemische und Analytische Methoden</i>	52
2.2.6	<i>Histologische Methoden</i>	60
2.2.7	<i>Bioinformatische Methoden</i>	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	DIE FUNKTION DES CAVEOLIN-1 IN DER <i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTEN MAGENENTZÜNDUNG <i>IN VIVO</i>	63
3.2	ROLLE VON CAVEOLIN-1 IN <i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTER ENTZÜNDUNG VON MAGENEPITHELZELLEN <i>IN VITRO</i>	69
3.2.1	<i>Einfluss von Caveolin-1 auf das Zellüberleben während einer H. pylori-Infektion</i>	69
3.2.2	<i>Einfluss von Caveolin-1 auf die Adhäsion von H. pylori an humane Magenadenokarzinom-Zellen</i>	71
3.2.3	<i>Einfluss von Caveolin-1 auf CagA-induzierte IL-8 Sekretion in humanen Magenadenokarzinom-Zellen</i>	72
3.2.4	<i>Einfluss von Caveolin-1 auf die CagA-induzierte Zellmorphologie „humming bird“</i>	73
3.2.5	<i>Molekularer Mechanismus zum Schutz vor „humming bird“</i>	75
3.2.6	<i>Einfluss von H. pylori auf die Caveolin-1-Expression</i>	88
3.2.7	<i>SREBP1 als potentieller Repressor des Caveolin-1-Promotors in H. pylori-infizierten Zellen</i>	94
4	DISKUSSION	102
4.1	BEDEUTUNG VON CAVEOLIN-1 IN <i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTER MAGENENTZÜNDUNG <i>IN VIVO</i>	102
4.2	ROLLE VON CAVEOLIN-1 IN CAGA-INDUZIERTEN SIGNALWEGEN <i>IN VITRO</i>	105
4.3	REGULATION DER CAVEOLIN-1-EXPRESSION WÄHREND EINER <i>H. PYLORI</i> -INFEKTION.....	111
5	ZUSAMMENFASSUNG	114
6	LITERATURVERZEICHNIS	116
7	ANHANG	136

Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CagA	Cytotoxin-assoziiertes Gen A (<i>cytotoxin associated gene A</i>)
Cav1	Caveolin-1
Cav1-KO	Caveolin-1 <i>Knock out</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFU	Kolonie-bildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DLC1	Deleted in liver cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EMSA	Gelretardationstest (<i>electrophoresis mobility shift assay</i>)
FBS	Fötale Rinderserum
HE	Hämatoxillin-Eosin
Hp, <i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IFN γ	Interferon gama
IgX	Immunglobulin der Klasse X
IL-X	Interleukin der Untergruppe X
IP	Immunopräzipitation
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
Neo ^R	Neomycin-Resistenz
OD ₆₀₀	Optische Dichte der Wellenlänge 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
RLU	Relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>Real time quantitative PCR</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRE	Sterol-regulatorisches Element
SREBP1	Sterol-regulatorisches Element bindendes Protein 1
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
T-PBS	Tween-PBS
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Westernblot
WC	Wilkins Chalgren
WT, wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Abkürzungen von Human- und Hundegenen werden kursiv und in Großbuchstaben (z.B. *CAV1*) geschrieben.

Mausgene und wenn im selben Abschnitt sowohl von Maus- als auch humanen Genen die Rede ist werden diese kursiv und mit einem Großbuchstabe beginnend, gefolgt von Kleinbuchstaben (z.B. *Cav1*) geschrieben.

1 Einleitung

1.1 Entdeckung und Epidemiologie von *Helicobacter pylori*

Berichte über spiralförmige Bakterien im Magen von Menschen und Tieren reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück [6]. Zum ersten Mal gelang es im Jahr 1982 den australischen Wissenschaftlern Barry Marshall und Robin Warren diese Bakterien aus Magenbiopsien von Patienten mit chronischer Gastritis und Magengeschwüren zu isolieren und zu kultivieren [7, 8]. Relativ früh wurde deutlich, dass diese heute als *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) bezeichneten Bakterien mit der Entstehung von schweren Magen- und Darm-Erkrankungen [9] sowie Magenkarzinom [10] assoziiert sind. Im Jahr 1994 wurde *H. pylori* von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als ein Klasse I humanes Karzinogen benannt [11].

Eine *H. pylori*-Infektion ist wahrscheinlich eine der am häufigsten vorkommenden chronischen bakteriellen Infektionen weltweit, da 50% der gesamten Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert sind [12]. Meist kommt es zu einer *H. pylori*-Infektion im frühen Kindesalter [13], welche im menschlichen Magen ein Leben lang persistieren kann [5]. Die Prävalenz korreliert dabei stark mit dem sozioökonomischen Status [14] und liegt zwischen 11% in den Industrieländern und 95% in den Entwicklungsländern [15]. Es wird angenommen, dass die Übertragung am häufigsten von Mensch zu Mensch stattfindet [16]. Dies geschieht insbesondere innerhalb einer Familie, da identische *H. pylori*-Stämme bei mehreren Mitgliedern einer Familie nachgewiesen wurden [17]. Vor allem infizierte Mütter stellen ein hohes Infektionsrisiko für ihre Kinder dar [18]. Ein genauer Transmissionsweg ist zwar nicht bekannt, es scheint aber oral-oral und fäkal-oral stattzufinden, da *H. pylori* sowohl im Zahnbelag und Speichel als auch im Stuhl nachgewiesen wurde [19]. In den Entwicklungsländern stellt ein zusätzliches Risiko kontaminiertes Trinkwasser dar [20].

1.2 *H. pylori*

H. pylori ist ein Gram-negatives, spiralförmiges Bakterium der Klasse ϵ Proteobakterien [6, 21]. Sein optimales Wachstum findet bei einer Sauerstoffkonzentration von 2-5% statt und gehört damit zu den Mikroaerophilen [22]. *H. pylori*-Stämme verfügen über eine außergewöhnlich hohe genetische Variabilität [23]. Zum einen ist diese durch horizontalen genetischen Austausch zwischen verschiedenen *H. pylori*-Stämmen bedingt, der bei *H. pylori* häufiger als bei anderen Bakterienspezies vorkommt [23], zum anderen tragen spontane

Mutationen, Verlust von Genen sowie Aufnahme von exogener DNA zur genetischen Vielfalt bei [24]. Eine Studie von Falush *et al.* hat gezeigt, dass *H. pylori* pro Jahr durchschnittlich 60 kleine DNA-Abschnitte aufnimmt [25]. Diese genetischen Veränderungen ermöglichen wahrscheinlich eine bessere Adaptation an individuelle Nischen im humanen Magen.

1.2.1 Kolonisierungsfaktoren von *H. pylori*

H. pylori ist ein neutrophiles Bakterium, d.h. es benötigt einen (fast-) neutralen pH-Wert (pH 6-8 [26]) zum Wachsen. Da im Inneren des menschlichen Magens ein sehr niedriger pH-Wert (pH 1-4 [27]) herrscht, besitzt *H. pylori* einen Anpassungsmechanismus, die sogenannte Säure-Akklimatisierung [28]. Eine entscheidende Rolle dabei spielt die Synthese von Urease, welche bis zu 10% des Gesamtproteins des Bakteriums deckt [29]. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Harnstoff, der bei einem niedrigen Umgebungs-pH-Wert in das Zytoplasma von *H. pylori* transportiert wird [30], in Ammoniak und Kohlendioxid. Die folgende Protonierung von Ammoniak führt zur Neutralisierung des pH-Wertes im Zytosol und Periplasma [31] und somit zur Erhaltung wichtiger Stoffwechselprozesse des Bakteriums.

Trotz der Urease-Aktivität kann *H. pylori* nur kurze Zeit im extrem niedrigen pH-Wert des Magenlumens überdauern [27] und muss sich schnell in einen pH-günstigeren Bereich wie den der Magenschleimhaut (pH=6,5) bewegen, wo das Bakterium gewöhnlich persistiert [32]. Die schnelle Beweglichkeit ist auf die Rotation von 3-6 unipolar lokalisierten Flagellen zurückzuführen [33]. Tierversuche haben gezeigt, dass Urease und Motilität zu den entscheidenden Kolonisierungsfaktoren von *H. pylori* gehören, da sowohl Urease-lose [34] als auch unbewegliche [35] *H. pylori*-Mutanten nicht in der Lage waren den Magen zu besiedeln.

Ein weiterer essentieller Faktor bei der Kolonisierung des Magens ist die Adhäsion. Histologische Analysen von infiziertem Gewebe zeigen, dass der größte Teil der Bakterien tief im Magenschleim frei schwimmt und etwa 20 % fest an das Magenepithel adhären [36]. Adhärenz bietet *H. pylori* unter anderem den Schutz vor der Ausspülung in das Magenlumen während der peristaltischen Bewegung des Magens und der Erneuerung des Magenschleims [37]. Zu den am besten charakterisierten Adhäsinen von *H. pylori* gehört BabA, welches fucosylierte Blutgruppenantigene (Lewis^b) bindet und SabA, das Blutgruppenantigene wie sialylierte Saccharide (s-Lewis^a und s-Lewis^x) erkennt [36].

1.2.2 Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Der wichtigste Virulenzfaktor von *H. pylori* ist die Cytotoxin-assoziierte Gen-Pathogenitäts-Insel (*cytotoxin-associated gene pathogenicity island, cagPAI*) [38]. Es handelt sich hier um einen etwa 40 kb großen Genomabschnitt mit etwa 31 Genen, die für das Typ-IV-Sekretionssystem (TFSS) und das Cytotoxin-assoziierte Gen A (*cytotoxin-associated gene A, CagA*) kodieren [39].

Das CagA-Protein ist 120-145 kDa groß und dient als Marker für das Vorhandensein von *cagPAI* [40]. CagA wird über das Typ-IV-Sekretionssystem direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert [41]. Daraufhin kann es durch die Src [42] oder Abl Kinasen [43] am Tyrosin in sogenannten EPIYA-Motiven, die in einer variablen Anzahl am C-Terminus des Proteins vorkommen [44], phosphoryliert werden. Phosphoryliertes CagA bindet und aktiviert die SHP2-Tyrosinphosphatase [45], welche daraufhin die Fokale-Adhäsions-Kinase (FAK) dephosphoryliert und somit inaktiviert [46]. Dieses bewirkt eine Reorganisierung des Aktinzytoskeletts und die Bildung von langgestreckten, nadelähnlichen Zellfortsätzen; ein Phänotyp, der als *humming bird* (Kolibri) bezeichnet wird [47].

Jedoch kann auch unphosphoryliertes CagA-Protein zur Pathogenese während einer *H. pylori*-Infektion beitragen. In der Studie von Amieva *et al.* konnte gezeigt werden, dass unphosphoryliertes CagA mit Proteinen der dichten Verbindungen (*tight junctions*) assoziiert, was in der Zerstörung der epithelialen Zellbarrieren resultiert [48]. Des Weiteren führt die Translokation von CagA zum Verlust von Zellpolarität sowie Zelladhäsion der Wirtszelle [49, 50].

H. pylori Stämme können bezüglich des Vorhandenseins des *cagA* Gens (und damit auch *cagPAI*) in zwei Typen eingeteilt werden. TypI-Stämme besitzen *cagA*, TypII-Stämme dagegen nicht [51]. *H. pylori*-Stämme vom TypI scheinen virulenter zu sein als die Stämme vom TypII, da sie in Patienten mit einem hohen Entzündungsgrad [52], Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren [53], atrophischer Gastritis [54] und Adenokarzinoma [55] nachgewiesen wurden.

Ein weiterer Virulenzfaktor von *H. pylori* ist das wasserlösliche vakuolisierende Zytotoxin A (*vacuolating cytotoxin A, VacA*). Das 88 kDa große Protein wird zum Teil ins extrazelluläre Medium sekretiert [56] und zum Teil bleibt es an der Oberfläche des Bakteriums gebunden [57]. Das sekretierte Protein scheint ziemlich inaktiv zu sein und erwirbt seine biologische Aktivität erst bei einem sauren oder basischen pH-Wert [58]. Unter diesen Bedingungen können sich VacA-Monomere in die *lipid rafts* der Wirtszellmembran einlagern [59] und zu porenförmigen Strukturen oligomerisieren, die zu einer erhöhten Permeabilisierung und

schließlich zur Depolarisierung der Plasmamembran führen [60]. Des Weiteren führt aktives VacA zur Bildung von großen cytoplasmatischen Vakuolen [61], zur Inhibierung der T-Zellaktivierung [62] sowie zur Induktion des Zelltodes [63]. Obwohl alle *H. pylori*-Stämme über ein *vacA* Gen verfügen, unterscheiden sie sich aufgrund eines Polymorphismus des *vacA* Gens in der Cytotoxin-Produktion [64].

1.3 Pathogenese *H. pylori*-induzierter Erkrankungen

Eine *H. pylori*-Infektion induziert zuerst eine lokale Entzündung der Magenschleimhaut (Gastritis), die in der akuten Phase der Infektion mit einer deutlichen Infiltration von polymorphonukleären Zellen, insbesondere neutrophilen Granulozyten in die Lamina Propria und in das Magenepithel verbunden ist [65, 66] und aus diesem Grund als akute Gastritis bezeichnet wird [66]. Bei einer geringen Anzahl von infizierten Personen kann es zu einer spontanen Eradikation von *H. pylori* und Heilung der Magenschleimhaut kommen [65]. Bei den meisten Fällen ist jedoch das Immunsystem des Betroffenen nicht in der Lage die Infektion zu beseitigen [65] und es kommt innerhalb von kurzer Zeit (bis zu 74 Tagen) zu einer erhöhten Infiltration von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie Plasmazellen und somit zur Entwicklung einer chronischen Entzündung [66, 67]. Diese wird aufgrund der Persistenz von neutrophilen Granulozyten als aktive chronische Gastritis bezeichnet [66].

Eine chronische Entzündung verläuft bei den meisten infizierten Personen (80%) asymptomatisch [5]. Bei 10-20% kann es jedoch zur Ausbildung von Magen- und Zwölffingerdarm-Geschwüren kommen [5]. Weniger als 0,1% der infizierten Personen entwickeln ein so genanntes mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (*mucosa associated lymphoma tissue*, MALT) und bei etwa 1-3% entstehen Adenokarzinome [10]. Die Entwicklung dieser Erkrankungen dauert in der Regel mehrere Jahrzehnte und hängt sowohl von der Virulenz des jeweiligen *H. pylori*-Stammes als auch von der Immunreaktion des infizierten Wirtes ab [9] und zeigt eine starke Korrelation mit dem Ausmaß und Lokalisation der Gastritis [68].

Die Mehrheit der asymptomatischen Personen entwickelt eine nicht atrophische milde chronische Gastritis, die sowohl im Korpus als auch im Antrum des Magens verteilt ist und daher als nicht atrophische Pangastritis bezeichnet wird (Abbildung 1.1). Bei diesen Personen ist die Magensäure-Produktion annähernd normal [58]. Eine dominante Entzündung im Antrum ist mit einer erhöhten Menge von Gastrin sowie einer übermäßigen Magensäureproduktion assoziiert [69]. Letztere ist auf die relativ gesunde Korpus Mukosa, die Säure-sezernierende Zellen, sogenannte Parietalzellen enthält, zurückzuführen [9]. Ein

andauernd hoher Gastrin-Spiegel fördert sowohl eine permanente Säureproduktion als auch das Wachstum von Parietalzellen [69]. Somit wird immer mehr Säure sekretiert. Dies führt auch zu einem Anstieg der Säurekonzentration im Zwölffingerdarm, was zu Gewebeschäden und später zur Bildung von Zwölffingerdarmgeschwüren führen kann [9]. Diese Art von Gastritis ist bei Menschen am meisten verbreitet [68] und stellt ein geringes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms dar [10].

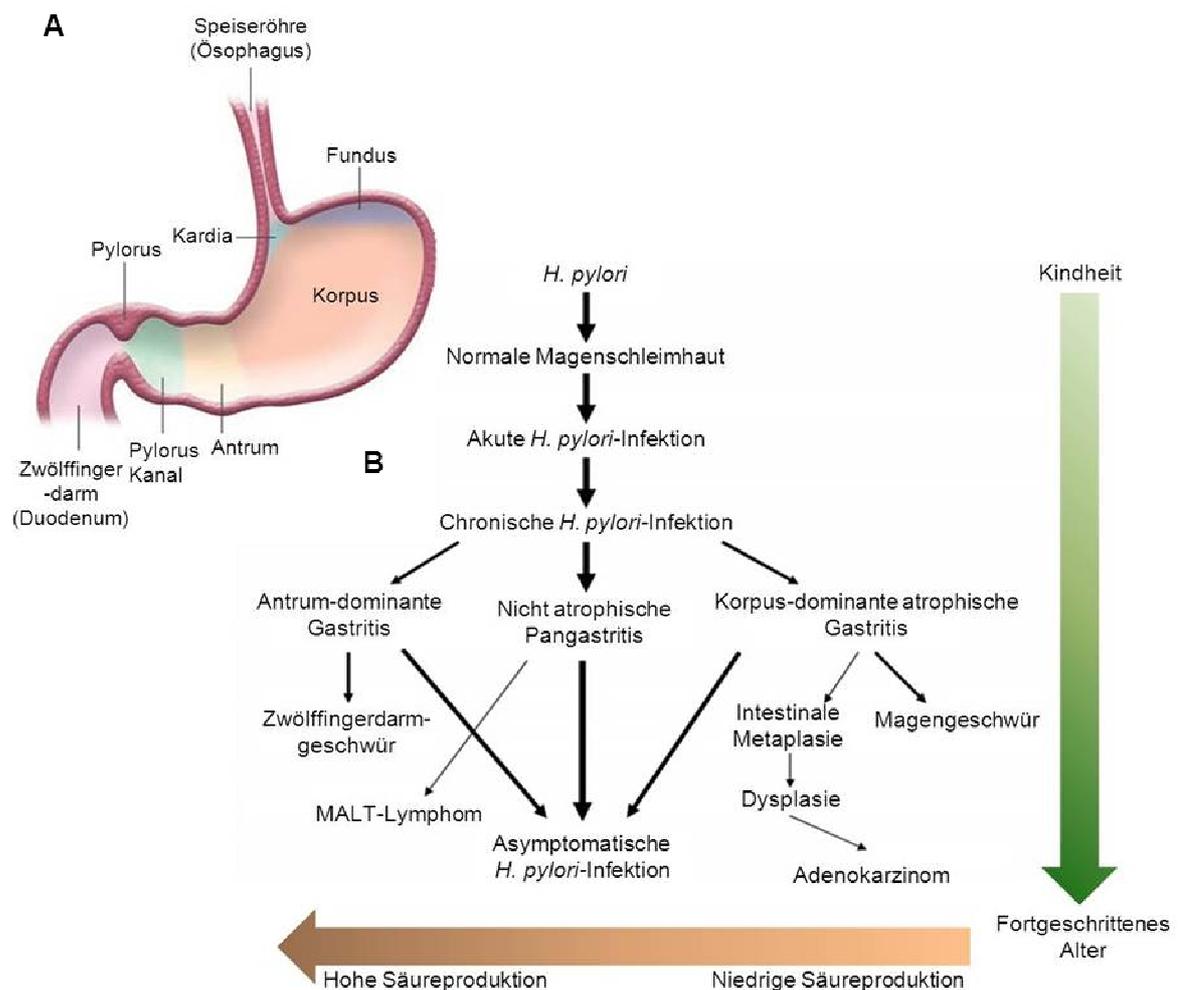


Abbildung 1.1 *H. pylori*-induzierte Erkrankungen. **A:** Schematischer Aufbau des menschlichen Magens. **B:** Verlauf von *H. pylori*-induzierten Erkrankungen. Zu einer *H. pylori*-Infektion kommt es in der frühen Kindheit und es kann mehrere Jahrzehnte bis zur Entwicklung von schweren Erkrankungen dauern. Die Mehrheit der infizierten Personen bleibt asymptomatisch. Personen mit starker Magensäureproduktion sind prädisponiert für die Entwicklung von Zwölffingerdarmgeschwüren, dagegen ist eine geringe Säureproduktion mit der Entstehung von atrophischer Gastritis und schließlich Adenokarzinomen assoziiert. Modifiziert nach [4] (A) und [5] (B) .

Dagegen prädisponiert eine vorwiegende Entzündung des Magenkorpus zur Entstehung einer atrophischen Korpus-Gastritis [68], die auf die Zerstörung von speziellen Magendrüsen und darin enthaltenen Parietalzellen zurückzuführen ist [4] und somit durch eine niedrige Säuresekretion (Hypochlorhydrie) begleitet wird [70]. Bei Personen mit dieser Art von Gastritis besteht ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Magengeschwüren sowie den Vorstufen des Magenkarzinoms, intestinale Metaplasie und Dysplasie, und schließlich des Adenokarzinoms [68].

Das Magenkarzinom steht an vierter Stelle der Prävalenz aller Karzinome und gilt als zweithäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [4]. Global gesehen sind etwa 5,5% aller infektionsbedingten Krebsfälle auf *H. pylori* zurückzuführen [10].

Eine weitere schwere Erkrankung in Folge einer *H. pylori*-Infektion stellen MALT dar. Histologisch gesehen handelt es sich hier um lymphoepitheliale Läsionen, die als Folge einer starken Infiltration und Besiedlung von Magendrüsen durch neoplastische Zellen entstanden sind [71]. Der Ursprung dieser neoplastischen Zellen liegt in autoreaktiven B-Zellen, die im Laufe einer *H. pylori*-Infektion gebildet werden können [71]. 90% aller MALT- Lymphome sind auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückzuführen und können im frühen Stadium bei etwa 80 % Patienten in Folge einer *H.pylori*-Eradikations-Therapie effektiv zurückgebildet werden [72].

1.4 Immunantwort auf *H. pylori*

Ähnlich wie bei anderen Pathogenen besteht eine Immunantwort auf eine *H. pylori*-Infektion aus einer unspezifischen, angeboren und einer spezifischen, adaptiven Immunantwort. Bei der angeborenen Immunantwort handelt es sich um einen schnelle, unspezifische Reaktion zur Beseitigung von Pathogenen [73]. Hier werden bestimmte strukturelle Komponenten von Bakterien, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) erkannt, die unter allen Bakterien hochkonserviert sind [74]. Die Erkennung solcher bakteriellen Muster wird durch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) vermittelt [74], die auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophilen Granulozyten [75], Monozyten, Makrophagen, unreifen dendritischen Zellen [76] aber auch Magenepithelzellen [77] exprimiert werden. Die Bindung von *H. pylori*-Komponenten durch diese Rezeptoren induziert in diesen Zellen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin (IL) IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 [78]. IL-8 ist ein potenter chemotaktischer Lockstoff und Aktivator neutrophiler Granulozyten [79] und wird in großen Mengen von Epithelzellen nach

einem direkten Kontakt mit *H. pylori* sezerniert [80]. Somit kommt es zu einer verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die eine charakteristische Zellkomponente in der *H. pylori*-induzierten Entzündung darstellen [66]. Laut Yamaoka *et al.* induzieren *cagA*-positive *H. pylori*-Stämme eine höhere Expression von *IL-8* mRNA als *cagA*-negative Stämme [81]. Die wesentliche Funktion von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen besteht in der Phagozytose und anschließender Lyse der aufgenommenen Bakterien sowie der Freisetzung antimikrobieller Substanzen [82]. *H. pylori* hat jedoch eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, die ihm das Entkommen vor einem Angriff durch das Immunsystem ermöglichen [38]. Somit kann die angeborene Immunantwort das Bakterium nicht vollständig eliminieren und trägt sogar durch die ständige Freisetzung antimikrobieller Substanzen wie zum Beispiel Reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) zur Schädigung des Gewebes bei [83]. Neben *IL-8* sezernieren Magenepithelzellen sowie Monozyten in Folge einer *H. pylori*-Infektion das Chemokin RANTES [84], das als ein starkes chemotaktische Molekül für T-Zellen und Monozyten fungiert [85].

Zusätzliche Infiltration von T- und B-Lymphozyten in *H. pylori*-infiziertes Gewebe sowie die Ausbildung von Lymphfollikeln deutet auf die Aktivierung der adaptiven Immunantwort hin. Die adaptive Immunantwort gegen Bakterien basiert auf einer spezifischen Reaktion, die gegen charakteristische bakterielle Epitope gerichtet ist [73]. *H. pylori* löst sowohl eine zelluläre (Zell-vermittelte) als auch eine humorale (Antikörper-vermittelte) Immunantwort aus [78].

T-Lymphozyten (T-Zellen) können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen. CD4-T-Zellen, die auch T-Helferzellen genannt werden, können intrazelluläre Pathogene töten und zwar durch Aktivierung von Makrophagen sowie extrazelluläre Krankheitserreger durch Stimulation von B-Lymphozyten dank deren Produktion pathogen-spezifischer Antikörper [82]. CD8-T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, sind vor allem auf die Vernichtung von virusinfizierten Zellen spezialisiert [82].

In Magen von *H. pylori*-infizierten Personen wurde eine erhöhte Infiltration von sowohl CD4- und CD8-T-Zellen beobachtet, jedoch überwiegen CD4-T-Zellen [86].

Die Aktivierung von CD4-T-Zellen erfolgt durch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC) wie zum Beispiel dendritische Zellen (DC), aber auch Makrophagen und B-Zellen [87]. Diese nehmen Antigene aus der Umgebung auf und präsentieren sie naiven (antigenunerfahrenen) CD4-T-Zellen als Peptide auf sogenannten MHCII Molekülen. Die Antigenerkennung erfolgt durch den T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche der CD4-T-Zelle [82]. Zusätzlich erhalten naive CD4-T-Zellen durch Bindung des Rezeptors CD28 der CD4-T-Zelle an das B7.1- (CD80) oder B7.2- (CD86) Molekül der aktivierten APC ein ko-

stimulierendes Signal, das für eine vollständige Aktivierung wichtig ist [82]. Anschließend können aktivierte CD4-T-Zellen in zwei Hauptgruppen von T-Helferzellen (T_H -Zellen), in T_{H1} - und T_{H2} -Zellen, differenzieren [88]. Dabei spielen Zytokine aus dem Umfeld eine entscheidende Rolle [89]. IL-12, das von aktivierten Makrophagen und DCs produziert wird, fördert die Entstehung von T_{H1} -Zellen [90]. Diese sezernieren große Mengen an IL-2 und Interferon gamma (IFN_γ) und führen somit zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen, die daraufhin die zuvor aufgenommenen Pathogene effektiv abtöten können [82]. Zusätzlich produzieren aktivierte Makrophagen eine erhöhte Menge von TNF α , IL-1, IL-6 und IL-8 [82].

Dagegen fördert IL-4 die Differenzierung zu T_{H2} -Zellen, die wiederum IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 produzieren. Diese Zytokine sowie eine direkte Interaktion von T_{H2} -Zellen mit B-Zellen fördern die Aktivierung und Proliferation von B-Zellen [82]. Ein Teil der aktivierten B-Zellen entwickelt sich zu Plasmazellen, die Immunglobuline (Ig) mit niedriger Affinität sezernieren. Ein anderer Teil der aktivierten B-Zellen wandert in primäre Follikel eines lymphatischen Organs, in welchem sie weiter proliferieren und sogenannte Keimzentren ausbilden, in denen nach zahlreichen Modifikationen Plasmazellen mit hochaffinen Antikörpern sowie Gedächtnis-B-Zellen entstehen [82]. Spezifische Antikörper können durch Anlagerung an das erkannte Antigen zur Neutralisierung, Opsonisierung und somit verbesserter Phagozytose des Antigens oder zur Aktivierung des Komplement-Systems führen [82].

Zudem verfügt das adaptive Immunsystem über mehrere T-Zell-Untergruppen, die eine regulatorische Funktion erfüllen. Von diesen sind die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen am besten charakterisiert [91]. $CD4^+CD25^+$ T-Zellen werden als natürliche T-regulatorische Zellen (Treg) bezeichnet und werden im Thymus als eine funktionell reife und individuelle Subpopulation von T-Zellen gebildet [92]. Sie unterdrücken die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Effektorzellen in einem kontaktabhängigen Prozess [91] und können somit die Entwicklung einer unkontrollierten Immunantwort sowie von Autoimmunerkrankungen verhindern [92].

Während einer *H. pylori*-Infektion scheint der T_{H1} -Phänotyp dominant zu sein. T-Zellen aus Magenbiopsien infizierter Menschen [93, 94], Mäusen [95] und Affen [96] produzieren hauptsächlich IFN_γ und TNF α . Diese Art von Immunantwort, die eigentlich zur Beseitigung intrazellulärer Pathogener geeignet ist, kann eine *H. pylori*-Infektion nicht effektiv eliminieren und fördert sogar die Entstehung gastroduodenaler Erkrankungen [97].

Trotz der in vielen Studien beschriebenen dominanten T_{H1} -Immunantwort wurde in der Magenmukosa von *H. pylori*-infizierten Patienten eine gesteigerte Anzahl von B-Zellen

beobachtet [98]. Sowohl im Serum als auch im Magen infizierter Menschen wurden *H. pylori*-spezifische Antikörper der Immunglobulinklasse IgM, IgG und IgA nachgewiesen [99-101]. Die Rolle der mukosalen Immunglobuline in der *H. pylori*-Infektion ist jedoch nicht geklärt. Eine Studie von Keenan *et al.* hat gezeigt, dass spezifische IgG jedoch nicht IgA eine Rolle im Schutz gegen *H. pylori* spielen könnten, da eine *H. pylori*-Infektion in zuvor mit *H. pylori*-Partikeln immunisierten Mäusen zu einer erhöhten Produktion von IgG führte was wiederum in einer geringen Kolonisierung mit *H. pylori* resultierte [102]. Eine andere Studie mit Immunglobulin-defizienten Mäusen hat trotz des Fehlens der Immunglobuline, in den zuvor immunisierten Mäusen, eine ähnlich geringe Kolonisierung mit *Helicobacter felis* wie in den immunisierten Wildtyp-Mäusen nachgewiesen [103]. Es wurde auch gezeigt, dass B-Zellen während einer *H. pylori*-Infektion autoreaktive Antikörper produzierten, die zur Pathogenese beitragen [104].

Zusätzlich scheinen in der Regulation der *H. pylori*-Infektion CD4⁺CD25⁺T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. In der Magenschleimhaut *H. pylori*-infizierter Personen wurde eine erhöhte Infiltration von CD4⁺CD25⁺T-Zellen detektiert. [105]. Versuche mit *H. pylori*-infizierten Mäusen zeigen, dass die Depletion von CD4⁺CD25⁺T-Zellen in einer erhöhten Entzündung resultierte, die jedoch mit einer niedrigeren bakteriellen Besiedlung verbunden war [91].

Die Tatsache, dass *H. pylori* trotz der ausgeprägten adaptiven Immunantwort in seinem Wirt ein Leben lang persistieren kann, ist einer Reihe von immunmodulierenden Mechanismen zuzuschreiben. *H. pylori*-Stämme, die an ihren Lipopolysacchariden Lewis-Antigene exprimieren, können durch die Bindung von DC-SIGN-Lektinen an dendritischen Zellen die Entwicklung von T_H1-Zellen inhibieren [106]. In der Studie von Wunder *et al.* wurde gezeigt, dass *H. pylori* Cholesterin von seinem Wirt extrahiert, um es nach der Glykosylierung in die eigene Membran einzubauen [107]. Somit entkommt *H. pylori* der Phagozytose durch antigenpräsentierende Zellen und inhibiert zugleich die Aktivierung von T-Zellen. Zudem kann *H. pylori* durch die Erhöhung der Fas-Ligand-Expression die Apoptose von T-Zellen induzieren [108].

1.5 Maus- und Zelladaptierter *H. pylori*

Die Pathogenese der *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen wird sehr häufig an Mausmodellen untersucht. Dieses Tiermodell bietet einen Vorteil nicht nur aufgrund ziemlich preiswerter Haltung, sondern auch aufgrund der Verfügbarkeit einer großen Vielfalt an Inzucht-, transgenen und mutierten Mausstämmen [109]. Die Etablierung eines geeigneten *H. pylori*-Stammes für die Mausinfektion war mühsam, da die meisten klinische *H. pylori*-Isolate aus

Menschen nur eine niedrige Kolonisierungsrate in Mäusen aufwiesen [110]. 1997 gelang es jedoch Lee *et al.* ein klinisches *H. pylori*-Isolat an den Mausmagen zu adaptieren [110]. Dieser als *H. pylori* sydney strain 1 (*H. pylori* SS1) bezeichnete Stamm kolonisiert langfristig sowohl Korpus als auch Antrum verschiedener Mäusestämme [110, 111]. In C57BL/6- und BALB/c-Wildtypmäusen induzierte *H. pylori* SS1 nach einer Infektionsdauer von 8 Monaten eine deutlich ausgeprägte aktive chronische Gastritis, die von einer Atrophie begleitet war [110]. Daher findet dieser Stamm vor allem bei Studien zur Auswirkung chronischer Entzündungen eine breite Anwendung. Das *cagA* sowie *vacA* Gen ist bei *H. pylori* SS1 vorhanden [110], die Toxine scheinen jedoch nicht funktionell zu sein. Dieses ist im Fall vom CagA auf ein unvollständiges *cagPAI* zurückzuführen [112]. Das *vacA* Gen weist dagegen einen sogenannten s2m2 Genotyp auf, der aufgrund verschiedener Modifikationen für nicht cytotoxische VacA-Proteine kodiert [113]. Aufgrund dieser genetischen Prädisposition ist dieser Stamm für Mäuse im Vergleich zu *H. pylori*-Stämmen mit vollständigem *cagPAI* sehr gut verträglich und daher vor allem für langfristige Studien geeignet [114].

Neben den Mausversuchen werden immer häufiger *H. pylori*-basierte Infektionsexperimente in Zellkulturen durchgeführt. Dieses System ermöglicht mit einem relativ niedrigen Aufwand eine schnelle und nähere Charakterisierung von konkreten molekularen Mechanismen. Aus einer mittlerweile großen Anzahl von *H. pylori*-Stämmen, die zur Zellinfektion verwendet werden, kommt *H. pylori* G27 zu verstärktem Einsatz. Dieser ursprünglich aus Patienten mit einem Zwölffingerdarmgeschwür isolierte *H. pylori*-Stamm [115] ist sehr gut an die Zellkultur adaptiert und aufgrund einer leichten Transformation auch für genetische Manipulationen geeignet [51]. *H. pylori* G27 ist *cagA*- sowie *vacA*-Gen positiv und deren Genprodukte sind biologisch aktiv [116]. Da das CagA-Protein mit hoher Effizienz in die Zellkulturzellen transloziert wird, ist dieser Stamm auch zur Analyse von CagA-spezifischen Effekten sehr gut geeignet [117, 118].

1.6 Caveolen und Caveoline

Caveolen werden als 50-100 nm große flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran definiert [119]. Sie können jedoch unterschiedliche Formen und zelluläre Verteilungen aufweisen [120-123]. Caveolen stellen eine Subklasse von lipid-reichen Membrandomänen („*lipid rafts*“) dar und ähnlich wie *lipid rafts* sind sie reich an Cholesterin und Sphingolipiden [123]. Eine charakteristische Protein-Komponente von Caveolen sind die sogenannten Caveoline [124]. In Säugern wurden bis jetzt drei verschiedene Mitglieder der Caveolin-Genfamilie charakterisiert: *cav1* [125], *cav2* [126] und *cav3* [127]. Zwar ähneln sich alle drei Caveoline in ihrer Proteinstruktur, unterscheiden sich jedoch in ihren zellulären Verteilung

und spezifischen Eigenschaften. Caveolin-1 und -2 werden meistens koexprimiert und bilden zusammen stabile Hetero-Oligomere in den meisten Zelltypen, vor allem aber in Fibroblasten, Endothelzellen, Zellen glatter Muskulatur, Myoblasten der Skelettmuskulatur und Adipozyten [128].

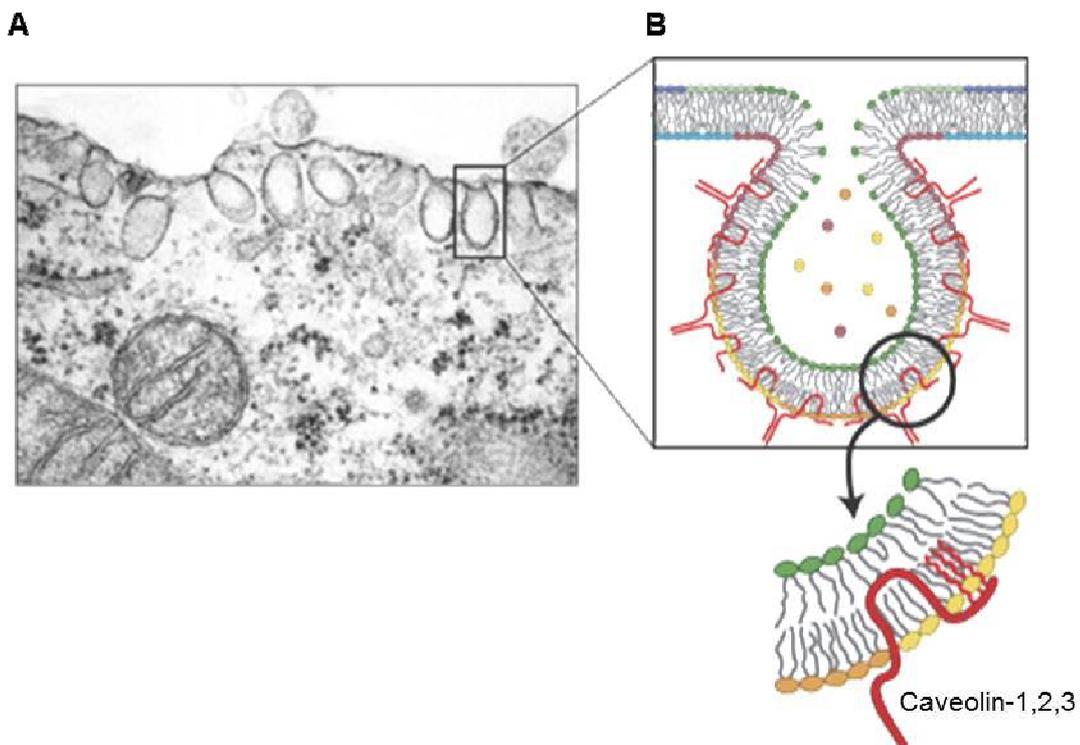


Abbildung 1.2 Caveolae. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von kleinen flaschenförmigen Einstülpungen in der Plasmamembran humaner Fibroblasten. (B) Caveoline stellen eine charakteristische Komponente von Caveolen dar. Modifiziert nach [3].

Caveolin-1 ist dabei sowohl für eine stabile Expression als auch für die Integrität des Caveolin-2 in die Membran erforderlich [2]. Zusätzlich ist Caveolin-1, jedoch nicht Caveolin-2 in zahlreichen Zellen des Immunsystems darunter Makrophagen, dendritischen Zellen, CD4- und CD8-T-Zellen vorhanden [129]. Caveolin-3 wird hauptsächlich in Zellen von Skelett-, Herz- und Diaphragma-Muskeln exprimiert [127].

Caveolin-1 (Cav1), ein 21-24 kDa großes integrales Membranprotein, ist der wesentliche Bestandteil der Caveolae und dient daher auch als Marker für dieses Organell [130]. Darüber hinaus ist Caveolin-1 für die Biogenese von Caveolen notwendig, da Caveolin-1-defiziente Mäuse keine morphologisch definierbaren Caveolen aufweisen [131]. Umgekehrt bewirkte eine Caveolin-1-Überexpression in Zellen, die über kein endogenes Caveolin-1 verfügen, eine

Induktion der Bildung von Caveolen [132]. Caveolin-1 findet man aber nicht nur in Caveolen, sondern auch in manchen Zellen im Zytoplasma, Mitochondrien und sekretorischen Vesikeln [133].

Eine allgemeine Funktion von Caveolin-1 und Caveolen ist bis jetzt nicht klar. Sie sind jedoch beteiligt an zahlreichen zellulären Prozessen wie der Endozytose und somit verbundenem Transport von Makromolekülen entlang des Endothels [134], der Regulation intrazellulärer Calcium-Konzentration [135], der Signaltransduktion [119] und der Cholesterinhomeostase [136]. Zusätzlich werden über Caveolen nicht nur bakterielle Toxine wie das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* [137], sondern auch Viren wie das Siam Virus 40 [138], Polyoma Virus BK [139] und sogar Bakterien wie *Escherichia coli* K1 [140] oder *Chlamydia trachomatis* [141], in die Wirtszelle internalisiert. Da Caveolen normalerweise nicht mit Lysosomen fusionieren [142], können Pathogene auf dieser Weise vor Degradierung in Lysosomen geschützt werden [143].

1.7 Caveolin-1-Protein

Das Caveolin-1-Protein ist über eine 33 Aminosäuren (AS) lange, hydrophobe Transmembran-Domäne (AS 102-134) in der Plasmamembran verankert [144] (Abbildung 1.3). Sowohl der Amino- als auch der Carboxyterminus sind im Zytosol lokalisiert [145]. Somit kann Caveolin-1 ungehindert mit zytosolischen Molekülen interagieren [146]. Über eine am N-terminus liegende Domäne, die so genannte Oligomerisierungsdomäne (AS 61-101), bildet Caveolin-1 Homo- und Hetero-Oligomere-Komplexe, die aus 14-16 Monomeren bestehen und insgesamt eine Größe von 200-400 kDa aufweisen [147, 148]. Die Oligomerisierung findet durch laterale Interaktion von α -Helices innerhalb der ersten 101 Aminosäuren am N-terminalen Ende des Proteins statt und führt damit zur Entstehung des filamentären Mantels der Caveolae [149]. Eine andere am N-Terminus liegende Domäne, die so genannte Caveolin-1-Scaffolding-Domäne (CSD, AS 82-101), ermöglicht eine direkte Interaktion des Caveolins-1 sowohl mit sich selbst als auch mit seinen Interaktionspartnern [146, 150]. Der Carboxyterminus weist mehrere Palmitoylierungsstellen auf, die für die Bindung von Cholesterin und dessen Transport zur Caveolae notwendig sind [151].

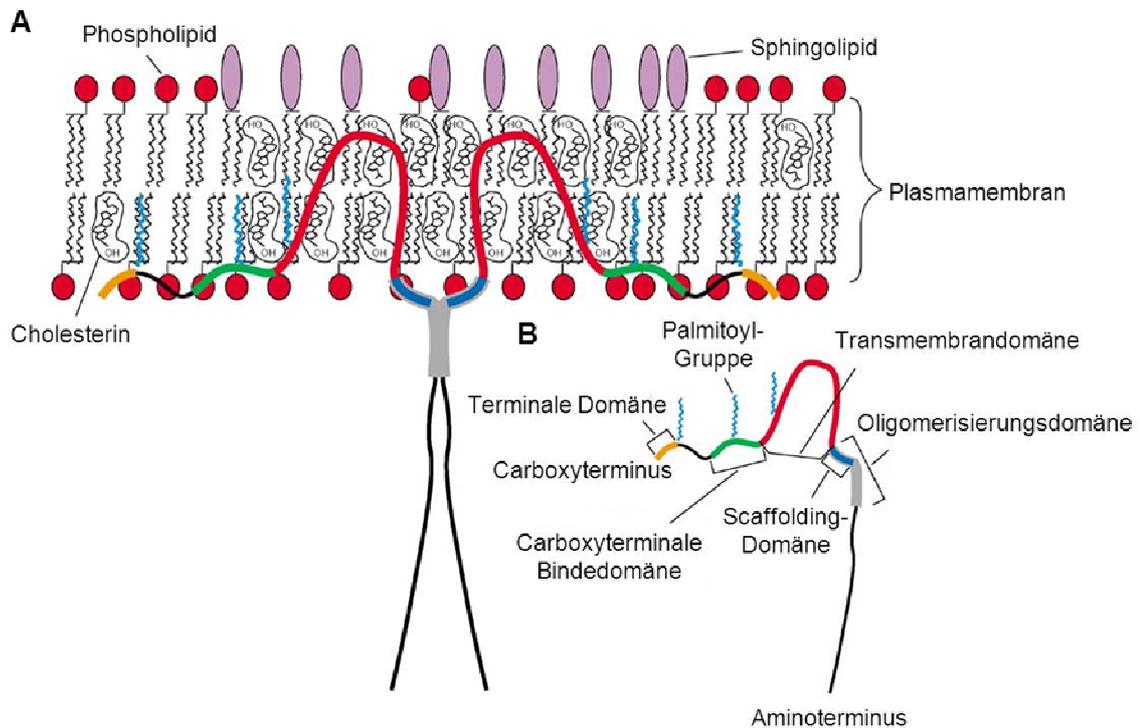


Abbildung 1.3 Primäre Struktur und Topologie von Caveolin-1. **A:** Die vermutete Membrantopologie von Caveolin-1. Zur Vereinfachung ist ein Dimer bestehend aus zwei Caveolin-1 Monomeren dargestellt. In der Wirklichkeit assoziieren etwa 14-16 Monomere zu einem einzelnen Caveolin-1 Homooligomer. Über eine Transmembrandomäne ist Caveolin-1 in die Doppelschicht der Plasmamembran inseriert. Sowohl Carboxy- als auch Aminoterminus ragen ins Zytosol. **B:** Caveolin-1 Domänen. Modifiziert nach [2].

1.7.1 Caveolin-1-Interaktionspartner

Caveolen stellen eine Art Anreicherungsstelle dar, da sie neben Caveolin-1, Cholesterin und Sphingolipiden eine Vielzahl verschiedener Signaltransduktionsmoleküle beinhalten können [152]. Caveolin-1 interagiert direkt mit zahlreichen dieser Signalmolekülen, darunter H-Ras, Src Tyrosin-Kinase der Src Familie, extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK1/2), Mitogen-aktivierten ERK-Kinasen (MEK1/2), α Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen sowie der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [152]. Wie zuvor erwähnt, ist die Caveolin-1-Scaffolding-Domäne (CSD) für die Interaktionen des Caveolin-1 mit diesen Proteinen zuständig. Diese 20 AS lange (81-101) am N-Terminus lokalisierte Domäne erkennt und bindet Proteine mit sogenanntem Caveolin1-bindenden Motiv ($\Phi X \Phi X X X \Phi$, $\Phi X X X \Phi X X \Phi$ oder $\Phi X \Phi X X X \Phi X X \Phi$) wobei Φ für Tryptophan, Phenylalanin oder Tyrosin steht und X eine beliebige Aminosäure darstellt [150]. Die CSD-Domäne scheint nur die inaktive Form des jeweiligen Moleküls zu erkennen, da beim mutierten und somit konstitutiv

aktivierten H-Ras [153] sowie heterotrimeren G-Proteinen [154] keine Bindung der CSD zu beobachten war. Somit bewirkt Caveolin-1 in den meisten Fällen eine negative Regulation des jeweiligen Interaktionspartners und dem damit verbundenen Signalweg.

Caveolin-1 kontrolliert nicht nur Zellüberleben [155], Proliferation [156], Migration [157], Zellbarriere und Adhäsion [158], sondern auch Entzündungsreaktionen. Die Studie von Garrean *et al.* hat gezeigt, dass eine Caveolin-1-bedingte Hemmung der eNOS in einer positiven Regulation der NFκB-Aktivität resultiert, was wiederum zu einer stärkeren, durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Lungenentzündung in Caveolin-1-Wildtyp-Mäusen führt [159]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Caveolin-1 das angeborene Immunsystem reguliert, indem es in Makrophagen den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) bindet und daraufhin die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beeinträchtigt [160]. Cav1-KO-Mäuse reagieren auf eine *Salmonella* Typhimurium-Infektion aufgrund einer defekten angeborenen Immunität mit einer erhöhten Produktion von Entzündungszytokinen und einer hohen Mortalitätsrate [161]. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*, die in Cav1-KO Mäusen zu einem deutlich stärkeren Entzündungsgrad, aber einer schwachen Elimination dieser Bakterien führte [162].

1.7.2 Phosphorylierung von Caveolin-1

Caveolin-1 kann an mehreren Stellen phosphoryliert werden. Eine Phosphorylierung am Serin 80 (Ser80) scheint wichtig für die Sekretion des eigentlich membranständigen Caveolin-1 zu sein [163]. Durch die Phosphorylierung am Tyrosin wurde Caveolin-1 ursprünglich entdeckt, da es das am stärksten phosphorylierte Protein in Rous-Sarcoma-Virus (RSV)-transformierten Zellen war [164]. Caveolin-1 weist mehrere potentielle Tyrosinreste auf, die phosphoryliert werden können [165]. Von diesen wird vorzugsweise Tyrosin 14 (Tyr14) durch Kinasen der Src Familie: Src, Abl und Fyn, erkannt und in der Gegenwart zahlreicher Stimuli wie Insulin, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Angiotensin II, sowie oxidativen und hyperosmotischen zellulärem Stress phosphoryliert [165, 166]. Tyr14-phosphoryliertes Caveolin-1 kann von verschiedenen Signalmolekülen, wie zum Beispiel von dem Adaptorprotein Grb7, gebunden werden und daraufhin Signalwege, die wichtig für Zellwachstum und Zellbewegung sind, regulieren [167]. Es wurde gezeigt, dass Tyr14-phosphoryliertes Caveolin-1 die Migration von metastasierenden Zellen fördert, indem es kleine Rho-GTPasen bindet und aktiviert [168]. Darüberhinaus ist Tyrosin 14 phosphoryliertes Caveolin-1 für die Stabilisierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) innerhalb der fokalen Adhäsionen (FA) der Zelle wichtig [169].

