

Charakterisierung der *Helicobacter pylori*-induzierten nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

von Dipl.-Biol. Michael Hartmut Feige

geb. am 22.04.1981 in Husum

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Naumann

PD Dr. rer. nat. Wolfgang Fischer

eingereicht am: 07.02.2019

verteidigt am: 10.12.2019

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

In dieser Doktorarbeit erzielte Ergebnisse wurden wie folgt veröffentlicht:

Feige MH, Vieth M, Sokolova O, Täger C, Naumann M (2018), Helicobacter pylori induces direct activation of the lymphotoxin beta receptor and non-canonical nuclear factor-kappa B signaling. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1865:545-550.

Folgende Veröffentlichungen wurden davon nicht in der Dissertationsschrift thematisiert:

Feige MH*, Sokolova O*, Pickenhahn A, Maubach G, Naumann M (2018), HopQ impacts the integrin alpha5beta1-independent NF-kappaB activation by Helicobacter pylori in CEACAM expressing cells. Int J Med Microbiol 308:527-533.

Lim MCC*, Maubach G*, Sokolova O, **Feige MH**, Diezko R, Buchbinder J, Backert S, Schlüter D, et al. (2017), Pathogen-induced ubiquitin-editing enzyme A20 bifunctionally shuts off NF-kappaB and caspase-8-dependent apoptotic cell death. Cell Death Differ 24:1621-1631.

Maubach G, **Feige MH**, Lim MCC, Naumann M (2018), NF-kappaB-inducing kinase in cancer. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 1871:40-49.

Studencka-Turski M, Maubach G, **Feige MH**, Naumann M (2018), Constitutive activation of nuclear factor kappa B-inducing kinase counteracts apoptosis in cells with rearranged mixed lineage leukemia gene. Leukemia 32:2498-2501.

*: Geteilte Erstautorenschaft

2.2.2 Bedeutung des LT β R für die <i>H. pylori</i> -induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung	38
2.2.3 Vergleichende Analysen der <i>H. pylori</i> Infektion und LT $\alpha_1\beta_2$ Stimulation.....	39
2.3 Die <i>H. pylori</i>-induzierte LTβR-Signaltransduktion ist abhängig von der	
basalen kanonischen NF-κB Signaltransduktion	41
2.4 Analysen zu putativen <i>H. pylori</i>-Liganden für den LTβR	43
2.4.1 Massenspektrometrische Untersuchung zu putativen LT β R-Liganden	43
2.4.2 Massenspektrometrische Interaktionsstudie zwischen dem LT β R und den	
T4SS-Komponenten CagL, CagY.....	45
2.5 Patienten mit <i>H. pylori</i>-assoziierter Gastritis weisen erhöhte NIK Level auf.....	46
3. Diskussion.....	47
3.1 Die <i>H. pylori</i> -induzierte LT β R-vermittelte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung	48
3.2 Nichtkanonische NF- κ B Aktivierung in der <i>H. pylori</i> -assozierten Pathogenese	51
3.3 Putative Funktionen der LT β R-vermittelten nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung in	
der <i>H. pylori</i> -assozierten Pathogenese.....	52
3.4 Putative Mechanismen für die <i>H. pylori</i> -induzierte Regulation des LT β R.....	53
3.5 Das T4SS - ein Entzündungsmodulator in der <i>H. pylori</i> Infektion.....	56
Schlusswort.....	58
4. Material und Methoden.....	59
4.1 Chemikalien	59
4.2 Verbrauchsmaterialien.....	59
4.3 Geräte.....	59
4.4 Lösungen.....	60
4.5 Antikörper	61
4.6 Kurze interferierende RNA	62
4.7 Anzucht und Lagerung des Bakteriums <i>H. pylori</i>	63
4.7.1 Stämme.....	63
4.7.2 Anzucht auf Agarplatten	63
4.7.3 Anzucht in Flüssigmedium	63
4.7.4 Kryokonservierung.....	64
4.8 Proteinextraktion aus <i>H. pylori</i>	64
4.8.1 Isolation der Gesamtproteine aus <i>H. pylori</i>	64
4.8.2 Isolation der äußeren Membranproteine aus <i>H. pylori</i>	65
4.9 Anzucht von Epithelzellen	65
4.9.1 Zelllinien	66
4.9.2 Anzucht auf Zellkultur-Petrischalen	66
4.9.3 Anzucht auf Zellkultureinsätzen	66

4.9.4 Kryokonservierung von Zellkulturen	67
4.10 Behandlungen von Zellkulturen	67
4.10.1 Infektion mit <i>H. pylori</i>	67
4.10.2 Stimulation mit Zytokinen	67
4.10.3 Hemmung mit Inhibitor/Antikörper	68
4.10.4 Transfektion mit kurzer interferierender RNA	68
4.11 Proteinextraktion aus Zellkulturen	68
4.11.1 Isolation der Gesamtproteine	68
4.11.2 Isolation der Proteine aus dem Zytosol und dem Zellkern	69
4.12 Bestimmung der Proteinkonzentration	69
4.12.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	69
4.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Smith	70
4.13 Immunpräzipitation	70
4.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	71
4.15 Western Blot Analyse	72
4.16 Stripping von PVDF-Membranen	73
4.17 Herstellung der Proben für die massenspektrometrische Analyse	73
Abkürzungen	75
Literaturverzeichnis	80
Ehrenerklärung	98

Zusammenfassung

Das gramnegative Bakterium *Helicobacter pylori* infiziert ca. 60 % der Weltbevölkerung und kann den Wirt lebenslang kolonisieren. Eine persistente Infektion des Magens führt dabei in 10 - 15 % der Fälle zu der Entstehung von Typ B Gastritis, Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüren, MALT-Lymphomen (*mucosa-associated lymphoid tissue*) oder Magenkrebs. Magenkrebs wird mit weltweit ca. 723.000 Toten pro Jahr als dritthäufigste krebsassoziierte Todesursache eingeschätzt. Das Krankheitsrisiko beruht zu einem großen Teil auf der Expression *H. pylori*-spezifischer Virulenzfaktoren. Von diesen ist das Typ 4 Sekretionssystem (T4SS) besonders wichtig, weil es den Virulenzfaktor CagA (*cytotoxin-associated gene A*) in die Wirtszelle injiziert und die Signaltransduktion der Wirtszelle moduliert. *H. pylori* T4SS aktiviert, CagA unabhängig, rasch durch den kanonischen Signalweg den Transkriptionsregulator NF- κ B (RelA/p50) (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), der entzündungsfördernd, proliferativ und antiapoptotisch wirken kann. Die kanonische NF- κ B Aktivierung begünstigt die Entwicklung der Typ B Gastritis, die als Vorstufe zu Magenkrebs fungieren kann, wo eine erhöhte kanonische NF- κ B Aktivität als Marker für eine schlechte Prognose gilt. Über *H. pylori* Kapazität das nichtkanonische NF- κ B (p52/RelB) zu aktivieren, das ähnliche Funktionen erfüllen kann, war vor Beginn dieser Arbeit nahezu nichts bekannt, obwohl eine steigende Anzahl an Studien dessen pathologisches Potential insbesondere in entzündungsassoziierten Krankheiten belegt. Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war es zu analysieren, ob *H. pylori* das nichtkanonische NF- κ B *in vitro* aktiviert und die damit assoziierte Signaltransduktion im Detail zu definieren.

Wir konnten zeigen, dass *H. pylori* rasch T4SS-abhängig und CagA-unabhängig das nichtkanonische NF- κ B in Epithelzellen (HeLa, NCI-N87, AGS) aktivierte und haben den Lymphotoxin Beta Rezeptor (LT β R) als essentiellen Vermittler identifiziert. Dieser rekrutierte innerhalb von 15 Minuten nach der Infektion die Signalkomponenten TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) und NIK (*NF- κ B inducing kinase*), die spezifische Schlüsselkinase des nichtkanonischen NF- κ B Signalweges. Dies erlaubte innerhalb von 45 Minuten die Stabilisierung und Phosphorylierung (Thr559) von NIK, das essentiell für die Phosphorylierung (Ser866/870) von p100 war und zu dessen 26S Proteasom-abhängiger Prozessierung zu p52 führte. Anschließend translozierte p52 zusammen mit RelB in den Zellkern um die Genexpression zu regulieren. Zudem war die Signaltransduktion von der Degradation des negativen Regulators TRAF3 begleitet. Darüber hinaus zeigte die *H. pylori*-induzierte Signaltransduktion für den LT β R untypische Merkmale, nämlich eine stark untergeordnete Rolle von IKK α (*inhibitor of kappaB kinase α*) und im Gegensatz zu der Lymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$ -vermittelten LT β R-Stimulation, eine Abhängigkeit der p100 Phosphorylierung von der basalen kanonischen NF- κ B Signaltransduktion. Dies legt eine Modulation der LT β R-Signaltransduktion durch *H. pylori* nahe.

Die Untersuchungen zu dem T4SS-abhängigen Aktivierungsmechanismus schlossen eine Integrin $\alpha_5\beta_1$ -abhängige Injektion, wie sie für CagA nachgewiesen wurde, aus. Vorläufige Ergebnisse zeigen zudem, dass die T4SS-Komponente CagL und das äußere

Membranprotein HofC (*Helicobacter pylori* outer membrane protein family C) in Konkurrenz zu $LT\alpha_1\beta_2$ mit der Ektodomäne des $LT\beta R$ *in vitro* interagierten. Daher könnten diese Proteine an der Aktivierung des $LT\beta R$ beteiligt sein. Abschließend konnten wir in einer Kooperation mit Prof. Vieth (Institut für Pathologie, Bayreuth) zeigen, dass NIK ebenfalls *in vivo* in Gewebeproben von Patienten mit *H. pylori*-assoziierter Gastritis verstärkt stabilisiert wurde, was ein starkes Indiz für die Aktivierung des nichtkanonischen NF- κ B ist und NIK als prognostischen Marker für diese Krankheit qualifizieren könnte.

Im Ausblick ist zu erwähnen, dass der $LT\beta R$ der Hauptvermittler der CXCL13 (*chemokine C-X-C motif ligand 13*) Expression ist, welches in der *H. pylori*-assozierten Gastritis erhöht und ein wichtiger Vermittler für die Entstehung von ektopischen lymphoiden Follikel ist und somit die Infiltration von B- und T-Zellen begünstigt. Diese Follikel sind in der *H. pylori*-assozierten Gastritis bis zu vier Mal häufiger nachweisbar als in anderen Gastritis-Typen und sind in persistenten Infektionen typischerweise schädlich für den Wirt. Für diese Phänomene könnte die Entdeckung der $LT\beta R$ -abhängigen nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung in der *H. pylori* Infektion ein wichtiger Verknüpfungspunkt sein und NIK potentiell als therapeutische Zielstruktur qualifizieren.

Abstract

The gram-negative bacterium *Helicobacter pylori* infects approximately 60 % of the world's population and is capable to colonize the host for life. A persistent infection of the stomach results in 10 - 15 % of the cases in development of type B gastritis, gastric- or duodenal ulcers, MALT-lymphomas (**mucosa-associated lymphoid tissue**) or gastric cancer. Gastric cancer causes an average of approximately 723.000 deaths annually and is estimated to be the third highest cause of cancer-associated deaths worldwide. The risk to develop these diseases is based to a large part on *H. pylori*'s expression of specific virulence factors. The type 4 secretion system (T4SS) is of particular importance as it injects the virulence factor CagA (**cytotoxin-associated gene A**) into the host cell and is capable to modulate the host's signal transduction. *H. pylori*'s T4SS activates rapidly and CagA-independent the transcription regulator NF- κ B (RelA/p50) (**nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells**) *via* the canonical pathway, which is capable to mediate pro-inflammatory, proliferative and antiapoptotic signalling. The canonical NF- κ B activation favours the development of type B gastritis, which can be a preliminary stage to gastric cancer, where an increased canonical NF- κ B activity is a marker for poor prognosis. In contrast, almost no information about *H. pylori*'s capability to activate noncanonical NF- κ B (p52/RelB) is available, which has similar functions. Moreover, an increasing number of studies indicate its pathological potential in particular in inflammatory diseases. The main subject of this study was to determine if *H. pylori* can induce noncanonical NF- κ B signalling and to investigate the associated signalling cascade in detail.

We found that *H. pylori* rapidly induced T4SS-dependent and CagA-independent noncanonical NF- κ B signalling in epithelial cell lines (HeLa, NCI-N87, AGS). We identified the lymphotoxin beta receptor (LT β R) as the essential mediator, which recruited within 15 minutes of infection the signalling components TRAF2 (**tumor necrosis factor receptor-associated factor 2**) and NIK (**NF- κ B inducing kinase**), which is the specific key kinase of the noncanonical NF- κ B signalling pathway. Subsequently, NIK was stabilised and phosphorylated (Thr559) within 45 minutes of infection, which was crucial for the phosphorylation (Ser866/870) of p100 and led to its 26S proteasome-dependent processing to p52. Afterwards, p52 translocated together with RelB into the nucleus to regulate gene expression. Furthermore, the signal transduction was accompanied by the degradation of the negative regulator TRAF3. Moreover, the *H. pylori*-induced signal transduction showed some atypical features for LT β R-induced signalling, specifically that IKK α (**inhibitor of kappaB kinase α**) was inferior for the signalling and that the p100 phosphorylation was dependent on the basal canonical NF- κ B activity, which was in contrast to the lymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$ -mediated LT β R stimulation. Thus, a modulation of the LT β R-signalling by *H. pylori* is likely.

The investigations of the T4SS-dependent mechanism of activation excluded an Integrin $\alpha_5\beta_1$ -dependent injection, which is utilized for CagA translocation. Further, our preliminary results indicate that the T4SS-component CagL and the outer membrane protein HofC (***Helicobacter pylori* outer membrane protein family C**) interacted *in vitro* with the ectodomain of the LT β R in competition to LT $\alpha_1\beta_2$. Thus, these proteins could be involved in the activation

of the $LT\beta R$. Furthermore, we showed in a cooperation with Prof. Vieth (Institut für Pathologie, Bayreuth) *in vivo* an enhanced stabilisation of NIK in tissue samples of patients with *H. pylori*-associated gastritis. This provides evidence for the activation of noncanonical NF- κ B in this disease and could qualify NIK as a prognostic marker.

A future prospect of this study is that the $LT\beta R$ is the primary mediator of CXCL13 (chemokine **C-X-C** motif ligand 13) expression, which is elevated in *H. pylori*-associated gastritis and a crucial mediator for the development of ectopic lymphoid follicles and thus favours the infiltration of B- and T-cells. In *H. pylori*-associated gastritis these follicles are detectable up to four times more frequent as in other gastritis types and are typically harmful for the host in persistent infections. Hence, the identification of the $LT\beta R$ -dependent noncanonical NF- κ B activation may be an important link for these phenomena in *H. pylori*-infected individuals and could potentially qualify NIK as a therapeutic target.

1. Einleitung

1.1 Das Humanpathogen *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ist ein mikroaerophiles, gramnegatives Bakterium, das erstmals 1983 von Marshall und Warren unter dem Namen *Campylobacter pyloridis* aus Gastritis-Patienten kultiviert wurde (Marshall und Warren 1983 und 1984). 1989 erhielt es, aufgrund einer Revision der taxonomischen Klassifikation, den heutigen Artnamen und wird der Ordnung der Campylobacterales (Marshall und Warren 1984) und der Familie der Helicobacteraceae zugeordnet.

Das Genom von *H. pylori* (Stamm 26695) wurde 1997 sequenziert (Tomb et al. 1997) und ist mit ca. 1,6 - 1,7 Mbp und ca. 1500 - 1600 Genen (Kawai et al. 2011, Satou et al. 2014) relativ klein für ein Bakterium, wie die nachfolgende Sequenzierung von über dreißig Stämmen bestätigte (genome.jp). Allerdings umfasst das pan-Genom von *H. pylori*, also der gesamte Genpool einer Spezies (Tettelin et al. 2008), ca. 4000 - 5000 Gene (Fischer et al. 2010). Die genetische Variabilität der Stämme beruht auf der hohen Mutations- und Rekombinationsrate und wird durch eine Vielzahl von Mechanismen ermöglicht. Dazu zählen die häufige natürliche Kompetenz von *H. pylori*, wie beispielsweise in der exponentiellen Wachstumsphase (Israel et al. 2000) oder bei DNA-Schäden (Dorer et al. 2010). Weiterhin kann *H. pylori* über horizontalen Gentransfer ein vollständiges Konjugationssystem mithilfe einer Rekombinase der XerD Familie übertragen (Fischer et al. 2010), was beispielsweise bei Infektionen mit mehreren Stämmen relevant ist (Dorer et al. 2010). Die hohe Rekombinationsrate von *H. pylori* erlaubt also trotz des kleinen Genoms eine hohe genetische Variabilität und Flexibilität, die eine effiziente Anpassung der einzelnen Stämme an den individuellen Wirt erlaubt (Atherton et al. 2006).

H. pylori gehört zu den wenigen Bakterien, das die lebensfeindlichen Bedingungen des Magens überlebt, wo es das Antrum und den Korpus kolonisiert (Abbildung 1). Selten kommt es auch zu einer Kolonisierung des Duodenums und des Ösophagus (Wyatt et al. 1990, Henihan et al. 1998). Für das Überleben unter den sauren Bedingungen (bis pH 1) exprimiert *H. pylori* Enzyme für verschiedene Ammoniak-produzierende Reaktionswege, die den umliegenden pH-Wert erhöhen und somit Säureresistenz verleihen (Clyne et al. 2007). Bisher wurden zwei Amidasen (Skouloubris et al. 1997 und 2001), eine Arginase (McGee et al. 1999) und eine Urease identifiziert, die am genauesten untersucht wurde. Die Urease weist mit einem K_m von 0,3 +/- 0,1 mM eine hohe Bindungsaffinität auf (Dunn et al. 1990) und kann bis zu 10 % des Feuchtgewichts von *H. pylori* ausmachen (Evans et al. 1991). Obwohl *H. pylori* mehrere Stunden im Magenlumen (pH 1-2) überleben kann (Stingl et al. 2001), ist eine Vermeidung der sauren Bedingungen für die persistente Infektion essentiell (Eaton et al. 1992), da sie ansonsten schnell zum Motilitätsverlust führen (Schreiber et al. 2005). Die zwei bis sechs lophotrichen Flagellen von *H. pylori* (Geis et al. 1989) erlauben die pH-abhängige chemotaktische Bewegung zu der Mukusschicht, die auf dem Epithel aufliegt (Abbildung 1) (Croxen et al. 2006). Neben der Chemotaxis, die für die Besiedlung des Corpus notwendig ist, scheint für die Kolonisation der Antrum Region zudem eine Energietaxis notwendig zu sein (Rolig et al. 2012). Mithilfe der Flagellen dringt *H. pylori* in die

Mukusschicht ein, die ein pH-Gradient durchzieht, und kann nahe dem Epithel bei fast neutralem pH-Wert den Wirt langfristig kolonisieren (Schreiber et al. 2004).

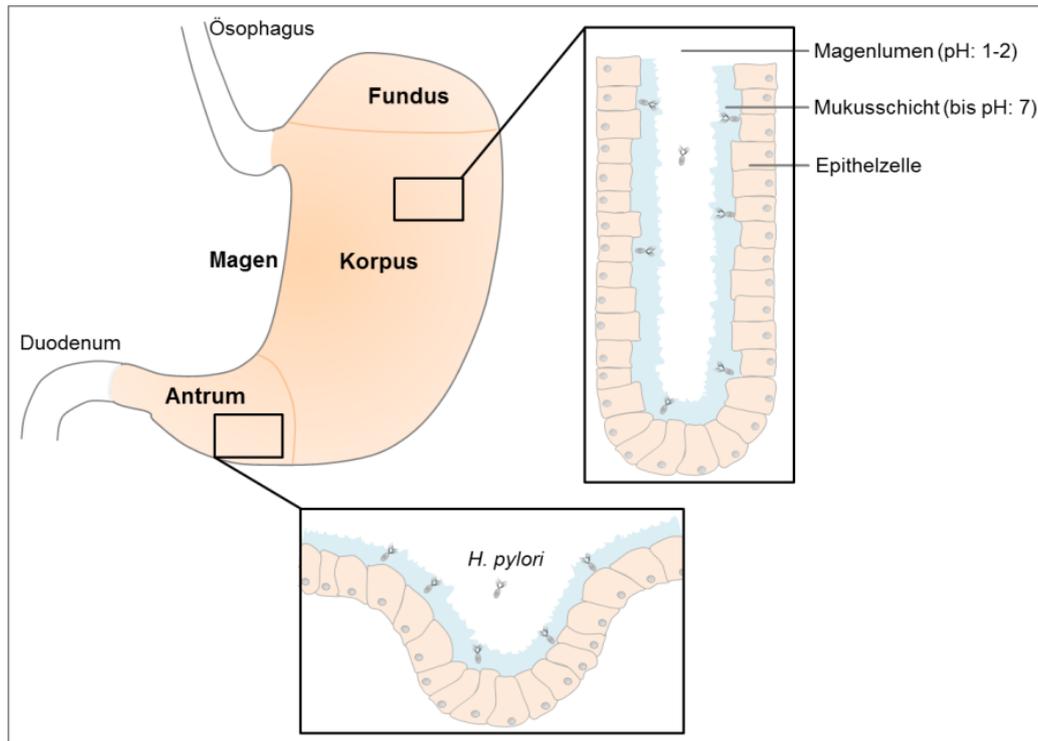


Abbildung 1: Darstellung eines Ausschnitts des menschlichen Gastrointestinaltrakts. *H. pylori* besiedelt den Magen in der Korpus- oder der Antrum-Region. Die Lokalisierung der Kolonisierung wirkt sich auf das Krankheitsrisiko aus.

Marshall und Warren zeigten, dass die meisten Patienten mit chronischer Magenschleimhautentzündung (Gastritis), Magengeschwüren (Ulcus ventriculi) und Zwölffingerdarmgeschwüren (Ulcus duodeni) mit *H. pylori* infiziert waren (Marshall und Warren 1984). Die entzündungsfördernden Eigenschaften des Bakteriums wies Barry Marshall durch die Einnahme einer *H. pylori* Suspension in zweiwöchigen Untersuchungen u.a. durch die Entnahme gastrischer Gewebeproben nach (Marshall et al. 1985). Für die Identifizierung von *H. pylori* als einer der Hauptrisikofaktoren für eine Vielzahl von Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts erhielten Marshall und Warren 2005 den Nobelpreis für Medizin. Einige der Erkrankungen werden in dem Kapitel zur Pathogenese (1.1.2) genauer diskutiert.

1.1.1 Epidemiologie

H. pylori infiziert den Menschen seit wahrscheinlich über 100.000 Jahren (Moodley et al. 2012). Es wird spekuliert, dass sich *H. pylori* durch die Übertragung einer *Helicobacter* Gattung eines Tieres auf den Menschen entwickelt hat (Moodley et al. 2012). Konsistent mit dieser Hypothese wurde für Tiere die Infektion mit *Helicobacter* Gattungen, die zum Wirt phylogenetisch inkongruent sind, nachgewiesen (Suerbaum und Michetti 2002, Moodley et al. 2012), während sich *Helicobacter acinonychis* durch die Übertragung von *H. pylori* vom Menschen auf die Großkatze entwickelt hat (Eppinger et al. 2006, Moodley et al. 2012).

Die meisten Infektionen mit *H. pylori* finden im frühen Kindesalter statt (Suerbaum und Michetti 2002, Mitchell und Megraud 2002), die auf familiären zwischenmenschlichen Kontakten beruhen (Schwarz et al. 2008). Die gastro-orale Transmission durch Erbrochenes

stellt das höchste Infektionsrisiko dar, aus dem *H. pylori* in den meisten Fällen kultivierbar ist (Parsonnet et al. 1999, Perry et al. 2006, Amieva und El-Omar 2008). Die oral-orale Transmission scheint dagegen eine untergeordnete Rolle zu spielen (Amieva und El-Omar 2008), da *H. pylori* selten aus dem Speichel kultivierbar ist (Parsonnet et al. 1999). Die fäkal-orale Transmission spielt in Industrieländern ebenfalls eine untergeordnete Rolle, da die Kultivierung von *H. pylori* aus Fäkalien zumeist die Erkrankung an Diarrhoe voraussetzt (Parsonnet et al. 1999, Amieva und El-Omar 2008). In Entwicklungsländern könnte dieser Übertragungsweg allerdings eine wichtigere Rolle durch verunreinigtes Trinkwasser spielen, aus dem in Ausnahmefällen ebenfalls *H. pylori* kultiviert werden kann (Suerbaum und Michetti 2002, Mitchell und Megraud 2002).

H. pylori infiziert seinen Wirt in den meisten Fällen lebenslang (Clyne et al. 2007) und insgesamt ca. 60 % der Weltbevölkerung, was es zu einer der häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen des Menschen macht (Hooi et al. 2017). Allerdings gibt es signifikante Unterschiede in den Infektionsraten zwischen den Ländern und deren Bevölkerungsgruppen. Die meisten Industrieländer haben eine Infektionsrate von ca. 30 - 40 %, während Entwicklungsländer bis zu 90 % erreichen können (Hooi et al. 2017, Abbildung 2), was stark mit dem sozioökonomischen Status, sowie den Hygienestandards korreliert ist (Mitchell und Megraud 2002, Suerbaum und Michetti 2002). Eine neue Metastudie hat insgesamt 184 Studien, die ein Patienten-Mindestalter von 18 Jahren hatten, aus 62 Ländern analysiert (Hooi et al. 2017, Abbildung 2). Nach Einschätzung dieser Studie lag die Infektionsrate im Jahr 2015 bei ca. 4,4 Milliarden Infizierten (Hooi et al. 2017). Außerdem soll die Infektionsrate in den letzten 17 Jahren in Europa und Nordamerika gesunken sein, während sie in Lateinamerika und Asien in den letzten 47 Jahren nahezu unverändert blieb (Hooi et al. 2017).

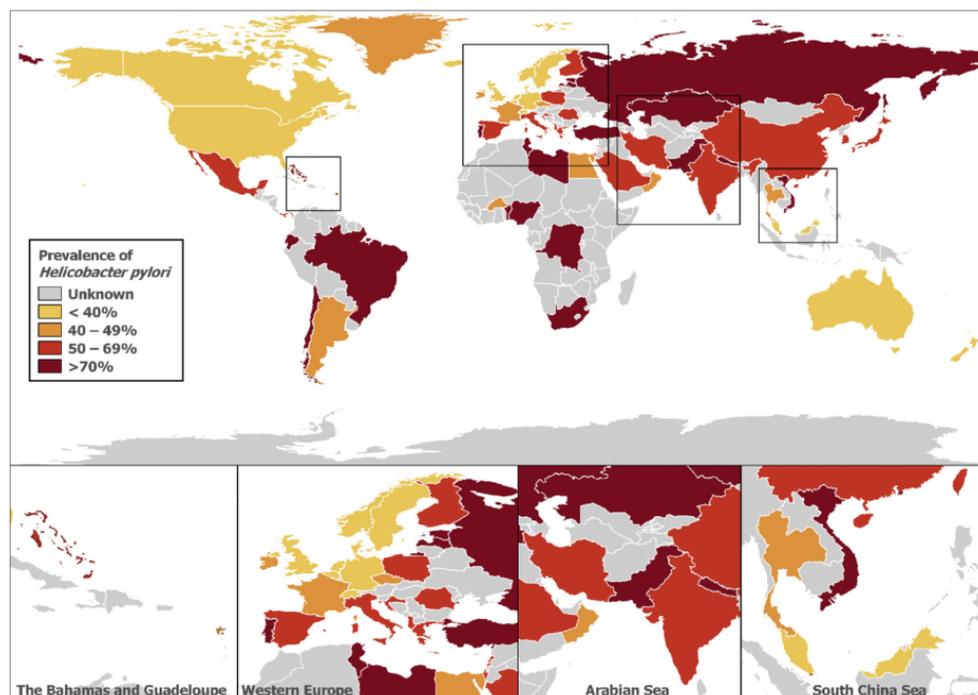


Abbildung 2: Choroplethenkarte zu der globalen Prävalenz von *H. pylori*. Spezifische Regionen sind vergrößert um kleinere Länder besser zu zeigen. Die Abbildung stammt aus der Veröffentlichung von Hooi et al. 2017.

1.1.2 Pathogenese

Nach der erfolgreichen Kolonisierung (Kapitel 1.1) vermag *H. pylori* das menschliche Immunsystem zu vermeiden und den Wirt persistent zu infizieren. Die persistente Infektion führt zu asymptomatischen chronischen Magenschleimhautentzündungen (Suerbaum und Michetti 2002, Varbanova et al. 2014) oder in 10 - 15 % der Infizierten zu der Entwicklung einer schwereren Krankheit (Naumann et al. 2017). Dazu zählen die Magenschleimhautentzündung (Typ B Gastritis), Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüre (5 - 10 %) (Malfertheiner et al. 2009), MALT-Lymphom (*mucosa-associated lymphoid tissue*) (> 0,1 %) und Magenkrebs (1 - 3 %) (Wroblewski et al. 2010). *H. pylori* wurde daher 1994 von der WHO als Gruppe 1 karzinogen klassifiziert (IARC Working Group 1994), wozu z.B. auch Tabak und Asbest gehören (Cover 2016). Außer der Magenschleimhautentzündung weisen die genannten Krankheiten eine hohe Morbidität und Mortalität auf. Magenkrebs wird mit weltweit ca. 723.000 Toten pro Jahr als dritthäufigste krebsassoziierte Todesursache eingeschätzt (McGuire 2016).

Das Risiko eine schwerere Krankheit zu entwickeln hängt von drei Faktorengruppen ab, den Virulenzfaktoren des *H. pylori* Stamms, sowie den genetischen- und Umweltfaktoren des Wirts (Varbanova et al. 2014). Die Virulenzfaktoren, die die wichtigsten Risikofaktoren zu sein scheinen, werden in Kapitel 1.1.3 diskutiert. Zu den Umweltfaktoren zählen das Rauchen von Tabak, der Alkoholkonsum und insbesondere eine salzreiche Ernährung (Siman et al. 2001, Fang et al. 2015). Für Hochsalzkonditionen konnte eine erhöhte Expression und Translokation des Virulenzfaktors CagA (*cytotoxin-associated gene A*), sowie eine erhöhte IL-8 (*interleukin-8*) Expression gezeigt werden, die zu der Entzündung durch *H. pylori* beitragen (Loh et al. 2007). Zu den genetischen Faktoren zählen epigenetische Veränderungen und mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen (Bornschein und Malfertheiner 2014). Davon sind auch Vermittler des kanonischen NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) betroffen (Kapitel 1.2.3), nämlich die Gene von TNF (*tumor necrosis factor*) (*TNF*), IL-1 β (*interleukin-1 β*) (*IL1B*) und des Agonisten des IL-1 β Rezeptors (*IL1RN*). Für die Einzelnukleotid-Polymorphismen von *IL1B* und *IL1RN* konnte in *H. pylori* infizierten Individuen gezeigt werden, dass diese einen erhöhten IL-1 β Level, verstärkte Entzündungen, sowie ein erhöhtes Risiko für Geschwüre und distale Magen-Adenokarzinome haben (Artherton et al. 2006). Eine kürzlich erschienene Metastudie berichtet allerdings, dass diese Phänotypen spezifisch für ethnische Gruppen sind (Bornschein und Malfertheiner 2014). Ebenso wurden Polymorphismen des TNF-Gens mit einer verstärkten Entzündung sowie einem erhöhten Magenkrebsrisiko in Verbindung gesetzt (Artherton et al. 2006).

Neben den beschriebenen Faktoren spielt die Lokalisierung der Magenschleimhautentzündung eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung (Rolig et al. 2012). Magenschleimhautentzündungen, die primär in der Korpus Region (Abbildung 1) lokalisiert sind, können zu einer reduzierten Säureproduktion (Hypochlorhydria) führen (Artherton et al. 2006), die zu starken Veränderungen in der Zusammensetzung der gastrischen Mikrobiota führt und die Pathogenese beeinflussen könnte (Parsons et al. 2017). Weiterhin besteht für die Entzündung in der Korpus Region ein erhöhtes Risiko zu der Entwicklung von Magengeschwüren und intestinalem Magenkrebs, während eine Entzündung des gesamten

Magens (pan-Gastritis) das Risiko für diffusen Magenkrebs erhöht (Rolig et al. 2012, Uemura et al. 2001). *H. pylori* ist primär für distalen Magenkrebs (im Antrum/Korpus-Teil) ein Risikofaktor (Huang et al. 1998), aber nicht für proximalen Magenkrebs (im Fundus/Korpus-Teil) (Cover 2016, Crew und Neugut 2006). Magenschleimhautentzündungen in der Antrum Region hingegen führen häufig zu einer erhöhten Säureproduktion (Hyperchlorhydria) (Malfertheiner et al. 2009). Die erhöhte Säureproduktion korreliert mit einem erhöhten Risiko Zwölffingerdarmgeschwüre, aber nicht Magenkrebs zu entwickeln (Rolig et al. 2012, Atherton et al. 2006). Das MALT-Lymphom ist im Vergleich zu Magenkrebs sehr selten und kann häufig durch die Eradikation von *H. pylori* behandelt werden, was zu einer vollständigen Remission führt (Venerito et al. 2017). Zusammengefasst beruhen die schweren Krankheiten der *H. pylori*-assoziierten Pathogenese auf der persistenten Infektion, der Lokalisierung der Kolonisierung und den drei genannten Risikofaktorgruppen.

1.1.3 Virulenzfaktoren

Die Virulenzfaktoren von *H. pylori* stellen einen erheblichen Risikofaktor für die Entwicklung einer schweren Krankheit dar. Aufgrund der hohen innerartlichen genetischen Variabilität (Kapitel 1.1) exprimiert allerdings nur ein Teil der *H. pylori* Stämme diese Faktoren, was eine der Ursachen ist, dass nur ein Bruchteil der Wirte eine schwere Krankheit entwickelt. In diesem Kapitel sollen einige Virulenzfaktoren, sowie deren Wirkmechanismen kurz dargestellt werden, während die drei Wichtigsten, nämlich das T4SS (Typ 4 Sekretionssystem, 1.1.3.1), CagA (1.1.3.2) und VacA (*vacuolating cytotoxin A*, 1.1.3.3) in den Folgekapiteln adressiert werden. Als Virulenzfaktoren werden in der vorliegenden Arbeit Proteine bezeichnet, die für den Wirt die Wahrscheinlichkeit eine faktorspezifische Krankheit(en) zu entwickeln signifikant erhöht, aber nicht essentiell für die Viabilität von *H. pylori* sind. Die Virulenzfaktoren von *H. pylori* tragen primär in langfristigen Infektionen zur Krankheitsentstehung bei.

H. pylori soll mit über vierzig Wirtszellrezeptoren interagieren, wovon der Großteil durch Virulenzfaktoren vermittelt wird (Pachathundikandi et al. 2013). Dieses umfasst die Bindung von mehreren Adhäsinen von *H. pylori* an spezifische Rezeptoren, was sein Anhaften an die Wirtszelle erlaubt. Die Expression von Adhäsinen, wie BabA, SabA, HomB, OipA und HopQ (Typ I) korrelieren mit einer Erhöhung des Magenkrebsrisikos (Cover 2016).

Die Adhäsion ist ein wichtiger Schritt für die Pathogenese (Hessey et al. 1990), da sowohl die Bindung an den Adhäsionsrezeptor, als auch die physikalische Nähe zur Wirtszelle die Funktion weiterer bakterieller Virulenzfaktoren, wie des T4SS erlaubt, und beides die Signaltransduktion der Wirtszelle beeinflussen kann. Dieses umfasst auch die frühe T4SS-abhängige transkriptionelle Regulation durch NF- κ B. Ebenso interagiert die Serin-Protease HtrA (*high temperature requirement A*), die von *H. pylori* in den extrazellulären Raum sekretiert wird, mit dem Wirtszelladhäsionsrezeptor und Adhärenz Junction Protein E-Cadherin und spaltet es in der extrazellulären Domäne (Lower et al. 2008, Hoy et al. 2010). HtrA ist also ein Faktor der dazu beiträgt, dass *H. pylori* Zell-Zellkontakte abbaut und die epitheliale Barriere durchbricht, was die laterale und basale Lokalisierung von *H. pylori* in Biopsien von Magenkrebs Patienten erklären könnte (Necchi et al. 2007, Posselt et al. 2013) (Abbildung 3). Außerdem macht der Abbau der Zell-Zellkontakte in polarisierten Zellen

Integrin β_1 für *H. pylori* verfügbar, der damit CagA in die Wirtszelle transloziert und dessen Signaltransduktion reguliert (Kapitel 1.1.3.2). Dieses führt u.a. zur Reorganisation des Zytoskeletts und starken Veränderungen in der apikal-basolateralen Organisation von Epithelzellen (Wessler und Backert 2008). Die meisten der über vierzig beschriebenen Wirtszellrezeptoren-Interaktionen finden durch das T4SS, CagA oder VacA statt, welche bereits innerhalb der ersten Infektionsstunden in Zellkulturexperimenten nachweisbar sind.

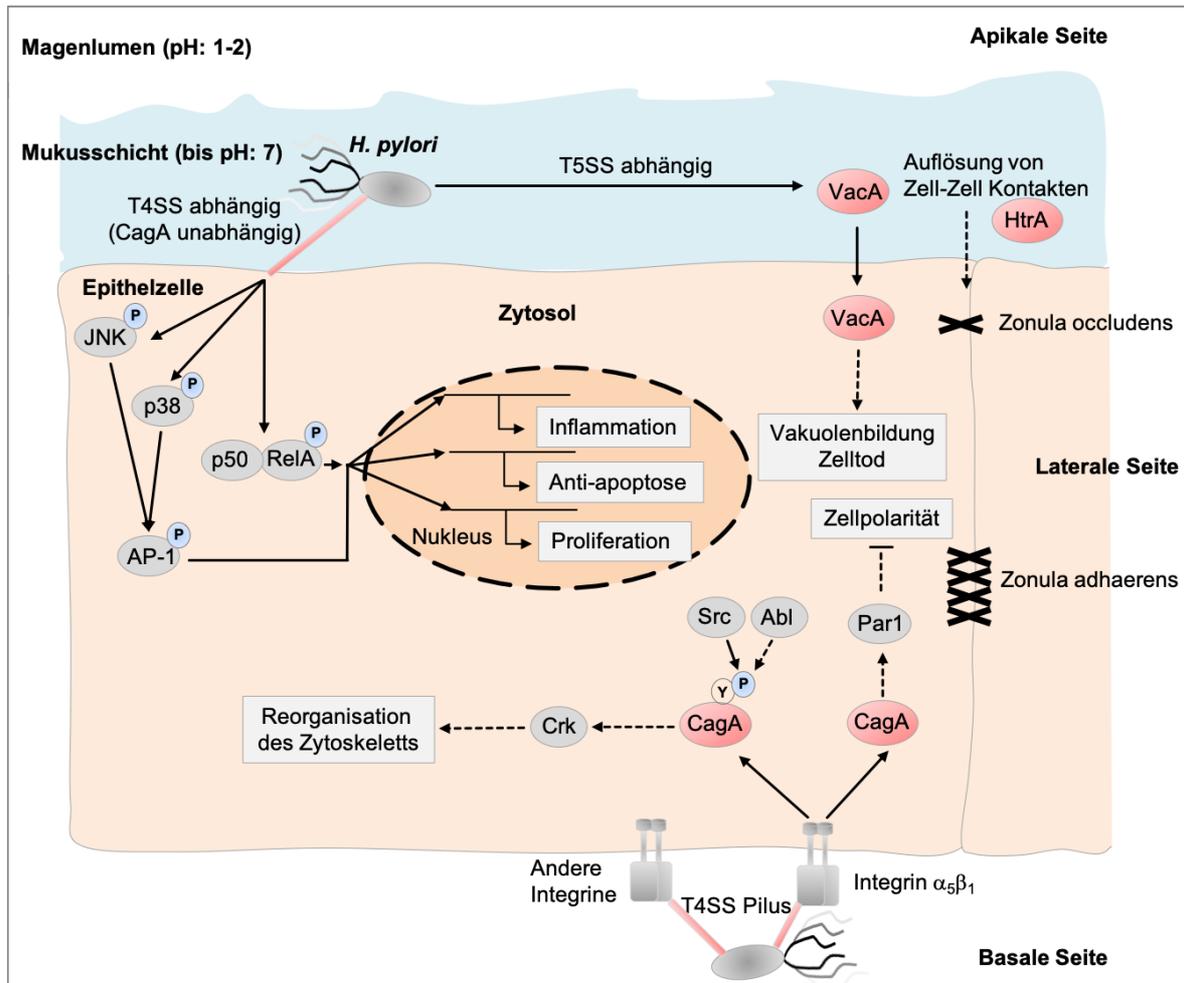


Abbildung 3: Darstellung der Reaktion von Epithelzellen auf das T4SS, CagA und VacA von *H. pylori*.