1.7.3 Regulation von Caveolin-1

Aufgrund der Hemmung zahlreicher Signalmoleküle wird dem Caveolin-1 eine Rolle als negativer Regulator der Zell-Transformation [170] oder sogar als Tumorsuppressor [171, 172] zugeschrieben. Dies belegen etliche Studien. In Fibroblasten, die mit verschiedenen Onkogenen transformiert wurden, war die Expression von Caveolin-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene deutlich vermindert [173]. Darüber hinaus ist die Caveolin-1-Expression in einer Vielzahl von primären Tumoren, wie zum Beispiel bei Magen- [174], Dickdarm- [175], und Eierstocktumoren [172], sehr stark reduziert oder sogar komplett verloren.

Die molekularen Mechanismen der Regulation der *Cav1*-Expression sind nicht ganz geklärt. Der humane *CAV1*-Promotor (Abbildung 1.4) verfügt über mehrere Sequenzabschnitte, die von verschiedenen Transkriptionsfaktoren gebunden werden können.

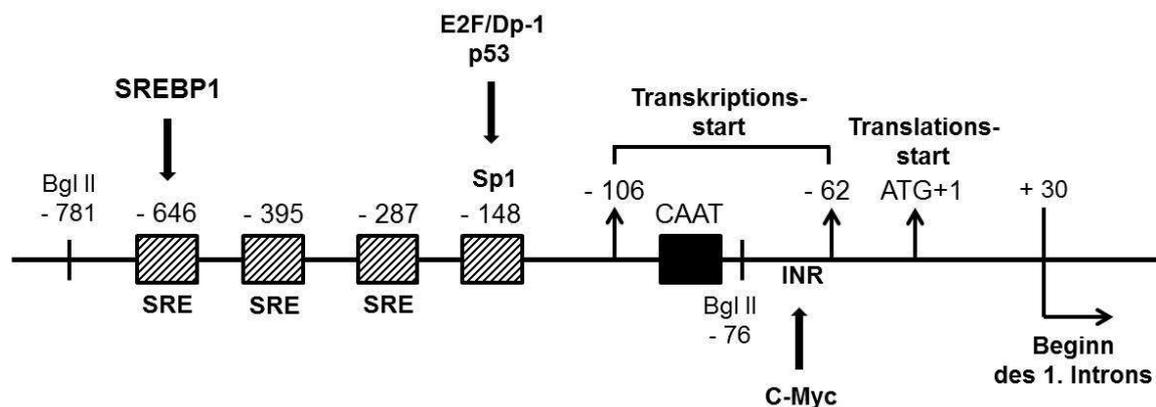


Abbildung 1.4 Die 5'-flankierende Promotor-Region des humanen Caveolin-1 Gens. Der Promotor beinhaltet mehrere Sequenzabschnitte, die von verschiedenen Transkriptionsfaktoren gebunden werden können. 66 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt (+1) befindet sich eine Initiator Sequenz (INR), an die C-Myc bindet. Die an der Position -148 liegende SP1-Konsensussequenz wird zusätzlich von den Transkriptionsfaktoren E2F/Dp1 sowie p53 erkannt. An den Positionen -287, -395 und -646 liegen potentielle *sterol regulatory elements* (SRE), die vom Transkriptionsfaktor SREBP1 gebunden werden können. Modifiziert nach [1].

Das Onkogenprotein C-Myc bindet eine sogenannte Initiator Sequenz (INT), die 66 bp stromaufwärts vom Translationsstart (+1) im *CAV1*-Promotor lokalisiert ist und hemmt dadurch die *CAV1*-Expression [176]. Die Sequenz an der Position -148 ähnelt der Konsensussequenz (CCGCC) für den Transkriptionsfaktor SP1 [1]. An diese bindet neben dem Sp1 auch E2F/Dp-1 und somit entsteht ein Komplex, der zusätzlich von p53 stabilisiert

wird und in der S-Phase von sich teilenden Hautfibroblasten zur Hemmung der *CAV1*-Expression führt [177, 178]. An den Positionen -287, -395 und -646 liegen drei G+C-reiche Sequenzen, die 50-60% Homologie zu dem zehn Basen (ATCACCCAC) langen Sterol-regulatorischen Element (*sterol regulatory element*, SRE) des LDL Rezeptors aufweisen [1]. Eine Studie von Fielding *et al.* zeigt, dass bei einer niedrigen intrazellulären Cholesterinkonzentration der Transkriptionsfaktor SREBP1 an diese SRE-Sequenzen bindet und Caveolin-1 mRNA Expression inhibiert [1].

1.8 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Caveolin-1 wird im Zusammenhang mit einigen Infektionen und der damit assoziierten Immunantwort gebracht. Die Rolle des Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion sowie einer dadurch induzierten Magenentzündung war bisher nicht bekannt und sollte in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Funktion des Caveolin-1 in einer *H. pylori*-induzierten Magenentzündung *in vivo* untersucht werden. Hier sollten Cav1-KO- und WT-Mäuse für eine Dauer von 11 Monaten mit *H. pylori* SS1 infiziert werden und hinsichtlich des Schweregrades der Gastritis, pathologischen Veränderungen sowie der Immunantwort miteinander verglichen werden. Zudem sollte die Kolonisierung mit *H. pylori* in beiden Mausgenotypen überprüft werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte eine nähere Charakterisierung der Rolle von Caveolin-1 in *in vitro* Infektionsexperimenten mit *H. pylori* G27 erfolgen. Aufgrund seiner vielseitigen Funktionen, darunter die Steuerung der Internalisierung von Toxinen und Pathogenen sowie die Regulation des Zellüberlebens, der Zellproliferation und der Signaltransduktion könnte Caveolin-1 bei verschiedenen Aspekten der *H. pylori*-Infektion eine Rolle spielen. So könnte Caveolin-1 zum Beispiel die Adhäsion von *H. pylori* an die Magenepithelzellen, die Internalisierung des CagA-Toxins oder das Überleben der infizierten Zellen beeinflussen. Auch könnte Caveolin-1 mit *H. pylori* oder CagA interagieren oder CagA-induzierte Signalwege und die damit assoziierte Expression des *IL-8* sowie die Bildung von langgestreckten nadelähnlichen Stressfilamenten, dem sogenannten *humming bird* Phänotyp regulieren.

Da Caveolin-1 als ein multifunktionaler Interaktionspartner fungiert, sollten in der vorliegenden Arbeit direkte Interaktionspartner von Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion identifiziert werden. Ein potentieller Interaktionspartner sollte ausgewählt werden, in

einen Expressionsvektor kloniert und durch Überexpression auf die Relevanz der Interaktion hin weiter untersucht werden.

Caveolin-1 kann am Tyr14 in der Gegenwart verschiedener Stimuli, darunter zellulärem Stress, durch die Src Kinase phosphoryliert werden. Tyr14-phosphoryliertes Caveolin-1 sowie phosphoryliertes Src können die Aktivität der kleinen Rho-GTPasen regulieren und somit die Zellmorphologie und Motilität beeinflussen. Hier stellte sich die Frage, ob es durch *H. pylori*-induzierten zellulären Stress zur Phosphorylierung von Caveolin-1 kommt und ob zwischen Caveolin-1-exprimierenden und -defizienten Zellen Unterschiede in der Src-Phosphorylierung sowie GTPasen-Aktivität feststellbar sind und ob sich diese gegebenenfalls in Form von morphologischen Veränderungen, wie *humming bird*, niederschlagen.

H. pylori extrahiert Cholesterin aus der Wirtszellmembran. Bei Cholesterinmangel wird die Expression des *Cav1*-Gens negativ durch den Transkriptionsfaktor SREBP1 reguliert. Zudem stellt eine chronische *H. pylori*-Infektion ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Magenkarzinomen dar, in denen *Cav1* meistens herunterreguliert ist. Daher sollte in infizierten WT-Mäusen sowie in Magenzelllinien eine Expressionsanalyse des *Cav1*-Gens durchgeführt werden. Im Fall einer Reduktion der *Cav1*-Expression sollte SREBP1 als potentieller Repressor in Bezug auf die SREBP1-Aktivierung, -Bindung an und -Interaktion mit dem *Cav1*-Promotor analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30	Roth GmbH, Karlsruhe
Amoniumperoxodisulfat (APS)	Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua (dH ₂ O)	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt
Desoxycholsäure (DCA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth GmbH, Karlsruhe
DNA-Größenstandard Gene Ruler 50bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Größenstandard Gene Ruler 1 kb	NEB, Beverly MA, USA
DNA-Ladepuffer 6x <i>Orange DNA Loading Dye</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>ECL Westernblotting Detections Reagents</i>	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
Eosin	Apotheke Klinikum rechts der Isar
Essigsäure >99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol absolut	Merck KgaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Fluorescence mounting medium</i>	Dako North America, Inc
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin	Apotheke Klinikum rechts der Isar
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Histoclear	Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth GmbH, Karlsruhe
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Roth GmbH, Karlsruhe
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Pertex <i>mounting medium</i>	Medite GmbH, Burgdorf
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Protein A Agarose / Salmon Sperm DNA	Millipore Biosciences, Temecula CA, USA
Protein-Massenstandart <i>Page Ruler Plus prestained</i>	Promega GmbH, Mannheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth GmbH, Karlsruhe
Silbernitratlösung (AgNO ₃) 2,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Roth GmbH, Karlsruhe
Tergitol NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris Ultra Qualität	Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TurboFect <i>in vitro Transfection Reagent</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Tween 20	Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.2 Tiere

Tabelle 2.2 Verwendete Mäuse.

Maus	Beschreibung	Herkunft
Cav1 knockout (Cav1-KO)	Homozygote <i>Cav1 knockout</i> , Stamm Cav1tm1Mls/J; Bestandsnummer 004585	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
Wildtyp (WT)	Angepasster Kontrollstamm für Cav1-KO, StammB6129SF2/J; Bestandsnummer 101045	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 2.3 Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft/Referenz
AGS	humane primäre Magenadenokarzinomzellen	ATCC, Manassas, USA
AGS/Cav1	mit pcDNA3.1-Cav1 stabil transfizierte AGS	Burgermeister <i>et al.</i> 2007 [174]
AGS/LV	mit pcDNA3.1 stabil transfizierte AGS	Burgermeister <i>et al.</i> 2007 [174]
HEK293	humane primäre embryonale Nierenzellen	ATCC, Manassas, USA
HepG2	humane hepatozelluläre Karzinomzellen	ATCC, Manassas, USA
MDCK	Hundenierenzellen	ATCC, Manassas, USA
MKN45	humane Metastasen/Magenkarzinomzellen	ATCC, Manassas, USA
NCI-N87	humane Metastasen/Magenkarzinomzellen	ATCC, Manassas, USA

2.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 2.4 Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften/Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>H. pylori</i> G27	Klinisches Isolat, <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> ⁺	Covacic <i>et al.</i> 1993; Xiang <i>et al.</i> 1995 [115, 116]
<i>H. pylori</i> G27 Δ <i>cagA</i>	<i>H. pylori</i> G27, <i>cagA</i> ^Δ ::Kan ^R	Stein <i>et al.</i> 2002 [179]
<i>H. pylori</i> SS1	Klinisches Isolat, Tiermodell <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> (s2-m2)	Lee <i>et al.</i> 1997, van Doorn <i>et al.</i> 1999 [110, 113]
<i>E. coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.5 Plasmide

Tabelle 2.5 Verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevante Eigenschaft	Herkunft/Referenz
pCR2.1 TOPO	Klonierungsvektor, Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pEGFP-C1CagA	Enthält eine vollständige <i>cagA</i> Sequenz von <i>H. pylori</i> G27, Kan ^R , Neo ^R	PD Dr. Roger Vogelmann
pGL2-BSEP	<i>luc</i> , Amp ^R , enthält 2 kb Promotor des humanen <i>bile salt export pump</i> (BSEP) Gens	Dr. Elke Burgermeister
pGL3-CAV1p	Enthält ein etwa 800 bp großes Fragment des humanen <i>CAV1</i> Promotors (69 – 895 bp), <i>luc+</i> , Amp ^R	Prade <i>et al.</i> 2012 [180]
pGL3-SRE	<i>luc+</i> , Amp ^R , enthält fünf <i>serum responsive elements</i> (SRE)	Stratagene Inc, La Jolla, USA
pRL-CMV	<i>Rluc</i> , CMV Enhancer/Promotor, Amp ^R	Promega GmbH, Mannheim
pTarget	Expressionsvektor, CMV Enhancer/Promotor, Amp ^R , Neo ^R	Promega GmbH, Mannheim
pTarget- <i>Dlc1v4</i>	Enthält humane <i>Dlc1v4</i> Variante, CMV Enhancer/Promotor, Amp ^R , Neo ^R	diese Arbeit

2.1.6 Oligonukleotide

Alle in der Tabelle 2.6 angegebenen Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen und mit dH₂O auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt.

Tabelle 2.6 Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Vorwärtssequenz (5´-3´)	Rückwärtssequenz (5´-3´)
RT-qPCR		
Maus Cav1	AGCCGCGTCTACTCCATCA	TCTCTTTCTGCGTGCTGATG
Maus β2M	ATGGGAAGCCGAACATACG	CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT
Maus TNFα	ACGGCATGGATCTCAAAGC	GTGGGTGAGGAGCACGTAGT
Maus IFNγ	GCGTCATTGAATCACACCG	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
Maus CD4	AGGAAGTGAACCTGGTGGG	CTCCTGCTTCAGGGTCAGTC
Maus CD19	GGACAGTGAACGTGGAGGT	GGGCACATACAGGCTTTGTT
Maus CD25	AGAACACCACCGATTTCTG	CTGTGGGTTGTGGGAAGTCT
Maus CD86	TCAGTGATCGCCAACTTCG	TTAGGTTTCGGGTGACCTTG
Maus CCL5	ATATGGCTCGGACACCACC	TCCTTCGAGTGACAAACACG
Maus CXCL1	GCTGGGATTACCTCAAGA	TGGGGACACCTTTTAGCATC

Tabelle 2.6 Verwendete Oligonukleotide (Fortsetzung).

Oligonukleotid	Vorwärtssequenz (5'-3')	Rückwärtssequenz (5'-3')
RT-qPCR		
Mensch CAV1	TCTCTACACCGTTCCCATCC	CAGGTCGATCTCCTTGGTGT
Mensch β 2M	TGCTGTCTCCATGTTTGATGATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAT
Mensch IL-8	GTGCAGTTTTGCCAAGGAT	CTCTGCACCCAGTTTTCTT
Mensch ACS	ATTGACTTGTGGTGGCATA	CTGTGTGAACCACACCCTTG
Mensch HMGC _o AS	CAAAAAGATCCATGCCCAT	AAAGGCTTCCAGGCCACTAT
Mensch HMGC _o AR	GGCATTGACAGCACTAGA	GCTGGAATGACAGCTTCACA
Mensch LDLR	GCGAAAGAAACGAGTTCCG	TGACAGACAAGCACGTCTCC
Hund Cav1	TCTCTACACCGTTCCCATCC	CAGGTCGATCTCCTTGGTGT
Hund β 2M	GCTACGTGTCAGGGTTCCT	CATGCTTTACACGGCAGCTA
Nachweis von DLC1v1 und DLC1v4		
DLC1v1	CAGGCACACCAACAAACCTGCG	GGCACAAGGCTCATCCTCGTCTG
DLC1v4	TTGAAGCCAAGGAAGCTTGT	TCGTCTGAATCGTCACTTCG
EMSA		
SRE3	AAGCACCCCAGCGCGGGACAACG TTCT	AGAACGTTGTCCCGCGCTGGGGT GCTT
SRE3 Mut	AATTAATTAATCGCGGGACAACGT TCT	AGAACGTTGTCCCGCGATTAATTA ATT
ChIP		
CAV1-300	GAGATGATGCACTGCGAAAA	GCCAAAGGTTTGTCTGCTC
Klonierung		
DLC1v4	ATGGATCCATGTGCAGAAAGAAG CCGGACAC	ATGCGGCGGCTCACCTAGATTTGG TGCTTTGGTTTCAG
DNA-Sequenzanalyse		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
M13 FP	TGTAAAACGACGGCCAGT	
M13 RP		CAGGAAACAGCTATGACC

2.1.7 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2.7 Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe. WB= Westernblot, IF=Immunofluoreszenz, IHC=Immunhistochemie, IP=Immunopräzipitation

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper		
Ac-Histone H4 (Lys12) sc-34266	IP: 1:20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

Tabelle 2.7 Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe (Fortsetzung). WB=Westernblot, IF=Immunofluoreszenz, IHC=Immunhistochemie, IP=Immunopräzipitation

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper		
β-Actin (AC-15) sc-69879	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Caveolin-1 (pY14)	WB: 1:1000	BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg
Caveolin-1 (N-20) sc-894	WB: 1:1000 IF: 1:500 IP: 1:20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
CagA (b-300) sc-25766	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Cdc42 (RhoA/Rac1/Cdc42 activation assay Kit)	WB: 1:1000	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
DLC1 (C-12) sc-271915	WB: 1:700	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
F4/80 MF48000	IHC: 1:100	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FAK (A17) sc-557	WB: 1:800	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
HSP90 α/β (H-114) sc-7947	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Lamin A/C (H-110) sc-20681	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
pFAK (397)-R sc-11765	WB: 1:800	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
SREBP-1 (C-20) sc-366	WB: 1:1000 IP: 1:20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Phospho-Akt (Ser473) (193H12) #4058	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) #4511	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) #9101	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Phospho-Src Family (Tyr416) (D49G4) #6943	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
Rac1 (RhoA/Rac1/Cdc42 activation assay Kit)	WB: 1:1000	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
RhoA (RhoA/Rac1/Cdc42 activation assay Kit)	WB: 1:1000	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
<i>H. pylori</i>	IF: 1:3000	Von Dr. Roger Vogelmann
Sekundäre Antikörper		
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG	IF: 1:750	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 goat anti-chicken IgG	IF: 1:250	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Biotinylated anti-rat IgG (H+L) BA-4000	IHC: 1:500	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ECL Peroxidase labelled anti-mouse antibody NA931VS	WB: 1:5000	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
ECL Peroxidase labelled anti-rabbit antibody NA934VS	WB: 1:5000	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Tabelle 2.7 Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe (Fortsetzung). WB=Westernblot, IF=Immunofluoreszenz, IHC=Immunhistochemie, IP=Immunopräzipitation

Fluoreszenzfarbstoffe	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 Phalloidin	IF: 1:100	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DAPI	IF: 1:2000	Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.8 Enzyme

Tabelle 2.8 Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
<i>Bam</i> HI 10 u/μl	Promega GmbH, Mannheim
GoTaq Green Mastermix	Promega GmbH, Mannheim
JumpStart RedTaq <i>Ready Mix</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LightCycler 480 SYBRGreen I Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>Not</i> I 10 u/μl	Promega GmbH, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim,
DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
0,25% Trypsin EDTA 1X	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.9 Antibiotika

Tabelle 2.9 Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Roth GmbH, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
G418 Sulfat	Calbiochem GmbH, Bad Soden
Gentamycin Lösung 50 mg/ml	Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Vancomycin	Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.10 Zellkultur Medien Puffer und Zusätze

Tabelle 2.10 Verwendete Zellkultur Medien Puffer und Zusätze.

Medium, Puffer, Zusatz	Hersteller
DMEM Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMEM/F-12 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin 200 mM 100X	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS pH 7,4 1X	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.11 Nährmedien und Nährböden für Bakterien

Tabelle 2.11 Verwendete Nährmedien und Nährböden für Bakterien.

Medium, Nährboden	Hersteller
Brucella Broth Base B3051 (14,05 g /0,5 L dH ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (BHI, 35 g/1 L dH ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LB-Medium Lennox(20 g/1 L dH ₂ O)	Roth GmbH, Karlsruhe
LB-Agar Lennox (35 g/1 L dH ₂ O)	Roth GmbH, Karlsruhe
Wilkins-Chalgren (WC) Blutagarplatten für <i>H. pylori</i>	Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Klinikum rechts der Isar, München

2.1.12 Kits

Tabelle 2.12 Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DAB <i>Peroxidase Substrate</i> Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Dual-Glo <i>Luciferase Assay System</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>Genome Plex Whole Genome Amplification</i> Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>LightShiftChemiluminescent EMSA</i> Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pierce BCA <i>Protein Assay</i> Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Peq Gold <i>Gel Extraction</i> Kit	PEQLAB GmbH, Erlangen
<i>Pure Yield</i> Plasmid Miniprep system	Promega GmbH, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RhoA/Rac1/Cdc42 <i>Activation Assay Combo</i> Kit	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
TOPO TA <i>Cloning</i> Kit (mit dem pCR2.1 TOPO)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2.12 Verwendete Kits (Fortsetzung).

Kit	Hersteller
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Verso cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.13 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Filterpapier <i>Whatman</i> 3mm	OMNILAB-Laborzentrum GmbH & Co.KG, Bremen
Deckgläser 22x22 mm und 22x50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
GasPak EZ anaerobe container System with indicator	BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kunststoffküvetten 10x4x45 mm	SARSTEDT AG & CO., Nümbrecht
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
6-, 12-, 96-Lochplatten	BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg
Nitrozellulosemembran Protran BA83	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger SuperFrost Ultra Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
PCR Gefäße 200 µl <i>multiply-µstrip Pro 8-strip</i>	SARSTEDT AG & CO., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Röntgenfilme Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25, 50 ml	BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg
<i>Shandon coverplate</i>	Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK
Sterile Watterstäbchen Raucotupf	Lohman& Rauscher GmbH, Rengsdorf
Zellkulturflaschen 25 und 75 cm ²	BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg
Zellkulturschalen 10 mm	BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg
Zentrifugationsgefäße 15 und 50 ml	BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg

2.1.14 Apparaturen und Geräte

Tabelle 2.14 Verwendete Apparaturen und Geräte.

Apparatur, Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresesystem SubCell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Analyse Wage Sartorius BL310	Sartorius AG, Göttingen

Tabelle 2.14 Verwendete Apparaturen und Geräte (Fortsetzung)

Apparatur, Gerät	Hersteller
Färbegestell <i>Sequenza Slide Rack</i>	Ted Pella, Inc., Redding USA
Fein Wage Sartorius research R180D	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop AxioVert 200 M	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hallbergmoos
Gelektrophoresesystem Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gewebeentwässerungsanlage Leica ASP300 S	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Homogenisator DiAx 900	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Konfokales Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hallbergmoos
LightCycler 480	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Luminometer GloMax 20/20	Promega GmbH, Mannheim
Mikroplatten-Messgerät Precision	Molecular Devices GmbH, Ismaning
Mikrowelle	Siemens AG, München
Nano Drop Spektrophotometer ND 1000	PEQLAB GmbH, Erlangen
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Rotationsmikrotom Leica RM2145	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Röntgenfilmentwickler Hyper Processor SRX-101A	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Röntgenfilmkassette ABS X-Ray	CAWO Photochemisches Werk GmbH, Schrobenhausen
Scanner Epson Perfection 4990 Photo	Epson Deutschland GmbH, Meerbusch
Schüttler IKA KS-125 Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Stromgerät für Elektrophorese PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rotator 2-1175	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Thermocycler Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Forster City, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraviolet Crosslinker CL1000	UVP, Inc., Upland, USA
Ultraschal Sonoplus HD 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortexer IKA MS 2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Westernblotapparatur Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkulturinkubator Heracell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zellkultur-Mikroskop Axiovert 40CFL	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hallbergmoos
Zellzähler Countess <i>automated cell counter</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.15 Software

Tabelle 2.15 Verwendete Software.

Software	Hersteller
Axio Vision Rel. 4.4	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hallbergmoos
ImageJ 1.45s	Wayne Rasband NIH, MD, USA
LigtCycler 480 Software 1.5.0	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Volocity	Improvision, Tübingen

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle in der Tabelle 2.3 aufgelisteten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit in belüfteten Zellkulturflaschen kultiviert. Als Kulturmedium wurde bei AGS-, AGS/LV-, AGS/Cav1-, Hek293-, MDCK-Zellen DMEM-Medium, bei N87- und MKN45-Zellen RPMI-Medium verwendet. Vor der Anwendung wurde den Medien 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) L- Glutamin und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Zudem enthielt das DMEM-Medium für AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen 250 µg/ml G418.

2.2.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 80-90% passagiert. Hierzu wurden Zellen mit 2 ml (25 cm² Zellkulturflasche) oder 4 ml (75 cm² Zellkulturflasche) PBS gewaschen, um somit die Reste von FBS zu entfernen welches sonst zur Hemmung der Trypsinaktivität führen würde. Folgend wurden die Zellen mit 0,5 ml (25 cm² Zellkulturflasche) oder 1 ml (75cm² Zellkulturflasche) 0,25 % Trypsin EDTA beschichtet und für kurze Zeit im Zellkulturbrutschrank bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen von der Flasche gelöst haben. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml oder 11 ml des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen, resuspendiert und in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 oder 1:20 in eine neue mit Kulturmedium befüllte Flasche überführt.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde eine 75 cm² Zellkulturflasche mit etwa 90% konfluenten Zellen trypsinisiert (vgl. 2.2.1.2), die Zellen in 12 ml entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 4°C, 1500 rpm wurden die Zellen pelletiert. Der Pellet wurde in 3 ml Einfriermedium (10% (v/v) DMSO und 90% (v/v) FBS) resuspendiert und auf drei Kryoröhrchen verteilt. Das DMSO verhindert die Ausbildung von Eiskristallen und schützt somit die Zellen vor mechanischer Zerstörung. Da es bei Raumtemperatur jedoch zytotoxisch auf Zellen wirkt, müssen Zellen im Einfriermedium schnell eingefroren bzw. aufgetaut werden. Das Einfrieren erfolgte zuerst bei -20°C und dann bei -80°C. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt, in dem sie auch gelagert wurden.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen sollte möglichst rasch erfolgen, um die toxische Wirkung von DMSO zu lindern. Hierfür wurden zu den gefrorenen Zellen 0,5 ml Kulturmedium pipettiert, um das im Einfriermedium befindliche DMSO zu verdünnen. Die Zellen wurden anschliessend im Zellkulturinkubator bei 37°C aufgetaut. Folgend wurden die Zellen in 4 ml entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und bei 1500 rpm zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium aufgenommen in eine 5 ml Zellkulturflasche ausgesät und im Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Gerät Countess *automated cell counter* (Invitrogen GmbH) verwendet. Hierzu wurden trypsinisierte Zellen in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und durch auf und ab pipettieren vereinzelt. Von der Zellsuspension wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 10 µl mit 10 µl Trypanblau 0,4% (1:1) vermischt. Dieser blaue Farbstoff akkumuliert in perforierten, toten Zellen. Somit kann anhand der Farbe zwischen lebenden (farblos) und toten (dunkelblau) Zellen unterschieden werden. Von dem Zell-Trypanblau Gemisch wurden 10 µl auf eine dafür bestimmte Zählkammer vorgelegt und ins Gerät eingeführt. Dabei wurde eine Anzahl von vitalen Zellen pro Mililiter ermittelt.

2.2.1.6 Transiente Transfektion

Mittels dieser Methode kann z.B. Plasmid-DNA vorübergehend in eukaryotische Zellen eingeführt werden. Als Transfektions-Reagenz wurde in der vorliegenden Arbeit TurboFect (Fermentas GmbH) verwendet. Dieses kationische Polymer bildet mit der zu transfizierenden DNA stabile, positiv geladene Komplexe, welche zum einen die DNA vor dem Abbau schützen und zum anderen die DNA-Aufnahme erleichtern.

Für die transiente Transfektion wurden $3,5 \times 10^5$ AGS-; AGS/Cav1-, und HEK293-Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und für 20 h inkubiert.

Pro Transfektionsansatz wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 400 µl FBS-freies Medium (DMEM/-) vorgelegt und dieses wurde mit 4 µg Plasmid-DNA vermischt. Dazu wurden 6 µl TurboFect zugegeben und der entsprechende Transfektionsansatz wurde sofort durch kurzes Vortexen gemischt und für 15 min bei RT inkubiert, um somit die Bildung von Turbofect-DNA-Komplexen zu ermöglichen. Der komplette Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen zugegeben und gleichzeitig im Zellmedium durch eine kreisende Bewegung der Platte verteilt. Es erfolgte die Inkubation im Zellkulturbrutschrank bei 37°C für 16 h. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 24 h im Zellkulturbrutschrank bei 37°C inkubiert, womit eine ausreichende Expression des jeweiligen Proteins ermöglicht werden sollte.

2.2.1.7 Dual-Luciferase Reporter Assay

Zur Untersuchung des Einflusses von *H. pylori* auf die Promotor- bzw. Enhancer-Aktivität von *CAV1*, *SeRE*, *BSEP* wurde Dual-Luciferase Reporter Assay System von der Firma Promega angewendet. Dieses System basiert auf zwei Luciferasen, die *Firefly* und *Renilla* Luciferase. Beide Luciferasen katalysieren die Oxidation ihres spezifischen Substrates und können somit in getrennten Reaktionen untersucht werden. Die *Firefly* Luciferase dient als Reporter für die Aktivität des zu untersuchenden Promotors bzw. *Enhancers*, da ihre Expression in den verwendeten Konstrukten von dem jeweiligen Promotor bzw. *Enhancer* reguliert wird. Die *Renilla* Luciferase dagegen ist von einem viralen, konstitutiv aktiven Promotor (CMV) reguliert und kann somit zur internen Kontrolle der Transfektionsrate genutzt werden. Als *Firefly* Luciferase-Reporter-Konstrukte wurden in der vorliegenden Arbeit pGL3-*CAV1*p, pGL3-*SeRE*, pGL2-*BSEP* (vgl. Tabelle 2.5) verwendet. Als *Renilla* Luciferase-Plasmid diente pRL-CMV.

Hierfür wurden 2×10^5 HEK293- bzw. $2,5 \times 10^5$ MKN45-Zellen pro Vertiefung einer 12-Lochplatte ausgesät und für 20 h inkubiert und wie folgt mit entsprechenden Plasmiden transient transfiziert. Pro Transfektionsansatz wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 250 µl FBS-freies Medium (DMEM/-) vorgelegt. Zu jedem Reaktionsansatz wurden 0,02 µg pRL-CMV-Plasmid pipetiert. Dazu wurden entweder 2 µg pGL3-CAV1p, oder pGL3-S α RE oder pGL2-BSEP zugegeben und die Ansätze wurden durch kurzes Vortexen gemischt. Zu jedem Transfektionsansatz wurden 4 µl TurboFect zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde durch erneutes kurzes Vortexen gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Der komplette Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen zugegeben und gleichzeitig durch eine kreisende Bewegung der 12-Lochplatte im Zellmedium verteilt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Zellkulturinkubator bei 37°C, für 8 h. Folgend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h weiter inkubiert. Danach wurde ein Teil der Zellen mit *H. pylori* (MOI=100) infiziert (vgl. 2.2.2.6) während der andere Teil (uninfizierte Kontrolle) mit *H. pylori* Medium versetzt wurde. 16 h später wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden mit 150 µl 1x passiven Lysepuffer bedeckt und beim Schütteln auf einem Schüttler für 15 min, bei RT lysiert. Die Lysate wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zusätzlich mehrmals hoch und runter pipetiert, um somit die Zellyse zu vervollständigen. Durch anschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min, 4°C wurden die unlöslichen Zellbestandteile pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und auf Eis gestellt. Die Lysate wurden entweder sofort zur Messung der Luciferase-Aktivität verwendet, oder bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.7.1 Messung der Luciferase-Aktivität

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte im Luminometer GloMax 20/20 der Firma Promega. Dabei wurde die Aktivität in relativen Lichteinheiten (*relative light Units*, RLU) erfasst. Hierzu wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 35 µl *Luciferase assay reagent* (LAR II), welches das Substrat der *Firefly* Luciferase ist, mit 10 µl Proteinlysat gemischt und die Aktivität wurde sofort gemessen. Nach darauffolgender Zugabe von 35 µl Stop & Glo und kurzem Vortexen wurde die Aktivität der *Renilla* Luciferase gemessen. Die relative Luciferase-Aktivität der *Firefly* Luciferase ergab sich aus der Differenz der Messwerte von *Firefly* Luciferase und *Renilla* Luciferase.

2.2.1.8 MTT Assay

Diese Methode basiert auf der Verwendung des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), der nur in lebenden Zellen zu

dunkel-violetten wasserunlöslichen Formazon-Krystallen metabolisiert wird. Diese werden dann nach Lyse der Zellen in Lösung gebracht. Die Menge an gebildetem Formazon kann photometrisch ermittelt werden und ist dabei direkt proportional zur Anzahl an lebenden, proliferierenden Zellen.

Hierfür wurden 1×10^4 AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät und für 24 h inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit je 100 μ l von *H. pylori* G27 wt-Suspension beschichtet, die zuvor auf eine MOI von 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500 und 1:2000 eingestellt wurde. Zur Kontrolle wurden uninfizierte Zellen mit 100 μ l *H. pylori*-Kulturmedium (DMEM/F12, 10% (v/v) FCS, 10% (v/v) Brucella Broth, 10 μ g/ml Vancomycin) versetzt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Nach anschließender Inkubation im Zellkulturbrutschrank bei 37°C für 48 h wurden zu dem Medium 10 μ l MTT (5% w/v) zugegeben. Die Platte wurde vorsichtig hin und her geschwenkt, wodurch das MTT im Medium besser verteilt werden sollte und für 4 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank weiter inkubiert. Danach wurden zu jedem Ansatz 100 μ l Lysepuffer (10% (w/v) SDS + 0.01 N HCl) gegeben und die Platte wurde im Zellkulturinkubator bei 37°C für 12 h weiterinkubiert. Während dieser Zeit sollten zum einen die Zellen vollständig lysiert und zum anderen das gebildete Formazon vollständig solubilisiert werden. Die Messung der Absorption des gelösten Formazons erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Messgerät (Precision, Molecular Devices GmbH) bei einer Wellenlänge von 550 nm und Referenzwellenlänge von 650nm.

2.2.1.9 Gentamycin Assay

Hierfür wurden 6×10^5 AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und für 16 h inkubiert. Folgend wurden die Zellen wie unter 2.2.2.6 beschrieben mit *H. pylori* G27 wt (MOI=500) für 2, 6, 16 und 24 h infiziert. Anschließend wurde durch dreimaliges Waschen mit warmen PBS nicht adhärente Bakterien entfernt und die Zellen für eine Dauer von 2 h im *H. pylori*-Kulturmedium (DMEM/F12, 10% (v/v) FCS, 10% (v/v) Brucella Broth, 10 μ g/ml Vancomycin) inkubiert, dem zusätzlich Gentamycin (200 μ g/ml), Penicillin/Streptomycin (100 μ g/ml) und Choramphenicol (100 μ g/ml) zugegeben worden war. Somit sollten alle übrig gebliebenen Bakterien getötet werden. Danach wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend in 600 μ l SDS-Lysepuffer aufgenommen. Die Präparation von Gesamtzelllysaten erfolgte wie unter 2.2.5.1 beschrieben.

2.2.1.10 Immunofluoreszenzfärbung

Für die Immunofluoreszenzfärbung wurden die Zellen wie unter 2.2.1.10.1-2.2.1.10.5 beschrieben ausgesät und infiziert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit je 2 ml warmen PBS gewaschen und daraufhin in 2 ml Fixierlösung (4% w/v Paraformaldehyd (PFA) in PBS) für 15 min, RT fixiert. Das PFA wurde durch dreimaliges Waschen mit je 2 ml PBS vollständig entfernt und die Zellen wurden in 2 ml Permeabilisierungspuffer (0,4% (v/v) Triton-X 100 in PBS) für 10 min permeabilisiert, wodurch auch intrazelluläre Antigene besser für die Antikörper zugänglich werden sollten. Die Zellen wurden erneut drei Mal mit je 2 ml PBS gewaschen, mit 150 µl 100% FBS bedeckt und für 30 min, bei RT inkubiert. Hierdurch sollten unspezifische Bindungstellen gesättigt werden. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl einer Mischung aus dem spezifischen primären Antikörper (Tabelle 2.7) und aus 1% FBS (v/v) PBS-Lösung beschichtet. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Zur Detektion von *H. pylori* diente der Antikörper *chicken anti-H. pylori* (Verdünnung 1:3000) und zur Färbung von Caveolin-1 der Antikörper *rabbit anti-Caveolin-1* (Verdünnung 1:500). Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit je 2 ml PBS entfernt. Folgend wurden die Zellen mit 150 µl sekundärem Antikörper (in 1% FBS (v/v) PBS-Lösung; Verdünnung entsprechend Tabelle 2.7) bedeckt und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert, um die an die Antikörper gebundenen Fluorochrome vor Licht zu schützen. Zur Detektion von *H. pylori* wurde der Antikörper Alexa Fluor 488 *goat anti-chicken* (Verdünnung 1:250) und zur Detektion von Caveolin-1 der sekundäre Antikörper Alexa Fluor 594 *donkey anti-rabbit* (Verdünnung 1:750) verwendet. Zur Visualisierung des Zytoskeletts (bei *humming bird*) wurde dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 Phalloidin (Verdünnung 1:100) zugesetzt. Es folgte dreimaliges Waschen für je 5 min mit je 2 ml PBS bei RT. Um die Zellkerne sichtbar zu machen wurden die Zellen mit 150 µl 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Verdünnung 1:2000 in PBS) bedeckt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen drei Mal für je 5 min mit je 2 ml PBS bei RT gewaschen, mit einem Tropfen *Fluorescence mounting medium* bedeckt und auf einem Objektträger platziert. Die Präparate wurden bis zur Analyse im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.10.1 Adhäsion von *H. pylori* an AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen

Für die Zählung von adhärenenten Bakterien wurden 3×10^5 AGS/LV- bzw. AGS/Cav1-Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät, in die zuvor ein Deckglas (22 x 22 mm) gelegt wurde. Die Zellen wurden dann für 16 h inkubiert, um sich somit gut an das Deckglas anheften zu können. Folgend wurden die Zellen drei Mal mit 2 ml warmen PBS gewaschen und anschließend mit *H. pylori* G27 (MOI=10) für 30 min infiziert (vgl. 2.2.2.6). Durch

darauflfolgendes dreimaliges Waschen mit je 2 ml PBS wurden nichtadhärente Bakterien entfernt. Die Zellen wurden mit 2 ml frischen *H. pylori*-Kulturmedium bedeckt und für weitere 2 h im Zellbrutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen und *H. pylori*, Caveolin-1 und die Zellkerne wurden wie unter 2.2.1.10 beschrieben gefärbt. Fertige Präparate wurden mittels des Fluoreszenzmikroskops AxioVert 200 M (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bei einer 630-fachen Vergrößerung untersucht. Dabei wurden 5 Sichtfelder mit mindestens 10 Zellen pro Sichtfeld analysiert. Die Zahl an Bakterien, die an einer Caveolin-1-losen oder -exprimierenden Zelle adhärirt hatten, wurde bestimmt und aus drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert \pm Standardfehler gebildet. Zudem wurden repräsentative digitale Bilder erstellt, die mit der Software Axio Vision Rel. 4.4 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bearbeitet wurden.

2.2.1.10.2 Humming bird in AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen

Für die Analyse des *humming birds* Phänotyps wurden 3×10^5 AGS/LV- bzw. AGS/Cav1-Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät, in die zuvor ein Deckglas (22 x 22 mm) gelegt wurde. Die Zellen wurden für eine Dauer von 24 h inkubiert, drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert. Folgend wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen und das Caveolin-1, Zytoskelett und die Zellkerne wurden wie unter 2.2.1.10 beschrieben gefärbt. Fertige Präparate wurden an dem Fluoreszenzmikroskop AxioVert 200 M (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) analysiert. Die Quantifizierung erfolgte bei einer 400-fachen Vergrößerung. Pro Experiment wurden mindestens 10 Sichtfelder mit mindestens 10 Zellen pro Sichtfeld quantifiziert. Die Anzahl an Zellen mit langgestreckten, nadelförmigen Strukturen wurde in Bezug zu der Gesamtzellzahl (100%) von Caveolin-1-exprimierenden oder -losen Zellen pro Sichtfeld gesetzt. Von drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert \pm Standardfehler errechnet. Auch hier wurden repräsentative digitale Bilder erstellt, die mit der Software Axio Vision Rel. 4.4 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bearbeitet wurden.

2.2.1.10.3 Humming bird, flächige Ausbreitung in AGS/LV- und AGS/DLC1v4-Zellen

Für die Analyse von *humming bird* bzw. der flächigen Ausbreitung (*cell spreading*) in DLC1v4 überexprimierenden AGS-Zellen wurden $3,5 \times 10^5$ parentale AGS-Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät, in die zuvor ein Deckglas (22 x 22 mm) gelegt wurde. Die Zellen wurden für eine Dauer von 24 h inkubiert und dann wie unter 2.2.1.6 mit leerem Vektor pTarget (pT) oder DLC1v4 exprimierendem Vektor pT-DLC1v4 für 24 h transient transfiziert. Im Folgenden wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und mit *H. pylori* G27 wt

(MOI=100) für 16 h infiziert (vgl. 2.2.2.6). Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen und das Zytoskelet sowie die Zellkerne wurden wie unter 2.2.1.10 beschrieben gefärbt. Fertige Präparate wurden an dem Fluoreszenzmikroskop AxioVert 200 M (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bei einer 400-fachen Vergrößerung analysiert. Pro Experiment wurden mindestens 10 Sichtfelder mit mindestens 10 Zellen pro Sichtfeld quantifiziert. Die Anzahl an Zellen mit langgestreckten, nadelförmigen Strukturen bzw. einer flächigen Ausbreitung wurde in Bezug zur Gesamtzellzahl (100%) der mit pT-DLC1v4 bzw. pT transfizierten Zellen pro Sichtfeld gesetzt. Von drei unabhängigen Experimenten wurde der Mittelwert \pm Standardfehler errechnet. Repräsentative digitale Aufnahmen wurden mit der Software Axio Vision Rel. 4.4 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bearbeitet.

2.2.1.10.4 Lokalisierung von *H. pylori* und Caveolin-1

Zur Analyse der Lokalisation von *H. pylori* und Caveolin-1 wurden 3×10^5 MKN45- und MDCK-Zellen auf ein Deckglas (22 x 22 mm) in die Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und für 16 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen wie unter 2.2.2.6 beschrieben mit *H. pylori* (MOI=10) für 30 min infiziert, gewaschen und für weitere 2 h im Zellbrutschrank inkubiert. *H. pylori*, Caveolin-1 und die Zellkerne wurden wie unter 2.2.1.10 gefärbt und die fertigen Präparate wurden mit dem konfokalen Mikroskop LSM510 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bei einer 630-fachen Vergrößerung analysiert. Die aufgenommenen dreidimensionalen Bilder wurden mittels Volocity (Improvision, Tübingen) rekonstruiert.

2.2.1.10.5 Lokalisierung von CagA und Caveolin-1

Zur Analyse der Lokalisation von CagA und Caveolin-1 wurden $3,5 \times 10^5$ AGS/Cav1-Zellen auf ein Deckglas (22 x 22 mm) in die Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät, für 20 h inkubiert und wie unter 2.2.1.6 beschrieben mit EGFP-CagA für 16 h transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Caveolin-1 und die Zellkerne wie unter 2.2.1.10 beschrieben gefärbt und die fertigen Präparate wurden mit dem konfokalen Mikroskop LSM510 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bei einer 630-fachen Vergrößerung analysiert. Die aufgenommenen dreidimensionalen Bilder wurden mittels Volocity (Improvision, Tübingen) rekonstruiert.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Auftauen und Anzucht von *H. pylori*

Ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit gefrorenen *H. pylori* G27 bzw. *H. pylori* SS1 wurde auf Eis gelegt und langsam aufgetaut. Der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes (100 µl) wurde auf eine zuvor für 20 min bei RT vorgewärmten Wilkins-Chalgren (WC)-Blutagarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte im Bakterienbrutschrank bei 37°C, 10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂ für 48-72 h.

2.2.2.2 Kultivierung von *H. pylori* G27

H. pylori G27 ist ein zelladaptierter Stamm. Die Kultivierung erfolgte in einer Kokultur mit MDCK-Zellen, die zuvor zu einem vollständig polarisierten Monolayer ausdifferenziert waren. Die gesamte Bakterienkultur von einer WC-Blutagarplatte wurde mit einem sterilen Wattestäbchen abgestrichen und in 2 ml *H. pylori*-Kulturmedium (DMEM/F12, 10% (v/v) FCS, 10% (v/v) Brucella Broth, 10 µg/ml Vancomycin) resuspendiert. Eine 72 cm² Kulturflasche mit MDCK-Zellen (Konfluenz von 100%) wurde drei Mal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen, um Antibiotikarückstände zu entfernen, die das Wachstum von *H. pylori* hemmen könnten. Anschließend wurden die MDCK-Zellen mit 10 ml *H. pylori*-Kulturmedium bedeckt und dazu wurden 2 ml der zuvor bereiteten *H. pylori* G27-Suspension pipettiert. Nach einem kurzen Schwenken erfolgte die Inkubation im Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Luftfeuchtigkeit. Jeden Tag wurde der bakterienhaltige Kulturüberstand vollständig abgenommen und mikroskopisch auf die Beweglichkeit und Zellform (spiralförmig oder kokkoid) untersucht und bei Bedarf für eine Infektion benutzt oder verworfen. Die in der Flasche verbliebenen MDCK-Zellen wurden mit 12 ml warmen *H. pylori*-Kulturmedium bedeckt und im Zellbrutschrank bei 37°C bis zum nächsten Tag weiter inkubiert. Da die MDCK-Zellen aufgrund des Vorhandenseins von *H. pylori* nach ein paar Tagen abgestorben sind, wurde alle drei bis vier Tage eine neue Flasche mit MDCK-Zellen bereitgestellt und mit 2 ml *H. pylori* G27-haltigem Kulturüberstand beimpft. Diese Art von Bakterienkultur wurde höchstens ein Monat lang gehalten. Danach wurden frische Bakterien aufgetaut.

2.2.2.3 Bestimmung der optischen Dichte von *H. pylori*

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte in dem BioPhotometer (Firma Eppendorf AG) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀). Hierzu wurden 900 µl *H. pylori*-Kulturmedium mit 100 µl bakterieller Suspension (Verdünnung 1:10) in einer Kunststoffküvette gemischt und

die OD_{600} wurde ermittelt. Als Leerwert diente 1 ml *H. pylori*-Kulturmedium. Nach Subtrahieren des Leerwertes und Multiplizieren mit dem Verdünnungsfaktor erhielt man den tatsächlichen OD_{600} -Wert von *H. pylori*. Dieser entspricht bei einem Wert von 1 ca. 2×10^8 *H. pylori* pro Milliliter [181].

2.2.2.4 Herstellung von *H. pylori* SS1-Inokulat zur Mausinfektion

Für das Inokulat wurde *H. pylori* SS1 wie in 2.2.2.1 beschrieben aufgetaut und auf einer WC-Blutagarplatte angezüchtet. Von der Platte wurden Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen, in 1 ml *H. pylori*-Kulturmedium resuspendiert und je 100 µl wurden auf vier vorgewärmte WC-Blutagarplatten ausplattiert und für 48 h inkubiert. Von den bewachsenen Platten wurden Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und in 1 ml sterilen Brucella Broth resuspendiert. Die OD_{600} wurde wie unter 2.2.2.3 beschrieben bestimmt. Für die Inokulation von Mäusen wurde eine $OD_{600} = 5$ eingestellt.

2.2.2.5 Infektion von Mäusen

Drei Monate alte B6129 WT- und Cav1-KO-Mäuse wurden dreimal hintereinander im Abstand von zwei Tagen oral mit jeweils 0,2 ml Inokulationssuspension (siehe 2.2.2.4) infiziert. Dazu wurden die Mäuse 6 h vor der Infektion und 1 h nach der Infektion in leeren Käfigen mit Trinkmöglichkeit, aber ohne Nahrung und Streu gehalten, um somit eine effiziente Infektion durch *H. pylori* SS1 zu ermöglichen.

2.2.2.6 Infektion von eukaryotischen Zellen

Zur Infektion von eukaryotischen Zellen wurde *H. pylori* SS1 von der WC-Blutagarplatte abgenommen und in 5 ml warmem *H. pylori*-Kulturmedium resuspendiert. Bei der Infektion mit *H. pylori* G27 wurde der Kulturüberstand der Bakterienkultur bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 3 ml warmem *H. pylori*-Kulturmedium aufgenommen. Folgend wurde die optische Dichte gemessen und mit frischem *H. pylori*-Kulturmedium auf eine $OD_{600} = 1$ eingestellt, sodass etwa 2×10^8 Bakterien pro Milliliter [181] vorhanden waren. Je nach Versuch wurde die Infektion mit *H. pylori* mit unterschiedlichen *multiplicity of infection* (MOI) durchgeführt. Diese gibt die Anzahl von Bakterien an, die eine Zelle infizieren können. Die zu infizierenden Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl (96-Lochplatte), 2 ml (6-Lochplatte), 1 ml (12-Lochplatte), 10 ml (10 cm Schale) einer, zuvor auf die entsprechende

MOI eingestellten, *H. pylori*-Suspension beschichtet. Die Infektion erfolgte im Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Luftfeuchtigkeit.