Signalkomponenten der Epithelzellen sind in grauen Kreisen, Reaktionen der Epithelzellen sind in hellgrauen Kästen und Virulenzfaktoren von *H. pylori* sind in Rot dargestellt. Pfeile mit durchgezogenen Linien stellen Prozesse dar, die *in vitro* innerhalb der ersten 2 Infektionsstunden stattfinden, während Pfeile mit gestrichelten Linien später stattfinden. Y: Tyrosin, P: Phosphorylierung, GTP: Guanosintriphosphat. *H. pylori* induziert T4SS-abhängig und CagA-unabhängig die Aktivierung des kanonischen NF- κ B (p50/RelA) und mittels JNK oder p38 die Aktivierung von AP-1. p50/RelA und AP-1 fördern die Inflammation, Proliferation und antiapoptotische Reaktionen. VacA wird von *H. pylori* über die T5SS-vermittelte Autosekretion in den extrazellulären Raum gegeben, wonach es in Epithelzellen internalisiert wird in denen es die Bildung von Vakuolen und die Induktion des Zelltodes fördert. Das T4SS von *H. pylori* interagiert direkt mit verschiedenen Integrinen, inklusive dem Integrin $\alpha_5\beta_1$, mit dessen Hilfe CagA in die Zelle injiziert wird. CagA vermittelt nach der Tyrosin-Phosphorylierung durch die Wirtszellkinasen Src und Abl mithilfe von Crk die Reorganisation des Zytoskeletts. Unphosphoryliertes CagA induziert mithilfe von Par1 die Aufhebung der Zellpolarität. Außerdem induziert *H. pylori* die Auflösung der Zell-Zell Kontakte, nämlich der Zonula occludens und Zonula adhaerens. Die Abbildung wurde in Anlehnung an die Übersichtsartikel von Wessler und Backert (2008) und Backert und Selbach (2008) erstellt.

1.1.3.1 Das Typ 4 Sekretionssystem (T4SS)

Sekretionssysteme sind eine vielfältige Gruppe von makromolekularen Transportsystemen, die in nahezu allen Bakterien und einigen Archaeen vorkommen und kleine Moleküle, Proteine oder DNA in andere Zellen oder den extrazellulären Raum translozieren (da Costa et al. 2015). Die Sekretionssysteme in gramnegativen Bakterien werden in sechs verschiedene Typen unterteilt (da Costa et al. 2015). Das Sekretionssystem von *H. pylori* wird dem Typ IV zugeordnet und wird durch das ca. 40 kb lange *cagPAI* (*cytotoxin-associated genes pathogenicity island*) kodiert, weshalb es auch *cag*-T4SS genannt wird (Censini et al. 1996, Tegtmeyer et al. 2011). *H. pylori* Knockoutmutanten (Stamm 26695) für die 27 Gene des *cagPAI*s zeigen, dass 15 Gene für die NF- κ B abhängige IL-8 Induktion bzw. 18 - 19 Gene für die T4SS-abhängige CagA Translokation essentiell sind (Tabelle 1) (Fischer et al. 2001). Die Gene kodieren für Komponenten, die für die Assemblierung, Funktion oder die Stabilisierung anderer wichtiger Komponenten des T4SS essentiell sind (Fischer et al. 2011, Frick-Cheng et al. 2016).

Tabelle 1: Typ 4 Sekretionssystem-Komponenten von *H. pylori*. Die Tabelle ist modifiziert von Backert et al. 2015 übernommen worden.

Proteinname	IL-8 Sekretion	CagA Phosphorylierung	Pilusbildung	Extrazellulär	Homolog
Cag ζ /Cag1	+++	+++	n.b.	-	-
Cag ϵ /Cag2	+++	+++	n.b.	-	-
Cag δ /Cag3	-	-	-	-	-
Cag γ /Cag4	-	-	n.b.	-	VirB1
Cag β /Cag5	+++	-	+++	-	VirD4
Cag α /VirB11	-	-	+++	-	VirB11
CagZ	++	++	n.b.	-	-
CagY	-	-	#	+	VirB10
CagX	-	-	+	+	VirB9
CagW	-	-	n.b.	-	VirB6
CagV	-	-	-	-	VirB8
CagU	-	-	n.b.	-	-
CagT	-	-	-	+	VirB7
CagS	+++	+++	n.b.	-	-
CagQ	+++	+++	n.b.	-	-
CagP	+++	+++	n.b.	-	-
CagM	-	-	-	-	-
CagN	+	+	n.b.	-	-
CagL	-	-	-	+	VirB5
CagI	-	-	-	+	-
CagH	-	-	++++	-	-
CagG	++	-	n.b.	-	-
CagF	+++	-	n.b.	-	-
CagE	-	-	-	-	VirB3/VirB4
CagD	+	#	n.b.	+	-
CagC	-	-	+++	+	VirB2
CagB	n.b.	n.b.	n.b.	-	-

-: Nicht vorhanden; +: schwach; ++: mittel; +++: stark (wie Wildtyp); ++++: stärker als Wildtyp; n.b.: nicht bestimmt; #: widersprüchliche Studien.

Das *cagPAI* wurde 1996 identifiziert und mit besonders virulenten *H. pylori* Stämmen in Verbindung gesetzt (Censini et al. 1996). Ogura et al. (2000) zeigte für einen Modellorganismus (Mongolische Rennmäuse, n = 23), dass die Tiere in einer langanhaltenden *H. pylori* Infektion (14 Monate) T4SS-abhängig Magengeschwüre, intestinale Metaplasien und Magenkrebs entwickelten. Diese Befunde wurden durch Franco et al. (2005) verifiziert, der für den voradaptierten *H. pylori* Stamm B128 bereits nach 2 Monaten T4SS-abhängig schwere Erkrankungen feststellte, beispielsweise entwickelten 6 der 8 Tiere Adenokarzinome. Außerdem wurde in transgenen C57BL/6J Mäusen gezeigt, dass die CagA Überexpression ausreicht, um die Entwicklung von Adenokarzinomen auszulösen (Ohnishi et al. 2008). Eine Vielzahl weiterer Studien belegt, dass das T4SS ein sehr wichtiger Virulenzfaktor ist (Naumann et al. 2017).

Typ 4 Sekretionssysteme bestehen, wie anhand des prototypischen T4SS von *Agrobacterium tumefaciens* gezeigt wurde, aus mindestens 12 VirB/D4-Komponenten bzw. Homologen zu diesen (Christie et al. 2014). Davon fungieren VirB4, VirB11 und VirD4 (NTPasen) als energetische Komponenten, VirB6-10 als Hauptkomplex- bzw. Pilus-Komponenten und VirB2, VirB3 und VirB5 als Pilus-assoziierte Komponenten, wobei die Muraminidase VirB1 an der Mureinlyse und der Assemblierung des T4SS beteiligt sein könnte (Tegtmeyer et al. 2011).

Das T4SS von *H. pylori* ist mit den 27 *cagPAI*-kodierte Komponenten deutlich komplexer (Abbildung 4) (Christie et al. 2014). Zudem weisen mehrere der Homologe zu den 12 VirB/D4-Komponenten von *A. tumefaciens* nur eine geringe Homologie auf, sind anders lokalisiert und haben zusätzliche Funktionen (Tabelle 1). Außerdem ist die Funktion der meisten Komponenten ohne VirB/D4-Homologe unbekannt (Barden et al. 2013). Der Hauptkomplex des T4SS von *H. pylori* ist mit ca. 41 nm doppelt so groß wie der von *A. tumefaciens* oder *Escherichia coli* und endet extrazellulär in einer ummantelten nadelähnlichen Struktur, die bei *H. pylori* ca. 45 nm breit und 200 - 300 nm lang ist (Rohde et al. 2003, Grohmann et al. 2018). Sechs der sieben putativen extrazellulären Komponenten des T4SS sind essentiell für die IL-8 Induktion und CagA Translokation, wobei die siebte Komponente CagD, ebenfalls wichtig für die Funktionalität des T4SS ist. Von den extrazellulären Komponenten können einige direkt mit Wirtszellrezeptoren, wie Integrin $\alpha_5\beta_1$ interagieren (Kapitel 1.1.3.1.2 und 1.1.3.1.3), was diesen Mechanismus ebenfalls interessant für die, in der vorliegenden Arbeit gezeigte, T4SS-abhängige schnelle Aktivierung des LT β R (*Lymphotoxin β receptor*) macht. Zudem sind die meisten dieser Komponenten essentiell für die Pilusbildung was nahelegt, dass der Pilus wichtig für die genannten Prozesse ist, allerdings gibt es ebenfalls Bakterien, wo der Pilus redundant für die Funktionalität ist (Christie et al. 2014). CagC (VirB2), CagL (VirB5), CagT (VirB7), CagX (VirB9) und CagY (VirB10) wurden am Pilus mithilfe von goldmarkierten Antikörpern elektronenmikroskopisch nachgewiesen, wobei neben CagL, ebenfalls CagA an der Spitze lokalisiert waren (Andrzejewska et al. 2006, Kwok et al. 2007, Fischer et al. 2011).

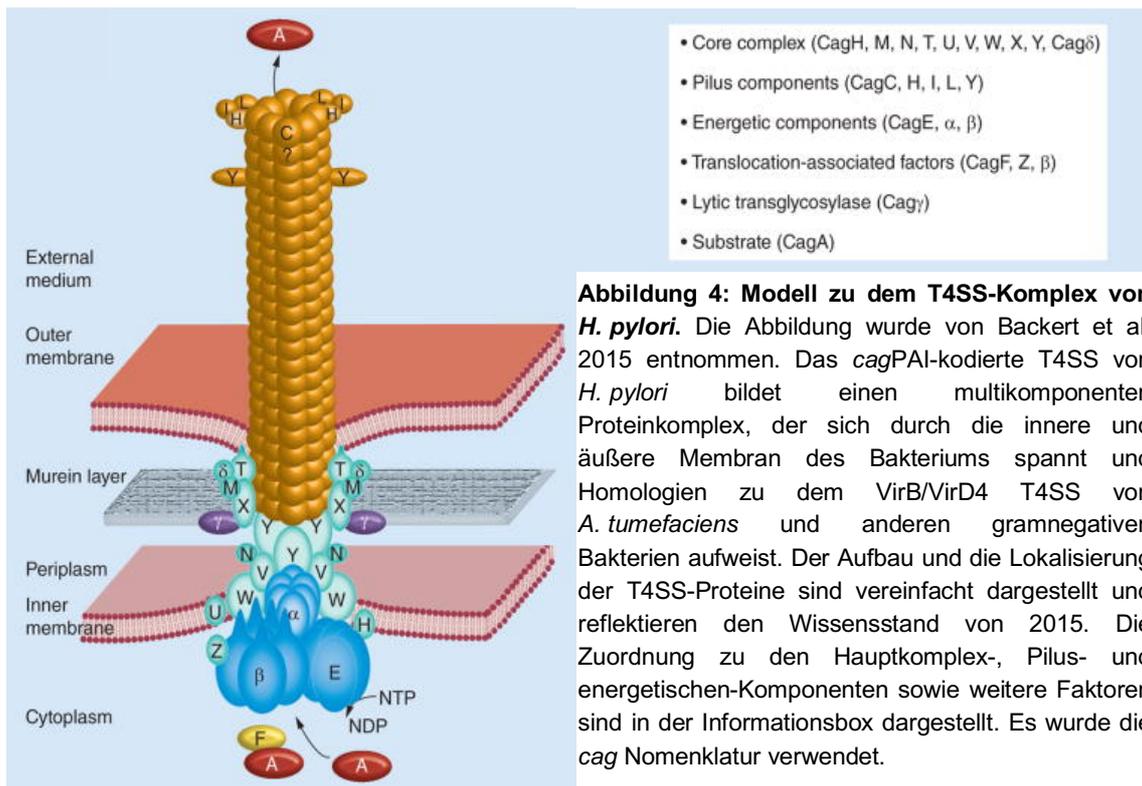


Abbildung 4: Modell zu dem T4SS-Komplex von *H. pylori*. Die Abbildung wurde von Backert et al. 2015 entnommen. Das *cagPAI*-kodierte T4SS von *H. pylori* bildet einen multikomponenten Proteinkomplex, der sich durch die innere und äußere Membran des Bakteriums spannt und Homologien zu dem VirB/VirD4 T4SS von *A. tumefaciens* und anderen gramnegativen Bakterien aufweist. Der Aufbau und die Lokalisierung der T4SS-Proteine sind vereinfacht dargestellt und reflektieren den Wissensstand von 2015. Die Zuordnung zu den Hauptkomplex-, Pilus- und energetischen-Komponenten sowie weitere Faktoren sind in der Informationsbox dargestellt. Es wurde die *cag* Nomenklatur verwendet.

1.1.3.1.1 Die Adhäsionsrezeptor-Familie der Integrine

Integrine sind Glykoprotein-Adhäsionsrezeptoren, die sich aus je einer der 18 α - und einer der 8 β -Untereinheiten zu insgesamt 24 nicht-kovalent gebundenen Heterodimeren zusammensetzen (Hynes 2002). Jedes dieser Heterodimere hat nichtredundante Funktionen, die auf der Spezifität ihrer Liganden und ihrer zelltypspezifischen Expression beruhen (Kim et al. 2011). Als Adhäsionsrezeptoren sind sie typischerweise in der basolateralen Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 3) und fungieren als mechanischer Verknüpfungspunkt zwischen verschiedenen Zellen und zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett (Takagi und Springer 2002). Außerdem leiten sie durch die „outside-in“-Signalübertragung Informationen über die chemischen und physischen Eigenschaften ihrer extrazellulären Liganden weiter oder reagieren auf zytoplasmatische Signale durch die „inside-out“-Signalübertragung. Sie regulieren so die Proliferation, das Überleben, die Migration, die Differenzierung, sowie die Polarität der Zelle (Springer und Dustin 2012, Hynes 2002). Die α - und β -Untereinheiten der Integrine bestehen jeweils aus einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (ca. 100 Aminosäure), einer Transmembrandomäne und einer längeren extrazellulären Domäne (> 640 Aminosäuren) (Takagi und Springer 2002). Die Enden der extrazellulären Domänen interagieren miteinander, was elektronenmikroskopisch als kugelförmige Struktur identifizierbar ist (Takagi und Springer 2002). Mutations- und Strukturstudien haben gezeigt, dass sich die Konformation dieses Kopfstücks entscheidend auf die Liganden-Affinität auswirkt. Die „gebeugte“ Haltung des Kopfstücks ist mit einer niedrigen Liganden-Affinität assoziiert und wird auch als „inaktiv“ bezeichnet, während ein „gestrecktes“ Kopfstück mit einer bis zu 9000-fach höheren Liganden-Affinität „aktiv“ ist (Abbildung 5) (Takagi und Springer 2002). Die Aktivierung kann unter anderem durch die

Bindung von zweiwertigem Mangan (Mn^{2+}) oder Magnesium (Mg^{2+}) in dem am Kopf befindlichen MIDAS-Motiv (*metal ion-dependent adhesion site*) oder durch die Signalweiterleitung von der zyttoplasmatischen Domäne erfolgen (Hynes 2002). Die CagA Translokation wird sowohl durch die Aktivierung, als auch die Elastizität der extrazellulären Untereinheiten des Integrin β_1 Heterodimers entscheidend beeinflusst (Jimenez-Soto et al. 2009).

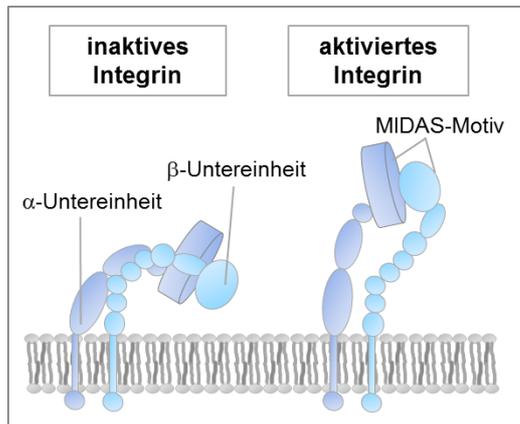


Abbildung 5: Darstellung eines Integrin Dimers in inaktiver und aktivierter Konformation.

Integrine bilden Heterodimere aus unterschiedlichen α - und β -Untereinheiten und bestehen aus jeweils einer großen extrazellulären und einer kleinen zyttoplasmatischen Domäne. Die Liganden-Affinität des Integrin Dimers hängt von der Konformation ab. Inaktive Integrin Dimere befinden sich in einer „gebeugter Haltung“ (links) und aktivierte Integrine in der „gestreckten Haltung“ (rechts). Das MIDAS-Motiv bindet spezifische Kationen und wirkt damit aktivierend oder reprimierend.

1.1.3.1.2 Die direkte Interaktion des T4SS mit β_1 -Integrin Heterodimeren vermittelt die CagA Translokation

H. pylori interagiert mithilfe des T4SS direkt mit mehreren Rezeptoren innerhalb der ersten Infektionsstunden (Pachathundikandi et al. 2013). Eine Schlüsselinteraktion findet mit Integrin β_1 Heterodimeren statt, die zu der Translokation des Virulenzfaktors und einzigen Effektorproteins CagA führt (Kwok et al. 2007). Initial wurde dafür das Integrin $\alpha_5\beta_1$ postuliert, allerdings haben mehrere Studien gezeigt, dass die Überexpression von Integrin β_1 in Integrin β_1 -negativen Zelllinien ausreicht (Jimenez-Soto et al. 2009, Kwok et al. 2007).

Die *H. pylori*, die nahe der Zonula occludens lokalisiert sind (Abbildung 3), interagieren mit β_1 -Heterodimeren, indem sie deren extrazelluläre Liganden wie Fibronectin, Kollagen oder Laminin mithilfe eines RGD-Aminosäuremotivs in der T4SS-Pilus Komponente CagL nachahmen. Dieses RGD-Motiv unterscheidet sich strukturell stark von dem RGD-Motiv der Liganden und wird erst bei einem pH-Wert von $> 5,5$ in der Mukusschicht nahe den Epithelzellen durch eine Konformationsänderung demaskiert (Barden et al. 2013, Bonsor et al. 2015). Das RGD-Motiv und zwei dazu gegenüberliegende variable Aminosäuremotive (TSPSA und TASLI) sind kritisch für die CagA Translokation (Bonig et al. 2016, Barden et al. 2013).

Der molekulare Mechanismus, der zu der Integrin β_1 -vermittelten CagA Translokation führt, ist weitestgehend unverstanden. *H. pylori* induziert dafür schnell und transient die Translokation von Phosphatidylinositol von der zytosolischen zu der extrazellulär exponierten Plasmamembranseite - dieses geschieht unabhängig von dem *cagPAI*, CagA und VacA (Goth und Stephens 2001, Murata-Kamyia et al. 2010). Das CagA interagiert anschließend abhängig von seinem K-Xn-R-X-R Aminosäuremotiv mit dem Phosphatidylinositol, was wie bei der VacA Translokation, zu einer Clathrin-unabhängigen Überwindung der

Plasmamembran führt und nachfolgend in der CagA Translokation resultiert (Murata-Kamyia et al. 2010). Diese scheint durch eine unkonventionelle Endozytose vermittelt zu werden (Murata-Kamyia et al. 2010). Die Translokation von Phosphatidylinositol zu der extrazellulär exponierten Plasmamembranseite wurde ebenfalls für die Endozytose von anderen Makromolekülen und von verschiedenen obligat und fakultativ intrazellulären Bakterien beobachtet (Kenis et al. 2004, Murata-Kamyia et al. 2010).

1.1.3.1.3 T4SS-Komponenten interagieren mit weiteren Wirtszellrezeptoren

In der Koevolution von wahrscheinlich über 100.000 Jahren hat sich *H. pylori* stark an den menschlichen Wirt adaptiert (Moodley et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die schnelle Aktivierung des LT β R durch das T4SS von *H. pylori* beschrieben. Ob diese Aktivierung, wie die Interaktion mit Integrin β_1 Heterodimeren auf einem physischen Kontakt beruht, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Nach der Identifizierung der physischen Interaktion zwischen der T4SS-Pilus Komponente CagL und Integrin β_1 Heterodimeren wurden weitere Interaktionen zwischen CagL und anderen Integrinen gezeigt.

Eine Studie von Wiedemann et al. (2012) zeigte, dass CagL unabhängig von seinem RGD-Motiv mit dem Integrin $\alpha_v\beta_5$ interagiert und damit eine ILK-Komplex-vermittelte (*integrin linked kinase*) Aktivierung des Gastrinpromotors induziert. Ebenfalls haben *in vitro* Interaktionsstudien gezeigt, dass gereinigtes CagL (unabhängig vom T4SS) mit Integrin $\alpha_v\beta_6$ über ein längeres RGD β XL-Aminosäuremotiv interagieren kann, wozu es zudem eine deutlich höhere Affinität als zu Integrin $\alpha_5\beta_1$ aufwies (Barden und Niemann 2015). Außerdem induziert gereinigtes CagL RGD-abhängig (unabhängig vom T4SS) die Regulation ähnlicher Signalkomponenten wie der Ligand Fibronectin. Dazu gehört FAK (*focal adhesion kinase*), Src (*cellular sarcoma kinase*) (Kwok et al. 2007) und der EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor*), aber auch Signalkomponenten wie ERBB3 (*erb-b2-receptor tyrosine kinase 3*), die nicht durch Fibronectin reguliert werden. Die Signalkomponenten induzieren wie Fibronectin die Zellausbreitung und fokale Adhäsion (Tegtmeyer et al. 2010). Abseits von CagL wurde für die extrazellulär exponierten T4SS-Komponenten CagI und CagY, sowie CagA selbst, die kein RGD-Motiv aufweisen, die Interaktion mit β_1 Integrin Heterodimeren mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System und Pulldown-Assay *in vitro* nachgewiesen (Jimenez-Soto et al. 2009). Es scheint also, dass mehrere T4SS-Komponenten die Kapazität haben mit Wirtszellrezeptoren zu interagieren, wobei der Schwerpunkt der Untersuchungen auf Integrinen liegt.

Eine Herausforderung der Untersuchungen zur Interaktion des T4SS ist, dass die meisten Komponenten essentiell für die Integrität und Funktionalität des Sekretionssystems sind (Kapitel 1.1.3.1), was Rückschlüsse auf die Funktion von Einzelkomponenten erschwert. Dagegen birgt die Untersuchung ektopisch exprimierter und gereinigter Einzelkomponenten das Risiko, dass es aufgrund des Fehlens der physiologischen T4SS-Interaktionspartner aufgrund freiliegender Interaktionsbereiche zu unphysiologischen Interaktionen kommt. Ebenso birgt die ektopische Expression der Proteine, aufgrund von Fehlfaltungen oder erhöhter Abundanz, das Risiko für Artefakte.

1.1.3.2 Das Cytotoxin-assoziierte Gen A (CagA)

Das *cagPAI* kodiert neben dem T4SS ebenfalls für das 128 - 145 kDa schwere Protein CagA, das 1993 identifiziert wurde und dem eine Schlüsselrolle für die Pathogenese zukommt (Tummuru et al. 1993, Covacci et al. 1993). Eine Vielzahl von Studien belegt das hohe Virulenzpotential von CagA. Beispielsweise wurde das Antigen zu CagA mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) im Serum von Patienten mit gastrointestinalen Krankheiten (75,3 %), z.B. mit Zwölffingerdarmgeschwüren (100 %) (Covacci et al. 1993) und mit Magenkrebs (71 – 91 %) nachgewiesen (Bornschein und Malfertheiner 2014). Außerdem hat eine Studie mit transgenen Mäusen gezeigt, dass die ektopische Expression von CagA (ohne *H. pylori* Infektion) zu der Entwicklung von epithelialen Hyperplasien, Magenpolypen und Adenokarzinomen führt (Ohnishi et al. 2008). Aufgrund des krebsfördernden Potentials wird CagA als erstes bakterielles Onkogen bezeichnet (Naumann et al. 2017).

CagA ist bis heute das einzige beschriebene Effektorprotein von *H. pylori*, das durch das T4SS in das Zytosol der Wirtszelle injiziert wird, wo es an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Abbildung 3) (Backert et al. 2000, Odenbreit et al. 2000, Stein et al. 2000, Asahi et al. 2000). Die Translokation von CagA ist *in vitro* sehr schnell, wie anhand eines β -Laktamase abhängigen Reporter Systems gezeigt wurde. Bereits nach 15 Minuten Infektion ist CagA im Zytosol von ca. der Hälfte von *H. pylori* infizierten AGS Zellen mittels Immunfluoreszenz nachweisbar (Schindele et al. 2016).

Die Tyrosinphosphorylierung von CagA findet ausschließlich in der Wirtszelle statt, da das Genom von *H. pylori* für keine Tyrosinkinase kodiert (Tegtmeyer und Backert 2011). Zellkultur Experimente haben gezeigt, dass CagA nach der Translokation in das Zytosol der Wirtszelle innerhalb der ersten beiden Infektionsstunden von der onkogenen Src Kinase und innerhalb der darauf folgenden sechs Stunden von der onkogenen Abl Kinase phosphoryliert wird, wonach CagA auch unphosphoryliert in der Wirtszelle vorkommen kann (Selbach et al. 2003, Tegtmeyer und Backert 2011, Backert und Tegtmeyer 2017). Die Phosphorylierung von CagA findet am C-Terminus an einem oder mehreren Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala Motiven statt, die der Aminosäuresequenz entsprechend EPIYA Motive genannt werden (Stein et al. 2002). Die EPIYA Motive ähneln der Phosphorylierungs-Konsensussequenz der Src Kinase (EEIYG/E) (Selbach et al. 2002) und werden, basierend auf der umgebenden Sequenz, in Typ A, B, C und D unterteilt (Tegtmeyer und Backert 2011). Intakte EPIYA Motive sind, wie im Mausmodell gezeigt wurde, essentiell für das Virulenzpotential und somit für die Krankheitsentstehung (Ohnishi et al. 2008). Zudem können sowohl der Typ als auch die Anzahl der Motive das Magenkrebsrisiko beeinflussen (Cover 2016).

CagA interagiert insgesamt mit 22 Wirtszellproteinen, was die höchste bekannte Quantität unter Virulenz-assoziierten Faktoren der mikrobiellen Welt ist (Backert et al. 2010). CagA interagiert ausschließlich im phosphorylierten Zustand mit 10 dieser Wirtszellproteine über deren *src homology 2* (SH2) Domäne, während die Interaktionen mit den anderen 12 Wirtszellproteinen unabhängig vom CagA Phosphorylierungsstatus stattfindet (Tegtmeyer et al. 2011). Sowohl phosphoryliertes wie auch unphosphoryliertes CagA reguliert über unterschiedliche Signalwege die Motilität und Elongation von Epithelzellen, u.a. durch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts (Abbildung 3) (Backert et al. 2001, Stein et al. 2002).

Phosphoryliertes CagA kann außerdem die Zellproliferation und Entzündung verstärken oder abschwächen, während unphosphoryliertes CagA beide Prozesse verstärkt. Außerdem reprimiert phosphoryliertes CagA den Zelltod, während unphosphoryliertes CagA an der Aufhebung der Zellpolarität und Auflösung der Zell-Zell Kontakte in der fokalen Adhäsion mitwirkt (Tegtmeyer et al. 2011). CagA reguliert zudem onkogene Proteine wie c-Met, bzw. induziert die Degradation von Tumorsuppressoren, wie p53 und RUNX3 (*runt related transcription factor 3*) (Atherton et al. 2006, Cover 2016).

1.1.3.3 Das vakuolisierende Cytotoxin A (VacA)

Der Schlüsselvirulenzfaktor VacA wurde 1992 erstmals charakterisiert (Cover und Blaser 1992), ist ubiquitär in *H. pylori* Stämmen verbreitet und wird mittels Typ V Sekretionssystem autotransportiert (Utsch und Haas 2016). VacA bildet im extrazellulären Raum Hexamere, Dodekamere oder Tetradekamere (Chambers et al. 2013), die in der Membran der Zielzelle die Ausbildung von Anion-spezifischen Kanälen induziert und damit die Entstehung von zytoplasmatischen Vakuolen erlaubt (Sewald und Haas 2009) (Abbildung 3). Neben dem Vermögen von VacA mit unterschiedlichen Wirtszellrezeptoren zu interagieren (Posselt et al. 2013, Atherton et al. 2006), kann es diverse Wirtszellveränderungen durch die Ausbildung der Anion-spezifischen Kanäle induzieren. Dazu zählen unter anderem Veränderungen in der Permeabilität der Plasma- und Mitochondrienmembran, die mitochondriale Abgabe von Zytochrom C, die Störung von Zell-Zellkontakten, die Induktion von Autophagie, Apoptose, Nekrose und des Zellzyklus-Arrests (Utsch und Haas 2016, McClain et al. 2017). Weiterhin begünstigt VacA die Immuntoleranz und die Persistenz der Infektion mit *H. pylori*, indem es entzündungsfördernde Signalprozesse und die Funktion und Proliferation von verschiedenen Immunzellen reguliert (Naumann et al. 2017, Cover 2016). Obwohl das *vacA* Gen ubiquitär in *H. pylori* verbreitet ist, gibt es erhebliche, stammspezifische Variationen in der Toxizität, die insbesondere auf die Heterogenität der Genstruktur zurückzuführen sind, die in spezifische Sequenzregionen und damit assoziierte Sequenztypen unterteilt werden kann (McClain et al. 2017, Palframan et al. 2012). Diese haben starke Auswirkungen auf die Transkription, Sekretion und die Kapazität die Vakuolisierung zu induzieren und sind mit unterschiedlichen Risiken für prä-maligne Veränderungen, für peptische Geschwüre und zur Entwicklung von Magenkrebs assoziiert (McClain et al. 2017, Palframan et al. 2012).

1.2 Die Transkriptionsfaktorfamilie NF-κB

Die NF-κB Familie besteht aus induzierbaren eukaryotischen Transkriptionsregulatoren, die von Cnidaria bis zum Menschen konserviert sind (Gilmore 2006). NF-κB wurde erstmals im Jahr 1986 in menschlichen B-Zellen nach der Stimulation mit bakteriellem LPS (**L**ipopolysaccharid) als Bindepartner der Enhancer-Region des Gens für die Immunglobulin Leichtkette κ beschrieben (Sen und Baltimore 1986). Die Bedeutung der NF-κB Familie nimmt seit der Entdeckung sukzessiv zu und machte im Jahr 2010 mit ca. 5000 Publikationen, ca. 0,6 % der jährlichen Pubmed-Veröffentlichungen aus (Hayden und Ghosh 2012). NF-κB reguliert mehrere hundert Gene, die in der Promotor oder Enhancer-Region die κB-Bindesequenz 5'-GGGRNYYYCC-3' (R = Purin, N = beliebiges Nukleotid, W =

Adenin oder Thymin, Y = Pyrimidin) aufweisen (<https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes>). Dementsprechend groß ist das Wirkspektrum auf verschiedene physiologische Prozesse, inklusive der Kontrolle über die angeborene und adaptive Immunantwort, die Differenzierung und Entwicklung verschiedener Immunzellen sowie die Regulation von Entzündungsreaktionen, der Zellproliferation und der Apoptose (Vallabhapurapu und Karin 2009, Neumann und Naumann 2007). Im Gegenzug spielt NF- κ B ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten, entzündungsassoziierten Krankheiten und verschiedenen soliden und hämatologischen Krebsformen (Karin 2009, Vallabhapurapu und Karin 2009). Die Induzierbarkeit der NF- κ B Aktivität durch die Translokation von zytosolischem NF- κ B in den Zellkern erlaubt eine schnelle und umfassende Reaktion auf ein breites Spektrum von Stimuli. Zu den Stimuli zählen unter anderem entzündungsfördernde Zytokine, spezifische bakterielle, virale und fungale Bestandteile und genotoxischer Stress durch UV-Licht oder reaktive Sauerstoffspezies (Neumann und Naumann 2007).

Die Signaltransduktion, die zu der NF- κ B Aktivierung führt, kann grob in den kanonischen (Kapitel 1.2.3) und den nichtkanonischen Signalweg (Kapitel 1.2.4.3) unterschieden werden. Der Forschungsschwerpunkt der *H. pylori*-assoziierten Pathogenese liegt bislang auf der kanonischen Signaltransduktion, während es vor dem Beginn dieser Arbeit nahezu keine Informationen zu der nichtkanonischen Signaltransduktion gab.

Für die *H. pylori*-assoziierte Gastritis wurde gezeigt, dass die Zytokine IL-8 und IL-1 β , Zielgene des kanonischen NF- κ B, an der Initiation und dem Anhalten der Krankheit beteiligt sind (Aihara et al. 1997, Naumann et al. 2017), die als Vorstufe zur Krebsentstehung fungieren kann. Die Expression dieser Zielgene wird z.B. durch Magenschleimhautzellen (autokrine Sekretion) oder infiltrierende Immunzellen, wie Neutrophile Granulozyten, Makrophagen oder Lymphozyten (parakrine Sekretion) vermittelt (Sokolova und Naumann 2017), was die Infiltration weiterer Immunzellen begünstigt, die ihrerseits kanonisches NF- κ B induzieren und zu einer persistenten Entzündung beitragen. Die NF- κ B vermittelte chronische Entzündung kann ein wichtiger Faktor in der Krebsentstehung und -progression sein (Karin 2009). In *H. pylori*-assoziierten Magenkrebs wurde ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der erhöhten Expression von Zielgenen des kanonischen NF- κ B, der Krebsentwicklung und einer schlechten Prognose hergestellt (Sasaki et al. 2001, Yamanaka et al. 2004). Zu diesen Zielgenen zählen die entzündungsfördernden Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF, die antiapoptotischen Faktoren cIAP1/2 (*cellular inhibitor of apoptosis*), A20, Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) und die Regulatoren der Angiogenese VEGF (*vascular endothelial growth factor*), MMP-2 (*matrix metalloproteinase-2*) und MMP-9 (Sokolova und Naumann 2017). Einige dieser Studien haben zudem die Expression, Kernlokalisierung oder Phosphorylierung des NF- κ B Mitglieds RelA als Indikator für die kanonische NF- κ B Aktivität untersucht und konnten eine positive Korrelation mit der Expression einiger Zielgene herstellen (Kwon et al. 2012, Ooi et al. 2009, Sasaki et al. 2001). Außerdem zeigt der siRNA-vermittelte Knockdown von RelA *in vitro* und *in vivo* anti-onkogene Effekte (Sokolova und Naumann 2017).

1.2.1 Die NF- κ B Mitglieder

Die Familie der NF- κ B Transkriptionsregulatoren besteht aus fünf Mitgliedern: RelA, c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105) und NF- κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100) (Abbildung 6). Das charakteristische Merkmal der Familie ist die ca. 300 Aminosäuren lange Rel-Homologie-Domäne (RHD), die, wie Kristallstrukturanalysen gezeigt haben, zwei Immunglobulin-ähnliche Faltungen ausbildet, wovon eine zur Interaktion mit der DNA und eine zur Dimerisierung mit NF- κ B Mitgliedern dient (Vallabhapurapu und Karin 2009). Die NF- κ B Mitglieder bilden in sehr vielen Kombinationen Homo- und Heterodimere. Diese translozieren nach der Aktivierung in den Nukleus, interagieren direkt mit κ B-Bindesequenzenthaltender DNA und induzieren mithilfe der Rekrutierung von Coaktivatoren die Gentranskription, bzw. können diese auch seltener mithilfe von Corepressoren inhibieren (Hayden und Ghosh 2014). Dimere, die RelA, c-Rel und RelB enthalten fungieren als Aktivatoren, da diese über eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) verfügen, die in p50 und p52 nicht enthalten ist (Hayden und Ghosh 2014). Dementsprechend fungieren p50 oder p52 Homodimere primär als transkriptionelle Repressoren. Basierend auf ihren Affinitäten dimerisiert RelB mit p100 oder prozessierten p52 zu dem typischen Dimer der nichtkanonischen Signaltransduktion, während RelA oder c-Rel mit p50 die typischen Dimere der kanonischen Signaltransduktion bilden (Vallabhapurapu und Karin 2009).

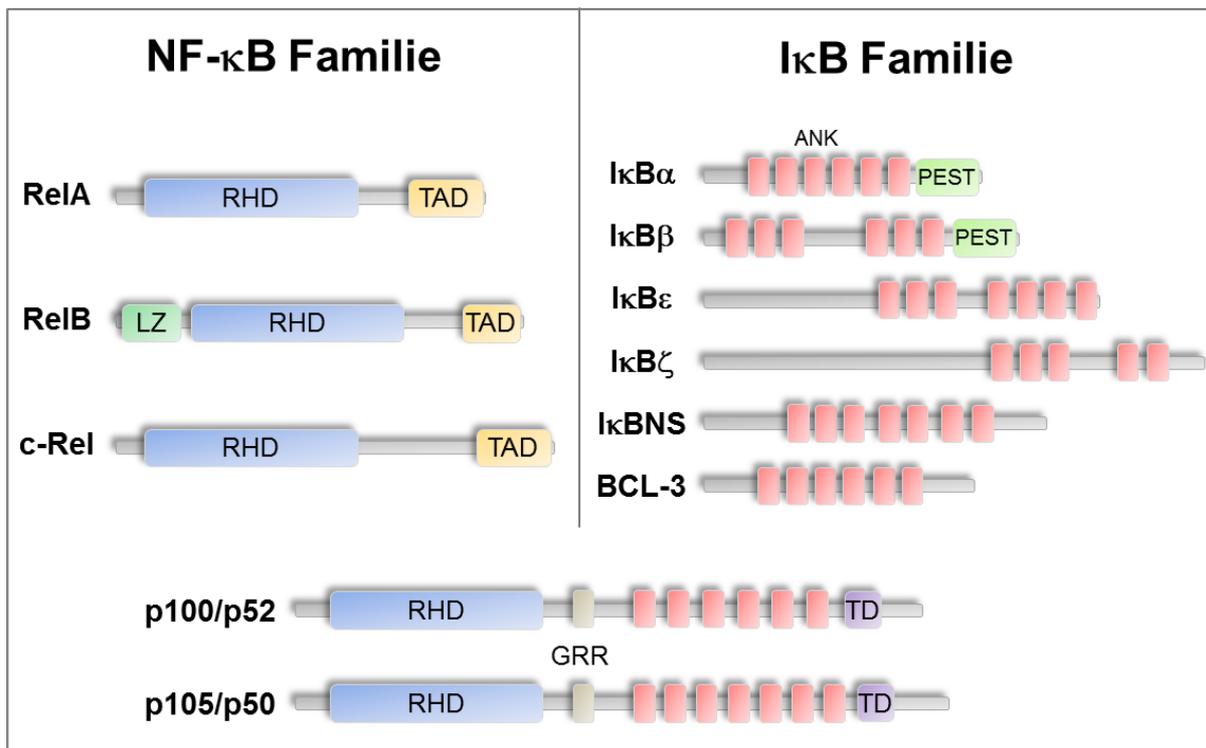


Abbildung 6: Domänenstruktur der Mitglieder der NF- κ B und I κ B Familie in Säugetieren. Die NF- κ B Familie besteht aus den Mitgliedern RelA, RelB, c-Rel, p100/p52 und p105/p50. Die I κ B Familie besteht aus den Mitgliedern I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , I κ BNS, BCL-3, p100/p52 und p105/p50. RHD: Rel-Homologie-Domäne, TAD: Transaktivierungsdomäne, LZ: Leucin-Zipper-Domäne, ANK: Ankyrin-Wiederholung, TD: Todesdomäne, GRR: Glycin (G)-reiche Region, PEST: Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)-reiche Region. Die Abbildung und Zuordnungen zu den Familien wurden nach Hayden und Ghosh 2012 erstellt.