2.2.2.7 Bestimmung von *colony forming units* (CFU)

Die Bestimmung von kolonienbildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU) aus infiziertem Gewebe erfolgte nach Rad *et al.*, 2006. Hierzu wurde ein 1 mm² großes Magenstückchen gewogen, in 5 ml Brucella Broth aufgenommen und für 10 min gevortex, um so die Bakterien von dem Gewebe zu separieren. Daraufhin wurden Verdünnungen (1:10, 1:100 und 1:1000) erstellt und von diesen wurden jeweils 100 µl auf je eine WC-Blutagarplatte plattiert. Die Inkubation der WC-Blutagarplatten erfolgte im Bakterienbrutschrank bei 37°C, 10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂ für 4-5 Tage. Die Anzahl an gewachsenen Kolonien pro Platte wurde mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert und auf das Gewicht des entsprechenden Magenstücks normalisiert

2.2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.2.3.1 Organentnahme

11 Monate nach der Infektion wurden die Mäuse mit einer hohen Konzentration von Narkosemittel Isofluran narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Nach Aufschneiden der Bauchdecke wurden die Mägen entnommen. Diese wurden mit Hilfe einer Kanüle mit Wasser gespült, um Nahrungsreste zu entfernen. Vom Antrum wurden zwei je 1 mm² große Streifen abgeschnitten. Eines davon wurde für die CFU-Bestimmung (vgl. 2.2.2.7) und das andere für die RNA-Präparation (vgl. 2.2.4.3.1) verwendet. Der restliche Magen wurde in eine Fixierlösung (4% w/v Paraformaldehyd (PFA) in PBS) überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Am folgenden Tag wurden die Mägen in ein 70% Ethanol-Wasser-Gemisch überführt. Die Mägen wurden entlang der großen und kleinen Kurvaturen in zwei Hälften geteilt. Diese wurden in separate Einbettkassetten platziert und in der Gewebeentwässerungsanlage Leica ASP300 (Leica Microsysteme Vertrieb GmbH) über Nacht entwässert.

2.2.4 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.2.4.1 Transformation von Plasmid-DNA

Zur Vervielfältigung von Plasmiden diente *E. coli* DH5 α . Dieser Stamm wurde in Form chemisch kompetenter Zellen von der Firma Invitrogen GmbH als Gefrierkultur bezogen. Zur Transformation wurde ein 50 μ l Aliquot auf Eis aufgetaut, 1 μ l Plasmid-DNA (ca. 200 ng) wurde dazu pipettiert und der gesamte Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem darauffolgenden Hitzeschock bei 42°C für 90 s, wurden die Zellen für 5 min auf Eis gekühlt, in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h auf einem Thermoschüttler bei 37°C, 370 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min, bei RT pelletiert und das Pellet wurde in 250 μ l LB-Medium resuspendiert. Von dem Ansatz wurden 50 μ l auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden in einem Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Hierzu wurde von einer LB-Platte mit einer sterilen Pippettenspitze eine Kolonie abgenommen und in ein Greiner-Röhrchen überführt, welches mit 3 ml LB-Medium sowie entsprechendem Antibiotikum (Verdünnung 1:1000) befüllt war. Nach darauf folgenden Übernachtinkubation auf einem Schüttler bei 37°C, 370 rpm wurden die Bakterien bei maximaler Geschwindigkeit, für 5 min zentrifugiert und die Plasmid-DNA wurde mit dem *Pure Yield* Plasmid Miniprep system Kit der Firma Promega GmbH nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.2.4.3 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen GmbH nach Angaben des Herstellers gewonnen.

2.2.4.3.1 RNA-Isolierung aus dem Gewebe

Hierzu wurde das Gewebe (Größe 1 mm²) in 600 μ l Lysepuffer (1% (v/v) β -Mercaptoethanol in RLT-Lyse-Puffer) aufgenommen und mit dem Homogenisator DiAx 900 (Heidolph Instruments GmbH) homogenisiert. Das Homogenisat wurde zusätzlich auf eine *Qia-shredder spin column* überführt und für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert um damit die noch nicht lysierten Gewebefragmente abzutrennen. Um eine vollständige Lyse

und damit auch höhere RNA-Ausbeute zu erzielen wurde der Durchfluss 20 Mal auf und ab pipettiert. Die gesamte RNA wurde durch anschließende Zugabe von 600 µl 70% Ethanol (1:1) zu dem Gewebelysat gefällt. Das komplette Gemisch wurde auf eine RNeasy-Spin-Säule gegeben und bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert. Hierbei bindet die RNA an die Säulen-Matrix (Silikat). Die durchgeflossene Flüssigkeit wurde verworfen. Die gebundene RNA wurde mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und für 15 s, bei 10.000 rpm zentrifugiert. Um mögliche DNA-Rückstände aus der Probe zu entfernen, wurde auf die Säule 80 µl DNase-Lösung (10 µl DNase und 70 µl RBD Puffer, beide von DNase Set der Firma Quiagen GmbH) pipettiert und die Reaktion für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die RNA erneut gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte durch Zugabe von 350 µl RW1 Puffer auf die Säule und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 s. Im darauffolgenden Waschschrift wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule überführt und diese für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde durch eine erneute Zugabe von 500 µl RPE auf die Säule wiederholt und diese 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert womit der restliche Ethanol von der Säule entfernt wurde. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und die RNA wurde durch Zugabe von 35 µl RNase-freiem dH₂O auf die Säule und anschließende Zentrifugation für 1min bei 10.000 rpm eluiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4.3.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Hierfür wurden Zellen aus einer Vertiefung einer 6-Lochplatte mit einer Konfluenz von 90% (ca. 1×10^6 Zellen) einmal mit PBS gewaschen und mit 350 µl Lysepuffer (1% (v/v) β-Mercaptoethanol in RLT-Lyse-Puffer) bedeckt. Die Zellen wurden von der Platte mit Hilfe eines Zellschabers getrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Lysat wurde 20 Mal auf und ab pipettiert und die RNA wurde durch Zugabe von 350 µl 70% Ethanol präzipitiert. Folgende Schritte erfolgten wie bei der RNA-Präparation aus Gewebe (vgl. 2.2.4.3.1).

2.2.4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der isolierten DNA- und RNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 der Firma PEQLAB GmbH.

2.2.4.5 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription

Reverse Transkription dient zum Umschreiben von mRNA in eine einzelsträngige DNA-Sequenz. Diese wird auch als komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) bezeichnet.

Zur cDNA Synthese wurde der Verso cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Hierfür wurde 1 µg RNA mit RNase freiem dH₂O auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und der Reaktionsansatz mit 4 µl 10x Puffer, 2 µl dNTP, 1 µl Random-Hexamerprimer, 0,5 µl Stabilizator und 0,5 µl reverse Transkriptase vervollständigt. Die cDNA Synthese erfolgte in der PCR-Maschine Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) bei folgenden Bedingungen: 45°C für 30 min, 95°C für 2 min. Danach wurde die cDNA auf 4°C gekühlt und durch Zugabe von 20 µl dH₂O verdünnt.

2.2.4.6 Amplifikation von cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Für die meisten PCR Reaktionen wurde der Go Taq Green Mastermix von der Firma Promega verwendet. Es handelte sich dabei um eine Fertigmischung aus einer *Taq* DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ sowie geeignetem Reaktionspuffer. Für einen Reaktionsansatz wurden auf Eis, in ein 200 µl PCR-Gefäß, 6 µl dH₂O, 10 µl Go Taq Green Mastermix, 1 µl Vorwärtsoligonukleotide (10 µM), 1 µl Rückwärtsoligonukleotide (10 µM) und 2 µl cDNA zusammenpipettiert. Die PCR wurde in der PCR-Maschine Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Das PCR-Programm beinhaltete eine primäre Denaturierung bei 95°C für 5 min, gefolgt von 30-35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Anlagerung von Oligonukleotiden bei 55°C für 30 s und DNA-Synthese bei 72°C für 0,5 bis 1 min. Die Amplifikation wurde durch eine Inkubation bei 72°C für 2 min beendet und das PCR-Produkt wurde auf 4°C abgekühlt.

2.2.4.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die mittels PCR amplifizierten, sowie durch Restriktionsverdau (vgl. 2.2.4.10.1 - 2.2.4.10.2) entstandenen DNA-Fragmente wurden nach ihrer Größe mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde Agarose mit TAE-Puffer (pH 8,3: 50 mM Tris-Base; 1 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Essigsäure) in einer Mikrowelle aufgeköcht, kurz abgekühlt und nach der Zugabe von 0,01% Ethidium Bromid in eine entsprechende Gelform gegossen. Die Konzentration der Agarose betrug je nach der Größe der zu erwartenden Fragmente 1-1,5%. PCR-Produkte die mit Go Taq Green Mastermix oder JumpStart RedTaqReady Mix

amplifiziert wurden, konnten nach dem Erstarren des Agarose-Gels direkt in die Taschen geladen werden. Die Restriktionsprodukte wurden mit 6x DNA-Ladepuffer vermischt und dann aufgetragen. Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente dienten die 50 bp und 1 kb DNA-Größenstandards der Firmen Fermentas GmbH und NEB. Die Elektrophorese erfolgte in der mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer SubCell GT (Bio-Rad Laboratories GmbH) bei konstant 100 Volt. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit dem UV-Licht-Gerät Gel Doc XR+System der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH.

2.2.4.8 Gelextraktion

Die DNA-Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde mit dem Peq Gold Gel Extraction Kit (PEQLAB, GmbH) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

2.2.4.9 Quantitative *real time* PCR

Die Expression spezifischer Gene wurde mittels sogenannter Echtzeit-quantitativer PCR (*real time* quantity PCR, RT-qPCR) untersucht. Hier wird die Vermehrung eines PCR-Produktes durch Fluoreszenzmessung direkt während der Amplifikation analysiert. Als Fluoreszenzfarbstoff diente in der vorliegenden Arbeit SYBR Green. Dieses interkaliert sequenzunabhängig an die sich während der PCR bildende doppelsträngige DNA. Während die Fluoreszenzintensität des SYBR Green in gelöster Form gering ist, steigt sie mit der Bildung von doppelsträngigen PCR-Produkten an. Somit ist Fluoreszenzintensität einer Probe zur Konzentration des neu gebildeten PCR-Produktes direkt proportional. Als eigentlicher Messwert diente der sogenannte *cycle threshold* (CT). Dieser Wert entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, bei der sich die Fluoreszenz der Amplifikate gerade deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt.

Für die einzelnen Reaktionen wurde ein Mastermix bestehend aus 10 µl LightCycler 480 SYBRGreen I Master (Roche Diagnostics GmbH), 1 µl Vorwärtsoligonukleotiden (10µM), 1 µl Rückwärtsoligonukleotiden (10 µM) und 6 µl dH₂O vorbereitet und davon wurden jeweils 18 µl pro Vertiefung einer LightCycler480 Multiwell Plate 96 (Roche Diagnostics GmbH) vorgelegt. Der PCR Ansatz wurde durch Zugabe von jeweils 2 µl cDNA (aus Schritt 2.2.4.5) vervollständigt. Als Referenz diente das Haushaltsgen β 2-Mikrotubulin (β 2M). Alle Muster wurden in Duplikaten ausgeführt. Die PCR wurde in dem Gerät LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Das PCR-Programm beinhaltete eine initiale Denaturierung

bei 95°C für 5 min, gefolgt von 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C 10 s, Anlagerung von Oligonukleotiden bei 55°C für 30 s und DNA-Synthese bei 72°C für 5 s. Die Amplifikation wurde durch eine Inkubation bei 72°C für 2 min beendet.

Zur Auswertung der Daten wurde die LightCycler 480 Software 1.5.0 (Roche Diagnostics GmbH) verwendet. Aus den erhaltenen CT-Werten wurde ein Mittelwert gebildet und dieser wurde von dem Mittelwert des β 2M substrahiert. Daraus ergab sich der sogenannte Δ CT-Wert. Aus allen Δ CT-Werten die für ein untersuchtes Gen ermittelt wurden, wurde der Mittelwert gebildet, der als Kalibrator bezeichnet wurde. Der Kalibrator wurde dann von den einzelnen Δ CT-Werten substrahiert und ergab somit $\Delta\Delta$ CT. Anschließend berechnete man entsprechend der folgenden Formel die x-fache Induktion des jeweiligen Gens:

$$\text{x-fache Induktion} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

2.2.4.10 Konstruktion des pTarget-DLC1v4-Expressionsvektors

2.2.4.10.1 Amplifikation von DLC1v4

Die humane DLC1 Isoform 4 (NM_001164271.1) [182] wurde aus cDNA der HepG2-Zelllinie mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig mit *Bam*HI (stromaufwärts) und *Not*I (stromabwärts)-Schnittstellen versehen. Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.6 unter Klonierung angegeben.

Hier wurde der JumpStart REDTaq *Ready Mix* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bestehend aus *Taq* DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ sowie Reaktionspuffer verwendet. Pro PCR-Ansatz wurden in ein 200 μ l PCR-Gefäß 8 μ l dH₂O, 12,5 μ l JumpStart REDTaq *Ready Mix*, 1,25 μ l Vorwärtsoligonukleotide (10 μ M), 1,25 μ l Rückwärtsoligonukleotide (10 μ M) und 2 μ l cDNA zusammenpipettiert. Die PCR wurde in der PCR-Maschine Gene Amp PCR System 9700 der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Das PCR Programm beinhaltete eine initiale Denaturierung bei 95°C für 5 min gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus je einer Denaturierung bei 95°C für 30 s, Anlagerung von Oligonukleotiden bei 55°C für 1 min und DNA-Synthese bei 72°C für 4 min. Die Amplifikation wurde durch eine Inkubation bei 72°C für 2 min beendet und das PCR-Produkt wurde auf 4°C gekühlt. Das gesamte PCR-Produkt wurde im 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt (vgl. 2.2.4.7). Das entsprechende DNA-Fragment (~3 kb) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 2.2.4.8 beschrieben extrahiert und gereinigt.

2.2.4.10.2 Restriktion

Die Restriktion erfolgte mit zwei Enzymen *Bam*HI und *Not*I (Promega GmbH) gleichzeitig. Als Reaktionspuffer wurde Puffer D gewählt (*Not*I zu 100% aktiv und *Bam*HI zu 50-75% aktiv). Daher wurde 1,5-fach mehr *Bam*HI als *Not*I eingesetzt. Pro Restriktionsansatz von 20 µl wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ein variables Volumen von dH₂O, 2 µl 10x Puffer D, 0,2 µl 10x BSA, 2 µg DNA, 1 µl *Not*I, 1,5 µl *Bam*HI zusammenpipettiert. Die Restriktion erfolgte bei 37°C für 1 h. Zu jedem Restriktionsansatz wurde 3,3 µl 6x DNA-Ladepuffer zugegeben und die fragmentierte DNA in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt (vgl. 2.2.4.7). Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden wie in 2.2.4.8 beschrieben extrahiert.

2.2.4.10.3 Subklonierung in den TOPO-Vektor

Zuerst wurde das gewünschte DLC1v4 Fragment in den pCR2.1 TOPO-Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) inseriert. Der bereits linearisierte TOPO-Vektor ermöglicht aufgrund der *Vaccinia* Topoisomerase I eine schnelle und effiziente Insertion von beliebigen mit *Taq* DNA-Polymerase amplifizierten PCR Produkten in den linearisierten Vektor. Somit kann die Sequenz des zu klonierenden Fragments schnell mittels Sequenzierung überprüft, folgend vervielfältigt und anschließend in einen Zielvektor überführt werden. Zur Klonierung des *Dlc1v4* PCR-Produktes in den TOPO-Vektor wurde der TOPO-TA Klonierungskit der Firma Invitrogen GmbH verwendet.

Hierfür wurden nach Angaben des Herstellers 4 µl des zuvor aus dem Agarosegel extrahierten DLC1v4 DNA-Fragments (vgl. 2.2.4.10) mit 1 µl Salzlösung und 1 µl TOPO-Vektor gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Von diesem Reaktionsansatz wurden 2 µl in *E. coli* DH5α wie unter 2.2.4.1 beschrieben transformiert und anschließend auf eine LB-Ampicillin-Platte ausplattiert. Aus den erhaltenen Klonen wurden die Plasmide wie unter 2.2.4.2 beschrieben isoliert und das Vorhandensein von DLC1v4-Fragmenten wurde durch Kontrollverdau mit *Bam*HI und *Not*I (vgl. 2.2.4.10.2) überprüft. Positive Plasmide wurden mit Sequenzanalyse (vgl. 2.2.4.10.7) unter Verwendung des T7-Oligonukleotids (Tabelle 2.6) überprüft.

2.2.4.10.4 Klonierung in den pTarget-Vektor

Um schließlich DLC1v4 in den pTarget-Expressionsvektor klonieren zu können wurde der *Dlc1v4*-TOPO-Vektor, sowie der pTarget-Vektor mit *Bam*HI und *Not*I verdaut (vgl. 2.2.4.10.2). Die dabei entstandenen Produkte wurden in einem 1%-igen Agarosegel separiert (vgl. 2.2.4.7) und aus dem Agarosegel (vgl. 2.2.4.8) extrahiert. Daraufhin wurden

pTarget und Dlc1v4 ligiert (vgl. 2.2.4.10.5). Von dem Ligationsansatz wurden 4 µl in 50 µl *E. coli* DH5α transformiert (vgl. 2.2.4.1) und diese wurden auf LB-Ampicillin-Platten selektiert. Die erhaltenen Klone wurden auf das Vorhandensein von DLC1v4-pTarget mittels Kolonie-PCR (vgl. 2.2.4.10.6) überprüft und mit *Bam*HI und *Not*I (vgl. 2.2.4.10.2) zur Kontrolle verdaut. Positive Vektoren wurden mittels Sequenzanalyse (vgl. 2.2.4.12.5) unter Verwendung der M13 FP und M13 RP Oligonukleotide (Tabelle 2.6) analysiert.

2.2.4.10.5 Ligation

Die Ligation von Vektor (pTarget) und *Insert* (DLC1v4) erfolgte mittels T4 DNA Ligase der Firma Promega GmbH. Hierfür wurde Vektor und *Insert* in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Menge der *Insert*-DNA wurde mit Hilfe der vom Hersteller angegebenen Formel wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Größe des } \underline{\text{Inserts}}}{\text{kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältniss } \frac{\underline{\text{Insert}}}{\text{Vektor}} = \text{ng des } \underline{\text{Inserts}}$$

Der 10 µl Ligationsansatz bestand aus 100 ng pTarget-Vektor, 53 ng DLC1v4 DNA, 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl T4 DNA Ligase und einem variablen Volume von dH₂O. Die Ligation erfolgte in der PCR-Maschine Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) bei 11°C über Nacht.

2.2.4.10.6 Kolonie-PCR

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine einzelne Kolonie von einer LB-Ampicillin-Platte abgenommen. Von dieser wurde zuerst ein Teil auf eine frische LB-Ampicillin-Platte (Backup) überstrichen und der Rest wurde in ein mit 50 µl LB-Ampicillin-Medium befülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die LB-Ampicillin-Platte wurde bei 37°C im Bakterienbrutschrank für 20 h inkubiert. Die flüssige Bakteriensuspension wurde auf einem Thermoschüttler bei 37°C, 370 rpm für 2 h inkubiert. Von dieser Suspension wurden 5 µl einem PCR-Ansatz bestehend aus 10 µl JumpStart REDTaq *Ready Mix*, 3 µl dH₂O, 1µl Vorwärtsoligonukleotiden (10 µM), 1 µl Rückwärtsoligonukleotiden (10 µM) zugesetzt. Bei den Oligonukleotiden handelte es sich um die gleichen, die zur Amplifikation von DLC1v4 zur Klonierung verwendet wurden. Das verwendete PCR-Program entsprach dem in Kapitel 2.2.4.10.1.

2.2.4.10.7 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse wurde durch die Firma GATC Biotech AG, Köln durchgeführt. Die Sequenzierungsprimer sind in Tabelle 2.6 angegeben.

2.2.4.11 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Diese Methode dient zur Analyse von Interaktionen zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen. Somit kann z.B. die Bindung eines Transkriptionsfaktors an eine entsprechende regulatorische Sequenz im Promotor eines Gens nachgewiesen werden. Das Prinzip beruht auf der Kenntniss, dass Protein-DNA-Komplexe im Vergleich zu freier, ungebundener DNA eine geringere Mobilität im nativen Polyacrylamid-Gel aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das LightShift Chemiluminescent EMSA-Kit von der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Hier wird die zu untersuchende DNA-Sequenz mit Biotin markiert, wodurch die DNA mittels Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase sichtbar gemacht werden kann.

2.2.4.11.1 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Einzelsträngige mit Biotin markierte und unmarkierte SRE-Oligonukleotide (SRE3) sowie unmarkierte mutierte SRE-Oligonukleotide (SRE3 Mut, Tabelle 2.6) wurden mit dH₂O auf eine Endkonzentration von 10 µM eingestellt. Die Aneinanderlagerung der komplementären DNA-Einzelstränge erfolgte in dem man jeweils 10 µl der entsprechenden Oligonukleotide zusammen mischte, für 10 min bei 95°C inkubierte und anschließend langsam bei RT abkühlen ließ. Danach wurden die Reaktionsansätze bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt und später bei -20°C gelagert. Die Konzentration der hergestellten doppelsträngigen Oligonukleotide wurde mittels NanoDrop Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie GMBH) gemessen und mit dH₂O auf eine Konzentration von 1 ng/µl (biotinmarkierte SRE3-Oligonukleotide) und 200 ng/µl (unmarkierte SRE3-Oligonukleotide und unmarkierte mutierte SRE3-Oligonukleotide) eingestellt.

2.2.4.11.2 Durchführung der Bindungsreaktion

Die nukleäre Extrakte wurden wie unter 2.2.5.2 beschrieben hergestellt. Alle Komponenten wurden auf Eis aufgetaut. Die einzelnen Reaktionen wurden in der gleichen Reihenfolge (von oben nach unten) wie in Tabelle 2.16 dargestellt, zusammenpipettiert, durch zweimaliges auf und ab pipettieren gemischt und bei RT für 20 min inkubiert.

Tabelle 2.16 Komponenten für die EMSA-Bindungsreaktion.

Komponente	Endkonzentration	Reaktion 1	Reaktion 2	Reaktion3
dd H ₂ O	-	var.	var.	var.
10x Bindungspuffer	1x	2 µl	2 µl	2 µl
1 µg/µl Poly (dl.dC)	50 ng/µl	1 µl	1 µl	1 µl
Nukleärer Extrakt	max.	max. 15 µl	max. 14 µl	max. 14 µl
unmark. SRE3-WT Oligonukleotide	200 ng	-	1 µl	-
unmark. SRE3-Mut Oligonukleotide	200 ng	-	-	1 µl
biotinmarkierte SRE3-Oligonukleotide	2 ng	2 µl	2 µl	2 µl
Gesamtvolumen		20 µl	20 µl	20 µl

Bei Reaktion 1 handelte es sich um den Nachweis der Bindung des Proteins an spezifische biotinmarkierte SRE3-Oligonukleotide. Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurde dem Ansatz ein 100-facher Überschuss an identischen, unmarkierten Oligonukleotiden (SRE3-WT, Reaktion 2) und unmarkierten mutierten SRE3-Oligonukleotiden (SRE3-Mut, Reaktion 3) zugegeben (Kompetition). Dabei binden die in dem nukleären Extrakt vorhandene Proteine proportional zum gewählten Verhältnis an die unmarkierten und biotinmarkierten DNA-Fragmente. Aufgrund des Überschusses an identischen unmarkierten SRE3-WT-Oligonukleotiden sollten vor allem diese von Proteinen gebunden werden. Die entstandenen SRE3-WT-Protein-Komplexe können aufgrund der fehlenden Oligonukleotidmarkierung nicht detektiert werden. Dagegen sollte keine Kompetition trotz eines Überschusses an unmarkierten mutierten SRE3-Oligonukleotiden stattfinden.

2.2.4.11.3 Elektrophorese, DNA-Protein Transfer und DNA-Fixierung

Nach der Bindungsreaktion wurden die Reaktionsansätze mit jeweils 5 µl 5x DNA-Ladepuffer versetzt. Von jedem Ansatz wurden 20 µl in die Taschen eines nicht-denaturierenden 7,5%-igen Polyacrylamid-Gels geladen, das zuvor für 30 min in 0,5x TBE-Puffer (5x TBE-Puffer pH 8,3: 89 mM Tris-Base; 2 mM EDTA, pH 8,0; 89 mM Borsäure) bei einer Spannung von 100 V konstant leer vorgelaufen war. Die einzelnen Gel-Komponenten sind in Tabelle 2.17 aufgelistet. Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,5x TBE-Puffer bei einer Spannung von 100 V konstant.

Tabelle 2.17 Komponenten zur Herstellung von 7,5%-igen Polyacrylamid-Gelen für EMSA.
 Angegebene Volumina sind für die Herstellung von zwei 10 cm x 7,5 cm großen Gelen mit einer Dicke von 1 mm bestimmt.

Komponente	Volume
Acrylamid 30%	4,2 ml
5X TBE	1,66 ml
APS (w/v) 10%	84 µl
TEMED	5,6 µl
dH ₂ O	10,65 µl
Gesamtvolumen	16,6 ml

Die aufgetrennten DNA-Protein-Komplexe sowie die freie DNA wurden auf eine Nylonmembran überführt, die zuvor für 10 min im 0,5x TBE-Puffer eingeweicht worden war. Hierzu wurde ein Stapel (*blot sandwich*) wie unter 2.2.5.6 beschrieben aufgebaut und der Transfer erfolgte im 0,5x TBE-Puffer bei 380 mA konstant für 60 min. Danach wurde die Membran in 0,5x TBE Puffer gelegt um somit das Austrocknen zu verhindern.

Anschließend wurden die auf der Membran gebundenen DNA/DNA-Protein-Komplexe auf der Membran mit Hilfe des UV-Crosslinkers CL1000 (UVP, Inc.) fixiert. Hierzu wurde die Nylonmembran auf ein mit 0,5x TBE befeuchtetes Filterpapier gelegt und in dem UV-Crosslinker platziert. Die UV-Bestrahlung erfolgte bei 120 mJ/cm² und 254nm für 3 min. Danach wurde die Membran bis zur weiteren Anwendung trocken aufbewahrt.

2.2.4.11.4 Visualisierung der Biotin-markierten DNA

Die aus Punkt 2.2.4.11.3 erhaltene Membran wurde in 10 ml zuvor bei 37-50°C vorgewärmten Blockierungspuffer für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran in ein Gemisch bestehend aus 10 ml Blockierungspuffer und 16,7 µl Streptavidin-konjugierten Meerrettichperoxidase (Verhältnis 1:300) überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran bei RT bis zum Auflösen der gebildeten Präzipitate (etwa 1 h) auf einem Schüttler geschwänkt. Folgend wurde die Membran in einen neuen Behälter überführt und drei Mal je 20 min mit 10 ml 1x Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die biotinmarkierte DNA mit ECL wie unter 2.2.5.6.1 beschrieben detektiert.

2.2.4.12 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Ähnlich wie EMSA (vgl. 2.2.4.11) dient auch diese Methode zur Untersuchung spezifischer Interaktionen zwischen Protein und DNA wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Histonen oder anderen DNA-bindenden Proteinen. Hier werden die entstandenen Protein-DNA-Komplexe quervernetzt und mittels spezifischer Antikörper präzipitiert. Nach Auflösen der Protein-DNA-Komplexe sowie Proteinverdau wird die zurückgebliebene DNA unter Verwendung spezifischer Oligonukleotiden mittels PCR quantifiziert.

Hierzu wurden 6×10^6 MKN45-Zellen in eine 10 cm Schale ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Infektion mit *H. pylori* G27 (MOI=100) für 16 h. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal mit 37°C warmem RPMI-Medium gewaschen und anschließend in 10 ml warmem RPMI-Medium aufgenommen.

2.2.4.12.1 Quervernetzung des Chromatins

Die Quervernetzung des Chromatins erfolgte durch Zugabe von 270 μ l 37% Formaldehyd und anschließender Inkubation auf einem Schüttler bei RT für 10 min. Ungebundenes Formaldehyd wurde durch anschließende Zugabe von 500 μ l 2,5 M Glycin und einer weiteren Inkubation auf dem Schüttler für 5 min bei RT entfernt. Die Zellkulturschalen wurden auf Eis platziert und folgende Schritte erfolgten bei 4°C. Allen verwendeten Puffern wurden Proteaseninhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Tablette) zugesetzt. Die Zellen wurden zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml PBS beschichtet, mit einem Schaber von der Kulturschale entfernt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min, 4°C. Der Zellpellet wurde in 200 μ l SDS-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,1; 10 mM EDTA; 1% (w/v) SDS) lysiert.

2.2.4.12.2 Fragmentierung des Chromatins

Um DNA-Fragmente einer Größe von 500-1000 bp zu gewinnen, wurde das Lysat mit dem Ultraschall Sonoplus HD 2070 (Bandelin electronic GmbH & Co. KG) bei einer Amplitude von 30% zwei Mal für 10 s behandelt. Durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm wurden unlösliche Zellbestandteile entfernt. Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und daraufhin in 1800 μ l Verdünnungs-Puffer (167 mM NaCl; 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1; 1,2 mM EDTA; 1,1% (v/v) Triton X-100; 0,01% (w/v) SDS; frisch zugesetzt: Protease Inhibitor Cocktail Tablette) verdünnt.

2.2.4.12.3 Chromatin-Immunopräzipitation

Zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundes wurden dem Lysat 100 µl Protein A Agarose/*Salmon sperm* DNA zugeben. Der Ansatz wurde auf einem Rotator bei 4°C für 1 h inkubiert und die unspezifischen Präzipitate wurden anschließend bei 4°C, 5000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Zur Quantifizierung des Ausgangsmaterials (der *Input*) wurden von dem DNA-haltigen Überstand 20 µl entnommen und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Der Rest wurde auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zu einem Aliquot wurden 25 µl anti-SREBP1- bzw. anti-Ac-Histon H4-Antikörper, zu dem anderen 1 µl Kaninchen IgG (Negativkontrolle) zugegeben. Die Immunopräzipitation erfolgte über Nacht auf einem Rotator bei 4°C. Anschließend wurden den Antikörper/Protein/DNA-Komplexen 60 µl Protein A Agarose/*Salmon sperm* DNA zugegeben und der Ansatz auf einem Rotator bei 4°C für 1 h inkubiert. Die entstandenen Agarose/Antikörper/Protein/DNA-Komplexe wurden bei 5000 rpm und 4°C für 1 min pelletiert und anschließend einmal mit Puffer A (150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 2 mM EDTA pH 8,0; 1% (v/v) Triton X-100; 0,1 % SDS), einmal mit Puffer B (500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 2 mM EDTA pH 8,0; 1% (v/v) Triton X-100; 0,1 % SDS), einmal mit LiCl-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,1; 1 mM EDTA pH 8,0; 1% (w/v) DOC; 1% (v/v) NP40; 250 mM LiCl) und anschließend zweimal mit TE-Puffer (10 mM Tris-Base; 1 mM EDTA pH 8,0) gewaschen. Jeder Waschgang beinhaltete die Zugabe von 1 ml des jeweiligen Puffers, die Inkubation auf einem Schüttler bei 4°C für 5 min und die darauffolgende 1 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C. Die gewaschenen Protein-DNA-Komplexe wurden durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (0,1 mM NaHCO₃; 1% (w/v) SDS) zum Pellet, einer Inkubation für 15 min bei RT und einer anschließender 1 minütigen Zentrifugation bei 5000 rpm und RT von der Agarose eluiert. Der Überstand wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis aufbewahrt. Die Elution wurde einmal wiederholt und die eluierten Fraktionen wurden vereinigt. Der *Input* wurde in 200 µl Elutions-Puffer aufgenommen.

2.2.4.12.4 Lösen der Protein-DNA-Komplexe

Die durch Formaldehyd gebildeten Quervernetzungen von DNA-Protein-Komplexen wurden durch Zugabe von 8 µl 5 M NaCl zu den ChIP-Proben und anschließender Inkubation auf einem Thermoschüttler bei 65°C über Nacht gelöst. RNA in den Proben wurde durch Zugabe von 1 µl RNase A und folgender Inkubation für 30 min bei 37°C verdaut. Danach wurden Proteine durch die Zugabe von 4 µl 0,5 M EDTA, 8 µl 1 M Tris-HCl pH 7,4, 1 µl Proteinase K und anschließender Inkubation bei 45°C für 2 h degradiert. Die DNA aus den Proben wurde mit Phenol-Chloroform (vgl. 2.2.4.12.5) aus den Proben extrahiert.

2.2.4.12.5 DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform

Die aus Punkt 2.2.4.12.4 erhaltenen ChIP-Proben von wurden mit einem Volumen Phenol (1:1) versetzt und für 5 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach folgender Zentrifugation für 10 min, 3000 rpm bei 4°C wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumen Chloroform (1:1) versetzt und für 5 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Daraufhin wurden die Proben abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde 3 M Natriumacetat im Verhältnis 1:20 als Fällungshelfer zugegeben und die Fällung erfolgte in 2,5 Volumen 100% Ethanol und Inkubation bei -20°C über Nacht. Die präzipitierte DNA wurde bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 30 min abzentrifugiert und das Pellet wurde in 1 ml Ethanol (70%) resuspendiert und erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Waschgang wurde einmal wiederholt. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet bis das Ethanol vollständig verdampft war. Anschließend wurde die DNA in 20 µl dH₂O aufgenommen.

2.2.4.12.6 Vervielfältigung der DNA mittels *whole genome amplification* (WGA)

Da die Konzentration der mittels ChIP-extrahierten DNA (vgl. 2.2.4.12.1 – 2.2.4.12.5) sehr gering war, wurde die DNA mit Hilfe des *Genome Plex Whole Genome* Amplifikation Kits (WGA) der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH amplifiziert. Dieses sollte laut Hersteller eine bis zu 1000-fache Vervielfältigung der Ausgangs-DNA bewirken.

Herstellung einer OmniPlex-Bibliothek

Zu Beginn wurde eine sogenannte OmniPlex-Bibliothek erstellt. Es handelt sich um eine Sammlung von DNA-Fragmenten, die durch Einbringen universeller Adaptorsequenzen an beiden Enden der ursprünglichen DNA-Fragmente für die WGA-Amplifikation vorbereitet werden.

Hierzu wurde in einem 200 µl PCR-Gefäß 10 µl der zuvor extrahierten DNA (vgl. 2.2.4.12.5) mit 2 µl 1x *Library Preparation* Puffer und 1 µl *Library Stabilisation* Puffer zusammengegeben und in der PCR-Maschine Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) bei 95°C für 2 min denaturiert. Nach folgendem Abkühlen auf dem Eis wurde dem Ansatz 1 µl *Library Preparation* Enzym zugesetzt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 16°C für 20 min, 24°C für 20 min, 37°C für 20 min, 75°C für 5 min, Abkühlen auf 4°C.

Amplifikation der gesamten genomischen DNA

Hierzu wurde die zuvor hergestellte OmniPlex-Bibliothek mit 7,5 µl des 10x Amplifikations-Master-Mixes, 50 µl dH₂O und 2,5 µl der Jumpstart *Taq* DNA-Polymerase vermengt. Das PCR-Programm bestand aus 20 Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltete eine Inkubation bei 95°C für 3 min, bei 94°C für 15 s und bei 65°C für 5 min. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 4°C abgekühlt.

2.2.4.12.7 Reinigung von WGA-PCR Produkten

Die mit dem WGA-Kit amplifizierten DNA Fragmente wurden mit dem MinElute PCR *Purification* Kit (Qiagen GmbH) nach Angaben des Herstellers gereinigt, anschließend in 20 µl dH₂O eluiert und direkt für die RT-qPCR (vgl. 2.2.4.9) eingesetzt. Die bei der RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide (CAV1-300) sind in Tabelle 2.6 unter ChIP angegeben.

2.2.5 Proteinbiochemische und Analytische Methoden

2.2.5.1 Präparation von Gesamtzelllysaten

6-Lochplatten sowie Zellkulturschalen (10 cm) mit infizierten bzw. uninfizierten Zellen wurden auf Eis gestellt und alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Die Zellen wurden drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 600 µl (6-Lochplatte) bzw. 1,5 ml (10 cm Zellkulturschale) SDS-Lysepuffer (50mM TrisHCl pH 7,4; 2% (w/v) SDS) bedeckt, dem zuvor Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Tablette, 1 mM DTT und 1 mM Na₃VO₄) frisch zugesetzt wurden. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Platte entfernt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Um die Lyse zu vervollständigen, wurden das Lysat 20 Mal auf und ab pipettiert und anschließend mit dem Ultraschall Sonoplus HD 2070 (Bandelin electronic GmbH & Co. KG) zwei Mal für 10 s bei einer Amplitude von 30% auf Eis behandelt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit für 15 min abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Preparation von nukleären Extrakten

Für die Herstellung von nukleären Extrakten wurden 5x10⁶ MKN45-Zellen in Zellschalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät, für 24 h inkubiert und mit *H. pylori* G27 (MOI=100) für 16 h

infiziert. Daraufhin wurden die Schalen auf Eis gelegt und folgende Schritte erfolgten bei 4°C. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml Puffer A (niedrige Salz-Konzentration; 10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; frisch zugesetzt: 1 mM Na₃VO₄; 1 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail Tablette) beschichtet. Daraufhin wurden sie mit einem Zellschaber von der Kulturschale entfernt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit sollte aufgrund des osmotischen Gradienten und des dadurch einströmenden Wassers in die Zellen hinein eine hypotonische Lyse der Plasmamembran stattfinden, so dass das Zytosol und die Zellkerne freigesetzt wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension 20 Mal auf und ab pipettiert, um damit die Lyse zu verstärken. Durch Zentrifugation für 5 min bei 7000 rpm bei 4°C wurde das Zytosol (im Überstand) von den Zellkernen (im Pellet) getrennt. Das Pellet wurde in 150 µl Puffer B (hohe Salz-Konzentration; 20 mM HEPES pH 7,9; 25% (v/v) Glycerol; 420 mM NaCl; 0,2 mM EDTA pH 8,0; frisch zugesetzt: 1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail Tablette) resuspendiert und für 45 min auf Eis bei mehrmaligem Durchmischen mit Hilfe eines Vortexgerätes (alle 2 min) inkubiert. Hierdurch sollte die Kernmembran zerstört werden. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei einer maximalen Geschwindigkeit und bei 4°C enthielt man Kernextrakt im Überstand und Zellreste im Pellet. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 150 µl Puffer D+ (20 mM HEPES pH 7,9; 20% Glycerol; 100 mM KCl; 0,05 mM EDTA; 1% (v/v) NP40; frisch zugesetzt: 1 mM Na₃VO₄; 1 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail Tablette) in einem Verhältnis 1:1 gemischt. Davon wurden 50 µl Aliquots erstellt und bei -80°C eingefroren.

2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce BCA *Protein Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen Proteinnachweis mit Hilfe von Kupfersulfat und Bicinchoninsäure (BCA). In alkalischer Umgebung werden Cu²⁺-Ionen durch Bindung an Proteine zu Cu¹⁺ reduziert. Die Cu¹⁺-Ionen bilden mit je zwei BCA-Molekülen Chelate und es entsteht dabei ein violetter, wasserlöslicher Komplex, dessen Absorption bei 570 nm gemessen werden kann. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde Reagenz A mit Reagenz B in einem Verhältnis von 1:50 zusammen gemischt. Davon wurden je 200 µl pro Vertiefung einer 96-Lochplatte vorgelegt und mit 10 µl Proteinlysate (verdünnt mit dH₂O 1:5) bzw. des BSA-Standards versetzt. Alle Ansätze wurden in Duplikaten durchgeführt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Intensität

der Färbung bei einer Absorption von 570 nm in dem Mikrotiterplatten-Messgerät Precision (Molecular Devices GmbH) bestimmt.

2.2.5.4 Vorbereitung der Proteinproben für Gel-Elektrophorese

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proteinlysate mit dH₂O auf die gewünschte Konzentration verdünnt und mit 5x SDS-Proteinladepuffer (62,5 mM Tris-Base pH >10, 10% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerol; 5% (v/v) β -Mercaptoethanol; Bromphenolblau) in einem Verhältnis von 5:1 vermischt. Nach darauffolgender Denaturierung bei 99°C für 7 min und kurzer Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT, wurden die Proteinproben bis zur Verwendung entweder bei -20°C gelagert, oder gleich auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen.

2.2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierfür wurden 1 mm dicke vertikale SDS-Polyacrylamid-Gele bestehend aus einem 4%-igen Sammelgel und 10 bzw. 15 %-igen Trenngel verwendet. Zur Herstellung von Gelen, sowie für die Gel-Elektrophorese wurde eine Gel-Elektrophoreseapparatur (*Mini-Protean Tetra Cell*) der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet. Die einzelnen Komponenten zur Herstellung von diesen Gelen sind in Tabelle 2.18 dargestellt.

Tabelle 2.18 Komponenten zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gele Die Volumina beziehen sich auf die Herstellung eines 10 cm x 7,5 cm großen Gels einer Breite von 1 mm.

Komponente	Trenngel		4% Sammelgel
	10%	15%	
dH ₂ O	3,29 ml	1,89 ml	1,53 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,1 ml	2,1 ml	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8			625 μ l
Acrylamid 30%	2,8 ml	4,2 ml	333 μ l
SDS w/v 10 %	83 μ l	83 μ l	25 μ l
APS w/v 10 %	42 μ l	42 μ l	12,5 μ l
TEMED	2,8 μ l	2,8 μ l	2,5 μ l

Die zu analysierenden Proteinproben wurden nach Vorbereitung (vgl. 2.2.5.4) auf ein entsprechendes Gel aufgetragen. Als Protein-Massenstandard diente *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* der Firma Promega GmbH. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 0,1% (w/v) SDS) gefüllten Gel-Elektrophoreseapparatur (s.o.) bei einer Stromstärke von konstant 25-30 mA.

2.2.5.6 Westernblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben erfolgte die Westernblot-Analyse. Hier werden die aufgetrennten Proteine durch das Anlegen einer Spannung aus dem Elektrophorese-Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Mittels spezifischer primärer und passender Meerrettichperoxidase-konjugierten, sekundärer Antikörper werden die zu untersuchenden Proteine sichtbar gemacht.

Zum Proteintransfer wurde eine Westernblotapparatur (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*) der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet. Hierzu wurde in einer mit Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 20% Methanol (v/v)) befüllten Wanne eine zur Westernblotapparatur gehörende, aufklappbare Kassette gelegt. Auf die schwarze Seite der Kassette wurde ein mit Transferpuffer angefeuchteter Schwamm platziert gefolgt von 3 Filterpapieren. Auf diese wurde das proteinhaltige Gel gelegt und auf das Gel wurde eine mit Transferpuffer benetzte Nitrozellulosemembran gelegt. Der Stapel (*blot sandwich*) wurde erneut mit 3 Lagen feuchtem Filterpapier und zuletzt einem feuchten Schwamm belegt. Die Kassette wurde geschlossen und in ein Elektrodengestell eingeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die schwarze Seite der Kassette zur schwarzen Seite (Kathode) des Gestells ausgerichtet war und somit die negativ geladenen Proteine von der Kathode zur Anode (vom Gel auf die Nitrozellulosemembran) transferiert werden konnten. Das Elektrodengestell wurde dann in eine mit Transferpuffer befüllten und mit einem Eis-Akku ausgestatteten Kammer gesetzt. Der Transfer erfolgte 1 h bei einer Stromstärke von konstant 400 mA.

Nach dem Transfer wurde die Membran entnommen und in einer Blockierungslösung unter Schwenken für 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungstellen zu sättigen. Die Art der Blockierungslösung wurde je nach den Empfehlungen des Herstellers des verwendeten primären Antikörpers sowie nach persönlichen Erfahrungen gewählt. Für die Detektion von β -Aktin, FAK und P-FAK wurde die Membran in einer Milch-T-PBS-Blockierungslösung (5% (w/v) Milch, 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS) inkubiert. Für alle anderen, in Tabelle 2.7 aufgelisteten, primären Antikörper wurde eine BSA-T-PBS Blockierungslösung (5% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS) gewählt. Anschließend wurde die Blockierungslösung

entfernt und die Membran mit primärem Antikörper beschichtet, welcher in der entsprechenden, oben beschriebenen Blockierungslösung verdünnt war. Die entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 2.7 angegeben. Es folgte eine Inkubation auf dem Schüttler über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit T-PBS (0,1% (v/v) Tween 20 in PBS) für je 15 min entfernt und die Membran wurde bei RT, für 1 h in einer Lösung mit Meerrettichperoxidase gekoppeltem sekundären Antikörper (Tabelle 2.7) inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde in der gleichen Blockierungslösung wie der primäre Antikörper in einem Verhältnis von 1:5000 verdünnt. Anschließend wurde die Membran erneut drei Mal gewaschen und die Proteine wurden wie unter 2.2.5.6.1 beschrieben visualisiert.

2.2.5.6.1 Visualisierung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Detektion der Proteine auf den Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels des ECL *Westernblotting Detections Reagents* der Firma GE Healthcare Limited. Dieses System beruht darauf, dass die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase das in den ECL-Reagenzien enthaltene Luminol oxidiert. Dieses emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 428 nm, welches auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Zur Detektion wurde ECL-Reagenz A mit der ECL-Reagenz B in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Die Membran wurde mit der Proteinseite nach unten in dieses Reagenz gelegt und für 2 min inkubiert. Danach wurde die Membran in eine Röntgenfilmkassette hineingelegt, mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt und auf diese wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm gelegt. Je nach nachzuweisendem Protein und verwendetem Antikörper wurde der Film 0,5-5 min exponiert und schließlich in einer Röntgenfilmentwicklungsmaschine (Hyper Processor SRX-101A, Amersham Biosciences Europe GmbH) entwickelt.

2.2.5.6.2 Quantifizierung der Proteinbanden

Die auf den Röntgenfilmen sichtbaren Proteinbanden wurden mit einem Scanner digitalisiert und mittels ImageJ-Programme densitometrisch quantifiziert. Die erhaltenen Werte der einzelnen Proteinbanden wurden durch die entsprechenden Hsp90- bzw. β -Aktin-Werte (Ladekontrolle) dividiert. Die Resultate wurden in Bezug zur uninfizierten Kontrolle gesetzt. Aus drei Experimenten wurde ein Mittelwert \pm Standardfehler ermittelt.

2.2.5.7 Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel mittels Silberfärbung

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Diese Methode ist aufgrund ihrer hohen Sensitivität zur Detektion von geringen Proteinmengen (Nachweisgrenze etwa 10 ng) sehr gut geeignet. Hierbei binden Silberionen (Ag^+) an die negativ geladenen Proteine. Durch reduzierenden Agenzien wie alkalisches Formaldehyd oder Natriumthiosulfat werden die gebundenen Silberionen zu elementarem Silber (Ag) reduziert und somit erscheinen die Proteine schwarz gefärbt.

Hierfür wurden die SDS-Gele zwei Mal hintereinander für jeweils 30 min in Fixierlösung (25% (v/v) Methanol; 12 % (v/v) wasserfreie Essigsäure; 0,05 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert und anschließend drei Mal für jeweils 20 min in 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Daraufhin wurden die Gele für 1 min in Sensibilisierungslösung (0,05% (w/v) Natriumthiosulfat) geschwenkt und anschließend einmal für wenige Sekunden im dH_2O gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Gele für 20 min in Silbernitratlösung (0,38% w/v Silbernitrat; 0,075% (v/v) Formaldehyd) inkubiert und das überschüssige Silber durch kurzes, einmaliges Waschen in dH_2O entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Gele bis zum Erreichen der gewünschten Farbtintensität (1-10 min) in Entwicklerlösung (6% (w/v) Natriumcarbonat; 2,5% (v/v) Sensibilisierungslösung; 0,05% (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Die Farbreaktion wurde dann durch Inkubation für 10 min in der Stopplösung (50% (v/v) Methanol; 12% (v/v) wasserfreie Essigsäure) beendet. Die gefärbten Gele wurden auf eine saubere Plastikfolie gelegt, die Proteinbanden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 25 μl Wasser pipettiert um das Austrocknen des Gelstücks zu verhindern. Die Proben wurden bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5.8 Massenspektrometrische Analyse

Die Probenaufbereitung für die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Massenspektrometrie (MS) mit Flugzeitanalysator (engl. time of flight, TOF), sowie die Analyse und Auswertung wurde durch die Research Unit for Protein Science (PROT) – Core Facility Proteomics im Helmholtz Zentrum, München durchgeführt.

2.2.5.9 Ko-Immunopräzipitation

Diese Methode dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Für den Nachweis von Caveolin-1-Interaktionspartnern während einer *H. pylori*-Infektion wurden 4×10^6 von AGS/Cav1- bzw. AGS/LV-Zellen pro 10 cm Schale ausgesät und für 24 h inkubiert. Am

nächsten Tag erfolgte die Infektion mit *H. pylori* G27 WT (MOI=100) für 16 h. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal mit warmen PBS gewaschen, mit 1 ml MES-Lysepuffer (25 mM MES pH 6,5; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; frisch zugesetzt: 1 mM Na₃VO₄; 1 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail Tablette) bedeckt und durch anschließende Inkubation für 15 min bei RT lysiert. Hiermit sollte Caveolin-1 auch von den Zellmembranen effektiv gelöst werden, was bei 4°C nicht möglich ist [152]. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale entfernt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mehrere Male auf und ab pipettiert um die Zellyse zu vervollständigen. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C entfernt. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Davon wurden 100 µl als Ausgangsmaterial (*Input*) für die spätere Quantifizierung in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C aufbewahrt. Das restliche Protein wurde auf drei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Einem Aliquot wurde kein Antikörper zugesetzt (Negativkontrolle). Dem zweiten Aliquot wurden 25 µl des Caveolin-1-Antikörpers und dem dritten Aliquot wurden, je nachdem welcher Interaktionspartner untersucht werden sollte, 25 µl CagA- oder DLC1-spezifisches Antiserum zugegeben. Die Immunopräzipitation erfolgte über Nacht auf einem Rotator bei 4°C. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 25 µl Protein A/G PLUS-Agarose zugegeben und die Ansätze auf einem Rotator bei 4°C für 2 h inkubiert. Die gebildeten Agarose/Antikörper/Protein-Komplexe wurden bei 5000 rpm, 4°C für 1 min pelletiert und drei Mal mit MES-Waschpuffer (25 mM MES pH 6,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Triton X-100, frisch zugesetzt: 1 mM Na₃VO₄; 1 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail Tablette) gewaschen. Jeder Waschgang bestand aus der Zugabe von 1 ml des MES-Waschpuffers, einem kurzen manuellen Schwenken und einer darauffolgenden Zentrifugation bei 5000 rpm 4°C für 1 min. Zur Elution der Protein/Protein-Komplexe von der Agarose wurden zu jedem Ansatz 50 µl 100 µM Glycin gegeben und die Ansätze für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteinproben durch Zugabe von 10 µl Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8) neutralisiert und bei 5000 rpm und 4°C für 1 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 14 µl 5x SDS-Proteinladepuffer vermischt. Dem *Input* wurden 20 µl 5x SDS-Proteinladepuffer zugesetzt. Die Proteinproben wurden bei 99°C für 7 min aufgekocht und auf ein 10%-iges oder 15%-iges SDS-Gel geladen.

2.2.5.10 Pull down

Die Untersuchung der Aktivität von RhoA, Rac1 und Cdc42 erfolgte mittels des RhoA/Rac1/Cdc42 *Activation Assay Combo Kits* der Firma Cell Biolabs Inc. Diese Methode

basiert auf der Verwendung von Agarosekügelchen, die an die Rho-Bindungs-Domäne (RBD) von Rhotekin oder an die p21-Bindungs-Domäne (PBD) der p21-aktivierten Kinase (PAK) gekoppelt sind. Ist in der Proteinprobe aktives RhoA vorhanden, bindet es an Rhotekin-RBD, während aktives Cdc42 sowie Rac1 an PAK-PBD binden. Somit kann man diese aus der Probe isolieren und anschließend mittels Westernblot detektieren. Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden 4×10^6 AGS/EV- bzw. AGS/Cav1-Zellen in eine 10 cm Schalen ausgesät (insgesamt drei Schale pro Zelltyp), für 24 h inkubiert und anschließend mit *H. pylori* G27 (MOI=100) für 16 h infiziert. Die Schalen wurden auf Eis gestellt und alle darauffolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit je 1 ml 1x Assay/Lysis Puffer (frisch zugegeben: 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, Protease Inhibitor Cocktail Tablette) beschichtet und für 15 min inkubiert um damit die Zelllyse durchzuführen. Im Folgenden wurden die Zellen von der Schale mit einem Zellschaber entfernt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und einige Male auf und ab pipettiert, um die Zelllyse zu vervollständigen. Durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min wurde das Lysat von den Zelltrümmern getrennt und der proteinhaltige Überstand wurde in je einem 15 ml Zentrifugationsgefäß vereinigt. Anschließend wurde in den Proben wie unter 2.2.5.3 beschrieben die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit 1x Assay/Lysis Puffer auf 0,5 mg/ml eingestellt. Davon wurde zweimal je 1 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zusätzlich wurden 50 μl des jeweiligen Lysats als Ausgangsmaterialkontrolle (*Input*) in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Zu einem Teil der Aliquots wurden 40 μl Rhotekin-RBD-Agarose zugegeben, zum anderen Teil 40 μl PAK-PBD-Agarose. Anschließend wurden die Ansätze für 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Die gebildeten Protein-Rhotekin-RBD- und Protein-PAK-PBD-Komplexe wurden bei 13.000 rpm und 4°C für 1 min zentrifugiert und drei Mal mit 1x Assay/Lysis Puffer gewaschen. Jeder Waschschrift bestand aus der Zugabe von 500 μl 1x Assay/Lysis Puffer, dreimaligem vertikalen Schwenken und einer Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 10 s. Anschließend wurden die gebundenen aktiven RhoA-, Cdc42- und Rac1-Proteine durch Zugabe von 40 μl 2x SDS-Proteinladepuffer, Aufkochen bei 99°C für 5 min und darauffolgender Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT von der Agarose eluiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Der Input wurde mit 5 μl 5x SDS-Proteinladepuffer vereint und ebenfalls bei 99°C für 5 min erhitzt. Die erhaltenen Eluate sowie der *Input* wurden im 15%-igen SDS-Gel separiert (vgl. 2.2.5.5) und wie unter 2.2.5.6 beschrieben mittels anti-RhoA-, anti-Rac1- und anti-Cdc42-Antikörpern detektiert.

2.2.6 Histologische Methoden

2.2.6.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wurde das zu analysierende Gewebe in einer Gewebeentwässerungsanlage (ASP300S, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH) entwässert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet. Mittels eines Rotationsmikrotoms (RM2145, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH) wurden Gewebeschnitte einer Stärke von 3 µm angefertigt. Diese wurden zuerst im Wasserbad bei 45°C für etwa 5 min gestreckt und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Nach vollständigem Trocknen bei RT über Nacht wurden die Gewebeschnitte bis zur Verwendung in dazu vorgesehenen Objektträgerkassetten bei RT aufbewahrt.

2.2.6.2 Vorbereitung von Paraffinschnitten für eine Färbung

Vor der Färbung musste zuerst das Paraffin aus dem Gewebe entfernt werden. Dieses wurde durch eine zweimalige nacheinander folgende Inkubation für jeweils 3 min in Histoclear durchgeführt. Folgend wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (je 3 min pro Schritt) rehydratisiert. Die Rehydratisierung bestand aus je zweimaliger, hintereinander folgender Inkubation für 3 min (pro Stufe) in 100%-igem Ethanol, dann 96%-igem Ethanol und schließlich 70%-igem Ethanol. Danach wurden die Schnitte in dH₂O für 2 min inkubiert.

2.2.6.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Nach der Rehydratisierung wurden die Schnitte für 7 s in Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophile Strukturen und somit erscheinen insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA blau. Durch die darauffolgende Inkubation der Schnitte für 10 min unter fließendem Leitungswasser, auch „Bläuen“ genannt, wurden einerseits die Reste des Hämatoxylins entfernt, andererseits wurde die Intensität der blauen Farbe verstärkt. Es folgte eine Gegenfärbung für 5 min in Eosin-Lösung. Dieser Farbstoff färbt alle acidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen rot und so erscheint vor allem das Zytoplasma mit den darin enthaltenen Proteinen rot. Nach der Färbung erfolgte nacheinander eine Inkubation für 25 s in 100%-igem Isopropanol, für 25 s in 96%-igem Ethanol und zwei Mal für 3 min in Histoclear. Anschließend wurden die Färbepreparate mit Pertex beschichtet und mit einem Deckglass (22 x 50 mm) bedeckt.

2.2.6.4 Immunhistochemische Färbung von F4/80 positiven Makrophagen

Vor der Färbung wurden die Schnitte entparaffinisiert und rehydratisiert wie in 2.2.6.2 beschrieben. Da die Fixierung mit Paraformaldehyd im Gewebe zur Proteinquervernetzung führt, sind für Antikörper viele Epitope nicht mehr zugänglich und müssen durch geeignete Behandlung des Gewebes zugänglich gemacht werden. Die Art der Behandlung ist sowohl Antigen als auch Antikörper abhängig. Hier wurde eine proteolytische Antigendemaskierung durchgeführt in dem man die Schnitte für 15 min in einer Lösung bestehend aus 20 µg/ml Proteinase K in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 inkubiert hat. Folgend wurden die Schnitte zwei Mal mit dH₂O gewaschen und anschließend in Wasserstoffperoxidlösung (3% (v/v) H₂O₂ in PBS) für 15 min bei RT inkubiert. Hierdurch sollte die endogene Peroxidase geblockt werden, die sonst zu einer unspezifischen Färbung führen könnte. Danach wurden die Präparate einmal mit dH₂O, und zweimal mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden mit je einem speziellen Kunststoffansatz (*Shandon coverplate*, Thermo Fisher Scientific) bedeckt und so in einem Färbegestell (*Sequenza Slide Rack*, Ted Pella, Inc.) befestigt. Die nächsten Schritte erfolgten in diesem Färbegestell. Die unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurden durch Inkubation der Schnitte in 250 µl einer Blockierungslösung (5% µl Kaninchenserum, vier Tropfen Avidin; mit PBS aufgefüllt auf 1 ml) bedeckt. Die Blockierung erfolgte bei RT für 1 h. Folgend wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl F4/80-Antikörper-Lösung (10 µl anti-F4/80, 50 µl Kaninchenserum, 4 Tropfen Biotin; mit PBS aufgefüllt auf 1 ml) bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Präparate wurden in 250 µl sekundärer Antikörper-Lösung (2 µl *Biotinylated anti-rat* Antikörper, 50 µl Kaninchenserum; mit PBS aufgefüllt auf 1 ml) für 1 h bei RT inkubiert. 30 min nach der Antikörperzugabe, wurde eine ABC-Lösung nach Angaben des dazu verwendeten Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, 2,5 ml PBS, 1 Tropfen Reagenz A, 1 Tropfen Reagenz B) angesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Hier sollte ein Komplex bestehend aus Avidin und mehreren biotinylierten Meerrettichperoxidase-Molekülen gebildet werden. Aufgrund der starken Affinität von Avidin zu Biotin bindet dieser Avidin-Meerrettichperoxidase-Komplex an das am sekundären Antikörper vorhandene Biotin. Somit kann eine große Menge von Peroxidase an den sekundären Antikörper gebunden werden, was später in einer höheren Sensitivität der Färbung resultiert. Im Folgenden wurden die Präparate dreimal mit dH₂O gewaschen, aus dem Färbegestell genommen und die Kunststoffansätze entfernt. Die Färbung wurde sichtbar gemacht indem die Schnitte mit frisch angesetzter DAB-Lösung (2,5 ml dH₂O, 1 Tropfen Puffer-Stock, 1 Tropfen Wasserstoffperoxid-Lösung, 2 Tropfen Diaminobenzidin Substrat) bedeckt und für etwa 2

min bei RT inkubiert wurden. Dabei wird das Chromogen Diaminobenzidin durch die Meerrettichperoxidasen in ein braungefärbtes Endprodukt umgewandelt. Somit erscheinen die Stellen an die der primäre und der sekundäre Antikörper gebunden haben braun gefärbt. Die Reaktion wurde durch eine zweiminütige Inkubation in dH₂O gestoppt. Daraufhin erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10 s und Bläuen unter fließendem Wasser für 10 min. Die Präparate wurden in einer aufsteigender Ethanolreihe (2 x 3min 70% Ethanol, 2 x 3 min 96% Ethanol, 2 x 3 min 100% Ethanol) dehydriert und zwei Mal hintereinander für je 3 min in Histoclear inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Pertex beschichtet und mit einem Deckglass (22 x 50 mm) bedeckt.

2.2.7 Bioinformatische Methoden

2.2.7.1 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Daten stammen von 15 Mäusen pro Genotyp oder von drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Zellpassagen. Die statistische Auswertung erfolgte meist mit dem Student t Test. Zur statistischen Auswertung der Daten in Anhangstabelle 1 wurde der *Fisher Exact* Test angewendet. Als statistisch signifikant wurden P-Werte von $<0,05$ bezeichnet.

2.2.7.2 Datenbankrecherche

Zur Recherche sowie Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen wurden folgende Datenbanken verwendet:

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

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

3 Ergebnisse

3.1 Die Funktion des Caveolin-1 in der *H. pylori*-induzierten Magenentzündung *in vivo*

Um zu untersuchen, welche Rolle Caveolin-1 in einer *H. pylori*-Infektion spielt, wurden B6129 WT- und Cav1-KO-Mäuse mit dem mausadaptierten *H. pylori* SS1-Stamm wie unter 2.2.2.5 beschrieben infiziert. Kontrollmäuse erhielten keine Bakterien. Nach 11 Monaten wurden alle Mäuse getötet und die Mägen wurden entnommen (vgl. 2.2.3.1). Die Infektionsdauer bezog sich auf Literaturangaben, wonach die infizierten Mäuse in dieser Zeit eine chronische Entzündung entwickeln sollten [110].

Von jedem Magen wurde ein Streifen im Bereich des Antrums abgeschnitten und in zwei Teile geteilt. Ein Teil des Magens wurde zur Bestimmung von lebenden Bakterien verwendet (vgl. 2.2.2.7) und der zweite Teil diente zur Extraktion der Gesamt-RNA (vgl. 2.2.4.3.1). Der restliche Magen wurde in Paraffin eingebettet und diente zur Präparation histologischer Schnitte (vgl. 2.2.6.1).

Die Anzahl an Kolonie-bildenden *H. pylori* SS1, die aus dem Magen infizierter Cav1-KO-Mäusen reisoliert wurden, betrug $1,6 \times 10^3 \pm 0,5$ CFU (siehe Abbildung 3.1) und war damit im Vergleich zu WT-Mäusen ($7,3 \times 10^3 \pm 2,4$) signifikant reduziert.

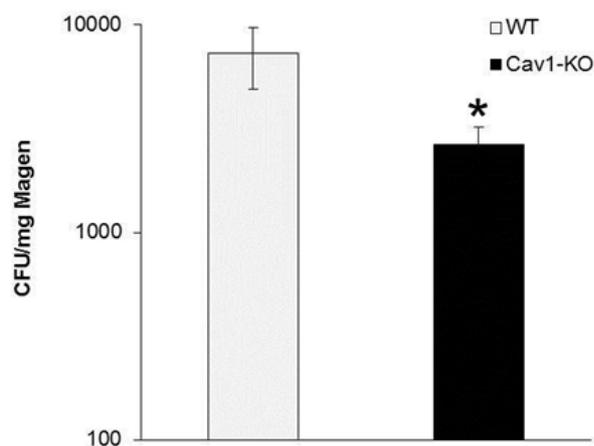


Abbildung 3.1 Geringe *H. pylori*-Kolonisierung in Cav1-KO-Mäusen. WT- und Cav1-KO-Mäuse wurden mit dem mausadaptierten Stamm *H. pylori* SS1 oral infiziert. 11 Monate nach der Infektion wurde *H. pylori* aus dem Magengewebe reisoliert. Die Daten stellen Mittelwerte von *H. pylori* SS1 colony forming units (CFU) pro mg Magengewebe \pm Standardfehler dar. Pro Genotyp wurden 15 Tiere (n=15) untersucht. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

Die histologische Analyse anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Magenschnitten ergab, dass sowohl WT- als auch Cav1-KO-Mäuse eine chronische Gastritis entwickelt hatten, da mononukleäre Zellen die Magenmukosa infiltriert hatten (Abbildung 3.2 A, B, C, D, E, F).

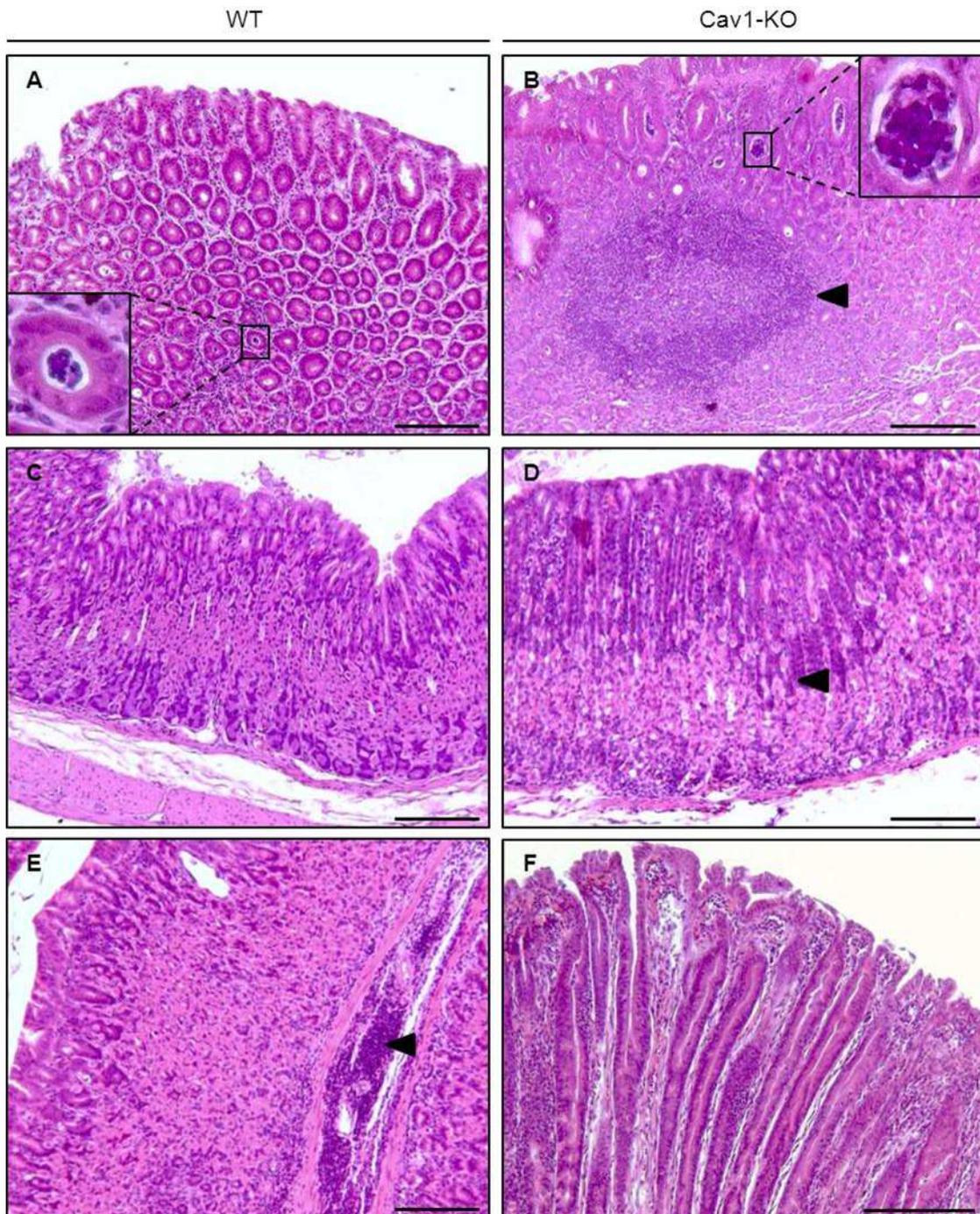


Abbildung 3.2 Histologische Analyse von WT- und Cav1-KO-Mäusen 11 Monate nach der *H. pylori* SS1-Infektion. Mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbte Magenmukosa von infizierten WT- (rechts) und Cav1-KO-Mäusen (links). **A, B:** Aktive, chronische Gastritis mit polymorphonukleären Neutrophilen (Zoom), B-Zell-Follikel (B, Pfeil) **C:** Gesunde Magenmukosa. **D:** Örtlicher Verlust von Parietalzellen (Pfeil). **E:** Deutliche submukosale Infiltration von Immunzellen (Pfeil). **F:** Verstärkte foveoläre Hyperplasie. Der Maßstabsbalken entspricht 150 µm (A-E) und 100 µm (F).

Aufgrund des Vorhandenseins von polymorphonukleären Neutrophilen (Abbildung 3.2 A, B Zoom), handelte es sich bei beiden Maus-Genotypen um eine aktive chronische Gastritis. Darüber hinaus wurde in der Magenmukosa von Cav1-KO-Mäusen eine erhöhte Präsenz von intramukosalen B-Zell-Follikel-ähnlichen Aggregaten (Abbildung 3.2 B) sowie pathologische Veränderungen wie ein örtlicher Verlust von Parietalzellen (Abbildung 3.2 D) und eine verstärkte foveoläre Hyperplasie (Abbildung 3.2 F) beobachtet. WT-Mäuse zeigten zwar zum Teil eine verstärkte submukosale Infiltration von Immunzellen (Abbildung 3.2 E), die Gewebeveränderungen waren jedoch nicht so deutlich wie in Cav1-KO-Mäusen.

Die HE-gefärbten Magenpräparate wurden von mehreren Pathologen beurteilt und anhand der Ergebnisse wurde eine Entzündungsskala zwischen 0 und 3 festgelegt. Hierbei galt: 0=keine, 1=geringgradige, 2=mittelgradige und 3=schwergradige chronische Gastritis. In Abbildung 3.3 und Anhangtabelle 7.1 sind die pathologischen Befunde zusammengefasst. Wie man hier sehen kann, betrug der durchschnittliche Gastritisgrad von Cav1-KO-Mäusen $1,7 \pm 0,1$; was einer mittelgradigen Gastritis entspricht (Abbildung 3.3). Der durchschnittliche Gastritisgrad von WT-Mäusen wies dagegen einen Wert von $0,7 \pm 0,2$ auf. Somit handelte es sich hier um eine geringgradige Gastritis.

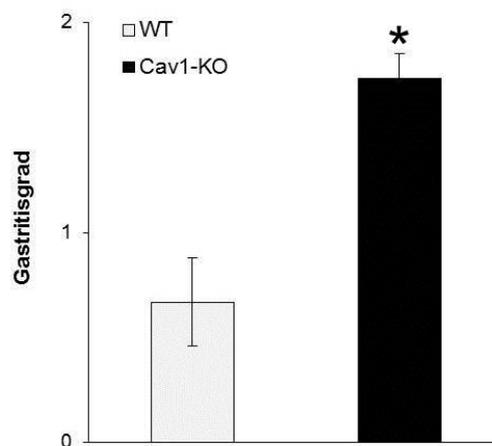


Abbildung 3.3 Cav1-KO-Mäuse zeigten nach Infektion mit *H. pylori* SS1 eine stärkere Gastritis.

Quantitative Gastritis-Analyse der Magenschleimhaut von WT- und Cav1-KO-Mäusen 11 Monate nach der *H. pylori* SS1-Infektion. Gastritisskala: 0=keine, 1=geringe, 2=mäßige, 3=starke. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardfehler dar. Pro Genotyp wurden 15 Tiere ($n=15$) analysiert. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

Um den Charakter des Entzündungsinfiltrats und der damit verbundenen Immunantwort in der Magenmukosa von Cav1-KO- und WT-Mäusen näher bestimmen zu können, wurde die Expression ausgesuchter, in Tabelle 3.1 zusammengefasster Zytokine, Chemokine sowie

Oberflächenmarker von Immunzellen mittels quantitativer RT-PCR (RT-qPCR, vgl. 2.2.4.9) analysiert und mit uninfizierten Kontrollmäusen verglichen.

Tabelle 3.1 Überblick von mittels RT-qPCR quantifizierter Zytokine, Chemokine und Oberflächenmarker in Proben aus dem Magen infizierter bzw. uninfizierter WT- und Cav1-KO-Mäuse.

Zytokin/ Chemokin/ Oberflächenmarker	Gen	Produzierende Zellen/Funktion	Literatur
IFN γ	<i>Ifng</i>	Wird durch aktivierte T-Zellen und natürliche Killer-Zellen produziert. Aktiviert Makrophagen, hemmt T _H 2-Zellen.	[82, 183, 184]
TNF α	<i>Tnfa</i>	Wird von aktivierten Makrophagen, natürlichen Killer-Zellen und T-Zellen produziert. Bewirkt lokale Entzündung und Endothelaktivierung.	[82]
CCL5 (RANTES)	<i>Ccl5</i>	Wird vom Magenepithel exprimiert. Chemischer Lockstoff von Monozyten, T-Zellen, Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten. Diese Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung ebenfalls CCL5.	[85, 185-187]
CXCL1 (GRO α)	<i>Cxcl1</i>	Wird von Magenepithel exprimiert. Dient zur Rekrutierung von Neutrophilen.	[82, 188]
CD4	<i>Cd4</i>	Oberflächenmarker von T-Zellen.	[82]
CD19	<i>Cd19</i>	Oberflächenmarker von B-Zellen.	[82]
CD86	<i>Cd86</i>	Kostimulatorisches Molekül zur Aktivierung von T-Zellen. Es wird auf antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert.	[82, 189]
CD25	<i>Cd25</i>	Wird konstitutiv in einer hoher Menge in CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen exprimiert.	[190]

Die Infektion mit *H. pylori* SS1 führte zu einer verstärkten Expression von *Ifng* in beiden Maus-Genotypen (Abbildung 3.4). Diese betrug in infizierten Cav1-KO-Mäusen einen Wert von $4,0 \pm 1,0$ und in WT-Mäusen $3,7 \pm 0,9$. Ähnlich wurde in beiden infizierten Mäusen ein Anstieg von *Tnfa* mRNA beobachtet, welche in infizierten Cav1-KO-Mäusen einen Wert von $1,4 \pm 0,1$ und in infizierten WT-Mäusen einen Wert von $1,7 \pm 0,5$ aufwies. Auffällig war, dass infizierte Cav1-KO-Mäuse eine deutlich höhere Expressionsrate ($3,3 \pm 0,9$) von *Cd19* im Vergleich zu WT-Mäusen ($1,6 \pm 0,3$) aufwiesen. Das Chemokin *Ccl5* (*Rantes*) wurde in

infizierten Cav1-KO mit einem Wert von $2,1 \pm 0,6$ ebenfalls stärker als in infizierten WT-Mäusen ($1,3 \pm 0,2$) exprimiert. Die mRNA Expression von *Cxcl1* ist in beiden infizierten Cav1-KO- ($2,6 \pm 0,3$) und WT-Mäusen ($2,5 \pm 0,9$) zwar gestiegen, wies jedoch nahezu keine Unterschiede auf.

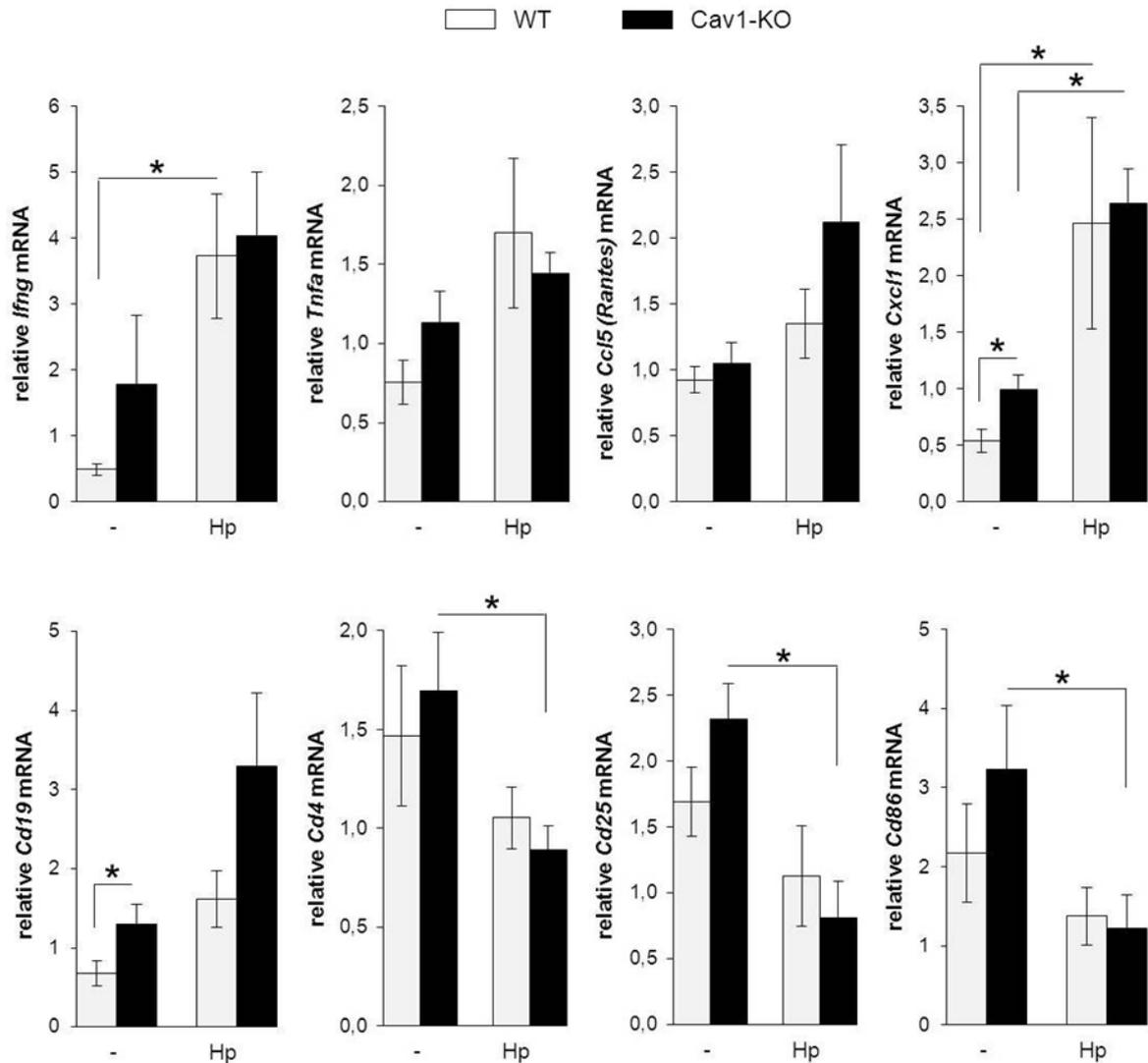


Abbildung 3.4: Expression von Zytokinen, Chemokinen und Oberflächenmarker von Immunzellen im Magen von WT- und Cav1-KO-Mäusen 11 Monate nach der Infektion mit *H. pylori* SS1. Aus infiziertem (Hp) bzw. uninfiziertem (-) Magengewebe wurde Gesamt-RNA extrahiert, die nach Umschreiben in cDNA zur Quantifizierung von *Ifng*, *Tnfa*, *Ccl5*, *Cxcl1*, *Cd19*, *Cd4*, *Cd25*, *CD86* mittels RT-qPCR diente. Erhaltene CT-Werte wurden mit $\beta 2$ -Mikroglobulin mRNA-Mengen ($\beta 2m$) normalisiert und sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Pro Genotyp wurden 15 Tiere ($n=15$) analysiert. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

Zudem führte die *H. pylori* SS1-Infektion zu einer Abnahme in der Expression von *Cd4*, *Cd25* und *Cd86* mRNA sowohl in WT- als auch in Cav1-KO-Mäusen. In infizierten Cav1-KO-

Mäusen war die Expression aller drei Gene im Vergleich zu uninfizierten Kontrollmäusen signifikant reduziert. Im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen wies sie jedoch keine signifikanten Unterschiede auf.

Makrophagen spielen während einer *H. pylori*-Infektion eine wichtige Rolle. Dabei sind sie nicht nur entscheidend für die Phagozytose und die damit verbundene Vernichtung des Bakteriums, sondern auch für die Regulation der adaptiven Immunantwort indem sie z.B. als antigenpräsentierende Zellen fungieren [189]. Im folgenden Experiment wurde die Infiltration von Makrophagen in die infizierte Magenmukosa anhand einer immunhistochemischen Färbung des für die Makrophagen charakteristischen Oberflächenmarkers F4/80 (vgl. 2.2.6.4) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Cav1-KO-Mäuse eine stärkere Präsenz von intramukosalen Makrophagen im Vergleich zu WT-Mäusen aufwiesen (Abbildung 3.5).

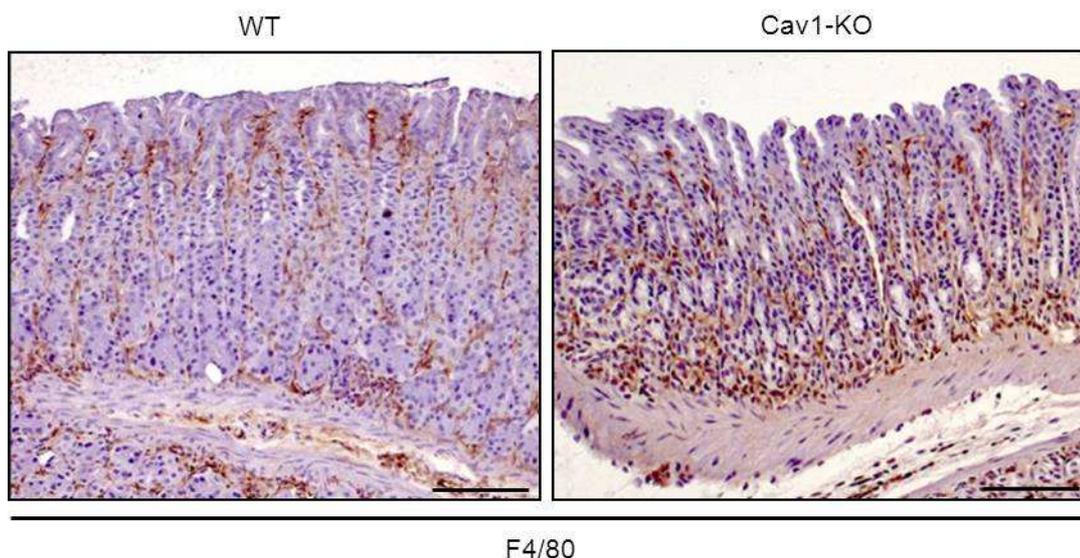


Abbildung 3.5 Verlust von Caveolin-1 fördert die Infiltration von F4/80-positiven Makrophagen ins *H. pylori*-infizierte Magengewebe. Immunhistologische Färbung von F4/80-positiven Makrophagen (braun) in Paraffinschnitten vom Magen *H. pylori* SS1-infizierter WT- (links) und Cav1-KO-Mäusen (rechts). Der Maßstabsbalken entspricht 150 μ m.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass der Verlust von Caveolin-1 mit einer stärker ausgeprägten chronischen Gastritis verbunden ist, welche durch eine erhöhte Infiltration von B-Zellen und Makrophagen in die Mukosa, sowie durch die Produktion von RANTES und verstärkten mukosalen Schäden begleitet ist, obwohl Caveolin-1-defiziente Mäuse eine niedrigere Kolonisierungsrate mit *H. pylori* aufwiesen.

3.2 Rolle von Caveolin-1 in *H. pylori*-induzierter Entzündung von Magenepithelzellen *in vitro*

Um die Bedeutung von Caveolin-1 in einer *H. pylori*-Infektion näher charakterisieren zu können, wurden Infektionsexperimente *in vitro* durchgeführt. Hierzu wurden als Infektionsmodell humane Magenadenokarzinom-Zellen (AGS) verwendet, welche mit einem Caveolin-1-Expressionsvektor (AGS/Cav1) oder einem leeren Vektor (AGS/LV) stabil transfiziert wurden und im Labor bereits etabliert waren [174]. Zudem wurde die Infektion in den meisten Experimenten mit dem zelladaptierten Stamm *H. pylori* G27 wt durchgeführt, der im Gegensatz zu *H. pylori* SS1 ein aktives CagA-Toxin (vgl. 1.5) produziert und es somit ermöglichte auch CagA-spezifische Effekte näher zu untersuchen.

3.2.1 Einfluss von Caveolin-1 auf das Zellüberleben während einer *H. pylori*-Infektion

Eine *H. pylori*-Infektion ist unter anderem mit zellulären Schäden und Apoptose verbunden [191, 192]. Caveolin-1 unterstützt das Überleben von Tumorzellen durch Aktivierung zahlreicher „Pro-Überlebens“ Signalwege [155, 193].

Um zu untersuchen, ob Caveolin-1 einen Einfluss auf das Zellüberleben während einer *H. pylori* Infektion hat, wurden AGS/Cav1- und AGS/LV-Zellen mit *H. pylori* G27 wt in verschiedenen *multiplicity of infection* (MOI) Verhältnissen für 48 h infiziert und die globale Überlebensrate wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, vgl.2.2.1.8) ermittelt. Die Überlebensrate sank mit steigender Anzahl von *H. pylori* G27 wt sowohl in Caveolin-1-defizienten als auch in Caveolin-1-exprimierenden Zellen (Abbildung 3.6 A). Diese wies jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zellklonen auf.

Ähnliche Ergebnisse ergaben Analysen der Aktivierung von ausgesuchten Proteinkinasen, die eine Rolle für das Überleben von Zellen spielen, z.B. die extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), die Proteinkinase B (PKB), die auch als Akt bezeichnet wird und die Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 [194-196]. Hierfür wurden AGS/Cav1- und AGS/LV-Zellen mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 0,5 h bis 48 h infiziert. Die gewonnenen Lysate (vgl. 2.2.5.1) wurden mittels 10%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und anschließend mit Westernblot (vgl. 2.2.5.6) analysiert. Dabei wurde unter der Verwendung von spezifischen Antikörpern nur die phosphorylierte und somit aktive Form der einzelnen Kinasen detektiert. Die Infektion mit *H. pylori* G27 wt führte in beiden AGS/Cav1- sowie AGS/LV-Zellen zur

Phosphorylierung von Akt, ERK 1/2, und p38 MAPK (Abbildung 3.6). Diese unterschied sich jedoch kaum zwischen Caveolin-1-negativen und -positiven Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass Caveolin-1 keine entscheidende Rolle bei der Förderung des Zellüberlebens während der *H. pylori*-Infektion spielte.

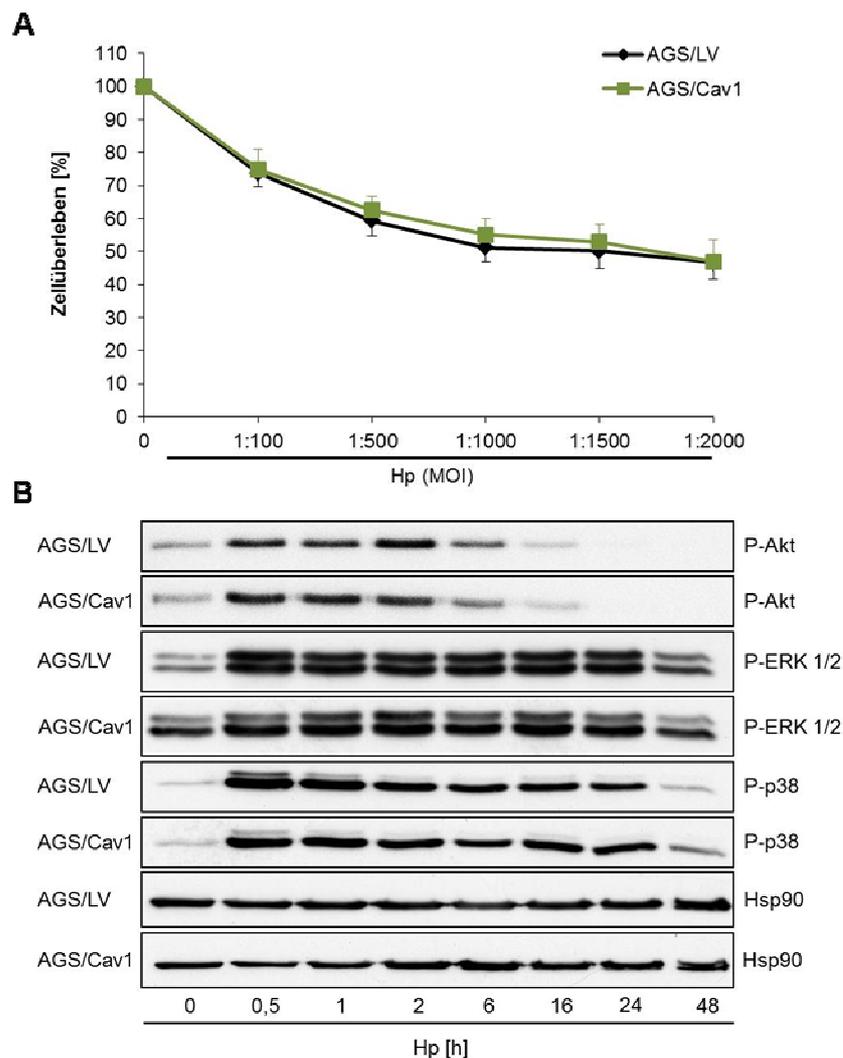
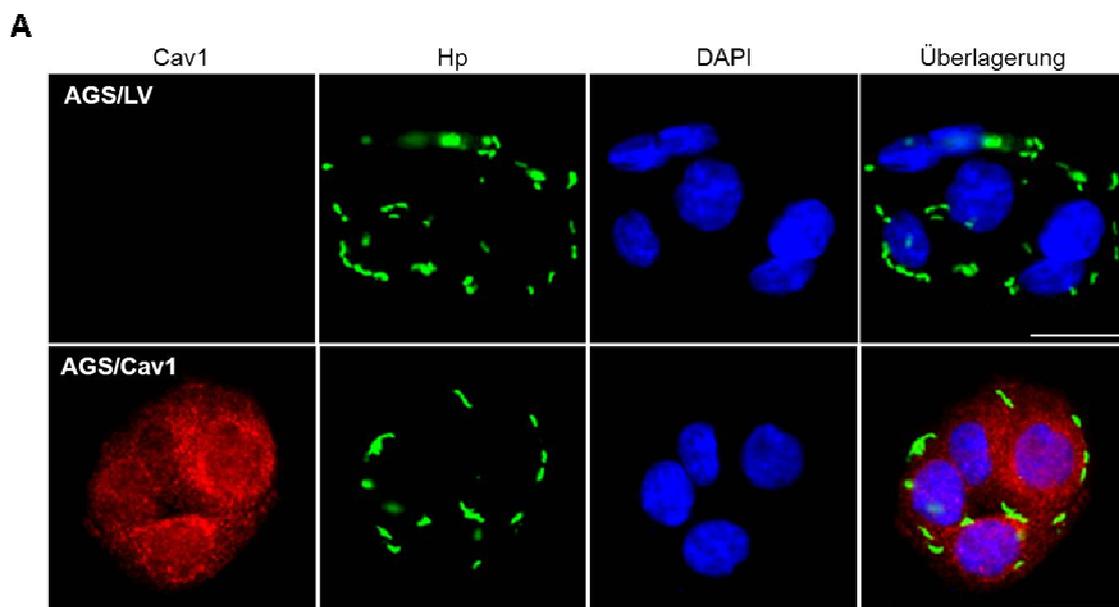


Abbildung 3.6 Caveolin-1 hat keinen Einfluss auf das Zellüberleben während der *H. pylori*-Infektion. **A:** Überlebensrate. AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt in MOI-Verhältnissen von 1:100 bis 1:2000 für 48 h infiziert. Die Zellüberlebensrate wurde anhand der Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) photometrisch ermittelt. Erhaltene Werte sind präsentiert als Prozent von lebenden Zellen \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten in Bezug auf die uninfizierte Kontrolle (100%). **B:** Westernblot-Analyse von „Überleben-fördernden Proteinen“ in Gesatzelllysaten von AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen, die mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 0,5 bis 48 h infiziert wurden. Die phosphorylierten (P-) Proteine Akt, ERK1/2, und p38 wurden mittels monoklonaler anti-P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-P-Akt (Ser473), anti-P-p38 (Thr180/Tyr182) Seren visualisiert. Als Ladekontrolle wurde Hsp90 mit polyklonalem anti-Hsp90 Serum detektiert.

3.2.2 Einfluss von Caveolin-1 auf die Adhäsion von *H. pylori* an humane Magenadenokarzinom-Zellen

Das VacA-Toxin von *H. pylori* wird in die Wirtszelle über *lipid rafts* internalisiert [197]. Caveolin-1 ist der Hauptbestandteil von Caveolen, welche eine Subklasse von *lipid rafts* darstellen [123]. Sowohl *lipid rafts* als auch Caveolen werden von Pathogenen wie *Pseudomonas aeruginosa* [198] und *Salmonella* Typhimurium [199] als direkte Eintrittsstelle in die Wirtszelle genutzt.

Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, ob in Anwesenheit von Caveolin-1 mehr oder weniger *H. pylori* an die Wirtszelle adhäreren. Hierzu wurden AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen wie unter 2.2.1.9.1 beschrieben mit *H. pylori* G27 wt (MOI=10) infiziert und *H. pylori* sowie Caveolin-1 wurden mit spezifischen Antikörpern gefärbt (vgl. 2.2.1.10.1). Die anschließende quantitative Analyse im Fluoreszenzmikroskop ergab, dass durchschnittlich $7,2 \pm 0,7$ *H. pylori* G27 wt-Bakterien pro Caveolin-1-exprimierende Zelle adhärerten (Abbildung 3.7 A, B). Eine ähnlich hohe Bakterienzahl ($7,6 \pm 0,8$) wurde pro Caveolin-1-defiziente Zelle ermittelt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Caveolin-1 keine wesentliche Rolle bei der Adhäsion von *H. pylori* an die Wirtszelle spielte.



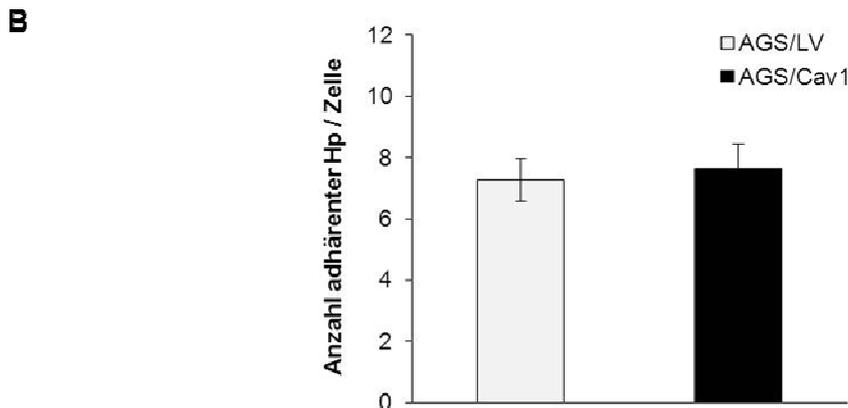


Abbildung 3.7 Caveolin-1 spielt keine Rolle bei der Adhäsion von *H. pylori* an humane Magenadenokarzinom-Zellen. AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=10) für 30 min infiziert, mittels Immunfluoreszenz gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. **A:** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von *H. pylori* G27 wt auf AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen: grün=*H. pylori*, rot=Caveolin-1 (Cav1), blau (DAPI)=Zellkern. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. **B:** Quantitative Auswertung adhärenter *H. pylori* pro AGS/LV- und AGS/Cav1-Zelle. Pro Experiment wurden 5 Sichtfelder mit mindestens 10 Zellen/pro Sichtfeld analysiert. Balken stellen Mittelwerte von adhärenenten Bakterien pro Zelle \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar.

3.2.3 Einfluss von Caveolin-1 auf CagA-induzierte IL-8 Sekretion in humanen Magenadenokarzinom-Zellen

Die Translokation des *H. pylori* Toxins CagA in das Magenepithel ist mit zahlreichen zellulären Veränderungen, darunter auch der Induktion der IL-8-Sekretion, verbunden [200]. IL-8 ist ein starker chemotaktischer Lockstoff für neutrophile Zellen und Initiator der Entzündungsreaktion [79]. Humane Magenadenokarzinom-Zellen AGS sind ein sehr gut geeignetes und oft verwendetes Infektionsmodell für IL-8 Analysen *in vitro* [201].

Um zu untersuchen, ob Caveolin-1 die Induktion von IL-8 während einer *H. pylori*-Infektion beeinflusst, wurden AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen mit dem zelladaptierten *H. pylori*-Stamm G27 wt für 6 h infiziert und anschließend die Gesamt-RNA extrahiert (vgl. 2.2.4.3.2), die dann nach dem Umschreiben in die cDNA (vgl. 2.2.4.5) zur RT-qPCR Analyse (vgl. 2.2.4.9) verwendet wurde. In infizierten AGS/Cav1-Zellen wurde die *IL-8* mRNA-Expression mit einem Wert von 19 ± 6 signifikant schwächer induziert als in infizierten AGS/LV-Zellen (64 ± 19) (Abbildung 3.8). Ähnlich wie die *in vivo* Versuche deutet dies darauf hin, dass Caveolin-1 eine gewisse Kontrolle über die Ausprägung einer *H. pylori*-induzierten Magenentzündung ausübt.