1.2.2 Die Inhibitoren von NF- κ B

Ein charakteristisches Merkmal der NF- κ B Familie ist die Regulation durch die Inhibitoren von NF- κ B (I κ B). Diese werden in die klassischen I κ Bs (I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ), die atypischen I κ Bs (BCL-3 (**B-cell lymphoma-3**) I κ B ζ und I κ BNS) und (die unprozessierten) p100 und p105 unterschieden (Abbildung 6). Dementsprechend werden p100 und p105 zugleich der NF- κ B und der I κ B Familie zugeordnet (Hayden und Ghosh 2012). Charakteristisch für die acht Inhibitoren sind die fünf bis sieben Ankyrin-Wiederholungen am C-Terminus, die zur Interaktion mit NF- κ B, sowie der Inhibition der NF- κ B Aktivität dienen können. Fast alle Mitglieder haben zudem das Phosphodegron Motiv DSGxxS (D = Asparaginsäure, S = Serin, G = Glycin, x = beliebige Aminosäure), das bei der Stimulation phosphoryliert wird (Hayden und Ghosh 2012). Das phosphorylierte Degron dient als Erkennungssequenz für das F-Box Protein β -TrCP (**β -transducin repeat-containing protein**), das Bestandteil eines Cullin E3 Ubiquitin Ligase Komplexes (Skp1-Cullin-Roc1/Rbx1/Hrt1) ist. Dieser Komplex bindet K48-verknüpfte Ubiquitinketten mithilfe des E2 Enzyms UBE2D1 (**ubiquitin conjugating enzyme E2 D1**) kovalent an den phosphorylierten Inhibitor, was bei den I κ Bs zur Degradation bzw. bei p105 und p100 zur Prozessierung und Degradation des C-Terminus durch das 26S Proteasom und somit zur Aktivierung des NF- κ B Dimers führt (Hayden und Ghosh 2014).

Von den klassischen I κ Bs werden I κ B α und I κ B β in allen Geweben exprimiert, während I κ B ϵ nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Hayden und Ghosh 2012, Rao et al. 2010). Die klassischen I κ Bs sind primär im Zytosol lokalisiert und binden RelA Homo- oder Heterodimere, sind aber nicht auf diese limitiert (Hayden und Ghosh 2012, Whiteside et al. 1997). Sowohl I κ B α als auch I κ B β maskieren das Kernlokalisierungssignal von gebundenen NF- κ B Dimeren, sequestrieren es bis zu der Stimulus-induzierten Degradation im Zytosol und inhibieren damit den Transkriptionsregulator. I κ B α ist der Hauptinhibitor der kanonischen Signaltransduktion (Details sind Kapitel 1.2.3 zu entnehmen) (Hayden und Ghosh 2012), während I κ B ϵ nahezu unerforscht ist (Hayden und Ghosh 2012, Whiteside et al. 1997).

Die atypischen I κ Bs BCL-3, I κ B ζ , I κ BNS sind wenig untersucht und größtenteils im Zellkern lokalisiert, wo sie die Transkription durch NF- κ B und andere Transkriptionsregulatoren sowohl inhibieren als auch verstärken können (Hayden und Ghosh 2012, Gilmore 2006). Sie werden zumeist erst nach der NF- κ B Aktivierung exprimiert und fungieren dann als sekundäre Reaktion (Hayden und Ghosh 2012). Sie binden an p50 Homo- oder Heterodimere, sind aber nicht auf diese limitiert (Hayden und Ghosh 2012, Hirotani et al. 2005, Fiorini et al. 2002).

p100 ist der Hauptinhibitor der nichtkanonischen Signaltransduktion, indem es hauptsächlich mit RelB interagiert und in unstimulierten Zellen durch die Maskierung des Kernlokalisierungssignals das p100/RelB Heterodimer inaktiv im Zytosol sequestriert. Die Prozessierung von p100 zu p52 erlaubt die Translokation von p52/RelB in den Zellkern und damit die nichtkanonische NF- κ B Genexpression (Details sind dem Kapitel 1.2.4.3 zu entnehmen) (Cartwright et al. 2016, Sun 2011). Außerdem wirken p50 (s.u.) und p52 Homodimere im Nukleus als transkriptionelle Repressoren bzw. nach der Bindung von BCL-3 als transkriptionelle Aktivatoren (Hayden und Ghosh 2012).

p105 ist ein zytosolischer Inhibitor und Vorläufer für NF- κ B Dimere. In unstimulierten Zellen wird p105 in einem bestimmten Verhältnis zu p50 sowohl ko- als auch posttranslational, aber primär konstitutiv und β -TrCP-Komplex-unabhängig prozessiert (Cohen et al. 2004, Oeckinghaus und Ghosh 2009). p105 kann auf mehrere Weisen als Inhibitor wirken, z.B. indem es an NF- κ B Mitglieder bindet, wonach es induzierbar prozessiert werden kann und als p50 mit den TAD-enthaltenden RelA, c-Rel und RelB transkriptionell aktive NF- κ B Dimere bildet (Cartwright et al. 2016).

1.2.3 Das kanonische NF- κ B und die *H. pylori*-induzierte Signaltransduktion

Die kanonische NF- κ B Aktivierung spielt in diversen Stressreaktionen eine wichtige Rolle, wozu auch die angeborene Immunantwort gegenüber Pathogenen gehört. In diesem Fall führt die schnelle Aktivierung zu der Expression entzündungsfördernder Chemokine und Zytokine wie IL-8 und TNF und induziert durch die Rekrutierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen oder natürliche Killerzellen, eine umfassende Immunreaktion. Zu den dutzenden Rezeptoren, die diese Signaltransduktion vermitteln, gehören auch Rezeptorfamilien, die auf spezifische bakterielle, virale und fungale Bestandteile reagieren, wie z.B. die TLR1-10 (*toll-like receptor*) und die NOD-ähnlichen Rezeptoren sowie Zytokinrezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) und Interleukin-Rezeptorfamilie (IL-R) (Hayden und Ghosh 2012, Neumann und Naumann 2007).

Für die kanonische NF- κ B Aktivierung durch *H. pylori* wurden bereits 2010 mindestens 12 Signalwege in Zellkulturexperimenten postuliert (Backert und Naumann 2010). Diese Signalwege werden 1) direkt und innerhalb von 15 Minuten aktiviert 2) indirekt nach mehreren Stunden aktiviert, z.B. durch die Liganden-Expression oder Folgesignalkaskaden oder 3) Zelllinien-spezifisch induziert, was auf der unterschiedlichen Expression der induzierenden Rezeptoren beruhen könnte (unveröffentlichte Daten). Abgesehen davon handelt es sich bei einigen der postulierten Signalwege wahrscheinlich um Artefakte, die auf unzureichende Kontroll- und Validierungsexperimente zurückzuführen sind (Backert und Naumann 2010).

Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt seit ca. 20 Jahren auf der direkten T4SS-abhängigen und CagA-unabhängigen kanonischen NF- κ B Signaltransduktion (Schweitzer et al. 2010, Sokolova et al. 2013). In unstimulierten Zellen inhibiert I κ B α RelA/p50, indem es mit dessen RHD interagiert, damit das Kernlokalisierungssignal maskiert und so inaktiv im Zytosol sequestriert (Ganchi et al. 1992). Für die direkte kanonische NF- κ B Aktivierung wurde kürzlich von drei Arbeitsgruppen postuliert, dass *H. pylori* durch das T4SS das β Anomer von Heptose 1,7-Bisphosphat (HBP), eine metabolische Vorstufe in der LPS Biosynthese, in die Wirtszelle als Stimulus injiziert (Gall et al. 2017, Stein et al. 2017, Zimmermann et al. 2017). Dieses führt zu der ALPK1 (*alpha-kinase 1*) und TIFA (*TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain*)-abhängigen Generierung essentieller Rekrutierungskomplexe so genannter TIFAsomen (Zimmerman et al. 2017). Analog dazu wurde für das *Yersinia pseudotuberculosis* injizierte β -HBP ebenfalls eine ALPK1 und TIFA-abhängige kanonische NF- κ B Aktivierung gezeigt (Zhou et al. 2018). Dort wurde außerdem nachgewiesen, dass β -HBP in der Wirtszelle durch Adenylyltransferasen zu dem *bona fide* Liganden ADP-Heptose 7-P umgesetzt wird und dann direkt ALPK1 aktiviert. Dies ist höchstwahrscheinlich auch für *H. pylori* der Fall. Anschließend vermitteln die TIFAsomen in der *H. pylori* Infektion die Interaktion mit der essentiellen E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) und TAK1 (*TGF β -activated kinase 1*), das sich in einem Komplex mit TAB1 und 2 (*TGF β -binding protein*) befindet (Abbildung 7) (Maeda et al. 2000, Hirata et al. 2006, Sokolova et al. 2014). TAK1 wird K63 polyubiquitinyliert und an Threonin 184/187 phosphoryliert (Sokolova et al. 2018), wofür in der IL-1R Stimulation gezeigt wurde,

dass diese Phosphorylierung essentiell für die NF- κ B Aktivierung ist (Yu et al. 2008). Außerdem wird MEKK3 (MAP3K3, *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3*) an Serin 166 phosphoryliert (unbekannte Funktion) (Sokolova et al. 2014). TAK1 und MEKK3 induzieren gemeinsam die Aktivierung des IKK-Komplexes (*inhibitor of kappaB kinase*), indem sie die Phosphorylierung von IKK α an Serin 176/180 und von IKK β an Serin 177/181 vermitteln (Sokolova et al. 2014). Dafür ist insbesondere TAK1 wichtig, während MEKK3 eine untergeordnete Rolle spielt, wie siRNA Knockdown Experimente gezeigt haben (Sokolova et al. 2014). Der 700 - 900 kDa schwere IKK-Komplex ist ein Kernelement der kanonischen NF- κ B Signaltransduktion. Er besteht aus den 85 kDa bzw. 87 kDa schweren Serin/Threonin-Kinasen IKK α und IKK β und dem 48 kDa schweren Gerüstprotein IKK γ , das auch als NEMO (*NF-kappaB essential modulator*) bezeichnet wird (Hayden und Ghosh 2012). Für die kanonische NF- κ B Aktivierung sind NEMO (Yamaoka et al. 1998) und IKK β essentiell, während IKK α in vielen der kanonischen NF- κ B Signaltransduktionen redundant ist (Vallabhapurapu und Karin 2009, Delhase et al. 1999). Der aktivierte IKK-Komplex vermittelt die Phosphorylierungen von I κ B α und RelA, davon wirkt die RelA-Phosphorylierung an Serin 536 transaktivierend (Neumann und Naumann 2007, Sokolova et al. 2013). Die Phosphorylierung an Serin 32/36 im Phosphodegron von I κ B α (Chen et al. 1996) dient als Rekrutierungssignal für den E3 Ubiquitin Ligase Komplex β -TrCP-Skp1-Cullin1-Roc1/Rbx1/Hrt1 (Hayden und Ghosh 2014, Vallabhapurapu und Karin 2009). Die Rekrutierung des Komplexes wurde in der *H. pylori*-induzierten Aktivierung noch nicht nachgewiesen, ist aber wahrscheinlich, da dieselbe Phosphorylierung in der TNF-vermittelten Signalkaskade dazu führt. Der Komplex induziert die K48 Polyubiquitinylierung von I κ B α , was in dessen 26S Proteasom-abhängiger Degradation resultiert. Die damit assoziierte Freilegung des Kernlokalisierungssignals von RelA/p50 erlaubt die Translokation in den Nukleus, wo es die Expression von κ B-Bindesequenzen-enthaltenden Genen reguliert (Hayden und Ghosh 2012).

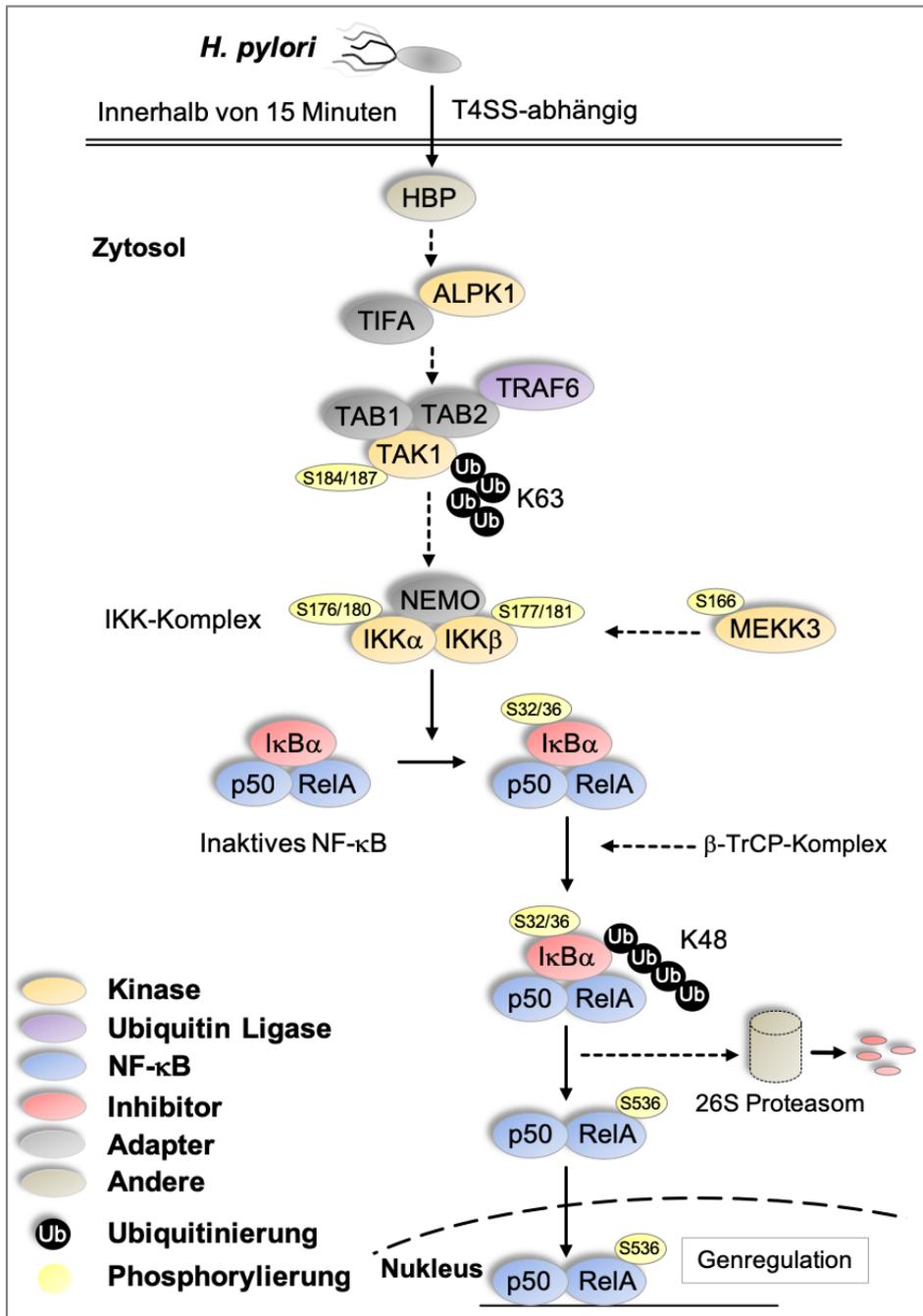


Abbildung 7: Modell der *H. pylori* induzierten schnellen kanonischen NF-κB Signaltransduktion in Epithelzellen. *H. pylori* induziert innerhalb von 15 Minuten das kanonische NF-κB. Dafür injiziert es mithilfe seines T4SS das β Anomer von Heptose 1,7-Bisphosphat (HBP) in die Wirtszelle, was zu der Aktivierung des IKK-Komplexes führt. Der IKK-Komplex induziert die Degradation von IκBα, was in der Demaskierung des Kernlokalisierungssignals und der Translokation von RelA/p50 in den Nucleus resultiert, wo es die Genexpression reguliert.

1.2.4 Das nichtkanonische NF-κB

1.2.4.1 Physiologische Funktionen des nichtkanonischen NF-κB und LTβR

Die nichtkanonische NF-κB Signaltransduktion ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen und insbesondere des adaptiven Immunsystems. Mäuse mit einer Lymphotoxin β Rezeptor (LTβR)-Defizienz (*Itbr^{-/-}*) zeigen erhebliche Entwicklungsstörungen in verschiedenen lymphatischen Organen. Dazu zählen Fehlbildungen im Thymus, einem primären lymphatischen Organ (Boehm et al. 2003, Kajiura et al. 2004) sowie in den meisten sekundären lymphatischen Organen. *Itbr^{-/-}* Mäuse fehlen nämlich vollständig die Lymphknoten und Peyer-Drüsen und zeigen zudem eine gestörte Architektur der Milz und Störungen oder die Abwesenheit von Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Geweben (Futterer et al. 1998, Dejardin 2006, van de Pavert und Mebius 2010).

Ein Schlüsselmerkmal dieser sekundären lymphatischen Organe sind die sekundären lymphatischen Follikel - kugelförmige Kolonien aus B-Zellen, die von T-Zellen umgeben, aber von diesen getrennt sind (Abbildungen 8). Die beiden Zellpopulationen interagieren primär in einem spezifischen Bereich miteinander - dem so genannten Keimzentrum (GC, *germinal center*). Die Entstehung von sekundären lymphatischen Follikeln wird durch lymphatische Stromazellen und durch die LTβR-vermittelte nichtkanonische NF-κB-abhängige Expression von CCL19 und CCL21 (*C-C motif chemokine ligand*) und dem dafür essentiellen CXCL13 (*chemokine C-X-C motif ligand 13*) reguliert (Schneider et al. 2004, Pitzalis et al. 2014). CXCL13 ist ein Chemoattraktor, der B-Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen rekrutiert (Legler et al. 1998), weshalb *cxcl13^{-/-}* Mäuse ebenfalls starke Fehlbildungen in sekundären lymphatischen Organen zeigen (van de Pavert und Mebius 2010).

Weiterhin ist die nichtkanonische NF-κB Signaltransduktion essentiell für die Keimzentren-Bildung, indem es die Netzbildung in follikulären dendritischen Zellen während der Keimzentren-Bildung reguliert (Sun 2017). Die Keimzentren sind ein Schlüsselmerkmal der humoralen adaptiven Immunantwort und erlauben die Reifung und den Immunglobulin Klassenwechsel der B-Zellen, sowie deren Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Pitzalis et al. 2014, Sun 2017). Patienten mit Mutationen bzw. Mäuse mit einem Knockout in dem NF-κB2- oder dem NIK (*NF-κB inducing kinase*)-kodierenden Gen zeigen daher eine stark eingeschränkte humorale Immunantwort (Sun 2017). Dies ist wahrscheinlich auch dadurch begünstigt, dass das nichtkanonische NF-κB essentiell für das Überleben von B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen ist (Sun 2017).

Weiterhin wurde anhand von Mäusen mit NIK-Defizienz und NF-κB2^{Lym1}, das für nicht prozessierbares p100 kodiert, gezeigt, dass das nichtkanonische NF-κB wichtig für die Entstehung und den Bestand von TH1 und TH17 Effektor T-Zellen sowie CD4 und CD8 (*cluster of differentiation*) Gedächtnis T-Zellen ist (Yu et al. 2014, Li et al. 2016, Rowe et al. 2013, Sun 2017). T-Zellen sind als zentrale Komponente der angeborenen Immunantwort verantwortlich für verschiedene Autoimmun- und Entzündungskrankheiten (Sun 2017).

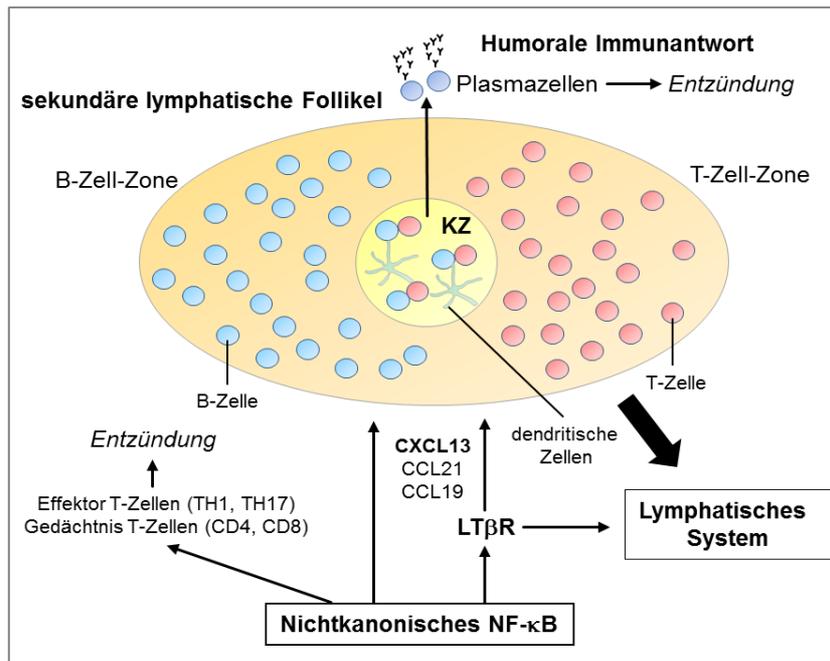


Abbildung 8: Schematische Darstellung physiologischer Funktionen der nichtkanonischen NF-κB Signaltransduktion und des LTβR. KZ: Keimzentrum. Die nichtkanonische NF-κB Signaltransduktion und der LTβR sind essentiell für die Entstehung von sekundären lymphatischen Follikeln, u.a. durch die LTβR-vermittelte Expression von CCL21, CCL19 und insbesondere CXCL13. Sekundäre lymphatische Follikel können in die B-Zell- und T-Zell-Zone sowie das Keimzentrum unterteilt werden. Diese Follikel sind ein zentraler Bestandteil von verschiedenen Komponenten des lymphatischen Systems und essentiell für die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, die wichtig für die Humorale Immunantwort sind. Außerdem ist die nichtkanonische NF-κB Aktivität entscheidend für die Entstehung und den Bestand von spezifizierten T-Zellen.

1.2.4.2 Pathophysiologische Bedeutung des nichtkanonischen NF-κB und LTβR

Die Dysregulation oder konstante Aktivierung der nichtkanonischen NF-κB Signaltransduktion führt, wie Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, zu einer Vielzahl verschiedener Krankheiten. Dafür spielt unter anderem die Regulation von Entzündungsreaktionen durch die Expression von Chemokinen, Zytokinen und die Rekrutierung weiterer Immunzellen eine Rolle sowie die Regulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens (Studencka-Turski et al. 2018, Fernandes et al. 2016, Nishina et al. 2009). Die konstante Aktivierung des nichtkanonischen NF-κB führt beispielsweise zu dem Überleben von selbstreaktiven B-Zellen, die in mehreren entzündungsassoziierten- und Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen, wozu auch die rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus erythematoses und das Sjögren-Syndrom zählen (Sun 2017, Winter et al. 2010). Weiterhin zeigen aktuelle Patientenstudien eine erhöhte NIK mRNA- oder Proteinmenge in verschiedenen Krebsformen, wobei in einigen Studien eine Korrelation zwischen der Abundanz und der Erkrankung festgestellt wurde. Dazu zählen sowohl solide Krebsformen, wie das bronchogene Karzinom (Saitoh et al. 2010, Ma et al. 2015), das hepatozelluläre Karzinom (Zhang et al. 2012) und das maligne Melanom (Asangani et al. 2012), als auch hämatologische Krebsformen, wie das klassische Hodgkin Lymphom (Otto et al. 2012), das periphere T-Zell-Lymphom (Odqvist et al. 2013), das Milz-Randzonen-Lymphom (Rossi et al. 2011), die Adulte T-Zell-Leukämie (Yamagishi et al. 2012, Saitoh et al. 2008) und das Multiple Myelom (Annunziata et al. 2007, Keats et al. 2007).

Es gibt nur sehr wenige Informationen zu der Fähigkeit von *H. pylori* das nichtkanonische NF- κ B *in vitro* oder *in vivo* zu aktivieren. Eine einzige Publikation hat die Aktivierung in der menschlichen B-Zelllinie IM-9 und der Epithelzelllinie AGS untersucht. Ohmae et al. (2005) hat gezeigt, dass *H. pylori* in IM-9 Zellen eine späte *cagPAI*-unabhängige Aktivierung induziert, während keine Aktivierung in AGS Zellen nachgewiesen werden konnte. Bezüglich der IM-9 Zellen ist erwähnenswert, dass B-Zellen keinen LT β R exprimieren (Fernandes et al. 2016). Erst im Verlauf der vorliegenden Arbeit ist eine zweite Studie veröffentlicht worden, die, wie diese Arbeit, eine LT β R-vermittelte Aktivierung in Epithelzellen zeigt. Allerdings postulieren Mejias-Luque et al. (2017) im Gegensatz zu dieser Arbeit einen indirekten Aktivierungsmechanismus durch die Expression des Liganden LIGHT (*homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes*).

Außerdem deuten Indizien auf die Aktivierung des nichtkanonischen NF- κ B und des LT β R in verschiedenen *H. pylori*-assoziierten Krankheiten und insbesondere in der Gastritis hin, da diese eine erhöhte CXCL13 Expression zeigen (Mazzucchelli et al. 1999), das primär durch den LT β R induziert wird (Dejardin et al. 2002, Gräbner et al. 2009, Pitzalis et al. 2014). Patienten zeigen zudem in verschiedenen *H. pylori*-assoziierten Krankheiten eine sehr häufige und hohe Anwesenheit von lymphoiden Follikeln (Zaitoun 1995, Tariq Siddiqui et al. 2011), deren Entstehung ebenfalls von dem LT β R abhängig sein kann, was genauer in der Diskussion thematisiert wird.

1.2.4.3 Die nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion

Die nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion wird durch 11 Rezeptoren induziert, wovon 10 der TNFRSF zugeordnet werden (Sun 2017). Von diesen ist der LT β R, der BAFFR (*B cell-activating factor receptor*) und CD40 am besten untersucht (Vallabhapurapu und Karin 2009). Allerdings ist die Signaltransduktion dieser Rezeptoren nur eingeschränkt studiert worden, weshalb sich die nachfolgenden Beschreibungen aus Untersuchungen dieser drei Rezeptoren zusammensetzt. Die Beschreibung entspricht dem allgemein anerkannten Modell für die nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion.

Ohne Stimulation ist das nichtkanonische NF- κ B Dimer p100/RelB inaktiv im Zytosol der Zelle sequestriert. Die Ankyrin-Wiederholungen an der C-terminalen Seite von p100 maskieren nämlich das Kernlokalisierungssignal in der RHD auf der N-terminalen Seite, was in Co-Immünpräzipitationsstudien mit unterschiedlichen p100 Fragmenten gezeigt wurde (Qing et al. 2005). Die Aktivierung der nichtkanonischen Signaltransduktion beruht auf der Regulation der Stabilität der Schlüsselkinase NIK (*NF- κ B inducing kinase*), die als spezifisch für den Signalweg angesehen wird (Sun 2012). Ohne Stimulation bindet zytosolisches NIK an einen Proteinkomplex aus TRAF3 und den E3 Ubiquitin Ligasen TRAF2 und cIAP1 oder 2, wodurch es konstitutiv degradiert wird (Abbildung 9 A). cIAP1 und cIAP2 werden fortwährend als cIAP1/2 bezeichnet, da sie dieselbe Funktion in diesem Komplex erfüllen und ausschließlich die Abwesenheit beider Proteine die Funktion des Komplexes beeinträchtigt (Gray et al. 2014, Wallach und Kovalenko 2008, Zarnegar et al. 2008). Die Degradation von NIK findet wie folgt statt: NIK bindet mithilfe seines Bindemotivs in

Aminosäuren 78 - 84 direkt an TRAF3 (Liao et al. 2004), welches über die TRAF2-Interaktion den Komplex mit cIAP1/2 bildet (Zarnegar et al. 2008). Außerdem interagiert NIK schwach mithilfe seiner N-terminalen *IAP-binding motif* (IBM)-Domäne mit der *baculovirus IAP repeat* (BIR) 2-Domäne von cIAP1/2 (Lee et al. 2014). Diese Interaktion ist wichtig für cIAP1/2 vermittelte K48 Polyubiquitinylierung und Degradation von NIK über das 26S Proteasom, die von der katalytischen Aktivität von cIAP1/2 abhängt (Sun 2011, Lee et al. 2014).

In der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion ist die Stabilisierung von NIK ein Schlüsselereignis. Der LT β R wird durch die Liganden Lymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$ oder LIGHT $_3$ aktiviert (Fernandes et al. 2016), was bei der LT $\alpha_1\beta_2$ Stimulation zu der Dimerisierung des Rezeptors führt (Sudhamsu et al. 2013). Dies erlaubt die Rekrutierung des NIK/TRAF3/TRAF2/cIAP1/2-Komplexes an den aktivierten Rezeptor (Abbildung 9 B) (Sun 2011). TRAF2 verstärkt mithilfe seiner dafür essentiellen RING (*really interesting new gene*)-Finger Domäne die K63 Polyubiquitinylierung von cIAP1/2 (Vallabhapurapu et al. 2008), was zu der cIAP1/2-abhängigen K48 Polyubiquitinylierung und Degradation von TRAF3 anstelle von NIK führt (Sun 2011, Ganef et al. 2011, Liao et al. 2004). Eine Ausnahme zu der TRAF3 Degradation wurde für die Stimulation mit TWEAK (*TNF-related weak inducer of apoptosis*) beschrieben, das nach der Bindung an den Rezeptor FN14 (*fibroblast growth factor-inducible 14*) stattdessen die Degradation von TRAF2 und cIAP1/2 induziert (Varfolomeev et al. 2007). Nichtsdestotrotz führen beide Prozesse zu einer Störung des TRAF3/TRAF2/cIAP1/2-Komplexes, was in der Stabilisierung und Akkumulation von NIK resultiert. Ebenso zeigen verschiedene Zellkultur-Studien und Mausexperimente, dass die Abwesenheit von TRAF2, TRAF3, der beiden cIAPs oder eine mutationsbedingte Störung der Interaktion zwischen den Komponenten zu der Akkumulation von NIK führt (Vallabhapurapu et al. 2008, Zarnegar et al. 2008, Liao et al. 2004, He et al. 2007, Gardam et al. 2008, Xie et al. 2007).

Das akkumulierte NIK wird durch die Phosphorylierung an Threonin 559 aktiviert, wobei spekuliert wird, dass diese über eine trans-Autophosphorylierung geschieht, weil die Rezeptorrekrutierung von NIK zu einer lokalen Konzentrationserhöhung durch die Assoziation und Dissoziation vom Rezeptorkomplex führt (Sun 2011). Das aktivierte NIK erfüllt anschließend mehrere essentielle Funktionen für die nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion: 1) NIK vermittelt (IKK α -abhängig aber unabhängig von dessen Kinaseaktivität) in der Region der Ankyrin-Wiederholungen die Phosphorylierung von p100 an Serin 866/870 (Xiao et al. 2001 und 2004, Liang et al. 2006) 2) NIK aktiviert IKK α , indem es dessen Phosphorylierung an Serin 176 vermittelt (Senftleben et al. 2001, Ling et al. 1998) 3) NIK ist *in vitro* notwendig für die Rekrutierung von IKK α zu dem p100/RelB Dimer (Xiao et al. 2004). Anschließend induziert IKK α direkt, wie mithilfe eines *in vitro* Kinase Assays gezeigt wurde, die Phosphorylierung von p100 an Serin 99/108/115/123/872 (Xiao et al. 2004). Sowohl die NIK-abhängige Phosphorylierung an Serin 866/870 als auch die IKK α -induzierte Phosphorylierung an Serin 99/108/115/123/872 sind, wie anhand eines Konstruktes mit Alanin Substitutionen an den fünf Positionen gezeigt wurde, essentiell für die Rekrutierung des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes β -TrCP-Skp1-Cullin1-Roc1/Rbx1/Hrt1 (Xiao et al. 2004, Liang et al. 2006). Dabei fungieren die phosphorylierten Serine 866/870

und Serin 872, deren Aminosäuresequenz dem Phosphodegron von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ ähnelt (Liang et al. 2006), als Rekrutierungssignal für den E3 Ubiquitin Ligase Komplex. Die anschließende K48 Polyubiquitinylierung führt zu der Prozessierung von p100 zu p52 (Sun 2011, Liang et al. 2006). Dieser Abbau der Ankyrin-Wiederholungen demaskiert das Kernlokalisierungssignal und erlaubt die Translokation von p52/RelB in den Zellkern, wo es die Expression von κB -Bindesequenzen-enthaltenden Genen reguliert.

Im Vergleich zu der kanonischen NF- κB Signaltransduktion zeichnet den nichtkanonischen Signalweg eine erheblich längere Aktivierung aus. Weiterhin nimmt $\text{IKK}\alpha$ eine Schlüsselrolle ein, während $\text{IKK}\beta$ und NEMO, wie in Knockout MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) gezeigt wurde, redundant sind (Liang et al. 2006, Claudio et al. 2002, Dejardin et al. 2002), was im starken Kontrast zu der kanonischen NF- κB Signaltransduktion steht.

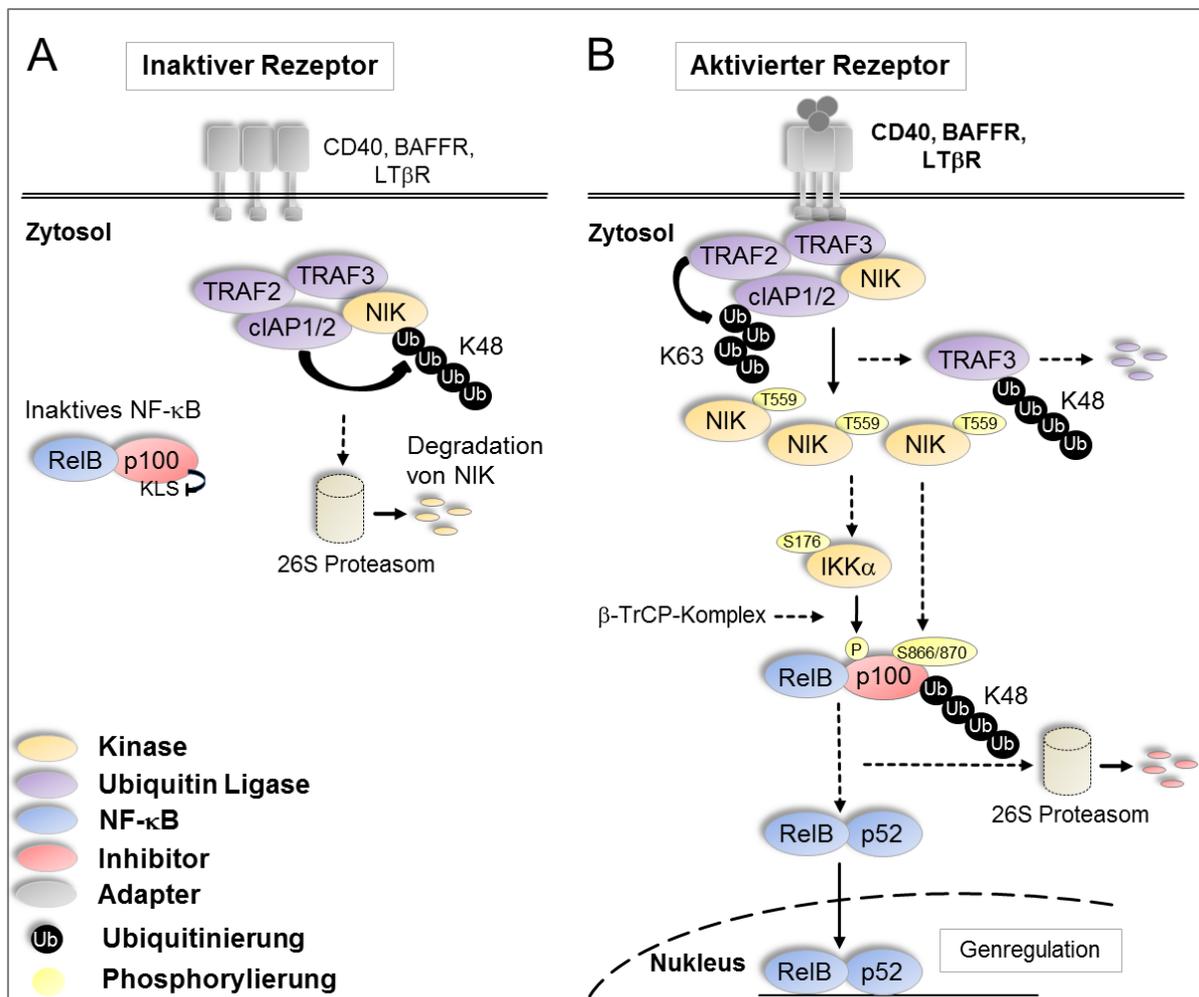


Abbildung 9: Regulation des nichtkanonischen NF- κB unter stimulierten und unstimulierten Bedingungen. (A) Ohne Stimulation wird p100/RelB im Zytoplasma sequestriert, indem p100 sein Kernlokalisierungssignal (KLS) maskiert, während NIK konstitutiv durch den TRAF3/TRAF2/cIAP1/2-Komplex degradiert wird. (B) P: Serin 99/108/115/123/872. Die Stimulation der dargestellten Rezeptoren führt zu der Rezeptorrekrutierung und Destabilisierung des TRAF3/TRAF2/cIAP1/2-Komplexes, was in der Stabilisierung von NIK resultiert. Die gezeigte Folgesignalkaskade führt zur Prozessierung von p100 zu p52 und der Demaskierung des Kernlokalisierungssignals. Dies führt zu der Translokation von p52/RelB in den Nukleus, wo es die Genexpression reguliert.

Ziele dieser Arbeit

Eine steigende Anzahl an Studien zeigt die Dysregulation der nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion in entzündungsassoziierten Krankheiten. Einige dieser Krankheiten werden durch Pathogene begünstigt, die wie *H. pylori* spezifisch den Menschen persistent infizieren. Dabei handelt es sich primär um onkogene Viren, nämlich den humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1), den Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV), den Hepatitis-C-Virus (HCV) und den Epstein-Barr-Virus (EBV), wovon einige die nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion direkt durch Onkoproteine modulieren (Sun und Cesarman 2011). Weiterhin wurde für die HCV-Infektion gezeigt, dass eine Inhibition der Lymphotoxin vermittelten LT β R-Aktivierung signifikant die chronische Hepatitis und Karzinogenese reduziert (Haybäck et al. 2009). *H. pylori* teilt einige Merkmale in der Pathogenese mit diesem und weiteren der genannten Viren, deren nichtkanonische NF- κ B Aktivierung potentiell mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert ist (Pitzalis et al. 2014, Sun und Cesarman 2011), was genauer in der Diskussion thematisiert wird. Vor Beginn dieser Arbeit hat eine einzige Veröffentlichung das Vermögen von *H. pylori* untersucht das nichtkanonische NF- κ B in Epithelzellen (AGS) zu induzieren, wo keine Aktivierung nachgewiesen werden konnte (Ohmae et al. 2005). Allerdings zeigte eine Studie für *Helicobacter felis* infizierte C57BL/6 Mäuse, die als Modellsystem für die *H. pylori* Infektion verwendet werden, nach 6 Wochen bzw. 12 Monaten Infektion mithilfe von Knockouts, dass p100/p52 (im Gegensatz zu c-Rel) einen starken Einfluss auf die gastrische epitheliale Pathogenese hatte (Burkitt et al. 2013). Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit war es zu analysieren, ob *H. pylori* die Fähigkeit besitzt das nichtkanonische NF- κ B *in vitro* in Epithelzellen zu aktivieren und die damit assoziierte Signaltransduktion im Detail zu definieren. Dafür sollten beteiligte Signalkomponenten der Wirtszelle bzw. Faktoren von *H. pylori* innerhalb der Signalkaskade identifiziert, sowie ggf. relevante posttranslationale Modifikationen nachgewiesen werden. Dieses soll als Basis für weitergehende Untersuchungen dienen.