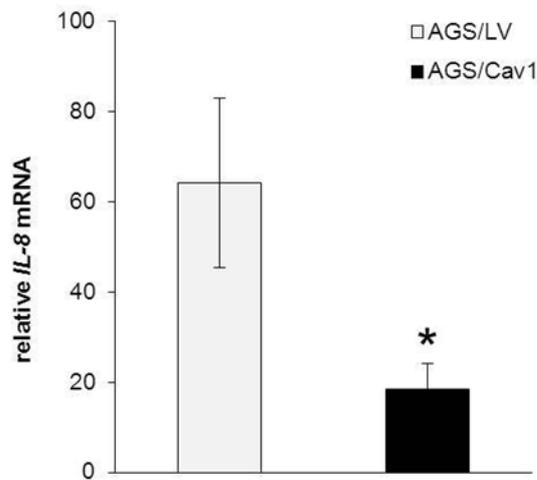


Abbildung 3.8 Caveolin-1 hemmt die durch *H. pylori*-induzierte Expression von *IL-8* in humanen Magenadenokarzinom-Zellen. AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 6 h infiziert und die Expression von *IL-8* mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Erhaltene *IL-8* CT-Werte wurden an die CT-Werte von β 2-Mikroglobulin (β 2M) normalisiert. Die Resultate sind als Mittelwerte \pm Standardfehler im Bezug zur uninfizierten Kontrolle, die gleich 1 gesetzt wurde (im Graph nicht angezeigt), dargestellt. Die Daten stammen von drei unabhängigen Experimenten. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

3.2.4 Einfluss von Caveolin-1 auf die CagA-induzierte Zellmorphologie „humming bird“

Ein charakteristischer morphologischer Phänotyp, der in humanen Magenadenokarzinom-Zellen AGS während einer *H. pylori* Infektion beobachtet wird, ist der so genannte *humming bird* Phänotyp [47]. Es handelt sich hier um die Bildung von langgestreckten, nadelähnlichen Fortsätzen, die als Folge der CagA-Translokation, -Phosphorylierung und der damit verbundenen Deregulation bestimmter Signalwege sowie der Umorganisation des Aktinzytoskeletts entstehen [46, 202].

Um zu untersuchen, ob Caveolin-1 eine Rolle bei der Entstehung des *humming bird* Phänotyps spielt, wurden AGS/LV- und AGS/Cav1- mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) wie unter 2.2.1.10.2 beschrieben für 16 h infiziert, mittels Immunofluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und anschließend in einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In beiden Zellklonen wurde die Bildung langgesteckter Fortsätze beobachtet (Abbildung 3.9 A, B). Dieser Phänotyp war jedoch in Caveolin-1-defizienten AGS-Zellen mit einem Wert von $11,4 \pm 0,8\%$ signifikant stärker ausgeprägt als in Caveolin-1-exprimierenden AGS-Zellen ($3,8 \pm 0,8\%$).

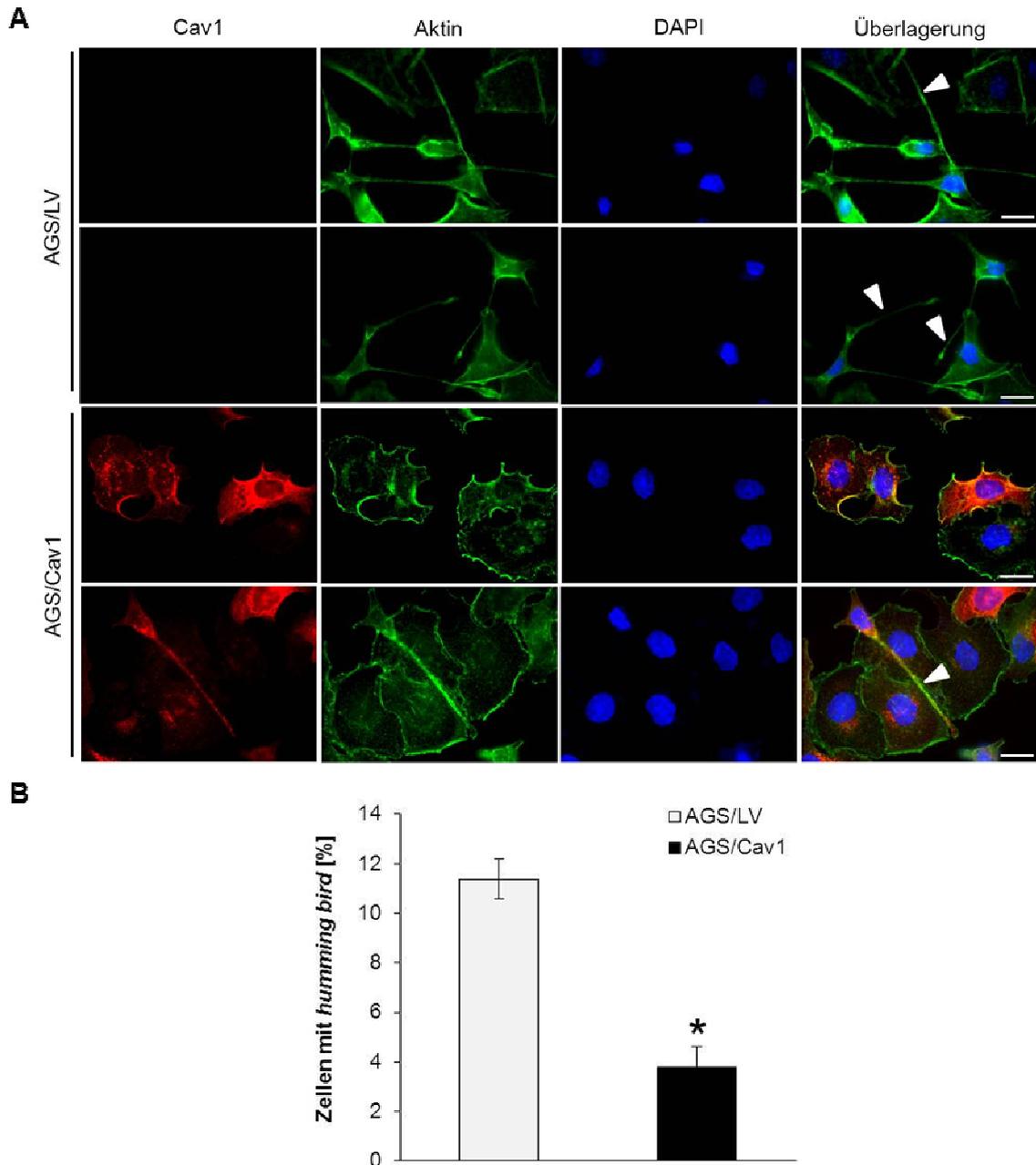


Abbildung 3.9 Caveolin-1 hemmt die Entstehung von *humming bird*. AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert, gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. **A:** Repräsentative Aufnahmen von *H. pylori*-infizierten AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen: grün=Aktin, rot=Caveolin-1 (Cav1), blau=Zellkern, Pfeil=*humming bird*. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m. **B:** Quantitative Auswertung *humming bird* bildender AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen. Pro Experiment wurden 10 Sichtfelder mit mindestens 10 Zellen analysiert. Die Anzahl an Zellen mit nadelförmigen Strukturen wurde in Relation zur Gesamtzellzahl (100%) von Caveolin-1-exprimierenden oder -losen Zellen pro Sichtfeld gesetzt und ist dargestellt als Prozent \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Caveolin-1 humane AGS-Zellen vor CagA-induzierten morphologischen Veränderungen schützt.

3.2.5 Molekularer Mechanismus zum Schutz vor „*humming bird*“

In den folgenden Experimenten wurde der molekulare Mechanismus analysiert, anhand dessen Caveolin-1 zum Schutz vor CagA-induzierten morphologischen Veränderungen beiträgt.

3.2.5.1 Einfluss von Caveolin-1 auf die Phosphorylierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase

Bei der Ausbildung des *humming bird* Phänotyps spielt die Dephosphorylierung und somit die Inaktivierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) als Folge der CagA-Phosphorylierung eine wesentliche Rolle [46].

Im folgenden Experiment wurde daher der Phosphorylierungsstatus von FAK in AGS/Cav1- und AGS/LV-Zellen im Verlauf einer *H. pylori*-Infektion untersucht. Hierzu wurden AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen mit *H. pylori* G27 (MOI=100) für 2 bis 24 h infiziert und aus diesen Gesamtzellsate präpariert (vgl. 2.2.5.1). Die Lysate wurden mittels 10%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und mit Westernblot (vgl. 2.2.5.6) analysiert. Beide Zelltypen wiesen eine ähnliche Menge an Gesamt-FAK-Protein auf und diese blieb über die gesamte Infektionsdauer unverändert (Abbildung 3.10 A, B). Der Anteil an phosphoryliertem FAK-Protein (P-FAK) nahm in AGS/Cav1-Zellen 2 h nach der Infektion leicht ab, blieb dann jedoch über 6 h und 16 h nahezu unverändert und stieg nach 24 h wieder an (Abbildung 3.10 B). In AGS/LV-Zellen dagegen sank mit zunehmender Infektionsdauer die Menge an P-FAK, im Vergleich zu AGS/Cav1-Zellen ($1,4 \pm 0,1$) war insbesondere der Wert nach 24 h ($0,4 \pm 0,1$) signifikant reduziert.

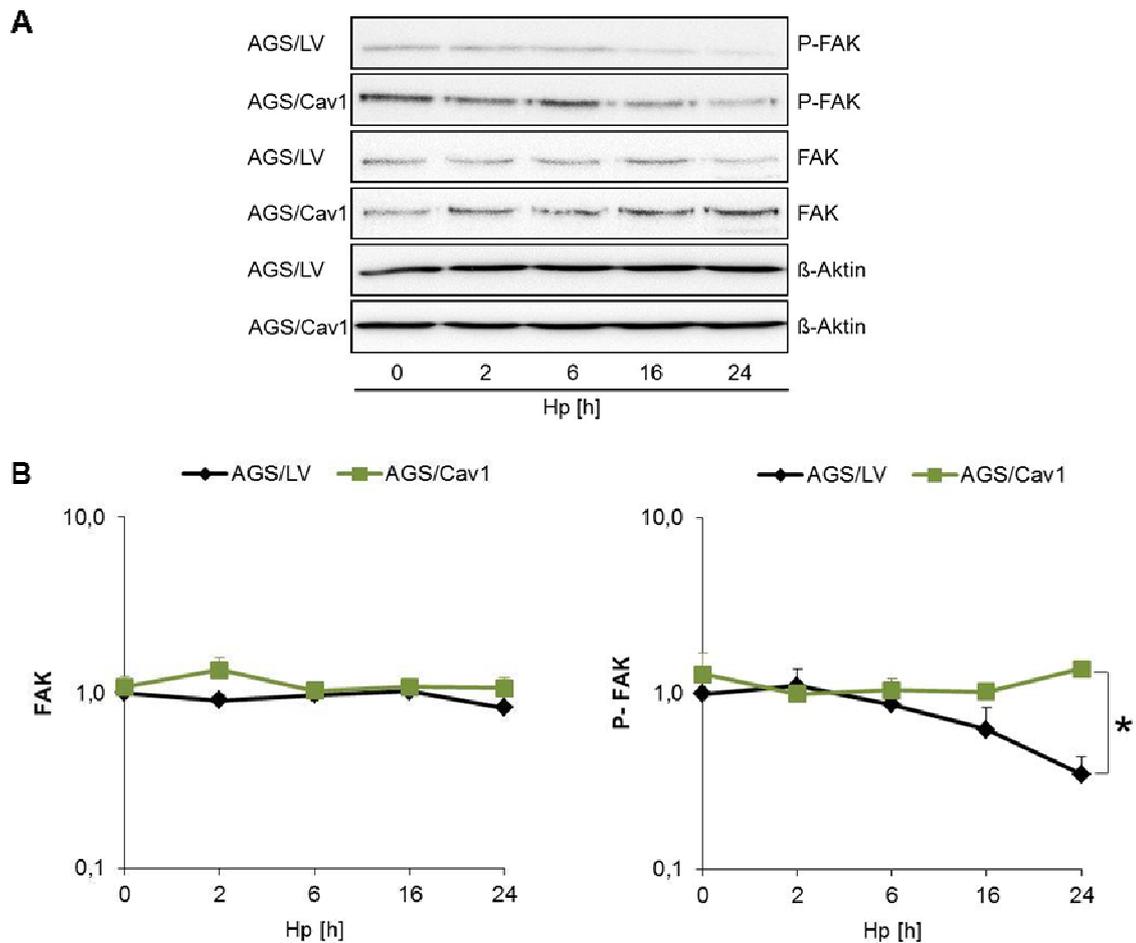


Abbildung 3.10: Caveolin-1 fördert Aktivität von FAK während einer *H. pylori*-Infektion. A: Repräsentative Westernblots von FAK und P-FAK in Gesamtzelllysaten von AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen, die mit *H. pylori* (Hp) G27 wt für 2 bis 24 h infiziert waren. FAK und P-FAK wurden mit polyklonalem anti-FAK- und polyklonalem anti-P-FAK-(Tyr397)-Antikörper visualisiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin mit monoklonalem anti- β -Aktin-Serum detektiert. **B:** Quantitative Auswertung von FAK und P-FAK in AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen. Die Werte der densitometrischen Auswertung von FAK- und P-FAK-Proteinbanden wurden mit den Werten von β -Aktin abgeglichen. Die sich daraus ergebenden Werte sind als x-fache Expression \pm Standardfehler in Bezug auf die uninfizierte Kontrolle (Zeitpunkt 0) dargestellt. Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

3.2.5.2 Einfluss von Caveolin-1 auf die CagA-Internalisierung

Als nächstes wurde untersucht, ob Caveolin-1 die Internalisierung von CagA in die Zelle verändert und damit die Ausbildung von nadelförmigen Strukturen beeinflusst. Hierfür wurden AGS/LV- und AGS/Cav-Zellen wie unter 2.2.1.9 beschrieben mit *H. pylori* G27 wt (MOI=500) für 2, 6, 16 und 24 h infiziert und anschließend gewaschen, um nichtadhärente

Bakterien zu entfernen. Durch eine darauffolgende Inkubation für 2 h im DMEM/F12 Medium mit Zusatz von verschiedenen hochdosierten Antibiotika (vgl. 2.2.1.9) wurden die restlichen Bakterien eliminiert, um nur das injizierte CagA-Protein detektieren zu können. Dazu wurden die Zellen lysiert (vgl. 2.2.5.1) und die erhaltenen Proteinlysate wurden nach der Auftrennung mittels 10%-iger SDS-PAGE (vgl. 2.2.5.5) mit Westernblot analysiert (vgl. 2.2.5.6). Sowohl in AGS/LV- als auch in AGS/Cav1-Zellen stieg mit zunehmender Infektionsdauer auch die Menge an CagA-Protein an (Abbildung 3.11 A, B). Die quantitative Auswertung der CagA-Proteinbanden ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Zelltypen (Abbildung 3.11 B).

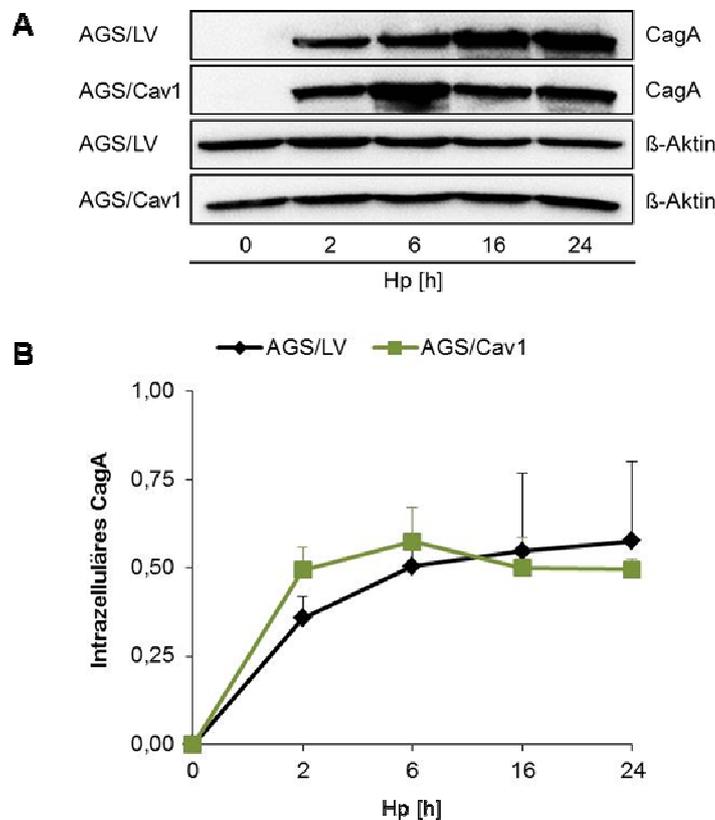


Abbildung 3.11 Caveolin-1 beeinflusst nicht die Internalisierung von CagA. AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=500) für 2 bis 24 h infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden mit einem hochdosierten Antibiotikagemisch eliminiert und die Zellen wurden lysiert. Das im Lysat erhaltene CagA-Protein wurde in einer Westernblot Analyse unter der Verwendung von polyklonalem anti-CagA-Serum visualisiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin mit monoklonalem anti- β -Aktin-Serum detektiert. **A:** Repräsentative Westernblots von intrazellulärem CagA in Gesamtzelllysaten von AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen. **B:** Quantitative Auswertung von intrazellulärem CagA in AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen. Die Werte der densitometrischen Auswertung von CagA-Proteinbanden wurden an die Werte von β -Aktin abgeglichen. Die daraus ergebenden Werte sind als x-fache Expression \pm Standardfehler in Bezug auf die uninfizierte Kontrolle (Zeitpunkt 0) dargestellt.

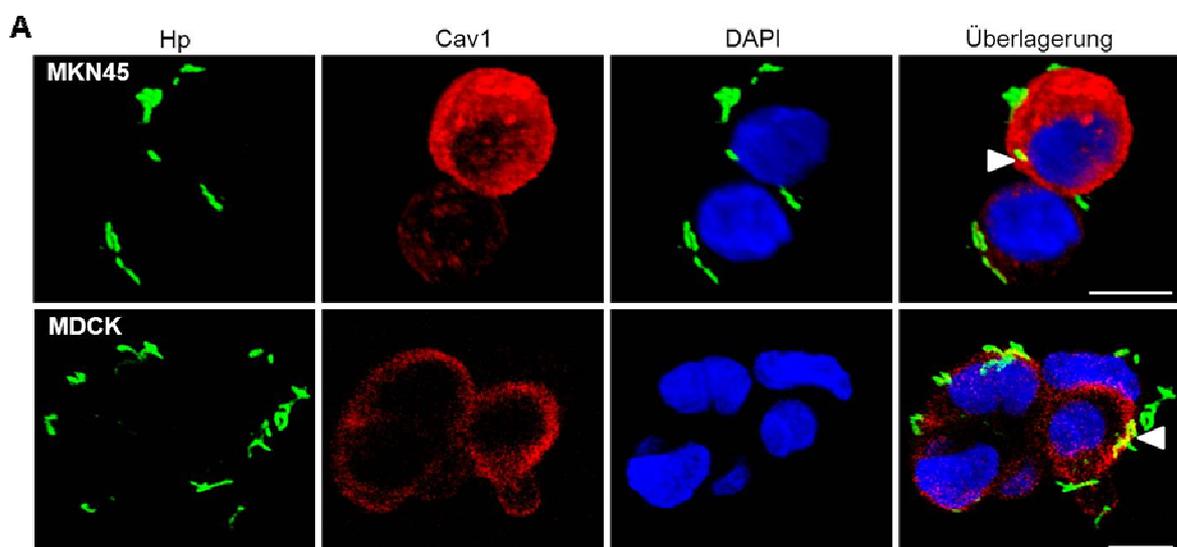
Hiermit kann gesagt werden, dass Caveolin-1 keine bedeutende Rolle in der Internalisierung von CagA spielt.

3.2.5.3 Interaktionsstudie zwischen Caveolin-1, *H. pylori* und CagA anhand der zellulären Lokalisierung

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob zwischen dem in den bisherigen *in vitro* Versuchen verwendeten CagA-produzierenden Stamm *H. pylori* G27 wt und Caveolin-1 sowie reinem CagA und Caveolin-1 eine Interaktion stattfindet, die möglicherweise die Aktivität von CagA beeinflusst und somit in der geringeren Ausprägung des *humming bird* Phänotyps resultiert.

Erste Eindrücke über eine mögliche Interaktion zwischen Proteinen können anhand ihrer zellulären Lokalisierung gewonnen werden. Hierfür wurden MDCK- und MKN45-Zellen, die über endogenes Caveolin-1 verfügen, wie unter 2.2.1.10.4 beschrieben, mit *H. pylori* G27 wt (MOI=10) infiziert und mittels Immunofluoreszenz gefärbt. In der anschließenden Analyse im konfokalen Mikroskop konnte sowohl bei MKN45- als auch bei MDCK-Zellen nur eine sehr vereinzelt vorkommende Kolokalisation von *H. pylori* mit Caveolin-1 beobachtet werden (Abbildung 3.12).

Da die Färbung von injiziertem CagA nicht möglich war (Daten nicht gezeigt), wurde CagA in AGS/Cav1-Zellen überexprimiert und so zur Analyse verwendet. Hierfür wurden AGS/Cav1-Zellen mit dem EGFP-CagA-exprimierenden Plasmid pEGFP-CagA für 48 h transient transfiziert (vgl. 2.2.1.6), mittels Immunofluoreszenzfärbung gefärbt (2.2.1.10.5) und anschließend im konfokalen Mikroskop analysiert. Auch hier war nur selten eine Kolokalisation von Caveolin-1 und CagA zu erkennen (Abbildung 3.12 B).



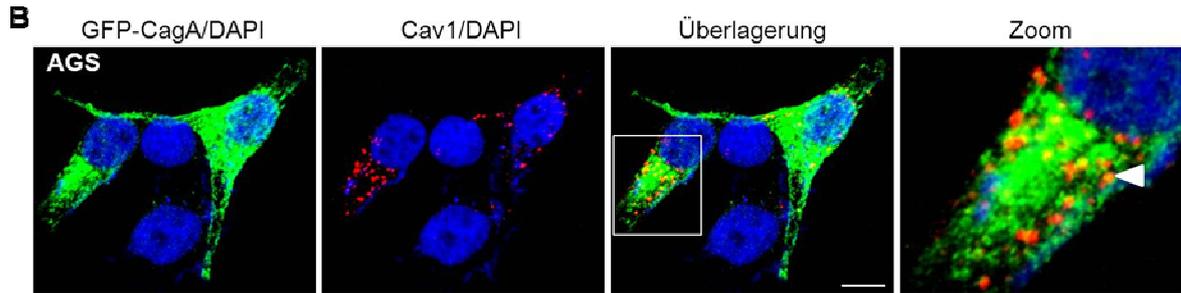


Abbildung 3.12 Sporadische Kolokalisation von Caveolin-1 mit *H. pylori* und CagA. **A:** Lokalisation von *H. pylori* G27 wt an und Caveolin-1 in MKN45- und MDCK-Zellen. MKN45- sowie MDCK-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=10) für 30 min infiziert. Nach der Immunofluoreszenzfärbung erfolgte die Analyse im konfokalen Mikroskop: grün=*H. pylori*, rot=Caveolin-1 (Cav1), blau (DAPI)=Zellkern, gelb=Kolokalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. **B:** Lokalisation von EGFP-CagA und Caveolin-1 in AGS/Cav1-Zellen. AGS/Cav1-Zellen wurden mit pEGFP-CagA-Plasmid für 48 h transient transfiziert, gefärbt und im konfokalen Mikroskop analysiert: grün=EGFP-CagA, rot=Caveolin-1 (Cav1), blau (DAPI)=Zellkern, gelb=Kolokalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. A und B zeigen repräsentative Aufnahmen einer Färbung. Pfeile deuten auf eine Kolokalisation hin.

3.2.5.4 Interaktionsstudie zwischen Caveolin-1 und CagA mittels Ko-Immunopräzipitation

Um eine genaue Aussage treffen zu können, ob es zwischen Caveolin-1 und CagA tatsächlich zu einer Interaktion während einer *H. pylori*-Infektion kommt, wurde eine Immunopräzipitation der beiden Proteine wie unter 2.2.5.9 beschrieben durchgeführt. Hierzu wurden AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert oder nicht infiziert und anschließend lysiert. Aus den erhaltenen Gesamtzelllysaten wurden Caveolin-1 und CagA mittels spezifischer Antikörper angereichert, mit 10%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und anschließend mit Hilfe einer Westernblot Analyse (vgl. 2.2.5.6) untersucht. Wie erwartet wurde sowohl im CagA- als auch im Caveolin-1-Immunopräzipitat aus dem Lysat uninfizierter AGS/Cav1-Zellen kein CagA detektiert (Abbildung 3.13 links). Im Caveolin-1-Präzipitat aus Lysaten infizierter AGS/Cav1-Zellen konnte ebenfalls kein CagA nachgewiesen werden (Abbildung 3.13 Mitte). Ebenfalls wurde kein Caveolin-1 mit dem anti-CagA-Antikörper ko-immunopräzipitiert. Im Lysat aus infizierten AGS/LV-Zellen, welches als Negativkontrolle für die Spezifität einer möglichen Interaktion zwischen Caveolin-1 und CagA diente, wurde wie erwartet kein Caveolin-1 immunopräzipitiert (Abbildung 3.13 rechts) und daher auch kein CagA ko-immunopräzipitiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass zwischen Caveolin-1 und dem CagA-Toxin keine starke Bindung und somit höchstwahrscheinlich keine Interaktion stattfindet.

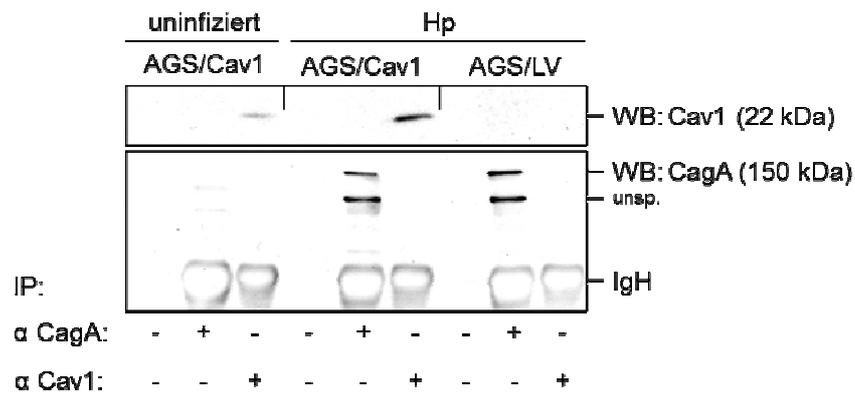


Abbildung 3.13 Nachweis keiner direkten Interaktion zwischen Caveolin-1 und CagA. MKN45-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert, lysiert und aus den erhaltenen Proteinlysaten wurde Caveolin-1 und CagA mit polyklonalem anti-Caveolin-1- und monoklonalem anti-CagA-Serum immunopräzipitiert (IP). Die immunopräzipitierten sowie ko-immunopräzipitierten Proteine wurden im Westernblot (WB) mit polyklonalem anti-Caveolin-1- und polyklonalem anti-CagA-Antikörper visualisiert. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme eines Westernblots. unsp=unspezifische Proteinbande.

3.2.5.5 Identifizierung eines Caveolin-1 Interaktionspartners während einer *H. pylori*-Infektion mittels MALDI-MS

Folgend sollte ein Interaktionspartner von Caveolin-1 identifiziert werden, der während einer *H. pylori*-Infektion mit Caveolin-1 interagiert und so möglicherweise zum zusätzlichen Schutz vor CagA-induzierten morphologischen Veränderungen beiträgt. Hierzu wurden AGS/Cav1-Zellen mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert bzw. nicht infiziert, lysiert und aus den Gesamtzelllysaten wurde Caveolin-1 mit spezifischem Antikörper wie unter 2.2.5.9 beschrieben, immunopräzipitiert. Die erhaltenen Caveolin1-Präzipitate wurden mit 15%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und mit Silberfärbung (vgl. 2.2.5.7) sichtbar gemacht. Im Caveolin-1-Präzipitat aus infizierten AGS/Cav1-Zellen wurde eine stärkere Intensität der Proteinbanden Nr. 1,2,3,4,5 im Vergleich zum Präzipitat von uninfizierten AGS/Cav1-Zellen beobachtet (Abbildung 3.14).

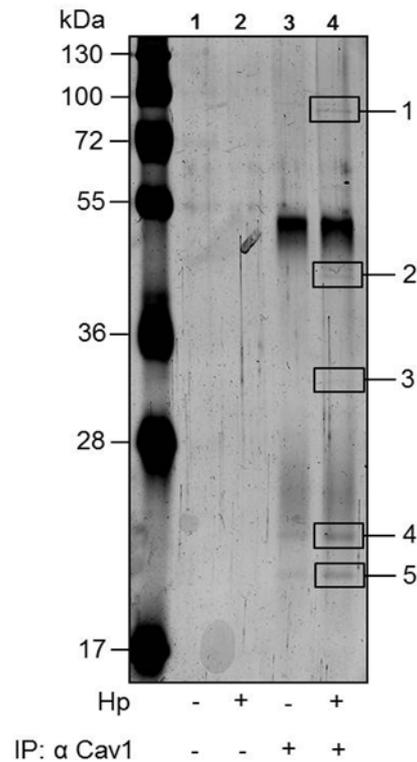


Abbildung 3.14 Visualisierung von Caveolin-1-bindenden Proteinen. AGS/Cav1 Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI) für 16 h infiziert bzw. nicht infiziert und lysiert. Mittels polyklonaler anti-Caveolin-1-Antikörper wurde in den Proteinlysaten Caveolin-1 immunopräzipitiert. Die erhaltenen Immunopräzipitate wurden in einem 15%-igen SDS-Gel separiert und mit Silberfärbung visualisiert. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme eines Silber-gefärbten SDS-Gels. Proteinbanden 1,2,3,4,5 wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-MS analysiert.

Alle fünf Banden wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-MS (vgl. 2.2.5.8) analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Bei den Proteinbanden 2, 3, 4 handelte es sich um Keratine und Proteinbande Nummer 5 war ein Protein „ähnlich zum GDP Dissotiationsinhibitor 2“. Bei Proteinbande Nummer 1 handelte es sich um ein Proteinfragment, dessen Aminosäuresequenz der Variante 4 des p120 Rho-GTPase-aktivierenden Proteins 7 entsprach. Dieses Protein ist ein bekannter Tumorsuppressor, das in der Literatur vorwiegend mit dem Namen *deleted in liver cancer 1* (DLC1) bezeichnet wird. Die Größe der vollständigen DLC1 Variante 4 (DLC1v4) beträgt etwa 110 kDa. Rho-GTPase-aktivierende Proteine regulieren die Aktivität kleiner Rho-GTPasen [203], welche eine wesentliche Rolle bei der Zellmigration und Zellmorphologie spielen [204]. Zudem ist bekannt, dass DLC1 über ein Caveolin-1-bindendes Motiv verfügt [205] und ähnlich wie Caveolin-1 ist DLC1 in Caveolen und fokalen Adhäsionen (FA) lokalisiert [205, 206]. Aus

diesem Grund stellte DLC1v4 einen interessanten Kandidaten dar, der als *H. pylori*-induzierter Interaktionspartner des Caveolin-1 fungieren könnte, und wurde deshalb weiter untersucht.

Tabelle 3.2 Identifizierung Caveolin-1-bindender Proteine mittels MALDI-MS Analyse

Bande Nr.	Akzession Nr.	Masse [Da]	Score	Beschreibung	Spezies
1	Q96QB1	172197	57	p120 Rho-GTPase-aktivierendes Protein 7, <i>Deleted in liver cancer 1</i> Protein	Mensch
2	PO4264	66170	59	Keratin, Typ II cytoskeletal 1	Mensch
3	PO4264	66170	71	Keratin, Typ II cytoskeletal 1	Mensch
4	P35527	62255	51	Keratin, Typ I cytoskeletal 9	Mensch
5	Q8TB95	21602	56	ähnlich zum GDP-Dissotiations-Inhibitor 2	Mensch

3.2.5.6 Verifizierung der Interaktion zwischen Caveolin-1 und DLC1v4 in *H. pylori*-infizierten Zellen

Zunächst wurde mittels Ko-Immunopräzipitation (vgl. 2.2.5.9) die Interaktion von Caveolin-1 und DLC1v4 während einer *H. pylori*-Infektion überprüft. Hierzu wurden wie oben beschrieben AGS/Cav1-Zellen mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert bzw. unbehandelt gelassen, anschließend lysiert und aus dem Lysat wurden Caveolin-1 sowie DLC1 mittels spezifischer Antikörper präzipitiert. Die gewonnenen Präzipitate wurden mit 10%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und anschließend im Westernblot (vgl. 2.2.5.6) analysiert. Hier konnte das DLC1-Protein mit spezifischem anti-DLC1-Serum im Caveolin-1-Immunopräzipitat nachgewiesen werden (Abbildung 3.15 A). Umgekehrt wurde im DLC1-Immunopräzipitat mit spezifischem anti-Caveolin-1-Antikörper Caveolin-1 detektiert (Abbildung 3.15 B). Hiermit konnten die Ergebnisse der MALDI-MS Analyse bestätigt werden. Zudem wurde sowohl im Caveolin-1- (Abbildung 3.15 C) als auch im DLC1-Immunopräzipitat (Abbildung 3.15 B) von infizierten Zellen mittels anti-Caveolin-1-Serum eine etwa 24 kDa große Proteinbande detektiert, bei der es sich höchstwahrscheinlich um die phosphorylierte Form des Caveolin-1 handelte (unphosphoryliertes Caveolin-1: 22 kDa;

Phosphorylgruppe: + ca. 2 kDa). Das bedeutet, dass nicht nur unphosphoryliertes, sondern auch phosphoryliertes Caveolin-1 mit DLC1v4 während einer *H. pylori*-Infektion interagiert und umgekehrt.

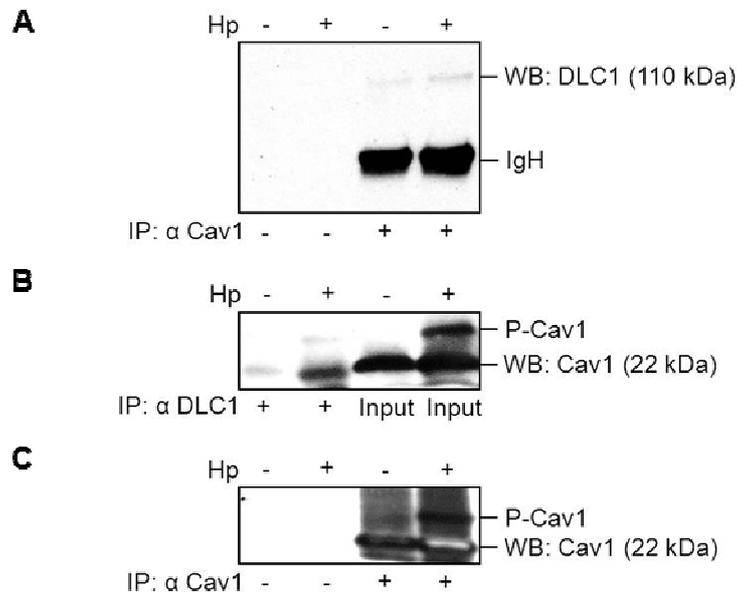


Abbildung 3.15 Verifizierung der Interaktion zwischen Caveolin-1 und DLC1v4 während einer *H. pylori*-Infektion. AGS/Cav1-Zellen wurden wie in 3.2.5.5 infiziert und lysiert. Aus den Proteinlysaten wurden Caveolin-1 und DLC1 mittels anti-Caveolin-1- (A, C) und anti-DLC1- (B) Seren immunopräzipitiert (IP). Die immunopräzipitierten sowie ko-immunopräzipitierten Proteine wurden im Westernblot (WB) mit polyklonalem anti-Caveolin-1- (B, C) und monoklonalem anti-DLC1-Antikörper (A) visualisiert. Bei der Proteinbande P-Cav1, die mit polyklonalem anti-Caveolin-1-Serum detektiert wurde (B, C), handelt es sich höchstwahrscheinlich um phosphoryliertes Caveolin-1. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme eines Westernblots.

3.2.5.7 Überexpression von DLC1v4

Im Folgenden sollte DLC1v4 in das Expressionsplasmid (pTarget) kloniert werden. Hierzu wurde zuerst mittels PCR (vgl. 2.2.4.6) die endogene Expression von DLC1v4 in verschiedenen Zelllinien verifiziert. Zusätzlich wurde auch die Expression der längsten DLC1 mRNA Variante und zwar DLC1v1 untersucht. Alle untersuchten Zelllinien wiesen eine deutliche DLC1v4 mRNA Expression auf (Abbildung 3.16 A). Dagegen war die DLC1v1 Isoform nur in der HEK293-Zelllinie (Spur 4) nachzuweisen. Dieses spricht auch dafür, dass es sich bei dem in AGS/Cav1-Zellen durch MALDI-MS identifizierten DLC1-Proteins um die Variante 4 handeln müsste. Zur Klonierung von DLC1v4 [182] wurde cDNA von HepG2-Zellen verwendet. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in der Kapitel 2.2.4.10 beschrieben.

Nach erfolgreicher Klonierung wurde die Überexpression von DLC1v4 auf der mRNA- sowie der Protein-Ebene in HEK293- und parentalen AGS-Zellen verifiziert. Hierzu wurden HEK293- und AGS-Zellen mit leerem pTarget Vektor (pT-LV) oder DLC1v4-exprimierendem pTarget Vektor (pT-DLC1v4) für 24 h transient transfiziert (2.2.1.6) und aus den Zellen wurde sowohl Gesamt-RNA (vgl. 2.2.4.3.2) als auch Gesamtprotein (2.2.5.1) extrahiert. Beide mit dem pT-DLC1v4 Expressionsvektor transient transfizierte Zelllinien zeigten eine 2-fach erhöhte Expression an DLC1v4 mRNA (Abbildung 3.16 B, oben). Das überexprimierte DLC1v4-Protein wies wie in der Immunopräzipitation (Abbildung 3.16 B, unten) eine Größe von 110 kDa auf.

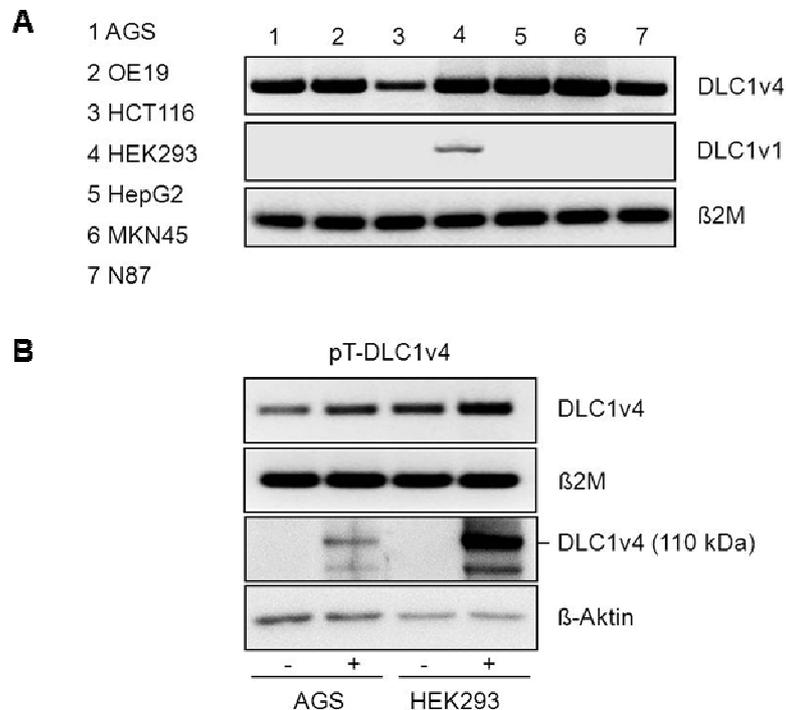


Abbildung 3.16 Expression von DLC1. **A:** Endogene Expression von DLC1v4 und DLC1v1 mRNA in humanen Zelllinien. Aus allen untersuchten Zelllinien wurde Gesamt-RNA extrahiert, die nach Umschreiben in cDNA zur Amplifikation von DLC1v4 und DLC1v1 mRNA mittels PCR diente. Als interne Kontrolle wurde β 2-Mikroglobulin (β 2M) amplifiziert. Erhaltene PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt ist ein Agarosegel mit PCR Produkten von DLC1v4 (oben), DLC1v1 (Mitte) und β 2M mRNA (unten). **B:** DLC1v4 mRNA und Protein nach transienter Überexpression. Parentale AGS- und HEK293-Zellen wurden mit pT-DLC1v4 (+) oder pT-LV (-) für 24 h transient transfiziert. Aus einem Teil der Zellen wurde Gesamt-RNA extrahiert, die dann als cDNA zur Amplifikation von DLC1v4 sowie β 2M mittels PCR diente. Aus dem anderen Teil der transfizierten Zellen wurden Gesamtzelllysate präpariert, die zur Detektion des überexprimierten DLC1v4-Proteins mit monoklonalem anti-DLC1-Serum im Westernblot eingesetzt wurden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, visualisiert mit monoklonalem anti- β -Aktin-Serum. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme eines Agarosegels (obere Hälfte) sowie eines Westernblots (untere Hälfte).

3.2.5.8 Einfluss der DLC1v4-Überexpression auf die Bildung der CagA-induzierten „humming bird“ Morphologie

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Überexpression von DLC1v4 einen Effekt auf die Formation des *humming bird* Zellphänotyps hat. Hierzu wurden parentale AGS-Zellen mit pT-DLC1v4 (AGS/DLC1v4) oder leerem Vektor (AGS/LV) für 24 h transient transfiziert (vgl. 2.2.1.6) und anschließend mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert. Nach anschließender Immunofluoreszenz-Färbung (vgl. 2.2.1.10.3) erfolgte die Analyse im Fluoreszenzmikroskop. Sowohl AGS/LV- als auch AGS/DLC1v4-Zellen wiesen langgestreckte, nadelförmige Strukturen auf (Abbildung 3.17 A, B).

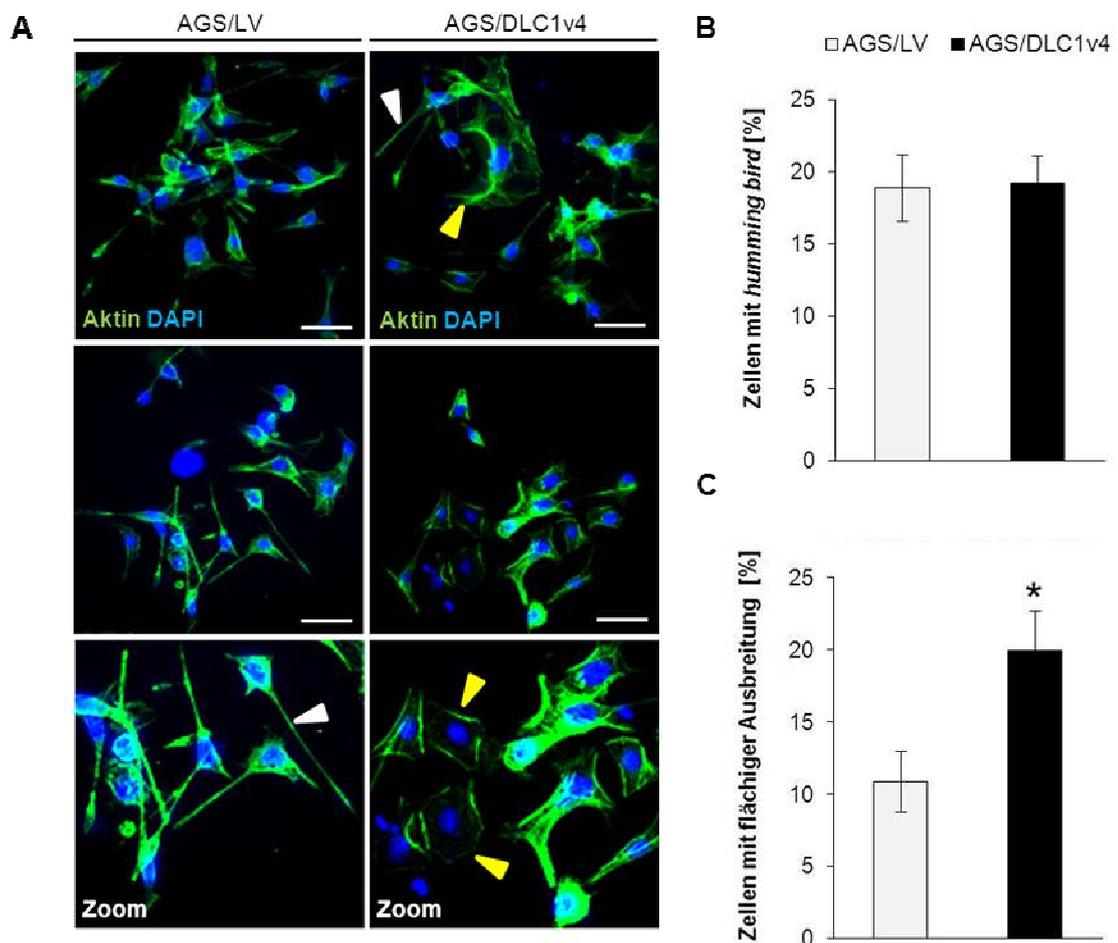


Abbildung 3.17 DLC1v4 hat keinen Effekt auf die Ausbildung der *humming bird* Morphologie. AGS-Zellen wurden mit leerem pTarget (AGS/LV) oder pT-DLC1v4 (AGS/DLC1v4) für 24 h transient transfiziert und mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=10) für 16 h infiziert. **A:** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von infizierten AGS/LV- und AGS/DLC1v4-Zellen: grün=Aktin, blau (DAPI)=Zellkern. Pfeile zeigen *humming bird* (weiss) und flächige Ausbreitung (gelb) an. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. **B:** Quantitative Auswertung von *humming bird*-bildenden Zellen. **C:** Quantitative Auswertung von flächig ausgebreiteten Zellen. Pro Experiment wurden 10 Sichtfelder mit mindestens 10 Zellen/ Sichtfeld analysiert. Balken präsentieren *humming bird*-bildende Zellen (B) sowie flächig ausgebreitete Zellen (C) als Prozent \pm Standardfehler im Bezug zur Gesamtzellzahl von drei unabhängigen Experimenten. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

Der durchschnittliche Wert von *humming bird*-bildenden AGS/DLC1v4-Zellen lag bei $19\pm 2\%$. Ein ebenso hoher Anteil ($19\pm 2\%$) wurde in AGS/LV-Zellen ermittelt (Abbildung 3.17 B). Auffallend war, dass in AGS/DLC1v4-Zellen eine flächig ausgebreitete Zellmorphologie, das so genannte *cell spreading*, häufiger als in AGS/LV-Zellen vorkam. Diese Beobachtung wurde in der quantitativen Auswertung (Abbildung 3.17 C) bestätigt, wonach der Anteil an flächig ausgebreiteten Zellen unter den AGS/DLC1v4-Zellen $20\pm 3\%$ betrug und somit signifikant höher als in AGS/LV-Zellen ($11\pm 2\%$) war. Diese Daten deuten darauf hin, dass DLC1v4 keine Rolle im Schutzmechanismus vor *humming bird* spielt, sondern wie schon bekannt für die Regulation von fokalen Adhäsionen [206, 207] und der damit verbundenen Ausbreitung der Zellen zuständig ist.

3.2.5.9 Phosphorylierung von Src und Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion

Caveolin-1 kann durch die zytosolischen Tyrosinkinasen Src und Abl [165] am Tyrosin 14 phosphoryliert werden. Phosphoryliertes Caveolin-1 und Src regulieren die Aktivität der kleinen Rho-GTPasen, die wiederum die Organisation des Zytoskeletts und somit die Zellmorphologie beeinflussen [204].

Erste Hinweise auf eine Caveolin-1 Phosphorylierung in infizierten Zellen wurden in der Abbildung 3.15 erhalten. Im folgenden Experiment wurde daher verifiziert, ob *H. pylori* zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Src und der anschließenden Phosphorylierung von Caveolin-1 beiträgt. Hierfür wurden AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 0,5 bis 48 h infiziert und anschließend lysiert (vgl. 2.2.5.1). Die gewonnenen Zelllysate wurden mittels 15%-iger (P-Caveolin-1) und 10%-iger (P-Src) SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und anschließend im Westernblot analysiert (vgl. 2.2.5.6). Die Infektion mit *H. pylori* G27 wt führte zur Phosphorylierung von Src (P-Src) sowohl in AGS/Cav1- als auch in AGS/LV-Zellen (Abbildung 3.18 links, rechts). Die quantitative Auswertung der P-Src-Proteinbanden (Abbildung 3.18 rechts) ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. Darüber hinaus zeigten AGS/Cav1-Zellen eine rapide Phosphorylierung von Caveolin-1 am Tyrosin 14 (Y14, Abbildung 3.18 links). Diese war nach sechs Stunden eindeutig sichtbar und wurde mit der zunehmenden Infektionsdauer verstärkt. Hiermit konnte bestätigt werden, dass eine *H. pylori*-Infektion eine Phosphorylierung von Src und somit auch von Caveolin-1 induziert.

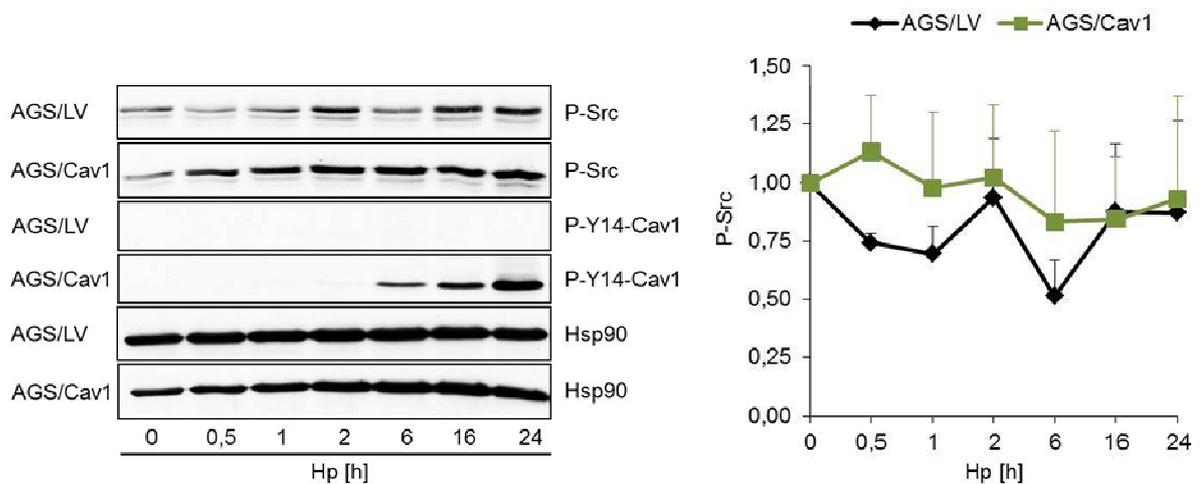


Abbildung 3.18 Eine *H. pylori*-Infektion induziert eine starke Phosphorylierung von Src und Y14-Caveolin-1. **A:** Repräsentative Westernblots von P-Src und P-Y14-Cav1 in Gesamtzelllysaten von AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen, die mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 0,5 bis 24h infiziert wurden. P-Src wurde mit monoklonalem anti-P-Src-Serum (Y416) und P-Cav1 mit monoklonalem anti-P-Caveolin-1-Serum (Y14) detektiert. Hsp90 diente als Ladekontrolle, visualisiert mit polyklonalem anti-Hsp90-Antikörper. **B:** Quantitative Auswertung der P-Src-Proteinbanden. Die Werte der densitometrischen Auswertung von P-Src-Proteinbanden wurden an die Werte von Hsp90 abgeglichen. Die sich daraus ergebenden Werte sind als x-fache Expression \pm Standardfehler im Bezug auf die uninferzierte Kontrolle (Zeitpunkt 0) dargestellt. Die Daten stammen von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.5.10 Einfluss von Caveolin-1 auf die Aktivierung der Rho-GTPasen

Schließlich wurde die Aktivität der kleinen GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 in infizierten AGS-Zellen mittels eines modifizierten Immunpräzipitationsansatzes (*pull down*, vgl. 2.2.5.10) untersucht. Hierzu wurden AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen mit *H. pylori* G27 (MOI=100) für 16 h infiziert und anschließend lysiert. Aus den Proteinlysaten wurden aktive GTPasen durch Präzipitation mit spezifischen Agarosekügelchen isoliert, die für die Bindung von aktivem RhoA mit der Rho-Bindungs-Domäne (RBD) von Rhotekin und für die Bindung von aktivem Rac1 oder Cdc42 mit der p21-Bindungs-Domäne (PBD) der p21-aktivierten Kinase (PAK) beschichtet waren. Die erhaltenen Präzipitate sowie ein Teil des ursprünglichen Zelllysats (Input), welches als Ladekontrolle diente, wurden mittels 10%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und mit Westernblot (vgl. 2.2.5.6) analysiert. Hier wurde beobachtet, dass die *H. pylori*-Infektion weder in AGS/Cav1- noch in AGS/LV-Zellen zu einer Aktivierung von Cdc42 und RhoA führte (Abbildung 3.19). Hinzu kam, dass im Fall von Cdc42 nur eine sehr schwache Proteinbande im *Input* nachgewiesen werden konnte, was

bedeutet, dass das Protein in beiden Zellklonen nur sehr schwach exprimiert wurde. In den Proteinlysaten von beiden Zelltypen wurde zwar eine hohe Menge an Gesamt-Rac1 detektiert, aber nur ein minimaler Anteil dieser GTPase war aktiv. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass kleine GTPasen wie RhoA, Cdc42 und Rac1 keine Rolle im molekularen Mechanismus des *humming bird* Phänotyps spielen, da sie in den untersuchten Zellen entweder kaum vorhanden waren oder durch *H. pylori* G27 [47] nur minimal aktiviert wurden.

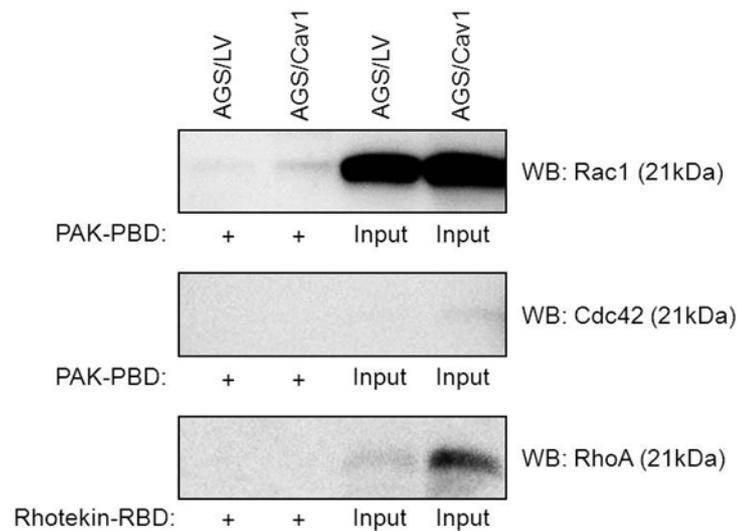


Abbildung 3.19 *H. pylori* G27 ist ein schwacher Aktivator von kleinen Rho-GTPasen. AGS/LV- und AGS/Cav1-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert und lysiert. Aus den erhaltenen Proteinlysaten wurde die aktive Form von Rac1, Cdc42 und RhoA mittels PAK-PBD- oder Rhotekin-RBD-konjugierter Agarose angereichert und im Westernblot (WB) unter Verwendung der entsprechenden monoklonalen Antikörpern visualisiert. Der Input diente als Kontrolle des im jeweiligen Lysat erhaltenen Gesamtproteins.

3.2.6 Einfluss von *H. pylori* auf die Caveolin-1-Expression

H. pylori moduliert während der Infektion die Expression zahlreicher Gene der Wirtszelle [118, 208, 209]. Zudem stellt eine chronische Entzündung mit *H. pylori* ein Hauptrisiko für die Entstehung von Magenkarzinomen dar, bei denen die *Cav1*-Expression meistens herunterreguliert ist [174]. In folgenden Experimenten wurde daher untersucht, ob eine *H. pylori*-Infektion einen Einfluss auf die Caveolin-1-Expression hat.

3.2.6.1 *Cav1* mRNA-Expression in *H. pylori* infizierten Mäusen

Zunächst wurde die Caveolin-1-Expression in infizierten Mäusen analysiert. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus dem Magengewebe von mit *H. pylori* SS1 für 11 Monate infizierten sowie uninfizierten WT-Mäusen isoliert (vgl. 2.2.4.3.1) und in cDNA umgeschrieben (vgl. 2.2.4.5), die dann für die quantitative Analyse mittels RT-qPCR (vgl. 2.2.4.9) eingesetzt wurde. Zur Kontrolle wurde die *Cav1*-Expression auch im Magen infizierter und unifizierter *Cav1*-KO-Mäuse verifiziert. Alle infizierten WT-Mäuse wiesen eine signifikant reduzierte *Cav1* mRNA-Expression (13 ± 4) im Vergleich zu uninfizierten WT-Mäusen (38 ± 9) auf (Abbildung 3.20). Wie erwartet wurde keine *Cav1* mRNA in *Cav1*-KO-Mäusen detektiert.

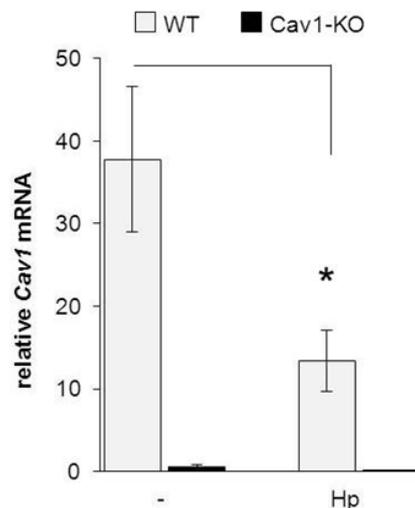


Abbildung 3.20 Reduzierte *Cav1* mRNA in WT- und *Cav1*-KO-Mäusen 11 Monate nach der *H. pylori* SS1-Infektion. Aus *H. pylori* (Hp) SS1-infiziertem bzw. uninfiziertem Magengewebe wurde die Gesamt-RNA extrahiert und nach Umschreiben in cDNA zur Quantifizierung der *Cav1* mRNA mittels RT-qPCR eingesetzt. Die erhaltenen *Cav1* CT-Werte wurden auf die CT-Werte von β 2-Mikroglobulin (β 2M) normalisiert und die Resultate als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Pro Genotyp wurden 15 Tiere (n=15) untersucht. P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$.

3.2.6.2 Expression von Caveolin-1 mRNA und Protein in *H. pylori* infizierten Zellen

Zusätzlich wurde der Einfluss einer *H. pylori*-Infektion auf die Caveolin-1-Expression *in vitro* untersucht. Hierfür wurden drei verschiedene Zelllinien (N87-, MKN45- und MDCK-Zellen), die über eine endogene Caveolin-1-Expression verfügen, mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für

eine Dauer von 72 h infiziert bzw. nicht infiziert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA präpariert (vgl. 2.2.4.3.2), die nach Umschreiben in cDNA (vgl. 2.2.4.5) zur Quantifizierung der *CAV1*-Expression mittels RT-qPCR (vgl. 2.2.4.9) verwendet wurde. Ähnlich wie in den Mägen infizierter WT-Mäuse wurde eine starke, signifikante Reduktion von *CAV1* mRNA in allen drei Zelllinien beobachtet (Abbildung 3.21). In infizierten MDCK-Zellen war die *CAV1* mRNA auf $38\pm 22\%$ gegenüber der uninfizierten Kontrolle (100%) reduziert. In infizierten MKN45-Zellen sank die *Cav1*-Expression auf $22\pm 6\%$ und in infizierten N87-Zellen sogar auf $17\pm 11\%$ im Vergleich zu uninfizierten Zellen.

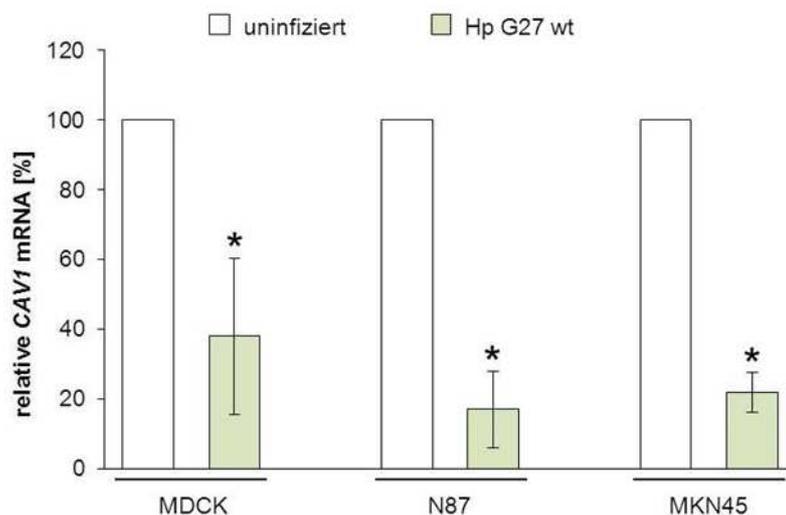


Abbildung 3.21 *H. pylori* führt zur Reduktion der Caveolin-1 mRNA-Expression *in vitro*. MDCK-, MKN45- und N78-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 72 h infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und zur Quantifizierung der Caveolin-1 mRNA mittels RT-qPCR eingesetzt. Erhaltene Caveolin-1 (*CAV1*) CT-Werte wurden durch CT-Werte von β 2-Mikroglobulin (β 2M) normalisiert. Die Resultate sind als Prozent \pm Standardfehler im Bezug auf uninfizierte Zellen (100%) dargestellt. Die P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde die Caveolin-1-Expression auch auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurden MDCK-, N87- und MKN45-Zellen für 24, 48, 72 und 96 h mit *H. pylori* G27 wt infiziert und dann lysiert (vgl. 2.2.5.1). Die erhaltenen Gesamtzelllysate wurden mittels 15%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und im Westernblot (vgl. 2.2.5.6) analysiert. Sowohl in MKN45- als auch in N78-Zellen konnte mit zunehmender Infektionsdauer eine starke Abnahme des Caveolin-1 Proteins detektiert werden (Abbildung 3.22). In MDCK-Zellen

konnte zwar eine Tendenz, aber keine so deutliche Reduktion in der Menge des Caveolin-1 Proteins beobachtet werden wie in MKN45- und N87-Zellen.

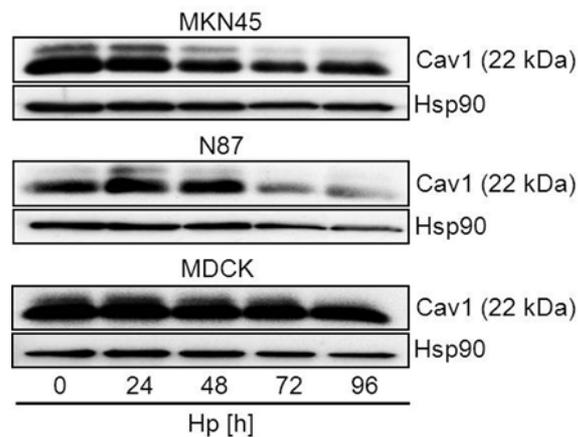


Abbildung 3.22 Reduzierte Caveolin-1-Proteinmenge *in vitro* aufgrund einer *H. pylori*-Infektion. Repräsentative Westernblots von Caveolin-1 in Gesamteinlysaten von MKN45-, N87- und MDCK-Zellen, die mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 24 bis 96 h infiziert wurden. Das Caveolin-1-Protein wurde mit polyklonalem anti-Caveolin-1-Antikörper visualisiert. Als Ladekontrolle diente Hsp90, das mit polyklonalem anti-Hsp90-Serum detektiert wurde.

Anhand dieser Ergebnisse kann gesagt werden, dass eine *H. pylori*-Infektion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Reduktion der Cav1 mRNA Expression sowie der Caveolin-1 Proteinmenge führt.

3.2.6.3 Einfluss von CagA auf die Caveolin-1-Expression

Der zur Infektion *in vivo* verwendete Stamm *H. pylori* SS1 verfügt aufgrund eines unvollständigen *cagPAI* über kein aktives CagA-Protein [112]. Dagegen transloziert der *in vitro* genutzte Stamm *H. pylori* G27 wt ein funktionell aktives CagA-Protein in die Zellen [47]. Aus diesem Grund wurde im folgenden Experiment verifiziert, ob die Herunterregulation der Caveolin-1 mRNA-Expression von CagA-abhängig war.

Hierfür wurden die gleichen Zelllinien (MDCK-, N87- und MKN45-Zellen) mit CagA-defizienten Stämmen *H. pylori* G27 Δ *cagA* und *H. pylori* SS1 (MOI=100) für 72 h infiziert bzw. unbehandelt gelassen. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA (vgl. 2.2.4.3.2) isoliert, die nach Umschreiben in cDNA (vgl. 2.2.4.5) zur Analyse der Caveolin-1-Expression mittels RT-

qPCR (vgl. 2.2.4.9) diene. Sowohl die Infektion mit *H. pylori* G27 Δ cagA als auch mit *H. pylori* SS1 führte zu einer signifikanten Abnahme der *CAV1* mRNA in allen drei Zelllinien (Abbildung 3.23).

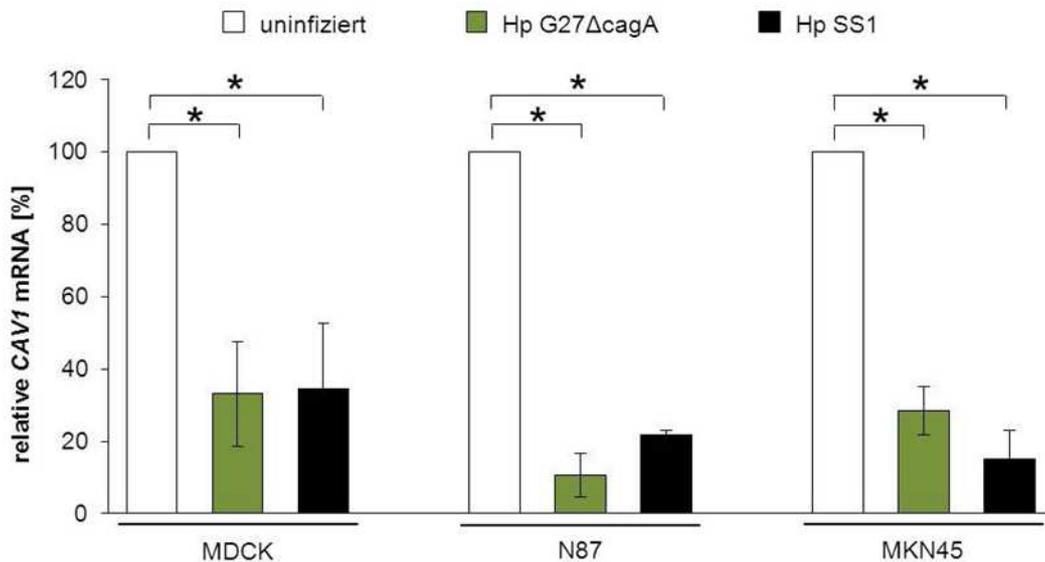


Abbildung 3.23 Die Caveolin-1-Reduktion ist CagA-unabhängig. MDCK-, MKN45- und N78-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 Δ cagA und *H. pylori* (Hp) SS1 (MOI=100) für 72 h infiziert bzw. nicht infiziert. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA extrahiert, die nach Umschreiben in cDNA zur Quantifizierung der *CAV1* mRNA mittels RT-qPCR eingesetzt wurde. Erhaltene Caveolin-1 (*CAV1*) CT-Werte wurden mit Hilfe der CT-Werte von β 2-Mikroglobulin (β 2M) normalisiert. Die Resultate sind als Prozent \pm Standardfehler im Bezug auf uninfizierte Zellen (100%) dargestellt. Die P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

H. pylori G27 Δ cagA reduzierte die *CAV1*-Expression in MDCK-Zellen um 67% im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle. Der gleiche Stamm bewirkte in MKN45-Zellen eine Abnahme der *CAV1*-Expression auf einen Wert von $29 \pm 7\%$ und in N87-Zellen sogar auf $11 \pm 6\%$ im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Ebenso führte *H. pylori* SS1 in MDCK-Zellen zu einer Reduktion der *CAV1*-Expression auf $35 \pm 18\%$ und in N87-Zellen auf $21 \pm 1\%$ im Vergleich zu uninfizierten Kontrollzellen. In MKN45-Zellen, die mit *H. pylori* SS1 infiziert waren, fiel die *CAV1* mRNA auf einen Wert von $15 \pm 8\%$ im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle ab. Hiermit wurde bestätigt, dass *H. pylori* die Caveolin-1-Expression inhibiert und diese Regulation CagA-unabhängig ist.

3.2.6.4 Regulation der Caveolin-1-Expression

Um zu untersuchen, ob die in den vorangegangenen Experimenten beobachtete Abnahme der *Cav1* mRNA durch eine Repression des Caveolin-1-Promotors verursacht wurde, wurde die Aktivität des *Cav1*-Promotors in *H. pylori*-infizierten Zellen mittels eines Dualen Luciferase Reporter Testsystems (*Dual-Luciferase Reporter Assay*, vgl. 2.2.1.7) analysiert. Hierfür wurden HEK293- und MKN45-Zellen mit dem pGL3-CAV1p *Firefly* Luciferase-Reporter-Konstrukt transfiziert, das den humanen proximalen CAV1-Promotor enthielt [180]. Zusätzlich wurde in einem parallelen Ansatz ein pGL3 *Firefly* Luciferase-Reporter-Plasmid mit dem Serum-responsiven Element (*serum response element*, SeRE, pGL3-SeRE) transfiziert. Dieses diente als Positivkontrolle, da SeRE durch externen Stress sowie durch das CagA-Protein von *H. pylori* aktiviert werden kann [210]. Als Negativkontrolle diente das pGL2-BSEP-Plasmid, welches den Enhancer des Gens für die Gallensalz-Exportpumpe (*bile salt export pump*, BSEP) beinhaltet. Zur internen Kontrolle der Transfektionsrate wurde in allen Ansätzen das *Renilla* Luciferase-Plasmid (pRL-CMV) kotransfiziert. Nach einer Transfektionsdauer von 24 h wurden die Zellen mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert und lysiert. Die *Firefly* Luciferase-Aktivität des jeweiligen Promotors bzw. Enhancers wurde luminometrisch ermittelt und auf die Aktivität der *Renilla* Luciferase normalisiert (vgl. 2.2.1.7.1).

In den beiden untersuchten Zelllinien bewirkte die Infektion mit *H. pylori* G27 wt eine signifikante Abnahme der CAV1-Promotor-Aktivität (Abbildung 3.24 A, B). In infizierten MKN45-Zellen betrug die Aktivität des CAV1-Promotors $53 \pm 1\%$ im Vergleich zu uninfizierten Zellen. In infizierten HEK297-Zellen sank die CAV1-Promotor-Aktivität sogar auf $30 \pm 6\%$ im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle. Im Gegensatz dazu war die Aktivität des SeRE in infizierten MKN45-Zellen 2,4-fach höher ($243 \pm 54\%$) als in uninfizierten MKN45-Zellen. Ebenso wiesen infizierte HEK293-Zellen einen Anstieg der SeRE-Aktivität auf einen Wert von $147 \pm 29\%$ im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle auf. Wie erwartet, blieb die Aktivität des BSEP-Enhancers in beiden untersuchten Zelllinien unverändert.

Mit diesen Ergebnissen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Caveolin-1-Expression in *H. pylori*-infizierten Zellen auf transkriptionaler Ebene herunterreguliert ist.

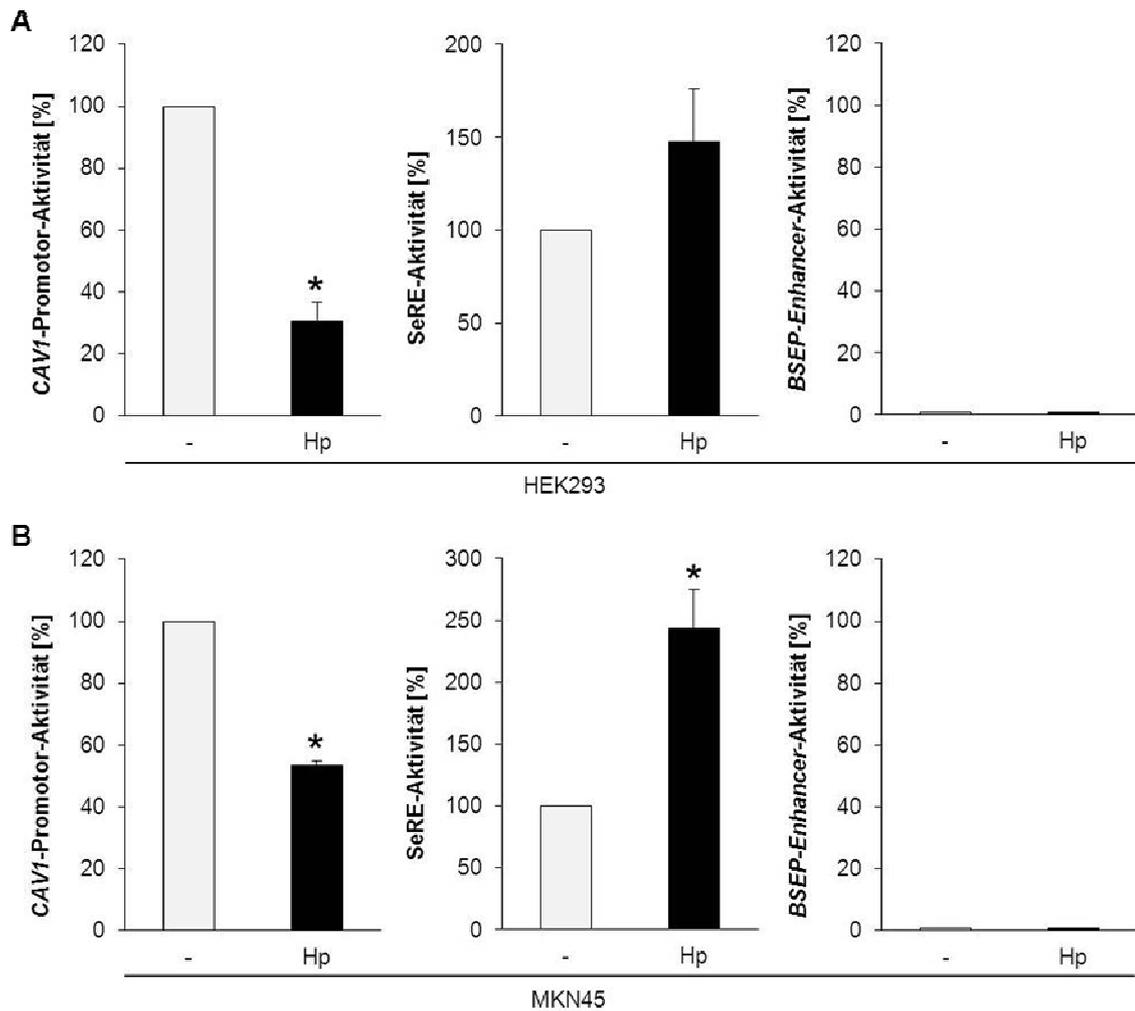


Abbildung 3.24 Eine Infektion mit *H. pylori* hemmt die CAV1-Promotor-Aktivität. HEK293- und MKN45-Zellen wurden mit pGL3-CAV1p-, pGL3-SeRE-, pGL2-BSEP-Firefly Luciferase-Reporter Konstrukten für 24 h transient transfiziert. Als interne Kontrolle wurde das *Renilla* Luciferase-Plasmid (pRL-CMV) kotransfiziert. Nach erfolgter Infektion mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 16 h wurde die Aktivität der verschiedenen Firefly Luciferasen luminometrisch ermittelt. Die erhaltene *relative light units* (RLU) wurden mit Hilfe der RLU von *Renilla* normalisiert und sind dargestellt als Prozent im Bezug zur uninfizierten Kontrolle (100%) \pm Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, * $p < 0,05$.

3.2.7 SREBP1 als potentieller Repressor des Caveolin-1-Promotors in *H. pylori*-infizierten Zellen

Im nächsten Schritt sollte der durch *H. pylori*-aktivierte Repressor des *Cav1*-Promotors identifiziert werden. Ein bekannter negativer Regulator der *Cav1*-Transkription ist das Sterol-regulatorische Element bindendes Protein 1 (*sterol regulatory element binding protein 1*,

SREBP1). Der humane *CAV1*-Promotor weist drei Bindestellen, sogenannte Sterol-regulatorische Elemente (*sterol regulatory elements*, SRE) für SREBP1 auf. Bei einem Mangel an intrazellulärem Cholesterin bindet SREBP1 an diese Sequenzen und reprimiert die Transkription des humanen *CAV1*-Gens [1]. *H. pylori* ist Cholesterin-auxotroph und nutzt das Cholesterin seines Wirts um dem Immunsystem zu entkommen. Dazu glykosyliert *H. pylori* das Cholesterin und baut es in die eigene Membran ein [107]. Da es dadurch zu einem Cholesterinmangel in den Wirtszellen kommen könnte, wurde die Rolle von SREBP1 während der *H. pylori*-Infektion genauer untersucht.

3.2.7.1 Einfluss einer *H. pylori*-Infektion auf die SREBP1-Aktivierung

Bei einem hohen intrazellulären Cholesteringehalt ist SREBP1 als inaktives, 125 kDa großes Vorläuferprotein an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden. Bei Cholesterinmangel wird es proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert. Das dabei entstandene 68 kDa große Fragment wird in den Zellkern transloziert, wo es die Transkription seiner Ziel-Gene reguliert [211, 212].

Im folgenden Experiment wurde zunächst untersucht, ob eine *H. pylori* Infektion zur Spaltung von SREBP1 führt. Hierzu wurden MKN45-Zellen für 6 bis 48 h mit *H. pylori* G27 wt infiziert und anschließend lysiert (vgl. 2.2.5.1). Die erhaltenen Gesamtzelllysate wurden mittels 10%-iger SDS-PAGE separiert (vgl. 2.2.5.5) und mittels Westernblots analysiert (vgl. 2.2.5.6). Bereits sechs Stunden nach der Infektion war das 68 kDa große Spaltfragment von SREBP1 in den Gesamtzelllysaten vorhanden und die Menge nahm mit der Infektionsdauer weiter zu (Abbildung 3.25). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *H. pylori* zur Aktivierung von SREBP1 führt.



Abbildung 3.25 Nachweis des aktiven SREBP1-Spaltfragments in infizierten MKN45-Zellen. Repräsentativer Westernblot von SREBP1 in Gesamtzelllysaten von MKN45-Zellen, die mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 6 bis 24 h infiziert waren. Das 68 kDa große SREBP1-Fragment wurde mit polyklonalem anti-SREBP1-Serum visualisiert. Als Ladekontrolle wurde Hsp90 mit polyklonalem anti-Hsp90-Serum detektiert.

3.2.7.2 Verifizierung der SREBP1-Bindung an den humanen CAV1-Promotor mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Im darauf folgenden Ansatz wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit anti-SREBP1-Antikörper durchgeführt, um die Frage zu klären, ob die mit *H. pylori*-infizierten Zellen eine vermehrte Bindung von SREBP1 an eine der drei SRE-Sequenzen im *Cav1*-Promotor aufwiesen. Zusätzlich wurde getestet, ob die untersuchte Region des *Cav1*-Promotors transkriptionell aktiv (offenes Chromatin) war oder nicht (geschlossenes Chromatin). Letzteres wurde anhand einer ChIP mit anti-Acetyl-Histon-H4-Antikörper untersucht. Acetylierung der H4-Histone setzt ihre Bindefähigkeit für die Chromatin-DNA herab. Somit liegt die DNA in einer aufgelockerten, offenen Konformation vor und ist dadurch für die Transkriptionsmaschinerie leichter zugänglich [213]. Es wurden MKN45-Zellen mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert bzw. nicht behandelt und die Chromatin-Immunopräzipitation wurde wie unter 2.2.4.12 beschrieben durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde mittels RT-qPCR quantifiziert (vgl. 2.2.4.9). Der amplifizierte Bereich des *CAV1*-Promotors lag -382 bis -145 bp stromaufwärts vom Translationsstart (+1) und beinhaltete die SRE3-Sequenz (Abbildung 3.26 A). Die Menge an SRE3-DNA, die mit dem anti-SREBP1-Serum immunopräzipitiert wurde, betrug in infizierten Zellen einen Wert von $2,5 \pm 0,5$ (Abbildung 3.26 B). Dagegen wies die mit dem gleichen Serum immunopräzipitierte SRE3-DNA in uninfizierten Zellen einen Wert von $0,4 \pm 0,2$ auf. In infizierten Zellen war also an diese *CAV1*-Promotor-Region deutlich mehr SREBP1 gebunden als in uninfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in infizierten Zellen mittels anti-Acetyl-Histon-H4-Antikörper wesentlich weniger SRE3-DNA ($0,5 \pm 0,5\%$) als in uninfizierten Zellen ($3,0 \pm 0,6\%$) immunopräzipitiert (Abbildung 3.26 C). Dieses bedeutet, dass die H4-Histone in dem untersuchten *CAV1*-Promotorbereich infizierter Zellen weniger als die H4-Histone uninfizierter Zellen acetyliert waren. Hierdurch wird bestätigt, dass die untersuchte Promotoregion in *H. pylori*-infizierten Zellen weniger transkriptionell aktiv war als die in uninfizierten Zellen.

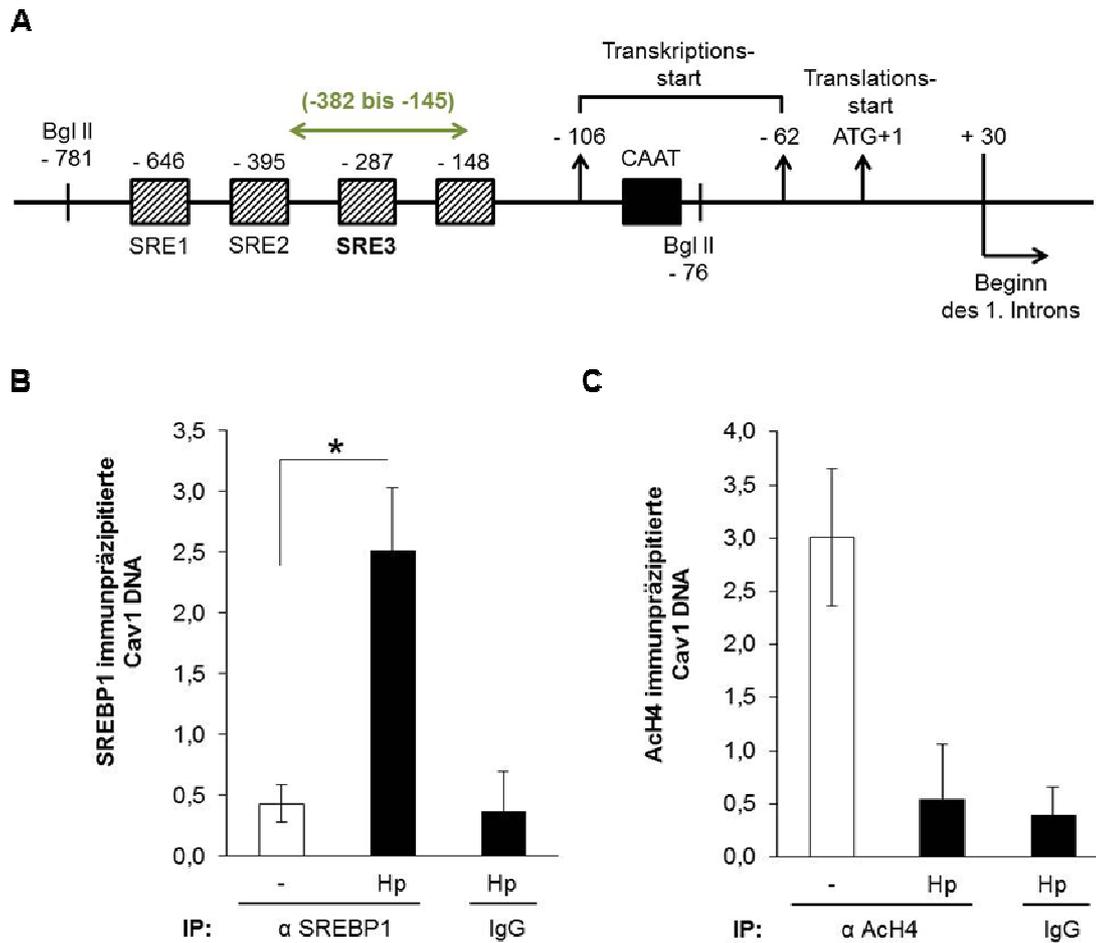


Abbildung 3.26 In einer *H. pylori*-Infektion ist die Bindung von SREBP1 an das *sterol response element 3* (SRE3) im proximalen humanen *CAV1*-Promotor verstärkt. MKN45-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert bzw. nichtinfiziert, die Nukleinsäuren mit den Proteinen durch Formaldehyd-Zugabe quervernetzt und anschließend lysiert. Die aus den Lysaten mittels anti-SREBP1- und anti-Acetyl-Histon-H4-Antikörper oder IgG (Negativkontrolle) immunopräzipitierte (IP) DNA wurde mittels RT-qPCR quantifiziert (ChIP). **A:** Schematische Darstellung des proximalen humanen *CAV1*-Promotors. Die amplifizierte Promotor-Region (-382 bis -145 bp) ist grün markiert. **B:** Quantitative Auswertung der mit SREBP1-Serum immunopräzipitierten DNA. **C:** Quantitative Auswertung der mittels Acetyl-H4 Histon Serum (AcH4) immunopräzipitierten DNA. Die in der RT-qPCR ermittelten CT-Werte der immunopräzipitierten DNA wurden auf die CT-Werte der Input-DNA normalisiert. Relative Induktionswerte und sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Die Daten stellen Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dar.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass SREBP1 in *H. pylori*-infizierten Zellen verstärkt an die SRE3-Sequenz im *CAV1*-Promotor bindet und somit die Transkription des *CAV1*-Gens reprimiert.

3.2.7.3 Nachweis der SREBP1-Bindung an SRE3-Region im humanen CAV1-Promotor mittels EMSA

Zusätzlich wurde die Bindung des 68 kDa großen SREBP1-Fragments an die SRE3-Sequenz im humanen CAV1-Promotor mit Hilfe eines Gelretardierungstests (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) wie unter 2.2.4.11 beschrieben analysiert. Hierzu wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid, welches den SRE3-Sequenzabschnitt (-287 bis -261 bp) des humanen CAV1-Promotors umfasste (Abbildung 3.27 A) mit Biotin markiert käuflich erworben. MKN45-Zellen wurden mit *H. pylori* G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert bzw. unbehandelt gelassen und anschließend fraktioniert (vgl. 2.2.5.2). Hierdurch gewonnene nukleäre Extrakte wurden mit den biotinmarkierten SRE3-Oligonukleotiden inkubiert. Zusätzlich wurden in zwei parallelen Ansätzen die nukleären Extrakte von infizierten Zellen entweder mit biotinmarkierten und identischen, aber unmarkierten SRE3-Oligonukleotiden oder mit biotinmarkierten und unmarkierten mutierten SRE3-Oligonukleotiden inkubiert. Durch die Mutationen in den Oligonukleotiden sollte die Affinität des SREBP1 zur Zielsequenz drastisch reduziert werden wodurch diese Oligonukleotide nicht mehr als Kompetitoren dienen sollten. Die gebildeten SRE3-Protein-Komplexe wurden im nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gel separiert und wie unter 2.2.4.11.4 beschrieben visualisiert.

Eine Proteinbindung an die biotinmarkierten SRE3-Oligonukleotide war nur in nukleären Extrakten aus infizierten Zellen nachweisbar (Abbildung 3.27 B, Spur 2). Die detektierten SRE3-Protein-Komplexe wiesen eine Größe von etwa 70 kDa auf. Dies entspricht in etwa der Größe von aktiviertem SREBP1 (68 kDa). Die Proteinbindung wurde durch 100-fachen Überschuss an identischen, nichtmarkierten SRE3-Oligonukleotiden (SRE3-WT, Spur 3) aber nicht durch unmarkierte, mutierte SRE3-Oligonukleotide (SRE3-Mut, Spur 4) kompetitiert. Eine zusätzliche Westernblot Analyse (vgl. 2.2.5.6) der verwendeten nukleären Extrakte zeigte, dass das aktive 68 kDa große SREBP1-Fragment nur in nukleären Extrakten von infizierten Zellen vorhanden war (Abbildung 3.27 C). Diese Ergebnisse bestätigen, dass SREBP1 durch *H. pylori* aktiviert wird, woraufhin das aktive Spaltfragment in den Zellkern transportiert wird und an die SRE3-Region des CAV1-Promotors bindet.

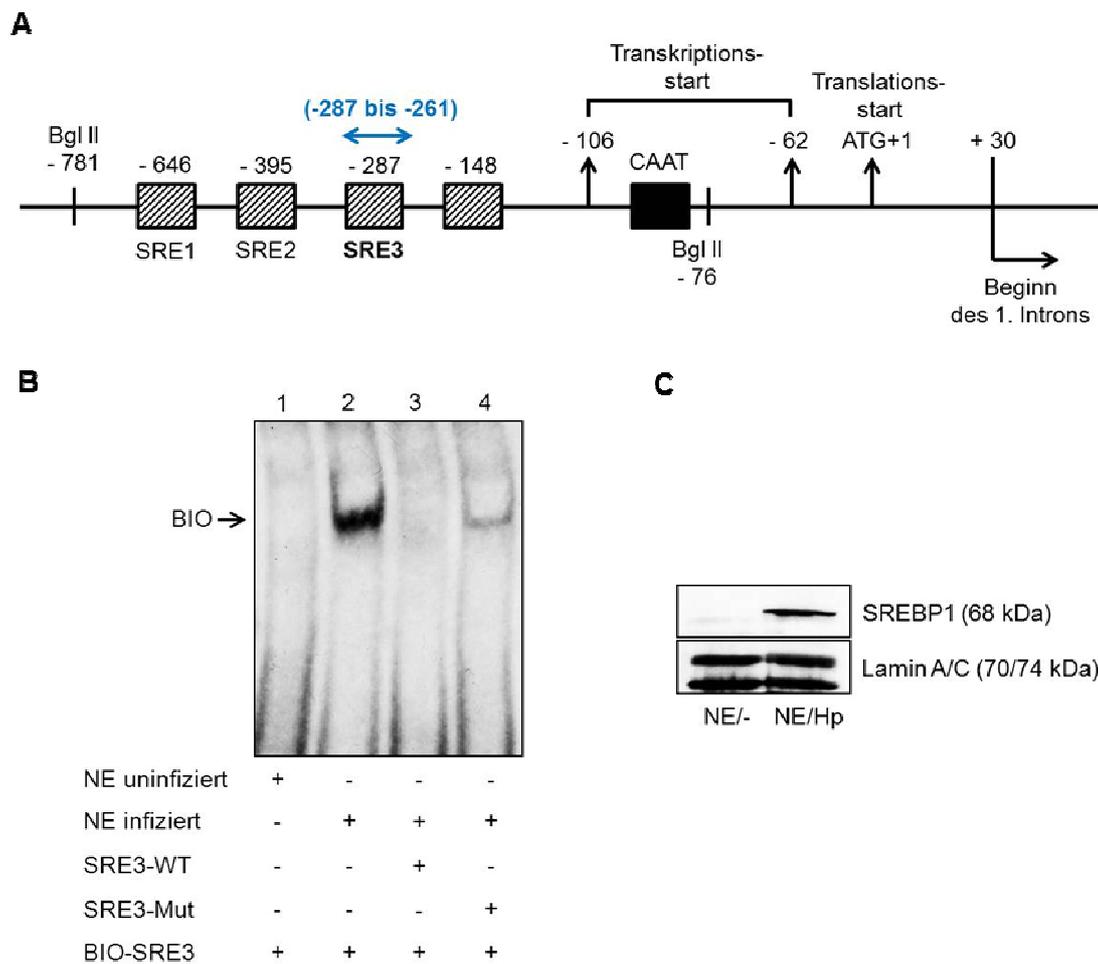


Abbildung 3.27 Bindung von aktiven SREBP1 an SRE3-Oligonukleotidsequenz im humanen CAV1-Promotor (EMSA). MKN45-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt (MOI=100) für 16 h infiziert bzw. nicht infiziert, lysiert und fraktioniert. Nukleäre Extrakte (NE) uninifizierter Zellen wurden nur mit den biotinmarkierten SRE-3-Oligonukleotiden (BIO-SRE3, Spur 1) inkubiert. Nukleäre Extrakte infizierter Zellen wurden entweder nur mit der biotinylierten SRE-3-Oligonukleotid Sequenz (BIO-SRE3, Spur 2) oder zusätzlich mit einem 100-fachem Überschuss an identischer unmarkierter SRE3-Oligonukleotid-DNA (SRE3-WT, Spur 3) bzw. unmarkierter mutierter SRE3-Oligonukleotid-DNA (SRE3-Mut, Spur 4) inkubiert. Die entstandenen DNA-Protein-Komplexe wurden mittels EMSA visualisiert. Parallel dazu wurden die nukleären Extrakte auf das Vorhandensein eines 68 kDa großen SREBP1-Fragments im Westernblot untersucht. **A:** Schematische Darstellung des humanen CAV1-Promotors. Die verwendete SRE3-Oligonukleotidsequenz entsprach dem blau markierten Promotorbereich. **B:** Repräsentative Aufnahme eines EMSA-Polyacrylamid-Gels. **C:** Repräsentativer Westernblot. Detektiert wurde das aktive, 68 kDa große SREBP1-Fragment in nukleären Extrakten von infizierten und uninifizierten Zellen. SREBP1 wurde mit polyklonalem anti-SREBP1-Antikörper visualisiert. Als Ladekontrolle wurde Lamin A/C mittels polyklonalen anti-Lamin A/C-Serum detektiert.

3.2.7.4 Detektion der SREBP1-Aktivität anhand der Expression SREBP1 positiv regulierter Gene

Für eine zusätzliche Bestätigung der oben beschriebenen Ergebnisse wurde die Expression von Genen wie 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase (*HMGCoAS*), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (*HMGCoAR*), *Low density* Lipoprotein-Rezeptor (*LDLR*), Acetyl-Coenzym A-Synthetase (*ACS*) analysiert, deren Expression durch SREBP1 positiv reguliert ist [214]. Hierzu wurden MKN45- und N87-Zellen mit *H. pylori* G27 wt, *H. pylori* G27 Δ *cagA* und *H. pylori* SS1 für 72 h infiziert bzw. nichtinfiziert. Aus allen Zellen wurde Gesamt-RNA extrahiert (vgl. 2.2.4.3.2), die nach Umschreiben in cDNA (vgl. 2.2.4.5) für die Quantifizierung der oben genannten Gene mittels RT-qPCR (vgl. 2.2.4.9) verwendet wurde.

In MKN45-Zellen führte die Infektion mit *H. pylori* G27 wt zum Anstieg von sowohl *HMGCoAS* (345±281%) als auch von *HMGCoAR* (741±686%) mRNA im Vergleich zu uninfizierten Zellen (Abbildung 3.28 oben). Dagegen war hier die Expression von *LDLR* (19±9%) signifikant reprimiert und die Expression von *ACS* (96±86%) war hier ebenso ein wenig reduziert im Vergleich zu uninfizierten Zellen. MKN45-Zellen, die mit *H. pylori* G27 Δ *cagA* infiziert waren, wiesen eine leichte Zunahme von *HMGCoAS* (105±25%), *HMGCoAR* (110±54%) sowie *ACS* (174±143%) im Vergleich zu uninfizierten MKN45-Zellen auf. Die Expression von *LDLR* war hier ebenso wie bei der Infektion mit *H. pylori* G27 wt reduziert. Dagegen wurde in *H. pylori* SS1 infizierten MKN45-Zellen eine signifikant höhere Expression sowohl von *HMGCoAS* (553±92%) als auch von *ACS* (499±142%) beobachtet. Die Expression von *HMGCoAR* (281±165%) und *LDLR* (133±28%) stieg ebenso an. In N87-Zellen bewirkte die Infektion mit *H. pylori* G27 wt einen Anstieg der mRNA von allen vier untersuchten Genen (Abbildung 3.28 unten). Die mRNA Menge von *ACS* betrug 1044±751% und die von *LDLR* sogar 1894±1100%. Ähnliche Ergebnisse wurden in N87-Zellen beobachtet, die mit *H. pylori* G27 Δ *cagA* infiziert wurden. Hier war die Expression von *ACS* (627±174%) sowie von *LDLR* (1837±548%) im Vergleich zu uninfizierten Zellen signifikant gestiegen. In N87-Zellen, die mit *H. pylori* SS1 infiziert wurden, konnte eine signifikant höhere Expression von *HMGCoAS* (740±88) im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle detektiert werden. Die mRNA von *HMGCoAR* (223±136%), *LDLR* (2108±1619%) und *ACS* (1529±1295%) war hier ebenso erhöht.