2. Ergebnisse

2.1 *H. pylori* induziert eine rasche T4SS-vermittelte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung in Epithelzellen

2.1.1 Bestimmung des Vermögens von *H. pylori* das nichtkanonische NF- κ B in Epithelzellen zu aktivieren

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Vermögen von *H. pylori* das nichtkanonische NF- κ B zu induzieren untersucht. Dafür wurden unterschiedliche Epithelzelllinien mit dem Stamm P1 infiziert, der in jeder der getesteten Zelllinien schnell und mit einer übereinstimmenden Kinetik die Regulation von nichtkanonischen NF- κ B Signalkomponenten induzierte. HeLa und NCI-N87 Zellen zeigten in Western Blot Analysen innerhalb von 30 Minuten nach der Infektion die Phosphorylierung von NIK in der Aktivierungsschleife (Threonin 559) und anschließend die Stabilisierung und Akkumulation von NIK (Abbildung 10 A und B). Zusätzlich zu der Stabilisierung konnte die NIK-vermittelte Phosphorylierung von p100 an Serin 866/870, die essentiell für die Prozessierung zu p52 ist, innerhalb von 45 Minuten gezeigt werden (Abbildung 10 A und B). Die Regulation der nichtkanonischen NF- κ B Signalkomponenten war damit fast so schnell wie die T4SS-abhängige kanonische NF- κ B Aktivierung, wie die Phosphorylierung an Serin 32/36 und die nachfolgende Degradation von I κ B α sowie die transaktivierende Phosphorylierung von RelA an Serin 536 zeigte (Abbildung 10 A und B).

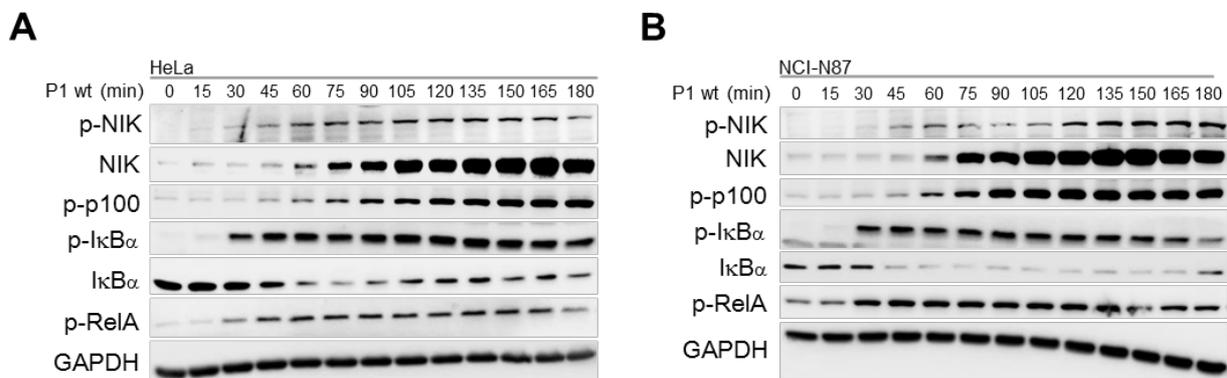


Abbildung 10: *H. pylori* induziert die Regulation von Komponenten der nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion (NIK und p100) innerhalb von 45 Minuten. Es wurde die Kinetik der *H. pylori* P1 induzierten Regulation der nichtkanonischen NF- κ B-Signalkomponenten NIK und p100 in (A) HeLa und (B) NCI-N87 Zellen untersucht. Die kanonischen NF- κ B Signalkomponenten I κ B α und RelA sind zum Vergleich der Regulationskinetiken gezeigt. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* P1 infiziert und die Gesamtllysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Um die Daten zu konsolidieren wurde zudem der *H. pylori* P12 Stamm getestet, der wie der P1 Stamm die Akkumulation von NIK und die Phosphorylierung von p100 in HeLa und AGS Zellen induzierte (Abbildung 11 A und B). Es ist erwähnenswert, dass für AGS Zellen eine höhere Proteinmenge eingesetzt werden musste, um eine vergleichbare Signalstärke wie für

HeLa Zellen zu detektieren. Dies könnte der Grund dafür sein, dass Ohmae et al. (2005) keine Aktivierung für AGS Zellen nachweisen konnte.

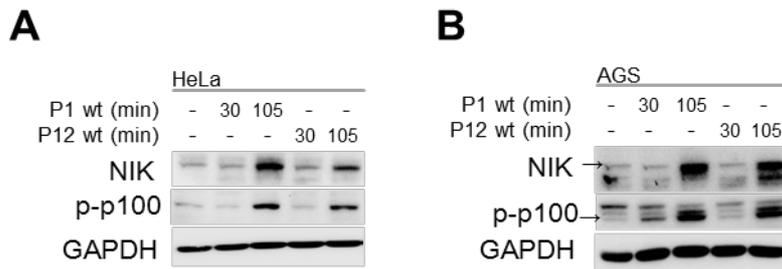


Abbildung 11: Die *H. pylori* Stämme P1 und P12 induzieren die Akkumulation von NIK und die Phosphorylierung von p100. Es wurde die Kapazität der *H. pylori* Stämme P1 und P12 untersucht, die nichtkanonischen NF- κ B-Signalkomponenten NIK und p100 in (A) HeLa und (B) AGS Zellen zu regulieren. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit angegebenen *H. pylori* Stämmen infiziert und die Gesamtlysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Anschließend wurde untersucht, ob die *H. pylori*-induzierte Regulation von NIK und p100 zu der Aktivierung des nichtkanonischen NF- κ B führen. Dafür wurde die subzelluläre Lokalisierung, sowie die Prozessierung von p100 zu p52 untersucht. Konsistent mit der schnellen Regulation von NIK und p100 (Abbildung 10 A und B), zeigten HeLa und NCI-N87 Zellen bereits innerhalb von einer Stunde nach der *H. pylori* P1 Infektion die Prozessierung von p100 zu p52, das gemeinsam mit RelB in den Zellkern translozierte und in den untersuchten 9 Infektionsstunden weiter zunahm (Abbildung 12 A und B). Im Einklang mit der schnellen Translokation von RelB und p52 wurde bereits nach 45 Minuten die NF- κ B Bindung an die NF- κ B-Konsensussequenz nachgewiesen, die zu einem Anteil durch p52-vermittelt wurde, wie die Antikörper-vermittelte Bandenverschiebung in einem EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) zeigte (Feige et al. 2018a). Zusammengefasst zeigen die Daten, dass *H. pylori* sehr schnell in Epithelzellen die nichtkanonische NF- κ B Aktivierung induziert, die aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit mit mehreren *H. pylori* Stämmen und Zelllinien einen konservierten Mechanismus vermuten lässt.

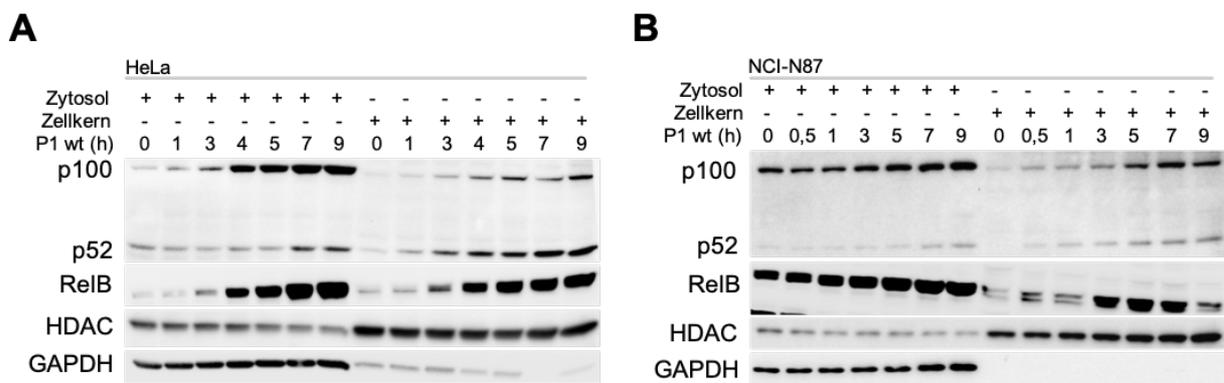


Abbildung 12: *H. pylori* induziert schnell die Translokation des nichtkanonischen NF- κ B Dimers p52/RelB in den Zellkern. Analyse zu der Kapazität von *H. pylori* P1 die nukleäre Translokation von p52/RelB in (A) HeLa und (B) NCI-N87 zu regulieren. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* P1 infiziert und die Lysate aus den angegebenen subzellulären Fraktionen mittels Western Blot mit dargestellten Antikörpern analysiert. GAPDH und HDAC wurden als Ladekontrolle verwendet.

Als nächstes wurde die Relevanz der beobachteten NIK Akkumulation mithilfe eines siRNA-vermittelten Knockdowns analysiert. Dieser zeigte in HeLa und NCI-N87 Zellen eine essentielle Rolle von NIK für die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion, wie anhand der stark reduzierten p100 Phosphorylierung und Prozessierung zu p52 zu beobachten war (Abbildung 13 A und B).

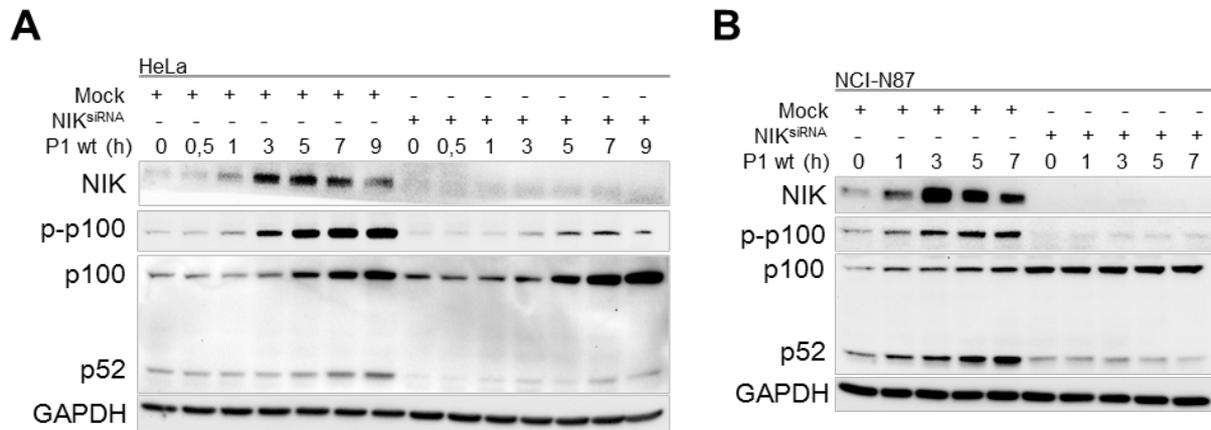


Abbildung 13: Die *H. pylori*-induzierte schnelle nichtkanonische NF- κ B Aktivierung ist abhängig von NIK. Der Einfluss von NIK auf die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung wurde mithilfe siRNA-vermittelter Knockdowns (25 nM) in (A) HeLa und (B) NCI-N87 Zellen untersucht. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* infiziert und die Gesamtlysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Abschließend wurde die Regulation der nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion durch das 26 Proteasom mithilfe des Inhibitors MG132 untersucht. Dieser zeigte, in Übereinstimmung mit der Forschungsliteratur (Sun 2012), dass die Prozessierung von p100 zu p52 von dem 26S Proteasom abhängt (Abbildung 14). Weiterhin führt die Inhibition des 26S Proteasoms zu einer basalen Akkumulation von NIK, da es nicht länger konstitutiv degradiert werden kann. Dies entspricht der erwarteten Regulation von NIK auf Protein- und nicht auf mRNA-Ebene (Vallabhapurapu et al. 2008, Razani et al. 2011), wie mittels qRT-PCR bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst zeigen die Daten, dass NIK und das 26S Proteasom essentiell für die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion sind, wie es für mehrere Rezeptoren beschrieben wurde (Kapitel 1.2.4.3).

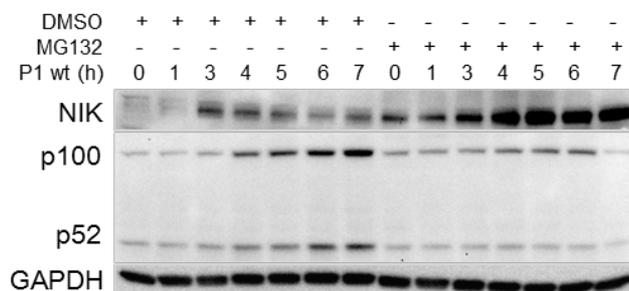


Abbildung 14: Das 26S Proteasom ist essentiell für die Prozessierung von p100 zu p52 und die negative Regulation von NIK. Es wurde die putative Rolle des 26S Proteasoms für die Prozessierung von p100 und die konstitutive Degradation von NIK mithilfe des Inhibitors MG132 untersucht. Die HeLa Zellen wurden 1 h vor dem Beginn der Kinetik entweder mit 10 μ M MG132 oder dem gleichen Volumen DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* P1 infiziert und die Gesamtlysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

2.1.2 Bedeutung von CagA und des T4SS für die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung

H. pylori aktiviert eine Vielzahl von Rezeptoren und Signalwegen mithilfe von drei wichtigen Virulenzfaktoren - VacA, das T4SS und dessen Effektorprotein CagA (Pachathundikandi et al. 2013). Daher wurden die Faktoren in der vorliegenden Arbeit bezüglich ihrer Relevanz für die nichtkanonische NF- κ B Aktivierung mithilfe von isogenen Mutanten von *H. pylori*, die defizient in CagA oder VirB7 waren, untersucht. VirB7 ist essentiell für die funktionelle Integrität des T4SS (Fischer 2011). Western Blot Analysen zeigten, dass die Infektion mit *H. pylori* P1 *virB7* im Gegensatz zu der Infektion mit dem Wildtyp und der *cagA*-defizienten Mutante keine Regulation der nichtkanonischen NF- κ B Signalkomponenten in HeLa und NCI-N87 Zellen induzierte (Abbildung 15 A und B). Somit ist die nichtkanonische NF- κ B Aktivierung abhängig von dem T4SS, unabhängig vom Effektorprotein CagA und diesbezüglich analog zur kanonischen NF- κ B Signaltransduktion, wie die I κ B α und RelA Phosphorylierung zeigte (Abbildung 15 A und B). Es ist erwähnenswert, dass die p100 Expression durch das kanonische NF- κ B induziert wird (Lombardi et al. 1995). Weiterhin impliziert die strikte Abhängigkeit der nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung von einem funktionierenden T4SS, dass die Aktivierung nicht wie in der B-Zelllinie IM-9 durch LPS induziert wird (Ohmae et al. 2005) und dass die Aktivierung nicht durch den Virulenzfaktor VacA induziert wird, weil dieser durch ein Typ 5 Sekretionssystem autotransportiert wird und somit unabhängig von dem T4SS wirkt (Utsch und Haas 2016).

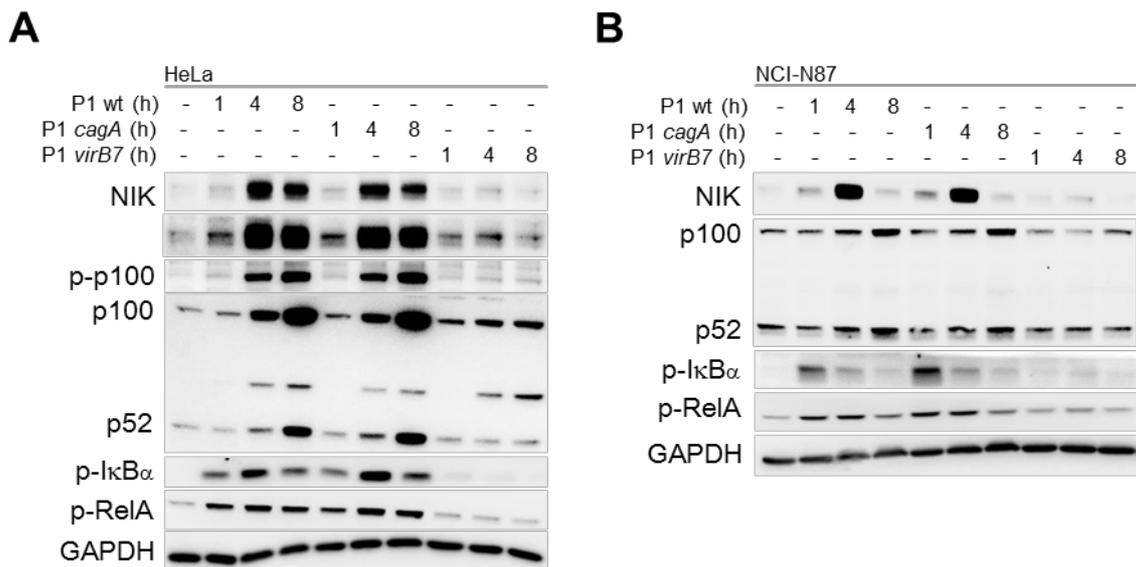


Abbildung 15: *H. pylori* induziert die schnelle nichtkanonische NF- κ B Aktivierung abhängig von dem T4SS und unabhängig von CagA. Es wurden die angegebenen *H. pylori* P1 Mutanten bezüglich ihrer Kapazität das nichtkanonische NF- κ B zu induzieren in (A) HeLa und (B) NCI-N87 Zellen untersucht. Die bekannte Regulation der kanonischen NF- κ B-Signalkomponenten wird als Kontrolle gezeigt. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* infiziert und die Gesamtllysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

2.2 Die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung wird abhängig von dem LT β R und unabhängig von Integrin $\alpha_5\beta_1$ vermittelt

Basierend auf der T4SS-Abhängigkeit kann grob in drei mögliche Aktivierungsmechanismen für das nichtkanonische NF- κ B unterschieden werden, die genauer in der Diskussion thematisiert werden, nämlich eine Aktivierung durch 1) eine direkte Interaktion des T4SS mit dem vermittelndem Rezeptor 2) die Injektion eines aktivierenden Moleküls in die Wirtszelle oder 3) die Sekretion eines aktivierenden Moleküls. Das T4SS interagiert direkt durch das Pilusprotein CagL mit Integrin $\alpha_5\beta_1$ (Kwok et al. 2007). Dies erlaubt *in vitro*, wie in AGS Zellen gezeigt wurde, innerhalb der ersten Infektionsstunde die CagA Translokation und die Freisetzung von gebundenem TACE (*tumor necrosis factor- α -converting enzyme*) (Saha et al. 2010). Die Metalloprotease TACE spaltet membrangebundenes LT $\alpha_1\beta_2$ (Young et al. 2010) und sollte somit das nichtkanonische NF- κ B aktivieren können. Integrin $\alpha_5\beta_1$ kann also potentiell das nichtkanonische NF- κ B durch die Freisetzung von TACE oder als Vermittler für molekulare Translokationen, wie es für CagA gezeigt wurde (Kwok et al. 2007), induzieren. Über die Kapazität von Integrin $\alpha_5\beta_1$ das nichtkanonische NF- κ B direkt zu induzieren gibt es keine Informationen.

In Anbetracht der schnellen nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung wurde zuerst untersucht, ob die Nutzung von Integrin $\alpha_5\beta_1$ für die CagA-Translokation schnell genug stattfindet. Die Analyse der Injektionskinetik in AGS Zellen zeigte, dass die CagA Translokation innerhalb von 30 Minuten stattfand, wie anhand der Tyrosin Phosphorylierung von CagA in Immunpräzipitationen zu beobachten war (Abbildung 16). Die Tyrosin Phosphorylierung wird durch die Wirtszellkinase Src vermittelt (Tegtmeyer und Backert 2011). Integrin $\alpha_5\beta_1$ wurde als putativer Vermittler der nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion weiter untersucht (siehe nächste Seite).



Abbildung 16: *H. pylori* injiziert über das T4SS CagA innerhalb von 30 Minuten. Die Injektionskinetik von *H. pylori* wurde anhand der Detektion der Translokations-abhängigen Tyrosin Phosphorylierung von CagA untersucht. AGS Zellen wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* P1 infiziert und die Gesamtllysate für CagA-IPs verwendet. Die IPs wurden mit angegebenen Antikörpern mittels Western Blot analysiert. IgG wurde anstelle des CagA Antikörpers für die Negativkontrolle verwendet.

2.2.1 Bedeutung von Integrin $\alpha_5\beta_1$ für die *H. pylori* induzierte-nichtkanonische NF- κ B Aktivierung

Für das folgende Experiment wurden polarisierte NCI-N87 Zellen verwendet, die wie unter 4.9.3 beschrieben gezüchtet wurden. Die auf 12-well Zellkultureinsätzen gewachsenen Zellen wurde an Tag 6 bei einer transepithelialen elektrischen Resistenz (TEER) von $> 0,5 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ als konfluent eingestuft. Weiterhin wurde die Polarisierung der Zellen mithilfe von Antikörpern gegen den apikalen Marker Ezrin (Berryman et al. 1993) und das basolaterale Integrin β_1 (Lee und Streuli, 2014) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sichergestellt (Feige et al. 2018b). Die Infektion der polarisierten NCI-N87 Zellen zeigte für GFP-exprimierende (grün fluoreszierendes Protein) *H. pylori* nahezu keine Interaktion mit Integrin β_1 (Feige et al. 2018b). Konsistent damit konnte ebenfalls nahezu keine Integrin β_1 -abhängige CagA Translokation nach bis zu 6 Stunden Infektion in CagA Immunpräzipitationen anhand der Tyrosin Phosphorylierung nachgewiesen werden (Feige et al. 2018b). Die polarisierten Zellen induzierten allerdings, ähnlich wie nichtpolarisierte Zellen, innerhalb von 1 Stunde nach der Infektion das nichtkanonische NF- κ B, wie mittels Western Blot Analysen anhand der NIK Akkumulation gezeigt wurde (Abbildung 17). Dies deutet auf eine Integrin β_1 -unabhängige nichtkanonische NF- κ B Aktivierung hin. Außerdem wurde auch das schnelle T4SS-abhängige kanonische NF- κ B induziert, wie die Phosphorylierung von I κ B α und RelA zeigte (Abbildung 17). Dies deutet darauf hin, dass der induzierende Faktor HBP im Gegensatz zu CagA unabhängig von Integrin β_1 in die Zelle injiziert wird (Gall et al. 2017, Stein et al. 2017, Zimmermann et al. 2017). Überraschenderweise zeigten die polarisierten NCI-N87 Zellen zudem eine sehr schwache T4SS-unabhängige Aktivierung beider Signalwege, wie anhand der Infektion mit der *virB7* Mutante zu beobachten ist (Abbildung 17).

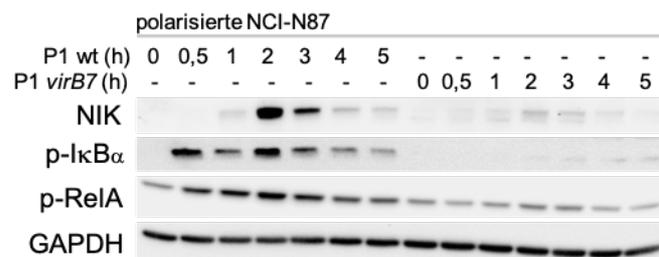


Abbildung 17: *H. pylori* induziert die T4SS-abhängige nichtkanonische NF- κ B Aktivierung von der apikalen Zellseite. Es wurde *H. pylori* Kapazität das nichtkanonische und kanonische NF- κ B in polarisierten NCI-N87 Zellen zu induzieren nach einer apikalen Infektion untersucht, wo Integrin β_1 nicht verfügbar ist. Polarisierte NCI-N87 Zellen wurden für die spezifizierten Zeiten mit den angegebenen P1 Stämmen apikal infiziert und die Gesamtlysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Um die Indizien einer Integrin β_1 -unabhängigen nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung zu konsolidieren wurde Integrin β_1 mithilfe eines Ansatzes nach Jimenez-Soto et al. (2009) reprimiert. AGS Zellen wurden dafür vor der Infektion mit Mangan(II)-chlorid (MnCl_2) inkubiert, welche im Medium als Mn^{2+} Ionen an das MIDAS Motiv der Integrine bindet (Kapitel 1.1.3.1.1). Diese Bindung induziert einen Konformationswechsel der Kopfdomäne

von der gebeugten zur gestreckten „aktivierten“ Haltung, was das Epitop für den antagonistischen Antikörper 9EG7 freilegt (Lenter et al. 1993, Bazzoni et al. 1995). Im Einklang mit publizierten Daten (Jimenez et al. 2009) zeigten AGS Zellen nach der Infektion mit *H. pylori* aufgrund der MnCl₂-vermittelten Aktivierung der Integrine eine erhöhte CagA Translokation, wie anhand der erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung zu erkennen ist (Abbildung 18 A). Die zusätzliche Inkubation mit 9EG7 vor der Infektion zeigte ebenfalls die erwartete starke Reduktion der CagA Tyrosin-Phosphorylierung, hatte aber keinen Einfluss auf die *H. pylori*-induzierte NIK Akkumulation und p100 Phosphorylierung (Abbildung 18 A). Im Einklang dazu, zeigt der siRNA-vermittelte Knockdown von Integrin $\alpha_5\beta_1$ in NCI-N87 Zellen ebenfalls keinen Einfluss auf die NIK Regulation, während die Negativkontrolle P1 *virB7* wie erwartet kein NIK induzierte (Abbildung 18 B). Die Ergebnisse des Knockdowns wurden in AGS Zellen reproduziert (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst zeigen die verschiedenen experimentellen Ansätze dieses Kapitels, dass *H. pylori*s T4SS-abhängige nichtkanonische NF- κ B Aktivierung unabhängig von Integrin $\alpha_5\beta_1$ ist.

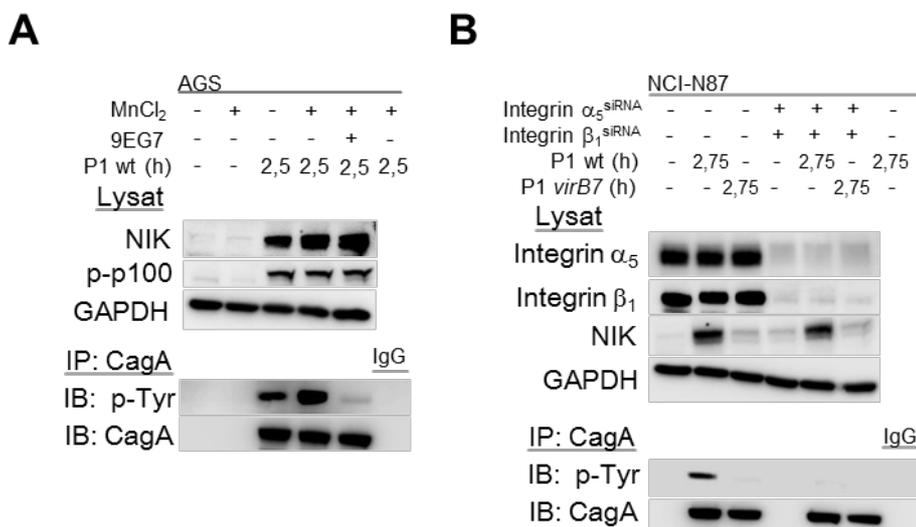


Abbildung 18: Die *H. pylori*-induzierte T4SS-abhängige nichtkanonische NF- κ B Aktivierung ist unabhängig von Integrin β_1 . Der Einfluss von Integrin β_1 auf die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung wurde mithilfe (A) der Behandlung mit dem Integrin β_1 -antagonistischem Antikörper 9EG7 oder (B) siRNA-vermittelter Knockdowns gegen Integrin $\alpha_5\beta_1$ (40 nM je siRNA) untersucht. Die Zellen wurden (A) 2,5 Stunden vor der Infektion wie angegeben mit 9EG7 (30 μ g/ml) und 2 mM Mangan(II)-chlorid (MnCl₂) inkubiert. (A-B) Die Integrin β_1 - und Translokations-abhängige Tyrosin Phosphorylierung von CagA diente als Kontrolle. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit angegebenen *H. pylori* Stämmen infiziert und die Gesamtllysate hergestellt. Die Gesamtllysate wurden entweder direkt oder nach CagA-IPs mit den dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. Detektiertes GAPDH diente als Ladekontrolle für die Lysate und detektiertes CagA als Ladekontrolle für die IPs. IgG wurde anstelle des CagA Antikörpers für die Negativkontrolle verwendet.

2.2.2 Bedeutung des LT β R für die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung

Patienten mit *H. pylori*-assoziierten Krankheiten und insbesondere mit Gastritis zeigen eine erhöhte CXCL13 Expression sowie die Entstehung ektoptischer lymphoider Follikel (Mazzucchelli et al. 1999). Der LT β R ist der Hauptvermittler für die Expression von CXCL13 und kann mit dieser Expression entscheidend für die Entstehung ektoptischer lymphoider Follikel sein (Pitzalis et al. 2014, Aloisi und Pujol-Borrell 2006).

Um zu analysieren, ob der LT β R *in vitro* der Vermittler der T4SS-abhängigen nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung ist, wurde dafür in HeLa (Abbildung 19 A) und AGS Zellen (Abbildung 19 B) ein siRNA-vermittelter Knockdown durchgeführt. Beide Zelllinien zeigten nach der Infektion mit *H. pylori* P1 nahezu keine Akkumulation von NIK, Phosphorylierung von p100 und Generierung von p52. Zur Konsolidierung der Ergebnisse wurden diese durch Knockdowns mit bis zu 4 verschiedenen siRNAs, die entweder einzeln oder als Kombination aus zwei eingesetzt wurden, reproduziert, sowie analoge Experimente in NCI-N87 Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend liefern die Daten starke Evidenzen für eine LT β R-vermittelte Aktivierung des nichtkanonischen NF- κ B. Abschließend ist erwähnenswert, dass für Mock behandelte Zellen nach der *H. pylori* Infektion die zwei LT β R Isoformen (Wilhelm et al. 2014) verstärkt exprimiert wurden (Abbildung 19 A und B).

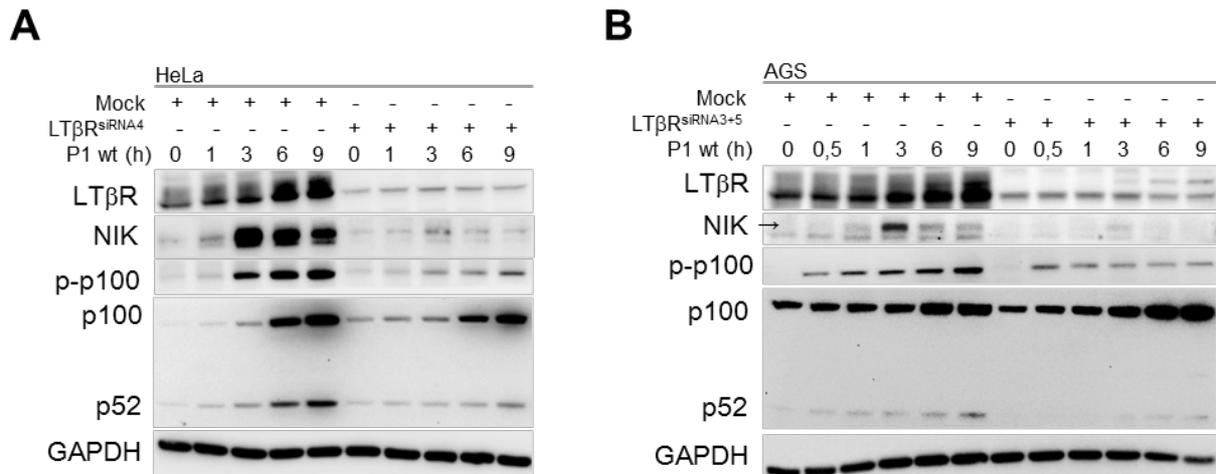


Abbildung 19: Die *H. pylori*-induzierte schnelle nichtkanonische NF- κ B Aktivierung wird durch den LT β R vermittelt. Der Einfluss des LT β R auf die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung wurde mithilfe siRNA-vermittelter Knockdowns (25 nM je siRNA) in (A) HeLa und (B) AGS Zellen untersucht. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* P1 infiziert und die Gesamtllysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

2.2.3 Vergleichende Analysen der *H. pylori* Infektion und LT $\alpha_1\beta_2$ Stimulation

Zur Bestimmung des Stimulationspotentials von *H. pylori* P1 wurde die nichtkanonische NF- κ B Aktivierung mit verschiedenen LT $\alpha_1\beta_2$ Konzentrationen verglichen (Abbildung 20 A und B). Die Analyse zeigte, dass *H. pylori* eine ähnliche NIK Akkumulation wie ca. 30 - 40 ng/ml LT $\alpha_1\beta_2$ induziert. Außerdem induzierten sowohl *H. pylori* als auch LT $\alpha_1\beta_2$ die erwartete LT β R-vermittelte TRAF3 Degradation (Ganeff et al. 2011). Die Rolle von TRAF3 (innerhalb des TRAF2/TRAF3/cIAP1/2-Komplexes) als negativer Regulator von NIK wurde mithilfe eines Knockdowns bestätigt, der sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach der *H. pylori* Infektion eine erhöhte NIK Menge zeigte (Abbildung 21). Es ist erwähnenswert, dass AGS Zellen nach der LT $\alpha_1\beta_2$ Stimulation genauso wie nach der *H. pylori* Infektion eine relativ schwache Regulation von NIK und p100 im Vergleich zu HeLa und NCI-N87 Zellen zeigten, die nicht auf eine geringere Rezeptorexpression zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

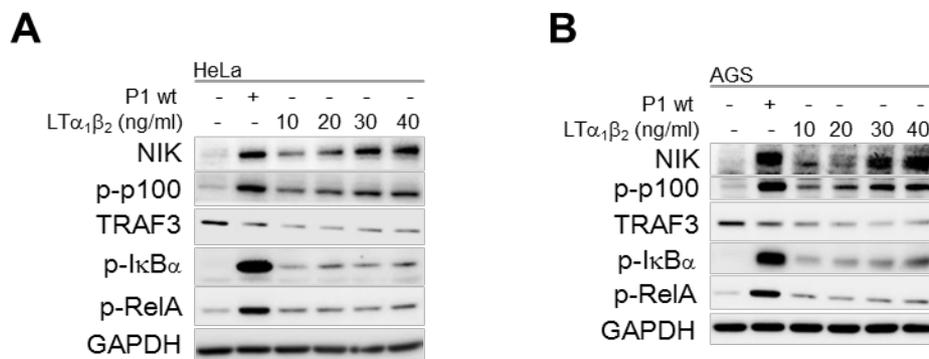


Abbildung 20: *H. pylori* induziert eine vergleichbare Akkumulation von NIK und Phosphorylierung von p100 wie 30-40 ng/ml LT $\alpha_1\beta_2$. Es wurde das Stimulationspotential von *H. pylori* P1 im Vergleich zu 10 - 40 ng/ml LT $\alpha_1\beta_2$ nach 2,5 Stunden in (A) HeLa und (B) AGS Zellen untersucht. Die angegebenen Zelllinien wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* P1 oder LT $\alpha_1\beta_2$ stimuliert und die Gesamtlysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

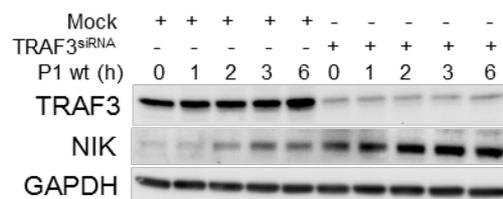


Abbildung 21: TRAF3 vermittelt die Degradation von NIK. Die putative Rolle von TRAF3 in der Degradation von NIK wurde mithilfe siRNA-vermittelter Knockdowns (25 nM) untersucht. NCI-N87 Zellen wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* P1 infiziert und die Gesamtlysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Abschließend wurde zur Konsolidierung der LT β R Knockdown-Daten (Abbildung 19) die endogene Rekrutierung von Signalkomponenten des nichtkanonischen NF- κ B mithilfe von Co-Immünpräzipitationen analysiert. HeLa Zellen zeigten nach der Stimulation mit *H. pylori* innerhalb von 15 Minuten die Rekrutierung von TRAF2 und NIK an den LT β R (Abbildung 22 A), was vergleichbar mit der Rezeptor Aktivierung durch 40 ng/ml LT $\alpha_1\beta_2$ war (Abbildung 22 B). Während TRAF2 bis zu 45 Minuten gebunden blieb, war zu diesem Zeitpunkt die Menge von gebundenem NIK stark reduziert, was auf dessen Dissoziation vom Rezeptor hindeutet und die anschließende Akkumulation erlaubt (Abbildung 22 A). Zusammengefasst zeigten

die LT β R-Daten eindeutig, dass der LT β R als schneller Vermittler der nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion in der *H. pylori* Infektion fungiert und dass die NIK Akkumulation wie erwartet von der Degradation von TRAF3 abhing.

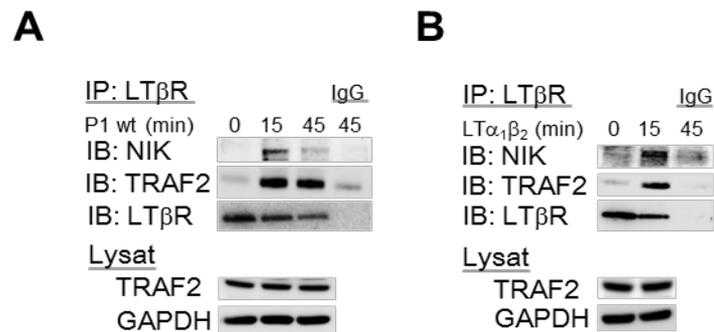


Abbildung 22: *H. pylori* induziert (wie LT $\alpha_1\beta_2$) innerhalb von 15 Minuten die Rekrutierung von Signalkomponenten der nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion zum LT β R. Die Rekrutierung der Signalkomponenten zum LT β R wurde nach der Stimulation mit (A) *H. pylori* P1 (MOI: 100) oder (B) 40 ng/ml LT $\alpha_1\beta_2$ in HeLa Zellen untersucht. Die Zellen wurden wie gezeigt stimuliert und die Gesamtlysate hergestellt. Die Gesamtlysate wurden entweder direkt oder nach LT β R-IPs mit den dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. Detektiertes TRAF2 und GAPDH in den Lysaten und detektierter LT β R der IPs dienen als Ladekontrolle. IgG wurde anstelle des LT β R Antikörpers für die Negativkontrolle verwendet.