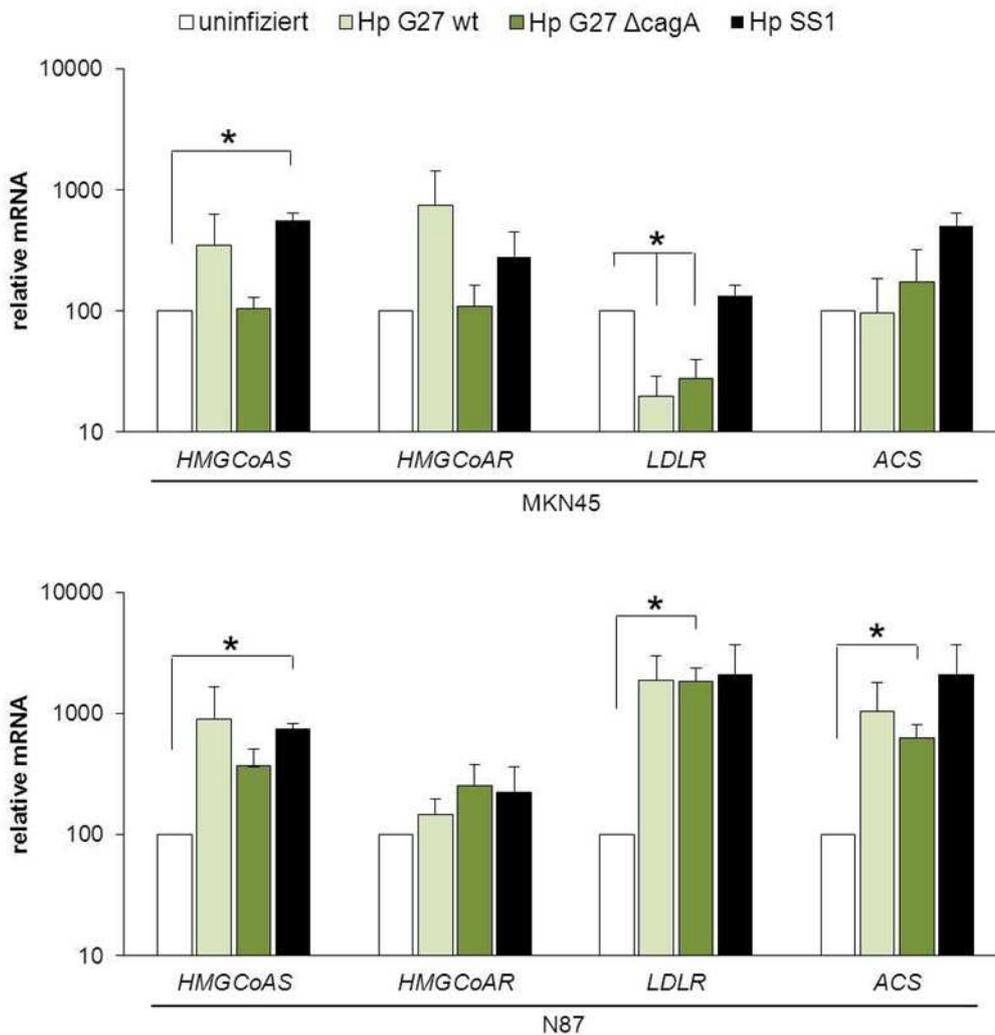


Abbildung 3.28 SREBP1-regulierte Gene sind in *H. pylori*-infizierten Zellen hochreguliert. MKN45- und N78-Zellen wurden mit *H. pylori* (Hp) G27 wt, G27 Δ cagA und SS1 (MOI=100) für 72 h infiziert bzw. nicht infiziert. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA extrahiert, die nach Umschreiben in cDNA zur Quantifizierung von *HMGCoAS*, *HMGCoAR*, *LDLR* und *ACS* mittels RT-qPCR eingesetzt wurde. Erhaltene CT-Werte wurden durch CT-Werte von β 2-Mikroglobulin (β 2M) normalisiert. Die Resultate sind als Prozent \pm Standardfehler in Bezug auf uninifizierte Zellen (100%) dargestellt. Die P Werte wurden mit dem Student t Test ermittelt, $p^* < 0,05$. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression der meisten durch SREBP1 positiv regulierten Gene in infizierten MKN45- und N87- erhöht war. Somit wurde die Aktivität von SREBP1 in infizierten Zellen zusätzlich bestätigt.

4 Diskussion

Die Rolle von Caveolin-1 bei einer *H. pylori*-Infektion und damit assoziierter Magenentzündung *in vivo* und *in vitro* wurde bisher nicht untersucht und lag daher im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Caveolin-1 ist das strukturelle Protein von flaschenförmigen Einstülpungen der Plasmamembran, den sogenannten „Caveolen“. Caveolin-1 und Caveolen sind Modulatoren einer Vielzahl von Infektionskrankheiten, da zum einen über Caveolin-1/Caveolen-vermittelte Endozytose Viren, bakterielle Toxine, sowie Bakterien in die Wirtszelle internalisiert werden. Zum anderen koordiniert Caveolin-1 die Immunantwort indem es die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen reguliert.

4.1 Bedeutung von Caveolin-1 in *H. pylori*-induzierter Magenentzündung *in vivo*

Infektionsstudien von Cav1-KO-Mäusen mit bakteriellen Pathogenen wie *Pseudomonas aeruginosa* [162], *Salmonella Typhimurium* [161], sowie Parasiten wie *Trypanosoma cruzi* [215] zeigten, dass diese Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber diesen Infekten im Vergleich zu WT-Mäusen aufweisen. Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine deregulierte natürliche oder adaptive Immunantwort, die mit dem Fehlen von Caveolin-1 einhergeht.

Im Einklang mit diesen Studien wiesen *H. pylori*-infizierte Cav1-KO-Mäuse eine signifikant stärkere, aktive, chronische Gastritis im Vergleich zu WT-Mäusen auf (vgl. Abbildung 3.3). Eine chronische Entzündung der Magenschleimhaut mit *H. pylori* ist durch Infiltration von polymorphonukleären Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, T- und B-Zellen sowie einer erhöhten Freisetzung von chemischen Lockstoffen und Entzündungszytokinen darunter IFN γ und TNF α gekennzeichnet [78]. Sowohl in infizierten Cav1-KO- als auch WT-Mäusen stieg die Expression von *Ifng* als auch *Tnfa* an, wies jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausgenotypen auf (vgl. Abbildung 3.4). IFN γ wird von aktivierten T-Zellen [183] sowie von natürlichen Killer-Zellen [82] produziert und dient unter anderem zur Aktivierung von Makrophagen [82, 184]. TNF α wird vorwiegend von aktivierten Makrophagen, aber auch natürlichen Killer-Zellen sowie aktivierten T-Zellen sezerniert [82]. Anhand des für die Makrophagen charakteristischen Oberflächenmarkers F4/80 wurde festgestellt, dass in die Magenschleimhaut infizierter Cav1-KO-Mäuse deutlich mehr Makrophagen eingewandert waren als in die von infizierten WT-Mäusen (vgl. Abbildung 3.5). Trotzdem war die *Tnfa*-Expression in den infizierten Cav1-

KO-Mäusen nicht höher als in infizierten WT-Mäusen. Dieses könnte auf eine fehlerhafte Aktivierung von Cav1-KO-Makrophagen hindeuten. Da Caveolin-1 besonders stark in Makrophagen exprimiert wird [216] ist anzunehmen, dass die Abwesenheit von Caveolin-1 in Cav1-KO-Makrophagen mit einer reduzierten Aktivierung der Makrophagen und einer daraus resultierenden *Tnfa*-Expression assoziiert ist. In einem ähnlichen Ansatz wurde eine reduzierte TNFa-Produktion in mit *Trypanosoma cruzi*-infizierten Cav1-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen detektiert [215].

Auffällig war, dass in das Magengewebe infizierter Cav1-KO-Mäuse im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen deutlich mehr B-Zellen rekrutiert wurden, was einerseits anhand der Expression des B-Zell-Oberflächenmarkers *Cd19* (vgl. Abbildung 3.4) und andererseits an der erhöhten Präsenz von intramukosalen B-Zell-Follikeln (vgl. Abbildung 3.2 B) festgestellt wurde. Die B-Zell-Follikel können als Beweis, für eine B-Zell-Aktivierung und -Reifung zu spezifischen antikörperproduzierenden Plasmazellen angesehen werden [217]. Spezifische Antikörper können durch Anlagerung an das erkannte Antigen (in diesem Fall *H. pylori*) zur Opsonisierung und somit zur verbesserten Phagozytose des Bakteriums durch Makrophagen oder zur Aktivierung des Komplement-Systems führen [82]. Daher könnte auch die in den Cav1-KO beobachtete reduzierte Anzahl an Kolonien-bildenden *H. pylori* (vgl. Abbildung 3.1) auf die erhöhte Präsenz von B-Zellen, sowie zuvor erwähnten Makrophagen zurück zu führen sein. B-Zellen können jedoch auch zu mukosalen Schäden beitragen. Laut einer Studie von Yamanishi *et al.* führt eine *H. pylori*-Infektion zur Aktivierung einer Subgruppe von B-Zellen, den sogenannten B1-Zellen, die autoreaktive Antikörper produzieren [104] und im Serum von *H. pylori*-infizierten Patienten sind anti-Parietalzellantikörper nachweisbar [218]. Der Antikörpertiter bzw. die Spezifität der vorhandenen Antikörper wurde zwar in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt, jedoch ist anzunehmen, dass der örtliche Verlust von Parietalzellen (vgl. Abbildung 3.2 D), der in infizierten Cav1-KO-Mäusen beobachtet wurde unter anderem auch auf eine erhöhte Infiltration von (anti-Parietalzellantikörperproduzierenden) B-Zellen zurückzuführen sein könnte.

Zudem wurde in infizierten Cav1-KO-Mäusen im Vergleich zu infizierten WT-Mäusen eine stark erhöhte Expression des Chemokins *Ccl5* (*Rantes*) festgestellt (vgl. Abbildung 3.4). RANTES wird in Magenepithel-Zellen nach einem direkten Kontakt mit *H. pylori* induziert [185] und dient der Rekrutierung von Monozyten, T-Zellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen zur Entzündungsstelle [85, 186, 187]. Zudem tragen diese Immunzellen nach ihrer Aktivierung zu einer zusätzlichen Sekretion dieses Chemokins bei [219]. Somit ist eine erhöhte RANTES-Produktion mit einer verstärkten Infiltration von Immunzellen zur Entzündungsstelle sowie damit verbundenen Gewebeschäden assoziiert.

Dieses entspricht auch den Ergebnissen der pathologischen Analyse, wonach infizierte Cav1-KO-Mäuse einen stärkeren Entzündungsgrad sowie Gewebeschäden aufwiesen. Eine erhöhte Expression von RANTES unterstützt die Entstehung und die Progression von Mamma-, Magen- sowie kolorektalen Karzinomen [220-222]. Durch Neutralisation von RANTES wird das Wachstum des Magentumors signifikant inhibiert [223]. Daher ist anzunehmen, dass die in Cav1-KO-Mäusen beobachtete erhöhte Expression von RANTES zusammen mit IFN γ , TNF α , B-Zellen, Makrophagen und anderen Immunzellen, Zytokinen sowie Chemokinen, deren Expression nicht untersucht wurde, zu pathologischen Veränderungen beitragen könnte, die über einen längeren Zeitraum die Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigen könnten.

Interessanterweise wiesen sowohl infizierte WT-Mäuse als auch Cav1-KO-Mäuse eine reduzierte Expression von *Cd86*, *Cd4* sowie *Cd25* auf (vgl. Abbildung 3.4). Vorallem in infizierten Cav1-KO-Mäusen waren alle drei Gene signifikant geringer exprimiert als in den uninfizierten Kontrollmäusen. Dieses Phänomen ist nur schwer zu erklären und wurde zum ersten Mal in dieser Arbeit beobachtet. CD86 wird an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen aber auch Makrophagen [189] exprimiert und dient als zweites kostimulierendes Signal zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen [82]. Eine chronische Infektion mit *H. pylori* und somit der andauernde Kontakt von dendritischen Zellen mit diesem Antigen kann die Entwicklung und Funktion von dendritischen Zellen beeinträchtigen [224]. Dies beruhte jedoch auf einer reduzierten Produktion von IL-12, während die CD86-Expression nicht betroffen war. Eine reduzierte Expression von CD86 bedeutet, dass naive T-Zellen nicht ausreichend aktiviert werden und folglich nicht klonal expandieren können [225]. Daher könnte auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verminderte Expression des CD4-T-Zelloberflächenmarker-Gens *Cd4* auf eine reduzierte Expression von *Cd86* und damit assoziierter verminderter Aktivierung sowie Proliferation von CD4-T-Zellen zurückzuführen sein. Desweiteren könnten bakterielle Faktoren von *H. pylori* zur Hemmung der CD4-T-Zellaktivierung bzw. Proliferation und somit *Cd4*-Expression beitragen. Die Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGT) von *H. pylori* inhibiert die Proliferation von aktivierten T-Zellen indem sie einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus induziert [226]. Diese Inhibition der T-Zell-Proliferation wird nicht von einer reduzierten IFN γ -Sekretion begleitet. Die L-Arginase von *H. pylori* bewirkt eine reduzierte Expression der CD3 ζ -Kette des T-Zellrezeptors (TCR) und somit ebenfalls eine Verminderung der T-Zellproliferation [227]. Die in dieser Arbeit beobachtete, reduzierte Expression des *Cd25* Oberflächenmarker-Gens von CD4⁺CD25⁺-regulatorischen T-Zellen ist ein weiterer Widerspruch zu den bisherigen Studien an *H. pylori*-infizierten Menschen und Mäusen. Diese Zellen schützen vor Entwicklung einer unkontrollierten Immunantwort, indem

sie die T-Zell-Proliferation und Produktion von Zytokinen kontaktabhängig hemmen [91, 92]. Die Entfernung von CD4⁺CD25⁺T-Zellen resultiert in einer verstärkten Entzündung und damit verbundenen mukosalen Schäden [91]. Es war jedoch sowohl die *Cd4* als auch die *Cd25* Expression in infizierten Mäusen etwa im gleichen Maß reduziert, daher könnte es sich hier um eine bis jetzt noch nicht beschriebene Hemmung der T-Zell-vermittelten adaptiven Immunantwort durch *H. pylori* handeln.

Darüber hinaus wurde in Cav1-KO-Mäusen jedoch nicht in WT-Mäusen eine starke foveoläre Hyperplasie (vgl. Abbildung 3.2 F) sowie ein örtlicher Verlust von Parietalzellen (vgl. Abbildung 3.2 D) festgestellt. Histologisch gesehen handelt sich bei der foveolären Hyperplasie um eine zunehmende Verlängerung sowie Verdickung von Foveolen (Magengrübchen) was auf ein hyperproliferatives Wachstum von schleimproduzierenden Zellen zurückzuführen ist [228, 229]. Die Cav1-KO-Mäuse weisen zwar bereits aufgrund des Fehlens des Caveolin-1, welches als negativer Regulator der Zellteilung gilt [230], hyperproliferatives Wachstum auf [180, 231], dieses war jedoch durch die Infektion mit *H. pylori* enorm verstärkt. Mit einer erhöhten Zellproliferation steigt jedoch auch das Risiko für die Entstehung von DNA-Mutationen [232]. Diese könnten zusätzlich während der *H. pylori*-Infektion aufgrund vermehrter DNA-Schäden und der Inhibition von DNA-Reparatursystemen begünstigt werden [233, 234] und so zu der Entstehung von preneoplastischen Veränderungen beitragen. Zudem ist der örtliche Verlust von Parietalzellen in infizierten Cav1-KO-Mäusen ein erstes Anzeichen für eine atrophische Gastritis [4] und bedeutet somit ein erhöhtes Potential für die Entstehung eines Adenokarzinoms [10, 68] in Cav1-KO-Mäusen.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, das Caveolin-1 vor Ausprägung einer starken chronischen *H. pylori*-Entzündung und den damit verbundenen mukosalen Schäden in infizierten Mäusen schützt.

4.2 Rolle von Caveolin-1 in CagA-induzierten Signalwegen *in vitro*

Zur näheren Charakterisierung der Caveolin-1-Funktion während einer chronischen Magenentzündung wurden Infektionsexperimente *in vitro* durchgeführt. Caveolin-1 unterstützt die Internalisierung von Pathogenen wie zum Beispiel *Salmonella* Typhimurium [199]. Auf die Adhäsion von *H. pylori* an Magenepithelzellen hatte Caveolin-1 jedoch keinen Einfluss, da sowohl Caveolin-1-exprimierende als auch -defiziente AGS-Zellen eine ähnlich hohe *H. pylori*-Anzahl auf ihrer Oberfläche aufwiesen (vgl. Abbildung 3.7 A, B). Auch hatte Caveolin-1 keinen Einfluss auf das Zellüberleben während einer *H. pylori*-Infektion. So waren

in beiden Zelltypen die überlebensfördernden Proteine ERK 1/2, Akt, p38 (vgl. Abbildung 3.6 B) gleichermaßen aktiviert. Desweiteren hatte Caveolin-1 ebenfalls keinen Effekt auf die globale Zellüberlebensrate, die mit steigender Bakterienanzahl sowohl in Caveolin-1-exprimierenden als auch in Caveolin-1-negativen AGS-Zellen ohne signifikante Unterschiede abnahm (vgl. Abbildung 3.6 A).

Der zur *in vitro* Infektion verwendete Stamm *H. pylori* G27 wt ermöglichte es auch CagA-induzierte Effekte zu untersuchen, da dieser Stamm im Vergleich zu dem *in vivo* verwendeten Stamm *H. pylori* SS1, über ein vollständiges Sekretionssystem verfügt und damit CagA in die infizierten Zellen translozieren kann. Infektionen mit CagA-positiven Stämmen sind mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von schwergradiger chronischer Gastritis, Atrophie der Magenschleimhaut und Adenokarzinoma assoziiert [52, 54, 55].

Das internalisierte CagA-Protein induziert im Magenepithel über den RAS/Raf/Mek/ERK/NFkB-Signalweg die Expression und Bildung von *IL-8* [235], welches als starker chemotaktischer Lockstoff für neutrophile Granulozyten fungiert und damit als Aktivator einer *H. pylori*-induzierten Immunantwort gilt [79]. In Caveolin-1-exprimierenden Zellen wurde eine signifikant niedrigere Expression der *IL-8* mRNA detektiert (vgl. Abbildung 3.8). Dieses Ergebnis bekräftigt die *in vivo* Beobachtungen, dass Caveolin-1 die Entwicklung einer starken Immunreaktion hemmt und zeigt, dass Caveolin-1 den CagA-induzierten Signalweg zur *IL-8* Expression inhibiert.

Ein weiterer Effekt, der in Folge der Internalisierung und Phosphorylierung des CagA-Proteins auftritt, ist die Induktion von langgesteckten nadelähnlichen Zellfortsätzen, dem sogenannten *humming bird* [117, 202]. In Caveolin-1-defizienten Zellen war dieses Phänomen signifikant stärker ausgeprägt, als in Caveolin-1-exprimierenden Zellen (vgl. Abbildung 3.9 A, B). Caveolin-1 schützt also die Zellen vor CagA-induziertem Stress. Die biologische Relevanz, dieses bis jetzt nur *in vitro* beobachteten Phänotyps, ist bis jetzt nicht geklärt. Es ist anzunehmen, dass solche morphologischen Veränderungen zusammen mit der CagA-induzierten Zerstörung der Zell-Zell-Barriere [48] die natürliche Anatomie der Magenschleimhaut schädigen. Dadurch könnte *H. pylori* einen besseren Zugang zu günstigen nährstoffreichen Nischen erlangen und somit leichter persistieren. Hinzu kommt, dass *humming bird* mit einer fehlerhaften Zellretraktion und somit einer gestörten Zellmigration assoziiert ist [47]. Daher könnten Caveolin-1-exprimierende Zellen in Gewebereparaturprozessen wie zum Beispiel Wundenschließung [236] aufgrund der geringeren Ausbildung von *humming bird* Morphologie einen Vorteil haben.

Die Bildung von *humming bird* ist mit der Dephosphorylierung von FAK am Tyrosin 397 (Tyr397), einer der Hauptkinasen von fokalen Adhäsionen der Zelle, assoziiert [46]. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Proteinmenge an Tyr397-phosphorylierter FAK mit zunehmender Infektionsdauer in Caveolin-1-losen Zellen im Vergleich zu Caveolin-1-exprimierenden Zellen deutlich abnahm (vgl. Abbildung 3.10 A, B). Dies steht im Einklang mit der verstärkten Ausprägung des *humming birds* in AGS/LV-Zellen. Es könnte bedeuten, dass Caveolin-1 entweder die Dephosphorylierung von FAK am Tyr397 inhibiert oder die Phosphorylierung von bereits dephosphorylierter FAK unterstützt, so dass keine deutlichen Unterschiede in der Proteinmenge an phosphoryliertem FAK detektierbar sind. Die Phosphorylierung von FAK am Tyr397 findet in Folge der Zusammenlagerung von Integrinen und deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix statt [237]. Die Tyr397-phosphorylierte FAK bietet eine Bindungsmöglichkeit für verschiedene Adaptorproteine sowie die Src-Kinase und ermöglicht somit unter anderem die Aktivierung von Signalwegen zur Erneuerung der fokalen Adhäsion der Zelle [238]. Caveolin-1 assoziiert mit β 1-Integrinen [239] und sowohl Tyr14-phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes Caveolin-1 ist in den fokalen Adhäsionen lokalisiert [169, 239]. Zudem bewirkt Tyr14-phosphoryliertes Caveolin-1 zusammen mit Galektin-3 die Stabilisierung von FAK sowie von α 5-Integrin und Paxilin innerhalb der fokalen Adhäsionen der Zelle und fördert somit die Erneuerung von fokalen Adhäsionen [169], die für eine Adhäsion sowie eine gerichtete Zellmigration unerlässlich sind [240]. In der vorliegenden Arbeit war Tyr14-phosphoryliertes Caveolin-1 bereits sechs Stunden nach der Infektion deutlich sichtbar und die Menge nahm mit der Infektionsdauer weiter zu (vgl. Abbildung 3.18 A). Auch zum Zeitpunkt 16 h nach der Infektion, zu dem der *humming bird* Phänotyp quantifiziert wurde, lag Caveolin-1 stark phosphoryliert vor. Daher ist vorstellbar, dass Caveolin-1 durch die Interaktion mit Integrinen sowie anderen Proteinen der fokalen Adhäsionen die Phosphorylierung von FAK und somit auch die Erneuerung der fokalen Adhäsionen der Zelle unterstützt und damit den *humming bird* Phänotyp inhibiert. Der genaue Mechanismus muss jedoch noch näher untersucht werden.

Caveolin-1 ist ein multifunktionales Protein und Interaktionspartner von zahlreichen Proteinen. Durch weiterführende Experimente sollte festgestellt werden, über welche zusätzlichen Mechanismen Caveolin-1 CagA-induzierte nadelähnliche Zellfortsätze reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 weder die Internalisierung von CagA hemmt (vgl. Abbildung 3.11 A, B), noch mit *H. pylori* bzw. CagA direkt interagiert (vgl. Abbildung 3.12 A, B, 3.13). Daher ist die Reduktion des *humming birds* nicht auf eine zusätzliche mögliche Reduktion/Abschwächung des CagA-Toxins durch Caveolin-1 zurückzuführen. Mittels Ko-Immunopräzipitation und anschließender MALDI-MS-Analyse sollten direkte Interaktionspartner von Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion identifiziert und im

Bezug auf die Ausbildung des *humming bird* Phänotyps untersucht werden. Insgesamt fünf Proteinbanden wurden im Caveolin-1-Präzipitat infizierter AGS/Cav1-Zellen im Vergleich zu uninfizierten AGS/Cav1-Zellen stärker angereichert (vgl. Abbildung 3.14) und daher als Proteinbanden potentieller Caveolin-1-Interaktionspartner während einer *H. pylori*-Infektion in Betracht gezogen. Drei der fünf Banden wurden als Keratine identifiziert (vgl. Tabelle 3.2), was eher auf eine Verunreinigung der Proben hindeutete [241]. Bei zwei Proteinbanden handelte es sich um negative Regulatoren der kleinen Rho-GTPasen, den Schlüsselproteinen der Zellmorphologie [203, 204, 242]. Diese Banden beinhalteten Peptide welche Bestandteile eines Proteins „ähnlich zum GDP Dissoziationsinhibitor 2“ und die Transkriptionsvariante 4 des „p120 Rho-GTPase-aktivierenden Proteins 7“ DLC1 enthielten. Es liegen keine wissenschaftlichen Untersuchungen zum Verhältnis zwischen Caveolin-1 und dem Protein „ähnlich zum GDP Dissotiationsinhibitor 2“ vor. DLC1 dagegen ist ähnlich wie Caveolin-1 in Caveolen sowie in den fokalen Adhäsionen der Zelle lokalisiert [205, 206] und kann aufgrund eines Caveolin-1-bindenden Motivs direkt mit Caveolin-1 interagieren [205]. Aus diesen Gründen wurde DLC1v4 weiter experimentell analysiert.

Mit einer zusätzlichen Ko-Immunopräzipitation unter der Verwendung spezifischer anti-DLC1- sowie anti-Caveolin-1-Antikörper wurde bestätigt, dass Caveolin-1 und DLC1v4 während einer *H. pylori*-Infektion verstärkt interagieren (vgl. Abbildung 3.15 A, B, C). DLC1v4 interagiert nicht nur mit unphosphoryliertem, sondern auch mit phosphoryliertem Caveolin-1, da sowohl im DLC1- als auch im Caveolin-1-Immunopräzipitat von Lysaten infizierter Zellen mittels anti-Caveolin-1 Antikörper eine etwa 24 kDa große Bande detektiert wurde, die der Größe von phosphoryliertem Caveolin-1 entsprach (vgl. Abbildung 3.15 B, C). Die Analyse der mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen bestätigte weiterhin DLC1v4 als potentiellen Interaktionspartner da die vollständige DLC1-Variante (Variante 1) nur in HEK293-Zellen exprimiert wurde (vgl. Abbildung 3.16 A). Um eine nähere Analyse des DLC1v4 hinsichtlich des *humming bird* Phänotyps durchführen zu können, wurde DLC1v4 in den pTarget-Expressionsvektor kloniert und erfolgreich überexprimiert (vgl. Abbildung 3.16 B). Das überexprimierte DLC1v4-Protein konnte jedoch die Bildung von langgestreckten nadelähnlichen Strukturen in infizierten AGS-Zellen nicht inhibieren (vgl. Abbildung 3.17 A, B). Als Erklärung dafür kann eine nähere Untersuchung der RhoA-, Rac1-, Cdc42-GTPase-Aktivität in den ursprünglichen zur *humming bird* Analyse verwendeten AGS/LV- sowie AGS/Cav1-Zellen dienen. Diese ergab, dass sowohl in infizierten Caveolin-1-defizienten, als auch -exprimierenden AGS-Zellen von den drei untersuchten GTPasen nur Rac1 minimal aktiviert wurde, jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen aufwies (vgl. Abbildung 3.19). Hinzu kam, dass das Cdc42-Gesamtprotein in beiden Zelltypen nur schwach exprimiert wurde (vgl. Abbildung 3.19) und damit die Analyse des aktiven Proteins

erschwerte. Zu den zusätzlichen Regulatoren der kleinen Rho-GTPasen gehören P-Src sowie P-Cav1 [168, 243]. Mit zunehmender Infektionsdauer nahm die Phosphorylierung der Src Kinase zu, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen (vgl. Abbildung 3.18 A, B). Auch Caveolin-1 wurde mit ansteigender Infektionsdauer zunehmend phosphoryliert (vgl. Abbildung 3.18 A). Jedoch trotz der starken Phosphorylierung insbesondere zu dem Zeitpunkt von 16 h, der dem Zeitpunkt der Analysen der GTPase-Aktivitäten sowie des *humming birds* entsprach, konnte kein Unterschied in der Aktivierung der untersuchten GTPasen in den AGS/Cav1- im Vergleich zu AGS/LV-Zellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.19). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Studie von Bourzac *et al.* und bestätigen, dass *H. pylori* G27 wenn überhaupt nur ein schwacher Aktivator der kleinen GTPasen ist und daher der *humming bird* Phänotyp nicht über die Regulation der Aktivität der kleinen GTPasen reguliert werden kann [47]. Somit konnte auch in DLC1v4-überexprimierten Zellen die Induktion des *humming bird* Phänotyps nicht verhindert werden.

Das Vorhandensein signifikant erhöhter Mengen an flächig ausgebreiteten Zellen bei der Überexpression von DLC1v4 (vgl. Abbildung 3.17 C) deutet jedoch darauf hin, dass die Zellen ähnlich wie Caveolin-1-exprimierende Zellen [244] besser adhärten. Der molekulare Hintergrund dieses Phänotyps wurde zwar in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, kann aber auf die direkte Interaktion des DLC1 mit FAK sowie anderen Proteinen der fokalen Adhäsionen wie Talin und Tensin [205-207] und der damit verbundenen Aufbau (Assemblierung) bzw. Abbau (Disassemblierung) von fokalen Adhäsionen zurückzuführen sein. Obwohl AGS-Zellen über eine endogene DLC1v4-Expression verfügen, war diese morphologische Veränderung erst nach der DLC1v4-Überexpression sichtbar. Dies könnte bedeuten, dass die flächig ausgebreitete Zellmorphologie in AGS-Zellen erst bei einer gewissen DLC1v4-Proteinmenge oder wie in den AGS/Cav1-Zellen durch Interaktion des DLC1v4 mit Caveolin-1 begünstigt wird. Dieses müsste jedoch noch in weiteren Versuchen genauer analysiert werden.

Anhand der bezüglich des *humming birds* gewonnenen Ergebnisse wurde folgender, vereinfachter molekularer Mechanismus von Caveolin-1 zum Schutz vor *humming bird* und zur Stabilisierung der Zellmorphologie während einer *H. pylori*-Infektion entwickelt: In Caveolin-1-exprimierenden Zellen (Abbildung 4.1, rechts) wird Caveolin-1 während der *H. pylori*-Infektion durch P-Src phosphoryliert. Phosphoryliertes Caveolin-1 stabilisiert die FAK und α/β -Integrine innerhalb der fokalen Adhäsionen und unterstützt dadurch die Phosphorylierung von FAK. Zudem kommt es zu einer verstärkten Bindung von DLC1v4 an Caveolin-1 und damit zur Stabilisierung der Zelladhäsion und einer flächig ausgebreiteten

Zellmorphologie. In Zellen ohne Caveolin-1 (Abbildung 4.1 links) kann FAK nicht stabilisiert werden und wird zunehmend dephosphoryliert. Somit kommt es zu einer erhöhten Bildung des *humming bird* Phänotyps.

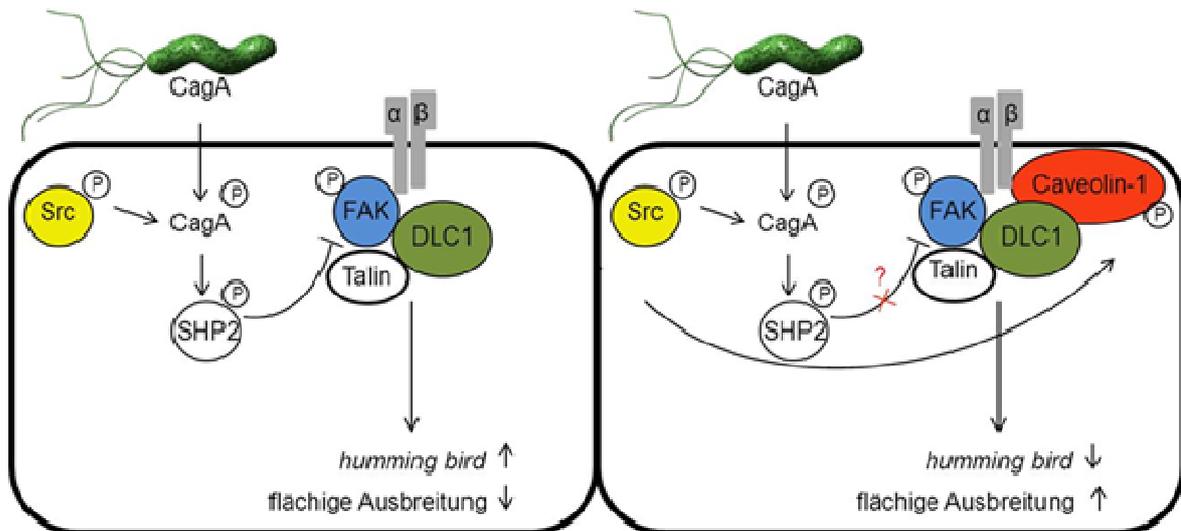


Abbildung 4. 1 Möglicher molekularer Mechanismus zur Stabilisierung der flächig ausgebreiteten Zellmorphologie und Schutz vor *humming bird* während einer *H. pylori*-Infektion. **links:** In Caveolin-1-losen Zellen, kann FAK nicht innerhalb der fokalen Adhäsionen stabilisiert werden und es kommt zur zunehmenden FAK-Dephosphorylierung durch P-SHP2 und *humming bird*. **rechts:** In Caveolin-1-exprimierenden-Zellen wird Caveolin-1 durch P-Src phosphoryliert und kann dadurch die FAK und αβ-Integrine innerhalb der fokalen Adhäsionen stabilisieren und somit weitere Phosphorylierung von FAK sichern. Durch eine verstärkte Interaktion von Caveolin-1 mit DLC1 wird auch die flächige Morphologie und Adhäsion der Zelle unterstützt.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass Caveolin-1 die CagA-aktivierte Signalwege zur Induktion der *IL-8* Expression und der morphologischen Veränderungen hemmt und durch eine verstärkte Interaktion mit DLC1v4 die flächig ausgebreitete Zellmorphologie stabilisiert.

4.3 Regulation der Caveolin-1-Expression während einer *H. pylori*-Infektion

Während einer *H. pylori*-Infektion kommt es sowohl zur Aktivierung als auch zur Repression von zahlreichen Genen [208, 209]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die *Cav1*-Expression während der *H. pylori*-Infektion reguliert wird. In infizierten WT-Mäusen (vgl. Abbildung 3.20) als auch in infizierten MDCK-, MKN45, N87-Zellen (vgl. Abbildung 3.21) war Caveolin-1 mRNA im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen herunterreguliert. Eine zusätzliche Verifizierung der Caveolin1-Expression in Zellen, die mit den CagA-negativen *H. pylori* G27 Δ cagA- sowie CagA-Internalisierungsdefizienten *H. pylori* SS1-Stämmen infiziert worden waren, ergab ähnliche Ergebnisse (vgl. Abbildung 3.23) und bestätigte gleichzeitig, dass die, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtete, Abnahme der *Cav1* mRNA CagA-unabhängig war. Die Repression der Caveolin-1-Expression fand auf transkriptioneller Ebene statt, da die Aktivität des humanen *CAV1*-Promotors sowohl in infizierten MKN45- als auch in HEK293-Zellen signifikant reduziert war (vgl. Abbildung 3.24 A, B). Die Expression der Stress- bzw. CagA-induzierbaren Positivkontrolle SeRE wurde in infizierten Zellen wie erwartet aktiviert, während die Expression der Negativkontrolle, des BSEP-Enhancers, unverändert blieb (vgl. Abbildung 3.24 A, B). Auch die Menge an Caveolin-1-Protein nahm in MKN45- und N87-Zellen mit zunehmender Infektionsdauer deutlich ab (vgl. Abbildung 3.22) In MDCK-Zellen fiel die Reduktion der Caveolin-1 Menge nicht so drastisch aus (vgl. Abbildung 3.22). Da jedoch nicht nur die Expression von Genen [245], sondern auch die posttranslationale Modifikation [246] sowie der Abbau der Genprodukte [247, 248] gewebespezifisch reguliert werden, könnten diese Unterschiede gewebespezifisch sein. Zudem kann eine Proteindegradation je nach Art des Proteins in zeitlichen Abständen von wenigen Minuten bis Tagen oder sogar Wochen stattfinden [249]. Daher ist vorstellbar, dass in MDCK-Zellen, die aus einer Hundniere abstammen, das Caveolin-1-Protein langsamer abgebaut wird als in den Zelllinien MKN45 und N87, welche aus humanen Magenmetastasen stammen. Auf diese Weise könnten trotz einer reduzierten mRNA-Expression auch nach Tagen, keine deutlichen Unterschiede in der Caveolin-1-Proteinmenge beobachtet werden.

Eine Reduktion der *Cav1*-Expression in Folge einer bakteriellen Infektion wurde bis jetzt nur im Gehirn von mit *Haemophilus parasuis*-infizierten Schweinen beschrieben [250]. Dagegen wird eine reduzierte Expression oder sogar der komplette Verlust von Caveolin-1 immer häufiger in primären Tumoren wie zum Beispiel Eierstock-, Dickdarm- sowie Magentumoren detektiert [172, 174, 175]. Der Verlust von Caveolin-1 in diesen Tumoren ist mit einer erhöhten Zellproliferation sowie dem Verlust von Zell-Zellkontakten assoziiert [251, 252].

Entsprechend wiesen Cav1-KO-Mäuse eine foveoläre Hyperplasie auf, die durch *H. pylori*-Infektion deutlich verstärkt wurde. Obwohl die Expression von Cav1 in infizierten WT-Mäusen drastisch reduziert war, zeigten diese Mäuse nicht die identischen pathologischen Veränderungen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in WT-Mäusen zwar die Cav1-Expression reduziert, jedoch nicht komplett verloren war. Weder in der Magenschleimhaut infizierter Cav1-KO- noch WT-Mäuse wurden Magenkarzinome festgestellt. Die Herunterregulation der Cav1-Expression in den WT-Mäusen könnte jedoch ein Zeichen für den Beginn der Transition einer chronischen Infektion ins preneoplastische Stadium sein.

Es ist bekannt, dass die Transkription des humanen CAV1-Gens beispielweise durch das Onkogen C-Myc [176], sowie in der S-Phase des Zellzyklus durch die Transkriptionsfaktoren SP1, E2F/Dp-1 und p53 [177, 178] reprimiert werden kann. Bei Mangel an intrazellulärem Cholesterin bindet SREBP1 an SRE-Regionen im humanen CAV1-Promotor und inhibiert die CAV1 mRNA-Expression [1]. *H. pylori* ist Cholesterin-auxotroph [107]. Es extrahiert das Cholesterin seines Wirtes um es nach der Glykosylierung in die eigene Membran einzubauen und somit unter anderem der Phagozytose durch antigenpräsentierende Zellen sowie der Aktivierung von T-Zellen zu entkommen [107]. Dadurch könnte es während einer *H. pylori*-Infektion zu einem Cholesterinmangel kommen. Der induzierte Cholesterinmangel würde wiederum zur proteolytischen Spaltung des SREBP1 Vorläuferproteins und dadurch zur Aktivierung von SREBP1 führen. Aus diesem Grund wurde SREBP1 als potentieller Repressor des Caveolin-1 Gens näher betrachtet.

In infizierten MKN45-Zellen war bereits sechs Stunden nach der Infektion das aktive Spaltfragment von SREBP1 vorhanden und die Menge nahm mit der Infektionszeit weiter zu (vgl. Abbildung 3.25). Darüberhinaus konnte in infizierten MKN45-Zellen deutlich mehr Bindung von SREBP1 an die SRE3-Region des CAV1-Promotors im Vergleich zu uninfizierten Zellen detektiert werden (vgl. Abbildung 3.26 A, B). Entsprechend war die untersuchte Caveolin-1-Promotorregion in infizierten Zellen weniger transkriptionell aktiv als in uninfizierten Zellen was sich auch in einer geringeren Acetylierung des H4 Histons widerspiegelte (vgl. Abbildung 3.26 A, C). Eine nähere Analyse ergab, dass das aktive SREBP1-Fragment nur in Kernextrakten von infizierten Zellen vorzufinden war (vgl. Abbildung 3.27 C). Zudem wurde nur in Kernextrakten infizierter MKN45-Zellen eine Bindung des SREBP1-Proteins an biotinmarkierte SRE3-Oligonukleotidsequenzen festgestellt (vgl. Abbildung 3.27 A, B). Diese Bindung war spezifisch, da sie durch identische unmarkierte aber nicht durch mutierte unmarkierte Oligonukleotide kompetitiert werden konnte. Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SREBP1 während einer *H. pylori*-Infektion aktiviert und

in den Zellkern transloziert wird wo es an den Caveolin-1-Promotor bindet und dadurch die *Cav1*-Expression inhibiert.

SREBP1 ist nicht nur ein negativer Regulator des *Cav1*-Gens, sondern auch ein positiver Regulator der Gene der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Synthase (*HMGCoAS*), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (*HMGCoAR*), *Low density* Lipoprotein-Rezeptor (*LDLR*) und Acetyl-Coenzym A-Synthetase (*ACS*), die für die Cholesterinsynthese zuständig sind [214]. Um einerseits die Aktivität von SREBP1 zusätzlich zu bestätigen und andererseits um feststellen zu können, ob die SREBP1-Aktivierung CagA-abhängig war oder nicht, wurde die Expression dieser Gene in MKN45- und N87-Zellen untersucht, die mit *H. pylori* G27 wt, G27 Δ cagA sowie SS1 infiziert worden waren. In MKN45-Zellen, die mit *H. pylori* SS1 infiziert worden waren, war die Expression aller untersuchten Gene aktiviert (vgl. Abbildung 3.28 A). Auch in den mit *H. pylori* G27 wt- und Δ cagA- infizierten MKN45-Zellen waren die meisten untersuchten Gene bis auf *LDLR*, das sogar signifikant reduziert war, induziert (vgl. Abbildung 3.28 A). Dies schien jedoch nicht stammspezifisch sondern eher zellspezifisch bedingt zu sein, da in N87-Zellen jeder verwendete *H. pylori*-Stamm eine Induktion von allen vier Genen bewirkte (vgl. Abbildung 3.28 B). Da eine *H. pylori*-Infektion mit einem hohen zellulärem Stress sowie mitochondrialen Schäden [253] einhergeht, ist vorstellbar, dass MKN45-Zellen auf solch einen Stress empfindlicher als N87-Zellen reagieren. Dadurch könnte in diesen Zellen der organellenstressaktivierte Repressor des *LDLR*-Promotors, ATF3 [254] bevorzugt aktiviert werden und durch eine stärkere Interaktion mit dem *LDLR*-Promotor auch während einer gleichzeitigen Bindung des SREBP1 an diesen Promotor, die Expression des *LDLR* reprimieren. Insgesamt war jedoch die Mehrheit der SREBP1 positiv regulierten Gene induziert, was zusätzlich bestätigte, dass SREBP1 während einer *H. pylori*-Infektion aktiviert ist. Die Aktivierung ist CagA-unabhängig da sowohl ein CagA-defizienter *H. pylori*-Stamm als auch der zur CagA-Translokation unfähige *H. pylori*-Stamm SS1 zur Induktion der SREBP1-aktivierten Gene führten.

Hiermit wurde zum ersten Mal eine Aktivierung von SREBP1 in Folge einer *H. pylori*-Infektion beschrieben. Die damit verbundene Reduktion der *Cav1*-Expression könnte *H. pylori* als Strategie dienen, um die in dieser Arbeit beobachteten Hemmung von CagA-induzierten Signalwegen durch Caveolin-1 (*IL-8*-Expression und Bildung von *humming bird*) zu unterbinden um so die Wirkung der Virulenzfaktoren (z.B. CagA) auf Signalwege und die damit assoziierte Pathogenese zu unterstützen.

5 Zusammenfassung

Caveolin-1, ein integrales Membranprotein in Zellen der Magenschleimhaut dient als Pathogenrezeptor und Regulator von Signalmolekülen, zur Kontrolle der Entzündungsreaktionen, der epithelialen Zellbarriere, der Zellproliferation und des Überlebens von Zellen. Eine chronische Entzündung der Magenschleimhaut mit *Helicobacter pylori* erhöht das Risiko für die Entstehung von schwerer atrophischer Gastritis, Zwölffingerdarmgeschwüren und schließlich Magenkarzinomen. In den meisten Magenkarzinomen ist die Expression von Caveolin-1 herunterreguliert. Die Funktion des Caveolin-1 in der *H. pylori*-induzierten Gastritis und damit assoziierten Pathogenese des Magenkarzinoms ist unbekannt und wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die mit *H. pylori* SS1-infizierten Caveolin-1-defizienten Mäuse eine signifikant stärkere chronische Gastritis im Vergleich zu WT-Mäusen aufwiesen. Diese war zum einen durch erhöhte mukosale Schäden, darunter verstärkte foveoläre Hyperplasie und Verlust von Parietalzellen, zum anderen durch eine stark erhöhte Sekretion des Chemokins RANTES, eine erhöhte Infiltration von B-Zellen und Makrophagen aber auch eine reduzierte Rekrutierung von CD4- sowie CD4⁺CD25⁺T-Zellen begleitet. Die Kolonisierungsrate von Cav1-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen mit *H. pylori* SS1 war signifikant reduziert, was vermutlich auf die verstärkte Immunantwort in diesen Mäusen zurück zu führen war.

Anhand von *in vitro* Infektionsexperimenten mit dem CagA-Internalisierungsfähigem *H. pylori*-Stamm G27 wurde gezeigt, dass Caveolin-1 weder die Adhäsion von *H. pylori* an die Magenepithelzellen noch das Überleben der infizierten Zellen beeinflusste. Caveolin-1 hemmte aber CagA-assoziierte Effekte wie die Induktion des proinflammatorischen Chemokins *IL-8* und die Bildung von langgestreckten Stressfilamenten (*humming bird*). Der molekulare Mechanismus der Hemmung des *humming bird* Phänotyps war aufgrund einer unveränderten CagA-Internalisierung sowie einer fehlenden Interaktion mit CagA nicht auf eine Inhibierung oder Abschwächung des CagA-Toxins durch Caveolin-1 zurückzuführen. Vielmehr war dieser Mechanismus mit einer positiven Regulation der Aktivität der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) durch Caveolin-1 assoziiert.

Zwei GTPase-Inhibitorproteine wurden als potentielle Interaktionspartner von Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion identifiziert, das Protein „ähnlich zum GDP Dissoziationsinhibitor 2“ und die Transkriptionsvariante 4 des „p120 Rho-GTPase-aktivierenden Proteins 7“ DLC1 (DLC1v4). Eine verstärkte Interaktion von DLC1v4 und

Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion konnte bestätigt werden. In DLC1v4 überexprimierenden, infizierten Zellen wurde die Bildung von *humming bird* nicht inhibiert, dafür jedoch dominierte in diesen Zellen eine flächig ausgebreitete Zellmorphologie. Somit trägt die verstärkte Interaktion von Caveolin-1 mit DLC1v4 zur Stabilisierung der flächig ausgebreiteten Zellmorphologie während einer *H. pylori*-Infektion bei.

Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl Src als auch Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion zunehmend phosphoryliert werden. Das Tyr14-phosphorylierte Caveolin-1 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der kleinen RhoA-, Rac1-, Cdc42-GTPasen und bestätigte, dass kleine Rho-GTPasen keine Rolle im molekularen Mechanismus zur Entstehung des *humming bird* Phänotyps spielen.

Die *Cav1* mRNA-Expression wurde sowohl in der Magenschleimhaut infizierter WT-Mäuse als auch in den Magenzelllinien CagA-unabhängig herunterreguliert. Als Transkriptionsrepressor des *Cav1*-Gens während der *H. pylori*-Infektion konnte SREBP1 bestätigt werden. SREBP1 wurde nur in infizierten Zellen aktiviert und band dort verstärkt an die SRE3-Region des Caveolin-1 Promotors. Entsprechend war die untersuchte *Cav1*-Promotorregion in infizierten Zellen weniger transkriptionsaktiv als in uninfizierten Zellen.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass Caveolin-1 während einer *H. pylori*-Infektion vor einer verstärkten Magenentzündung und der damit assoziierten Schädigung der Magenschleimhaut schützt, sowie CagA-induzierte Signalwege und die damit einhergehende Pathogenese der Entzündung inhibiert. Im Laufe der *H. pylori*-Infektion wird die Caveolin-1-Expression herunterreguliert um so möglicherweise die Wirkung von Virulenzfaktoren wie z.B. CagA auf die Signalwege der Wirtszelle zu fördern.

6 Literaturverzeichnis

1. Bist, A., Fielding, P.E., and Fielding, C.J. (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10693-10698.
2. Williams, T.M., and Lisanti, M.P. (2004). The caveolin proteins. *Genome biology* 5, 214.
3. Parton, R.G. (2001). Cell biology. Life without caveolae. *Science* 293, 2404-2405.
4. Fox, J.G., and Wang, T.C. (2007). Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *The Journal of clinical investigation* 117, 60-69.
5. Portal-Celhay, C., and Perez-Perez, G.I. (2006). Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical science* 110, 305-314.
6. de Reuse, H., and Bereswill, S. (2007). Ten years after the first *Helicobacter pylori* genome: comparative and functional genomics provide new insights in the variability and adaptability of a persistent pathogen. *FEMS immunology and medical microbiology* 50, 165-176.
7. 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.
8. Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., and Marshall, B.J. (1986). *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *Journal of clinical pathology* 39, 353-365.
9. Atherton, J.C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual review of pathology* 1, 63-96.
10. Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Jr., and Wilson, K.T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews* 23, 713-739.
11. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 61, 1-241.
12. Marshall, B.J., and Windsor, H.M. (2005). The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. *The Medical clinics of North America* 89, 313-344, viii.
13. Malaty, H.M., El-Kasabany, A., Graham, D.Y., Miller, C.C., Reddy, S.G., Srinivasan, S.R., Yamaoka, Y., and Berenson, G.S. (2002). Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 359, 931-935.
14. 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.