2.3 Die *H. pylori*-induzierte LT β R-Signaltransduktion ist abhängig von der basalen kanonischen NF- κ B Signaltransduktion

Die verfügbare Forschungsliteratur zur LT β R-induzierten nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung ist sehr limitiert. Eine wichtige Arbeit von Dejardin et al. (2002) hat für unterschiedliche Knockout MEFs gezeigt, dass die nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion von NIK und IKK α abhängt, während sie von den Schlüsselementen der kanonischen NF- κ B Signaltransduktion RelA, NEMO und IKK β unabhängig ist (Stimulus: agonistischer LT β R Antikörper).

Die essentielle Rolle von NIK wurde bereits gezeigt (Abbildung 13). Mit dem Fokus auf der molekularen Entschlüsselung der Signaltransduktion wurde als nächstes die Rolle von IKK α mittels siRNA-Knockdown untersucht. Dieser zeigte überraschend für HeLa (Abbildung 23) und NCI-N87 Zellen (Daten nicht gezeigt) eine nur mäßige Verringerung der induzierten p100 Phosphorylierung und Prozessierung zu p52. Die kanonische NF- κ B Signaltransduktion zeigte hingegen die erwartete Reduktion der I κ B α und RelA Phosphorylierung, die bereits in *H. pylori* P1 infizierten AGS Zellen beobachtet wurde und auf einer mäßigen Destabilisierung des IKK-Komplexes zu beruhen scheint (Sokolova et al. 2014).

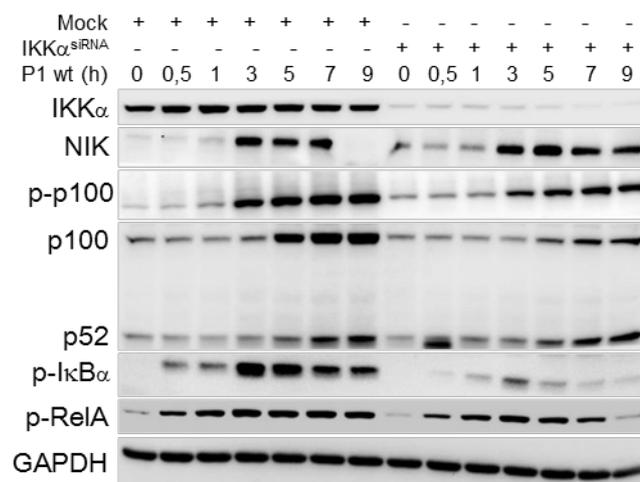


Abbildung 23: Die *H. pylori*-induzierte schnelle nichtkanonische NF- κ B Aktivierung ist nicht von IKK α abhängig. Der Einfluss von IKK α auf die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung wurde mithilfe eines siRNA-vermittelten Knockdowns (35 nM) in HeLa Zellen untersucht. Die Zellen wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* infiziert und die Gesamtllysate mit dargestellten Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Anschließend wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown von NEMO und RelA in HeLa Zellen durchgeführt (Abbildung 24 A und B). Beide Knockdowns zeigten eine konstitutive NIK Stabilisierung, die andernfalls durch die Genexpression des kanonischen NF- κ Bs reprimiert wird (Gray et al. 2014) und interessanterweise im RelA Knockdown stärker ausgeprägt war. Beide Knockdowns zeigten nach der *H. pylori* Infektion, dass die NIK Akkumulation nicht beeinflusst war. Überraschend zeigten die Knockdowns allerdings eine stark reduzierte Induktion der p100 Phosphorylierung, die zu einer verringerten Prozessierung zu p52 führte. Die Ergebnisse wurden in NCI-N87 Zellen reproduziert (Daten nicht gezeigt).

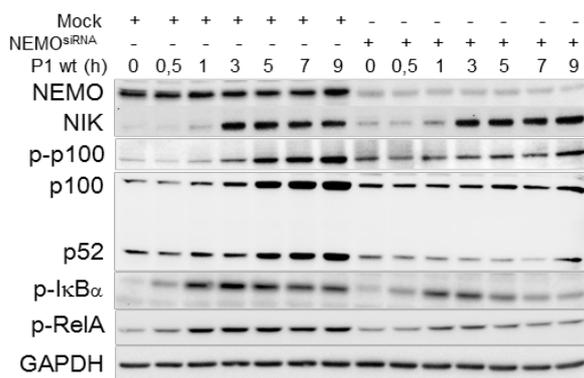
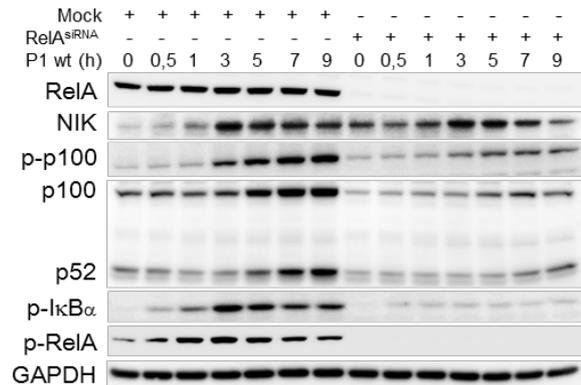
A**B**

Abbildung 24: Die *H. pylori*-induzierte p100 Prozessierung zu p52 ist abhängig von der basalen kanonischen NF-κB Signaltransduktion. Der Einfluss der kanonischen NF-κB Signalkomponenten NEMO und RelA auf die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF-κB Aktivierung wurde mithilfe von siRNA-vermittelter Knockdowns (NEMO: 20 nM, RelA: 30 nM) untersucht. HeLa Zellen wurden für die spezifizierten Zeiten mit *H. pylori* infiziert und die Gesamtllysate mit angegebenen Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Im Gegensatz dazu war die LT $\alpha_1\beta_2$ -induzierte nichtkanonische NF-κB Signaltransduktion durch dieselben Knockdowns nicht beeinflusst, da in HeLa Zellen weiterhin p100 phosphoryliert und p52 prozessiert wurde (Abbildung 25). Dabei zeigte der RelA Knockdown nur eine verringerte p100 Prozessierung zu p52, weil die p100 Menge limitierend war, welches wegen des Knockdowns nicht länger durch das kanonische NF-κB exprimiert wurde (Lombardi et al. 1995). Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF-κB Aktivierung mit der geringen Abhängigkeit von IKK α und der Abhängigkeit der p100 Phosphorylierung von der basalen kanonischen NF-κB Signaltransduktion einige spezifische Eigenschaften aufweist, die einen untypischen T4SS-vermittelten Aktivierungsmechanismus vermuten lassen.

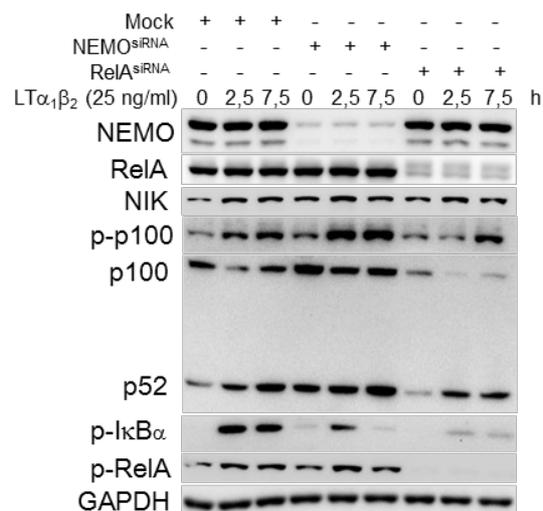


Abbildung 25: LT $\alpha_1\beta_2$ induziert im Gegensatz zu *H. pylori* die nichtkanonische NF-κB Aktivierung unabhängig von der basalen kanonischen NF-κB Signaltransduktion. Der Einfluss der kanonischen NF-κB Signalkomponenten NEMO und RelA auf die LT $\alpha_1\beta_2$ -induzierte nichtkanonische NF-κB Aktivierung wurde mithilfe von siRNA-vermittelten Knockdowns (NEMO: 20 nM, RelA: 30 nM) untersucht. HeLa Zellen wurden für die spezifizierten Zeiten mit LT $\alpha_1\beta_2$ stimuliert und die Gesamtllysate mit angegebenen Antikörpern mittels Western Blot analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

2.4 Analysen zu putativen *H. pylori*-Liganden für den LT β R

2.4.1 Massenspektrometrische Untersuchung zu putativen LT β R-Liganden

Zur Identifikation putativer LT β R Liganden aus dem Gesamtlysat und den angereicherten Membranproteinen von *H. pylori* wurde eine Flüssigkultur etabliert, um eine möglichst hohe Proteinausbeute zu erzielen. Das Wachstum von *H. pylori* wurde photometrisch mithilfe der ΔOD_{550} verfolgt (Abbildung 26). Der Wachstumsverlauf verhielt sich, wie anhand der Wachstumsphasen dargestellt ist, wie erwartet, wenngleich die Latenzphase und die Generationszeit (11,8 h) relativ lang waren. Um sicherzustellen, dass die suboptimalen Wachstumsbedingungen keinen Einfluss auf die Expression des nichtkanonischen NF- κ B-induzierenden Faktors hatten, wurde das Aktivierungspotential von *H. pylori* am Erntezeitpunkt mittels Zellkulturexperimente und Western Blot Analysen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Es folgte die Extraktion der Gesamtproteine oder der angereicherten äußeren Membranproteine aus *H. pylori* in der späten exponentiellen Wachstumsphase ($25 \cdot 10^9$ *H. pylori*/ml), wenn eine Vielzahl von Virulenzfaktoren verstärkt exprimiert wird (Thompson et al. 2003).

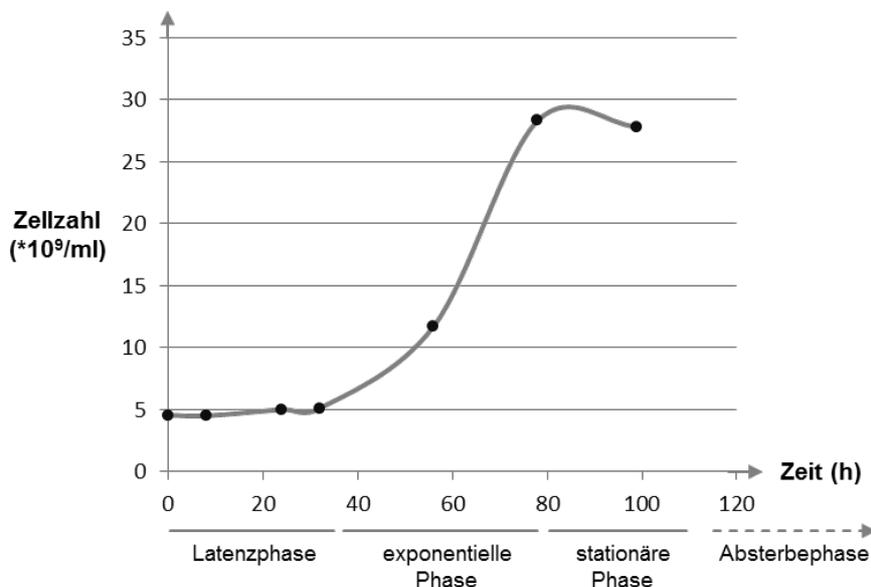


Abbildung 26: Wachstum von *H. pylori* in BHI-Flüssigmedium mit 10 % Pferdeserum und 10 μ g/ml Vancomycin. *H. pylori* P1 wurde unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C bis zu der Probenentnahme inokuliert. Die Zellzahl wurde mithilfe der Optischen Dichte bei 550 nm (ΔOD_{550}) bestimmt. Unter der Grafik ist eine Zuordnung zu den typischen mikrobiellen Wachstumsphasen dargestellt.

Zur Identifikation putativer *H. pylori* Liganden des LT β R wurden die isolierten Gesamtproteine und die angereicherten Membranproteine anschließend jeweils mit den, wie in Abbildung 27 dargestellt, zusätzlichen Komponenten inkubiert. Die verwendeten LT β R-Konstrukte enthielten eine FC-Region über die sie an das Protein A/G der Beads binden konnten ohne mit der LT $\alpha_1\beta_2$ -Bindung zu interferieren (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit der extrazellulären Domäne (ED) des LT β R (Abbildung 27-1) diente zur Identifizierung putativer extrazellulärer Bindepartner, während der LT β R der vollen Länge (VL) (Abbildung 27-2) dazu diente putative extrazelluläre Bindepartner zu validieren und zusätzlich putative intrazelluläre Bindepartner zu identifizieren. Als Kontrolle für extrazelluläre Bindepartner

wurde zudem $LT\alpha_1\beta_2$ (Abbildung 27-3) als kompetitiver Bindepartner verwendet, während unspezifische Beads-Bindepartner nicht berücksichtigt wurden (Abbildung 27-4). Die gebundenen Proteine wurden nach einem tryptischen Verdau mittels nano-LC-MS/MS-Massenspektrometrie von Prof. Kühne (Institut für Experimentelle Innere Medizin) analysiert. Es wurden mehrere putative Interaktionspartner identifiziert, die mit der extrazellulären, aber nicht mit der intrazellulären Domäne des $LT\beta R$ interagierten und kompetitiv zu $LT\alpha_1\beta_2$ gebunden haben, da sie in (3) nicht nachweisbar waren. Diese umfassten mehrere äußere Membranproteine, wovon HofC mit sehr hoher Sicherheit nachweisbar war, z.B. in den Gesamtproteinen mit dem $LT\beta R$ ED/VL mit einem Wahrscheinlichkeits-score ($-10\log P$) von 194/197 durch 21/27 unterschiedliche Peptide mit insgesamt 54%/49% Proteinabdeckung. Nur die verwendeten $LT\beta R$ ED/VL-Konstrukte wurden ähnlich prominent nachgewiesen mit einem Wahrscheinlichkeits-score von 180/190 durch 25/34 unterschiedliche Peptide und mit insgesamt 62%/62% Proteinabdeckung. Zu den weniger prominenten Treffern gehörten die (putativen) äußeren Membranproteine HopZ, HopD, HopT (babB), HopC (alpA). Neben den identifizierten Proteinen, die begrenzt erforscht sind, konnten keine T4SS-Komponenten identifiziert werden. Die Ergebnisse werden detaillierter in der Diskussion adressiert.

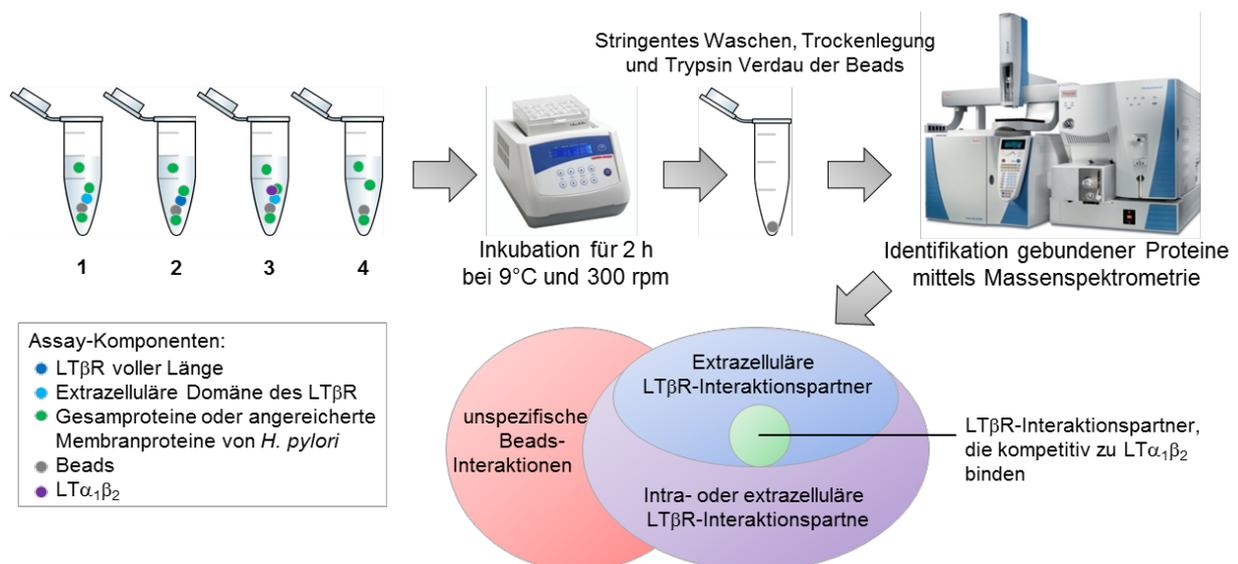


Abbildung 27: Schematische Darstellung der massenspektrometrischen Analysen zur Identifikation putativer $LT\beta R$ Liganden von *H. pylori*. Es sind die Assay-Komponenten der unterschiedlichen Ansätze dargestellt. Die Komponenten wurden mit je 80 nM pro Ansatz (außer den Lysaten) eingesetzt und für 2 h bei 9 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Beads mehrfach stringent gewaschen, trockengelegt, damit ein tryptischer Verdau durchgeführt und massenspektrometrisch analysiert. Identifikation von (1) Extrazellulären $LT\beta R$ -Interaktionspartnern und (2) Extra- und intrazellulären $LT\beta R$ -Interaktionspartnern. Die Interaktionspartner, die in beiden Ansätzen (1 und 2) identifiziert wurden, wurden als putative extrazelluläre $LT\beta R$ -Interaktionspartner eingestuft. Diese wurden zudem als kompetitive Bindepartner zu $LT\alpha_1\beta_2$ eingestuft, falls diese nicht in (3) identifiziert wurden. Die unspezifischen Interaktionen mit den Beads aus (4) wurden nicht als Interaktionspartner berücksichtigt. Die Interaktionspartnergruppen sind schematisch dargestellt.

2.4.2 Massenspektrometrische Interaktionsstudie zwischen dem LT β R und den T4SS Komponenten CagL, CagY

Parallel zum Ansatz aus Kapitel 2.4.1 wurde die putative Interaktion von extrazellulär exponierten T4SS-Komponenten mit dem LT β R untersucht. Es wurde dafür in Kooperation mit Prof. Backert (Department für Biologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg), einem der Entdecker der CagL-Integrin $\alpha_5\beta_1$ Interaktion (Kwok et al. 2007), CagL und CagY ausgewählt. In den darauf folgenden Interaktionsstudien wurde ähnlich wie in Kapitel 2.4.1 verfahren (Abbildung 28). Die massenspektrometrische relative Quantifizierung von CagL und CagY, die von Prof. Kähne durchgeführt wurde, zeigte, dass CagL neben der unspezifischen Bindung an die Beads (Abbildung 28-1), die Quantität von gebundenem CagL in Anwesenheit vom LT β R um Faktor 1,76 zunahm (Abbildung 28-2), während das Hinzufügen von LT $\alpha_1\beta_2$ diese Zunahme wieder stark verringerte (Abbildung 28-3). Es scheint also zu einer kompetitiven Bindung von CagL und LT $\alpha_1\beta_2$ an den LT β R zu kommen. Die Bindung von CagL war allerdings im Vergleich zu der unspezifischen Bindung an die Beads relativ gering und Bedarf daher weiterer Optimierungen, um zu evaluieren, ob die unspezifische Bindung groß oder die LT β R-abhängige Bindung gering ist. Weiterhin wurde die CagL Quantität mit absteigenden LT β R Konzentrationen in Konkurrenz mit 80 nM LT $\alpha_1\beta_2$ bestimmt. Diese zeigten eine mit der Konzentration verringernde Quantität von CagL, die bei der geringsten Konzentration von 8 nM LT β R der Bindung von (1) entsprach (Daten nicht gezeigt). Dies ist eine weitere Evidenz für eine LT β R-abhängige CagL Bindung. Im Gegensatz dazu konnte CagY ausschließlich im Überstand nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass CagL mit dem LT β R interagiert, inwieweit diese Interaktion allerdings physiologisch relevant ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

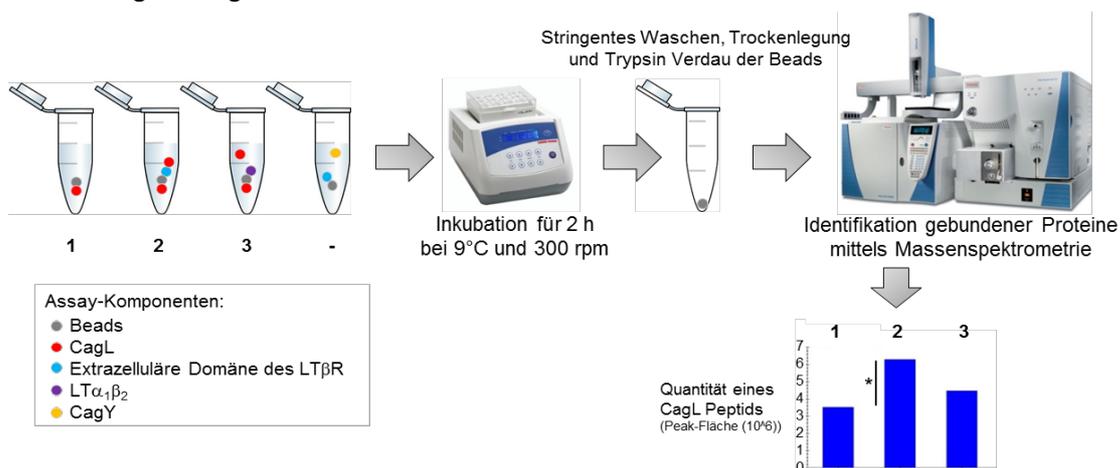


Abbildung 28: Schematische Darstellung der massenspektrometrischen Analysen zu der Interaktion der T4SS-Komponenten CagL und CagY mit dem LT β R. Es sind die Assay-Komponenten der unterschiedlichen Ansätze dargestellt. Die Komponenten wurden mit je 80 nM pro Ansatz eingesetzt und für 2 h bei 9 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Beads mehrfach stringent gewaschen, trockengelegt, damit ein tryptischer Verdau durchgeführt und massenspektrometrisch analysiert. CagL und CagY wurden mithilfe von je drei zufällig ausgewählten Peptiden relativ quantifiziert (Peak-Fläche). Die relative Quantifizierung eines repräsentativen Peptids von CagL ist dargestellt. CagY zeigte keine Bindung und ist nicht dargestellt. (1) Unspezifische CagL Interaktion mit den Beads, (2) CagL Interaktion mit den Beads und dem LT β R, (*) Putative spezifische Interaktion zwischen CagL und dem LT β R (3) CagL Interaktion mit den Beads und dem LT β R in Konkurrenz zu LT $\alpha_1\beta_2$.

2.5 Patienten mit *H. pylori*-assoziierter Gastritis weisen erhöhte NIK Level auf

Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass *H. pylori in vitro* das nicht-kanonische NF- κ B aktiviert. Patienten mit *H. pylori*-assoziierter Gastritis zeigen eine erhöhte CXCL13 Expression und häufig die Entstehung ektopischer lymphoider Follikel (Mazzucchelli et al. 1999, Galamb et al. 2008), die potentiell von dem LT β R abhängt. Daher wurde in einer Kooperation mit Prof. Vieth (Institut für Pathologie, Bayreuth) der nichtkanonische NF- κ B Aktivitätsstatus *in vivo* durch den Nachweis von NIK, das eine hohe Spezifität für den Signalweg aufweist, untersucht. Prof. Vieth zeigte in immunhistochemischen Analysen eine signifikant erhöhte NIK Abundanz in Biopsien der Magenschleimhaut von Patienten mit *H. pylori*-assoziierter Gastritis (Feige et al. 2018a). Die NIK Abundanz kann also putativ als prognostischer Biomarker für die *H. pylori*-assoziierte Gastritis fungieren. Außerdem kann diese Analyse als Fundament für weitergehende Untersuchungen, beispielsweise zur Bestimmung der pathophysiologischen Relevanz der Aktivierung dienen. Abschließend wäre es interessant neben der Gastritis weitere *H. pylori*-assoziierte Krankheiten diesbezüglich zu untersuchen und zu analysieren, ob die Aktivierung *in vivo* ebenfalls durch den LT β R vermittelt wird.

3. Diskussion

Chronische Entzündungen spielen in der Pathogenese vieler Krankheiten, wie z.B. in Autoimmunerkrankungen, spezifischen Krebsformen und Krankheiten, die mit persistenten Infektionen assoziiert sind, eine wichtige Rolle. Die Entzündungsreaktionen umfassen die Expression von Zytokinen, Chemokinen und die Rekrutierung von Immunzellen, wofür die Transkriptionsfaktorfamilie NF- κ B einer der Hauptvermittler ist.

Der Forschungsschwerpunkt in der *H. pylori*-assoziierten Pathogenese liegt, wie in den meisten Forschungsfeldern, auf dem kanonischen NF- κ B, während es vor dem Beginn dieser Arbeit nahezu keine Informationen zu dem nichtkanonischen NF- κ B gab. Für die *H. pylori*-assoziierte Gastritis wurde gezeigt, dass das kanonische NF- κ B durch die Expression von IL-8 und IL-1 β an der Initiation und dem Anhalten der Krankheit beteiligt ist (Aihara et al. 1997, Naumann et al. 2017), die als Vorstufe zu Magenkrebs fungieren kann (Moss et al. 2017).

In Zellkulturexperimenten aktiviert *H. pylori* das kanonische NF- κ B schnell mithilfe des Typ 4 Sekretionssystems (T4SS) durch die Injektion von HBP (Kapitel 1.2.3, Schweitzer et al. 2010). Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass *H. pylori* ebenfalls eine schnelle T4SS-abhängige nichtkanonische NF- κ B Aktivierung induziert. Die untypische Signalkaskade, die durch den LT β R vermittelt wird, lässt eine Modulation des Signalweges vermuten, wie es für einige Viren wie den Hepatitis-C-Virus oder den Epstein-Barr-Virus beschrieben wurde.

Insbesondere jüngere Studien zeigen das pathologische Potential des nichtkanonischen NF- κ B bis hin zur Entstehung von Krebs, was unter anderem auf der Regulation der adaptiven Immunantwort und des Zelltods beruht (Kapitel 1.2.4.2, Yamagishi et al. 2012, Annunziata et al. 2007). Außerdem wurde für *Helicobacter felis* infizierte C57BL/6 Mäuse, die als Modellsystem für die *H. pylori* Infektion verwendet werden, nach 12 Monaten Infektion gezeigt, dass c-Rel-defiziente Tiere wie der Wildtyp gastrische Atrophien, Präneoplasien und lymphoproliferative Läsionen entwickelten, während *Nfkb2*^{-/-}, also p100/p52-defiziente Tiere minimale gastrische epitheliale Pathologie zeigten (Burkitt et al. 2013). Dies könnte ein Indiz für eine wichtige Rolle des nichtkanonischen NF- κ B in der chronischen Mageninfektion mit der Gattung *Helicobacter* sein.

3.1 Die *H. pylori*-induzierte LT β R-vermittelte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung

Diese Arbeit zeigt erstmals eine *H. pylori*-induzierte schnelle und LT β R-vermittelte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung in mehreren Epithelzelllinien, inklusive gastrischer Epithelzellen. Für diese T4SS-abhängige und CagA-, sowie Integrin $\alpha_5\beta_1$ -unabhängige Aktivierung wurden folgende Signaltransduktionsereignisse aufgedeckt (Abbildung 29): 1) Rekrutierung von Signalkomponenten zum LT β R 2) Degradation von TRAF3 sowie die Akkumulation und Phosphorylierung von NIK (Thr559) 3) NIK-abhängige p100 Phosphorylierung (Ser866/870) und 26S Proteasom-abhängige Prozessierung zu p52, was von der basalen kanonischen NF- κ B Aktivität abhängt 4) Nukleäre Translokation von p52/RelB, worauf die p52-DNA-Bindung folgt und 5) IKK α besitzt eine (unerwartet) untergeordnete Rolle.

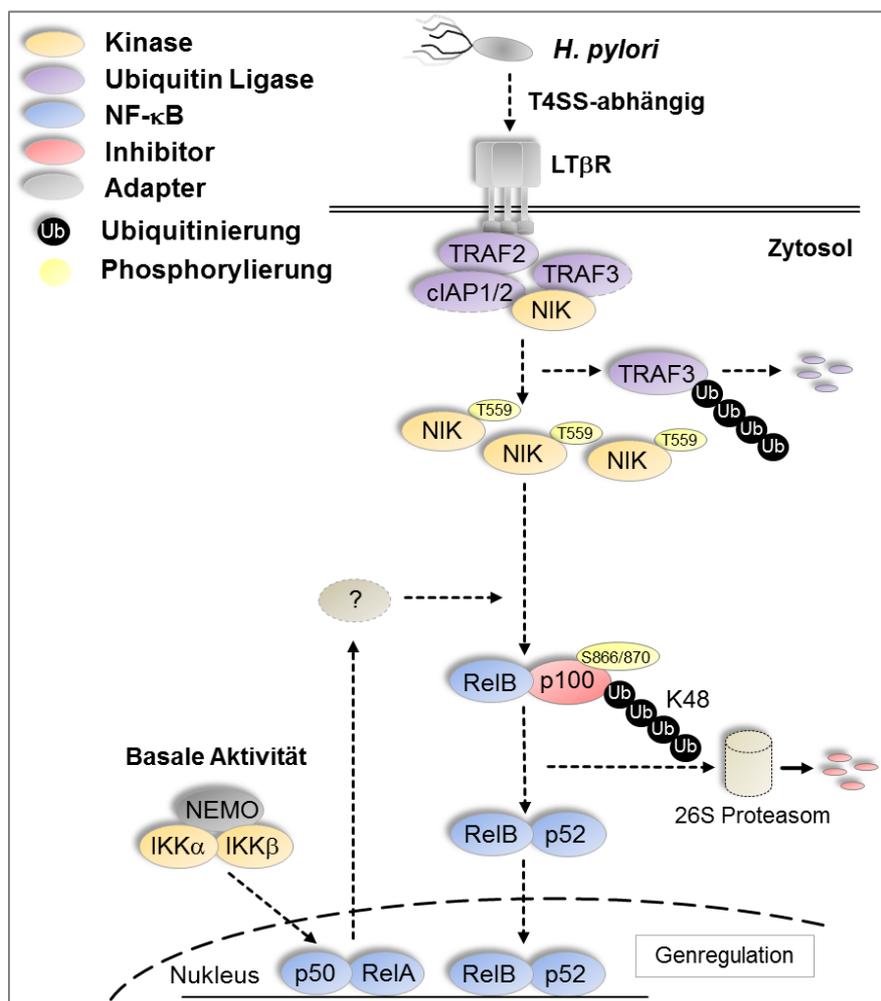


Abbildung 29: Schematische Darstellung der schnellen LT β R-vermittelten nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung durch *H. pylori*. Das T4SS stimuliert die Rekrutierung von Signalkomponenten zu dem LT β R, was zu der TRAF3 Degradation und der Phosphorylierung und Akkumulation von NIK führt. Das aktivierte NIK induziert, abhängig von der basalen kanonischen NF- κ B Aktivität, die Phosphorylierung und die Prozessierung von p100. Das daraus entstehende p52 transloziert mit RelB in den Nucleus und bindet an DNA mit κ B-Bindesequenz. Die Ubiquitinylierungen, sowie Ovale mit gestrichelten Linien zeigen putative Signaltransduktionsereignisse, die nicht untersucht wurden.

Während der Bearbeitung dieses Projekts ist eine Veröffentlichung erschienen, die ebenfalls eine *H. pylori*-induzierte Aktivierung des LT β R postuliert (Mejias-Luque et al. 2017). In dieser Studie wurde im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit eine Aktivierung des LT β R frühestens nach 8 Stunden *H. pylori* Infektion durch die T4SS-unabhängige Expression von LIGHT in MKN-45 Zellen postuliert. Außerdem zeigt die Studie, dass die Expression des Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ geringfügig induziert wurde. Diese Induktion wurde allerdings *in vitro* als Aktivator ausgeschlossen, da die Repression der LT β -mRNA-Induktion durch den IKK β -Inhibitor TPCA-1 keinen Einfluss auf die Prozessierung von p100 zu p52 hatte. Unsere Daten deuten ebenfalls auf eine LT $\alpha_1\beta_2$ -unabhängige Aktivierung hin, weil *H. pylori* beispielsweise im Gegensatz zu LT $\alpha_1\beta_2$ die p100 Phosphorylierung abhängig von dem kanonischen NF- κ B induziert (Abbildung 24 und 25).

Zum Vergleich wurden von uns zudem MKN-45 Zellen mit *H. pylori* P1 und P12 infiziert. Diese zeigten allerdings eine ähnliche Kinetik wie die zuvor getesteten Zelllinien (HeLa, NCI-N87, AGS) für die NIK Akkumulation und p100 Phosphorylierung, die darüber hinaus im Gegensatz zu der postulierten LIGHT Induktion T4SS-abhängig war (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit, dass die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung sehr schnell ist, wie z.B. die Rekrutierung von Signalkomponenten zum LT β R innerhalb von 15 Minuten zeigte (Abbildung 22 A). Diese Aktivierung ist zu schnell um von einer *de novo* mRNA-Synthese von LIGHT abzuhängen und ist im Gegensatz zu dieser T4SS-abhängig (Mejias-Luque et al 2017). Somit scheint *H. pylori in vitro* den LT β R durch zwei Mechanismen zu aktivieren – rasch durch das T4SS und eventuell später durch LIGHT. Allerdings sollte die Relevanz der mit Faktor 2 signifikanten Induktion der LIGHT-mRNA (Mejias-Luque et al 2017) weiter untersucht werden, weil 1) Die verwendete Zelllinie (MKN-45) in eigenen Untersuchungen ebenfalls die schnelle T4SS-abhängige Aktivierung induzierte und 2) Die nichtkanonische NF- κ B Aktivierung in HeLa und NCI-N87 Zellen auch nach 8 Stunden (im Gegensatz zu der LIGHT-mRNA Induktion) T4SS-abhängig war (Abbildung 15 A und B). Die Untersuchung zu den Bestandteilen und Signaltransduktionsereignissen innerhalb der *H. pylori* induzierten nichtkanonischen NF- κ B Signaltransduktion hat gezeigt, dass diese größtenteils mit dem allgemein anerkannten Modell übereinzustimmen scheint (Abbildung 9). Allerdings zeigten sich auch zwei Unterschiede, nämlich die Abhängigkeit der p100 Phosphorylierung von der basalen kanonischen NF- κ B Signaltransduktion (Abbildung 24, 25) und die untergeordnete Rolle von IKK α (Abbildung 23), das ansonsten als essentiell gilt.

IKK $\alpha^{-/-}$ MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) zeigten nämlich nach der Stimulation mit einem agonistischen LT β R Antikörper (Dejardin et al. 2002, Derudder et al. 2003) oder nach der Überexpression von NIK (Senftleben et al. 2001) keine Generierung oder DNA-Bindung von p52. Diese Ergebnisse beruhen darauf, dass IKK α essentiell für zwei Gruppen von Phosphorylierungsstellen ist, die jeweils essentiell für die Prozessierung von p100 sind (Abbildung 30): 1) Die Phosphorylierung von p100 an Serin 99/108/115/123/872, die direkt durch IKK α induziert wird (Xiao et al. 2004) 2) Die Phosphorylierung von p100 an Serin 866/870. Diese Phosphorylierung ist abhängig von der Kinaseaktivität von NIK, während die von IKK α dafür redundant ist - IKK α fungiert aber als essentielles Gerüstprotein (Xiao et al. 2001, Liang et al. 2006). Die Phosphorylierung wird entweder direkt durch NIK oder indirekt

(durch eine weitere Kinase) vermittelt wie von Liang et al. (2006) diskutiert wird, die den Großteil der Untersuchungen durchgeführt haben (Abbildung 30).

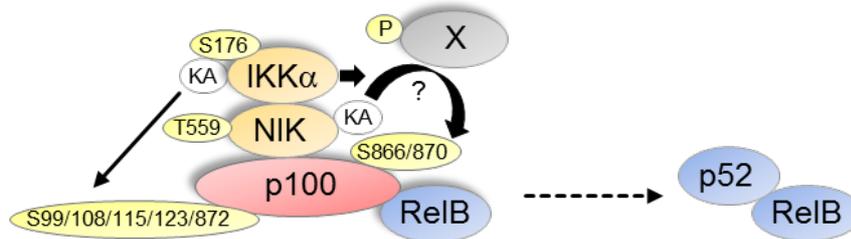


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Regulation von p100 in der typischen nichtkanonischen NF-κB Signaltransduktion. KA: Die Kinaseaktivität ist essentiell für den dargestellten Prozess. NIK, das an T559 phosphoryliert ist, vermittelt ausschließlich in Anwesenheit von IKK α die Phosphorylierung von p100 an S866/870. Dies geschieht potentiell in Abhängigkeit von weiteren unbekannt Komponenten (Oval mit X). Außerdem wird IKK α - abhängig von NIK und S866/870, aber unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus - zu p100 rekrutiert, wo IKK α direkt p100 an S99/108/115/123/872 phosphoryliert. Beide Phosphorylierungsgruppen sind essentiell für die anschließende Prozessierung von p100 zu p52.

Da in *H. pylori* infizierten Zellen die NIK-vermittelte Phosphorylierung an Serin 866/870 trotz eines IKK α Knockdowns stattfindet (Abbildung 23), muss eine andere Komponente die Funktion von IKK α (als Gerüstprotein) übernehmen. Diese unbekannt Komponente ist spezifisch für *H. pylori*. Die ansonsten von IKK α induzierten Phosphorylierungen an Serin 99/108/115/123/872 konnten nicht im Knockdown untersucht werden, da dafür kein kommerzieller Antikörper verfügbar ist. Diese Phosphorylierungen finden aber wahrscheinlich auch statt, da sie essentiell für die Prozessierung sind.

Vor diesem Hintergrund sind die Daten des NEMO und RelA Knockdowns nach der *H. pylori* Infektion interessant, die eine stark reduzierte Induktion der p100 Phosphorylierung an Serin 866/870 und Prozessierung zu p52 zeigten (Abbildung 24). Es ist allgemein anerkannt, dass die Induktion der nichtkanonischen NF-κB Signaltransduktion unabhängig von dem kanonischen NF-κB ist, wie in NEMO $^{-/-}$ und RelA $^{-/-}$ MEFs nach der Stimulation mit einem agonistischen LT β R Antikörper gezeigt wurde (Dejardin et al. 2002, Derudder et al. 2003, Liang et al. 2006) und in der vorliegenden Arbeit durch die LT $\alpha_1\beta_2$ Stimulation in HeLa Zellen mit NEMO und RelA Knockdowns bestätigt wurde (Abbildung 25). Daher spekulieren wir, dass die Komponente, die in der *H. pylori* Infektion die Funktion von IKK α übernimmt, durch das basale kanonische NF-κB reguliert wird, was beide unerwarteten Ergebnisse begründet. Das Fehlen dieser Komponente im RelA und NEMO Knockdown würde somit, wie in IKK $\alpha^{-/-}$ MEFs, trotz der Anwesenheit von NIK zu der beobachteten starken Verringerung der NIK-abhängige Phosphorylierung an Serin 866/870 führen, die essentiell für die Prozessierung zu p52 ist.

Zusammengefasst deutet die schwache Auswirkung des IKK α Knockdowns und die Abhängigkeit der p100 Phosphorylierung (Serin 866/870) von der basalen kanonischen NF-κB Signaltransduktion innerhalb der *H. pylori*-vermittelten nichtkanonischen NF-κB Signaltransduktion auf eine Modulation der Signalkaskade hin und bedarf weiterer Untersuchungen. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die *H. pylori*-induzierte Signaltransduktion der LIGHT $_3$ -LT β R induzierten Signaltransduktion entspricht, weil diese

nahezu unerforscht ist, allerdings wäre diese, wie beschrieben, unabhängig von der *de novo* mRNA Synthese.

3.2 Nichtkanonische NF- κ B Aktivierung in der *H. pylori*-assoziierten Pathogenese

Für diese Arbeit wurden von Prof. Vieth Evidenzen für eine *in vivo* Aktivierung des nichtkanonischen NF- κ B durch den immunhistochemischen Nachweis der NIK-Abundanz in Patientenproben mit *H. pylori*-assoziiierter Gastritis gesammelt (Feige et al. 2018a). Alternativ dazu wird ebenfalls RelB oder p52 immunhistochemisch nachgewiesen, allerdings scheint dieses der unspezifischere Nachweis zu sein, da p52 Antikörper auch p100 detektieren und p100 und RelB durch das kanonische NF- κ B reguliert werden können (Lombardi et al. 1995, Zhao et al. 2015, Wood et al. 2016). Während in der immunhistochemischen Studie von Prof. Vieth ausschließlich die NIK Abundanz untersucht wurde, wurde eine ausführlichere Analyse von Mejias-Luque et al. (2017) durchgeführt. Diese zeigte, dass *in vivo* die LIGHT mRNA Expression mit der Schwere der Gastritis bis zum frühen Magenkrebs zunimmt. Ebenso wurde die LT β mRNA, aber nicht LT α mRNA erhöht exprimiert, welche ausschließlich zusammen den LT β R als LT $\alpha_1\beta_2$ Heterotrimer stimulieren (Sudhamsu et al. 2013). Nichtsdestotrotz scheint es, dass *H. pylori* in der Gastritis das nichtkanonische NF- κ B mithilfe des LT β R durch zwei Mechanismen induziert – durch die T4SS-abhängige und die LIGHT₃-abhängige Aktivierung. Ein ähnliches Phänomen wurde für die **Hepatitis B** und **C Viren** (HBV und HCV)-assoziierte Hepatitis und das HBV/HCV-assoziierte hepatozelluläre Karzinomen beschrieben. Dort induzieren die Viren nämlich eine erhöhte LT $\alpha_1\beta_2$ Expression (Haybäck et al. 2009), während das HCV Core Protein an das zytoplasmatische Ende des LT β R bindet um die Signalübertragung zu modulieren (Matsumoto et al. 1997, Chen et al. 1997).

Abgesehen von den Hepatitis Viren wurden mehrere andere prävalente Viren beschrieben, die das nichtkanonische NF- κ B mithilfe von onkogenen Proteinen modulieren und ausschließlich den Menschen chronisch infizieren (Sun und Cesarman 2011). Dazu zählt auch der **Epstein-Barr-Virus** (EBV), der mithilfe von LMP1 (*latent membrane protein 1*) IKK α /NIK-abhängig und unabhängig von der TRAF2 oder TRAF3 Degradation die Signaltransduktion induziert (Brown et al. 2001, Luftig et al. 2004) und mithilfe des LMP1 Interaktionspartners LAP1 (*LMP1-associated protein 1*) mit dem LT β R (und CD40) interagiert (Mosialos et al. 1995).

Zusammengefasst, liefert die vorliegende Arbeit Indizien, dass *H. pylori* das nichtkanonische NF- κ B mit dem LT β R als Transmitter mithilfe von NIK aktiviert. Da NIK ebenfalls eine Komponente der LIGHT₃-abhängigen Signaltransduktion ist (Jin et al. 2010), könnte es als prognostischer Marker für die *H. pylori*-induzierte gastrische Inflammation und Pathologie fungieren.

3.3 Putative Funktionen der LT β R-vermittelten nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung in der *H. pylori*-assoziierten Pathogenese

Die Untersuchungen zu dem nichtkanonischen NF- κ B in der *H. pylori*-assoziierten Pathogenese stehen am Anfang. Daher werden in diesem Kapitel Beobachtungen und Auswirkung, die mit der LT β R-vermittelten Aktivierung assoziiert sein könnten, dargestellt, die allerdings weiterer Untersuchungen bedürfen.

Der LT β R ist der Hauptvermittler für die Expression der Chemokine CXCL13, CCL19 und CCL21, die wichtig für die Entstehung und Aufrechterhaltung sekundärer lymphatischer Follikel und Organe sind (Ngo et al. 1999, Gräbner et al. 2009, Pitzalis et al. 2014). Ebenso kann der LT β R mit dieser Expression entscheidend für die Entstehung ektoptischer lymphoider Follikel bzw. Gewebe sein (Pitzalis et al. 2014, Aloisi und Pujol-Borrell 2006). Ektoptische lymphoide Gewebe bezeichnet die Neogenese von lymphoiden Geweben in nicht-lymphoiden Organen, die in ihrer mikrostrukturellen Organisation sekundären lymphatischen Organen stark ähneln (Pitzalis et al. 2014, Mazzucchelli et al. 1999). Es ist allgemein anerkannt, dass diese Follikel in persistenten Infektionen schädlich für den Wirt sind (Pitzalis et al. 2014).

Wir spekulieren, dass die LT β R-vermittelte nichtkanonische NF- κ B Aktivierung ein wichtiger Vermittler für die CXCL13-vermittelte Entstehung der ektoptischen lymphoiden Follikel bzw. Gewebe in der *H. pylori*-assoziierten Pathogenese ist. Chronisch *H. pylori* infizierte Mäuse zeigten (nach 5 - 7 Monaten), dass der CXCL13 Rezeptor CXCR5 (*chemokine C-X-C motif receptor 5*) essentiell für die Entstehung von ektoptischen lymphoiden Follikel bzw. Gewebe ist und die Entzündung verstärkt (Winter et al. 2010). Im Einklang dazu zeigten Patienten in verschiedenen *H. pylori*-assoziierten pathologischen Stadien eine erhöhte Menge CXCL13 auf mRNA- und/oder Proteinebene, nämlich in Schleimhauterosionen in der Antrum Region des Magens (Galamb et al. 2008), in chronischer Gastritis (Hofman et al. 2007, Mazzucchelli et al. 1999) und in niedrig bis hochgradigen Magen-Lymphomen (Mazzucchelli et al. 1999). Mehrere Patientenstudien belegen zudem, dass die *H. pylori*-assoziierte Gastritis im Vergleich zu anderen Gastritis Typen ca. 5 - 7 mal häufiger zu der Entstehung von ektoptischen lymphoiden Follikeln führt (Zaitoun 1995, Tariq Siddiqui et al. 2011, Broide et al. 2017). Der Bestand dieser lymphoiden Follikel ist signifikant mit der Schwere der Gastritis positiv korreliert und war beispielsweise in einer Studie, im fortgeschrittenen Stadium der Gastritis in den Biopsien aller Patienten nachweisbar (n = 294 Patienten mit verschiedenen Gastritis Stadien) (Zaitoun 1995, Stolte und Eidt 1989). Außerdem können die ektoptischen lymphoiden Follikel zur Bildung von organisierten Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe in der Magenschleimhaut führen, das als prämaligene Kondition zu MALT-Lymphomen fungieren kann (Zaitoun 1995, Tariq Siddiqui et al. 2011, Winter et al. 2010). Dementsprechend werden die Follikel als Schlüsselmerkmal für mehrere Vorstufen (nach dem Wotherspoon Punktesystem) in der Entstehung von *H. pylori*-assoziierten MALT-Lymphomen eingestuft (Bacon et al. 2007).

H. pylori zeigt außerdem einige interessante Parallelen zu den onkogenen HCV und EBV, die ebenfalls ausschließlich Menschen persistent infizieren, die nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion und den LT β R modulieren und ektoptische lymphoide Strukturen

induzieren (Matsumoto et al. 1997, Chen et al. 1997, Brown et al. 2001, Luftig et al. 2004, Mosialos et al. 1995, Pitzalis et al. 2014).

Abschließend sei angemerkt, dass der Forschungsschwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf Epithelzellen lag, die eine der ersten Verteidigungslinien des Wirtes in der *H. pylori* Infektion bilden. In Anbetracht der sehr schnellen nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung, die eine Modulation des LT β R nahe legt, ist es allerdings wahrscheinlich, dass auch andere Zelltypen betroffen sind. Der LT β R wird in einer Vielzahl weiterer Zellen exprimiert, inklusive follikulärer dendritischer Zellen, Fibroblasten sowie in mehreren Zelltypen myeloiden Ursprungs wie z.B. Monozyten und Mastzellen (Fernandes et al. 2016), wovon mehrere zu Entzündungsorten rekrutiert werden.

3.4 Putative Mechanismen für die *H. pylori*-induzierte Regulation des LT β R

In der Koevolution von *H. pylori* mit dem menschlichen Wirt für wahrscheinlich über 100.000 Jahre (Moodley et al. 2012) hat *H. pylori* hoch adaptive Mechanismen zur Modulation der Signalkaskaden des Wirtes entwickelt um diesen persistent zu infizieren. Dafür spielt sowohl die Modulation von leicht erreichbaren extrazellulär exponierten Rezeptoren durch Virulenzfaktoren, als auch deren Injektion in die Wirtszelle eine wichtige Rolle (Pachathundikandi et al. 2013). Die *H. pylori*-induzierte nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion wird durch den LT β R mithilfe des T4SS induziert. Diese Abhängigkeit erlaubt ein begrenztes Spektrum an Aktivierungsmechanismen. Dazu zählen die direkte Interaktion von T4SS-Komponenten mit dem LT β R, wie es für Integrine gezeigt wurde (Kapitel 1.1.3.1.2, 1.1.3.1.3), die T4SS-abhängige Sekretion von Molekülen in den extrazellulären Raum (da Costa et al. 2015) oder die Injektion von Molekülen in die Wirtszelle, wie es für CagA und HBP gezeigt wurde (Kapitel 1.1.3.1.2, 1.2.3), was jeweils den LT β R direkt oder indirekt durch die Nutzung von Wirtszellmolekülen aktivieren könnte (Abbildung 31).

Die Injektion kann trotz der Unabhängigkeit der nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung von Integrin $\alpha_5\beta_1$ (Kapitel 2.2.1) nicht ausgeschlossen werden, da unter diesen Bedingungen das kanonische NF- κ B aktiviert wird, was von der HBP-Injektion abhängen soll (Gall et al. 2017, Stein et al. 2017, Zimmermann et al. 2017), was auf einen Integrin β_1 -unabhängigen Injektionsmechanismus hindeutet. Außerdem sind die LT β R Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ und LIGHT $_3$ membrangebunden und könnten durch deren Abspaltung zur Aktivierung führen, wobei LT $\alpha_1\beta_2$ als Aktivator aufgrund der unterschiedlichen Signaltransduktion (Abbildung 24, 25) unwahrscheinlich ist.

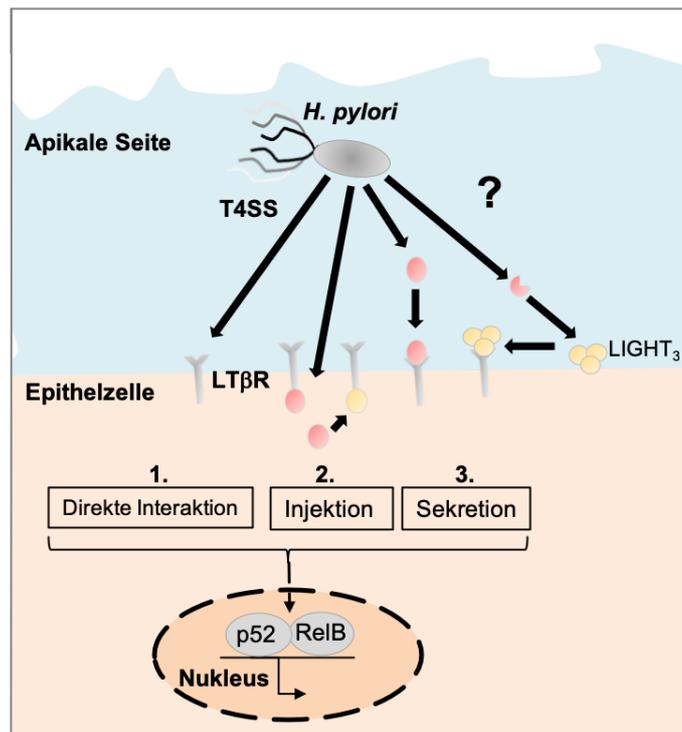


Abbildung 31: Schematische Darstellung zu den putativen Mechanismen für *H. pylori* schnelle LTβR-vermittelte nichtkanonische NF-κB Aktivierung. Rote Ovale stellen Moleküle von *H. pylori* dar. Die möglichen Mechanismen der Aktivierung umfassen: (1) eine direkte Interaktion des T4SS mit dem LTβR (2) die T4SS-abhängige Injektion oder (3) Sekretion eines Moleküls, das entweder direkt mit dem LTβR interagiert oder indirekt durch ein anderes Molekül die Aktivierung des LTβR vermittelt. Ein mögliches Szenario, nämlich die Abspaltung des Liganden LIGHT₃ von der äußeren Membran durch einen Sekretionsmechanismus ist dargestellt.

Zur Identifizierung potentieller Liganden von *H. pylori* wurden zwei Ansätze gewählt. In dem ersten Ansatz wurde die potentiell direkte Interaktion der extrazellulär exponierten T4SS-Komponenten CagL und CagY mit der Ektodomäne des LTβR mittels Massenspektrometrie untersucht. CagL und CagY zählen zu den wenigen extrazellulär exponierten T4SS-Komponenten, deren Interaktion mit β₁ Integrin Heterodimeren mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System und Pulldown-Experimenten *in vitro* nachgewiesen wurde (Jimenez-Soto et al. 2009), während CagL mit mehreren anderen Integrinen RGD-Motiv abhängig und unabhängig interagieren kann (Kapitel 1.1.3.1.3). Weiterhin hat eine kürzlich veröffentlichte Oberflächenplasmonresonanz-Studie die Interaktion von CagL und CagY mit Integrin α₅β₁ bestätigt (Koelblen et al. 2017). CagY ist mit ca. 220 kDa deutlich größer als das 48 kDa Homolog von *A. tumefaciens* und besitzt wahrscheinlich zusätzliche Funktionen. Es wird spekuliert, dass es aufgrund seiner zwei Membrandomänen eine der Hauptuntereinheiten des Pilus sein könnte oder an diesem Anhängsel bildet (Rhode et al. 2003, Tegtmeyer et al. 2011).

Die in dieser Arbeit vorgestellten vorläufigen Ergebnisse der Interaktionsanalysen zeigten, dass CagL und nicht CagY mit dem LTβR interagieren konnte. Diese Interaktion war im Vergleich zu der unspezifischen Bindung an die Beads relativ schwach und bedarf weiterer experimenteller Optimierung, wozu eine Erhöhung der Stringenz zählt, um herauszufinden, ob die unspezifische Bindung von CagL an die Beads groß oder die LTβR-abhängige Bindung gering ist. Dies sollte ein Indiz geben, ob es sich hierbei um eine physiologische Interaktion handeln könnte. Folgende weitere Faktoren könnten sich auf die CagL

Bindungsaffinität auswirken: 1) Fehlende Kofaktoren von *H. pylori* oder der Wirtszelle. Dazu zählen insbesondere die physiologischen Interaktionspartner von CagL, das mit mehreren T4SS Komponenten interagiert (Frick-Cheng et al. 2016), 2) Der Aktivierungs- oder oligomere Zustand des LT β R. Beispielsweise erhöht die Aktivierung von Integrin $\alpha_5\beta_1$ die Affinität von CagL, CagA und CagY, während Cagl ausschließlich mit aktivierten Integrinen interagiert, wie mittels Oberflächenplasmonresonanz gezeigt wurde (Koelblen et al. 2017) und 3) Die Aminosäuresequenz von CagL. CagL enthält ein hypervariables Motiv (Aminosäure 58-62) (Gorrell et al. 2016) und für Alterationen innerhalb dieses Motivs (Aminosäure 58 und 59) wurden kontroverse Daten publiziert, dass sich diese auf die T4SS Funktionalität auswirken, was ebenfalls die Bindung beeinflussen könnte (Tegtmeyer et al. 2014, Tafreshi et al. 2015).

Die CagY-LT β R Interaktion scheint aufgrund der Negativdaten unwahrscheinlich, weil CagY aus dem P12 Stamm amplifiziert wurde, das über ein funktionierendes T4SS verfügt. Obwohl CagY ebenfalls häufig Mutationen in der mittleren Region des Gens (Aminosäure: 715 - 1512) zeigt, die viele Wiederholungen enthält, wurde hierfür ausschließlich eine vollständige Dysfunktion des T4SS (CagA Translokation, IL-8 Induktion) beschrieben (Barozzo et al. 2013, Beckett et al. 2018). Es ist allerdings anzumerken, dass bei den Untersuchungen die Modifikation bzw. Relevanz von zwei putativen Glykosylierungsstellen von CagY nicht berücksichtigt wurde (Larsen et al. 2004). Der LT β R hingegen wurde glykosyliert von R&D Systems erworben und hat wie erwartet LT $\alpha_1\beta_2$ gebunden.

Die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz von CagL gegenüber dem Liganden LT $\alpha_1\beta_2$ zeigte kein homologes LT β R-Bindemotiv (Daten nicht gezeigt) (Sudhamsu et al. 2013), während das LIGHT-LT β R-Bindemotiv nicht bekannt ist. CagL hat allerdings auch keine signifikante Sequenzhomologie zu bekannten eukaryotischen Proteinen (Tegtmeyer et al. 2010). Weiterhin haben Kristallstrukturanalysen gezeigt, dass sich das RGD-Motiv von CagL, das essentiell für die Interaktion mit Integrin $\alpha_5\beta_1$ -Heterodimeren ist, in einer langen ausfahrbaren Helix befindet (Barden et al. 2013, Bonsor et al. 2015), während das RGD-Bindemotiv des physiologischen Liganden Fibronectin (FN Typ III) primär von β -Faltblättern umgeben ist (Dickinson et al. 1994). Daher sind weder hohe Sequenzhomologien noch Kristallstrukturähnlichkeiten von CagL zu erwarten.

Neben CagL und CagY ist Cagl ein weiterer Kandidat der direkt mit dem LT β R interagieren könnte, da er als CagL-Interaktionspartner ebenfalls mit dem Pilus assoziiert zu sein scheint (Pham et al. 2012) und mit Integrinen interagieren kann (Jimenez-soto et al. 2009, Koelblen et al. 2017).

In dem zweiten Ansatz wurde zur Analyse von putativen LT β R-Liganden aus *H. pylori* entweder die Ektodomäne des LT β R oder der gesamte Rezeptor mit entweder den angereicherten Membranproteinen oder den Gesamtproteinen von *H. pylori* inkubiert. Anschließend wurden die Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie bestimmt und basierend auf dem verwendeten LT β R-Konstrukt als extra- oder intrazellulärer Interaktionspartner eingestuft (Kapitel 2.4.1). Es ist erwähnenswert, dass in einer Publikation von Javaheri et al. (2016) ein ähnlicher Ansatz verwendet wurde, womit der CEACAM-

Interaktionspartner (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*) HopQ identifiziert wurde.

In dem Ansatz der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich äußere Membranproteine, nämlich HofC, HopZ, HopD, HopT (babB), HopC (alpA) als Interaktionspartner des LT β R identifiziert, die alle kompetitiv zu LT $\alpha_1\beta_2$ gebunden haben. Dies impliziert, dass das Membranprotein im Vergleich zu LT $\alpha_1\beta_2$ mit einer niedrigeren Affinität (unter diesen Bedingungen) und in einem ähnlichen Interaktionsbereich in der extrazellulären Domäne des LT β R bindet. HofC war mit sehr hoher Signalstärke und Spezifität nachweisbar. Wenngleich die Identifikation von ausschließlich äußeren Membranproteinen unerwartet war, so deuten beispielsweise Evidenzen für das äußere Membranprotein HopQ auf eine wichtige Rolle für die Funktionalität des T4SS hin (Belogolova et al. 2013, Feige et al. 2018b), die auf der Anwesenheit von CEACAM 1, 3, 5 oder 6 beruht (Königer et al. 2016, Javaheri et al. 2016) und aktuell untersucht wird. Über HofC (J0Q9M4; in Stamm 26695: HP0486) ist bisher nur bekannt, dass es ein N-terminales Signalpeptid zum Export hat (Zanotti und Cendron 2014) und für die Kolonisierung von zwei Modellorganismen (mongolische Rennmäuse, C57BL/6 Mäuse) essentiell ist (Kavermann et al. 2003, Baldwin et al. 2007). Daher soll die Relevanz von HofC und von anderen ausgewählten Kandidaten für die nichtkanonische NF- κ B Aktivierung bestimmt und die Interaktion mit dem LT β R in Zellkulturexperimenten untersucht werden.

3.5 Das T4SS - ein Entzündungsmodulator in der *H. pylori* Infektion

H. pylori kann seinen Wirt lebenslang infizieren und dafür die Immunantwort auf diverse Weisen vermeiden. Dazu zählt unter anderem die Inhibition von Funktionen von dendritischen Zellen, von T-Zellen, die Inhibition der Antigenpräsentation, die Vermeidung der humoralen Immunantwort sowie das Überleben innerhalb von Makrophagen und deren Abtötung (Lina et al. 2014). Ebenso scheint *H. pylori* die Aktivierung von Immunrezeptoren, die das kanonische NF- κ B aktivieren, zu vermeiden, wie die Toll-ähnlichen Rezeptoren 4 und 5 indem es modifiziertes Lipopolysaccharid (Wang et al. 2000, Bäckhed et al. 2003, Lepper et al. 2005) und modifiziertes Flagellin exprimiert (Andersen-Nissen et al. 2005). Nichtsdestotrotz induziert *H. pylori* scheinbar gezielt über das T4SS verschiedene immunstimulierende Signalwege, wie die kanonische und nichtkanonische NF- κ B Signaltransduktion.

Zu diesem vermeintlichen Widerspruch, dass *H. pylori* einerseits die Immunantwort vermeidet und andererseits scheinbar gezielt induziert, hat Barrozo et al. (2013, 2016) eine interessante Hypothese zur Funktion des T4SS postuliert. Das *cagY* Gen hat eine hohe Anzahl zentral gelegener repetitiver DNA Sequenzabschnitte, die während der DNA-Replikation anfällig für Deletionen und Duplikationen im Leserahmen sind (Aras et al. 2003). Diese führen in C57BL/6 Mäusen und Primaten (Rhesusaffe) zu einer hohen Mutationsrate und trotz der Expression von CagY zu der Deaktivierung des T4SS, wie anhand der IL-8 Induktion und CagA Translokation gezeigt wurde (Barrozo et al. 2013). Im Einklang dazu zeigt die Sequenzierung von *H. pylori* (Stamm 7.13) nach der Infektion von mongolischen

Rennmäusen, dass das *cagY* Gen eins von neun Genen ist, das am häufigsten mutiert (Beckett et al. 2018).

Diese Mutationen scheinen primär auf der Immunantwort des Wirtes, nämlich auf CD4+ T-Zellen und der Interferon γ (IFN γ) Expression zu beruhen, die im Verlauf der Infektion zur Deaktivierung des T4SS führt (Barrozo et al. 2016). Damit fungiert CagY als ein immunsensitiver Regulator des T4SS, der die Immunreaktion des Wirtes reguliert, wobei es über die beiden NF- κ B Signalwege sowohl die angeborene als auch adaptive Immunantwort beeinflussen kann. Diese Regulation der Entzündungsbedingungen ist höchstwahrscheinlich vorteilhaft für *H. pylori*, wobei insbesondere seine Immunvermeidung unter diesen Bedingungen ein Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen ist. Verschiedene Herpesviren zeigen ein ähnliches Verhalten, wie z.B. der mäuse-spezifische Gammaherpesvirus 68, der dem Humanpathogen EBV genetisch sehr stark ähnelt (Barton et al. 2007). Gammaherpesvirus 68 induziert die Produktion von IFN γ und die systematische Aktivierung von Makrophagen, was unter anderem zu der Infektionsresistenz des Wirtes gegenüber den bakteriellen Pathogenen *Listeria monocytogenes* und *Yersinia pestis* führt (Barton et al. 2007). Für *Salmonella typhimurium* ist die T3SS-abhängige Entzündung des Wirtes essentiell für die Kolonisierung von Mäusen, da dadurch Tetrathionat generiert wird, das nahezu ausschließlich von *S. typhimurium* als Elektronakzeptor genutzt wird (Barozzo et al. 2013). Einen weiteren Selektionsvorteil erhält *S. typhimurium* aufgrund der Expression eines hochspezialisierten Metalltransporters. Dieser schützt es vor Lipocalin-2 und Calprotectin, das Epithelzellen unter Entzündungsbedingungen exprimieren und zu der Sequestrierung von Zink und Eisen bei andere Darm-Mikrobiota führt (Barozzo et al. 2013). Dies sollen nur einige Veranschaulichungen sein, inwieweit die T4SS-abhängige Aktivierung der NF- κ B Signalwege und die damit assoziierten Entzündungsreaktionen zum Vorteil von *H. pylori* sein könnten.

Schlusswort

Vor Beginn dieser Arbeit gab es nahezu keine Informationen zu der Fähigkeit von *H. pylori* das nichtkanonische NF- κ B zu aktivieren, das eine zunehmende Relevanz für entzündungsassoziierte Krankheiten gewinnt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *H. pylori* das nichtkanonische NF- κ B in verschiedenen Epithelzellen aktiviert und diese Aktivierung von dem LT β R abhängt. Die äußerst schnelle Induktion wird *in vitro* durch das T4SS vermittelt – einem Schlüsselvirulenzfaktor von *H. pylori*. Weiterhin deuten die Daten aus einer Kooperation darauf hin, dass das nichtkanonische NF- κ B ebenfalls *in vivo* in der *H. pylori*-assoziierten Gastritis aktiviert wird. Da *in vivo* zudem kürzlich eine LIGHT-abhängige Aktivierung postuliert wurde, könnte eine Funktion der T4SS-abhängigen Aktivierung die immunsensitive Regulation des Aktivierungslevels von dem nichtkanonischen NF- κ B und somit der Entzündungsreaktion sein. Außerdem kann die persistente Infektion mit *H. pylori*, wie auch bei den LT β R-modulierenden HCV und EBV, zu der Entstehung von entzündungsfördernden ektopischen lymphoiden Follikeln führen, wofür der LT β R ein wichtiger Vermittler sein könnte. Die Implikationen dieser Arbeit sind daher schwierig einzuschätzen, unter anderem auch weil die Entstehung der Follikel nicht auf die Gastritis limitiert ist, ebenso wie der LT β R wahrscheinlich in einer Vielzahl von Zelltypen moduliert wird. Die aktuelle Datenlage lässt bisher nur den Schluss zu, dass NIK ein putativer prognostischer Marker für die Entzündung in der Gastritis ist. Es sollte untersucht werden, ob die Aktivierung des nichtkanonischen NF- κ B zur Entzündung beiträgt und falls ja, ob z.B. NIK als therapeutische Zielstruktur geeignet ist. Die Wirkung des nichtkanonischen NF- κ B ist zudem nicht auf Entzündungsreaktionen beschränkt, weshalb z.B. die Angiogenese, bestimmte Immunzellreifungen, sowie proliferative und antiapoptotische Effekte in Betracht gezogen werden können. Daher bedarf es umfangreicher Untersuchungen, um die pathophysiologische Relevanz der nichtkanonischen NF- κ B Aktivierung zu evaluieren. Die Forschung zum nichtkanonischen NF- κ B insbesondere in der *H. pylori* Infektion steht noch am Anfang. Die vorliegende Arbeit soll ein solides Fundament dafür legen und einen Anreiz für zukünftige Untersuchungen in diesem Forschungsbereich schaffen.

Wenngleich der Mechanismus für die T4SS-abhängige LT β R-vermittelte und untypische nichtkanonische NF- κ B Aktivierung noch nicht aufgeklärt werden konnte, konnte ein Großteil der Signalkaskade aufgedeckt und mögliche *H. pylori* Liganden identifiziert werden, die ebenfalls weiterer Untersuchungen bedürfen.

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden analysenreine (p.a.) Chemikalien von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem, Carl Roth, Merck und Sigma-Aldrich.

4.2 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden von angegebenen Herstellern bezogen und nicht in den Methodenbeschreibungen erwähnt:

Bakterienkultur Petrischalen (d = 100 mm, Roth), Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml, Greiner), Gelbeladungsspitzen (Roth), Kanülen (0,45 x 2 mm, Braun), Kryoröhrchen (2 ml, Simport), Küvetten (1,6 ml, Sarstedt), Nitril Handschuhe (Braun), Pipetten (steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, TPP), Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, Eppendorf), Pipettenspitzen mit Aerosolfilter (20 µl, 200 µl, 1000 µl, Sorbio), PVDF-Membranen (0,45 µm, Millipore), Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, Sarstedt), Reaktionsgefäße (0,2 ml, Biozym), Spritzen (1 ml, Braun), Sterilfilter (0,22 µm, Millipore), Stieltupfer (Lohmann-Rauscher), Ultrazentrifugen Reaktionsgefäße (1,5 ml, Beckman Coulter), Whatman Filterpapier (mittlere Dicke (0,34 mm), GE Healthcare), Zählkammer-Platten (Thermo Fisher Scientific), Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm², Greiner), Zellkultur Petrischalen (d = 35 mm, 60 mm, 100 mm, Greiner), Zellschaber (TPP), 96 well Platten (Greiner)

4.3 Geräte

Außer den folgenden Geräten sind die verwendeten Geräte in den Methodenbeschreibungen angegeben: MilliQSynthesis A10 (Millipore) für bidestilliertes Wasser, die Feinwaage Precisa XB120A (PESA Waagen GmbH), die Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R (Eppendorf), das Wasserbad MLW W1 (MLW) zur Aufwärmung von Substanzen auf 37 °C und der Vortex-Schüttler VF2 oder Magnetrührer (IKA) zur Mischung.

4.4 Lösungen

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Lösungen. Die Lösungen wurden mit H₂O_{bidest} hergestellt und bei RT gelagert (Ausnahmen angegeben).

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
RIPA Puffer, pH 7,5	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM K ₂ HPO ₄ , 10 % Glycerin ¹³ , 1 % Triton X-100 ¹ , 0,1 %, SDS ² , 1 mM AEBSF ³⁴ , 20 mM C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P ³⁵ , 20 mM NaF ³⁵ , 1 mM Na ₂ Mo ₄ ³⁵ , 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ³ , 1 mM Na ₃ VO ₃ ³⁴⁷ , Protease Inhibitoren ³⁴⁶	Proteinisolation, (Gesamtproteine) Immunpräzipitation
Puffer A, pH 7,9	20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM K ₂ HPO ₄ , 1,5 mM MgCl ₂ , 10 % Glycerin ¹³ , 0,5 mM AEBSF ³⁴ , 20 mM C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P ³⁵ , 10 mM NaF ³⁵ , 1 mM Na ₂ Mo ₄ ³⁵ , 1 mM Na ₃ VO ₃ ³⁴⁷ , Protease Inhibitoren ³⁴⁶	Proteinisolation, (Zytosol)
Puffer C, pH 7,9	20 mM Tris-HCl, 420 mM NaCl, 10 mM K ₂ HPO ₄ , 1,5 mM MgCl ₂ , 10 % Glycerin ¹³ , 0,5 mM AEBSF ³⁴ , 20 mM C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P ³⁵ , 0,2 mM EDTA, 10 mM NaF ³⁵ , 1 mM Na ₂ Mo ₄ ³⁵ , 1 mM Na ₃ VO ₃ ³⁴⁷ , Protease Inhibitoren ³⁴⁶	Proteinisolation, (Zellkern, löslich)
Puffer E, pH 7,9	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 1,5 mM MgCl ₂ , 10 % Glycerin ¹³ , 0,5 mM AEBSF ³⁴ , 20 mM C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P ³⁵ , 10 mM NaF ³⁵ , 1 mM Na ₂ Mo ₄ ³⁵ , 1 mM Na ₃ VO ₃ ³⁴⁷ , Protease Inhibitoren ³⁴⁶	(Zellkern, unlöslich)
Puffer E1, pH 7,9	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 1,5 mM MgCl ₂ , 10 % Glycerin ¹³ , 0,5 mM AEBSF ³⁴ , 20 mM C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P ³⁵ , 10 mM NaF ³⁵ , 1 mM Na ₂ Mo ₄ ³⁵ , 1 mM Na ₃ VO ₃ ³⁴⁷ , Protease Inhibitoren ³⁴⁶ , 2 % SDS ²	Proteinisolation, (Zellkern, unlöslich)
Puffer H1, pH 7,4	10 mM Tris-HCl, 2 % Sarkosyl ² , Protease Inhibitoren ³⁴⁶	Proteinisolation,
Puffer H2, pH 7,4	10 mM Tris-HCl, Protease Inhibitoren ³⁴⁶	(<i>H. pylori</i> , äußere
Puffer H3, pH 7,4	10 mM Tris-HCl, 10 % Glycerin ¹ , Protease Inhibitoren ³⁴⁶	Membranproteine)
DPBS mit Mg und Ca	Gibco®, Katalog Nr. 14040091	<i>H. pylori</i> Infektion / Passagieren
Laemmli Puffer ⁴ (4x), pH 6,8	240 mM Tris-HCl, 2 % SDS ² , 40 % Glycerin ¹ , 0,01 % Bromophenol Blau ² , 10 % β-Mercaptoethanol ¹	SDS-PAGE
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS ²	
Waschpuffer (TBST)	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 ¹	
Blockpuffer	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 ¹ , 5 % (w/v) Magermilchpulver ²	Western Blot
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin 10 % Methanol ¹	
Stripping-Puffer, pH: 2,2	200 mM Glycin, 0,1 % SDS ² , 1 % Tween 20 ¹	

¹ (v/v). ² (w/v). ³ Komponenten unmittelbar vor der Verwendung hinzugegeben. ⁴ Lagerung bei -20 °C. ⁵ Lagerung bei 4 °C. ⁶ von Sigma-Aldrich (04693116001)

⁷ Na₃VO₃ wurde vor der Verwendung wie folgt behandelt (nach Abcam): 1. 100 mM Lösung hergestellt 2. Die Lösung mit HCl auf pH 10 eingestellt 3. Die Lösung wurde gekocht bis sie farblos war und auf RT abgekühlt 4. Die Schritte 2 und 3 wurden solange wiederholt bis die Lösung farblos bei pH 10 war.

4.5 Antikörper

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper. Die Antikörper wurden 1:1000 in TBST mit 5 % (w/v) BSA oder Magermilchpulver verdünnt (Ausnahmen angegeben).

Antikörper	Wirtsspezies	Hersteller	Katalog Nr.	Verwendung
α -CagA (8C6/F13)	Maus	Austral Biologicals	HPM-5001-5	Milch
α -Flagellin (BDI516)	Maus	Acris Antibodies	AM00865PU-N	Milch, 1:500
α -GAPDH (6C5)	Maus	Millipore	MAB374	Milch, 1:5000
α -HDAC1 (H-51)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-7872	BSA
α -IKK γ (B-3)	Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-8032	BSA
α -Integrin α_5 (H-104)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-10729	Milch
α -Integrin β_1 (N-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-6622	Milch
α -I κ B α (44D4)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	#4812	BSA
α -LT β R (N-15)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-8375	BSA
α -NIK	Kaninchen	Cell Signaling Technology	#4994	BSA
α -NF- κ B p65 (20)	Maus	BD Biosciences	610869	BSA
α -p100/52	Kaninchen	Cell Signaling Technology	#4882	BSA
α -Phospho-I κ B α (S32/36) (5A5)	Maus	Cell Signaling Technology	#9246	Milch
α -Phospho-NIK (T559)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-12957	BSA
α -Phospho-p65 (S536)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	#3031	BSA
α -Phospho-p100 (S866/870)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	#4810	BSA
Phospho-TAK1 (T184/187) (90C7)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	#4508	BSA
α -Phospho-Tyr	Maus	Cell Signaling Technology	#9411	Milch
α -RelB (C-19)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-226	BSA
α -TRAF2 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-876	BSA
α -TRAF3 (H-122)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-1828	BSA

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper, die mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) konjugiert sind. Die Antikörper wurden 1:5000 in TBST mit 5 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt.

Antikörper	Hersteller	Katalog Nr.
α -Kaninchen IgG (F(ab') ₂ Fragment)-HRP		711-036-152
α -Kaninchen IgG (leichte Kette)-HRP		211-032-171
α -Maus IgG (F(ab') ₂ Fragment)-HRP	Jackson	715-036-151
α -Ziege IgG (F(ab') ₂ Fragment)-HRP	ImmunoResearch	305-035-047
α -Ziege IgG (leichte Kette)-HRP		205-032-176

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper für spezifizierte Anwendungen.

Antikörper	Wirtsspezies	Hersteller	Katalog Nr.	Anwendung
α -CagA	Kaninchen	Foryst-Ludwig et al. 2004	-	IP
α -IgG	Kaninchen	Sigmar Aldrich	I5006	IP Kontrolle
α -IgG	Ziege	Sigmar Aldrich	I5256	IP Kontrolle
α -Integrin β_1 (9EG7)	Maus	BD Biosciences	553715	Zellkultur
α -LT β R (N-15)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-8375	IP
α -NF- κ B p52	Maus	Upstate	05-361	Supershift

4.6 Kurze interferierende RNA

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete kurze interferierende RNA (siRNAs)

Ziel	Experimentelle Konzentration	Hersteller	Katalog Nr. / Referenz
AllStars negative control siRNA	Equimolar zu den spezifischen siRNA	QIAGEN	SI03650318
IKK α	35 nM*	Eurogentec	Auftragsarbeit für Sokolova et al. 2014
Integrin α_5	40 nM*	GE Dharmacon	L-008003-00-0005
Integrin β_1	40 nM*	GE Dharmacon	L-004506-00-0005
LTBR_1	25 nM	QIAGEN	SI00036372
LTBR_3	25 nM	QIAGEN	SI00036386
LTBR_4	25 nM	QIAGEN	SI00036393
LTBR_5	25 nM	QIAGEN	SI03044986
NEMO	20 nM	GE Dharmacon	L-003767-00-0005
NIK	25 nM*	Santa Cruz Biotechnology	sc-36065
RelA	30 nM*	GE Dharmacon	L-003533-00-0005
TRAF3	25 nM*	Santa Cruz Biotechnology	sc-29510

*Kombination aus mindestens drei verschiedenen siRNAs. Die gesamt-siRNA Konzentration ist angegeben.

4.7 Anzucht und Lagerung des Bakteriums *H. pylori*

4.7.1 Stämme

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

<i>H. pylori</i> Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
P1	Wildtyp	Van ^R	Haas et al. 1993
P1 <i>virB7</i>	P1 Δ <i>cagT</i>	Van ^R , Cam ^R	Backert et al. 2000
P1 <i>cagA</i>	P1 Δ <i>cagA</i>	Van ^R , Cam ^R	Backert et al. 2000
P12	Wildtyp	Van ^R	Schmitt und Haas 1994

^R: Resistenz; Van: Vancomycin; Cam: Chloramphenicol

4.7.2 Anzucht auf Agarplatten

Ausgewählte *H. pylori* Stämme (s.o.) wurden in einen Minicooler (-20 °C) überführt und mithilfe einer ausgeglühten Impföse auf Petrischalen mit GC-Agar (s.u.) ausgestrichen. Anschließend wurden die Agarplatten umgedreht in einem Oxoid™ Anaero Jar™ (Thermo Fisher Scientific) überführt und mithilfe Oxoid™ CampyGen™ (Thermo Fisher Scientific) unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C (HeraTherm™ Incubator, Thermo Scientific) für drei Tage inkubiert. Die Kulturen wurden mithilfe eines feuchten Stieltupfers in 1,5 ml 37 °C warmes DPBS überführt, davon 80 µl bzw. 160 µl auf GC-Agarplatten durch einen Drigalskispattel verteilt und unter gleichen Bedingungen zwei Tage bis zu der Verwendung inkubiert.