15. Lofgren, J.L., Whary, M.T., Ge, Z., Muthupalani, S., Taylor, N.S., Mobley, M., Potter, A., Varro, A., Eibach, D., Suerbaum, S., et al. (2011). Lack of commensal flora in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 140, 210-220.
16. Webb, P.M., Knight, T., Greaves, S., Wilson, A., Newell, D.G., Elder, J., and Forman, D. (1994). Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. *Bmj* 308, 750-753.
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. Kivi, M., Johansson, A.L., Reilly, M., and Tindberg, Y. (2005). *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. *Epidemiology and infection* 133, 645-652.
19. Kivi, M., and Tindberg, Y. (2006). *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? *Scandinavian journal of infectious diseases* 38, 407-417.
20. Hulten, K., Han, S.W., Enroth, H., Klein, P.D., Opekun, A.R., Gilman, R.H., Evans, D.G., Engstrand, L., Graham, D.Y., and El-Zaatari, F.A. (1996). *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 110, 1031-1035.
21. Clyne, M., Dolan, B., and Reeves, E.P. (2007). Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *FEMS microbiology letters* 268, 135-143.
22. Kusters, J.G., van Vliet, A.H., and Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews* 19, 449-490.
23. 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 12619-12624.
24. Israel, D.A., Salama, N., Krishna, U., Rieger, U.M., Atherton, J.C., Falkow, S., and Peek, R.M., Jr. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14625-14630.
25. Falush, D., Kraft, C., Taylor, N.S., Correa, P., Fox, J.G., Achtman, M., and Suerbaum, S. (2001). Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15056-15061.
26. Scott, D.R., Weeks, D., Hong, C., Postius, S., Melchers, K., and Sachs, G. (1998). The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 114, 58-70.
27. Scott, D.R., Marcus, E.A., Weeks, D.L., and Sachs, G. (2002). Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 123, 187-195.

28. Sachs, G., Kraut, J.A., Wen, Y., Feng, J., and Scott, D.R. (2006). Urea transport in bacteria: acid acclimation by gastric *Helicobacter* spp. *The Journal of membrane biology* 212, 71-82.
29. Beswick, E.J., Pinchuk, I.V., Minch, K., Suarez, G., Sierra, J.C., Yamaoka, Y., and Reyes, V.E. (2006). The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infection and immunity* 74, 1148-1155.
30. 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.
31. Stingl, K., Altendorf, K., and Bakker, E.P. (2002). Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends in microbiology* 10, 70-74.
32. Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H.O., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2004). The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5024-5029.
33. 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. *Journal of bacteriology* 175, 3278-3288.
34. 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. *Infection and immunity* 59, 2470-2475.
35. Eaton, K.A., Morgan, D.R., and Krakowka, S. (1992). Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Journal of medical microbiology* 37, 123-127.
36. Odenbreit, S. (2005). Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *International journal of medical microbiology : IJMM* 295, 317-324.
37. Magalhaes, A., and Reis, C.A. (2010). *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 43, 611-618.
38. Romero-Adrian, T.B., Leal-Montiel, J., Monsalve-Castillo, F., Mengual-Moreno, E., McGregor, E.G., Perini, L., and Antunez, A. (2010). *Helicobacter pylori*: bacterial factors and the role of cytokines in the immune response. *Current microbiology* 60, 143-155.
39. Rizzato, C., Torres, J., Plummer, M., Munoz, N., Franceschi, S., Camorlinga-Ponce, M., Fuentes-Panana, E.M., Canzian, F., and Kato, I. (2012). Variations in *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated genes and their influence in progression to gastric cancer: implications for prevention. *PloS one* 7, e29605.

40. Hatakeyama, M. (2002). Deregulation of SHP-2 tyrosine phosphatase by the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *The Keio journal of medicine* 51 Suppl 2, 26-32.
41. 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. *Cellular microbiology* 2, 155-164.
42. Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F., and Backert, S. (2002). Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 277, 6775-6778.
43. Poppe, M., Feller, S.M., Romer, G., and Wessler, S. (2007). Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26, 3462-3472.
44. 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. *The Journal of biological chemistry* 280, 23130-23137.
45. Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2002). SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295, 683-686.
46. 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. *Molecular and cellular biology* 26, 261-276.
47. Bourzac, K.M., Botham, C.M., and Guillemin, K. (2007). *Helicobacter pylori* CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infection and immunity* 75, 1203-1213.
48. 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.
49. Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., and Amieva, M.R. (2005). *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16339-16344.
50. Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T., and Sasakawa, C. (2005). Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *The Journal of experimental medicine* 202, 1235-1247.
51. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14648-14653.
52. Peek, R.M., Jr., Miller, G.G., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Zhao, X., Atherton, J.C., and Blaser, M.J. (1995). Heightened inflammatory response and cytokine expression

- in vivo to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 73, 760-770.
53. Figura, N., Guglielmetti, P., Rossolini, A., Barberi, A., Cusi, G., Musmanno, R.A., Russi, M., and Quaranta, S. (1989). Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *Journal of clinical microbiology* 27, 225-226.
 54. Kuipers, E.J., Perez-Perez, G.I., Meuwissen, S.G., and Blaser, M.J. (1995). *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *Journal of the National Cancer Institute* 87, 1777-1780.
 55. Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., Stemmermann, G.N., and Nomura, A. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer research* 55, 2111-2115.
 56. Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of biological chemistry* 267, 10570-10575.
 57. Pelicic, V., Reytrat, J.M., Sartori, L., Pagliaccia, C., Rappuoli, R., Telford, J.L., Montecucco, C., and Papini, E. (1999). *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology* 145 (Pt 8), 2043-2050.
 58. Amieva, M.R., and El-Omar, E.M. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134, 306-323.
 59. Gauthier, N.C., Ricci, V., Gounon, P., Doye, A., Tauc, M., Poujeol, P., and Boquet, P. (2004). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and actin cytoskeleton modulate chloride transport by channels formed by the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 9481-9489.
 60. Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and Zoratti, M. (1999). Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *The EMBO journal* 18, 5517-5527.
 61. 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*. *Journal of medical microbiology* 26, 93-99.
 62. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7727-7732.
 63. Galmiche, A., Rasso, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., de Thillot, 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. *The EMBO journal* 19, 6361-6370.

64. 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. *The Journal of biological chemistry* 269, 10566-10573.
65. Dixon, M.F. (2001). Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H.L.T. Mobley, G.L. Mendz and S.L. Hazell, eds. (Washington (DC)).
66. Sobala, G.M., Crabtree, J.E., Dixon, M.F., Schorah, C.J., Taylor, J.D., Rathbone, B.J., Heatley, R.V., and Axon, A.T. (1991). Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* 32, 1415-1418.
67. Eck, M., Schmausser, B., Scheller, K., Toksoy, A., Kraus, M., Menzel, T., Muller-Hermelink, H.K., and Gillitzer, R. (2000). CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clinical and experimental immunology* 122, 192-199.
68. Suerbaum, S., and Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *The New England journal of medicine* 347, 1175-1186.
69. el-Omar, E.M., Penman, I.D., Ardill, J.E., Chittajallu, R.S., Howie, C., and McColl, K.E. (1995). *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109, 681-691.
70. Malfertheiner, P. (2011). The intriguing relationship of *Helicobacter pylori* infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer. *Digestive diseases* 29, 459-464.
71. Du, M.Q., and Isaccson, P.G. (2002). Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *The lancet oncology* 3, 97-104.
72. Gisbert, J.P., and Calvet, X. (2011). Review article: common misconceptions in the management of *Helicobacter pylori*-associated gastric MALT-lymphoma. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 34, 1047-1062.
73. Prinz, C., Hafsi, N., and Volland, P. (2003). *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends in microbiology* 11, 134-138.
74. Peek, R.M., Jr., Fiske, C., and Wilson, K.T. (2010). Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiological reviews* 90, 831-858.
75. Hayashi, F., Means, T.K., and Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660-2669.
76. Hennessy, E.J., Parker, A.E., and O'Neill, L.A. (2010). Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nature reviews. Drug discovery* 9, 293-307.
77. Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G., and Podolsky, D.K. (2002). Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *The American journal of pathology* 160, 165-173.

78. Wilson, K.T., and Crabtree, J.E. (2007). Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology* 133, 288-308.
79. Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation* 84, 1045-1049.
80. Crowe, S.E., Alvarez, L., Dytoc, M., Hunt, R.H., Muller, M., Sherman, P., Patel, J., Jin, Y., and Ernst, P.B. (1995). Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gastroenterology* 108, 65-74.
81. Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., and Imanishi, J. (1996). *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 110, 1744-1752.
82. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. eds. (2002). *Immunologie*, 5. Edition (Spektrum Akademischer Verlag).
83. Matthews, G.M., and Butler, R.N. (2005). Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. *Helicobacter* 10, 298-306.
84. Cha, B., Lim, J.W., Kim, K.H., and Kim, H. (2011). 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2 suppresses RANTES expression by inhibiting NADPH oxidase activation in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 62, 167-174.
85. Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., and Goeddel, D.V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669-671.
86. Lundgren, A., Trollmo, C., Edebo, A., Svennerholm, A.M., and Lundin, B.S. (2005). *Helicobacter pylori*-specific CD4+ T cells home to and accumulate in the human *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Infection and immunity* 73, 5612-5619.
87. Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature reviews. Immunology* 8, 607-618.
88. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 136, 2348-2357.
89. Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 28, 445-489.
90. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
91. Rad, R., Brenner, L., Bauer, S., Schwendy, S., Layland, L., da Costa, C.P., Reindl, W., Dossumentkova, A., Friedrich, M., Saur, D., et al. (2006). CD25+/Foxp3+ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology* 131, 525-537.

92. Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 212, 8-27.
93. D'Ellos, M.M., Manghetti, M., De Carli, M., Costa, F., Baldari, C.T., Burrioni, D., Telford, J.L., Romagnani, S., and Del Prete, G. (1997). T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *Journal of immunology* 158, 962-967.
94. Sommer, F., Faller, G., Konturek, P., Kirchner, T., Hahn, E.G., Zeus, J., Rollinghoff, M., and Lohoff, M. (1998). Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infection and immunity* 66, 5543-5546.
95. Smythies, L.E., Waites, K.B., Lindsey, J.R., Harris, P.R., Ghiara, P., and Smith, P.D. (2000). *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *Journal of immunology* 165, 1022-1029.
96. Mattapallil, J.J., Dandekar, S., Canfield, D.R., and Solnick, J.V. (2000). A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology* 118, 307-315.
97. Ibraghimov, A., and Pappo, J. (2000). The immune response against *Helicobacter pylori*--a direct linkage to the development of gastroduodenal disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 1073-1077.
98. Bhuiyan, T.R., Qadri, F., Bardhan, P.K., Ahmad, M.M., Kindlund, B., Svennerholm, A.M., and Lundgren, A. (2008). Comparison of mucosal B- and T-cell responses in *Helicobacter pylori*-infected subjects in a developing and a developed country. *FEMS immunology and medical microbiology* 54, 70-79.
99. Nurgalieva, Z.Z., Conner, M.E., Opekun, A.R., Zheng, C.Q., Elliott, S.N., Ernst, P.B., Osato, M., Estes, M.K., and Graham, D.Y. (2005). B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infection and immunity* 73, 2999-3006.
100. Mattsson, A., Tinnert, A., Hamlet, A., Lonroth, H., Bolin, I., and Svennerholm, A.M. (1998). Specific antibodies in sera and gastric aspirates of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 5, 288-293.
101. Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S., and Rathbone, B.J. (1991). Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 338, 332-335.
102. Keenan, J., Neal, S., Allardyce, R., and Roake, J. (2002). Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection. *Vaccine* 20, 2981-2988.
103. Blanchard, T.G., Czinn, S.J., Redline, R.W., Sigmund, N., Harriman, G., and Nedrud, J.G. (1999). Antibody-independent protective mucosal immunity to gastric *helicobacter* infection in mice. *Cellular immunology* 191, 74-80.

104. Yamanishi, S., Iizumi, T., Watanabe, E., Shimizu, M., Kamiya, S., Nagata, K., Kumagai, Y., Fukunaga, Y., and Takahashi, H. (2006). Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease. *Infection and immunity* 74, 248-256.
105. Lundgren, A., Stromberg, E., Sjoling, A., Lindholm, C., Enarsson, K., Edebo, A., Johnsson, E., Suri-Payer, E., Larsson, P., Rudin, A., et al. (2005). Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infection and immunity* 73, 523-531.
106. Bergman, M.P., Engering, A., Smits, H.H., van Vliet, S.J., van Bodegraven, A.A., Wirth, H.P., Kapsenberg, M.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M., van Kooyk, Y., and Appelmek, B.J. (2004). *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine* 200, 979-990.
107. 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*. *Nature medicine* 12, 1030-1038.
108. Wang, J., Brooks, E.G., Bamford, K.B., Denning, T.L., Pappo, J., and Ernst, P.B. (2001). Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *Journal of immunology* 167, 926-934.
109. Nedrud, J.G. (1999). Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. *FEMS immunology and medical microbiology* 24, 243-250.
110. Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M.C., Robertson, B., Daskalopoulos, G., and Dixon, M.F. (1997). A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112, 1386-1397.
111. Akada, J.K., Ogura, K., Dailidienė, D., Dailide, G., Cheverud, J.M., and Berg, D.E. (2003). *Helicobacter pylori* tissue tropism: mouse-colonizing strains can target different gastric niches. *Microbiology* 149, 1901-1909.
112. Crabtree, J.E., Ferrero, R.L., and Kusters, J.G. (2002). The mouse colonizing *Helicobacter pylori* strain SS1 may lack a functional *cag* pathogenicity island. *Helicobacter* 7, 139-140; author reply 140-131.
113. van Doorn, N.E., Namavar, F., Sparrius, M., Stoof, J., van Rees, E.P., van Doorn, L.J., and Vandenbroucke-Grauls, C.M. (1999). *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infection and immunity* 67, 3040-3046.
114. Krueger, S., Roessner, A., and Kuester, D. (2011). Murine models of *H. pylori*-induced gastritis and gastric adenocarcinoma. *Pathology, research and practice* 207, 599-607.
115. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5791-5795.
116. 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. *Infection and immunity* 63, 94-98.
117. 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14559-14564.
 118. El-Etr, S.H., Mueller, A., Tompkins, L.S., Falkow, S., and Merrell, D.S. (2004). Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *The Journal of infectious diseases* 190, 1516-1523.
 119. Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Tang, Z., and Sargiacomo, M. (1994). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends in cell biology* 4, 231-235.
 120. Mundy, D.I., Machleidt, T., Ying, Y.S., Anderson, R.G., and Bloom, G.S. (2002). Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* 115, 4327-4339.
 121. Shin, J.S., Gao, Z., and Abraham, S.N. (2000). Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* 289, 785-788.
 122. Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N., and Stang, E. (1997). Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *The Journal of cell biology* 136, 137-154.
 123. Patel, H.H., and Insel, P.A. (2009). Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxidants & redox signaling* 11, 1357-1372.
 124. Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Molecular and cellular biology* 19, 7289-7304.
 125. Glenney, J.R., Jr., and Soppet, D. (1992). Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10517-10521.
 126. Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H.F., and Lisanti, M.P. (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 131-135.
 127. Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., and Lisanti, M.P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *The Journal of biological chemistry* 271, 2255-2261.
 128. Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P., and Lisanti, M.P. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable

- hetero-oligomeric complex in vivo. *The Journal of biological chemistry* 272, 29337-29346.
129. Harris, J., Werling, D., Koss, M., Monaghan, P., Taylor, G., and Howard, C.J. (2002). Expression of caveolin by bovine lymphocytes and antigen-presenting cells. *Immunology* 105, 190-195.
 130. Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
 131. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., et al. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-2452.
 132. Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., and Parton, R.G. (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8655-8659.
 133. Li, W.P., Liu, P., Pilcher, B.K., and Anderson, R.G. (2001). Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *Journal of cell science* 114, 1397-1408.
 134. Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., and Allard, J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of cell biology* 127, 1217-1232.
 135. Fujimoto, T. (1993). Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *The Journal of cell biology* 120, 1147-1157.
 136. Frank, P.G., Cheung, M.W., Pavlides, S., Llaverias, G., Park, D.S., and Lisanti, M.P. (2006). Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 291, H677-686.
 137. Orlandi, P.A., and Fishman, P.H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *The Journal of cell biology* 141, 905-915.
 138. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature cell biology* 3, 473-483.
 139. Eash, S., Querbes, W., and Atwood, W.J. (2004). Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of virology* 78, 11583-11590.
 140. Sukumaran, S.K., Quon, M.J., and Prasadarao, N.V. (2002). Escherichia coli K1 internalization via caveolae requires caveolin-1 and protein kinase Calpha interaction in human brain microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 50716-50724.
 141. Norkin, L.C., Wolfrom, S.A., and Stuart, E.S. (2001). Association of caveolin with Chlamydia trachomatis inclusions at early and late stages of infection. *Experimental cell research* 266, 229-238.

142. Shin, J.S., and Abraham, S.N. (2001). Co-option of endocytic functions of cellular caveolae by pathogens. *Immunology* 102, 2-7.
143. Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 185-194.
144. Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Parton, R.G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., and Simons, K. (1992). VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *The Journal of cell biology* 118, 1003-1014.
145. Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *The EMBO journal* 12, 1597-1605.
146. Li, S., Couet, J., and Lisanti, M.P. (1996). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 271, 29182-29190.
147. Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K.S., Sanders, M.C., and Lisanti, M.P. (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9407-9411.
148. Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T.V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Molecular biology of the cell* 6, 911-927.
149. Fernandez, I., Ying, Y., Albanesi, J., and Anderson, R.G. (2002). Mechanism of caveolin filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11193-11198.
150. Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., and Lisanti, M.P. (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *The Journal of biological chemistry* 272, 6525-6533.
151. Uittenbogaard, A., and Smart, E.J. (2000). Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *The Journal of biological chemistry* 275, 25595-25599.
152. Razani, B., Woodman, S.E., and Lisanti, M.P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological reviews* 54, 431-467.
153. Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M., and Lisanti, M.P. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *The Journal of biological chemistry* 271, 9690-9697.
154. Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J.E., Hansen, S.H., Nishimoto, I., and Lisanti, M.P. (1995). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *The Journal of biological chemistry* 270, 15693-15701.

155. Li, L., Ren, C.H., Tahir, S.A., Ren, C., and Thompson, T.C. (2003). Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Molecular and cellular biology* 23, 9389-9404.
156. Fang, K., Fu, W., Beardsley, A.R., Sun, X., Lisanti, M.P., and Liu, J. (2007). Overexpression of caveolin-1 inhibits endothelial cell proliferation by arresting the cell cycle at G0/G1 phase. *Cell cycle* 6, 199-204.
157. Grande-Garcia, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N.B., Waterman-Storer, C.M., Valdivielso, J.M., and del Pozo, M.A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *The Journal of cell biology* 177, 683-694.
158. Miotti, S., Tomassetti, A., Facetti, I., Sanna, E., Berno, V., and Canevari, S. (2005). Simultaneous expression of caveolin-1 and E-cadherin in ovarian carcinoma cells stabilizes adherens junctions through inhibition of src-related kinases. *The American journal of pathology* 167, 1411-1427.
159. Garrean, S., Gao, X.P., Brovkovich, V., Shimizu, J., Zhao, Y.Y., Vogel, S.M., and Malik, A.B. (2006). Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. *Journal of immunology* 177, 4853-4860.
160. Wang, X.M., Kim, H.P., Nakahira, K., Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2009). The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *Journal of immunology* 182, 3809-3818.
161. Medina, F.A., de Almeida, C.J., Dew, E., Li, J., Bonuccelli, G., Williams, T.M., Cohen, A.W., Pestell, R.G., Frank, P.G., Tanowitz, H.B., et al. (2006). Caveolin-1-deficient mice show defects in innate immunity and inflammatory immune response during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and immunity* 74, 6665-6674.
162. Gadjeva, M., Paradis-Bleau, C., Priebe, G.P., Fichorova, R., and Pier, G.B. (2010). Caveolin-1 modifies the immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of immunology* 184, 296-302.
163. Schlegel, A., Arvan, P., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. *Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. The Journal of biological chemistry* 276, 4398-4408.
164. Glenney, J.R., Jr. (1989). Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *The Journal of biological chemistry* 264, 20163-20166.
165. Li, S., Seitz, R., and Lisanti, M.P. (1996). Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *The Journal of biological chemistry* 271, 3863-3868.
166. Cao, H., Courchesne, W.E., and Mastick, C.C. (2002). A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *The Journal of biological chemistry* 277, 8771-8774.

167. Lee, H., Volonte, D., Galbiati, F., Iyengar, P., Lublin, D.M., Bregman, D.B., Wilson, M.T., Campos-Gonzalez, R., Bouzahzah, B., Pestell, R.G., et al. (2000). Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Molecular endocrinology* *14*, 1750-1775.
168. Joshi, B., Strugnell, S.S., Goetz, J.G., Kojic, L.D., Cox, M.E., Griffith, O.L., Chan, S.K., Jones, S.J., Leung, S.P., Masoudi, H., et al. (2008). Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer research* *68*, 8210-8220.
169. Goetz, J.G., Joshi, B., Lajoie, P., Strugnell, S.S., Scudamore, T., Kojic, L.D., and Nabi, I.R. (2008). Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *The Journal of cell biology* *180*, 1261-1275.
170. Williams, T.M., Cheung, M.W., Park, D.S., Razani, B., Cohen, A.W., Muller, W.J., Di Vizio, D., Chopra, N.G., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (2003). Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Molecular biology of the cell* *14*, 1027-1042.
171. Ho, C.C., Huang, P.H., Huang, H.Y., Chen, Y.H., Yang, P.C., and Hsu, S.M. (2002). Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *The American journal of pathology* *161*, 1647-1656.
172. Wiechen, K., Diatchenko, L., Agoulnik, A., Scharff, K.M., Schober, H., Arlt, K., Zhumabayeva, B., Siebert, P.D., Dietel, M., Schafer, R., et al. (2001). Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *The American journal of pathology* *159*, 1635-1643.
173. Koleske, A.J., Baltimore, D., and Lisanti, M.P. (1995). Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 1381-1385.
174. Burgermeister, E., Xing, X., Rocken, C., Juhasz, M., Chen, J., Hiber, M., Mair, K., Shatz, M., Liscovitch, M., Schmid, R.M., et al. (2007). Differential expression and function of caveolin-1 in human gastric cancer progression. *Cancer research* *67*, 8519-8526.
175. Bender, F.C., Reymond, M.A., Bron, C., and Quest, A.F. (2000). Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer research* *60*, 5870-5878.
176. Park, D.S., Razani, B., Lasorella, A., Schreiber-Agus, N., Pestell, R.G., Iavarone, A., and Lisanti, M.P. (2001). Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism. *Biochemistry* *40*, 3354-3362.
177. Fielding, C.J., Bist, A., and Fielding, P.E. (1999). Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* *38*, 2506-2513.
178. Bist, A., Fielding, C.J., and Fielding, P.E. (2000). p53 regulates caveolin gene transcription, cell cholesterol, and growth by a novel mechanism. *Biochemistry* *39*, 1966-1972.

179. Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J., and Covacci, A. (2002). c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular microbiology* 43, 971-980.
180. Prade, E., Tobiasch, M., Hitkova, I., Schaffer, I., Lian, F., Xing, X., Tanzer, M., Rauser, S., Walch, A., Feith, M., et al. (2012). Bile acids down-regulate caveolin-1 in esophageal epithelial cells through sterol responsive element-binding protein. *Molecular endocrinology* 26, 819-832.
181. Hafsi, N., Volland, P., Schwendy, S., Rad, R., Reindl, W., Gerhard, M., and Prinz, C. (2004). Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *Journal of immunology* 173, 1249-1257.
182. Low, J.S., Tao, Q., Ng, K.M., Goh, H.K., Shu, X.S., Woo, W.L., Ambinder, R.F., Srivastava, G., Shamay, M., Chan, A.T., et al. (2011). A novel isoform of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 suppresses tumor growth and is frequently silenced in multiple common tumors. *Oncogene* 30, 1923-1935.
183. Huse, M., Lillemeier, B.F., Kuhns, M.S., Chen, D.S., and Davis, M.M. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nature immunology* 7, 247-255.
184. Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A., and Stewart, T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259, 1739-1742.
185. Kudo, T., Lu, H., Wu, J.Y., Graham, D.Y., Casola, A., and Yamaoka, Y. (2005). Regulation of RANTES promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity* 73, 7602-7612.
186. Schroder, J.M., Kameyoshi, Y., and Christophers, E. (1994). RANTES, a novel eosinophil-chemotactic cytokine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 725, 91-103.
187. Mattoli, S., Ackerman, V., Vittori, E., and Marini, M. (1995). Mast cell chemotactic activity of RANTES. *Biochemical and biophysical research communications* 209, 316-321.
188. Cheng, W.L., Wang, C.S., Huang, Y.H., Tsai, M.M., Liang, Y., and Lin, K.H. (2011). Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22, 2267-2276.
189. Quiding-Jarbrink, M., Raghavan, S., and Sundquist, M. (2010). Enhanced M1 macrophage polarization in human *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS one* 5, e15018.
190. Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2004). CD25⁺ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *Journal of immunology* 173, 7259-7268.
191. Ashktorab, H., Dashwood, R.H., Dashwood, M.M., Zaidi, S.I., Hewitt, S.M., Green, W.R., Lee, E.L., Daremipouran, M., Nouraie, M., Malekzadeh, R., et al. (2008). H. pylori-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria. *Helicobacter* 13, 506-517.

192. Ding, S.Z., Minohara, Y., Fan, X.J., Wang, J., Reyes, V.E., Patel, J., Dirden-Kramer, B., Boldogh, I., Ernst, P.B., and Crowe, S.E. (2007). *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infection and immunity* 75, 4030-4039.
193. Timme, T.L., Goltsov, A., Tahir, S., Li, L., Wang, J., Ren, C., Johnston, R.N., and Thompson, T.C. (2000). Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 19, 3256-3265.
194. Kohno, M., Tanimura, S., and Ozaki, K. (2011). Targeting the extracellular signal-regulated kinase pathway in cancer therapy. *Biological & pharmaceutical bulletin* 34, 1781-1784.
195. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
196. Phong, M.S., Van Horn, R.D., Li, S., Tucker-Kellogg, G., Surana, U., and Ye, X.S. (2010). p38 mitogen-activated protein kinase promotes cell survival in response to DNA damage but is not required for the G(2) DNA damage checkpoint in human cancer cells. *Molecular and cellular biology* 30, 3816-3826.
197. Kuo, C.H., and Wang, W.C. (2003). Binding and internalization of *Helicobacter pylori* VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 303, 640-644.
198. Kowalski, M.P., and Pier, G.B. (2004). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *Journal of immunology* 172, 418-425.
199. Lim, J.S., Na, H.S., Lee, H.C., Choy, H.E., Park, S.C., Han, J.M., and Cho, K.A. (2009). Caveolae-mediated entry of *Salmonella Typhimurium* in a human M-cell model. *Biochemical and biophysical research communications* 390, 1322-1327.
200. Lai, C.H., Wang, H.J., Chang, Y.C., Hsieh, W.C., Lin, H.J., Tang, C.H., Sheu, J.J., Lin, C.J., Yang, M.S., Tseng, S.F., et al. (2011). *Helicobacter pylori* CagA-mediated IL-8 induction in gastric epithelial cells is cholesterol-dependent and requires the C-terminal tyrosine phosphorylation-containing domain. *FEMS microbiology letters* 323, 155-163.
201. 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. *Infection and immunity* 63, 1681-1687.
202. Moese, S., Selbach, M., Kwok, T., Brinkmann, V., Konig, W., Meyer, T.F., and Backert, S. (2004). *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infection and immunity* 72, 3646-3649.
203. Durkin, M.E., Yuan, B.Z., Zhou, X., Zimonjic, D.B., Lowy, D.R., Thorgeirsson, S.S., and Popescu, N.C. (2007). DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor. *Journal of cellular and molecular medicine* 11, 1185-1207.
204. Spiering, D., and Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell adhesion & migration* 5, 170-180.

205. Yam, J.W., Ko, F.C., Chan, C.Y., Jin, D.Y., and Ng, I.O. (2006). Interaction of deleted in liver cancer 1 with tensin2 in caveolae and implications in tumor suppression. *Cancer research* 66, 8367-8372.
206. Li, G., Du, X., Vass, W.C., Papageorge, A.G., Lowy, D.R., and Qian, X. (2011). Full activity of the deleted in liver cancer 1 (DLC1) tumor suppressor depends on an LD-like motif that binds talin and focal adhesion kinase (FAK). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 17129-17134.
207. Cao, X., Voss, C., Zhao, B., Kaneko, T., and Li, S.S. (2012). Differential regulation of the activity of deleted in liver cancer 1 (DLC1) by tensins controls cell migration and transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1455-1460.
208. Guillemin, K., Salama, N.R., Tompkins, L.S., and Falkow, S. (2002). Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15136-15141.
209. Peterson, A.J., Menheniott, T.R., O'Connor, L., Walduck, A.K., Fox, J.G., Kawakami, K., Minamoto, T., Ong, E.K., Wang, T.C., Judd, L.M., et al. (2010). *Helicobacter pylori* infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. *Gastroenterology* 139, 2005-2017.
210. Hirata, Y., Maeda, S., Mitsuno, Y., Tateishi, K., Yanai, A., Akanuma, M., Yoshida, H., Kawabe, T., Shiratori, Y., and Omata, M. (2002). *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 123, 1962-1971.
211. Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X., and Goldstein, J.L. (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77, 53-62.
212. Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* 109, 1125-1131.
213. Gorisch, S.M., Wachsmuth, M., Toth, K.F., Lichter, P., and Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *Journal of cell science* 118, 5825-5834.
214. Shimano, H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in lipid research* 40, 439-452.
215. Medina, F.A., Cohen, A.W., de Almeida, C.J., Nagajyothi, F., Braunstein, V.L., Teixeira, M.M., Tanowitz, H.B., and Lisanti, M.P. (2007). Immune dysfunction in caveolin-1 null mice following infection with *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9, 325-333.
216. Wang, X.M., Kim, H.P., Song, R., and Choi, A.M. (2006). Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34, 434-442.

217. Yakoob, M.Y., and Hussainy, A.S. (2010). Chronic gastritis and *Helicobacter pylori*: a histopathological study of gastric mucosal biopsies. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP* 20, 773-775.
218. Basso, D., Gallo, N., Zambon, C.F., Baron, M., Navaglia, F., Stockreiter, E., Di Mario, F., Rugge, M., and Plebani, M. (2000). Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection: role in gastric mucosal inflammation. *International journal of clinical & laboratory research* 30, 173-178.
219. Tahara, T., Shibata, T., Nakamura, M., Yamashita, H., Yoshioka, D., Hirata, I., and Arisawa, T. (2009). RANTES promoter genotype and gastric cancer risk in a Japanese population. *Anticancer research* 29, 4265-4269.
220. Soria, G., and Ben-Baruch, A. (2008). The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer letters* 267, 271-285.
221. Cambien, B., Richard-Fiardo, P., Karimjee, B.F., Martini, V., Ferrua, B., Pitard, B., Schmid-Antomarchi, H., and Schmid-Alliana, A. (2011). CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFRbeta in colorectal carcinoma. *PloS one* 6, e28842.
222. Kim, H.K., Song, K.S., Park, Y.S., Kang, Y.H., Lee, Y.J., Lee, K.R., Ryu, K.W., Bae, J.M., and Kim, S. (2003). Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 39, 184-191.
223. Sugasawa, H., Ichikura, T., Kinoshita, M., Ono, S., Majima, T., Tsujimoto, H., Chochi, K., Hiroi, S., Takayama, E., Saitoh, D., et al. (2008). Gastric cancer cells exploit CD4+ cell-derived CCL5 for their growth and prevention of CD8+ cell-involved tumor elimination. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 122, 2535-2541.
224. Mitchell, P., Germain, C., Fiori, P.L., Khamri, W., Foster, G.R., Ghosh, S., Lechler, R.I., Bamford, K.B., and Lombardi, G. (2007). Chronic exposure to *Helicobacter pylori* impairs dendritic cell function and inhibits Th1 development. *Infection and immunity* 75, 810-819.
225. Dahlen, E., Hedlund, G., and Dawe, K. (2000). Low CD86 expression in the nonobese diabetic mouse results in the impairment of both T cell activation and CTLA-4 up-regulation. *Journal of immunology* 164, 2444-2456.
226. Schmees, C., Prinz, C., Treptau, T., Rad, R., Hengst, L., Volland, P., Bauer, S., Brenner, L., Schmid, R.M., and Gerhard, M. (2007). Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 132, 1820-1833.
227. Zabaleta, J., McGee, D.J., Zea, A.H., Hernandez, C.P., Rodriguez, P.C., Sierra, R.A., Correa, P., and Ochoa, A.C. (2004). *Helicobacter pylori* arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *Journal of immunology* 173, 586-593.
228. Fragoso, A.C., Correia-Pinto, J., Carvalho, J.L., Dias, J.A., Troncoso, M.P., and Estevao-Costa, J. (2004). Ectopic pancreas and foveolar hyperplasia in a newborn: a unifying etiopathogenesis for gastric outlet obstruction. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 39, 92-94.

229. Buchta, Höper, and Sönnichsen eds. (2004). *Das zweite StEx Basiswissen klinische Medizin für Examen und Praxis*, 2. Edition (Springer-Verlag Heidelberg).
230. Galbiati, F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P.G., Zhu, L., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Molecular biology of the cell* *12*, 2229-2244.
231. Lee, H., Park, D.S., Razani, B., Russell, R.G., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (2002). Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *The American journal of pathology* *161*, 1357-1369.
232. Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., and Henderson, B.E. (1990). Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer research* *50*, 7415-7421.
233. Obst, B., Wagner, S., Sewing, K.F., and Beil, W. (2000). Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* *21*, 1111-1115.
234. Yao, Y., Tao, H., Park, D.I., Sepulveda, J.L., and Sepulveda, A.R. (2006). Demonstration and characterization of mutations induced by Helicobacter pylori organisms in gastric epithelial cells. *Helicobacter* *11*, 272-286.
235. Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W., and Backert, S. (2005). NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 9300-9305.
236. Kim, Y.W., Lee, W.H., Choi, S.M., Seo, Y.Y., Ahn, B.O., Kim, S.H., and Kim, S.G. (2012). DA6034 promotes gastric epithelial cell migration and wound-healing through the mTOR pathway. *Journal of gastroenterology and hepatology* *27*, 397-405.
237. Mitra, S.K., and Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology* *18*, 516-523.
238. van Nimwegen, M.J., and van de Water, B. (2007). Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochemical pharmacology* *73*, 597-609.
239. Boyd, N.D., Chan, B.M., and Petersen, N.O. (2003). Beta1 integrins are distributed in adhesion structures with fibronectin and caveolin and in coated pits. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* *81*, 335-348.
240. Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., and Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *International journal of cell biology* *2012*, 310616.
241. Lubec, G., and Afjehi-Sadat, L. (2007). Limitations and pitfalls in protein identification by mass spectrometry. *Chemical reviews* *107*, 3568-3584.
242. DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in cell biology* *15*, 356-363.
243. Thomas, S., Overvest, J.B., Nitz, M.D., Williams, P.D., Owens, C.R., Sanchez-Carbayo, M., Frierson, H.F., Schwartz, M.A., and Theodorescu, D. (2011). Src and

- caveolin-1 reciprocally regulate metastasis via a common downstream signaling pathway in bladder cancer. *Cancer research* 71, 832-841.
244. Hitkova, I., Yuan, G., Anderl, F., Gerhard, M., Kirchner, T., Reu, S., Röcken, C., Schäfer, C., Schmid, R., Vogelmann, R., et al. (2013). Caveolin-1 protects B6129 mice against *Helicobacter pylori* gastritis. *PLoS pathog* (akzeptiert).
 245. Ong, C.T., and Corces, V.G. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature reviews. Genetics* 12, 283-293.
 246. Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villen, J., Haas, W., Sowa, M.E., and Gygi, S.P. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143, 1174-1189.
 247. Jo, Y., Lee, P.C., Sguigna, P.V., and DeBose-Boyd, R.A. (2011). Sterol-induced degradation of HMG CoA reductase depends on interplay of two Insigs and two ubiquitin ligases, gp78 and Trc8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 20503-20508.
 248. Segref, A., Torres, S., and Hoppe, T. (2011). A screenable in vivo assay to study proteostasis networks in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 187, 1235-1240.
 249. Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Mitch, W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17, 1807-1819.
 250. Liu, X.D., Chen, H.B., Tong, Q., Li, X.Y., Zhu, M.J., Wu, Z.F., Zhou, R., and Zhao, S.H. (2011). Molecular characterization of caveolin-1 in pigs infected with *Haemophilus parasuis*. *Journal of immunology* 186, 3031-3046.
 251. Williams, T.M., and Lisanti, M.P. (2005). Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *American journal of physiology. Cell physiology* 288, C494-506.
 252. Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., and Hunter, T. (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer cell* 4, 499-515.
 253. Ashktorab, H., Frank, S., Khaled, A.R., Durum, S.K., Kifle, B., and Smoot, D.T. (2004). Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 53, 805-813.
 254. Lim, J.H., Lee, H.J., Pak, Y.K., Kim, W.H., and Song, J. (2011). Organelle stress-induced activating transcription factor-3 downregulates low-density lipoprotein receptor expression in Sk-Hep1 human liver cells. *Biological chemistry* 392, 377-385.

7 Anhang

Tabelle 7.1 Histopathologische Analyse der *H. pylori*-induzierten Gastritis in infizierten WT- und Cav1-KO-Mäusen. Die Analyse wurde anhand HE-gefärbter Magenpräparate von WT- und Cav1-KO-Mäusen durchgeführt, die mit *H. pylori* SS1 für 11 Monate infiziert waren. Gastritisgraduierung: 0=keine, 1=geringgradige, 2=mittelgradige, 3=schwergradige chronische Gastritis. Angegeben ist die Anzahl an Mäusen mit dem entsprechenden Gastritisgrad im Verhältnis zu allen untersuchten Mäusen (n=15) des jeweiligen Genotyps.

Mausgenotyp	Gastritisgrad 0	Gastritisgrad 1	Gastritisgrad 2	Gastritisgrad 3
WT	8/15	4/15	3/15	0/15
Cav1-KO	0/15	4/15	11/15	0/15

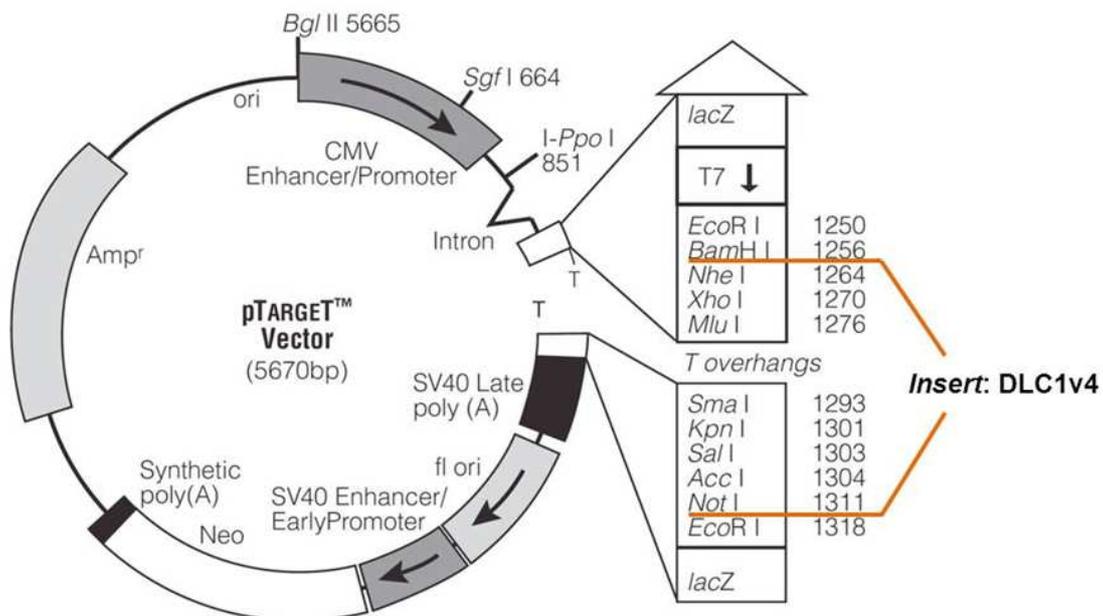


Abbildung 7.1 Vektorkarte des pT-DLC1v4 Vektors. Die cDNA des Inserts (DLC1v4) wurde in den pTarget-Vektor zwischen die Schnittstellen *BamHI* und *NotI* kloniert.

BamHI

```

241                                     atgg atccatgaag ctagaaatta
301 gtcctcatcg gaaacgaagt gacgattcag acgaggatga gccttgtgcc atcagtgcca
361 aatggacttt ccaaagggac agcaagaggt ggtcccggct tgaagagttt gatgtctttt
421 ctccaaaaca agacctggtc cctgggtccc cagacgactc ccaccggaag gacggcccca
481 gccccggagg cacgctgatg gacctcagcg agcgccagga ggtgtcttcc gtccgcagcc
541 tcagcagcac tggcagcctc cccagccacg cgccccccag cgaggatgct gccaccccc
601 ggactaactc cgtcatcagc gtttgtcctc ccagcaactt ggcaggcaat gacgactctt
661 tcggcagcct gccctctccc aaggaactgt ccagcttcag cttcagcatg aaaggccacg
721 aaaaaactgc caagtccaag acgcgcagtc tgctgaaacg gatggagagc ctgaagctca
781 agagctccca tcacagcaag cacaaagcgc cctcaaagct ggggttgatc atcagcgggc
841 ccatcttgca agaggggatg gatgaggaga agctgaagca gctcaactgc gtggagatct
901 ccgccctcaa tggcaaccgc atcaacgtcc ccatggtacg aaagaggagc gtttccaact
961 ccacgcagac cagcagcagc agcagccagt cggagaccag cagcgcggtc agcacgcca
1021 gccctgttac gaggaccggg agcctcagtg cgtgcaacaa gcgggtgggc atgtacttag
1081 agggcttcga tcctttcaat cagtcaacat ttaacaacgt ggtggagcag aactttaaga
1141 accgcgagag ctaccagag gacacgggtg tctacatccc tgaagatcac aagcctggca
1201 ctttcccaa agctctcacc aatggcagtt tctccccctc ggggaataac ggctctgtga
1261 actggaggac ggaagcttc cacggcctg gccacatcag ctcaggagg gaaaacagta
1321 gcgacagccc caaggaactg aagagacgca attcttcag ctccatgagc agccgcctga
1381 gcatctacga caacgtgccg ggctccatcc tctactccag ttcaggggac ctggcggatc
1441 tggagaacga ggacatcttc cccgagctgg acgacatcct ctaccagtg aaggggatgc
1501 agcggatagt caatcagtg tgggagaagt tttctgatga gggagattcg gactcagccc
1561 tggactcggc ctctccctgc ccgtcctctc caaacagat acacctggat gtggacaacg
1621 accgaaccac acccagcgac ctggacagca caggcaactc cctgaatgaa ccggaagagc
1681 cctccgagat cccgaaaaga agggattctg gggttggggc ttcctaacc aggtccaaca
1741 ggcaccgact gagatggcac agtttcaga gctcacatcg gccaagctc aactctgtat
1801 cactacgat taactgccag tctgtggccc agatgaacct gctgcgaaa tactcactcc
1861 taaagctaac ggccctgctg gaaaaataca caccttctaa caagcatggt tttagctggg
1921 ccgtgcccaa gttcatgaag aggatcaagg ttccagacta caaggaccgg agtgtgtttg
1981 ggggtcccact gacggtcaac gtgcagcgca caggacaacc gttgcctcag agcatccagc
2041 aggccatgcg atacctccgg aaccattggt tggatcaggt tgggctcttc agaaaatcgg
2101 gggcaagtc ccggattcag gctctgcgcc agatgaatga aggtgccata gactgtgtca
2161 actacgaagg acagtctgct tatgacgtgg cagacatgct gaagcagtat tttcgagatc
2221 ttctgagcc actaatgacg aacaaactct cggaaacctt tctacagatc taccaatatg
2281 tgcccaagga ccagcgctg caggccatca aggtgccat catgctgctg cctgacgaga
2341 accgggaggt tctgcagacc ctgctttatt tcctgagcga tgtcacagca gccgtaaaag
2401 aaaaccagat gacccaacc aacctggccg tgtgcttagc gccttccctc ttccatctca
2461 acaccctgaa gagagagaaat tccttccca gggtaatgca aagaaaacaa agtttgggca
2521 aaccagatca gaaagatttg aatgaaaacc tagctgccac tcaagggctg gcccatatga
2581 tcgccgagtg caagaagctt ttccaggttc ccgaggaat gagccgatgt cgtaattcct
2641 ataccgaaca agagctgaag ccctcactc tggaaagcact cgggcacctg ggtaatgatg
2701 actcagctga ctaccaaacac ttctccagg actgtgtgga tggcctgttt aaagaagtca
2761 aagagaagtt taaaggctgg gtcagctact ccacttcgga gcaggctgag ctgtcctata
2821 agaaggtgag cgaaggacc cctctgaggc tttggaggtc agtcattgaa gtcctctgctg
2881 tgccagagga aatcttaaag cgcctactta aagaacagca cctctgggat gtagacctgt
2941 tggattcaaa agtgatecga attctggaca gccaaactga aatttaccag tatgtccaaa
3001 acagtatggc acctcatcct gctcgagact acgttgtttt aagaacctgg aggactaatt
3061 tacccaaagg agcctgtgcc cttttactaa cctctgtgga tcacgatcgc gcacctgtgg
3121 tgggtgtgag ggttaatgtg ctcttgcca ggtatttgat tgaacctgt gggccaggaa
3181 aatccaaact cacctacatg tgcagagttg acttaagggg ccacatgcca gaatggtaca
3241 caaaatcttt tggacatttg tgtgcagctg aagttgtaa gatccgggat tccttcagta
3301 accagaaca tgaaaccaa gacaccaaat ctaggTgagcggccgcat

```

NotI

Abbildung 7.2 Kodierende Sequenz der humanen DLC1v4 mRNA (NM_001164271.1, 285-3301 bp). Die zum Klonieren mittels PCR eingefügten Schnittstellen *BamHI* und *NotI* sind unterstrichen. Die Sequenzen der dazu verwendeten Oligonukleotide sind gelb markiert. Das Translationstartkodon ist grün und das Translationsstopkodon rot hervor gehoben.

Hiermit möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. med. Matthias Ebert für die Möglichkeit am *Helicobacter pylori*- Projekt zu arbeiten sowie für die sehr guten Arbeitsbedingungen im Labor.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Scherer und PD Dr. med. Roger Vogelmann möchte ich mich ganz herzlich für die fachliche Betreuung und die große Hilfsbereitschaft bedanken.

Besonders verbunden bin ich Frau Dr. rer. nat. Elke Burgermeister für die wissenschaftliche Betreuung, das Entwickeln des Forschungskonzeptes und die geduldige und offene Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Forschungsthemas im Rahmen einer (BU-2285) geförderten Sachbeihilfe, welche die Durchführung meiner Arbeit ermöglichte.

Bei Dr. rer. nat. Florian Anderl möchte ich mich für die Hilfe bei den Mausversuchen und der Beschaffung von Blutagarplatten ganz herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Christoph Röcken, Prof. Dr. med. Thomas Kirchner und Dr. med. Simone Reu für die pathologische Analyse.

Prof. Dr. med. Markus Gerhard danke ich für die gute Kooperation und die Bereitstellung von *H. pylori* SS1.

Dr. rer. nat. Duarte Afonso danke ich für die Unterstützung bei der Silberfärbung.

Bei Dr. rer. nat. Ina Haneburger möchte ich mich für das kritische Lesen dieses Manuskripts und ihre sprachliche Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der ehemaligen sowie der neuen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Matthias Ebert in Mannheim und vor allem bei Teresa Friedrich, die mit mir den Umzug nach Mannheim gemeistert hat.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich vom ganzen Herzen für ihre Liebe und das Vertrauen.

Zu guter Letzt gilt mein tausendfacher Dank meinem Freund Memo für die Unterstützung, das Zuhören, den Glauben in mich und sein „immer-da-sein“.

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die Funktion von Caveolin-1 in *Helicobacter pylori*-induzierter Entzündung des Magens

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

München, den 10.12.2013

Unterschrift 

Persönliche Daten

Name	Ivana Hitkova
Geburtsdatum	19.05.1978
Geburtsort	Zlate Moravce, Slowakei
Familienstand	ledig

Promotion

01.07.2011-31.12.2012	Forschungslabor der II. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, Klinikum Mannheim, AG Prof. Dr. Matthias Ebert Thema: Funktion von Caveolin-1 in <i>Helicobacter pylori</i> - induzierter Magenentzündung
01.07.2009-30.06.2011	Forschungslabor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, AG Prof. Dr. Matthias Ebert Thema: Funktion von Caveolin-1 in <i>Helicobacter pylori</i> - induzierter Magenentzündung

Studium

20.12.2007-06.10.2008	Praktische Diplomarbeit, AG Prof. Dr. Kirsten Jung Thema: Homoserinlaktat vermittelte Regulation im entomopathogenen Bakterium <i>Photorhabdus luminescens</i>
01.10.2003-06.10.2008	Diplom-Studiengang Biologie, Department Biologie I, Ludwig-Maximilians-Universität München Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Immunologie und Zellbiologie Diplom, Note sehr gut (1,3)