Der GC-Agar für die Anzucht von *H. pylori* wurde wie folgt hergestellt. Bacto™ Proteose Peptone (15 g/l, BD Biosciences) und CC Agar base (36 g/l, Oxoid) wurden mit bidestilliertem Wasser vermischt und autoklaviert. Anschließend wurden die folgenden Bestandteile hinzugegeben 10 % (v/v) Pferdeserum (PAA), 1 µg/ml (v/v) Nystatin⁵, 5 µg/ml (v/v) Trimethoprim⁵, 1 % (v/v) Vitaminmix³⁴ (1,11 M Dextrose, 137 mM L-Glutamine, 296 mM L-Cystein, 430 nM Cocarboxylase, 90 nM Eisen(III)-Nitrat, 20 nM Thiamin, 160 nM p-Aminobenzoesäure, 750 nM β-Nicotinamidadenindinukleotid (NAD), 10 nM Vitamin B12, 11,7 µM L-Cystein Hydrochlorid, 19,4 µM Adenin, 530 nM Guanin, 2,37 µM Argenin, 14,87 µM Uracil). Zudem wurden zu dem GC-Agar filtrierte (Porengröße: 0,22 µm) Antibiotika hinzugefügt: 10 µg/ml (v/v) Vancomycin, 6 µg/ml (v/v) Chloramphenicol⁶. Welche Antibiotika verwendet wurden hing von der Resistenz des zu züchtenden *H. pylori* Stamms ab (Tabelle 7). Die Agarplatten wurden in der Nähe einer Bunsenbrenner Flamme gegossen und bei RT zur Aushärtung für ca. eine Stunde stehen gelassen. Anschließend wurden sie bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

¹ Lagerung bei Raumtemperatur, ² Lagerung bei 4 °C, ³ Lagerung bei -20 °C, ⁴ filtriert (Porengröße: 0,22 µm), ⁵ in N,N-Dimethylformamid gelöst ⁶ in reinem Ethanol gelöst

4.7.3 Anzucht in Flüssigmedium

Für die Anzucht von *H. pylori* in Flüssigmedium wurden Vorkulturen, wie unter 4.7.2 beschrieben, hergestellt. Die Bakterien wurden mithilfe eines feuchten Stieltupfers in 37 °C warmen BHI-Bouillon (37 g/l, Oxoid) mit 10 % Pferdeserum und 10 µg/ml (v/v) Vancomycin

überführt (1,2 ml pro Agarplatte) und daraus Verdünnungen hergestellt. Mindestens zwei Verdünnungen sollten eine optische Dichte von 0,1 bis 0,5 bei 550 nm (OD_{550}) abzüglich des Blindwertes (unbeimpftes Medium) (ΔOD_{550}) aufweisen, was dem Proportionalitätsbereich der Zellzahl/Zellstreuungs-Relation des verwendeten Photometers (Ultraspec 3100 pro, Biochrom Ltd) entspricht. Die Bakterienzahl pro ml wurde mithilfe einer Standardkurve und dem Verdünnungsfaktor anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt. Anschließend wurden, in Anlehnung an Sainsus et al. (2008), $2,5 \cdot 10^9$ *H. pylori* in 10 ml des beschriebenen BHI-Bouillons in liegenden Zellkulturflaschen (25 cm^2) in einem Oxoid™ Anaero Jar™ (Thermo Fisher Scientific) unter mikroaerophilen Bedingungen (Oxoid™ CampyGen™, Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C (HeraTherm™ Incubator, Thermo Fisher Scientific) bis zur Ernte bzw. Messung inokuliert.

4.7.4 Kryokonservierung

Die *H. pylori* wurden, wie unter 4.7.2 beschrieben, kultiviert. Die Bakterien von zwei gut bewachsenen Petrischalen mit GC-Agar wurden mithilfe eines Stieltupfers in 2 ml 37 °C warmen BHI-Bouillon mit 20 % Glycerin und 10 % FCS überführt und anschließend in einem Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

4.8 Proteinextraktion aus *H. pylori*

Die *H. pylori* Flüssigkulturen (siehe 4.7.3) wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (nach 65 - 70 Stunden) bei einer Bakterienzahl von $\sim 25 \cdot 10^9/\text{ml}$ geerntet. Dafür wurden 50 ml Wachstumskultur in einem Falcon Zentrifugenröhrchen vereinigt und für 20 min bei $3.500 \cdot g$ und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 10 mM Tris pH 7,4 resuspendiert und die Suspension unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml 10 mM Tris pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 5 mg/ml Lysozym und Protease Inhibitoren (Sigma-Aldrich) resuspendiert, zu je 1 ml pro 1,5 ml Reaktionsgefäß aliquotiert und die Suspensionen für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die viskosen Proben wurden mithilfe einer Pipette homogenisiert und die Bakterien darin mittels Ultraschall-Behandlung lysiert (15-mal alternierend: 10 s Ultraschall (50 % Amplitude) und 10 s Pause, Vibra™ Cell Sonicator, Sonics Materials). Falls die Proben noch viskos waren, wurde die Behandlung fortgesetzt. Es war zu beachten, dass sich Kavitationen, aber keine Blasen oder Schaum bildeten. Für die Kontrolle des Zellaufschlusses konnten Proben nach der Ernte, nach der Lysozym Behandlung und nach der Ultraschall Behandlung mittels Ponceau S auf einer SDS-PAGE analysiert, sowie die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Anschließend wurden entweder die Gesamtproteine oder äußeren Membranproteine isoliert (siehe 4.8.1 und 4.8.2).

4.8.1 Isolation der Gesamtproteine aus *H. pylori*

Für die Isolation der Gesamtproteine aus *H. pylori* wurde, wie unter 4.8 beschrieben, verfahren. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei $7.000 \cdot g$ und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein Falcon Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen

zweifach konzentrierten RIPA-Lysepuffer vermischt. Nach der Inkubation für 30 min auf Eis, wurden die Proben bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

4.8.2 Isolation der äußeren Membranproteine aus *H. pylori*

Die folgende Behandlung beruht auf einer Kombination verschiedener Assays (Bölin et al. 1982, Ruiz-Bustos et al. 2001 und Hobb et al. 2009). Für die Isolation der äußeren Membranproteine aus *H. pylori* wurde, wie unter 4.8 beschrieben, verfahren. Anschließend wurde die Probe für 20 min bei 7.000*g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in vier 1,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann) aufgeteilt, die für 1 Stunde bei 100.000*g und 4 °C zentrifugiert wurden (Optima TL Ultrazentrifuge, Beckmann Coulter). Die Pellets wurden in 1 ml Puffer H1 mithilfe einer Pipettenspitze abgekratzt und anschließend zur Resuspendierung für mindestens 45 min bei 37 °C und 550 rpm in einem Thermomixer (MB-102, BIOER) inkubiert. Dabei wurden die Proben alle 5 min für 5 s mit dem Vortex gemischt und auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die Suspensionen erneut für 1 Stunde bei 100.000*g und 4 °C zentrifugiert, die Pellets in 1 ml Puffer H2 resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die in jeweils 200 µl Puffer H3 resuspendierten Pellets wurden vereinigt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

4.9 Anzucht von Epithelzellen

Die Kultivierung verschiedener Epithelzelllinien (4.9.1) erfolgte in 10 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS in Zellkulturflaschen (75 cm²) bei 37 °C und 5 % CO₂ (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific). Die Zellkulturen wurden regelmäßig nach 2 - 3 Tage passagiert. Dafür wurden die Zellkulturen zweifach in 10 ml 37 °C warmen DPBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 0,05 M Trypsin für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden nach Zugabe von 8 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS in ein Falcon Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min bei 600*g zentrifugiert (Megafuge 2.0R, Heraeus) und das Zellpellet in 30 - 40 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS resuspendiert. Abschließend wurden je 10 ml in Zellkulturflaschen (75 cm²) überführt und diese, wie beschrieben, inkubiert. Alle Arbeiten mit Epithelzelllinien erfolgten in einer Sterilwerkbank (SterilGARD CLASS II Type A/B3, SterilGARD). Außerdem wurde die Viabilität und Konfluenz der Zellkulturen mittels Hellfeldmikroskopie (Eclipse TS100, Nikon) regelmäßig kontrolliert.

Tabelle 8: Verwendete Medien und Lösungen für Zellkulturarbeiten (Lagerung bei 4 °C).

Bezeichnung	Hersteller	Katalog Nr.
RPMI-1640	Gibco®	11875093
Opti-MEM™ mit reduziertem Serum, GlutaMAX™	Gibco®	51985034
FCS	Gibco®	10500064
Trypsin	Gibco®	25200072
Dulbecco's PBS ohne Mg und Ca	Gibco®	14190094

4.9.1 Zelllinien

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
AGS	Menschliche Epithelzellen eines Magenadenokarzinoms (ATCC CRL-1739)	Barranco et al. 1983
HeLa	Menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalsadenokarzinoms (ATCC CCL-2)	Gey et al. 1952
HKC-8	Menschliche Epithelzellen eines proximalen Nierentubulus, Klon 8	Racusen et al. 1997
MKN-45	Menschliche Epithelzellen eines Magenadenokarzinoms, die aus einer Lebermetastase isoliert wurden (ACC 409)	Motoyama et al. 1986
NCI-N87	Menschliche Epithelzellen eines Magenadenokarzinoms, die aus einer Lebermetastase isoliert wurden (ATCC CRL-5822™)	Park et al. 1990

4.9.2 Anzucht auf Zellkultur-Petrischalen

Für die Anzucht von Epithelzelllinien (4.9.1) auf Petrischalen wurden Zellkulturen der Passage 6 - 14 (siehe 4.9) verwendet. Die Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm²) wurden zweifach in 10 ml 37 °C warmen DPBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 0,05 M Trypsin für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific). Die abgelösten Zellen wurden nach Zugabe von 8 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS in ein Falcon Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min bei 600*g zentrifugiert (Megafuge 2.0R, Heraeus) und das Zellpellet in 10 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau Lösung (0,4 % w/v, Invitrogen) vermischt und damit die Lebendzellzahl in einer Zählkammer-Platte (Invitrogen) mithilfe von Countess™ (Invitrogen) und der mitgelieferten Software bestimmt. Es wurden 2*10⁵ Zellen pro 10 cm² Wachstumsfläche der Petrischalen (Durchmesser/Wachstumsfläche: 35 mm/9 cm², 60 mm/21 cm², 100 mm/58 cm²) in RPMI-1640 mit 10 % FCS ausgesät. Für Zelllinien mit höherer Verdoppelungszeit (NCI-N87, MKN-45) wurden stattdessen 2,65*10⁵ Zellen pro 10 cm² ausgesät. Nachdem die Zellen für ca. 30 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ gewachsen waren, wurden sie zweifach mit RPMI-1640 mit 0,2 % FCS gewaschen und mit dem gleichen Medium bis zum Experiment für 16 - 18 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert. Unmittelbar vor dem Experiment sollte die Zellkonfluenz ca. 70 % betragen, was mittels Hellfeldmikroskopie (Eclipse TS100, Nikon) kontrolliert wurde.

4.9.3 Anzucht auf Zellkultureinsätzen

Für die Anzucht von polarisiert wachsenden Epithelzellen wurden NCI-N87 Zellen verwendet, die in Zellkultureinsätzen eine zusammenhängende einlagige Zellschicht bilden (Diesing et al. 2013). Dafür wurde bis zur Zellzahlbestimmung wie unter 4.9.2 beschrieben verfahren. Anschließend wurden je ThinCert™ Zellkultureinsatz (Wachstumsfläche: 1,13 cm², 1 µm Porengröße, Greiner Bio-One) 2*10⁵ NCI-N87 Zellen in RPMI-1640 mit 10 % FCS auf 12-well Platten ausgesät. Die Zellkulturen wuchsen für 6 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific), dabei wurden die Zellkulturen nach 2 und 4 Tagen im gleichen Medium gewaschen und das Medium ausgetauscht. Zudem wurde die

Polarisierung mittels TEER (transepitheliale elektrische Resistenz)-Messungen (Millicell[®]-ERS, Millipore) verfolgt, indem der TEER der Zellkulturen bestimmt und davon der TEER von unbewachsenen Zellkultureinsätzen subtrahiert wurde. 16 - 18 Stunden vor dem Experiment wurden die Zellkulturen zweifach mit RPMI-1640 mit 0,2 % FCS gewaschen und mit dem gleichen Medium unter gleichen Bedingungen inkubiert. Für Experimente wurden ausschließlich Zellkulturen mit einem TEER von 0,5 – 0,6 k Ω *cm² verwendet, wo eine zusammenhängende einlagige Zellschicht vorliegen sollte.

4.9.4 Kryokonservierung von Zellkulturen

Für die Kryokonservierung wurden Zellkulturen, wie unter 4.9 beschrieben, für ca. 2 Tage gezüchtet, mittels Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 90 % FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und davon 1 ml mit 2 - 4*10⁶ Zellen in ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde zunächst für 3 Stunden bei -80 °C und anschließend für die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Für die Kultivierung kryokonservierter Zellkulturen wurden diese bei 37 °C aufgetaut und anschließend mit 5 ml 37 °C warmen RPMI-1640 mit 10 % FCS vermischt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 600*g wurde das Pellet in 15 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS resuspendiert und in Zellkulturflaschen (75 cm²) wie beschrieben kultiviert (4.9).

4.10 Behandlungen von Zellkulturen

4.10.1 Infektion mit *H. pylori*

Für die Infektion wurden die Zellkulturen und *H. pylori* wie angegeben (4.7.2, 4.9.2) in Petrischalen gezüchtet. Die Bakterien wurden mithilfe eines feuchten Stieltupfers in 37 °C warmes PBS überführt (1,2 ml pro Agarplatte) und daraus Verdünnungen hergestellt. Mindestens zwei Verdünnungen sollten eine optische Dichte von 0,1 bis 0,5 bei 550 nm (OD₅₅₀) abzüglich des Blindwertes (unbeimpftes Medium) (Δ OD₅₅₀) aufweisen, was dem Proportionalitätsbereich der Zellzahl/Zellstreuungs-Relation des verwendeten Photometers (Ultrospec 3100 pro, Biochrom Ltd) entspricht. Die Bakterienzahl pro ml wurde mithilfe einer Standardkurve und dem Verdünnungsfaktor anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt. Die Zellzahl der Zellkulturen wurde mithilfe der Konfluenz durch Hellfeldmikroskopie (Eclipse TS100, Nikon) und einer Standardkurve ermittelt.

Nach der Infektion der Zellkulturen mit 100 *H. pylori* pro Zelle (MOI, *multiplicity of infection* 100) in einer Sterilwerkbank (Herasafe KS18, Heraeus), wurden die Zellkulturen bis zur Ernte bei 37 °C und 5 % CO₂ (HeraTherm Incubator, Thermo Fisher Scientific) inkubiert.

4.10.2 Stimulation mit Zytokinen

Für die Stimulation mit Zytokinen wurden die Zellkulturen, wie unter 4.9.2 beschrieben, gezüchtet. Anschließend wurden die Zellen mit den in den Experimenten angegebenen Konzentrationen Lymphotoxin $\alpha_1\beta_2$ (678-LY, R&D Systems) stimuliert.

4.10.3 Hemmung mit Inhibitor/Antikörper

Die Zellkulturen wurden, wie unter 4.9.2 beschrieben, gezüchtet. Anschließend wurden die Zellkulturen eine Stunde vor der Infektion bzw. Stimulation mit 10 μ M MG132 (Proteasom Inhibitor, BML-PI102-0005, ENZO-LIFE Sciences) inkubiert. Die Kontrollen wurden stattdessen mit dem gleichen Volumen DMSO behandelt.

Für die Behandlung mit dem Integrin β_1 bindenden Antikörper 9EG7 wurden die Zellkulturen 16 - 18 Stunden vor dem Experiment nicht wie üblich (siehe 4.9.2) mit RPMI-1640 mit 0,2 % FCS, sondern mit 10 % FCS gewaschen und inkubiert. Anschließend wurde 2,5 Stunden vor der Infektion 2 mM $MnCl_2$ und 30 μ g/ml 9EG7 zu den Zellkulturen gegeben. $MnCl_2$ induzierte die Aktivierung von Integrin β_1 (Bazzoni et al. 1995), was zu der Exposition des 9EG7 Epitops führt. Die daraus folgende 9EG7 Bindung fixiert wahrscheinlich Integrin β_1 , was die *H. pylori*-induzierte CagA Translokation reprimiert (Jimenez-Soto et al. 2009).

4.10.4 Transfektion mit kurzer interferierender RNA

Für die Transfektion mit kurzer interferierender RNA (siRNA, *small interfering RNA*) wurden Zellkulturen der Passage 6 - 14 (siehe 4.9) in Petrischalen verwendet und so ausgesät (4.9.2), dass die Zellkonfluenz nach 16 - 20 Stunden bei 60 - 70 % lag. Dann wurden die Zellen zweifach mit 37°C warmen Opti-MEM™ mit reduziertem Serum und GlutaMAX™ gewaschen und in dem gleichen Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Parallel dazu wurde eine Suspension mit einer oder mehreren spezifischen siRNA(s) (Tabelle 6), sowie zur Kontrolle eine Suspension mit einer equimolaren siRNA ohne Zielgen (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen) (Tabelle 6) und zwei Suspensionen mit der Transfektionsreagenz siLentFect™ Lipid Reagenz (BioRad) mit Opti-MEM™ hergestellt.

Nach der vortex-Mischung (1000 rpm, 1 s) der Suspensionen, wurden jeweils eine siRNA - Suspension mit einer siLentFect™ Lipid Reagenz-Suspension vereinigt, erneut gemischt (1000 rpm, 1 s) und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf die Zellkulturen gegeben und das Wachstumsmedium 2 Stunden später mit 10 % FCS versetzt. Final wurden pro ml Medium 3,6 μ l siLentFect™ und 10 - 50 nM siRNA verwendet. Die verwendete siRNA Konzentration hing von der Wirksamkeit der spezifischen siRNA und der Ziel-mRNA ab (Krueger et al. 2007). Nachdem die Zellen für ca. 30 Stunden unter gleichen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ gewachsen waren, wurden sie zweifach mit RPMI-1640 mit 0,2 % FCS gewaschen und mit dem gleichen Medium bis zum Experiment für 16 - 18 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert.

4.11 Proteinextraktion aus Zellkulturen

4.11.1 Isolation der Gesamtproteine

Für die Isolation der Gesamtproteine wurden in Petrischalen (d = 35 - 100 mm) gewachsene Zellkulturen (4.9.2) auf Eis überführt und zweifach in eisgekühltem PBS (2 - 4 ml) gewaschen. Nach der Entfernung des PBS wurde modifizierter RIPA-Lysepuffer (250 - 800 μ l) auf die Zellkulturen gegeben und diese mithilfe eines Zellschabers abgekratzt. Für Zellkultureinsätze (4.9.3) wurde stattdessen eine Pipettenspitze zum Abkratzen verwendet.

Die Probe wurde vollständig in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen darin mithilfe einer Spritze (Kanüle: 0,45 x 2 mm) geschert. Nach der Inkubation der Proben für 30 min auf Eis wurden diese für 10 min bei 13.000*g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt bis zu der Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.11.2 Isolation der Proteine aus dem Zytosol und dem Zellkern

Die Isolation der Proteine aus dem Zytosol, dem löslichen oder dem unlöslichen Bestandteil des Zellkerns wurde nach einem beschriebenen Protokoll durchgeführt (Flässig et al. 2014). Die auf Petrischalen (d= 100 mm) gewachsenen Zellkulturen (4.9.2) wurden auf Eis überführt und zweifach in eisgekühltem PBS (4 ml) gewaschen. Danach wurden die Zellen vorsichtig mithilfe eines Zellschabers in 1 ml frischen PBS abgekratzt. Die Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 1.000*g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl des hypotonen Puffers A vorsichtig in dem Reaktionsgefäß resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach 10 min wurde zur Probe 3 µl 12,5 % NP-40 (Calbiochem) gegeben und diese gemischt, erneut für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 2000*g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieses für 10 min bei 13.000*g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Wiederholung dieses Schrittes wurde der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthielt, bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Pellet von der zuvor genannten Zentrifugation (bei 2000*g) wurde in 300 µl Puffer A resuspendiert und für 10 min bei 2.000*g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Resuspendierung des Pellets in 100 µl Puffer C wurde es für 40 min auf Eis inkubiert, wobei die Probe nach jeweils 10 min für 5 s mit dem Vortex gemischt wurde. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 13.000*g und 4 °C, konnten mit dem Überstand die löslichen Proteine des Zellkerns entnommen werden, welche bei -80 °C gelagert wurden. Das Pellet wurde mit 25 µl Puffer E mit 1 µl Nuklease versetzt und bei 4 °C inkubiert; dabei wurde es nach jeweils 10 min mithilfe einer Pipette resuspendiert. Nach 40 min wurden der Probe 25 µl Puffer E1 hinzugefügt, diese vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000*g und 4 °C. Der Überstand, der die unlöslichen Proteine des Zellkerns enthielt, wurden bei -80 °C gelagert.

4.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.12.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford et al. 1976) wurde für MnCl₂-behandelte Proben (4.10.3) durchgeführt. Dabei interagiert der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 primär über negativ geladene Sulfonsäuren mit den positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen. Zudem interagiert der Farbstoff mit den Proteinen über Van-der-Waals Kräfte. Die daraus resultierende Komplexbildung verschiebt das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm, was zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt werden kann. Dafür wurde Bradford Reagenz (Biorad) auf RT erwärmt und davon 950 µl mit 50 µl verdünnter Probe oder Standard durch invertieren vermischt. Nach der Inkubation für mindestens 5 min bei RT, erfolgte die

Absorptionsbestimmung bei 595 nm (OD_{595}), wovon der Blindwert (Absorption eines Ansatzes ohne Proteine) subtrahiert wurde (ΔOD_{595}). Mindestens zwei Verdünnungen jeder Probe sollten eine ΔOD_{595} innerhalb der zeitgleich ermittelten Standardkurve (0 - 11 $\mu\text{g/ml}$ BSA, Pierce) aufweisen. Jede Messung wurde als Triplikat in einem Photometer (Ultrospec 3100 pro, Biochrom Ltd) durchgeführt. Anhand des Extinktionskoeffizienten ϵ , der durch eine Standardkurve mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt wurde, konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

4.12.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Smith

In der kolorimetrischen Bestimmung der Proteinkonzentration nach Smith (Smith et al. 1985) reagieren unter alkalischen Bedingungen die zweiwertigen Kupferionen mit den Peptidbindungen der Proteine zu einwertigen Kupferionen, die anschließend mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden. Die daraus resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 562 nm wurde zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt. Es wurden 200 μl BCA-Reagenz (Pierce) mit 5 - 10 μl Probe oder Standard versetzt und für 25 - 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT erfolgte die Absorptionsbestimmung bei 562 nm (OD_{562}), wovon der Blindwert (Absorption eines Ansatzes ohne Proteine) subtrahiert wurde (ΔOD_{562}). Die ΔOD_{562} sollte sich innerhalb der zeitgleich ermittelten Standardkurve befinden (0,1 - 2 $\mu\text{g/ml}$ BSA, Pierce). Jede Messung wurde als Triplikat in 96-well Platten mithilfe des Mikroplatten-Reader SpectraMax M5 (Molecular Devices) durchgeführt und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve durch die mitgelieferte Software bestimmt.

4.13 Immunpräzipitation

In der Immunpräzipitation werden spezifische Proteine mithilfe eines Antikörpers aus einem komplexen Proteingemisch isoliert. Der Protein-Antikörperkomplex bindet an Protein A und/oder Protein-G Beads und kann somit präzipitiert und angereichert werden. Nach der Elution von den Beads können beispielsweise Interaktionspartner und posttranslationale Modifikationen des Zielproteins identifiziert werden. Es wurden Zellkulturen, wie unter 4.9.2 beschrieben, auf Petrischalen gezüchtet und die Gesamtproteine isoliert (4.11.1). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (4.12.1, 4.12.2) wurden die Proben eines Experiments so präpariert, dass sie die gleiche Menge an Proteinen (~ 0,5 mg - 1 mg) und das gleiche Volumen RIPA-Lysepuffer (~ 700 μl) enthielten. Anschließend wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Zielprotein hinzugefügt (~ 1 μg Antikörper pro 500 μg Protein) und die Proben über Nacht vertikal rotierend bei 6 rpm (Rotationsschüttler, Windaus) und 4 °C inkubiert.

Die Beads wurden in RIPA-Lysepuffer nach Herstellerangaben äquilibriert, wobei ca. 50 % des Volumens Beads und 50 % Puffer sein sollten. Die Wahl der Beads richtete sich nach dem Antikörper. Für Antikörper aus dem Kaninchen wurden üblicherweise 50 μl Protein A Sepharose Beads (GE Healthcare) und für Antikörper aus der Maus oder Ziege 50 μl Protein G Sepharose Beads (GE Healthcare) verwendet. Die magnetischen Beads (Pierce) waren mit Protein A und G beschichtet, wovon 25 μl pro Probe verwendet wurden. Nach der

Zugabe der Beads wurden die Proben für 1 Stunde vertikal rotierend bei 6 rpm und 4 °C inkubiert. Die Folgeschritte waren von den verwendeten Beads abhängig. Für Protein A oder G Sepharose Beads wurden die Proben für 1 min bei 1.000*g und 4°C zentrifugiert und die Beads anschließend in 600 µl eiskaltem RIPA-Lysepuffer durch achtfaches invertieren resuspendiert. Dieser Vorgang wurde mindestens viermal durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der RIPA-Lysepuffer vollständig entfernt, 25 µl zweifach konzentrierter Laemmli Puffer zu den Beads gegeben und die Proben mit dem Vortex gemischt. Die Proben wurden für 10 min auf 96 °C (DB-3, Techne) erhitzt und dann für 1 min bei 13.000*g zentrifugiert. Die eluierten Immunkomplexe wurden mithilfe von Gelbeladungsspitzen in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

Magnetische Beads wurden stattdessen in einem magnetischen Gestell (New England Biolabs) nach 1 - 2 min von dem RIPA-Lysepuffer getrennt und in 600 µl eiskaltem RIPA-Lysepuffer mittels Schnipsen resuspendiert. Dieser Schritt wurde mindestens viermal durchgeführt. Danach wurde der RIPA-Lysepuffer vollständig entfernt und die Beads für 20 min in 20 µl zweifach konzentriertem Laemmli Puffer bei RT inkubiert. In dem magnetischen Gestell wurden die Proben ohne die Beads in neue Reaktionsgefäße überführt, für 10 min auf 96 °C erhitzt und dann für 1 min bei 13.000*g zentrifugiert. Die eluierten Immunkomplexe wurden in neuen Reaktionsgefäßen bei -80 °C gelagert. Als Kontrolle diente eine Probe mit IgG aus der Spezies, aus dem der spezifische Antikörper stammte.

4.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) werden Hitze-denaturierte Proteine nach ihrer molekularen Masse zwischen 5 - 250 kDa aufgetrennt. Das im Proben- und Laufpuffer enthaltene SDS verleiht den Proteinen eine einheitliche negative Ladung, so dass die Eigenladung der Proteine keine Rolle für die elektrophoretische Trennung spielt. Für die Herstellung eines diskontinuierlichen Gels, das aus einem Trenn- und Sammelgel besteht, wurden folgende Lösungen verwendet.

Tabelle 10: Zusammensetzung eines Trenn- und Sammelgels. Trenngele wurden 10 %ig, 11 %ig oder 12 %ig verwendet.

Komponente	Trenngel 10 %	11 %	12 %	Sammelgel
29 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid	1,67 ml	1,84 ml	2,01 ml	0,25 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	-	0,625 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
H ₂ O _{bidest}	1,97 ml	1,8 ml	1,63 ml	1,58 ml
10 % APS*	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED*	5 µl	5 µl	5 µl	2,5 µl

*: wurden zuletzt hinzugegeben, um die Polymerisation zu initiieren.

Die Polyacrylamidkonzentration beeinflusst die Porengröße und somit die Trennung der Proteine im Gel. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen für das Trenngel (s.o.)

verwendet. Eine höhere Konzentration ist geeignet für die Trennung von Proteinen mit niedrigerer Masse bzw. eine niedrigere Konzentration für Proteine mit höherer Masse.

Zum Gießen des Gels wurden zwei Glasplatten in einer dafür vorgesehenen Gelapparatur justiert. Der Hohlraum zwischen den Platten wurde zu $\frac{3}{4}$ mit der Trenngel-Lösung gefüllt und die Lösung vorsichtig mit 70 % Ethanol überschichtet, um den entstehenden Gelrand zu glätten. Nach 25 min war das Trenngel polymerisiert und das Ethanol wurde entfernt. Der Rest des Hohlrums wurde mit der Sammelgel-Lösung gefüllt, ein Probenkamm eingesteckt und für 25 min stehen gelassen. Das fertige Gel wurde bis zum Probenauftrag bei 4°C gelagert.

Die Proteinkonzentration der Proben eines Experiments wurden angeglichen (4.12.1, 4.12.2) und mit Laemmli Puffer versetzt, mit dem Vortex gemischt und für 5 min auf 96 °C erhitzt. Anschließend wurden 10 - 35 µg Proteine (4.11.1, 4.11.2) oder die vollständigen Immunpräzipitationsproben (4.13) mittels Gelbeladungsspritzen in die Geltaschen überführt.

Die verwendete Proteinmenge der Proben richtete sich nach unterschiedlichen Faktoren von denen die Abundanz des Zielproteins und die Sensitivität des dazugehörigen Antikörpers zu den essentiellen gehörten. Zudem wurde ein Proteinmarker (26617, Thermo Fisher Scientific), der Proteine verschiedener bekannter Größen enthielt, nach Herstellerangaben verwendet. Dies erlaubte die Größenzuordnung immundetektierter Banden (4.15).

Die Proteine wurden in einer Mini Trans-Blot Cell (Biorad) in Tris-Glycin-SDS Laufpuffer zuerst für 30 min bei 90 V unten an der Geltaschen gesammelt und dann für 75 - 90 min bei 120 - 140 V aufgetrennt (PowerPac HC, Biorad). Die Gele mit den getrennten Proteinen wurden zur Western Blot Analyse verwendet (s.u.).

4.15 Western Blot Analyse

In der Western Blot Analyse werden spezifische Proteine oder posttranslationale Modifikationen aus einem komplexen Proteingemisch immunologisch nachgewiesen. Dafür werden die Proteine mittels SDS-PAGE ihrer molekularen Größe nach getrennt und auf eine Membran transferiert. Auf der Membran binden an die Zielproteine spezifische Primärantikörper (Tabelle 3) und an diese Sekundärantikörper mit konjugierter Peroxidase (Tabelle 4). Der Nachweis des Zielproteins erfolgt mithilfe der Peroxidase. Diese induziert nach der Substratzugabe eine Chemilumineszenz Reaktion, was in einem lichtlosen Raum mittels Analysekamera dokumentiert werden kann.

Für den praktischen Ablauf wurde die Tank-Blot-Methode nach Towbin (Towbin et al. 1979) verwendet. Die PVDF Membran wurde kurz in Methanol zur Verringerung der Hydrophobizität und damit besseren Proteinbindung inkubiert und dann wie Whatman-Filterpapier für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde in einer Western-Blot-Kassette eine mehrschichtige Konstruktion gebildet. Auf den beiden Außenseiten befand sich je ein Stoffpolster, gefolgt von je vier Whatman-Filterpapieren die im Inneren die PVDF Membran und das Polyacrylamidgel mit den getrennten Proteinen (4.14) umschlossen. Die Kassette wurde fest verschlossen und mit einem Eisgefäß in eine Biorad Trans-Blot-Cell™ überführt. Der Transfer der negativ geladenen Proteine zur Anode, von dem Gel zu der PVDF Membran, erfolgte für 2 Stunden bei 100V.

Die PVDF Membran wurde anschließend für 5 min in H_2O_{bidest} gewaschen, danach für 1 Stunde in TBST mit 5 % Magermilch inkubiert, was unspezifische Antikörper Bindungen minimiert und dann für 5 min in TBST gewaschen. Diese Schritte erfolgten auf einem Wippschüttler (Doumax 2030, Heidolph) bei ~40 rpm. Die PVDF Membran wurde über Nacht mit dem primären Antikörper (Tabelle 3) bei 10 rpm (Rocker 24, ProBlot™) und 4 °C inkubiert, der danach bis zur Wiederverwendung bei -20 °C aufbewahrt wurde. Nach dem dreimaligen Waschen in TBST für 5 min bei ~40 rpm, wurde die PVDF Membran mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 4) für 1 Stunde und ~40 rpm inkubiert. Es folgten vier Waschritte in TBST für 12 min bei ~40 rpm. Für die Immundetektion wurde die Membran für 3 - 7 min mit ECL Substrat (GE Healthcare) oder dem signalstärkeren HRP Substrat (Millipore) inkubiert und dann die Chemilumineszenz nach 15 s - 7 min im ChemoCam (Intas) bestimmt.

4.16 Stripping von PVDF-Membranen

Das „Stripping“ bezeichnet die Entfernung von primären und sekundären Antikörpern von einer Membran. In dieser Arbeit wurden PVDF Membranen von Western Blot Analysen gestripped und für erneute Immundetektionen verwendet (4.15). Dafür wurde das schonende Assay von Abcam angewendet. Alle folgenden Schritte erfolgten auf einem Wippschüttler (Doumax 2030, Heidolph) bei ~40 rpm. Die PVDF Membran wurde zweimal in stripping Puffer für 10 min inkubiert, dann zweimal in PBS für je 10 min inkubiert und abschließend zweimal in TBST für je 5 min inkubiert. Danach wurde die PVDF Membran, wie unter 4.15 beschrieben, in TBST mit 5 % Magermilch inkubiert, in TBST gewaschen und dann mit dem primären Antikörper inkubiert.

4.17 Herstellung der Proben für die massenspektrometrische Analyse

Mit der massenspektrometrischen Analyse können einzelne Proteine aus einem komplexen Proteingemisch identifiziert werden. Dafür werden die Proteine limitiert proteolytisch verdaut und die resultierenden Peptide ionisiert und in die Gasphase überführt. Verschiedene physikalische Verfahren eignen sich zur Masse/Ladung-abhängigen Auftrennung der Peptidionen. Peptidsequenzen können darüber hinaus durch gezielte Fragmentierung einzelner Peptidprecursoren errechnet werden. Aus der Precursormasse und den jeweiligen Fragmentmassen kann dann das Peptid und das dazugehörige Protein identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode für zwei experimentelle Ansätze verwendet. Zum einen wurden putative Interaktionspartner des $LT\beta R$ aus den Gesamt- (500 μl) bzw. äußeren Membranproteinen (250 μl) von *H. pylori* (4.8 - 4.8.2) identifiziert. Zum anderen wurde mittels relativer Quantifizierung untersucht, ob die Typ IV Sekretionssystemkomponenten CagL bzw. CagY kompetitiv zu $LT\alpha_1\beta_2$ mit dem $LT\beta R$ interagierten (62 μl). CagL und CagY wurden von Dr. Tegtmeyer (Institut für Mikrobiologie, Erlangen) überexprimiert und in gereinigter Form zur Verfügung gestellt.

Alle folgenden Komponenten wurden, soweit notwendig, in PBS gelöst und falls nicht anders angegeben, equimolar (80 - 100 nM) eingesetzt. G-Sepharose Beads (GE Healthcare) wurden in PBS nach Herstellerangaben äquilibriert, wobei ca. 50 % des Volumens Beads

und 50 % PBS sein sollten. Davon wurden 20 µl in ein Reaktionsgefäß überführt, der LTβR hinzugegeben und PBS bis zum Erreichen der genannten Volumina (s.o.) hinzugefügt und das Reaktionsgefäß anschließend für 2 Stunden bei 300 rpm und 7°C in einem Thermomixer (MB-102, BIOER) inkubiert. In dieser Zeit konnten die LTβR-Konstrukte mittels Fc-Region an die Beads binden. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 1000*g und 4 °C zentrifugiert und ein Triplikate aus Proben zur Kontrolle bezüglich der Bindungseffizienz des LTβR analysiert. Dafür wurde die Menge des LTβR im Überstand und an den Beads, die mittels Hamilton Spritze trockengelegt wurden, massenspektrometrisch verglichen. Die Beads der übrigen Proben wurden vorsichtig in PBS resuspendiert und für 1 min bei 1000*g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurden zu den Beads die potentiellen Interaktionspartner hinzugefügt also CagL, CagY, das Gesamtlisat oder die äußeren Membranproteine von *H. pylori* und für 1 Stunde bei 300 rpm und 7°C inkubiert.

Danach wurden die Proben für 1 min bei 1000*g und 4 °C zentrifugiert und ein Triplikate aus Proben zur Kontrolle bezüglich der Bindungseffizienz von CagL bzw. CagY analysiert. Dafür wurde die Menge im Überstand und an den Beads, die mittels Hamilton Spritze trockengelegt wurden, massenspektrometrisch verglichen. Die Beads der übrigen Proben wurden im gleichen Volumen RIPA-Lysepuffer resuspendiert und für 1 min bei 1000*g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden drei weitere Wiederholungen mit PBS anstelle von RIPA-Lysepuffer durchgeführt, wobei die Beads nach jedem Schritt für 5 min auf Eis inkubiert wurden. Abschließend wurden die Beads mithilfe einer Hamilton Spritze trockengelegt und massenspektrometrisch auf Bindepartner analysiert. Alle massenspektrometrischen Analysen (Orbitrap Velos Pro, Thermo Fisher Scientific) wurden von Prof. Kähne (Institut für Experimentelle Innere Medizin) durchgeführt.

Abkürzungen

In dieser Arbeit wurden neben den SI-Einheiten die folgenden Abkürzungen verwendet. Für Proteine wurde die englische Sprache beibehalten. Abkürzungen, die nur einmal verwendet wurden, sind nicht in der Liste enthalten, weil sie im Text definiert wurden.

α	anti
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
A	Alanin
ADAM17	engl.: <i>a disintegrin and metalloprotease 17</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
alpA	engl.: <i>adherence-associated lipoprotein A</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BabA	engl.: <i>blood group antigen binding adhesion</i>
BHI	Hirn-Herz-Infusions-Bouillon (engl.: <i>brain-heart-infusion</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxyterminaler Bereich eines Proteins
ca.	circa
CagA	engl.: <i>cytotoxin-associated gene A</i>
cagPAI	Zytotoxin-assoziierte-Gene-Pathogenitätsinsel (engl.: <i>cytotoxin-associated genes pathogenicity island</i>)
CCL19	engl.: <i>C-C motif chemokine ligand 19</i>
CCL21	engl.: <i>C-C motif chemokine ligand 21</i>
CXCL13	engl.: <i>chemokine C-X-C motif ligand 13</i>
CD40	engl.: <i>cluster of differentiation 40</i>
CDC42	engl.: <i>cell division cycle 42</i>
CEACAM	engl.: <i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
clAP1	engl.: <i>cellular inhibitor of apoptosis protein 1</i>
clAP2	engl.: <i>cellular inhibitor of apoptosis protein 2</i>
d	Durchmesser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <i>Dulbecco's phosphate-</i>

	<i>buffered saline</i>)
E	Glutaminsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	engl.: <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
engl.	englisch
EPIYA	Proteinmotiv: E: Glutaminsäure, P: Prolin, I: Isoleucin, Y: Tyrosin, A: Alanin
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
FC	Antikörper Bestandteil (engl.: <i>crystallisable fragment</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
(x*)g	x-faches der Erdbeschleunigung
G	Glycin
GAPDH	engl.: <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HBP	Heptose-1,7-Bisphosphat
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HofC	engl.: <i>Helicobacter pylori outer membrane protein family C</i>
HomB	engl.: <i>Helicobacter pylori outer membrane B</i>
HopC	engl.: <i>Helicobacter pylori outer membrane protein C</i>
HopD	engl.: <i>Helicobacter pylori outer membrane protein D</i>
HopT	engl.: <i>Helicobacter pylori outer membrane protein T</i>
HopZ	engl.: <i>Helicobacter pylori outer membrane protein Z</i>
HtrA	engl.: <i>high temperature requirement A</i>
I	Isoleucin
I κ B	engl.: <i>inhibitor of κB</i>
IB	Western blot
IgG	Immunglobulin G
IKK α	engl.: <i>IκB kinase α</i>
IKK β	engl.: <i>IκB kinase β</i>
IL-1 β	engl.: <i>interleukin-1β</i>
IL-8	engl.: <i>interleukin-8</i>
IL-R	engl.: <i>interleukin receptor</i>

IL1RN	engl.: <i>interleukin 1 receptor antagonist</i>
ILK	engl.: <i>integrin linked kinase</i>
IFN γ	engl.: <i>interferon γ</i>
IP	Immunpräzipitation
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Leucin
Lat.	lateinisch
LIGHT	engl.: <i>homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes</i>
LT α	engl.: <i>lymphotoxin α</i>
LT β	engl.: <i>lymphotoxin β</i>
LT β R	engl.: <i>lymphotoxin β receptor</i>
LMP1	engl.: <i>latent membrane protein 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl.: <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MAPK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAP3K14	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14</i>
Mbp	Megabasenpaare
MEF	Embryonale Maus-Fibroblasten (engl.: <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MIDAS	Proteinmotiv, engl.: <i>metal ion-dependent adhesion site</i>
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
MW	Molekulargewicht (engl.: <i>molecular weight</i>)
n	Hier: Anzahl der Versuchsobjekte
N-Terminus	aminoterminaler Bereich eines Proteins
NEMO	engl.: <i>NF-κB essential modulator</i>
NF- κ B	engl.: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NIK	engl.: <i>NF-κB inducing kinase</i>
KLS	Kernlokalisierungssignal
NTPase	engl.: <i>nucleoside-triphosphatase</i>
OD	Optische Dichte
OipA	engl.: <i>outer membrane inflammatory protein A</i>

P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>)
qRT-PCR	engl.: <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RGD	Proteinmotiv: R: Arginin, G: Glycin, A: Asparaginsäure
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIPA	Radioimmunpräzipitationsansatz
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
pH	lat.: <i>potentia hydrogenii</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
S	Serin
SabA	engl.: <i>sialic acid binding adhesin A</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecylsulfat</i>)
Ser	Serin
SI	Internationale Einheitensystem (französisch: <i>Système international d'unités</i>)
siRNA	Kurze interferierende RNA (engl.: <i>small interfering RNA</i>)
Src	engl.: <i>cellular sarcoma kinase</i>
T	Threonin
T4SS	Typ 4 Sekretionssystem
TACE	engl.: <i>tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK1	engl.: <i>TGFβ-activated kinase 1</i>
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20 (engl.: <i>tris-buffered saline with Tween 20</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamine
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand (engl.: <i>transepithelial electrical resistance</i>)
Thr	Threonin
TLR	engl.: <i>toll-like receptor</i>
TNF	engl.: <i>tumor necrosis factor</i>
TNFRSF	engl.: <i>TNF receptor superfamily</i>
TRAF2	engl.: <i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAF3	engl.: <i>TNF receptor-associated factor 3</i>
TRAF6	engl.: <i>TNF receptor-associated factor 6</i>
β -TrCP	engl.: <i>β-transducin repeat-containing protein</i>

Tris	Tris(hydroxymethyl)Aminomethan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
V	Volt
VL	Volle Länge
VacA	<i>engl.: vacuolating cytotoxin A</i>
X	<i>Beliebige Aminosäure</i>
Y	<i>Tyrosin</i>

Literaturverzeichnis

- Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, et al. (1997), Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 65:3218-3224.
- Aloisi F, Pujol-Borrell R (2006), Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 6:205-217.
- Amieva MR, El-Omar EM (2008), Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 134:306-323.
- Andrzejewska J, Lee SK, Olbermann P, Lotzing N, Katzowitsch E, Linz B, Achtman M, Kado CI, et al. (2006), Characterization of the pilin ortholog of the Helicobacter pylori type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J Bacteriol* 188:5865-5877.
- Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, et al. (2007), Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12:115-130.
- Aras RA, Fischer W, Perez-Perez GI, Crosatti M, Ando T, Haas R, Blaser MJ (2003), Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med* 198:1349-1360.
- Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, et al. (2000), Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 191:593-602.
- Asangani IA, Harms PW, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, Maher CA, Fullen DR, Johnson TM, et al. (2012), Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma. *Oncotarget* 3:1011-1025.
- Atherton JC (2006), The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 1:63-96.
- Backert S, Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Meyer TF (2001), Phosphorylation of tyrosine 972 of the Helicobacter pylori CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 42:631-644.
- Backert S, Naumann M (2010), What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by Helicobacter pylori. *Trends Microbiol* 18:479-486.
- Backert S, Selbach M (2008), Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis. *Cell Microbiol* 10:1573-1581.
- Backert S, Tegtmeyer N (2017), Type IV Secretion and Signal Transduction of Helicobacter pylori CagA through Interactions with Host Cell Receptors. *Toxins (Basel)* 9.
- Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W (2015), Composition, structure and function of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol* 10:955-965.
- Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M (2010), The versatility of Helicobacter pylori CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* 15:163-176.

Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF (2000), Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2:155-164.

Bäckhed F, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Y, Nilsson C, Seguin D, Normark S, Buchan AM, et al. (2003), Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis* 187:829-836.

Bacon CM, Du MQ, Dogan A (2007), Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: a practical guide for pathologists. *J Clin Pathol* 60:361-372.

Baldwin DN, Shepherd B, Kraemer P, Hall MK, Sycuro LK, Pinto-Santini DM, Salama NR (2007), Identification of *Helicobacter pylori* genes that contribute to stomach colonization. *Infect Immun* 75:1005-1016.

Barden S, Lange S, Tegtmeyer N, Conradi J, Sewald N, Backert S, Niemann HH (2013), A helical RGD motif promoting cell adhesion: crystal structures of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system pilus protein CagL. *Structure* 21:1931-1941.

Barden S, Niemann HH (2015), Adhesion of several cell lines to *Helicobacter pylori* CagL is mediated by integrin α V β 6 via an RGD β LXXL motif. *J Mol Biol* 427:1304-1315.

Barranco SC, Townsend CM, Jr., Casartelli C, Macik BG, Burger NL, Boerwinkle WR, Gourley WK (1983), Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 43:1703-1709.

Barrozo RM, Cooke CL, Hansen LM, Lam AM, Gaddy JA, Johnson EM, Cariaga TA, Suarez G, et al. (2013), Functional plasticity in the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 9:e1003189.

Barrozo RM, Hansen LM, Lam AM, Skoog EC, Martin ME, Cai LP, Lin Y, Latoscha A, et al. (2016), CagY Is an Immune-Sensitive Regulator of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System. *Gastroenterology* 151:1164-1175 e1163.

Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, Miller VL, Virgin HWt (2007), Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 447:326-329.

Bazzoni G, Shih DT, Buck CA, Hemler ME (1995), Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem* 270:25570-25577.

Beckett AC, Loh JT, Chopra A, Leary S, Lin AS, McDonnell WJ, Dixon B, Noto JM, et al. (2018), *Helicobacter pylori* genetic diversification in the Mongolian gerbil model. *PeerJ* 6:e4803.

Belogolova E, Bauer B, Pompaiah M, Asakura H, Brinkman V, Ertl C, Bartfeld S, Nechitaylo TY, et al. (2013), *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cell Microbiol* 15:1896-1912.

Berryman M, Franck Z, Bretscher A (1993), Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* 105 (Pt 4):1025-1043.

Boehm T, Scheu S, Pfeffer K, Bleul CC (2003), Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LT β R. *J Exp Med* 198:757-769.

Bölin I, Norlander L, Wolf-Watz H (1982), Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* 37:506-512.

Bonig T, Olbermann P, Bats SH, Fischer W, Josenhans C (2016), Systematic site-directed mutagenesis of the *Helicobacter pylori* CagL protein of the Cag type IV secretion system identifies novel functional domains. *Sci Rep* 6:38101.

Bonsor DA, Pham KT, Beadenkopf R, Diederichs K, Haas R, Beckett D, Fischer W, Sundberg EJ (2015), Integrin engagement by the helical RGD motif of the *Helicobacter pylori* CagL protein is regulated by pH-induced displacement of a neighboring helix. *J Biol Chem* 290:12929-12940.

Bornschein J, Malfertheiner P (2014), *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Dig Dis* 32:249-264.

Bradford MM (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Broide E, Richter V, Mendlovic S, Shalem T, Eindor-Abarbanel A, Moss SF, Shirin H (2017), Lymphoid follicles in children with *Helicobacter pylori*-negative gastritis. *Clin Exp Gastroenterol* 10:195-201.

Brown KD, Hostager BS, Bishop GA (2001), Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *J Exp Med* 193:943-954.

Burkitt MD, Williams JM, Duckworth CA, O'Hara A, Hanedi A, Varro A, Caamano JH, Pritchard DM (2013), Signaling mediated by the NF-kappaB sub-units NF-kappaB1, NF-kappaB2 and c-Rel differentially regulate *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Oncogene* 32:5563-5573.

Cartwright T, Perkins ND, C LW (2016), NFkB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J* 283:1812-1822.

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A (1996), *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14648-14653.

Chambers MG, Pyburn TM, Gonzalez-Rivera C, Collier SE, Eli I, Yip CK, Takizawa Y, Lacy DB, et al. (2013), Structural analysis of the oligomeric states of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *J Mol Biol* 425:524-535.

Chen ZJ, Parent L, Maniatis T (1996), Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 84:853-862.

Christie PJ, Whitaker N, Gonzalez-Rivera C (2014), Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* 1843:1578-1591.

Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U (2002), BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3:958-965.

Clyne M, Dolan B, Reeves EP (2007), Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 268:135-143.

Cohen S, Achbert-Weiner H, Ciechanover A (2004), Dual effects of I κ B kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing. *Mol Cell Biol* 24:475-486.

Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, et al. (1993), Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5791-5795.

Cover TL (2016), *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *MBio* 7:e01869-01815.

Crew KD, Neugut AI (2006), Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12:354-362.

Croxen MA, Sisson G, Melano R, Hoffman PS (2006), The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol* 188:2656-2665.

da Costa DM, Pereira Edos S, Rabenhorst SH (2015), What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World J Gastroenterol* 21:10563-10572.

Dejardin E (2006), The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 72:1161-1179.

Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, et al. (2002), The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF- κ B pathways. *Immunity* 17:525-535.

Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M (1999), Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284:309-313.

Derudder E, Dejardin E, Pritchard LL, Green DR, Korner M, Baud V (2003), RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem* 278:23278-23284.

Dickinson CD, Veerapandian B, Dai XP, Hamlin RC, Xuong NH, Ruoslahti E, Ely KR (1994), Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *J Mol Biol* 236:1079-1092.

Diesing AK, Nossol C, Faber-Zuschratter H, Zuschratter W, Renner L, Sokolova O, Naumann M, Rothkotter HJ (2013), Rapid interaction of *Helicobacter pylori* with microvilli of the polar human gastric epithelial cell line NCI-N87. *Anat Rec (Hoboken)* 296:1800-1805.

Dorer MS, Fero J, Salama NR (2010), DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 6:e1001026.

Dunn BE, Campbell GP, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1990), Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 265:9464-9469.

Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S (1992), Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 37:123-127.

Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, Keller H, Morelli G, Gressmann H, et al. (2006), Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genet* 2:e120.

- Evans DJ, Jr., Evans DG, Kirkpatrick SS, Graham DY (1991), Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits. *Microb Pathog* 10:15-26.
- Fang X, Wei J, He X, An P, Wang H, Jiang L, Shao D, Liang H, et al. (2015), Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer* 51:2820-2832.
- Feige MH (b), Sokolova O, Pickenhahn A, Maubach G, Naumann M (2018), HopQ impacts the integrin alpha5beta1-independent NF-kappaB activation by *Helicobacter pylori* in CEACAM expressing cells. *Int J Med Microbiol* 308:527-533.
- Feige MH (a), Vieth M, Sokolova O, Tager C, Naumann M (2018), *Helicobacter pylori* induces direct activation of the lymphotoxin beta receptor and non-canonical nuclear factor-kappa B signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865:545-550.
- Fernandes MT, Dejardin E, dos Santos NR (2016), Context-dependent roles for lymphotoxin-beta receptor signaling in cancer development. *Biochim Biophys Acta* 1865:204-219.
- Fiorini E, Schmitz I, Marissen WE, Osborn SL, Touma M, Sasada T, Reche PA, Tibaldi EV, et al. (2002), Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell* 9:637-648.
- Fischer W (2011), Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *FEBS J* 278:1203-1212.
- Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R (2001), Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 42:1337-1348.
- Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, Hoffmann R, Zimmer R, Haas R (2010), Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res* 38:6089-6101.
- Flassig RJ, Maubach G, Tager C, Sundmacher K, Naumann M (2014), Experimental design, validation and computational modeling uncover DNA damage sensing by DNA-PK and ATM. *Mol Biosyst* 10:1978-1986.
- Forst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumann M (2004), Curcumin blocks NF-kappaB and the mitogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316:1065-1072.
- Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB, Neish AS, Collier-Hyams L, et al. (2005), Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10646-10651.
- Frick-Cheng AE, Pyburn TM, Voss BJ, McDonald WH, Ohi MD, Cover TL (2016), Molecular and Structural Analysis of the *Helicobacter pylori* cag Type IV Secretion System Core Complex. *MBio* 7:e02001-02015.
- Futterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K (1998), The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9:59-70.
- Galamb O, Gyorffy B, Sipos F, Dinya E, Krenacs T, Berczi L, Szoke D, Spisak S, et al. (2008), *Helicobacter pylori* and antrum erosion-specific gene expression patterns: the discriminative role of CXCL13 and VCAM1 transcripts. *Helicobacter* 13:112-126.

Gall A, Gaudet RG, Gray-Owen SD, Salama NR (2017), TIFA Signaling in Gastric Epithelial Cells Initiates the cag Type 4 Secretion System-Dependent Innate Immune Response to *Helicobacter pylori* Infection. *MBio* 8.

Ganchi PA, Sun SC, Greene WC, Ballard DW (1992), I kappa B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF-kappa B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF-kappa B p65 DNA binding. *Mol Biol Cell* 3:1339-1352.

Ganef C, Remouchamps C, Boutaffala L, Benezech C, Galopin G, Vandepaer S, Bouillenne F, Ormenese S, et al. (2011), Induction of the alternative NF-kappaB pathway by lymphotoxin alphabeta (LTalphabeta) relies on internalization of LTbeta receptor. *Mol Cell Biol* 31:4319-4334.

Gardam S, Sierro F, Basten A, Mackay F, Brink R (2008), TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity* 28:391-401.

Geis G, Leying H, Suerbaum S, Mai U, Opferkuch W (1989), Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J Clin Microbiol* 27:436-441.

Gey GC (1952), Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12: 264-265.

Gilmore TD (2006), Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.

Gorrell RJ, Zwickel N, Reynolds J, Bulach D, Kwok T (2016), *Helicobacter pylori* CagL Hypervariable Motif: A Global Analysis of Geographical Diversity and Association With Gastric Cancer. *J Infect Dis* 213:1927-1931.

Goth SR, Stephens RS (2001), Rapid, transient phosphatidylserine externalization induced in host cells by infection with *Chlamydia* spp. *Infect Immun* 69:1109-1119.

Gray CM, McCorkell KA, Chunduru SK, McKinlay MA, May MJ (2014), Negative feedback regulation of NF-kappaB-inducing kinase is proteasome-dependent but does not require cellular inhibitors of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 450:341-346.

Grohmann E, Christie PJ, Waksman G, Backert S (2018), Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 107:455-471.

Group IW (1994), Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 61:1-241.

Haas R, Meyer TF, van Putten JP (1993), Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol* 8:753-760.

Haybäck J, Zeller N, Wolf MJ, Weber A, Wagner U, Kurrer MO, Bremer J, Iezzi G, et al. (2009), A lymphotoxin-driven pathway to hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 16:295-308.

Hayden MS, Ghosh S (2012), NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26:203-234.

Hayden MS, Ghosh S (2014), Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin Immunol* 26:253-266.

He JQ, Saha SK, Kang JR, Zarnegar B, Cheng G (2007), Specificity of TRAF3 in its negative regulation of the noncanonical NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 282:3688-3694.

Henihan RD, Stuart RC, Nolan N, Gorey TF, Hennessy TP, O'Morain CA (1998), Barrett's esophagus and the presence of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 93:542-546.

Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JL, Sobala G, Rathbone BJ, Axon AT, Dixon MF (1990), Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* 31:134-138.

Hirata Y, Ohmae T, Shibata W, Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kawabe T, Omata M (2006), MyD88 and TNF receptor-associated factor 6 are critical signal transducers in *Helicobacter pylori*-infected human epithelial cells. *J Immunol* 176:3796-3803.

Hirota T, Lee PY, Kuwata H, Yamamoto M, Matsumoto M, Kawase I, Akira S, Takeda K (2005), The nuclear I-kappaB protein I-kappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol* 174:3650-3657.

Hobb RI, Fields JA, Burns CM, Thompson SA (2009), Evaluation of procedures for outer membrane isolation from *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 155:979-988.

Hofman VJ, Moreilhon C, Brest PD, Lassalle S, Le Brigand K, Sicard D, Raymond J, Lamarque D, et al. (2007), Gene expression profiling in human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Mod Pathol* 20:974-989.

Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, et al. (2017), Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 153:420-429.

Hoy B, Lower M, Weydig C, Carra G, Tegtmeyer N, Geppert T, Schroder P, Sewald N, et al. (2010), *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep* 11:798-804.

Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH (1998), Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 114:1169-1179.

Hynes RO (2002), Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.

Israel DA, Lou AS, Blaser MJ (2000), Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol Lett* 186:275-280.

Javaheri A, Kruse T, Moonens K, Mejias-Luque R, Debraekeleer A, Asche CI, Tegtmeyer N, Kalali B, et al. (2016), *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol* 2:16189.

Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, Ertl C, Weiss E, Kapp U, Rohde M, Pirch T, et al. (2009), *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog* 5:e1000684.

Jin HR, Jin X, Lee JJ (2010), Zinc-finger protein 91 plays a key role in LIGHT-induced activation of non-canonical NF-kappaB pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 400:581-586.

Kajiura F, Sun S, Nomura T, Izumi K, Ueno T, Bando Y, Kuroda N, Han H, et al. (2004), NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol* 172:2067-2075.

- Karin M (2009), NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000141.
- Kavermann H, Burns BP, Angermuller K, Odenbreit S, Fischer W, Melchers K, Haas R (2003), Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* 197:813-822.
- Kawai M, Furuta Y, Yahara K, Tsuru T, Oshima K, Handa N, Takahashi N, Yoshida M, et al. (2011), Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol* 11:104.
- Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, et al. (2007), Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12:131-144.
- Kenis H, van Genderen H, Bennaghmouch A, Rinia HA, Frederik P, Narula J, Hofstra L, Reutelingsperger CP (2004), Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry. *J Biol Chem* 279:52623-52629.
- Kim C, Ye F, Ginsberg MH (2011), Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:321-345.
- Koelblen T, Berge C, Cherrier MV, Brillet K, Jimenez-Soto L, Ballut L, Takagi J, Montserret R, et al. (2017), Molecular dissection of protein-protein interactions between integrin alpha5beta1 and the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system. *FEBS J* 284:4143-4157.
- Königer V, Holsten L, Harrison U, Busch B, Loell E, Zhao Q, Bonsor DA, Roth A, et al. (2016), *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat Microbiol* 2:16188.
- Krueger U, Bergauer T, Kaufmann B, Wolter I, Pilk S, Heider-Fabian M, Kirch S, Artz-Oppitz C, et al. (2007), Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* 17:237-250.
- Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, Misselwitz R, Berger J, et al. (2007), *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449:862-866.
- Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Lee JH, Jang JS, Kim MC, Kim KH, et al. (2012), Clinicopathologic significance of expression of nuclear factor-kappaB RelA and its target gene products in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 18:4744-4750.
- Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larsen JC, Szymanski C, Guerry P (2004), N-linked protein glycosylation is required for full competence in *Campylobacter jejuni* 81-176. *J Bacteriol* 186:6508-6514.
- Lee JL, Streuli CH (2014), Integrins and epithelial cell polarity. *J Cell Sci* 127:3217-3225.
- Lee S, Challa-Malladi M, Bratton SB, Wright CW (2014), Nuclear factor-kappaB-inducing kinase (NIK) contains an amino-terminal inhibitor of apoptosis (IAP)-binding motif (IBM) that potentiates NIK degradation by cellular IAP1 (c-IAP1). *J Biol Chem* 289:30680-30689.

- Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1998), B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* 187:655-660.
- Lenter M, Uhlig H, Hamann A, Jenö P, Imhof B, Vestweber D (1993), A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9051-9055.
- Lepper PM, Triantafyllou M, Schumann C, Schneider EM, Triantafyllou K (2005), Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol* 7:519-528.
- Li Y, Wang H, Zhou X, Xie X, Chen X, Jie Z, Zou Q, Hu H, et al. (2016), Cell intrinsic role of NF-kappaB-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses. *Sci Rep* 6:22115.
- Liang C, Zhang M, Sun SC (2006), beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell Signal* 18:1309-1317.
- Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC (2004), Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* 279:26243-26250.
- Lina TT, Alzahrani S, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE (2014), Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 20:12753-12766.
- Ling L, Cao Z, Goeddel DV (1998), NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3792-3797.
- Loh JT, Torres VJ, Cover TL (2007), Regulation of *Helicobacter pylori* cagA expression in response to salt. *Cancer Res* 67:4709-4715.
- Lombardi L, Ciana P, Cappellini C, Trecca D, Guerrini L, Migliazza A, Maiolo AT, Neri A (1995), Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. *Nucleic Acids Res* 23:2328-2336.
- Lower M, Weydig C, Metzler D, Reuter A, Starzinski-Powitz A, Wessler S, Schneider G (2008), Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA. *PLoS One* 3:e3510.
- Luftig M, Yasui T, Soni V, Kang MS, Jacobson N, Cahir-McFarland E, Seed B, Kieff E (2004), Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:141-146.
- Ma D, Lu H, Qu Y, Fu W, Ma Z (2015), Developing an effective therapeutic by delivery of synthetic microRNA-520e in lung cancer treatment. *Biomed Pharmacother* 69:249-254.
- Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Mitsuno Y, Hirata Y, Yamaji Y, Akanuma M, Shiratori Y, et al. (2000), *H. pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology* 119:97-108.
- Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE (2009), Peptic ulcer disease. *Lancet* 374:1449-1461.
- Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ (1985), Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 142:436-439.

Marshall BJ, Warren JR (1984), Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311-1315.

Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS, Gorbalenya AE, Lo SY, et al. (1997), Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 71:1301-1309.

Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Scharli P, Laissue JA, Baggiolini M, Ugucioni M (1999), BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest* 104:R49-54.

McClain MS, Beckett AC, Cover TL (2017), *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins (Basel)* 9.

McGee DJ, Radcliff FJ, Mendz GL, Ferrero RL, Mobley HL (1999), *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J Bacteriol* 181:7314-7322.

McGuire S (2016), World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr* 7:418-419.

Mejias-Luque R, Zoller J, Anderl F, Loew-Gil E, Vieth M, Adler T, Engler DB, Urban S, et al. (2017), Lymphotoxin beta receptor signalling executes *Helicobacter pylori*-driven gastric inflammation in a T4SS-dependent manner. *Gut* 66:1369-1381.

Mitchell H, Megraud F (2002), Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 7 Suppl 1:8-16.

Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlebusch CM, Bernhoft S, Hale J, et al. (2012), Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog* 8:e1002693.

Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E (1995), The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80:389-399.

Moss SF (2017), The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3:183-191.

Motoyama T, Hojo H, Watanabe H (1986), Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol Jpn* 36:65-83.

Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Hayashi T, Higashi H, Hatakeyama M (2010), *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe* 7:399-411.

Naumann M, Sokolova O, Tegtmeyer N, Backert S (2017), *Helicobacter pylori*: A Paradigm Pathogen for Subverting Host Cell Signal Transmission. *Trends Microbiol* 25:316-328.

Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, Ricci V, Solcia E (2007), Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 132:1009-1023.

Neumann M, Naumann M (2007), Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J* 21:2642-2654.

Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, et al. (1999), Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 189:403-412.

Nishina T, Yamaguchi N, Gohda J, Semba K, Inoue J (2009), NIK is involved in constitutive activation of the alternative NF-kappaB pathway and proliferation of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 388:96-101.

Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R (2000), Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287:1497-1500.

Odqvist L, Sanchez-Beato M, Montes-Moreno S, Martin-Sanchez E, Pajares R, Sanchez-Verde L, Ortiz-Romero PL, Rodriguez J, et al. (2013), NIK controls classical and alternative NF-kappaB activation and is necessary for the survival of human T-cell lymphoma cells. *Clin Cancer Res* 19:2319-2330.

Oeckinghaus A, Ghosh S (2009), The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000034.

Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, Yoshida H, Shiratori Y, et al. (2000), Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* 192:1601-1610.

Ohmae T, Hirata Y, Maeda S, Shibata W, Yanai A, Ogura K, Yoshida H, Kawabe T, et al. (2005), *Helicobacter pylori* activates NF-kappaB via the alternative pathway in B lymphocytes. *J Immunol* 175:7162-7169.

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

Ooi CH, Ivanova T, Wu J, Lee M, Tan IB, Tao J, Ward L, Koo JH, et al. (2009), Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet* 5:e1000676.

Otto C, Giefing M, Massow A, Vater I, Gesk S, Schlesner M, Richter J, Klapper W, et al. (2012), Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 157:702-708.

Pachathundikandi SK, Tegtmeyer N, Backert S (2013), Signal transduction of *Helicobacter pylori* during interaction with host cell protein receptors of epithelial and immune cells. *Gut Microbes* 4:454-474.

Palframan SL, Kwok T, Gabriel K (2012), Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2:92.

Park JG, Frucht H, LaRocca RV, Bliss DP, Jr., Kurita Y, Chen TR, Henslee JG, Trepel JB, et al. (1990), Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res* 50:2773-2780.

Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T (1999), Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* 282:2240-2245.

Parsons BN, Ijaz UZ, D'Amore R, Burkitt MD, Eccles R, Lenzi L, Duckworth CA, Moore AR, et al. (2017), Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising

as a result of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis, autoimmune atrophic gastritis and proton pump inhibitor use. *PLoS Pathog* 13:e1006653.

Perry S, de la Luz Sanchez M, Yang S, Haggerty TD, Hurst P, Perez-Perez G, Parsonnet J (2006), Gastroenteritis and transmission of *Helicobacter pylori* infection in households. *Emerg Infect Dis* 12:1701-1708.

Pham KT, Weiss E, Jimenez Soto LF, Breithaupt U, Haas R, Fischer W (2012), Cagl is an essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system and forms a complex with CagL. *PLoS One* 7:e35341.

Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA (2014), Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 14:447-462.

Posselt G, Backert S, Wessler S (2013), The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal* 11:77.

Qing G, Qu Z, Xiao G (2005), Regulation of NF-kappa B2 p100 processing by its cis-acting domain. *J Biol Chem* 280:18-27.

Racusen LC, Monteil C, Sgrignoli A, Lucskay M, Marouillat S, Rhim JG, Morin JP (1997), Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. *J Lab Clin Med* 129:318-329.

Rao P, Hayden MS, Long M, Scott ML, West AP, Zhang D, Oeckinghaus A, Lynch C, et al. (2010), IkkappaBbeta acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. *Nature* 466:1115-1119.

Razani B, Reichardt AD, Cheng G (2011), Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev* 244:44-54.

Remmele W, Stegner HE (1987), [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 8:138-140.

Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R (2003), A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol* 49:219-234.

Rolig AS, Shanks J, Carter JE, Ottemann KM (2012), *Helicobacter pylori* requires TlpD-driven chemotaxis to proliferate in the antrum. *Infect Immun* 80:3713-3720.

Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D, Rasi S, Vaisitti T, Agostinelli C, Spina V, Brusca A, et al. (2011), Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 118:4930-4934.

Rowe AM, Murray SE, Raue HP, Koguchi Y, Slifka MK, Parker DC (2013), A cell-intrinsic requirement for NF-kappaB-inducing kinase in CD4 and CD8 T cell memory. *J Immunol* 191:3663-3672.

Ruiz-Bustos E, Ochoa JL, Wadstrom T, Ascencio F (2001), Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. *J Med Microbiol* 50:215-222.

Saha A, Backert S, Hammond CE, Goos M, Smolka AJ (2010), *Helicobacter pylori* CagL activates ADAM17 to induce repression of the gastric H, K-ATPase alpha subunit. *Gastroenterology* 139:239-248.

Sainsus N, Cattori V, Lepadatu C, Hofmann-Lehmann R (2008), Liquid culture medium for the rapid cultivation of *Helicobacter pylori* from biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:1209-1217.

Saitoh Y, Martinez Bruyn VJ, Uota S, Hasegawa A, Yamamoto N, Imoto I, Inazawa J, Yamaoka S (2010), Overexpression of NF-kappaB inducing kinase underlies constitutive NF-kappaB activation in lung cancer cells. *Lung Cancer* 70:263-270.

Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn VJ, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, et al. (2008), Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood* 111:5118-5129.

Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, et al. (2001), Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 7:4136-4142.

Satou K, Shiroma A, Teruya K, Shimoji M, Nakano K, Juan A, Tamotsu H, Terabayashi Y, et al. (2014), Complete Genome Sequences of Eight *Helicobacter pylori* Strains with Different Virulence Factor Genotypes and Methylation Profiles, Isolated from Patients with Diverse Gastrointestinal Diseases on Okinawa Island, Japan, Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. *Genome Announc* 2.

Schindele F, Weiss E, Haas R, Fischer W (2016), Quantitative analysis of CagA type IV secretion by *Helicobacter pylori* reveals substrate recognition and translocation requirements. *Mol Microbiol* 100:188-203.

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

Schneider K, Potter KG, Ware CF (2004), Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol Rev* 202:49-66.

Schreiber S, Bucker R, Groll C, Azevedo-Vethacke M, Garten D, Scheid P, Friedrich S, Gattermann S, et al. (2005), Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect Immun* 73:1584-1589.

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

Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, Owen RJ, Graham DY, van der Merwe S, et al. (2008), Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 4:e1000180.

Schweitzer K, Sokolova O, Bozko PM, Naumann M (2010), *Helicobacter pylori* induces NF-kappaB independent of CagA. *EMBO Rep* 11:10-11; author reply 11-12.

Sewald X, Haas R (2009), Das multifunktionelle Toxin VacA von *Helicobacter pylori*. *Biospektrum* 2: 152-155.

Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S (2002), Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 277:6775-6778.

Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S (2003), The Helicobacter pylori CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* 22:515-528.

Sen R, Baltimore D (1986), Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, et al. (2001), Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293:1495-1499.

Siddiqui ST, Naz E, Danish F, Mirza T, Aziz S, Ali A (2011), Frequency of Helicobacter pylori in biopsy proven gastritis and its association with lymphoid follicle formation. *J Pak Med Assoc* 61:138-141.

Siman JH, Forsgren A, Berglund G, Floren CH (2001), Tobacco smoking increases the risk for gastric adenocarcinoma among Helicobacter pylori-infected individuals. *Scand J Gastroenterol* 36:208-213.

Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H (1997), Identification and characterization of an aliphatic amidase in Helicobacter pylori. *Mol Microbiol* 25:989-998.

Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H (2001), The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of Helicobacter pylori: natural evolution of two enzyme paralogues. *Mol Microbiol* 40:596-609.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, et al. (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.

Sokolova O, Borgmann M, Rieke C, Schweitzer K, Rothkotter HJ, Naumann M (2013), Helicobacter pylori induces type 4 secretion system-dependent, but CagA-independent activation of IkkappaBs and NF-kappaB/RelA at early time points. *Int J Med Microbiol* 303:548-552.

Sokolova O, Maubach G, Naumann M (2014), MEKK3 and TAK1 synergize to activate IKK complex in Helicobacter pylori infection. *Biochim Biophys Acta* 1843:715-724.

Sokolova O, Naumann M (2017), NF-kappaB Signaling in Gastric Cancer. *Toxins (Basel)* 9.

Springer TA, Dustin ML (2012), Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol* 24:107-115.

Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A (2002), c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 43:971-980.

Stein M, Rappuoli R, Covacci A (2000), Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1263-1268.

Stein SC, Faber E, Bats SH, Murillo T, Speidel Y, Coombs N, Josenhans C (2017), Helicobacter pylori modulates host cell responses by CagT4SS-dependent translocation of

an intermediate metabolite of LPS inner core heptose biosynthesis. *PLoS Pathog* 13:e1006514.

Stingl K, Uhlemann EM, Deckers-Hebestreit G, Schmid R, Bakker EP, Altendorf K (2001), Prolonged survival and cytoplasmic pH homeostasis of *Helicobacter pylori* at pH 1. *Infect Immun* 69:1178-1180.

Stolte M, Eidt S (1989), Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*? *J Clin Pathol* 42:1269-1271.

Studencka-Turski M, Maubach G, Feige MH, Naumann M (2018), Constitutive activation of nuclear factor kappa B-inducing kinase counteracts apoptosis in cells with rearranged mixed lineage leukemia gene. *Leukemia*.

Sudhamsu J, Yin J, Chiang EY, Starovasnik MA, Grogan JL, Hymowitz SG (2013), Dimerization of LTbetaR by LTalpha1beta2 is necessary and sufficient for signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:19896-19901.

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

Sun SC (2011), Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 21:71-85.

Sun SC (2012), The noncanonical NF-kappaB pathway. *Immunol Rev* 246:125-140.

Sun SC (2017), The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 17:545-558.

Sun SC, Cesarman E (2011), NF-kappaB as a target for oncogenic viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 349:197-244.

Tafreshi M, Zwickel N, Gorrell RJ, Kwok T (2015), Preservation of *Helicobacter pylori* CagA Translocation and Host Cell Proinflammatory Responses in the Face of CagL Hypervariability at Amino Acid Residues 58/59. *PLoS One* 10:e0133531.

Takagi J, Springer TA (2002), Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* 186:141-163.

Tegtmeyer N, Backert S (2011), Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Eur J Cell Biol* 90:880-890.

Tegtmeyer N, Hartig R, Delahay RM, Rohde M, Brandt S, Conradi J, Takahashi S, Smolka AJ, et al. (2010), A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation. *J Biol Chem* 285:23515-23526.

Tegtmeyer N, Lind J, Schmid B, Backert S (2014), *Helicobacter pylori* CagL Y58/E59 mutation turns-off type IV secretion-dependent delivery of CagA into host cells. *PLoS One* 9:e97782.

Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S (2011), Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J* 278:1190-1202.

Tettelin H, Riley D, Cattuto C, Medini D (2008), Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol* 11:472-477.

Thompson LJ, Merrell DS, Neilan BA, Mitchell H, Lee A, Falkow S (2003), Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun* 71:2643-2655.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, et al. (1997), The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.

Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ (1993), Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 61:1799-1809.

Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, et al. (2001), *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345:784-789.

Utsch C, Haas R (2016), VacA's Induction of VacA-Containing Vacuoles (VCVs) and Their Immunomodulatory Activities on Human T Cells. *Toxins (Basel)* 8.

Vallabhapurapu S, Karin M (2009), Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27:693-733.

Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, et al. (2008), Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9:1364-1370.

van de Pavert SA, Mebius RE (2010), New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 10:664-674.

Varbanova M, Frauenschlager K, Malfertheiner P (2014), Chronic gastritis - an update. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28:1031-1042.

Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, Zobel K, Dynek JN, et al. (2007), IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131:669-681.

Venerito M, Vasapolli R, Rokkas T, Delchier JC, Malfertheiner P (2017), *Helicobacter pylori*, gastric cancer and other gastrointestinal malignancies. *Helicobacter* 22 Suppl 1.

Wallach D, Kovalenko A (2008), Self-termination of the terminator. *Nat Immunol* 9:1325-1327.

Wang G, Ge Z, Rasko DA, Taylor DE (2000), Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. *Mol Microbiol* 36:1187-1196.

Warren JR, Marshall B (1983), Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1:1273-1275.

Wessler S, Backert S (2008), Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 16:397-405.

Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A (1997), I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J* 16:1413-1426.

Wiedemann T, Hofbauer S, Tegtmeyer N, Huber S, Sewald N, Wessler S, Backert S, Rieder G (2012), *Helicobacter pylori* CagL dependent induction of gastrin expression via a novel $\alpha 5$ -integrin-integrin linked kinase signalling complex. *Gut* 61:986-996.

Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, Ziegler E, Butzmann L, et al. (2014), Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* 509:582-587.

Winter S, Loddenkemper C, Aebischer A, Rabel K, Hoffmann K, Meyer TF, Lipp M, Hopken UE (2010), The chemokine receptor CXCR5 is pivotal for ectopic mucosa-associated lymphoid tissue neogenesis in chronic *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *J Mol Med (Berl)* 88:1169-1180.

Wood MB, Rios D, Williams IR (2016), TNF- α augments RANKL-dependent intestinal M cell differentiation in enteroid cultures. *Am J Physiol Cell Physiol* 311:C498-507.

Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT (2010), *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* 23:713-739.

Wyatt JI, Rathbone BJ, Sobala GM, Shallcross T, Heatley RV, Axon AT, Dixon MF (1990), Gastric epithelium in the duodenum: its association with *Helicobacter pylori* and inflammation. *J Clin Pathol* 43:981-986.

Xiao G, Fong A, Sun SC (2004), Induction of p100 processing by NF- κ B-inducing kinase involves docking I κ B kinase α (IKK α) to p100 and IKK α -mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279:30099-30105.

Xiao G, Harhaj EW, Sun SC (2001), NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol Cell* 7:401-409.

Xie P, Stunz LL, Larison KD, Yang B, Bishop GA (2007), Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs. *Immunity* 27:253-267.

Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, et al. (2012), Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 21:121-135.

Yamanaka N, Sasaki N, Tasaki A, Nakashima H, Kubo M, Morisaki T, Noshiro H, Yao T, et al. (2004), Nuclear factor- κ B p65 is a prognostic indicator in gastric carcinoma. *Anticancer Res* 24:1071-1075.

Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, et al. (1998), Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* 93:1231-1240.

Yu J, Zhou X, Nakaya M, Jin W, Cheng X, Sun SC (2014), T cell-intrinsic function of the noncanonical NF- κ B pathway in the regulation of GM-CSF expression and experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *J Immunol* 193:422-430.

Yu Y, Ge N, Xie M, Sun W, Burlingame S, Pass AK, Nuchtern JG, Zhang D, et al. (2008), Phosphorylation of Thr-178 and Thr-184 in the TAK1 T-loop is required for interleukin (IL)-1-mediated optimal NF κ B and AP-1 activation as well as IL-6 gene expression. *J Biol Chem* 283:24497-24505.

Zaitoun AM (1995), The prevalence of lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* associated gastritis in patients with ulcers and non-ulcer dyspepsia. *J Clin Pathol* 48:325-329.

Zanotti G, Cendron L (2014), Structural and functional aspects of the Helicobacter pylori secretome. World J Gastroenterol 20:1402-1423.

Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, et al. (2008), Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. Nat Immunol 9:1371-1378.

Zhang S, Shan C, Kong G, Du Y, Ye L, Zhang X (2012), MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF-kappaB-inducing kinase (NIK). Oncogene 31:3607-3620.

Zhao Z, Hou X, Yin X, Li Y, Duan R, Boyce BF, Yao Z (2015), TNF Induction of NF-kappaB RelB Enhances RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Promoting Inflammatory Macrophage Differentiation but also Limits It through Suppression of NFATc1 Expression. PLoS One 10:e0135728.

Zhou P, She Y, Dong N, Li P, He H, Borio A, Wu Q, Lu S, et al. (2018), Alpha-kinase 1 is a cytosolic innate immune receptor for bacterial ADP-heptose. Nature 561:122-126.

Zimmermann S, Pfannkuch L, Al-Zeer MA, Bartfeld S, Koch M, Liu J, Rechner C, Soerensen M, et al. (2017), ALPK1- and TIFA-Dependent Innate Immune Response Triggered by the Helicobacter pylori Type IV Secretion System. Cell Rep 20:2384-2395.

Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchlich Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift