

Molekulare Funktion von Cortactin in der Signaltransduktion und Pathogenese von gastrischen Epithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

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

von Diplom-Biologin Nicole Tegtmeyer
geb. am 16.12.1976 in Berlin

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Steffen Backert
Prof. Dr. med. Uwe Groß

eingereicht am: 25.11.2008

verteidigt am: 26.03.2009

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Rolle des Aktin-Zytoskeletts in der Eukaryontenzelle.....	1
1.2 Aktindynamik und „Tretmühlen“-Verhalten	2
1.3 Regulation der Aktindynamik durch Aktin-bindende Proteine.....	3
1.3.1 Thymosin- β 4 und Profilin.....	4
1.3.2 Tropomyosin und Cofilin.....	6
1.3.3 CapZ und Tropomodulin.....	6
1.3.4 Fimbrin, α -Aktinin und Villin	7
1.3.5 Filamin und Spektrin.....	8
1.3.6 Gelsolin.....	9
1.3.7 Arp2/3-Komplex, Formine, Spir und Cobl	9
1.4 Zentrale Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts	12
1.4.1 Regulation der Aktindynamik durch Rho-GTPasen	12
1.4.2 Die Familie der WASP/WAVE-Proteine.....	13
1.4.3 Ena/VASP-Proteine	14
1.4.4 Cortactin.....	15
1.5 Struktur und zelluläre Funktion von Cortactin	16
1.5.1 Bindungspartner von Cortactin	21
1.5.2 Rolle von Cortactin in mikrobiellen Infektionen	24
2 ZIELSETZUNG.....	29
3 MATERIAL	30
3.1 Bakterienstämme	30
3.1.1 <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme.....	30
3.1.2 <i>Escherichia coli</i> -Stamm.....	30
3.2 Zellkultur	30
3.3 Nährmedien und Platten.....	31
3.4 Chemikalien.....	31
3.5 Enzyme und Proteine.....	31
3.6 Antikörper.....	32
3.7 Größenstandards	33
3.8 Oligonukleotide	34
3.9 Plasmide.....	34

4	METHODEN.....	37
4.1	Molekularbiologische Methoden	37
4.1.1	Verdau von DNS mit Restriktionsendonukleasen.....	37
4.1.2	Ortsspezifische <i>in vitro</i> -Mutagenese mittels PCR.....	37
4.1.3	Klenow-Reaktion	38
4.1.4	Ligation von DNS-Fragmenten.....	38
4.1.5	Isolierung von Plasmid-DNS	38
4.1.6	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNS	39
4.1.7	DNS-Extraktion aus dem Agarosegel	39
4.1.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	39
4.1.9	DNS-Sequenzierung	40
4.2	Proteinbiochemische Methoden.....	40
4.2.1	Herstellung polyklonaler Antikörper	40
4.2.2	Immunopräzipitation.....	40
4.2.3	Rac1-Aktivierungs-Assay.....	41
4.2.4	Zelluläre Fraktionierung	41
4.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
4.2.6	Coomassie-Färbung	43
4.2.7	Westernblot.....	43
4.3	Mikrobiologische Methoden.....	45
4.3.1	Kultivierung von <i>Helicobacter pylori</i>	45
4.3.2	Infektionen mit <i>Helicobacter pylori</i>	45
4.3.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	46
4.3.4	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	46
4.4	Zellbiologische Methoden	47
4.4.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen.....	47
4.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	47
4.4.3	Transiente Transfektion von Plasmid-DNS	48
4.4.4	Transiente Transfektion von siRNS	48
4.4.5	Wundheilungs-Assay.....	49
4.5	Mikroskopische Methoden	49
4.5.1	Phasenkontrasmikroskopie.....	49
4.5.2	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	49
4.5.3	Fluoreszenzmikroskopie	50
4.6	Computergestützte Analysen	51
4.6.1	Statistik	51
5	ERGEBNISSE.....	52
5.1	Bedeutung von Cortactin für die Infektion mit <i>H. pylori</i>	52

5.1.1	<i>Knockdown</i> von Cortactin mittels siRNS.....	53
5.1.2	Aktivierungsstatus der Kinasen von Cortactin in der Infektion mit <i>H. pylori</i>	54
5.2	Herstellung von Cortactin-Mutanten und deren Funktion in der Infektion.....	56
5.2.1	Mutagenese von Cortactin-GFP Konstrukten	56
5.2.2	Rolle von Cortactin für die Ausbildung des Elongationsphänotyps.....	57
5.3	Subzelluläre Lokalisation von Cortactin während der Infektion mit <i>H. pylori</i>	59
5.3.1	Subzelluläre Lokalisation von Tyrosin-phosphoryliertem Cortactin	59
5.3.2	Subzelluläre Lokalisation von Serin-phosphoryliertem Cortactin	62
5.4	Bindungspartner von Cortactin nach Infektion mit <i>H. pylori</i>	63
5.5	Identifizierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) als neuen Interaktionspartner von Cortactin.....	64
5.5.1	FAK bindet an Cortactin während der der Infektion mit <i>H. pylori</i>	64
5.5.2	FAK ist essentiell für die Ausbildung des Elongationsphänotyps	66
5.5.3	Die SH3-Domäne von Cortactin bindet an FAK.....	67
5.5.4	Rolle der Cortactin-Phosphorylierung für die Interaktion mit FAK	68
5.5.5	Identifizierung der Cortactin-Bindungsdomäne in FAK.....	69
5.5.6	Das <i>H. pylori</i> CagA-Protein spielt eine wichtige Rolle für die Cortactin-FAK-Interaktion und erhöhte FAK-Aktivität	76
5.6	Identifizierung von Vav2 als neuen Interaktionspartner von Cortactin	78
5.6.1	Phosphorylierung von Cortactin am Tyrosinrest 466 ist ausreichend für die Interaktion mit Vav2.....	78
5.6.2	Interaktion von Vav2 mit anderen Wirtszellproteinen	82
5.6.3	Induktion von Rac1-abhängiger Zellmotilität während der <i>H. pylori</i> -Infektion	83
6	DISKUSSION.....	85
6.1	Regulierung von Cortactin durch Kinasen der Erk-, PAK- und Src-Familie.....	86
6.2	Phosphorylierungsmuster und subzelluläre Lokalisation von Cortactin	89
6.3	Molekulare Basis der Interaktion von Cortactin mit FAK.....	90
6.4	Molekulare Basis der Interaktion von Cortactin mit Vav2 und Rac1	93
6.5	Mögliche Bedeutung von Cortactin für <i>H. pylori</i>	95
7	ZUSAMMENFASSUNG	97
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	98
	DANKSAGUNG.....	119
	LEBENS LAUF	120
	PUBLIKATIONS LISTE	121
	ERKLÄRUNG	122

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere (Stromstärke)
Abb.	Abbildung
AGS	Zelllinie (<i>stomach</i> ; <i>gastric adenocarcinoma</i>)
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintri-phosphat
ADP	Adenosindiphosphat
Arp2/3	<i>actin-related protein 2/3</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bp	Basenpaar
CagA	<i>Cytotoxin-associated gene A</i>
Cam	Chloramphenicol
CBP90	<i>cortactin binding protein 90</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
CortBP1	<i>cortactin binding protein 1</i>
Csk	<i>C-terminal src kinase</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanintri-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtri-phosphat
DPBS	Dulbecco's <i>Phosphate buffered saline</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxytymidintri-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
et al.	<i>et aliter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAP	Guanosintri-phosphatase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintri-phosphat
GTPase	Guanosintri-phosphatase
h	Stunde
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HA	Hämagglutinin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	<i>Luria broth</i>
M	Molar
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Mr	Molekulargewicht
N-Terminus	Aminoterminus
N-WASP	neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
OD	optische Dichte
orf	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PS	Penicillin-Streptomycin
PT	Phänotyp
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PY	Phosphotyrosin
Rac1	<i>Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate 1</i>
Rho	<i>Ras-homology</i>
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SH2, SH3	<i>src homology</i>
siRNS	<i>small-interfering</i> Ribonukleinsäure
Src	<i>sarcoma</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris <i>buffered saline</i> mit Tween20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine-isothiocyanat
TritonX100	Polyethylenglycol-[4-(2',2',4',4'-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Rolle des Aktin-Zytoskeletts in der Eukaryontenzelle

Das Zytoskelett ist ein aus Proteinen aufgebautes Gerüst im Zytoplasma der Zelle und besteht aus dynamisch auf- und abbaubaren, dünnen, fadenförmigen Strukturen (Filamenten), die in der Zellmembran verankert sind. Es werden drei Typen von Filamenten unterschieden: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Colowick, 1991; Nelson *et al.*, 1996; Colowick, 1998; Jeanteur, 1999; Carraway, 2000; Omary, 2004; Li & Gundersen, 2008). In seiner Gesamtheit ist das Zytoskelett für die Elastizität und mechanische Stabilität der Zelle sowie für ihre äußere Form, für aktive Bewegungen der Zelle als Ganzes, als auch für Bewegungen und Transporte innerhalb der Zelle verantwortlich. Es spielt zudem eine wichtige Rolle während der Zellteilung und der Aufnahme von äußeren Reizen und deren Weiterleitung in das Zellinnere. Die Filamente des Zytoskeletts stellen Polymere dar, die aus zahlreichen Protofilamenten, langen linearen Ketten aus Ende-an-Ende aneinander gereihten Untereinheiten (Monomeren), aufgebaut sind, die miteinander seitlich in Verbindung treten. Der Auf- und Abbau der Zytoskelettfilamente wird durch verschiedenste Kontrollfaktoren dynamisch reguliert. Eine entscheidende Funktion haben dabei so genannte Hilfsproteine, die an die Filamente oder freien Untereinheiten binden und für die Regulierung des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich sind (Kap.1.3). Zu den Hilfsproteinen zählen auch die Motorproteine, die Zellorganellen entlang den Filamenten transportieren oder sich selbst auf den Filamenten bewegen (Wanger *et al.*, 1985; Colowick, 1991; Nelson *et al.*, 1996; Colowick, 1998; Jeanteur, 1999; Carraway, 2000; Li & Gundersen, 2008; Omary, 2004; Revenu *et al.*, 2004).

Aktinfilamente (auch als Mikrofilamente bezeichnet) sind zweisträngige helikale Polymere aus dem Protein Aktin. Sie bilden flexible Anordnungen mit 5-9 nm Durchmesser, die zu vielfältigen linearen Bündeln, flächigen Netzen oder räumlichen Strukturen organisiert sind. Aktinfilamente sind zwar überall in der Zelle verteilt, ihre größte Dichte erreichen sie jedoch in der Zellrinde (Cortex) direkt unterhalb der Plasmamembran. Aktinfilamente beeinflussen die Form der Zelloberfläche und spielen bei Bewegungsvorgängen, bei der Zellteilung und der Muskelkontraktion eine wichtige Rolle (Wanger *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1996; Colowick, 1998; Jeanteur, 1999; Carraway, 2000; Chhabra & Higgs, 2007; Li & Gundersen, 2008). Aktin kann in der Zelle als eine einzige kugelförmige Polypeptidkette in Form eines Monomers vorliegen, welche als globuläres Aktin (G-Aktin) bezeichnet wird. Mehrere dieser Aktinmonomere können sich zu einer Kette zusammenlagern und bilden so das filamentöse Aktin (F-Aktin), aus dem sich die Aktinfilamente zusammensetzen. Jede Aktinuntereinheit trägt ein fest gebundenes ATP-Molekül, das kurz nach dem Einbau in das Polymer zu

einem fest gebundenen ADP gespalten wird. Die ATP-Hydrolyse begünstigt andererseits die Ablösung der Untereinheit vom Polymer, da die Affinität zu den benachbarten Monomeren abnimmt. Die Aktinuntereinheiten lagern sich „Kopf-an-Schwanz“ zusammen und bilden ein Filament mit klarer struktureller Polarität, welches ein rasch wachsendes Plus- und ein langsam wachsendes Minus-Ende besitzt. Bei Säugetieren gibt es sechs leicht unterschiedliche Aktin-Isoformen, die von verschiedenen Genen kodiert werden und sich in drei Klassen (α , β , und γ) einteilen lassen. Die α -Aktine sind ausschließlich in Muskelzellen exprimiert, während β und γ zusammen in fast allen Nicht-Muskelzellen zu finden sind. Die Motorproteine der Aktine bilden die Proteinklasse der Myosine. Auf der Aktin-Myosin-Interaktion basiert nicht nur die Bewegung der Muskulatur, sondern Myosine verspannen auch die Aktinfilamente zur Stabilisierung und sorgen für den Kurzstreckentransport zum Beispiel von Vesikeln zur Plasmamembran. Bei der Zellteilung bildet sich ein kontraktiler Ring von Aktinfilamenten, der sich unter dem Einfluss von Myosin kontrahiert und die beiden Tochterzellen voneinander abschnürt.

1.2 Aktindynamik und „Tretmühlen“-Verhalten

Aktinuntereinheiten besitzen eine enzymatische Aktivität, durch die sie die Hydrolyse von Nukleosidtriphosphat (ATP) katalysieren können (Wanger *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1996; Colowick, 1998; Jeanteur, 1999; Carraway, 2000; Li & Gundersen, 2008). Bei der frei liegenden Untereinheit verläuft die Hydrolyse sehr langsam, die jedoch beschleunigt wird, sobald die Untereinheiten in Aktinfilamente eingebaut sind. Es können also zwei unterschiedliche Arten der Filamentstruktur vorkommen, die eine mit der „T-Form“ des gebundenen Nukleotids (ATP) und die andere mit der „D-Form“ (ADP). In lebenden Zellen liegen die freien Untereinheiten meist in der „T-Form“ vor, da die freie Energie für ATP viel höher ist als die von ADP. Je länger die Untereinheiten im Polymer eingebaut waren, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie ihr gebundenes Nukleotid hydrolysiert haben. Ob eine Untereinheit am Ende eines Aktinfilaments in der „T-Form“ oder „D-Form“ vorliegt, hängt demnach von der relativen Geschwindigkeit der Hydrolyse und der Addition von Untereinheiten ab. Wenn die Additions geschwindigkeit hoch ist, d.h., wenn das Filament rasch wächst, wird die neue Untereinheit mit hoher Wahrscheinlichkeit angefügt, bevor die zuvor angefügte Untereinheit ihr Nukleotid hydrolysiert hat, und das Ende des Polymers bleibt in der „T-Form“, es bildet sich eine so genannte ATP-„Kappe“. Ist hingegen die Addition neuer Untereinheiten langsam, verläuft die Hydrolyse vor Anfügen einer neuen Untereinheit und die Spitze des Filaments liegt in der „D-Form“ vor. Die Geschwindigkeit des Anfügens von Untereinheiten am Ende eines Aktinfilaments ist das Produkt aus der Konzentration der freien Untereinheiten und der Geschwindigkeitskonstante. Aufgrund des strukturellen Unterschieds der beiden Filament-Enden ist die Geschwindigkeitskonstante für das Plus-Ende viel höher als für das Minus-Ende. Bei einer mittleren Konzentration an freien Untereinheiten ist es daher möglich, dass die Geschwindigkeit der Addition von Untereinheiten am Plus-Ende höher ist als die

Nukleotidhydrolyse, aber langsamer als die Nukleotidhydrolyse am Minus-Ende. In diesem Fall bleibt das Plus-Ende des Filaments in der „T-Form“, während das Minus-Ende die „D-Form“ annimmt, wobei die „D-Form“ eher zu Abbau und die „T-Form“ mehr zu Anbau neigt. Der so genannte „Tretmühlen“-Mechanismus tritt ein, wenn bei mittleren Konzentrationen von freien Untereinheiten am Plus-Ende des Filaments Untereinheiten angelagert und gleichzeitig am Minus-Ende Untereinheiten abgebaut werden (Wanger *et al.*, 1985; Theriot, 1997). In diesem Gleichgewichtszustand bleibt die Länge des Polymers konstant, aber die Untereinheiten wandern von einem Ende der Anordnung zum anderen und bewegen sich rasch zwischen dem freien und filamentgebundenen Zustand hin und her. Die kinetischen Unterschiede im Verhalten der „T-Form“ und der „D-Form“ haben eine weitere wichtige Auswirkung auf das Verhalten der Filamente. Wenn bei mittleren Konzentrationen an freien Untereinheiten die Geschwindigkeit der Untereinheitenaddition an einem Ende der Geschwindigkeit der Hydrolyse ähnelt, so besteht die Möglichkeit, dass dieses Ende eine bestimmte Zeit in der „T-Form“ wächst, dann aber plötzlich in die „D-Form“ wechselt und rasch schrumpft. Diese Umwandlung erfolgt plötzlich und zufällig mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit je Zeiteinheit. Zu einem späteren Zeitpunkt kann das Ende wieder in die „T-Form“ wechseln und wieder wachsen. Dieser rasche Wechsel zwischen Wachsen und Schrumpfen bei gleich bleibender Konzentration freier Untereinheiten wird als dynamische Instabilität bezeichnet. Es wird vermutet, dass in Zellen dynamische Instabilität bei Mikrotubuli, das „Tretmühlen“-Verhalten bei Aktinfilamenten vorherrscht. Sowohl die dynamische Instabilität als auch das „Tretmühlen“-Verhalten ermöglichen es einer Zelle, den Gesamt-Filamentanteil konstant zu halten, obwohl ständig einzelne Untereinheiten zwischen den Filamenten und dem Zytosol ausgetauscht werden.

1.3 Regulation der Aktindynamik durch Aktin-bindende Proteine

In einer Zelle kontrollieren Hunderte dem Aktin-Zytoskelett angelagerte so genannte Hilfsproteine die räumliche Verteilung und das dynamische Verhalten der Aktinfilamente (Abb. 1). Diese Hilfsproteine binden an die Aktinfilamente oder ihre Untereinheiten, um die Aufbaustelle neuer Filamente einzuleiten, die Verteilung der Polymerproteine zwischen Filament- und Untereinheitszustand zu regulieren, die Kinetik des Auf- und Abbaus der Filamente zu beeinflussen, die Energie für die Krafterzeugung einzusetzen und um Filamente untereinander oder an andere Zellstrukturen wie Organellen oder Plasmamembran zu knüpfen. Die Hilfsproteine werden in ihrer Gesamtheit als Aktin-bindende Proteine zusammengefasst (dos Remedios *et al.*, 2003). Man unterscheidet verschiedene Typen von Aktin-bindenden Proteinen, die den Auf- und Abbau der Aktinfilamente regulieren. Die Klassifizierung dieser Aktin-bindenden Proteine kann auf acht Gruppen reduziert werden: 1. Aktinmonomer-bindende Proteine (z.B. Thymosin- β 4, Profilin); 2. Aktinfilament-depolymerisierende Proteine (z.B. Cofilin); 3. Aktinfilament-stabilisierende Proteine (z.B. Tropomyosin); 4. Aktinfilament-Enden-bindende Proteine (z.B. Tropomodulin,

CapZ); 5. Aktinfilament-schneidende Proteine (z.B. Gelsolin); 6. Aktinfilament-quervernetzende Proteine (z.B. Fimbrin, Spektrin); 7. Proteine als Aktin-Nukleationszentren (z.B. Arp2/3, Formine) und 8. Motorproteine (z.B. Myosin). Die Aktin-bindenden Proteine sind jedoch nicht auf eine Klasse beschränkt, sondern können mehrere Funktionen haben, wie z.B. Gelsolin, das sowohl Aktinfilamente spalten, als auch Plus-Enden mit einer Kappe versehen kann. Viele der bekannten Aktin-bindenden Proteine binden an dieselbe Stelle auf der Oberfläche von Aktin, so dass angenommen werden kann, dass sie miteinander konkurrieren. Im Folgenden werden die bekanntesten Aktin-bindende Proteine aus den einzelnen Klassen dargestellt, wobei auf die Motorproteine nicht weiter eingegangen wird.

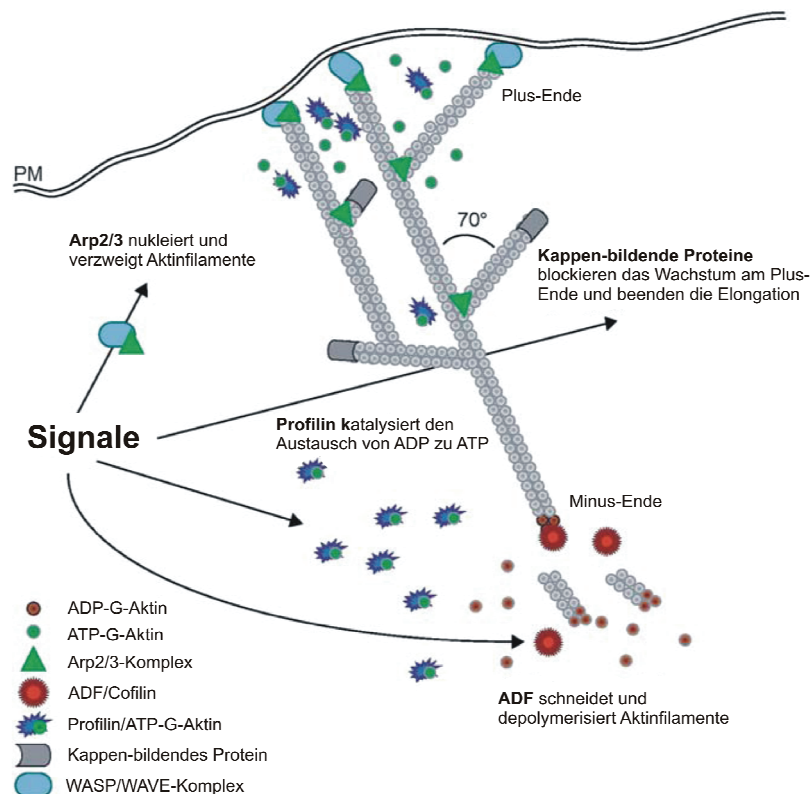


Abbildung 1. Schematischer Überblick der Aktindynamik und seine Regulation durch Aktin-bindende Proteine. Der aktivierte Arp2/3-Komplex nukleiert und verzweigt Aktinfilamente, wodurch neue Plus-Enden bzw. Filamente entstehen. Kappen-bildende Proteine kontrollieren die Halbwertszeit der Filamente. Sie blockieren das Wachstum an einem Großteil der Plus-Enden und fördern dadurch die ortsspezifische Elongation von Filamenten ohne „Kappe“. ADF/Cofilin fördert die Dissoziation von ADP-Aktin von den Minus-Enden und schneidet bereits vorhandene Filamente, wodurch neue Plus-Enden erzeugt werden. Profilin katalysiert den Austausch von ADP zu ATP an monomeren Aktin-Molekülen, so dass diese für die Polymerisation am Plus-Ende zur Verfügung stehen (in Anlehnung an Disanza *et al.*, 2005).

1.3.1 Thymosin-β4 und Profilin

Eine Möglichkeit die Aktin-Polymerisation zu beeinflussen besteht darin, die Polymerisationsfähigkeit von Aktinmonomeren einzuschränken bzw. zu fördern. Zwei Aktinmonomer-bindende Proteine sind Thymosin-β4 und Profilin. Thymosin-β4 gehört

zu einer Familie von hoch konservierten kleinen Proteinen, die ursprünglich aus der Thymusdrüse isoliert wurden. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie weit verbreitet sind (Erickson-Viitanen *et al.*, 1983; Nachmias, 1993). Zytoplasmatisches Thymosin- β 4 bindet G-Aktin in stöchiometrischen 1:1-Komplexen, wodurch das monomere Aktin-Reservoir in der Zelle stabilisiert und die Polymerisation inhibiert wird. An Thymosin gebundene Aktinmonomere befinden sich in einem geschlossenen Zustand, in dem sie weder an das Plus- noch an das Minus-Ende eines Aktinfilaments binden können und auch ihr gebundenes Nukleotid weder hydrolysieren noch austauschen können. Thymosin- β 4 ist jedoch nicht nur ein G-Aktin-bindendes Protein, sondern kann in hohen Konzentrationen auch mit F-Aktin interagieren (Carlier *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; Ballweber *et al.*, 2002). An der Mobilisierung und Repolymerisation von G-Aktin sind wiederum Profilin (Pantaloni & Carlier, 1993) und andere Aktin-bindende Proteine beteiligt. Profilin ist ein kleines ubiquitär vorkommendes eukaryontisches Protein, das den Nukleotidaustausch am G-Aktin katalysieren und die Aktin-Polymerisation fördern kann (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1992; Sohn & Goldschmidt-Clermont, 1994; dos Remedios *et al.*, 2003; Jockusch *et al.*, 2007). Es gehört zu den am höchsten exprimierten zytoplasmatischen Proteinen und ist im gesamten Zytoplasma verteilt. Profilin bindet an die der ATP-bindenden Tasche gegenüberliegende Seite von G-Aktin und blockiert so die Stelle am Monomer, mit der es sich normalerweise an das Minus-Ende des Filaments anlagern würde. Der Profilin/Aktin-Komplex kann sich jedoch leicht an ein freies Plus-Ende anhängen. Sobald dies geschieht, wird eine Konformationsänderung induziert, die die Affinität für Profilin reduziert, so dass Profilin abfällt und das Aktinfilament um eine Untereinheit länger vorliegt (Pollard, 1999; Jockusch *et al.*, 2007). Profilin konkurriert mit Thymosin um die Bindung an einzelne Aktinmonomere, und eine örtliche Aktivierung der Profilinmoleküle verschiebt Aktinuntereinheiten von dem Thymosin-gebundenen Reservoir zu den Plus-Enden der Filamente. Mehrere intrazelluläre Mechanismen kontrollieren die Aktivität von Profilin, darunter die Phosphorylierung des Profilins und die Bindung des Profilins an Inositolphospholipide (Lassing & Lindberg, 1988; Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990; Sohn *et al.*, 1995). Diese Mechanismen können die Stelle, an der Profilin wirkt, bestimmen. Die Fähigkeit von Profilin, gespeicherte Aktinmonomere zu den wachsenden Enden der Filamente zu bringen, ist z.B. für den Filamentaufbau an der Plasmamembran wichtig. Profilin ist über saure Phospholipide der Membran an die zytosolische Seite der Plasmamembran gebunden. Hier können extrazelluläre Signale eine explosionsartige Polymerisation von Aktin auslösen oder die Erweiterung von Aktin-reichen beweglichen Strukturen, wie den Filopodien und Lamellipodien. Außer an Aktin und Phospholipide kann Profilin auch an eine Reihe anderer intrazellulärer Proteine binden, die eine Prolin-reiche Domäne haben (wie z.B. Ena/VASP-Proteine, WASP und N-WASP). Diese Proteine tragen vermutlich auch dazu bei, Profilin an Stellen zu binden, wo ein rascher Aktinaufbau nötig wird (Sohn & Goldschmidt-Clermont, 1994). Profilin nimmt durch die Bindung von Aktinmonomeren eine Schlüsselrolle in der regulierten Aktin-Polymerisation ein. Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass Profilin aber auch in anderen zellulären Prozessen eine Rolle

spielen, wie etwa in der Endo- und Exozytose und in spezifischen Prozessen neuronaler Zellen (Witke, 2004).

1.3.2 Tropomyosin und Cofilin

Sobald ein Aktinfilament durch Nukleation und Wachstum aus dem Untereinheitenreservoir gebildet wurde, werden seine Stabilität und seine mechanischen Eigenschaften oftmals durch eine Reihe von Proteinen, die sich an die Seiten des Polymers anlagern, beeinflusst. Unterschiedliche mit den Filamenten verbundene Proteine nutzen ihre Bindungsenergie, um die Freie Energie des Polymerzustands entweder zu erhöhen oder zu erniedrigen und dabei das Polymer entweder zu stabilisieren oder zu destabilisieren. In den meisten Zellen werden Aktinfilamente durch die Bindung von Tropomyosin stabilisiert (Gunning *et al.*, 2008). Tropomyosin bildet ein ca. 40 nm langes fadenförmiges Molekül, das aus zwei identischen Polypeptidketten besteht und gleichzeitig an sieben Aktinuntereinheiten in einem Protofilament bindet, wobei sich die benachbarten Tropomyosine überlappen. Die Bindung von Tropomyosin am Aktinfilament kann die Bindung anderer Proteine (z.B. Myosin) an das Filament verhindern. Daher ist die Kontrolle der Tropomyosinbindung ein wichtiger Schritt bei der Muskelkontraktion. Ein anderes wichtiges Aktinfilament-bindendes Protein, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt, ist Cofilin (auch als Aktin-depolymerisierender tor, ADF, bezeichnet), das die Aktinfilamente destabilisiert und sowohl an monomeres G-Aktin, als auch an filamentöses F-Aktin binden kann (Carlier *et al.*, 1997; Theriot, 1997; Bamberg, 1999). Die Bindung von Cofilin entlang dem Aktinfilament drängt das Filament in eine engere Windung. Dieser mechanische Stress lockert die Bindungen zwischen den Aktinuntereinheiten des Filaments, wodurch das Filament brüchiger wird und leichter fragmentiert. Zudem können ADP-Aktinuntereinheiten leichter vom Minus-Ende des Filaments dissoziieren. Cofilin bindet eher an ADP-tragende Aktinfilamente als an ATP-enthaltende Filamente (dos Remedios *et al.*, 2003). Da die Hydrolyse des ATP normalerweise langsamer verläuft als die Fragmentverlängerung, enthalten junge Aktinfilamente in einer Zelle noch hauptsächlich ATP und sind resistent gegen eine Depolymerisation durch Cofilin. Cofilin wird also nur effizient die ältesten Filamente in einer Zelle abbauen und bewirkt dadurch den raschen Umsatz der Aktinfilamente. Cofilin wurde zudem eine Filament-schneidende Aktivität nachgewiesen, die den Umsatz der Aktinfilamente weiter steigern kann und so eine erhöhte und variable Aktinfilamentdynamik ermöglicht (Bamberg, 1999; dos Remedios *et al.*, 2003; Ono, 2007).

1.3.3 CapZ und Tropomodulin

Ein Aktinfilament, das nicht weiterwächst und nicht durch die Zelle in besonderer Weise stabilisiert wird, kann rasch depolymerisieren. Es kann Untereinheiten sowohl von seinem Plus- als auch von seinem Minus-Ende verlieren, sobald die Aktinmoleküle an diesen Enden ihr ATP hydrolysiert und sich in die D-Form umgewandelt haben. Die rascheste Umwandlung kann aber am Plus-Ende eintreten. Ein Aktinfilament kann

durch die Bindung eines Kappe-bildenden Proteins am Plus-Ende stabilisiert werden, das die Geschwindigkeit sowohl des Filament-Wachstums als auch der Filament-Depolymerisation stark hemmt, da es das Plus-Ende inaktiviert. Tatsächlich sind die meisten Aktinfilamente in einer Zelle an ihren Plus-Enden durch Proteine wie CapZ mit einer Kappe versehen (Weeds & Maciver, 1993; Cooper & Schafer, 2000; dos Remedios *et al.*, 2003). CapZ kommt in allen eukaryontischen Zellen vor und ist im Skelettmuskel in der Z-Scheibe lokalisiert (Casella *et al.*, 1987). Die Kontrolle der Kappenbildung durch verschiedene örtlich begrenzte intrazelluläre Signale ermöglicht es einer Zelle, spezifische Teile ihres Zytoskeletts zu erhalten oder abzubauen. Die Kappen-bildenden Proteine am Plus-Ende werden durch die Inositolphospholipide PIP (Phosphoinositolphosphat) und PIP₂ (Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat) reguliert (Schafer *et al.*, 1996). Eine durch Aktivierung der entsprechenden Zelloberflächen-Rezeptoren bewirkte Erhöhung der PIP- bzw. PIP₂-Konzentration entfernt die Kappen von den Plus-Enden. Dies macht die Plus-Enden frei für die Verlängerung und bewirkt so die Polymerisation von Aktinfilamenten in örtlich begrenzte Regionen der Zelle. In Muskelzellen, in denen die Aktinfilamente besonders langlebig sind, sind die Filamente an beiden Enden mit Kappen versehen: CapZ ist an den Plus-Enden, Tropomodulin an den Minus-Enden angelagert. Tropomodulin bindet nur an die Minus-Enden von Aktinfilamenten, die mit Tropomyosin bedeckt sind und dadurch schon etwas stabilisiert sind (Fischer & Fowler, 2003; Kostyukova, 2008). Im Gegensatz zu den Kappen-bildenden Proteinen am Plus-Ende sind Kappen-bildende Proteine am Minus-Ende eine Seltenheit. Neben Tropomodulin und Arp2/3 bindet kein weiteres Protein an die Minus-Enden von F-Aktin und kein anderes Protein inhibiert die Verlängerung der Filamente an diesem Ende (dos Remedios *et al.*, 2003).

1.3.4 Fimbrin, α -Aktinin und Villin

In Tierzellen sind Aktinfilamente als Bündel und gelartige Netzwerke angeordnet. Demnach werden auch die entsprechenden Hilfsproteine in zwei Gruppen eingeteilt: in bündelnde Proteine und netzbildende Proteine (Jeanteur, 1999; Carraway, 2000; Omary, 2004; Li & Gundersen, 2008). Bündelnde Proteine vernetzen die Aktinfilamente in paralleler Anordnung, während die netzbildenden Proteine zwei Aktinfilamente in einem großen Winkel zueinander halten und so ein loses Netzwerk bilden. Fimbrin und α -Aktinin sind weit verbreitete Aktin-bündelnde Proteine (Matsudaira, 1994; Otto, 1994). Fimbrin ist ein kleiner Quervernetzer mit zwei Aktin-Bindungsdomänen nahe beieinander auf einer einzigen Polypeptidkette. Es ist in den parallelen Aktinfilament-Bündeln der Filopodien am Leitsaum der Zelle angereichert und vermutlich die Ursache für die enge Aneinanderlagerung dieser Aktinfilamente. α -Aktinin besitzt zwei Aktin-bindende Domänen, die durch zwei in einem Dimer zusammengehaltene Polypeptidketten gebildet werden (Sjoblom *et al.*, 2008). Es ist in Stressfasern angereichert, wo es die relativ lose Quervernetzung der Aktinfilamente in den kontraktile Bündeln hervorruft. Jede Art Bündelprotein bestimmt, welches andere Molekül mit einem Aktinfilament in Wechselwirkung treten kann. Myosin II ist das Protein in Stressfasern

und anderen kontraktile Gittern, das für deren Kontraktionsvermögen verantwortlich ist. Die sehr enge Packung der Aktinfilamente durch Fimbrin schließt anscheinend Myosin aus, und daher sind Filopodien nicht kontraktile. Andererseits ermöglicht die lose Packung durch α -Aktinin ein Eindringen des Myosins in die Stressfaser, die daher kontraktile ist. Der sehr unterschiedliche Abstand zwischen den Aktinfilamenten führt dazu, dass ein Bündeln durch Fimbrin automatisch ein Bündeln durch α -Aktinin unmöglich macht, und umgekehrt, so dass die beiden Bündelproteine sich gegenseitig ausschließen. Villin ist ein anderes Bündelprotein, das ähnlich wie Fimbrin, zwei Aktinfilament-Bindungsstellen sehr nahe beieinander auf einer einzigen Polypeptidkette hat (Khurana & George, 2008). Villin hilft zusammen mit Fimbrin, die 20-30 Aktinfilamente eng zu bündeln, die in Mikrovilli gefunden werden. Mikrovilli sind fingerartige Ausstülpungen der Plasmamembran auf der Oberfläche vieler Epithelzellen. Sie vergrößern in hohem Ausmaß die Resorptionsfläche resorbierender Zellen, wie z.B. im Dünndarm. Neben seiner Funktion als Aktin-bündelndes Protein ist Villin auch an der Nukleation, Kappenbildung und Fragmentierung von Aktinfilamenten beteiligt (Friederich *et al.*, 1999; Silacci *et al.*, 2004).

1.3.5 Filamin und Spektrin

Ein gut untersuchtes netzbildendes Protein ist Spektrin, das zuerst in roten Blutkörperchen nachgewiesen wurde. Spektrin ist ein langes, biegsames Protein, das aus vier länglichen Polypeptidketten, zwei α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten, aufgebaut ist (Carraway, 2000; Thomas, 2001; Chakrabarti *et al.*, 2006). In der roten Blutzelle ist Spektrin unmittelbar unter der Plasmamembran konzentriert, wo es ein zweidimensionales Netzwerk bildet, das durch kurze Aktinfilamente zusammengehalten wird. Spektrin knüpft dieses Netz an die Plasmamembran, da es mehrere Bindungsstellen für periphere Membranproteine hat, die wiederum selbst durch integrale Membranproteine nahe an der Lipid-Doppelmembran gehalten werden. Das sich dadurch ergebende Netzwerk bildet eine steife Zellrinde, die der darauf liegenden Plasmamembran eine mechanische Stütze bietet und es der roten Blutzelle ermöglicht, nach der Passage durch eine Kapillare wieder ihre ursprüngliche Form anzunehmen. Nahe Verwandte von Spektrin finden sich in der Zellrinde der meisten anderen Zellarten der Wirbeltiere, wo sie ebenfalls dazu beitragen, der Oberflächenmembran Form und Festigkeit zu verleihen (Chakrabarti *et al.*, 2006). Ein weiteres netzbildendes Protein ist Filamin, welches die Bildung eines losen und sehr viskosen Gels hervorruft, indem es zwei Aktinfilamente im Winkel von annähernd 90° zusammenhält (Popowicz *et al.*, 2006; Komaletdinova & Pinaev, 2006). Die von Filamin gebildeten Aktingle sind für die Ausbildung der dünnen, blattartigen, als Lamellipodien bezeichneten Auswachsungen der Zellen nötig, die der Zelle das Wandern über ein Substrat ermöglichen.

1.3.6 Gelsolin

Ein vorhandenes langes Aktinfilament kann in viele kleinere Filamente gespalten werden, wodurch eine große Anzahl neuer Filament-Enden entsteht. Unter bestimmten intrazellulären Bedingungen können diese neu gebildeten Enden Filamentwachstum auslösen, und so kann das Spalten von Filamenten den Aufbau neuer Filamentgefüge beschleunigen. Unter anderen Bedingungen kann das Spalten die Depolymerisation des alten Filaments durch eine Erhöhung der Depolymerisationsgeschwindigkeit um einen Faktor 10 oder mehr beschleunigen. Zusätzlich ändert das Spalten von Filamenten die physikalischen und mechanischen Eigenschaften des Zytoplasmas, da steife, lange Bündel und Gele mit dem Spalten der Filamente viskoser werden. Die meisten Aktinspaltenden Proteine, wie z.B. Gelsolin, Villin und Adseverin, gehören zu der Gelsolin-Superfamilie, deren Spaltaktivität durch eine Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird (Sun *et al.*, 1999; dos Remedios *et al.*, 2003; Silacci *et al.*, 2004). Gelsolin besitzt Unterdomänen, die an zwei unterschiedlichen Stellen an der Aktinuntereinheit binden; die eine liegt offen an der Oberfläche des Filaments, während die andere normalerweise durch Längsbildung an die nächste Untereinheit im Protofilament versteckt ist (Sun *et al.*, 1999). Gemäß einem Modell für die Trennung durch Gelsolin bindet Gelsolin an die Seite eines Aktinfilaments und sobald durch thermische Fluktuation eine kleine Spalte zwischen den benachbarten Untereinheiten der Protofilamente entsteht, drängt Gelsolin seine Untereinheit in den Spalt und bricht so das Filament. Wenn Gelsolin ein Aktinfilament gespalten hat, bleibt es am Plus-Ende gebunden und wird als kappenbildendes Protein aktiv. Es kann jedoch, wie mehrere andere Aktinfilamente kappende Proteine, durch eine örtliche Erhöhung der PIP_2 -Konzentration vom Filament gelöst werden (dos Remedios *et al.*, 2003; Weeds & Maciver, 1993).

1.3.7 Arp2/3-Komplex, Formine, Spir und Cobl

Die spontane Nukleation von Aktin erfolgt sehr langsam, da sie thermodynamisch ungünstig ist. Um den Erfordernissen schneller Bewegungsvorgänge in Zellen gerecht zu werden, bedarf es eines regulierbaren Aktinnukleators, um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Nukleation zu beschleunigen und damit die rasche Filamentbildung zu ermöglichen. Wichtige Aktinnukleatoren sind der Arp2/3-Komplex, die Formin-Proteinfamilie und Spir-Proteinfamilie (Abb. 2). Der Arp2/3-Komplex ist der am besten charakterisierte Nukleator neuer Aktinfilamente in eukaryontischen Zellen (Ma *et al.*, 1998; Machesky & Gould, 1999; Mullins & Pollard, 1999; Welch, 1999; Svitkina & Borisy, 1999; Volkmann *et al.*, 2001). Er ist in Bereichen raschen Aktinfilament-Wachstums, wie den Lamellipodien, zu finden (Machesky *et al.*, 1997; Schafer *et al.*, 1998; Svitkina & Borisy, 1999). Arp2 und Arp3 (*actin related protein*) gehören zu einer Familie von Proteinen, die in ihrer Sequenz und Struktur Aktin zu einem gewissen Grad ähneln (Frankel & Mooseker, 1996). Der aus den sieben Proteinen Arp2, Arp3 und ARPC1-5 (in Säugern p16, p20, p21, p34 und p40 benannt) bestehende Komplex ist in einer Vielzahl von Organismen, von Hefen bis Säugern, zu

finden. Die atomare Struktur des Arp2/3-Komplexes wurde kristallographisch aufgeklärt (Robinson *et al.*, 2001). Arp2 und Arp3 weisen eine ähnliche Faltung wie Aktin auf. Sie bilden im aktivierten Zustand ein Heterodimer aus, welches einem freien Plus-Ende eines Aktinfilaments ähnelt und als Nukleus die Aktin-Polymerisation katalysiert. Die fünf weiteren neben Arp2 und Arp3 im Komplex assoziierten Proteine sind wahrscheinlich für die Verankerung an ein Aktinfilament verantwortlich, denn neben der schnellen Nukleation sorgt der Arp2/3-Komplex für „Y-förmige“ Verzweigungspunkte zweier Filamente während der Aktin-Polymerisation (Mullins *et al.*, 1998; Svitkina & Borisy, 1999). Diese Verzweigungspunkte führen zu einem bäumchenartig verästelten Netzwerk von Aktinfilamenten. Für den Mechanismus der Nukleation und Filamentverzweigung werden zwei Modelle diskutiert. Das Modell der „dendritischen Nukleation“ geht von einer seitlichen Anlagerung des Arp2/3-Komplexes an ein bereits vorhandenes „Mutterfilament“ aus, von wo aus ein „Tochterfilament“ nukleiert wird (Mullins *et al.*, 1998; Blanchoin *et al.*, 2000; Pollard *et al.*, 2000). Beim Modell der „Plus-Enden-Verzweigung“ wird hingegen angenommen, dass der Arp2/3-Komplex an die schnell wachsenden Plus-Enden der Filamente bindet und dort die Bildung zweier „Tochterfilamente“ induziert (Pantaloni *et al.*, 2000). Aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Aktinnetzwerkes in Lamellipodien wird das Modell der „dendritischen Nukleation“ derzeit favorisiert (Bailly *et al.*, 1999; Svitkina & Borisy, 1999; Amann & Pollard, 2001; Ichetovkin *et al.*, 2002). Da der Arp2/3-Komplex an sich nur eine geringe Nukleationsaktivität besitzt (Mullins *et al.*, 1998), muss er durch NPFs (*nucleation promoting factors*), zu denen die Proteine der WASP/Scar-Familie gehören, in Anwesenheit von F-Aktin aktiviert werden (Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999; Yarar *et al.*, 1999). Die in Eukaryonten ubiquitären Proteine der Formin-Familie sind außerordentlich wirksame Regulatoren der Aktindynamik (Higgs, 2005; Faix & Grosse, 2006; Kovar, 2006; Goode & Eck, 2007). Sie spielen z.B. bei der Ausbildung von Filopodien und Stressfasern, sowie bei der Zell-Adhäsion und der Endozytose eine wichtige Rolle. Formine sind sehr große Multidomänenproteine aus bis zu 2000 Aminosäureresten und zeichnen sich durch eine hochkonservierte FH2-Domäne (Formin-Homologie-2-Domäne) im C-terminalen Bereich aus, der in den meisten Fällen eine Prolin-reiche FH1-Domäne vorgelagert ist (Wallar & Alberts, 2003; Zigmond *et al.*, 2003). Im Gegensatz zum Arp2/3-Komplex nukleieren Formine lineare unverzweigte Aktinfilamente und sind auch in der Lage Aktin *de novo* zu assemblieren (Goode & Eck, 2007; Abb. 2). Somit führen der Arp2/3-Komplex und Formine zur Ausbildung gänzlich unterschiedlicher zellulärer Aktinstrukturen. Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Aktinnukleatoren ist ihre Interaktion mit den unterschiedlichen Enden der Aktinfilamente. Während der Arp2/3-Komplex nur an die Minus-Enden bindet, bleiben Formine dauerhaft mit dem schnell wachsenden Plus-Ende assoziiert (Xu *et al.*, 2004). Zu der Formin-Proteinfamilie gehört z.B. die wenig untersuchte Cappuccino-Untergruppe, welche unter anderem die zwei Säuger-Homologe Formin-1 und Formin-2 umfasst (Emmons *et al.*, 1995; Leader & Leder, 2000).

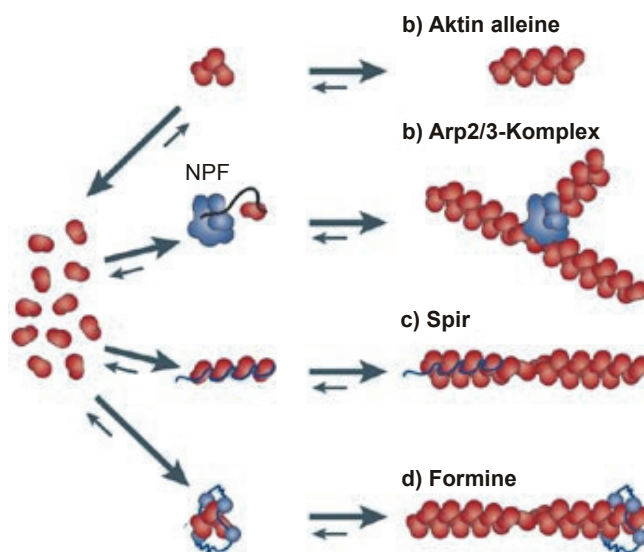


Abbildung 2. Schematische Darstellung verschiedener Aktin-Nukleationsmechanismen

(a) Die spontante Nukleation von Aktin ist thermodynamisch ungünstig und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Polymerisation, da kurze Aktin-Oligomere instabil sind und leicht zerfallen. (b) Der Arp2/3-Komplex ahmt vermutlich ein Aktin-Dimer oder -Trimer nach und fungiert so als Nukleus für die Bildung eines neuen Aktinfilaments, das von einem vorhandenen Filament abzweigt und zu „Y-verzweigten“ Aktin-Netzwerken führt. (c) Die vier G-Aktin-bindenden WH2-Domänen von Spir vermitteln die Assoziation von vier Aktin-Untereinheiten und dienen als Nukleus für die Polymerisation eines unverzweigten Filaments. (d) Formine fördern ebenfalls die Nukleation von unverzweigten Filamenten. Vermutlich bilden die Formin-Homologie-2 (FH2)-Domänen ein Dimer, das ein Aktin-Dimer oder -Trimer stabilisiert und den Nukleationsprozess erleichtert. NPF; *nucleation-promoting factor* (in Anlehnung an Goley & Welch, 2006)

Die Spir-Proteine gehören zu einer dritten Klasse von Aktinnukleatoren, die einen weiteren Nukleationsmechanismus besitzen und die im Gegensatz zum Arp2/3-Komplex und zu den Forminen bisher nur in Metazoen identifiziert wurden (Baum & Kunda, 2005; Kerkhoff, 2006; Bosch *et al.*, 2007; Quinlan *et al.*, 2007). Spir-Proteine sind große Multidomänenproteine, die insgesamt vier WASP-Homologie-2 (WH2)-Domänen enthalten. WH2-Domänen kommen in einer Vielzahl von Aktin-Bindeproteinen vor und können in zwei große Unterklasse eingeteilt werden: den WASP/WAVE-ähnlichen sowie den Thymosin- β 4-ähnlichen WH2-Domänen. Nach einem Modell von (Quinlan *et al.*, 2005) erfolgt die Aktinnukleation durch Spir folgendermaßen: Die vier WH2-Domänen innerhalb von Spir rekrutieren vier ATP-Aktinmonomere, wodurch ein einzelsträngiges Aktin-Tetramer entsteht, das als Nukleus für die Aktin-Polymerisation dient (Abb.2). Daraufhin werden weitere ATP-Aktinmonomere rekrutiert und erzeugen ein einzelsträngiges Polymer, welches nach der Umwandlung in eine doppelsträngige Form ein geeignetes Substrat für die schnelle Aktin-Polymerisation am Minus-Ende darstellt. Spir-Proteine nukleieren, wie Formine unverzweigte Aktinfilamente, verbleiben jedoch an deren Minus-Ende, wie der Arp2/3-Komplex. In jüngster Zeit wurde Cordon-Bleu (Cobl) als ein weiterer Aktinnukleator identifiziert (Ahuja *et al.*, 2007). Cobl ist ein im Gehirn angereichertes Protein, das mehrere prolinreiche Domänen und drei WH2-Domänen enthält. Die Cobl-vermittelte

Aktin-Polymerisation führt zu nicht gebündelten, unverzweigten Filamenten, wobei das Wachstum am Minus-Ende stattfindet. Um die Aktinnukleation zu realisieren, benötigt Cobl alle seine drei WH2-Domänen (Ahuja *et al.*, 2007; Renault *et al.*, 2008).

1.4 Zentrale Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts

1.4.1 Regulation der Aktindynamik durch Rho-GTPasen

Der Aufbau und die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts erfolgt als Reaktion auf äußere Signale, wie z.B. Lockstoffe (Chemokine). Auf molekularer Ebene führt die Bindung extrazellulärer Liganden an ihre membranständigen Rezeptoren, wie z.B. Rezeptor-Tyrosinkinasen, zur Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Kinasen, Adpatermolekülen, GTP-bindenden Proteinen sowie weiteren Faktoren. Bei der Übertragung von Signalen zum Zytoskelett sind die GTP-bindenden Proteine häufig Mitglieder der Rho-GTPase-Familie (Hall, 1998; Jeanteur, 1999; Hall & Nobes, 2000). Rho-GTPasen sind monomere Proteine mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 20-40 kDa, die zur Ras-Superfamilie gehören und meistens ubiquitär exprimiert werden. Sie sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, indem sie Signale ausgehend von Rezeptoren zu den Effektoren weiterleiten und so verschiedene Zellfunktionen beeinflussen (Hall, 1998; Hall, 1990; Takai *et al.*, 2001). Die bekanntesten Vertreter der Rho-Proteinfamilie sind die GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42. Wie andere Mitglieder der Ras-Superfamilie wirken auch diese Rho-Proteine bei der Kontrolle zellulärer Prozesse als molekulare Schalter, da sie zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand hin und her wechseln. An der Regulation dieses Zyklus sind drei unterschiedliche Proteinfamilien beteiligt: GDIs, GEFs und GAPs. In der GDP-gebundenen Form liegen die GTPasen an Guanin-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) gebunden im Zytoplasma vor (Ueda *et al.*, 1990). Diese Regulatorproteine verhindern die Dissoziation von GDP und in der Folge die Aktivierung der Rho-GTPasen. Erreichen extrazelluläre Stimuli die Zellen, lösen sich die GDIs von den GTPasen, die daraufhin zur Plasmamembran translozieren. Zur Aktivierung der GTPasen kommt es durch die Wirkung von Guanin-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*; GEFs), die die Dissoziation von GDP beschleunigen und die Bindung von GTP an die Rho-GTPase ermöglichen (Takai *et al.*, 2001; Hall & Nobes, 2000). Extrazelluläre Signale führen häufig zur Aktivierung der GEFs. Die Inaktivierung der Rho-GTPasen erfolgt durch Hydrolyse von GTP zu GDP über eine intrinsische GTPase-Aktivität. Dabei können so genannte GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die intrinsische GTPase-Aktivität steigern und die Rückkehr der Rho-GTPasen in den inaktiven GDP-gebundenen Zustand fördern (Takai *et al.*, 1993). Durch GDI-Proteine können die GTPasen nach der Inaktivierung aus der Membran gelöst und wieder ins Zytosol überführt werden (Hall & Nobes, 2000). Rho-GTPasen binden im aktiven Zustand an diverse Effektormoleküle und vermitteln so die Effekte auf das Zytoskelett (Bishop & Hall, 2000). Die Effektorproteine können Proteinkinasen, Lipidkinasen, Phospholipasen und

Adapterproteine sein. Die genauen Signalwege, die von den Rho-GTPasen zum Zytoskelett führen sind bisher nur teilweise aufgeklärt. Im Fall von Cdc42 ist bereits gezeigt worden, dass die aktivierte Form des Proteins an die GTPase-Bindungsdomäne (GBD) von WASP bzw. N-WASP bindet, wodurch die Proteine durch eine Konformationsänderung aktiviert werden. Dieses führt schließlich zur Nukleation und Polymerisation von Aktin und im Fall von N-WASP zur Ausbildung von Filopodien oder kürzeren als Mikroskopes bezeichneten Zellvorstülpungen. Die Aktivierung von Rac fördert die Aktin-Polymerisation am Zellrand, was zur Bildung von blattartigen Lamellipodien und Membranfalten führt. Zu den Effektoren von Rac gehören die WAVE-Proteine sowie die Serin/Threonin-Kinasen der PAK (*p21 activated kinase*)-Proteinfamilie. Die Aktivierung von Rho begünstigt sowohl die Bündelung von Aktin- und MyosinII-Filamenten zu Stressfasern als auch die Zusammenlagerung von Integrinen und zugehörigen Hilfsproteinen zu Fokalkontakten. Die Signalweiterleitung von der GTPase Rho erfolgt über seine Effektorproteine, wie z.B. der Rho-Kinase (ROCK) und mDia (Etienne-Manneville & Hall, 2002).

1.4.2 Die Familie der WASP/WAVE-Proteine

Die Multidomänenproteine der WASP/WAVE-Familie sind an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt und stellen als zentrale Regulatoren der zellulären Aktindynamik die Verbindung zwischen den Rho-GTPasen Cdc42 und Rac und dem Aktinnukleator Arp2/3-Komplex her (Machesky & Insall, 1998; Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999; Pollard *et al.*, 2000; Miki & Takenawa, 2003; Stradal *et al.*, 2004). In Säugetieren umfasst die WASP-Familie fünf Mitglieder: WASP, N-WASP und drei WASP- und Verprolin-homologe (WAVE) Proteine, die auch als Scar (*suppressor of cAMP-receptor*)-Proteine bezeichnet werden. Während WASP nur im hämatopoetischen System vorkommt, ist N-WASP ubiquitär exprimiert, ebenso wie die WAVE-Isoform WAVE-2, wohingegen WAVE-1 und -3 hauptsächlich im Nervensystem vorkommt. WASP wurde als Produkt eines Gens identifiziert, das in Patienten mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) mutiert ist und eine selten vorkommende X-chromosomal vererbte Immunschwäche auslöst (Derry *et al.*, 1994). Ein Homolog von WASP wurde später aus Gehirn isoliert und als neuronales (N)-WASP bezeichnet (Miki *et al.*, 1996). N-WASP weist eine 50 %-ige Sequenzhomologie zu WASP auf und besitzt die gleichen funktionalen Domänen und Motive, einschließlich der konservierten C-terminalen VCA-Region. Diese setzt sich aus der Verprolin-Homologie (V)-Domäne, Cofilin-Homologie (C)-Domäne und der sauren (*acidic*, A) Domäne zusammen. Die V-Domäne bindet Aktinmonomere und ist in vielen Proteinen zu finden, die die Aktin-Polymerisation regulieren (Paunola *et al.*, 2002). Die C- und die A-Domäne binden und aktivieren den Arp2/3-Komplex (Robinson *et al.*, 2001). Das Modul aus V-, C- und A-Domäne ist die kleinstmögliche benötigte Region zur Bindung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes. WAVE wurde als ein weiteres WASP-Homolog identifiziert, das eine VCA-Region besitzt (Miki *et al.*, 1998). Die VCA-Region der WASP/WAVE-Proteine wird in N-terminale Richtung von einer Prolin-reichen Sequenz gefolgt, die

von einer große Anzahl von SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen, sowie Profilin, gebunden werden kann (Carlier *et al.*, 2000; Fukuoka *et al.*, 2001; Rohatgi *et al.*, 2001; Suetsugu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000; Yasar *et al.*, 2002). Während der C-Terminus bei den Mitgliedern der WASP/WAVE-Familie homolog ist, so definiert die N-terminale Domäne die Zugehörigkeit zur WASP- oder WAVE/Scar-Klasse von Proteinen. WASP und N-WASP enthalten die WH1 (WASP-Homologie-1)-Domäne, welche der EVH1 (Ena- und VASP-Homologie-1)-Domäne der Ena/VASP-Protein-Familie ähnelt. WAVE/Scar-Proteine enthalten stattdessen die WHD (WAVE-Homologie)-Domäne. Die WH1-Domänen von WASP und N-WASP binden an Prolin-reiche Motive wie z.B. in WIP (WASP-interagierendes Protein; Ramesh *et al.*, 1997), während die WHD-Domäne von WAVE eine Interaktionsoberfläche für Abi (*Abelson interactor*)-Proteine darstellt (Innocenti *et al.*, 2004). Aufgrund der stetig wachsenden Anzahl von Bindungspartnern spielen WASP und N-WASP in einer Vielzahl Aktin-abhängiger Prozesse eine zentrale Rolle. WASP und N-WASP können über ihre zentrale GTPase-bindende Domäne (GBD) direkt an aktiviertes Cdc42 binden. Diese Bindung führt zu einer Entfaltung bzw. Konformationsänderung von WASP und N-WASP, so dass die VCA-Domäne den Arp2/3-Komplex binden und aktivieren kann. Im Gegensatz zu WASP und N-WASP sind die WAVE-Proteine in den Rac-Signalweg eingebunden, enthalten aber keine GBD-Domäne und binden daher nicht direkt an diese GTPase (Miki *et al.*, 1998).

1.4.3 Ena/VASP-Proteine

Ena/VASP-Proteine sind eine konservierte Familie von regulatorischen Proteinen, die die F-Aktin-Dynamik steuern und sich aus den EVH1-, EVH2-Domänen und einer Prolin-reichen zentralen Region zusammensetzen (Sechi & Wehland, 2004). Sie beeinflussen Aktin-basierte Prozesse, wie z.B. Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion (Ahern-Djamali *et al.*, 1998; Vasioukhin *et al.*, 2000; Collard *et al.*, 2002; Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002), Thrombozyten Aktivierung (Aszodi *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1999), Axon-Führungsprozesse (Bashaw *et al.*, 2000) und die Motilität sowohl von Zellen (Bear *et al.*, 2000; Machesky, 2000; Reinhard *et al.*, 2001; Loureiro *et al.*, 2002) als auch die des pathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes* (Niebuhr *et al.*, 1997; Laurent *et al.*, 1999; Loisel *et al.*, 1999; Geese *et al.*, 2002). Die Ena/VASP-Familie besteht aus *Drosophila* Ena (*enabled*; Gertler *et al.*, 1995), *Caenorhabditis* Unc-34, *Dictyostelium* DdVASP und den drei Familien-Mitgliedern, die in Säugetieren vorkommen: VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein), Mena (*mammalian ena*; Gertler *et al.*, 1996) und Evl (*Ena-VASP-like*; Gertler *et al.*, 1996). VASP wurde ursprünglich als Substrat der cAMP- und cGMP- abhängigen Proteinkinasen (PKA und PKG) in humanen Thrombozyten identifiziert (Halbrugge *et al.*, 1990; Halbrugge & Walter, 1989), wobei die VASP-Phosphorylierung mit einer Hemmung der Blutplättchenaggregation korreliert (Nolte *et al.*, 1991; Butt *et al.*, 1994; Aszodi *et al.*, 1999). Ena wurde als Supressor einer Abelson-Tyrosin-Kinase (Abl)-Mutation identifiziert (Gertler *et al.*, 1990) und ist in die Wachstumsverzögerung von

Axonen involviert (Bashaw *et al.*, 2000). Evl wurde wie Mena aufgrund von Sequenzhomologien zu Ena identifiziert (Gertler *et al.*, 1996). Alle Mitglieder der Ena/VASP-Proteinfamilie besitzen eine einheitliche, dreigeteilte Domänenstruktur bestehend aus einer N-terminalen Ena- und VASP-Homologie-1 (EVH1)-Domäne und einer C-terminalen EVH2-Domäne, die durch eine Prolin-reiche Region voneinander getrennt sind (Haffner *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996). Ena/VASP-Proteine binden über die EVH1-Domäne Prolin-reiche Liganden, wie die Fokalen-Kontakt-Proteine Vinculin (Reinhard *et al.*, 1996) und Zyxin (Reinhard *et al.*, 1995b), das Adaptorprotein Fyb/Slap (Krause *et al.*, 2000; Obergfell *et al.*, 2001), sowie WASP (Castellano *et al.*, 2001) und das *Listerien* Oberflächenprotein ActA (Niebuhr *et al.*, 1997). Die Prolin-reiche Region der Ena/VASP-Proteine interagiert mit SH3-Domänen (Ahern-Djamali *et al.*, 1998), sowie mit dem G-Aktin-bindenden Protein Profilin (Reinhard *et al.*, 1995a). Die EVH2-Domäne vermittelt, neben der Tetramerisierung und Hetero-Oligomerisierung, sowohl die Bindung an G- als auch an F-Aktin (Bachmann *et al.*, 1999; Walders-Harbeck *et al.*, 2002). Die Ena/VASP-Proteine sind mit den Minus-Enden der Aktinfilamente assoziiert und lokalisieren in Regionen dynamischer Aktin-Polymerisation und -Reorganisation (Reinhard *et al.*, 1995a; Rottner *et al.*, 1999; Bear *et al.*, 2000), wie z.B. an den Spitzen von Filopodien (Svitkina *et al.*, 2003) und am äußersten Rand sich fortbewegender Lamellipodien (Rottner *et al.*, 1999), sowie an anderen Aktin-abhängigen intrazellulären Strukturen, wie Zell-Zell-Kontakten (Vasioukhin *et al.*, 2000; Comerford *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2002), Fokaladhäsionen und Stressfasern. Die Ena/VASP-Proteine scheinen demnach für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts von großer Bedeutung zu sein und stellen wahrscheinlich ein Bindeglied zwischen Signaltransduktionswegen und dem Aktin-Zytoskelett dar (Krugmann *et al.*, 2001; Krugmann *et al.*, 2001; Garcia Arguinzonis *et al.*, 2002; Grosse *et al.*, 2003; Trichet *et al.*, 2008).

1.4.4 Cortactin

Eine besondere Rolle bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts spielt das multifunktionelle Protein Cortactin. Cortactin wurde vor über 15 Jahren als Aktinfilament-Bindeprotein und Hauptsubstrat der onkogenen Tyrosin-Kinase v-Src (*viral sarcoma*) entdeckt (Wu *et al.*, 1991; Wu & Parsons, 1993) und gilt mittlerweile als ein zentrales Signalprotein, das an zahlreichen Aktin-basierten zellulären Prozessen beteiligt ist (Abb. 3), wie z.B. an Zelladhäsion (Vuori & Ruoslahti, 1995), Endozytose (Schafer *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2003; Sauvonnnet *et al.*, 2005), Zellwanderung (Huang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999), Tumordinvasion (Weaver, 2008), synaptischer Organisation (Redecker *et al.*, 2001; Racz & Weinberg, 2004) und Zellmorphogenese (Hou *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999). Bei diesen Prozessen wirkt Cortactin als Adaptorprotein und interagiert mit Bestandteilen verschiedener Signaltransduktionswege. Diese Funktionen werden durch die einzelnen Domänen des Proteins ausgeübt und durch extrazelluläre Stimuli ausgelöst. Die Cortactin-Familie besteht aus zwei Gen-Produkten: das ubiquitär exprimierte Cortactin mit seinen

alternativen Splice-Varianten und das HS1-Protein (*hematopoietic lineage cell-specific protein 1*), das nur in Blutzellen vorkommt. Menschliches Cortactin ist durch das *CTTN*-Gen (früher als *EMSI* bezeichnet) kodiert, welches auf der Chromosom-Region 11q13 lokalisiert ist. Dieser Genabschnitt ist häufig in verschiedenen humanen Krebsarten (wie z.B. Brust-, Lungen- und Leberkrebs) amplifiziert, d.h. in erhöhter Kopiezahl vorhanden, und geht mit einer Überexpression von Cortactin einher. Cortactin scheint zudem eine entscheidende Rolle bei der Wanderung von Tumorzellen und Metastasen zu spielen. Eine der Hauptfunktionen von Cortactin ist die Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch die Bindung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes. Neben der direkten Interaktion mit Arp2/3 fördert Cortactin die Aktin-Nukleationsaktivität auch indirekt durch seine SH3-Domäne, die mit zahlreichen Signalmolekülen interagieren kann. Einer dieser Bindungspartner ist N-WASP, das über seine Prolin-reiche Region direkt an die SH3-Domäne von Cortactin binden kann. Cortactin ist ein Substrat für eine Vielzahl von Kinasen. Zu ihnen gehören die Serin/Threonin-Kinasen PAK (*p21-activated kinase*; Vidal *et al.*, 2002) und die MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase Erk (*extracellular-signal regulated kinase*; Campbell *et al.*, 1999; Martinez-Quiles *et al.*, 2004), die Mitglieder der Src-Tyrosin-Kinase-Familie v-Src, c-Src und Fyn (Wu & Parsons, 1993; Huang *et al.*, 1997; Kapus *et al.*, 1999; Kapus *et al.*, 2000), sowie andere nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie Fer (Kapus *et al.*, 2000; Kim & Wong, 1998) und Syk (Gallet *et al.*, 1999); und die Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Kinase Met (Crostella *et al.*, 2001).

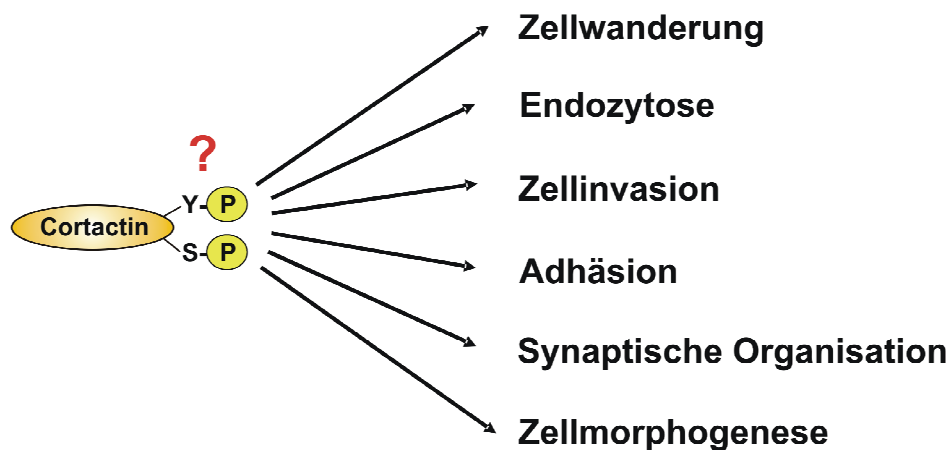


Abbildung 3. Cortactin als ein wichtiger Regulator zahlreicher zellulärer Prozesse

Cortactin ist ein zentrales Signalprotein, das an einer Vielzahl von Aktin-basierten zellulären Prozessen beteiligt ist, wie z.B. an Zellwanderung, Endozytose, Zellinvasion, Adhäsion, synaptischer Organisation und Zellmorphogenese. Cortactin ist ein Substrat für zahlreiche Kinasen, zu denen unter anderem die Tyrosin-Kinase Src und die MAP-Kinase Erk gehören. Die Rolle der Tyrosin-/Serin-Phosphorylierung von Cortactin bei der Regulation seiner Funktionen ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.5 Struktur und zelluläre Funktion von Cortactin

Cortactin ist ein Protein von 546 Aminosäuren (80/85 kDa), dessen molekulare Struktur in Menschen, Nagetieren und Vögeln konserviert ist und eine hohe Sequenzähnlichkeit

zeigt (Wu *et al.*, 1991; Zhan *et al.*, 1993; Schuurin *et al.*, 1993; Ohoka & Takai, 1998; Abb.4). Die N-terminale Region von ungefähr 90 Aminosäuren beinhaltet einen Bereich von 21-22 Aminosäuren, der reich an sauren Resten ist und als N-terminale saure Domäne (NTA, *N-terminal acidic region*) bezeichnet wird. Die NTA-Domäne enthält ein kurzes konserviertes Motiv (DDW), welches funktionell dem VCA-Motiv der WASP-Proteinfamilie entspricht und die Bindung an den Arp2/3-Komplex vermittelt (Weed *et al.*, 2000; Uruno *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2002). Diesem Bereich folgt die F-Aktin-Bindedomäne mit 6,5 Tandemwiederholungen eines 37 Aminosäure-Sequenzmotivs, wobei die vierte Tandemwiederholung die direkte Bindestelle für F-Aktin darstellt (Weed *et al.*, 2000). Den wiederholten Sequenzmotiven folgen eine α -helikalen Domäne von ca. 50 Aminosäuren, eine weniger konservierte Prolin-reichen Region und eine C-terminale Src-Homologie-3 (SH3)-Domäne, welche die Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen vermittelt (Daly, 2004; Abb. 4). Die Prolin-reiche Region enthält drei Tyrosin-Reste (Y-421, Y-466, Y-482), die durch die Src-Kinase phosphoryliert werden können (Huang *et al.*, 1998), sowie zwei Phosphorylierungsstellen der MAP-Kinase Erk an Serin-Resten (S405, S418; Campbell *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist eine PAK-Phosphorylierungsstelle (S-113) im ersten Sequenzmotiv der F-Aktin-Bindedomäne lokalisiert (Webb *et al.*, 2006b; Abb. 4). Man vermutet, dass diese Phosphorylierungsstellen eine regulatorische Funktion für die Aktivität des Proteins besitzen. Nach einem Modell von Martinez-Quiles *et al.* (2004) ist die SH3-Domäne von nicht-phosphoryliertem Cortactin teilweise verdeckt und somit für die Interaktion mit anderen Proteinen nicht frei zugänglich. Interessanterweise enthält die Prolin-reiche Region von Cortactin zwei benachbarte PxxP-Motive, die als Bindestellen für die SH3-Domäne dienen können. Demnach könnte die SH3-Domäne eine intramolekulare Bindung mit der Prolin-reiche Region eingehen. Da sowohl die Serin- als auch die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von Cortactin in dieser Region lokalisiert sind, könnte durch Veränderungen in der Phosphorylierung die SH3-Domäne wieder freigesetzt werden. In der Tat konnte durch *in vitro*-Experimente gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierung der Serinreste 405 und 418 die Fähigkeit von Cortactin die N-WASP-vermittelte Aktin-Polymerisation zu stimulieren stark erhöht wurde (Martinez-Quiles *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde diese Aktivität durch die Phosphorylierung der Tyrosine 421, 466 und 482 stark reduziert und unterdrückte sogar Serin-phosphoryliertes Cortactin. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Phosphorylierung der Serine die PxxP-SH3-Interaktion unterbricht, eine Konformationsänderung hervorruft und so die SH3-Domäne für Bindungspartner, wie N-WASP, frei zugänglich macht. Die Phosphorylierung der Tyrosine hingegen könnte eine andere Konformation hervorrufen, die die Interaktionen mit der SH3-Domäne beendet. Nach diesem Modell könnte die Erk/Src-Phosphorylierung von Cortactin als ein molekularer Schalter agieren, der die Fähigkeit N-WASP zu aktivieren, kontrolliert (Martinez-Quiles *et al.*, 2004; Selbach & Backert, 2005).

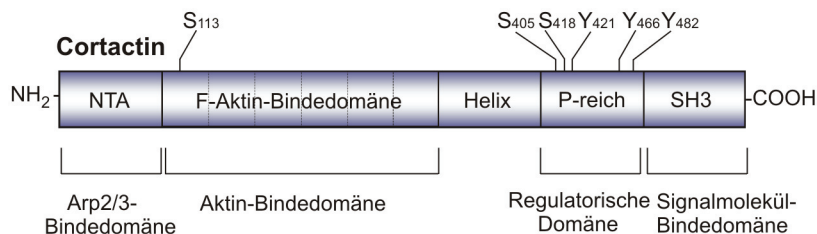


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Cortactin

Cortactin kann in verschiedene Domänen unterteilt werden, die jeweils mit unterschiedlichen Signalmolekülen interagieren. Die N-terminale saure (NTA)-Domäne bindet und aktiviert den Arp2/3-Komplex. Die F-Aktin-Bindedomäne ist für die Arp2/3-Aktivierung erforderlich und befindet sich in den wiederholten Sequenzmotiven, wobei die vierte Tandemwiederholung die direkte Bindestelle für F-Aktin darstellt. Die Prolin-reiche Region enthält Phosphorylierungsstellen für Serin-/Threonin-Kinasen und Src-Kinase. Die SH3-Domäne kann mit zahlreichen Proteinen interagieren, die an der Aktin-Polymerisation, Zell-Zell-Adhäsion und Membrandynamik beteiligt sind. P = Prolin; S= Serin; Y = Tyrosin

Cortactin fungiert, wie die Proteine der WASP/WAVE-Familie, als ein NPF (*nucleation promoting factor*) für Arp2/3 (Urano *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2001). NPFs sind eine Klasse von Proteinen, die den Arp2/3-Komplex durch direkte Bindung aktivieren können, was in einer Konformationsänderung des Arp2/3-Komplexes resultiert und die Aktin-Nukleation und Filament-Elongation ermöglicht (Welch & Mullins, 2002). Interessanterweise erfordert die NPF-Funktion von Cortactin sowohl die NTA-Domäne als auch die Aktin-Bindedomäne von Cortactin, was verdeutlicht, dass die beiden Interaktionspartner F-Aktin und Arp2/3 für eine effiziente Aktin-Polymerisation wichtig sind (Weaver *et al.*, 2001). Zudem stabilisiert die Bindung von Cortactin an Arp2/3 in F-Aktin-Verzweigungspunkten die Verbindungsstellen und verhindert einen Zusammenbruch des verzweigten Netzwerks. Somit ist Cortactin sowohl an der Verzweigung von Aktin-Filamenten, als auch an der Stabilisierung entstehender F-Aktin-Netzwerke beteiligt (Urano *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2001). Obwohl die Cortactin-vermittelte Arp2/3-Aktivierung schwächer ist, als die von N-WASP, unterstützt Cortactin N-WASP bei der Aktivierung von Arp2/3, wodurch die N-WASP-vermittelte Aktin-Nukleation verstärkt wird (Weaver *et al.*, 2001). Wie N-WASP und Cortactin zusammenarbeiten, um die Arp2/3-Aktivierung zu initiieren ist zum Teil umstritten. Möglicherweise binden und aktivieren Cortactin und N-WASP gleichzeitig den Arp2/3-Komplex und bilden einen ternären Komplex aus Arp2/3-VCA-NTA, was in einer verstärkten NPF-Aktivität resultiert (Weaver *et al.*, 2002). Alternativ könnte die Aktivierung von Arp2/3 durch Cortactin und N-WASP auch sequentiell erfolgen. Cortactin besitzt eine höhere Bindungsaffinität für den aktivierten Arp2/3-Komplex an Verzweigungspunkten, verglichen mit nicht-aktivierten, nicht-Aktin-assoziiertem Arp2/3 (Urano *et al.*, 2003). Nachdem Arp2/3 durch N-WASP aktiviert wurde, könnte Cortactin effektiv binden und N-WASP am Arp2/3-Komplex ersetzen (Urano *et al.*, 2003). Ob auf zellulärer Ebene eine oder beide Mechanismen zur Aktivierung von Arp2/3 zum Einsatz kommen, bleibt zu untersuchen.

Cortactin stellt ein Schlüsselprotein dar, das an der Koordination von Membrandynamik und Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist. In der Tat ist

Cortactin überall dort in der Zelle zu finden, wo Veränderungen im kortikalen Aktinzytoskelett bedeutende Membranvorgänge auslösen, verändern oder begeleiten, wie z.B. in Lamellipodien (Weed *et al.*, 1998; Bryce *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1999), in Invadopodien (Bowden *et al.*, 1999; Bowden *et al.*, 2006), in Podosomen (Destaing *et al.*, 2003; Linder & Aepfelbacher, 2003), an interzellulären Kontakten (El Sayegh *et al.*, 2004; El Sayegh *et al.*, 2005); an endozytotischen Vesikeln (Kaksonen *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2001), an der Eintrittsstelle von intrazellulären Pathogenen (Cossart & Sansonetti, 2004; Kapitel 1.5.2) oder an der Peripherie von mechanisch beanspruchten Zellen (Birukov *et al.*, 2002; Di Ciano *et al.*, 2002). Der gemeinsame Nenner dieser verschiedenen Prozesse ist offenbar nicht nur die Anwesenheit von F-Aktin, sondern die Ausbildung einer dynamischen Verbindung zwischen Membran und Zytoskelett, zumal andere F-Aktin-reiche Strukturen, wie z.B. Stressfasern, kein Cortactin enthalten.

Podosomen und Invadopodien sind spezialisierte, hoch dynamische adhäsive Strukturen, die von verschiedenen Zelltypen, einschließlich Krebszellen, gebildet werden und am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Gimona *et al.*, 2008). Podosomen findet man üblicherweise in nicht-karzinösen Zelltypen, dessen normale Funktion Zellinvasion erfordert, wie z.B. in Makrophagen und Osteoklasten. Wichtige Moleküle bei der Bildung von Podosomen sind die Proteine der WASP-Familie, welche eine schnelle Aktin-Polymerisation induzieren, die für die Ausbildung von Zellausstülpungen erforderlich ist (Linder *et al.*, 1999; Mizutani *et al.*, 2002). Zudem sind zahlreiche Bindungspartner von N-WASP an der Podosomen-Bildung beteiligt, wie z.B. Nck, WIP und Cortactin (Linder & Aepfelbacher, 2003). Die Rolle von Cortactin in Podosomen wurde anhand von glatten Gefäßmuskelzellen sehr gut untersucht. Die Expression einer konstitutiv-aktiven Src-Mutante resultierte in der Entstehung von Cortactin-enthaltenden Podosomen und erhöhte die Tyrosin-Phosphorylierung von Cortactin an den Src-Phosphorylierungsstellen (Zhou *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse wurden von Tehrani *et al.* (2006) bestätigt, die zeigten, dass in Osteoklasten die Tyrosin-Phosphorylierung von Cortactin für die normale Podosomen-Funktion, wie z.B. der Knochenresorption, erforderlich ist. Zudem wurde durch jüngste Untersuchungen gezeigt, dass Cortactin für die Podosomen-Bildung essentiell ist und dass die Translokation von Cortactin zu frühen Podosomen eine intakte N-WASP-bindende SH3-Domäne erfordert (Webb *et al.*, 2006a). Die Aktin-Bindedomäne von Cortactin ist an der späten Phase der Podosomen-Bildung beteiligt.

Invadopodien sind Aktin-reiche, Finger-ähnliche Membranausstülpungen, die in die umgebende extrazelluläre Matrix eindringen und proteolytische Enzyme, wie Matrix-Metalloproteasen, enthalten (Ayala *et al.*, 2006; Stylli *et al.*, 2008). Invadopodien sind bei Krebszellen zu finden und dienen z.B. metastasenbildenden Tumorzellen dazu, die Basalmembran zu durchdringen. Cortactin ist für die Bildung und Funktion von Invadopodien erforderlich (Artym *et al.*, 2006). Cortactin ist in Invadopodien stark angereichert und bildet dort einen Komplex mit Paxillin und Protein-Kinase C μ (Bowden *et al.*, 1999). Zudem wurde gezeigt, dass die Mikroinjektion von Anti-Cortactin-Antikörpern den Matrix-Abbau an Invadopodien unterdrückt (Bowden *et al.*, 1999) und dass die Herunterregulierung von Cortactin die

Bildung dieser Strukturen inhibiert (Artym *et al.*, 2006). Cortactin ist in aktiven Invadopodien stark Tyrosin-phosphoryliert und der Grad dieser Tyrosin-Phosphorylierung ist direkt proportional zur proteolytischen Aktivität der Invadopodien (Bowden *et al.*, 2006).

Lamellipodien sind dünne, flache Membranausläufer, die der Fortbewegung von Zellen dienen. Diese dynamischen Zellstrukturen enthalten eine polarisierte Anordnung von Aktinfilamenten, die ein orthogonal vernetztes Aktin-Netzwerk bilden (Small *et al.*, 2008). Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF und EGF; Weed *et al.*, 1998; Kempniak *et al.*, 2005), Spingosin-1-Phosphat (Lee *et al.*, 2006) und hyperosmotischer Schock (Di Ciano *et al.*, 2002) befördern Cortactin, vermutlich über die Aktivierung der GTPase Rac (Weed *et al.*, 1998), zur Zellperipherie und induzieren seine Akkumulation in Lamellipodien und Membranausstülpungen (*membrane ruffles*). Die Tyrosin-Phosphorylierung von Cortactin ist für diesen Prozess nicht erforderlich (Di Ciano *et al.*, 2002; Head *et al.*, 2003). Da Cortactin bei der Zellwanderung und -bewegung eine wichtige Rolle spielt, lässt sich vermuten, dass es für die Bildung von Lamellipodien unabdingbar ist. Überraschenderweise konnte dieses in nachfolgenden Untersuchungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Somit ist die genaue Rolle von Cortactin in der Lamellipodien-Dynamik noch unklar und nicht frei von Widersprüchen. Bryce *et al.* (2005) zeigte z.B., dass Cortactin für die Persistenz von Lamellipodien notwendig ist, d.h. in Abwesenheit von Cortactin waren die peripheren Membranausstülpungen instabil und zogen sich schnell wieder zurück. Im Gegensatz dazu, ergaben Untersuchungen von Kempniak (2005), dass Brust-Tumorzellen bei der Herunterregulierung von Cortactin verstärkt EGF-induzierte Lamellipodien-ähnliche Ausläufer aufwiesen, wenngleich ihre gesamte Beweglichkeit geringer war. Wiederum andere Ergebnisse mit den gleichen Zelltypen zeigten nach Herunterregulierung von Cortactin eine starke Verminderung der Lamellipodien-Ausläufer, die durch Retransfektion von Cortactin wieder hergestellt werden konnte (Cosen-Binker & Kapus, 2006). Die hier dargestellten Unstimmigkeiten könnten teilweise auf dem Ausmaß der Cortactin-Runterregulierung beruhen. In der Tat, wurde kürzlich gezeigt, dass die durch Abbau (Proteolyse) entstehenden fokalen Änderungen der Cortactin-Konzentration ein wichtiger regulatorischer Faktor in der Zellmotilität sein können.

Des Weiteren ist Cortactin auch an der Organisation von interzellulären Kontakten beteiligt, zu denen die Schließverbindungen (*Tight Junctions*) und Adhäsionsverbindungen (*Adherens Junctions*) gehören. *Tight Junctions* zwischen Epithelzellen haben zweierlei Funktionen. Zum einen dienen sie als Diffusionsbarriere für einige Membranproteine (und -lipide) zwischen den apikalen und basolateralen Bereichen der Plasmamembran und zum anderen dichten sie benachbarte Zellen gegeneinander ab. *Tight Junctions* bestehen aus Transmembran-Kontaktproteinen wie z.B. den Occludinen und ihren intrazellulären Bindungspartnern, vorwiegend die Mitglieder der Zonula Occludens (ZO)-Familie (Stevenson & Keon, 1998). Es wurde gezeigt, dass die Cortactin SH3-Domäne an die Prolin-reiche Region von ZO-1 bindet

(Katsube *et al.*, 1998). Obwohl wenig über die Funktion von Cortactin an *Tight Junctions* bekannt ist, so sprechen einige funktionelle Studien für eine aktive Rolle.

Adhäsionsverbindungen verbinden Aktinfilamente von Zelle zu Zelle und bestehen aus Cadherinen (Tepass, 2002). Cadherine sind transmembrane Adhäsionsproteine, die in der Plasmamembran jeder interagierenden Zelle Homodimere bilden. Die intrazellulären Bereiche der Cadherine binden an Ankerproteine (wie z.B. α -, β - und γ -Catenine), die sie mit den Aktinfilamenten verknüpfen. Es wurde gezeigt, dass Cortactin zu Zell-Zell-adhäsiven Kontakten rekrutiert wird und mit E-Cadherin (Epithelzellen) und N-Cadherin (Fibroblasten) in entstehenden Adhäsionsverbindungen interagiert. Die Herunterregulierung von Cortactin oder die Transfektion von Epithelzellen mit Aktin- oder Arp2/3-bindedefizienten Cortactin-Mutanten inhibierte die Ausweitung der Kontaktzone zwischen benachbarten Zellen (Helwani *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Cortactin an der Biogenese von epithelialen Adhäsionsverbindungen beteiligt ist. Zudem könnte Cortactin auch die Permeabilität und Dynamik von vollständig ausgebildeten Adhäsionsverbindungen regulieren, da die Herunterregulierung von Cortactin in Endothelzellen die Transmigration von polymorphkernigen Leukozyten durch die Endothel-Einfachschicht verminderte (Yang *et al.*, 2006).

Obwohl Cortactin bei allen zuvor erwähnten Prozessen eine Rolle spielt, ist seine genaue Funktion *in vivo* weitgehend unbekannt. Darüber hinaus ist die Rolle der Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierung von Cortactin bei der Regulation seiner Funktion, Lokalisation und Interaktion mit anderen Proteinen längst noch nicht vollständig aufgeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.5.1 Bindungspartner von Cortactin

Cortactin kann als ein zelluläres Gerüstprotein angesehen werden, das verschiedene Proteine zum Ort der Aktin-Polymerisation rekrutiert. Während die N-terminale Hälfte von Cortactin für die direkte Bindung des Arp2/3-Komplexes und F-Aktin erforderlich ist, kann seine C-terminale Hälfte mit zahlreichen Signalmolekülen interagieren. Diese sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt. Für die Interaktionen spielt die SH3-Domäne von Cortactin eine zentrale Rolle, da sie mit den Prolin-reichen Regionen der verschiedenen Proteine interagieren und so die diversen Funktionen von Cortactin vermitteln kann. Zu den SH3-Bindungspartnern gehören unter anderem das Arp2/3-stimulierende Wiskott-Aldrich-Protein N-WASP (Mizutani *et al.*, 2002) und das WASP-interagierende Protein WIP (Kinley *et al.*, 2003), das MIM (*missing in metastasis*)-Protein (Lin *et al.*, 2005), die endozytische GTPase Dynamin-2 (McNiven *et al.*, 2000), das Cortactin-CD2-assoziierte Protein (CD2AP; Lynch *et al.*, 2003), das *Tight Junction*-Protein ZO-1 (Katsube *et al.*, 1998), das synaptische Adaptorprotein Shank2 (Du *et al.*, 1998), der Cdc42-aktivierende Guaninnukleotid-Austauschfaktor FGD1 (Hou *et al.*, 2003), das Gehirn- und Milchdrüsen-spezifisches Cortactin-Bindeprotein CBP90 mit unbekannter Funktion (Ohoka & Takai, 1998; Imaoka *et al.*, 2002), und die Kontraktilität-verstärkende Myosin-Leichtketten-Kinase MLCK (Dudek

et al., 2002). Diese Auflistung zeigt deutlich, dass eine bemerkenswert große Anzahl von verschiedenen Prozessen Cortactin als Bindeglied zur Reorganisation des Zytoskeletts nutzt.

Neben der direkten Interaktion mit Arp2/3 über seine NTA-Domäne, fördert Cortactin die Aktin-Nukleationsaktivität auch indirekt über seine SH3-Domäne. Die SH3-Domäne von Cortactin bindet direkt an eine Prolin-reiche Region von N-WASP und setzt N-WASP aus seinem autoinhibitorischen Zustand frei, was in der N-WASP-vermittelten Arp2/3-Nukleationsaktivität resultiert (Mizutani *et al.*, 2002; Martinez-Quiles *et al.*, 2004). Die Interaktion von Cortactin und N-WASP begünstigt die Lokalisation von N-WASP an Orte der Aktin-Polymerisation innerhalb von Invadopodien und Podosomen (Mizutani *et al.*, 2002) und verstärkt die Zellbewegung (Kowalski *et al.*, 2005). Das WASP-interagierende Protein WIP bindet ebenfalls an die SH3-Domäne von Cortactin und verstärkt die Cortactin-vermittelte Arp2/3-Aktivierung (Kinley *et al.*, 2003). Die maximale Arp2/3-Aktivität wird erreicht, wenn der Cortactin-WIP-Komplex mit Aktinfilamenten assoziiert ist. Dieses könnte für eine neuartige Rolle von Cortactin sprechen, WIP mit bereits vorhandenen Filamenten in Verbindung zu bringen. WIP inhibiert auch die Depolymerisation von Aktinfilamenten, was in der Stabilisierung von Aktin-Verzweigungspunkten resultiert (Martinez-Quiles *et al.*, 2001). Die Cortactin SH3-Domäne bindet weiterhin Proteine, die an der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt sind, und zwar die GTPase Dynamin-2 und CD2AP (McNiven *et al.*, 2000; Schafer *et al.*, 2002; Krueger *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005). Cortactin und Dynamin-2 regulieren die Abschnürung Clathrin-beladener Partikel (Cao *et al.*, 2003) und sind auch an der Clathrin-unabhängigen Endozytose beteiligt (Sauvonnet *et al.*, 2005). Die Interaktion zwischen Cortactin und Dynamin-2 erfordert Aktin-Polymerisation. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Arp2/3-vermittelte Aktin-Polymerisation die Zugänglichkeit von Cortactin für Dynamin-2 reguliert (Zhu *et al.*, 2005). Die Interaktion wird durch die SH3-Domäne von Cortactin und zwei Motiven innerhalb der Prolin-reichen Region von Dynamin vermittelt (McNiven *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005). Die Dynamin-Cortactin-Interaktion ist jedoch nicht auf die endozytische Maschinerie limitiert, sondern sie ko-lokalisieren auch im Golgi-Apparat (Cao *et al.*, 2005), in Invadopodien, Podosomen und Lamellipodien (Orth & McNiven, 2003). Dynamin-2 erleichtert die Aktin-Nukleationsaktivität von Cortactin (Schafer *et al.*, 2002) und hat einen erheblichen Einfluss auf die Lamellipodien-Kinetik und die Festlegung der Zellform (McNiven *et al.*, 2000; Krueger *et al.*, 2003). Das CD2-assoziierte Proteine (CD2AP) ist ein SH3-Domäne-enhaltendes Adaptorprotein, das zuerst aufgrund seiner Interaktion mit CD2-Adhäsionsmolekülen in T-Lymphozyten identifiziert wurde (Dustin *et al.*, 1998). Die Interaktion von Cortactin mit CD2AP steht in Verbindung mit EGF-Signalwegen, da die Assoziation dieser beiden Moleküle durch EGF-Behandlung induziert werden konnte (Lynch *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Cortactin zu einem Komplex aus EGFR, Cbl, CD2AP und Endophilin rekrutiert wird, was darauf hindeutet, dass Cortactin möglicherweise an der Maschinerie zur Herunterregulierung von EGFR mitwirkt (Lynch *et al.*, 2003).

Tabelle 1. Bindungspartner von Cortactin*

(A) Bindungspartner der Cortactin SH3-Domäne			
Protein	Funktion	Bindungsstelle	Referenz
AMAP1	GTPase-aktivierendes Protein	824-KKRPPPPPPGHKR	Onodera <i>et al.</i> , 2005
BK channel	Calcium-aktivierter Kaliumkanal	653-RNSPNTSP 664-RHDPLLIP	Tian <i>et al.</i> , 2006
BPGAP1	GTPase-aktivierendes Protein	182-PPPRPPLP	Lua & Low, 2004
Caldesmon	Aktin-Bindeprotein	AA 4-147	Huang <i>et al.</i> , 2006
CBP90	Unbekannt	539-PPPIPPCKP	Ohoka & Takai, 1998
CD2AP	Adapterprotein	381-KPAAPQVP 392-KPTAPTKA	Lynch <i>et al.</i> , 2003
CortBP/ Shank2	Gerüstprotein	946-KPPVPPKP	Du <i>et al.</i> , 1998
Dynamin 2	GTPase	826-PPQIPSRP 847-RRAPAAPSRPTIIRP	McNiven <i>et al.</i> , 2000
Fgd1	Guaninnukleotid-Austauschfaktor	158-KPQVPPKP	Hou <i>et al.</i> , 2003
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase	972-PPPKPATP	Dudek <i>et al.</i> , 2002
N-WASP	Cdc42-GTP-Effektor	n.b.	Weaver <i>et al.</i> , 2002
WIP	Adaptorprotein	n.b.	Kinley <i>et al.</i> , 2003
Zo-1	Gerüstprotein	1019-PSGPLKP 1194-KPVPPPCKP	Katsube <i>et al.</i> , 1998
(B) Cortactin-Bindungspartner mit unbekanntem Interaktionen			
Protein	Funktion	Bindungsstelle	Referenz
Alix	Adaptorprotein	AA 436-609	Pan <i>et al.</i> , 2006
E- und N-Cadherin	Adhäsionsmoleküle	n.b.	El Sayegh <i>et al.</i> , 2004 Helwani <i>et al.</i> , 2004
Hax-1	Unbekannt	AA 27-66	Suzuki <i>et al.</i> , 1997
MIM	Aktin-Bindeprotein	n.b.	Lin <i>et al.</i> , 2005
Phox-47	Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase	n.b.	Touyz <i>et al.</i> , 2005
Syk	Tyrosinkinase	n.b.	Maruyama <i>et al.</i> , 1996
TEM-7	Tumormarkerprotein	471-GITAVALYDYQ	Nanda <i>et al.</i> , 2004

n.b. = nicht bestimmt

* verändert nach Buday & Downward (2007)

1.5.2 Rolle von Cortactin in mikrobiellen Infektionen

Zahlreiche pathogene Mikroorganismen nutzen das Aktin-Zytoskelett innerhalb ihres eukaryontischen Wirtes für ihre Zwecke aus (Galan & Collmer, 1999; Gruenheid & Finlay, 2003; Cossart & Sansonetti, 2004; Rottner *et al.*, 2005; Selbach & Backert, 2005; Backert & Selbach, 2005). Dadurch ermöglichen sie Prozesse, wie z.B. die Anheftung und den Eintritt in die Wirtszelle, die Bewegung innerhalb und zwischen den Zellen, die Bildung von Vakuolen sowie die Vermeidung von Phagozytose (Tab. 2). Die Forschung an diesen Mikroorganismen lieferte darüber hinaus wichtige und grundlegende Erkenntnisse zur allgemeinen Funktion des Aktin-Zytoskeletts der eukaryontischen Zelle.

Die Veränderung des Aktin-Zytoskeletts in der Wirtszelle durch Pathogene ist ein komplexer Vorgang, an dem unter anderem die GTPasen der Rho-Familie, Phosphoinositide und Aktin-Bindeproteine beteiligt sind. Unter den zahlreichen Proteinen, die an dem Aktin-zytoskelettalen Netzwerk beteiligt sind, scheint Cortactin ein bevorzugtes Angriffsziel von Mikroben zu sein (Selbach & Backert, 2005). Studien über die molekulare Grundlage von Infektionen mit Pathogenen wie enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC), *Shigellen*, *Helicobacter* und Vaccina Virus, haben gezeigt, dass Cortactin eine entscheidende Rolle in der Invasion, Aktin-basierten Bewegung, Aktinpodest-Bildung und Zell-Zell-Dissoziation spielt (Tab. 2 und Abb. 5). Diese gehen dabei häufig mit einer Veränderung der zellulären Lokalisation von Cortactin und/oder dessen Tyrosin-Phosphorylierung einher. Der Grund, warum Cortactin von einer wachsenden Anzahl an mikrobiellen Pathogenen als Angriffsziel bevorzugt wird, ist wahrscheinlich seine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion (Weed & Parsons, 2001; Daly, 2004). Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, besitzt Cortactin mehrere funktionelle Domänen, die die Bindung und Regulation anderer zellulärer Proteine vermitteln. Somit wurde postuliert das Pathogene, die Cortactin als Angriffsziel nutzen, eine Vielzahl von zellulären Funktionen für ihre Zwecke ausnutzen (Selbach & Backert, 2005).

EPEC sezerniert über ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) das bakterielle Effektor-Protein Tir (translozierter Intimin Rezeptor) in die Wirtszelle (Kenny *et al.*, 1997). Tir wird daraufhin in die Plasmamembran rekrutiert und fungiert dort als Rezeptor für das bakterielle Adhäsin Intimin. EPEC schleust somit in bemerkenswerter Weise seinen eigenen Rezeptor in die Wirtszelle ein. Die intrazelluläre Domäne von Tir wird durch eine Protein-Tyrosin-Kinase der Src- und Abl-Familie der Wirtszelle phosphoryliert (Phillips *et al.*, 2004; Swimm *et al.*, 2004). Zahlreiche Wirtszellproteine, einschließlich Cortactin, werden zu der Adhäsionsstelle rekrutiert und induzieren unter Beteiligung von Nck, WASP oder N-WASP und dem Arp2/3-Komplex Aktin-Polymerisation (Cantarelli *et al.*, 2000; Celli *et al.*, 2000; Lommel *et al.*, 2004). Das polymerisierte Aktin bildet eine einzigartige Ausstülpung an der Zelloberfläche, das so genannte Aktinpodest (Campellone & Leong, 2003). Eine funktionelle Rolle von Cortactin bei der Ausbildung dieser Strukturen wurde durch die Überexpression einer Cortactin-Mutante mit fehlender NTA-Domäne unterstützt. Dabei konnte gezeigt

werden, dass sowohl die Akkumulation von F-Aktin als auch die Podestbildung in dominant negativer Weise inhibiert werden (Cantarelli *et al.*, 2002). Auf der Grundlage von Immunopräzipitationsexperimenten und Bindungs-Assays wird außerdem angenommen, dass Tir direkt an Cortactin bindet (Cantarelli *et al.*, 2002). Unklar ist jedoch, ob die Tir-induzierte Aktin-Polymerisation die direkte Arp2/3-Aktivierung durch die Cortactin NTA-Domäne oder die WASP-Rekrutierung durch die SH3-Domäne beinhaltet. Während der EPEC-Infektion wird Cortactin weder Tyrosinphosphoryliert, noch wird die Rekrutierung von Cortactin durch Src-Inhibierung unterdrückt (Cantarelli *et al.*, 2000).

Zahlreiche Pathogene können in nicht-phagozytische Zellen eindringen und schaffen sich so ihre eigene intrazelluläre Nische im Zytoplasma eukaryotischer Zellen (Cossart & Sansonetti, 2004). Typischerweise lösen sie eine Signalkaskade aus, welche zu einem lokalen Zusammenbau von Aktinuntereinheiten, phagozytischer Zellausstülpungen und letztlich zur Internalisierung des Bakteriums führt. *Shigella flexneri* z.B. nutzt ein Typ-III-Sekretionssystem, das die Effektorproteine Ipa und Ipg in die Eukaryontenzelle injiziert und dadurch zytoskelettale Veränderungen hervorruft (Tran *et al.*, 2000; Suzuki & Sasakawa, 2001). Der erste Nachweis über den Zusammenhang zwischen Cortactin und Wirtszell-Invasion wurde durch die Arbeit von Dehio *et al.* (1995) mit *Shigellen* erbracht. Cortactin wird in einer frühen Phase des Invasionsprozesses zu der bakteriellen Anheftungsstelle rekrutiert, wobei dieses mit einer Zunahme an Cortactin Tyrosin-Phosphorylierung durch Src-Familie-Kinasen korreliert. Die Überexpression von Src erhöhte die Invasion von *S. flexneri*, was darauf hinweist, dass die Src-vermittelte Phosphorylierung von Cortactin in diesem Prozess eine Rolle spielt. Ähnliche Beobachtungen zur Tyrosinphosphorylierung von Cortactin wurden auch während der Infektion und Invasion von *Staphylococcus aureus* gemacht (Agerer *et al.*, 2005). Zahlreiche weitere Studien haben ebenfalls deutlich gemacht, dass die Phosphorylierung von Cortactin durch Src ein immer wiederkehrendes Thema in der Pathogen-Invasion und der Krankheitsentwicklung ist (Tab. 2).

Eine Gruppe nicht-verwandter Pathogene hat eine ähnliche Strategie entwickelt, um das Aktin-Zytoskelett auszunutzen und sowohl Bewegungen innerhalb als auch zwischen den infizierten Zellen zu ermöglichen (Frischknecht & Way, 2001; Backert *et al.*, 2008). An einem Zellpol des Bakteriums wird durch Aktin-Polymerisation ein verzweigtes Aktin-Bündel („Kometenschweif“) erzeugt, welches das Pathogen im Zytoplasma der infizierten Zelle vorwärts treibt. Das ActA-Protein von *Listeria monocytogenes* aktiviert direkt den Arp2/3-Komplex (Welch *et al.*, 1997), *Shigella flexneri* stimuliert Aktin-Polymerisation durch das Oberflächenprotein IcsA, welches N-WASP rekrutiert (Suzuki *et al.*, 1998) und Vaccinia Virus-Partikel werden mittels Mikrotubuli von der perinuklearen Region der Zelle zu der Zellperipherie transportiert (Hollinshead *et al.*, 2001; Rietdorf *et al.*, 2001). Die Wiederherstellung der Aktin-basierten Bewegung von *Listerien* und *Shigellen* unter Verwendung von rekombinanten Proteinen zeigte, dass die Antriebskraft durch Aktin und aktiviertem Arp2/3-Komplex, Aktin-depolymerisierenden Faktor (ADF, oder Cofilin) und dem Kappenprotein

vermittelt wird (Loisel *et al.*, 1999), wobei die Bewegung unter Beteiligung von Profilin, α -Aktinin und VASP noch effektiver ist. Die Rolle von Cortactin wurde dagegen noch nicht detailliert untersucht. *In vivo* wird Cortactin zu den Aktinschweiften von Vaccinia Virus, *Shigellen* und *Listerien* rekrutiert (Frischknecht & Way, 2001). Interessanterweise ist N-WASP nur an der Aktin-Polymerisationsstelle in der Nähe vom Pathogen lokalisiert, während Cortactin im gesamten Aktinschweif zu finden ist. Daher spielt Cortactin möglicherweise bei der Stabilisierung des verzweigten Aktin-Netzwerks eine zentrale Rolle (Zettl & Way, 2001). Nach einem Modell von Uruno *et al.* (2003) interagiert N-WASP mit Arp2/3 und initiiert die Ausbildung der verzweigten Filamente. Sobald die Filamente erzeugt sind, übernimmt Cortactin durch seine Filament-Bindeaktivität eine entscheidende Funktion als Aktivator von Arp2/3. Das Fehlen eines nachweisbaren Phosphotyrosin-Signals in den von *Listerien* und *Shigellen* erzeugten Aktinschweiften deutet darauf hin, dass Cortactin dort zum größten Teil nicht Tyrosin-phosphoryliert wird (Frischknecht *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu, konnte bei Vaccinia gezeigt werden, dass Cortactin an Tyrosinresten durch die Aktivierung von Src phosphoryliert wird. Die Src-vermittelte Phosphorylierung erfordert dabei vermutlich die vorherige Rekrutierung des Vaccinia Aktinschweif-Nukleationskomplexes (Newsome *et al.*, 2004).

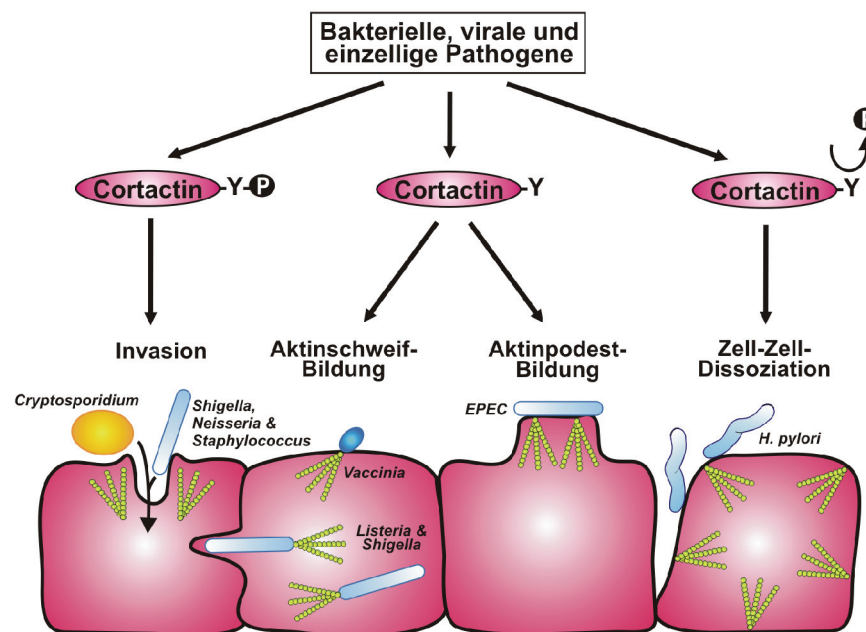


Abbildung 5. Schematische Darstellung der funktionellen Rolle von Cortactin in mikrobieller Pathogenese. Cortactin ist ein zentraler Regulator des Aktin-Zytoskeletts und ist an verschiedenen Pathogen-induzierten Wirtszell-Antworten beteiligt, wie z.B. an bakterieller Invasion, Aktin-basierten Bewegungen, Aktinpodest-Bildung und Zell-Zell-Dissoziation. In vielen Fällen geht dieses mit einer Veränderung der zellulären Lokalisation von Cortactin und/oder dessen Tyrosin-Phosphorylierung einher, wie hier angedeutet (in Anlehnung an Selbach & Backert, 2005)

Das Magenpathogen *Helicobacter pylori* injiziert über ein Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) den Virulenzfaktor CagA (kodiert vom *cytotoxin-associated gene A*) in das Zytoplasma von Magenepithelzellen. Die Infektion mit CagA-positiven

H. pylori-Stämmen ist mit diversen gastrointestinalen Erkrankungen, wie Gastritis, Ulkuskrankheit und Magenkarzinom assoziiert (Peek, Jr. & Blaser, 2002; Marshall & Warren, 1984). Transloziertes CagA wird zu frühen Zeitpunkten der Infektion durch die Src- und Abl-Tyrosinkinasen der Wirtzelle in so genannten EPIYA-Sequenzwiederholungen im C-Terminus des Proteins phosphoryliert (Stein *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007). Anschließend interagiert das phosphorylierte CagA mit verschiedenen zellulären Proteinen (Higashi *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2003), unter anderem auch mit Src (Selbach *et al.*, 2003) oder Csk (Carboxyterminale Src-Kinase; Tsutsumi *et al.*, 2003), und inhibiert die katalytische Aktivität von Src durch eine negative Rückkopplungsschleife (Selbach *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung von CagA hat den so genannten „Kolibri“- oder „Elongations“-Phänotyp zur Folge, d.h. die Zellen wandern aufgrund erhöhter Zellmotilität auseinander und bilden lange nadelähnliche Strukturen aus, die mit dramatischen Aktinzytoskelettalen Veränderungen verbunden sind. Die Src-Inaktivierung führt auch zu einer drastischen Abnahme der Tyrosin-Phosphorylierung von den Src-Substraten Cortactin, Ezrin und Vinculin (Selbach *et al.*, 2003; Selbach *et al.*, 2004; Backert *et al.*, 2004; Moese *et al.*, 2007). Die Befunde in Bezug auf Cortactin sprechen für die Möglichkeit, dass die CagA-induzierte Tyrosin-Dephosphorylierung des Proteins die Aktin-Polymerisation über N-WASP stimulieren könnte (Selbach *et al.*, 2003; Backert *et al.*, 2004; Selbach & Backert, 2005). Tatsächlich ist mit den Dephosphorylierungs-Ereignissen von Cortactin eine Veränderung in dessen subzellulärer Lokalisation verbunden. Cortactin wird dabei zu den Spitzen der Aktin-reichen zellulären Fortsätze rekrutiert (Selbach *et al.*, 2003). Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob Cortactin auch an den bekannten Serinresten phosphoryliert oder dephosphoryliert wird und welche Interaktionspartnern nach Infektion mit *H. pylori* an Cortactin binden. Die molekulare Funktion von Cortactin in der Infektion mit *H. pylori* ist somit noch nicht aufgeklärt.

Tabelle 2. Rolle von Cortactin in Pathogen-induzierten Aktin-zytoskelttalen Veränderungen*

Pathogen	Assoziierte Krankheiten	Pathogener Prozess	Cortactin Lokalisation	Änderung in der Tyrosin-Phosphorylierung ^a	Referenz
EPEC, EHEC	Diarrhöe	Ausbildung von Aktin-podesten	Anheftungsstelle	–	Cantarelli <i>et al.</i> , 2000; Cantarelli <i>et al.</i> , 2002
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis, Geschwüre, Magenkarzinom	Zell-Elongation/ Zell-Zell-Dissoziation	Aktinreiche Ausstülpung	↓	Selbach <i>et al.</i> , 2003; Backert <i>et al.</i> , 2004; Cottet <i>et al.</i> , 2002
<i>Listeria monocytogenes</i>	Blutvergiftung, Hirnhautentzündung, Abort	Aktin-basierte Bewegungen	Aktin-Kometenschweif	– (?)	Frischknecht & Way, 2001; Zettl & Way, 2001
<i>Shigella flexneri</i> Vaccina Virus	blutige Diarrhöe Impfstoff-Stamm (selten pathogen)				
<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	Diarrhöe Blutvergiftung, Hirnhautentzündung	Invasion in Wirtszellen	Invasionsstelle	↑	Chen <i>et al.</i> , 2003 Hoffmann <i>et al.</i> , 2001
<i>Rickettsia conorii</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Mittelmeerfieber Durchfall eiterbildende Infektionen, Lebensmittelvergiftung				Martinez & Cossart, 2004 Bougneres <i>et al.</i> , 2004; Dehio <i>et al.</i> , 1995
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Bindehautentzündung, sexuell übertragbare Krankheiten	Invasion in Wirtszellen?	Einschlusskörper	–	Fawaz <i>et al.</i> , 1997
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hautinfektionen (Furunkel, Karbunkel), bei Immunspress. Personen: Lungenentzündung, Endokarditis, Toxisches Schock-Syndrom (TSS) und Sepsis	Invasion in Wirtszellen	Invasionsstelle	↑	Agerer <i>et al.</i> , 2005

* verändert nach Selbach & Backert (2005)

^a –, keine Veränderung; ↓, Abnahme ↑, Zunahme; – (?), Änderung in der Tyrosin-Phosphorylierung von Cortactin wurde nur indirekt untersucht

2 ZIELSETZUNG

Cortactin ist ein multifunktionelles Aktin-bindendes Protein, das in diversen Signalkaskaden von gesunden und Karzinomzellen, sowie in mikrobiellen Infektionen eine bedeutende Rolle spielt. Als zentraler Regulator des Aktin-Zytoskeletts ist Cortactin an zahlreichen Aktin-basierten zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. an Zelladhäsion, Endozytose, Zellwanderung, Tumordinvasion, synaptischer Organisation und Zellmorphogenese. Über die molekulare Regulation der Funktion von Cortactin war zu Beginn meiner Arbeit nur wenig bekannt. Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Backert untersucht seit vielen Jahren die Wirt/Pathogen-Interaktion in gastrointestinalen Infektionen mit *Campylobacter jejuni*, enteropathogenen *Escherichia coli* und *Helicobacter pylori*. Interessanterweise wurde berichtet, dass die bakterielle Infektion zur Inaktivierung der Src-Tyrosinkinase führt, das mit der Tyrosin-Dephosphorylierung von 80 kDa- und 120 kDa-Wirtszellproteinen einhergeht (Backert *et al.*, 2000). Insgesamt wurden bisher drei dephosphorylierte Aktin-bindende Proteine identifiziert: Cortactin, Ezrin (beide 80 kDa) und Vinculin (120 kDa), die durch die Inaktivierung von Src nicht mehr an Tyrosinresten phosphoryliert werden können (Selbach *et al.*, 2003; 2004; Moese *et al.*, 2007). Die Relevanz dieser Ereignisse für die Infektion ist allerdings unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war folglich, die funktionelle Rolle eines dieser Proteine -Cortactin- in der Infektion mit gastrischen Epithelzellen (AGS-Zellmodell) näher zu untersuchen. Die Resultate zur Cortactin-abhängigen Signaltransduktion könnten somit wichtige neue Ansatzpunkte für die Funktion und Bedeutung dieses wichtigen Signalproteins erbringen und mögliche neue Therapiewege aufzeigen.

3 MATERIAL

3.1 Bakterienstämme

3.1.1 *Helicobacter pylori*-Stämme

Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete *H. pylori*-Stämme*

Stamm	Resistenz	Beschreibung/ Endoskopie	Referenz
P1	---	klinisches Isolat/ <i>Dyspepsie</i>	Schmitt & Haas, 1994
P12	---	klinisches Isolat/ <i>Ulkus duodeni</i>	Schmitt & Haas, 1994
P1 Δ <i>virB11</i>	Cam ^R	Typ IV-Sekretions-Mutante	Backert <i>et al.</i> , 2000
P1 Δ <i>cagA</i>	Cam ^R	<i>cagA</i> -Mutante	Backert <i>et al.</i> , 2000
P12 Δ <i>cagA</i>	Cam ^R	<i>cagA</i> -Mutante	Tammer <i>et al.</i> , 2007

* Die P1 Δ *virB11*-, P1 Δ *cagA*- und P12 Δ *cagA*-Mutanten wurden durch den Einbau einer Chloramphenicol-Kassette in das *virB11*- bzw. *cagA*-Gen erzeugt (Backert *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2003) und wurden von PD Dr. Steffen Backert zur Verfügung gestellt.

3.1.2 *Escherichia coli*-Stamm

TOP10 *F*⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rspL* (Str^R), *endA1*, *nupG* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

3.2 Zellkultur

Zelllinie	Spezies	Abstammung	Herkunft/Referenz
AGS	Human	Adenokarzinom des Magens	ATCC CRL 1739
FAK ^{-/-}	Maus	Fibroblasten aus FAK-defizienten Maus-Embryos	Prof. Dr. Ch. Hauck ; Sieg <i>et al.</i> , 1999

3.3 Nährmedien und Platten

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

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

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

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

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

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

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

Vitamin-Mix: Lösung 1 (500 ml in dd. H₂O)

100 g/l Dextrose; 10 g/l L-Glutamin; 26 g/l L-Cystein; 0,1 g/l Cocarboxylase; 0,02 g/l Fe(NO₃)₃; 0,003 g/l Thiamin-HCl; 0,013 g/l p-Aminobenzoesäure; 0,250 g/l NAD⁺; 0,010 g/l Vitamin B₁₂

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

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

3.4 Chemikalien

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

3.5 Enzyme und Proteine

<i>Bgl</i> III [10U/μl]	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>Dpn</i> I [20U/μl]	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

<i>Hind</i> III [20U/ μ l]	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Klenow-Fragment [5U/ μ l]	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Pferdeserum	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Platinum [®] <i>Taq</i> DNS-Polymerase <i>High Fidelity</i> [5U/ μ l]	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
T4-DNS-Ligase [5U/ μ l]	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
<i>Pst</i> I [20U/ μ l]	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>Sac</i> I [20U/ μ l]	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

3.6 Antikörper

Alle Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

monoklonale Antikörper:

α -phospho-Tyrosin	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
α -HA	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
α -Cortactin	Upstate/Millipore (Billerica, MA, USA)
α -Rac1	Upstate/Millipore (Billerica, MA, USA)
α -Src	Upstate/Millipore (Billerica, MA, USA)
α -GFP	Clontech/TaKaRa (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

polyklonale Antikörper:

α -Aktin	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
α -CagA	AMS Biotechnology (Wiesbaden, Deutschland)
α -phospho-Cortactin (Tyr-421)	Chemicon/Millipore (Billerica, MA, USA)
α -phospho-Cortactin (Tyr-466)	Chemicon/Millipore (Billerica, MA, USA)
α -phospho-Cortactin (Tyr-486)	Chemicon/Millipore (Billerica, MA, USA)
α -phospho-Cortactin (Ser-113)	Biogenes (Berlin, Deutschland)
α -phospho-Cortactin (Ser-405)	Biogenes (Berlin, Deutschland)
α -phospho-Cortactin (Ser-418)	Biogenes (Berlin, Deutschland)

α -phospho-Erk1/2 (Thr-202/Tyr-204)	Cell Signaling Technology (Danvers, MA,USA)
α -phospho-FAK (Tyr-397)	Biosource/Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
α -FAK	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
α -GFP	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
α -GAPDH	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
α -HA	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
α -Integrin- β 1	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
α -Vav2	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
α -N-WASP	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
α -phospho-Pak (Thr-423)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
α -phospho-Src (Tyr-416)	Biosource/Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

Sekundäre Antikörper für Westernblot:

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

Sekundäre Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie:

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

3.7 Größenstandards

Als DNS-Größenstandards dienten 1 kb- oder 100 bp-Leitern von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Als Standards für die molare Masse von Proteinen wurden *prestained* Protein-Marker (10-170 kDa) verwendet (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

3.8 Oligonukleotide

Tabelle 4. Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung von Cortactin- und FAK-Mutanten

Bezeichnung	Sequenz des Oligonukleotids*	verwendet zur Konstruktion von
F-Cortactin-S405D	GAC CCT AGT CCT CAA CCA ATT G	pEGFP-C1-Cortactin S405D
R-Cortactin-S405 wt	TGC AGG GGG CGT CTG CTT CT	
F-Cortactin-S418D	GAC CCC ATC TAT GAG GAT GCA GC	pEGFP-C1-Cortactin S418D
R-Cortactin-S418 wt	GGA GGG TGG TCT GTC TTC AAT T	und S405/418D
F-FAK-P712,713 wt	AGA CCT GGT TAT CCT AGC CCG	FAKΔPR2
R-FAK-P712,713 wt	GCT GGG CTT GGG TGG TGC TTC	
F-FAK-P718,721A	AGA GCT GGT TAT GCT AGC CCG	pcDNA3.1-FAKΔPR1/ΔPR3
R-FAK-P712,713A	GCT GGG CTT GGC TGC TGC TTC	
F-FAK-P882A	GCA GCT GGC CAC CTA AGC AAC	pcDNA3.1-FAKΔPR1/PR4
R-FAK-P879A	TCC AGC GCG AGG AGG TTT CT	
F-Cortactin-S113D	TGC GAC CAA GTG GAC TCG GTC	pEGFP-C1-Cortactin S113D
F1-Cortactin-S113A	TGC GCA CAA GTG GAC TCG GTC	pEGFP-C1-Cortactin S113A
R-Cortactin-S113 wt	GTG CTT GGA AAG CTT CGA CTG G	pEGFP-C1-Cortactin S113D/A
F-Cortactin-Y466D	GTG GAC GAG ACT ACA GAG GCT C	pEGFP-C1-Cortactin Y466D
F1-Cortactin-Y466F	GTG TTC GAG ACT ACA GAG GCT C	pEGFP-C1-Cortactin Y466F
R-Cortactin-Y466 wt	GGG CTC TGA TGT ATA GGT CAG G	pEGFP-C1-Cortactin-Y466D/F

*Basenaustausche im *cortactin*-Wildtyp-Gen sind unterstrichen und in Fettdruck.

3.9 Plasmide

Tabelle 5. In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Chatakteristika	Herkunft/Referenz
pcDNA3.1	CMV-Promoter, T7-Promoter, MCS, BGH PolyA, SV40 ori, f1 ori, SV40 PolyA, pUC ori, Amp ^R , Neo ^R	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pcDNA3.1-FAK wt pcDNA3.1-FAKΔPR1 pcDNA3.1-FAKΔPR1/PR2	pcDNA3.1-Konstrukte, die cDNAs von HA-gekoppelten Wildtyp-FAK oder verschiedenen FAK-Mutanten enthalten	Prof. Dr. Christof Hauck, Universität Konstanz; Sieg <i>et al.</i> , 1999

pEGFP-C1	CMV-Promoter, EGFP, MCS, SV40 polyA, f1 ori, SV40-Promoter, SV40 ori, Neo ^R , Kan ^R , HSV TK PolyA, pUC ori	BD Clontech, Heidelberg, Deutschland
pEGFP-C1-Cortactin wt	Cortactin wt im pEGFP-C1 Vektor	Ruth Wittelsberger aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Backert
pEGFP-C2-Cortactin W22A	Cortactin mit einer W22A-Mutation in der NTA-Domäne	Prof. Narcisa Martinez-Quiles; Martinez-Quiles <i>et al.</i> , 2004
pEGFP-C2-Cortactin Y421/466/486F	Cortactin mit einer Y421F-, Y466F- und Y486F-Mutation	Prof. Narcisa Martinez-Quiles; Martinez-Quiles <i>et al.</i> , 2004
pEGFP-C1-Cortactin Y421/466/486D	Cortactin mit einer Y421D-, Y466D- und Y486D-Mutation	Prof. Narcisa Martinez-Quiles; Martinez-Quiles <i>et al.</i> , 2004
pEGFP-C2-Cortactin S405/418A	Cortactin mit einer S405A- und S418A-Mutation	Prof. Narcisa Martinez-Quiles; Martinez-Quiles <i>et al.</i> , 2004
pEGFP-C1-Cortactin S405/418D/ Δ SH3	Cortactin mit einer S405D- und S418D-Mutation und Deletion der SH3-Domäne	Prof. Narcisa Martinez-Quiles; Martinez-Quiles <i>et al.</i> , 2004
pEGFP-C1-Cortactin S405D	Cortactin mit einer S405D-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S418D	Cortactin mit einer S418D-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S405/418D	Cortactin mit einer S405D- und S418D-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S405/418D/Y466D	Cortactin mit einer S405D-, S418D- und Y466D-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S113/405/418D	Cortactin mit einer S113D-, S405D- und S418D-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S113D	Cortactin mit einer S113D-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S113A	Cortactin mit einer S113A-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S113D/ Δ SH3	Cortactin mit einer S113D-Mutation und Deletion der SH3-Domäne	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin Y466D	Cortactin mit einer Y466D-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin Y466F	Cortactin mit einer Y466F-Mutation	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin S466D/ Δ SH3	Cortactin mit einer Y466D-Mutation und Deletion der SH3-Domäne	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin Δ SH3	Cortactin mit Deletion der SH3-Domäne	diese Arbeit

pEGFP-C1-Cortactin Δ SH3/ Δ PRR	Cortactin mit Deletion der SH3-Domäne und der prolinreichen Region	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin Δ 59-108	Cortactin mit Deletion in der NTA-Domäne	diese Arbeit
pEGFP-C1-Cortactin Δ 6-256	Cortactin mit der Deletion in der NTA-Domäne und F-Aktin-Bindedomäne	diese Arbeit

4 METHODEN

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Verdau von DNS mit Restriktionsendonukleasen

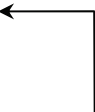
Plasmide wurden sowohl zur Klonierung als auch zur Analyse mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Für eine analytische Spaltung wurden 1-3 µg, für eine präparative Spaltung 5-10 µg DNS eingesetzt. Die Reaktion wurde mit dem Restriktionsenzym in einer Menge von 2-5 U/µg DNS in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert, mit 1/6 Volumen 6x Ladungspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt, auf Agarosegele aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. DNS-Fragmente aus präparativen Ansätzen wurden aus Agarosegelen mit dem Jetsorb *Gel Extraction Kit* (Genomed, Löhne, Deutschland) isoliert und für molekulares Klonieren verwendet.

4.1.2 Ortsspezifische *in vitro*-Mutagenese mittels PCR

Unter *in vitro*-Mutagenese versteht man die Veränderung der Basensequenz eines DNS-Segments ohne phänotypische Selektion. Sie dient zur Struktur- und Funktionsaufklärung, zur zielgerichteten Veränderung von Proteinen und zur Charakterisierung regulatorischer Regionen des Genoms. Die ortsspezifische Mutagenese ermöglicht den gezielten Austausch einzelner Basenpaare (Punktmutationen), um die Bedeutung bestimmter Aminosäuren für die Funktion von Proteinen zu analysieren. Punktmutationen wurden nach der PCR-basierten Methode von Weiner *et al.* (1994) erzeugt. Die Mutationen wurden mittels zweier 5'-phosphorylierter *primer* eingeführt, von denen einer oder beide (bei mehreren Mutationen) die gewünschten Basenaustausche enthielten. Die Hybridisierungspositionen der *primer* wurden dabei so gewählt, dass beide Stränge der Matrizen-DNS in gesamter Länge von der DNS-Polymerase amplifiziert werden. Als *template* diente doppelsträngige Plasmid-DNS. Nach Amplifikation wurde die methylierte *template*-DNS mit *DpnI* abgebaut und die neu synthetisierte DNS wurde mit Hilfe des QIAquick PCR *Purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Überstehende Basen an den 3'-Ende des linearen PCR-Produktes wurden mit *DNS Polymerase I, Large (Klenow) Fragment* (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) entfernt und die so erzeugten glatten Enden wurden mit T4-DNS-Ligase zu einem zirkulären Plasmid intramolekular ligiert. Ein 50 µl PCR-Ansatz enthielt ca. 0,1 ng *template*-DNS, je 200 µM dATP, dCTP, dTTP und dGTP, je 0,2 µM *primer*, 1/10 Volumen 10x *High Fidelity* PCR-Puffer, 2 mM MgSO₄ und 2,5 U Platinum[®] *Taq* DNS-Polymerase *High Fidelity* (Invitrogen,

Karlsruhe, Deutschland). Für den anschließenden Verdau des *templates* wurden 10 U *DpnI* zum PCR-Ansatz hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 6. PCR-Programm für *in vitro*-Mutagenese

Teilschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	2	94	1
Denaturierung	0,5	94	
Annealing	0,5	58	
Elongation	1 min/ 1 kb DNS	68	

4.1.3 Klenow-Reaktion

Die Erzeugung glatter DNS-Enden erfolgte mittels des Klenow-Fragments der DNS-Polymerase I aus *E. coli* (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), das sowohl eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität als auch eine 5'→3'-Polymerase-Funktion besitzt. Je nach Bedarf konnten demnach überhängende 3'-Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments entfernt oder überhängende 5'-Enden aufgefüllt werden. Ein 50 µl Ansatz enthielt 5-10 µg DNS, je 33 µM dATP, dCTP, dTTP und dGTP, 1/10 Volumen 10 x NEB2-Puffer und 1 *unit* Klenow-Fragment pro µg DNS. Die Reaktionsansätze wurden für 15 min bei 25 °C inkubiert und die Reaktion wurde nach Zugabe von 10 mM EDTA durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (5 min bei 70 °C) gestoppt. Die DNS wurde mit Hilfe des QIAquick PCR *Purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt und konnte anschließend für die Ligation verwendet werden.

4.1.4 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligierung von DNS-Fragmenten wurde mit Hilfe des *Rapid DNS Ligation Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 1/5 Volumen des 5x *Rapid Ligation* Puffer, 5 U T4-DNS-Ligase, 50-100 ng Vektor-DNS und das *insert* in einem dreifachen molaren Überschuß zur Vektor-DNS. Der Ligationsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, auf Eis abgekühlt und anschließend direkt zur Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen verwendet. Für die Rezirkulation von linearer DNS wurden 25-50 ng DNS im Ligationsansatz eingesetzt.

4.1.5 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Plasmid-Isolierung aus Bakterien erfolgte mit dem Jetstar *Plasmid Purification Maxi-Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers (Genomed, Löhne, Deutschland). Die Methode beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979) mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNS an ein Anionenaustauscherharz unter niedrigen Salz- und pH-Bedingungen.

4.1.6 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNS

Die Konzentration der Plasmid-DNS wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

4.1.7 DNS-Extraktion aus dem Agarosegel

Mit Hilfe des Jetsorb *Gel Extraction Kit* (Genomed, Löhne, Deutschland) wurden DNS-Fragmente aus Agarosegelen isoliert. In Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze wird Agarose aufgelöst und DNS adsorbiert an Silikat-Materialien, wie z.B. Glas (Vogelstein & Gillespie, 1979). Auf diese Weise lässt sich DNS von Agarose, Salzen, Farbstoffen, Nukleotiden und Proteinen trennen. Bei der Anwendung des Jetsorb Kits wurde nach Herstellerangaben verfahren. Verwendet wurden Agarosegele in TBE-Puffer. Zum Anfärben der DNS-Banden wurde das Gel für 15 min in einer Methyleneblaulösung (0,02 % Methyleneblau in H₂O) geschüttelt und anschließend für 15 min in Wasser entfärbt.

4.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Trennung von DNS-Fragmenten wurde mittels horizontaler Gelelektrophorese durchgeführt. Das Prinzip der gelelektrophoretischen Trennung beruht darauf, dass Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei von der Molekülgröße abhängig, so dass kleinere Fragmente schneller durch das als Molekularsieb wirkende Gel wandern, als größere Fragmente. Durch Anfärben mit Ethidiumbromid können die DNS-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dies ermöglicht die Größenbestimmung von DNS-Molekülen durch Vergleich mit einem Längenstandard.

Für die Herstellung der Agarosegele (8x7 cm²) wurde Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) in TBE-Puffer durch Kochen gelöst und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Die Konzentration der Agarose betrug je nach Größe der aufzutrennenden DNS 0,7 % bis 1,4 %. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer. Die DNS-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x Ladungspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNS-Fragmente wurde parallel der DNS-Längenstandard *GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und konstanter Spannung (10 V/cm) durchgeführt. Die Dokumentation des *DNS*-Gels erfolgte am Lumi Imager F-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

<u>0,5 x TBE-Puffer:</u>	44,5 mM Tris-Base 44,5 mM Borsäure 1 mM EDTA [pH 8,0]	<u>6x Ladungspuffer:</u>	10 mM Tris-HCl [pH 7,6] 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol FF 60 % Glycerol 60 mM EDTA
--------------------------	---	--------------------------	--

4.1.9 DNS-Sequenzierung

Die Nukleotidsequenz aller mittels PCR erzeugten DNS-Fragmente wurde durch Sequenzierung überprüft. Die DNS-Sequenzierungen wurden im Labor von der Dr. Martin Meixner GmbH an der Humboldt-Universität Berlin nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mittels *cycle sequencing* und ABI PRISM[®] 373 DNS-Sequenzern durchgeführt.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die phospho-Serin-spezifischen Cortactin-Antikörper Ser-113, Ser-405 und Ser-418 wurden von der Firma BioGenes (Berlin, Deutschland) hergestellt. Die für die Immunisierung verwendeten Phosphopeptide (1) As 108-118: LSKHC-pS-QVDSV; (2) As 398-411: KTQTPPV-pS-PAPQPT und (3) As 413-423: ERLPS-pS-PVYED wurden ebenfalls von BioGenes hergestellt und an das *Limulus polyphemus* Hämocyanin-Trägerprotein gekoppelt. Es wurden jeweils zwei Kaninchen mit einem der drei Phospho-Peptide immunisiert. Die Antikörper wurden im Labor von PD Dr. Backert auf ihre Spezifität überprüft und mir dann zur Verfügung gestellt.

4.2.2 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation (IP) ermöglicht den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*. Mit Hilfe eines Antikörpers wird ein bestimmtes Protein samt Interaktionspartner aus einem nativen Proteingemisch heraus präzipitiert und kann anschließend im Immunoblot analysiert werden.

Für die IP wurden 1×10^7 AGS-Zellen durch Zentrifugation (5 min, 5.000 rpm, 4 °C) geerntet. Das Pellet wurde mit eiskaltem DPBS (Lonza BioWhittaker, Basel, Schweiz) gewaschen, zentrifugiert (5 min, 5.000 rpm, 4 °C), in 1 ml Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde Protein-G-Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) zweimal mit DPBS und einmal mit Lysispuffer gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift für 5 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die Lysate mit der gewaschenen Protein-G-Sepharose für 2 h bei 4°C auf dem Taumelmischer (Sarmix[®] GM-1, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) inkubiert, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an die Protein-G-Sepharose binden (*preclearing*). Danach wurde die Protein-G-Sepharose aus

der Zellsuspension abzentrifugiert (5 min, 3.000 rpm, 4 °C) und der Überstand mit dem jeweiligen Antikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelmischer inkubiert. Die Antikörper wurden in der angegebenen Konzentration des jeweiligen Herstellers eingesetzt. Die Immunkomplexe wurden mit gewaschener Protein-G-Sepharose für 2 h bei 4 °C auf dem Taumelmischer inkubiert und mittels Zentrifugation (5 min, 5.000 rpm, 4 °C) präzipitiert. Die Präzipitate wurden einmal mit Lysispuffer und dreimal mit 0,5 x DPBS gewaschen und in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse des präzipitierten Proteins und seiner Interaktionspartner erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot.

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

4.2.3 Rac1-Aktivierungs-Assay

Die Aktivierung von Rac1 in infizierten Zellen wurde mit Hilfe des *Rac1 Activation Assay Kit* der Firma Cytoskeleton (Denver, USA) bestimmt. Diese Methode nutzt die Rac1/Cdc42-interaktive Bindedomäne CRIB des Rac1/Cdc42-Effektors PAK (*p21 activated kinase 1*), da das CRIB-Motiv spezifisch an die GTP-gebundene Form von Rac1- und/oder Cdc42 bindet. Die PAK-CRIB-Domäne liegt hierbei in Form eines Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteins vor, so dass der PAK-CRIB/GTP-Rac1 (oder GTP-Cdc42)-Komplex mit Hilfe von Glutathion-Affinitätsbeads präzipitiert werden kann. Dieser Assay stellt somit eine einfache und anerkannte Methode dar, um die Rac1/Cdc42-Aktivierung in Zellen zu quantifizieren. Der Rac1-Aktivierungs-Assay wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

4.2.4 Zelluläre Fraktionierung

Um die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von Proteinen in infizierten und nicht-infizierten Zellen nachzuweisen, wurde die schrittweise Extraktion von drei verschiedenen Proteinfractionen (Zytosol-, Membran- und unlösliche Fraktion) nach der Methode von Kenny & Finlay (1997) durchgeführt.

Für die Fraktionierung wurden mit *H. pylori*-infizierte oder nicht-infizierte AGS-Zellen (5×10^6) durch Zentrifugation (5 min, 5.000 rpm, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde mit eiskaltem DPBS (Lonza BioWhittaker, Basel, Schweiz) gewaschen, zentrifugiert (5 min, 5.000 rpm, 4 °C) und in 100 µl Saponinpuffer resuspendiert, um die Zellen zu

permeabilisieren. Nach 5 min Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (5 min, 10.000 rpm, 4°C) wurde die zytosolische Proteinfraction (Fraktion I) im Überstand erhalten und in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Um die Membranproteine herauszulösen wurde das Pellet in 50 µl TritonX-100-Puffer resuspendiert, zentrifugiert (5 min, 10.000 rpm, 4°C) und der Überstand (Fraktion II) in 50 µl 2 x SDS-Puffer aufgenommen. Das Pellet wurde in 100 µl 2 x SDS-Puffer resuspendiert und stellte die unlösliche Proteinfraction dar (Fraktion III). Die Analyse der verschiedenen Proteinfractionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot.

<u>Saponinpuffer:</u>	50 mM Tris-HCl [pH 7,5]	<u>2 x SDS-</u>	
	0,4 mM Na ₃ VO ₄	<u>Probenpuffer:</u>	125 mM Tris-HCl [pH 6,8]
	1 mM NaF		4 % SDS
	0,2 % Saponin		0,02 % Bromphenolblau
	COMPLETE™ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)		20 % Glycerin
			100 mM DTT

<u>TritonX-100-</u>	
<u>Puffer:</u>	Saponinpuffer
	1 % TritonX-100

4.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes wurde in denaturierenden, diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Proteine werden dabei auf ein flaches Gel aus quervernetztem polymerisiertem Acrylamid aufgetragen, das als Molekularsieb wirkt und größere Proteine stärker zurückhält als kleinere. Durch den Zusatz des anionischen Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird die native Konformation der Proteine aufgelöst und deren Eigenladung überdeckt. Die Proteine werden dadurch proportional zu ihrer Aminosäure-Anzahl negativ geladen und wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode.

Für die SDS-PAGE wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem Mini-Protean-III™ von Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug je nach Anwendung 6 bis 12 % und im Sammelgel 5 % (Sambrook *et al.*, 1989). Die in SDS-Puffer aufgenommenen Lysate wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen (10-30 µl). Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde parallel der Proteingrößenstandard *Page-Ruler-Prestained*™ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit einer Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung angefärbt oder auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Millipore, Billerica, MA, USA) transferiert.

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

Tabelle 7. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel				Sammelgel
	6%	8%	10%	12%	
Tris-HCl, pH 8,8 [M]	0,375	0,375	0,375	0,375	---
Tris-HCl, pH 7,4 [M]	---	---	---	---	0,125
Acrylamid-Mix [%]	6	8	10	12	5
SDS [%]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ammoniumpersulfat [%]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED [%]	0,08	0,06	0,04	0,04	0,1

4.2.6 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe des Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoffes können die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine direkt im Gel angefärbt werden. Man erreicht bei dieser Methode eine Nachweisempfindlichkeit von 1 µg bis 0,1 µg Protein.

Zum Anfärben der Proteine wurden die Gele für 30 min bei RT in der Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung geschüttelt. Die Proteine werden dabei durch die Essigsäure fixiert und das enthaltene Methanol bringt den Coomassie-Farbstoff in Lösung. Dieser lagert sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren an und macht so die Proteine sichtbar. Überschüssiger Farbstoff wurde mit der Entfärbelösung entfernt. Die Gele und Banden wurden am Lumi Imager F-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) dokumentiert, quantifiziert bzw. mit Hilfe eines Flachbettscanners digitalisiert.

<u>Färbelösung:</u>	45 % (v/v) Methanol	<u>Entfärbelösung:</u>	30 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure		10 % (v/v) Essigsäure
	0,25 % (w/v) Coomassie- Brilliant-Blau R-250		in H ₂ O
	in H ₂ O		

4.2.7 Westernblot

Der Immunoblot oder Westernblot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen (Towbin *et al.*, 1992). Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden dazu elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Millipore, Billerica, MA, USA) übertragen

und anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. Der Transfer erfolgte mittels einer *semidry*-Blot-Apparatur (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestehend aus zwei Graphitelektroden. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blot-Aufbau in Methanol aktiviert und anschließend, wie die zugeschnittenen Whatman-Papiere (Roth, Karlsruhe, Deutschland), in Transferpuffer äquilibriert. Für den Blot-Aufbau wurden dann drei Whatman-Papiere auf die Graphitanode gelegt, gefolgt von der Membran, dem Trenngel und drei weiteren Whatman-Papieren. Durch Auflegen der Graphitkathode wurde die Blot-Apparatur geschlossen. Nach Anlegen einer Spannung wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und werden auf der Membran immobilisiert. Der Proteintransfer erfolgte für 2 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$.

Nach dem Blotvorgang wurde die PVDF-Membran kurz in TBST gewaschen und anschließend in Blockierungspuffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Als Blockierungspuffer wurde je nach Antikörper 3 % Rinderserum-Albumin Fraktion V (BSA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in TBST oder 5 % Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in TBST verwendet. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Antikörper wurde dabei nach Herstellerangaben im jeweiligen Blockierungspuffer verdünnt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST für je 15 min entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe des in Blockierungspuffer verdünnten (1:1000) HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers für 1 h bei RT im Dunkeln. Der sekundäre Antikörper erkennt das Fc-Fragment des primären Antikörpers und die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase ermöglicht den hochsensitiven Nachweis des immobilisierten Antigens mittels Chemilumineszenz. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST für je 15 min erfolgte die Visualisierung des Protein-Antikörper-Komplexes mit Hilfe des *ECL Plus Western Blotting Detection ReagentsTM* (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland). Das Prinzip beruht auf der Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 durch die an Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase. Bei dieser chemischen Reaktion wird Licht freigesetzt, welches einen Röntgenfilm belichten bzw. von einer Kamera erfasst werden kann. Die Detektion und Dokumentaion erfolgte am Lumi Imager F-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

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

<u>Transferpuffer</u>		<u>1 x TBST</u>	
<u>[pH 8,4]:</u>	20 mM Tris-HCl	<u>[pH 7,4]:</u>	20 mM Tris-HCl
	192 mM Glycin		140 mM NaCl
	20 % (v/v) Methanol		0,1 % (v/v) Tween-20
	0,1 % (w/v) SDS		
<u>Stripping-</u>			
<u>Puffer:</u>	62,5 mM Tris-HCl [pH 6,7]		
	100 mM β -Mercaptoethanol		
	2 % (v/v) SDS		

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori wurde auf *GC-Agar-Base*-Platten, denen gegebenenfalls entsprechende Antibiotika zugesetzt wurden, kultiviert. Die Bakterien wurden dazu mit einer sterilen Impföse (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) aus der Gefrierkultur (-80°C) ausgestrichen und bei 37°C in Anaerobiertöpfen (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) unter mikroaerophilen Bedingungen (5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂) durch Zugabe von Campygen (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Bakterien durch Verdünnungsausstriche auf neue Platten überimpft. Für die erste Verdünnung wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) von der Platte abgenommen, in 1 ml BHI-Medium (*brain heart infusion*, Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz) resuspendiert und auf eine *GC-Agar-Base*-Platte ausgestrichen. Für die zweite und dritte Verdünnung wurde dasselbe Wattestäbchen erneut in je 1 ml BHI-Medium getaucht, die Bakterien darin resuspendiert und auf je eine weitere Platte ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend für zwei Tage bei 37°C in Anaerobiertöpfen unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Für die *H. pylori*-Infektionsexperimente wurde jeweils der dritte Verdünnungsausstrich verwendet.

Zur Stammerhaltung wurden die Bakterien einer dicht bewachsenen Platte in BHI-Medium mit 20 % Glycerin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

4.3.2 Infektionen mit *Helicobacter pylori*

Für Infektionsexperimente wurde *H. pylori* mit einem sterilen Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann & Rascher, Rengsdorf, Deutschland) von der Agarplatte (dritter Verdünnungsausstrich, Kap. 4.3.1) abgenommen, in BHI-Medium resuspendiert und die Konzentration photometrisch (OD=600 nm) bestimmt. Anschließend wurde die jeweils gewünscht Menge der Bakteriensuspension direkt in das Zellkulturmedium der kultivierten eukaryontischen Zellen gegeben. Die Konfluenz der Zellen betrug zum

Zeitpunkt der Infektion etwa 60-80 %. Die Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100 infiziert. Zu den nicht-infizierten Kontrollzellen wurde das gleiche Volumen an DPBS zugegeben. Nach Inkubation für 4-6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Infektion mittels Phasenkontrastmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert und die Zellen entsprechend weiter verarbeitet.

4.3.3 Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden Luria Broth- (LB-) Platten oder LB-Flüssigmedien mit den entsprechenden Antibiotika verwendet. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank bzw. Schüttelinkubator angezogen.

Für die Stammerhaltung wurden *E. coli*-Übernachtskulturen mit 20 % Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

4.3.4 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Als Transformation wird die Aufnahme von freier DNS in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Sie wird genutzt, um rekombinante DNS-Moleküle in Bakterien einzuschleusen und dort vervielfältigen zu lassen. Da die meisten Bakterien, wie z.B. *E. coli*, keine natürliche Kompetenz aufweisen, müssen sie vor der Transformation physikalisch oder chemisch behandelt werden, um die Fähigkeit zu erhalten DNS aufzunehmen.

Präparation chemisch kompetenter Zellen

Kompetente Zellen für die Transformation mit DNS wurden nach der Kalziumchlorid-Methode (Mandel & Higa, 1970) gewonnen. *E. coli*-Übernachtskulturen wurden auf eine Zelldichte von $A_{600} = 0,1$ in LB-Medium verdünnt und wuchsen bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von $A_{600} = 0,3-0,5$. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Durch Zentrifugation (10 min, 3.000 rpm) wurden die Bakterien aus 100 ml Kultur geerntet und in 50 ml eiskaltem CaCl₂ (100 mM) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1.500 rpm) wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1.500 rpm) und das Pellet in 5 ml 100 mM CaCl₂ mit 10% Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend à 100 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Chemische Transformation von *E. coli*

Einhundert µl kompetente *E. coli*-TOP-10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 2-5 µl Ligationsansatz versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock im Wasserbad unterzogen und für weitere 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium regenerierten sich die Zellen für 60 min bei 37 °C im Wärmeschüttler. Von diesem Ansatz wurden geeignete Verdünnungen auf selektive Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

<u>SOC-Medium:</u>	2 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	8,5 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	20 mM Glukose in H ₂ O

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Die adhärent wachsende humane Magenkarzinomzelllinie AGS (ATCC CRL 1739) wurde in RPMI-1640-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), das mit 10 % FCS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1% Antibiotika-Antimykotika-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) supplementiert war, in 175 cm²-Gewebe- kulturflaschen (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Eine konfluent gewachsene Kultur wurde zweimal mit DPBS gewaschen und mit 7 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland) für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Protease Trypsin durch Zugabe von FCS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellen wurden in geeigneter Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen überführt oder in 6-Loch-Platten oder Gewebekulturschalen (alle Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) eingesät.

4.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, trypsinisiert und anschließend in ein steriles Röhrchen mit Medium überführt und für 10 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in Einfrier Röhrchen (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Die Zellen wurden zunächst bei -80 °C eingefroren und anschließend im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei 37 °C im Wasserbad schnell erwärmt (40-60 Sekunden), sofort in das entsprechende Zellkulturmedium aufgenommen und für 10 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und in Gewebekulturflaschen überführt. DMSO-Reste wurden durch einen ersten Mediumwechsel nach 24 Stunden entfernt.

4.4.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNS

Als Transfektion wird das Einbringen von DNS (z.B. Plasmide) in eukaryontische Zellen bezeichnet. Man unterscheidet dabei zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen der DNS in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Durch Transfektion von Expressionsplasmiden, welche den offenen Leserahmen für ein Protein enthalten, können Eukaryontenzellen zur Synthese des exogenen Proteins veranlasst werden.

Plasmide wurden mit dem Transfektionsreagenz *GeneJammer* (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach Anleitung des Herstellers transfiziert. Durch Mischen der DNS mit dem polyaminen Transfektionsreagenz werden DNS-haltige Komplexe erzeugt, die an der Zelloberfläche adsorbieren und die Aufnahme der DNS in die Zelle durch Endozytose vermitteln. Es wurden 2-4 µg Plasmid-DNS für 8×10^5 Zellen bzw. 5-10 µg für 5×10^6 Zellen eingesetzt und pro µg DNS wurden 2-6 µl *GeneJammer* verwendet. 36-48 h nach Transfektion wurden die Zellen entsprechend weiter verarbeitet.

4.4.4 Transiente Transfektion von siRNS

RNS-Interferenz (RNSi) ist eine Methode zum Ausschalten von Genen auf posttranskriptionaler Ebene (Cullen, 2002). Doppelsträngige RNS (dsRNS) wird dabei in eine Zelle eingeschleust und führt so intrazellulär zum sequenzspezifischen Abbau der komplementären mRNA. Die genaue Wirkungsweise von RNSi ist noch nicht bekannt, aber man geht davon aus, dass lange dsRNSs durch eine zelleigene Ribonuklease (*dicer*) in kurze, 21-25-mer Ribonukleotide geschnitten werden. Diese kurzen RNS-Moleküle werden als *small interfering-RNS* (siRNS) bezeichnet. siRNS-Moleküle lagern sich mit verschiedenen Proteinen zu dem so genannten *RNS-induced silencing complex* (RISC) zusammen. Durch ATP-abhängiges Entwinden der doppelsträngigen siRNS entsteht aus diesem RISC ein Komplex, der durch sequenzspezifische Basenpaarung an seine komplementäre mRNA binden kann, um so deren Abbau einzuleiten. Das Einführen von dsRNS mit mehr als 30 Nukleotiden in Säugetierzellen führt jedoch zu einer starken antiviralen Antwort, die unspezifische Effekte bis hin zur Apoptose der Zelle mit sich bringen kann. Um dieses zu umgehen, werden zur spezifischen Reduktion der Genexpression in Säugetierzellen siRNSs verwendet.

In dieser Arbeit wurden kommerzielle siRNSs der Firma Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) verwendet und die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. In eine 6-Loch-Platte wurden 2×10^5 AGS-Zellen pro Loch eingesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen (A und B) vorbereitet. Für Lösung A wurden 80 µl Transfektionsmedium (serumfreies RPMI-1640-Medium) mit 1 µg siRNS gemischt und für Lösung B wurden 80 µl Transfektionsmedium mit 4,8 µl Transfektionsreagenz gemischt. Beide Lösungen wurden für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde Lösung A mit Lösung B gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 640 µl Transfektionsmedium. Das Medium von den Zellen wurde entfernt und das siRNS-

Transfektionreagenz-Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 5-7 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurde 1 ml Wachstumsmedium (RPMI-1640, 20 % FCS, 2 % PS) zugegeben und die Zellen wurden für weitere 36 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und entsprechend weiter verarbeitet.

4.4.5 Wundheilungs-Assay

Mit Hilfe des Wundheilungs-Assays kann die Fähigkeit von Zellen untersucht werden, eine künstliche Wunde zu schließen, die man durch das Zufügen eines schmalen Ritzes in den Zellrasen bringt. AGS-Zellen wurden dazu in 6-Loch-Platten eingesät und bis zu vollständiger Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ in Wachstumsmedium kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden mittels einer 1 ml-Pipettenspitze angekratzt (ca. 2 cm Länge und ca. 1 mm Breite). Die Breite des verursachten Spaltes wurde mikroskopisch nach 0 und 24 Stunden ausgemessen. Von Bedeutung war, dass immer der gleiche Bereich beobachtet und ausgemessen wurde, um so reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Zur Unterdrückung proliferativer Effekte, wurden die Zellen 12 Stunden vor der eigentlichen Versuchsdurchführung auf FCS-freies Medium gesetzt. Die gemessene Migration der Zellen wurde als Spaltbreite im Phasenkontrastmikroskop vermessen.

4.5 Mikroskopische Methoden

4.5.1 Phasenkontrastmikroskopie

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

4.5.2 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine Methode zur Lokalisierung von Proteinen innerhalb der Zelle. Es ist dabei z.B. möglich, die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins zu bestimmen, die Änderung der Lokalisierung als Antwort der Zelle auf bestimmte Stimuli hin zu untersuchen oder die relative Lokalisierung mehrerer Proteine zueinander zu vergleichen. Man unterscheidet die direkte und die indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung bindet ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Primärantikörper direkt an das Antigen der Zelle und wird mittels Mikroskopie dargestellt. Bei der meist verwendeten indirekten Immunfluoreszenz-Methode bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden AGS-Zellen auf runden Glas-Deckgläsern (12 mm Durchmesser, Omnilab, Bremen, Deutschland) eingesät und für 24-48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte gegebenenfalls für 4-6 h die Infektion der Zellen mit *H. pylori*. Die infizierten oder nicht-infizierten Zellen wurden mit 3,8 % PFA für 25 min fixiert und mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 0,5 % TritonX-100-Lösung für 1 min permeabilisiert, mit DPBS gewaschen, für 45 min im Blockpuffer blockiert und für 1 h mit dem primären Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde dabei nach Angaben des Herstellers im Blockpuffer verdünnt und die Zellen wurden anschließend dreimal für je 15 min mit DPBS gewaschen. Bei der indirekten Färbung wurden die Zellen erneut für 10 min im Blockpuffer blockiert, für 45 min mit dem Sekundärantikörper (verdünnt im Blockpuffer) inkubiert und dreimal für je 15 min mit DPBS gewaschen. Bei der direkten Färbung durch die Verwendung von Rhodamin- oder Alexa Fluor®350-gekoppelten Phalloidin (beide Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) waren der zweite Blockierungsschritt und der sekundäre Antikörper nicht notwendig. Die Zellen wurden schließlich mit Einbettmedium überschichtet und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Fixierlösung: 3,8 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS

Permeabilisierungslösung: 0,5 % TritonX-100 in PBS

Blockpuffer: 1 % BSA
0,1 % Tween-20 in PBS

Einbettmedium: Vectashild (Vector Labs, Peterborough, UK) + Glycerin (1:1)
2 % DABCO (1,4-diazobicyclo-(2,2,2)-octan)

4.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die für die Immunfluoreszenzmikroskopie angefärbten Zellen wurden mit dem Leica DMRE7 Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung eines 63/1,4 Objektivs analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit der CCD-Kamera Spot-RT (Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA). Für die Auswertung und Überlagerung der Bilder wurden die Programme SPOT Advanced (Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA) und ImageJ (National Institute of Health, USA) verwendet.

4.6 Computergestützte Analysen

4.6.1 Statistik

Die statistische Auswertung von Daten erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SigmaStat Version 2.03 unter Verwendung des *t-Testes nach Student*. Mit dem *t-Test nach Student* wird überprüft, ob sich zwei unabhängige Datengruppen signifikant unterscheiden. Voraussetzungen für den Test sind annähernde Normalverteilung und hohe Varianzhomogenität. Als statistisch signifikant wurden P-Werte $\leq 0,05$ angesehen (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,005$).

5 ERGEBNISSE

5.1 Bedeutung von Cortactin für die Infektion mit *H. pylori*

Selten erreichte in der Medizin eine Entdeckung solchmaßen Aufsehen wie die Erkenntnis, dass eine bakterielle Infektion durch *Helicobacter pylori* die Ursache von 80-90 % der Gastritiden, nahezu aller Zwölffingerdarmgeschwüre und etwa 80 % aller Magengeschwüre ist. Epidemiologische Studien zeigten, dass *H. pylori*-Stämme, welche die *cag*-Pathogenitätsinsel und das CagA-Protein exprimieren, häufiger Erkrankungen wie Gastritis, Magengeschwüre und sogar Magenkrebs auslösen als Stämme, denen die Pathogenitätsinsel fehlt (Peek, Jr. & Blaser, 2002; Monack *et al.*, 2004; Backert & Meyer, 2006; Suerbaum & Josenhans, 2007). CagA wird in das Zytoplasma von *in vitro* kultivierten Wirtszellen transloziert und durch Mitglieder der Src- und Abl-Kinasen an Tyrosinresten innerhalb der EPIYA-Sequenzmotive phosphoryliert (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007). Da diese phosphorylierten Tyrosine mit anderen Proteinen interagieren können, die eine so genannten SH2-Domäne als Bindungsstelle beinhalten, kann das CagA-Protein somit zelluläre Signaltransduktionsprozesse in infizierten Magenepithelzellen direkt beeinflussen. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene CagA-induzierte Signalwege beschrieben (Blaser & Atherton, 2004; Backert & Meyer, 2006; Backert & Selbach, 2008; Hatakeyama, 2008). Einer dieser Signalkaskaden ist, dass phosphoryliertes CagA direkt mit seiner Kinase c-Src interagiert (Selbach *et al.*, 2003). Diese Interaktion führt zu einer deutlichen Abnahme der c-Src-Autophosphorylierung am Tyrosinrest 416 und zur Inaktivierung der Kinaseaktivität durch Phosphorylierung von Tyrosinrest 527, dem negativen Regulierungsmotiv in Src (Selbach *et al.*, 2003). Darüber hinaus interagiert phosphoryliertes CagA mit der SH2-Domäne von Csk (*carboxyterminal Src kinase*) und stimuliert somit die Csk-Kinaseaktivität, die dann den Tyrosinrest 527 in Src phosphoryliert (Tsutsumi *et al.*, 2003). Somit wird c-Src über einen klassischen Regelkreis mit negativer Rückkopplung inhibiert (Selbach *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde auch berichtet, dass die Inaktivierung von Src mit der Tyrosin-Dephosphorylierung von 80 kDa- und 120 kDa-Wirtszellproteinen einhergeht (Backert *et al.*, 2000). Insgesamt wurden bisher drei dephosphorylierte Aktin-bindende Proteine identifiziert: Cortactin, Ezrin (beide 80 kDa) und Vinculin (120 kDa), die durch die Inaktivierung von Src nicht mehr an Tyrosinresten phosphoryliert werden können (Selbach *et al.*, 2003; 2004; Moese *et al.*, 2007). Die Relevanz dieser Ereignisse für die Infektion von *H. pylori* ist allerdings unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war folglich, die funktionelle Rolle eines dieser Proteine -Cortactin- in der *H. pylori*-Infektion mit gastrischen Epithelzellen (AGS-Zellmodell) näher zu untersuchen.

5.1.1 Knockdown von Cortactin mittels siRNS

Zu Beginn meiner Arbeiten sollte zunächst sichergestellt werden, dass Cortactin tatsächlich für die Infektion mit *H. pylori* wichtig ist. Zu diesem Zweck wurde die Expression von Cortactin in AGS-Zellen mit Hilfe von inhibitorischer siRNS herunterreguliert. Im Westernblot mit einem spezifischen anti-Cortactin-Antikörper ist die deutliche Abnahme der Expression des Proteins ersichtlich (Abb. 5A). Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten im Lumi-Imager zeigte, dass die Expression von Cortactin um etwa 90 % reduziert war (Daten nicht gezeigt). Zur Absicherung wurde eine unspezifische Kontroll-siRNS (Santa Cruz) in die AGS-Zellen transfiziert, die keinen Effekt auf die Expression von Cortactin zeigte (Abb. 5A). Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit dem *H. pylori*-Stamm P1 infiziert. Die Infektion mit Wildtyp-*H. pylori* erzeugte in AGS-Zellen nach etwa 1-2 Stunden die Dissoziation der Zell/Zell-Kontakte und eine hohe Motilität der Zellen (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2000; Selbach *et al.*, 2002). Nach etwa 4-6 Stunden entwickelten die Zellen eine spindelförmige Morphologie und dünne bis zu 70 μm lange Fortsätze (Abb. 5B,C). Diese charakteristischen Veränderungen des Zytoskeletts werden in der Literatur als „Kolibri“ (*hummingbird*)- oder Elongationsphänotyp definiert (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001; 2004). Die Entfaltung des „Kolibri“-Phänotyps war in Gegenwart der anti-Cortactin siRNS signifikant inhibiert (Abb. 5B,C). Diese Ergebnisse zeigen, dass Cortactin an der Ausbildung des Elongationsphänotyps beteiligt ist und somit in der Infektion mit *H. pylori* von Bedeutung sein könnte.

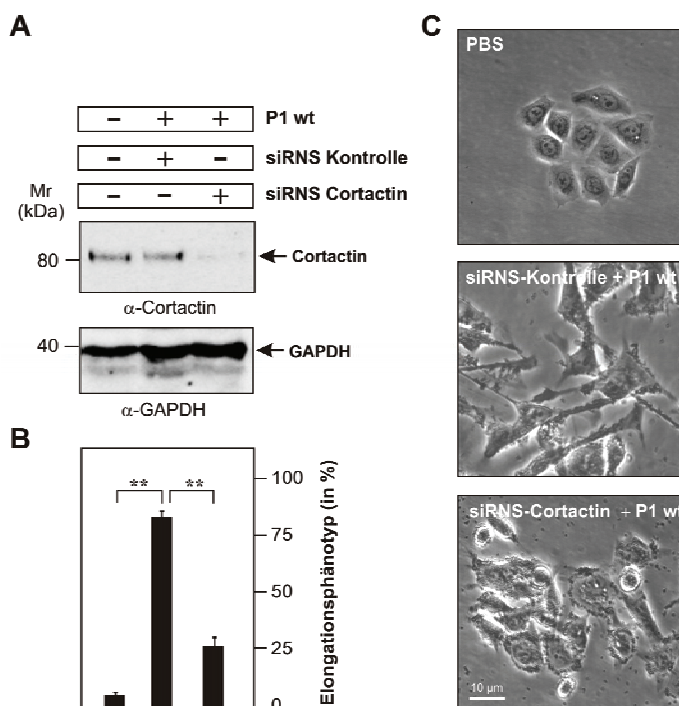


Abb. 5 Rolle von Cortactin für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps in AGS-Zellen. AGS-Zellen wurden mit Cortactin-siRNS oder einer Kontroll-siRNS transfiziert und nach 48 Stunden mit *H. pylori* für 6 Stunden infiziert. (A) Die Verminderung der Cortactin-Expression wurde mittels Westernblot-Analyse kontrolliert. Die Westernblot-Analyse mit dem α -GAPDH-Antikörper zeigt, dass der Unterschied in der Expression nicht auf weniger Gesamtprotein zurückzuführen ist. (B) Die Anzahl der elongierten Zellen wurde jeweils aus zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert ($P < 0,005$ **). (C) Mikroskopische Analysen zeigen, dass der *H. pylori*-induzierte Phänotyp in Gegenwart von Cortactin-siRNS, aber nicht mit der Kontroll-siRNS, inhibiert ist.

5.1.2 Aktivierungsstatus der Kinasen von Cortactin in der Infektion mit *H. pylori*

Humanes Cortactin besitzt mehrere bekannte Phosphorylierungsstellen und wird an den Serinresten 113, 405 und 418 sowie an den Tyrosinresten 421, 470 und 486 durch die Erk-, Pak- bzw. Src-Kinase phosphoryliert (Selbach & Backert, 2005; Abb. 6A). Da ich im Verlauf der Experimente auch auf Cortactin-Konstrukte aus der Maus zurückgreife, ist an dieser Stelle zu bemerken, dass das Maus-Cortactin in zwei Phosphorylierungsstellen variiert, den Tyrosinresten 466 und 482 (entsprechen den Tyrosinresten 470 und 486 im humanen System). Um nun die Rolle der Phosphorylierung von Cortactin während der Infektion mit *H. pylori* näher zu untersuchen, wurde zunächst die Aktivität der Erk-, Pak- und Src-Kinase während der Infektion über einen Zeitraum von 0,5-8 Stunden verfolgt. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Proteinproben generiert und mit aktivierungsspezifischen Phospho-Antikörpern im Westernblot analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der beiden Serin-/Threonin-Kinasen Erk und Pak während der Infektion kontinuierlich ansteigt, während die Src-Kinase in Übereinstimmung mit den oben genannten Publikationen nur temporär zwischen 0,5-2 Stunden aktiv ist und dann inaktiviert wird (Abb. 6B). Die Quantifizierung der Daten erfolgte densitometrisch und ist in Abb. 6C zusammengefasst. Die starke Ausprägung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps zwischen 6-8 Stunden zeigt eine deutliche Korrelation mit einer hohen Aktivität von Erk und Pak aber einer inhibierten Src-Kinaseaktivität (Abb. 6D). Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass die Serinreste 113, 405 und 418 in Cortactin möglicherweise während der Infektion phosphoryliert werden, während die Tyrosinreste 421, 466 und 482 durch die Inaktivierung von Src dephosphoryliert werden.

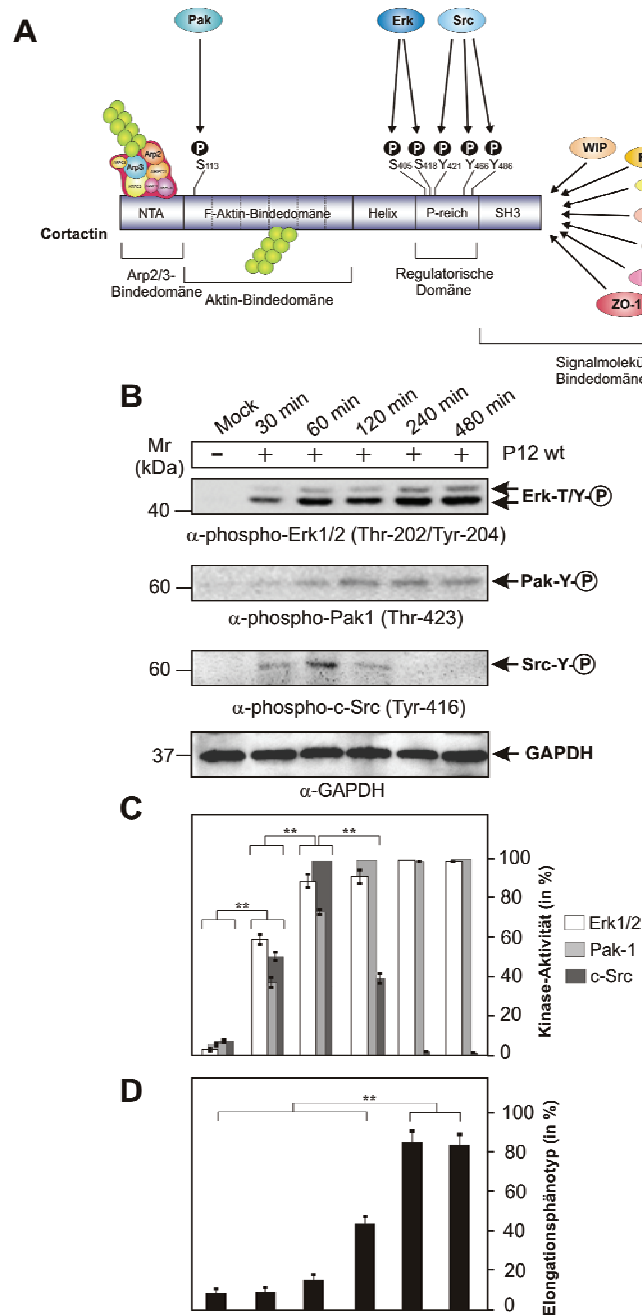


Abb. 6 Die Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori* führt zur Aktivierung von Erk- und Pak-Kinasen, sowie zur Inaktivierung von Src. (A) Schematische Darstellung der Cortactin-Domänenstruktur, einschließlich der bekannten Erk-, Pak- und Src-Phosphorylierungsstellen und Interaktionspartner der C-terminalen SH3-Domäne. (B) AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* für 30, 60, 120, 240 und 480 min infiziert und die Aktivität der Kinasen Erk1/2, Pak1 und c-Src wurde im Westernblot mittels phosphospezifischer Antikörper analysiert. Während Erk und Pak im Zeitverlauf der Infektion konstitutiv aktiviert werden, wird c-Src zunächst aktiviert und anschließend (> 2h) inaktiviert. Die Westernblot-Analyse mit dem α-GAPDH-Antikörper zeigt, dass gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden. Die Src- und GAPDH-Blots wurden freundlicherweise von Dr. Ina Tammer aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Backert zur Verfügung gestellt (Tammer *et al.*, 2007). (C) Die Aktivität der Kinasen wurde zu jedem Zeitpunkt densitometrisch analysiert. Die Quantifizierung der Banden in den Westernblots erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-Software™. (D) Die Anzahl der elongierten Zellen wurde zu jedem Zeitpunkt der Infektion aus jeweils zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert. Die Aktivierung von Erk1/2 und Pak1, sowie die Inaktivierung von c-Src korreliert mit dem *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp ($P < 0,005$ **).

5.2 Herstellung von Cortactin-Mutanten und deren Funktion in der Infektion

5.2.1 Mutagenese von Cortactin-GFP Konstrukten

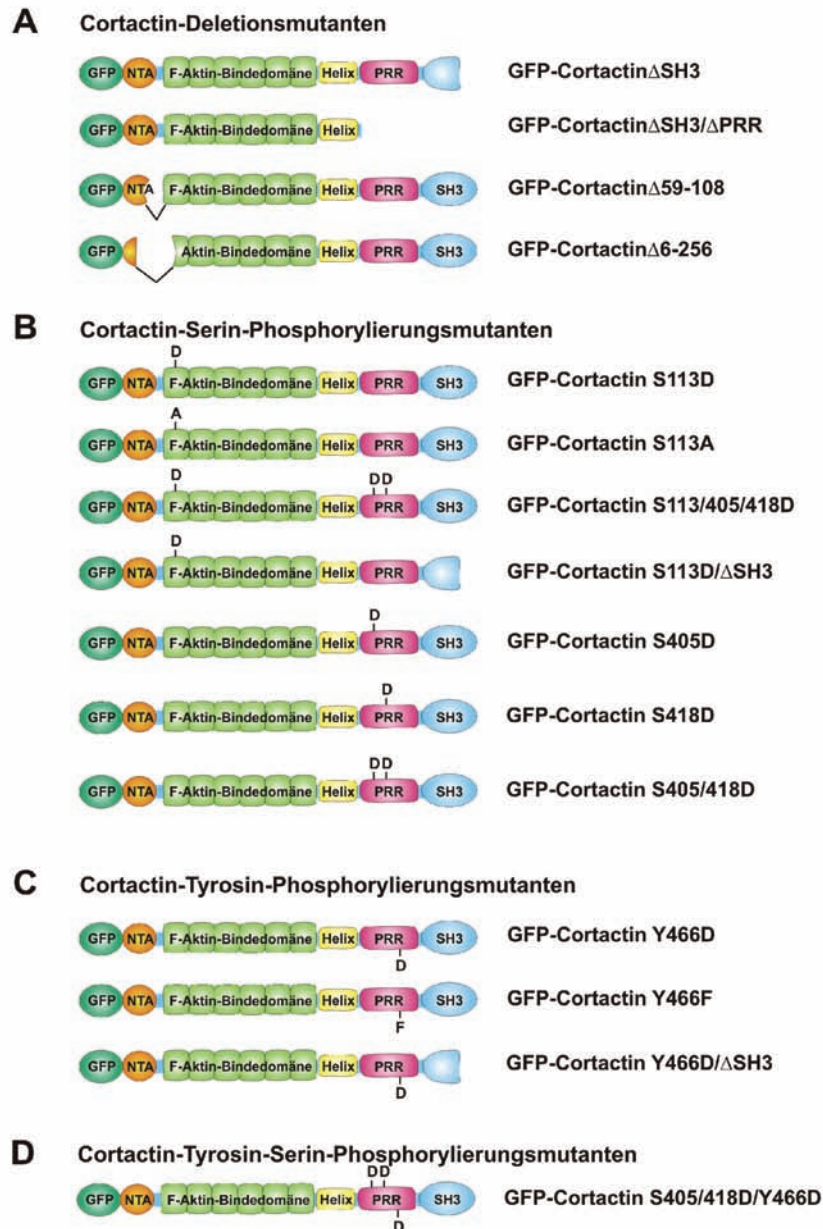


Abb. 7 Herstellung von GFP-markierten Cortactin-Mutanten für die transiente Expression in Wirtszellen. Wildtyp Maus-Cortactin wurde in den eGFP-C1-Vektor (Clontech) kloniert und freundlicherweise von Ruth Wittelsberger aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Backert zur Verfügung gestellt. Die Cortactin-Domänenstruktur ist schematisch dargestellt und die entsprechenden Mutationen sind eingefügt. Insgesamt wurden 15 Cortactin-Mutanten generiert, die sich aus Deletionsmutanten verschiedener Domänen (A), Serin-Phosphorylierungsmutanten (B), Tyrosin-Phosphorylierungsmutanten (C) und Tyrosin-/Serin-Phosphorylierungsmutanten zusammensetzen. Es wurden sowohl phosphorylierungsinactive Mutanten (S>A, Y>F) als auch phosphorylierungsaktive Mutanten (S>D, Y>D, sog. *phospho-mimicking* Mutanten) kloniert.

Um die funktionelle Rolle von Domänen und Phosphorylierungsstellen in Cortactin zu untersuchen, habe ich nachfolgend 15 verschiedene Cortactin-Mutanten in einem GFP-Fusionsvektor für die transiente Expression in Wirtszellen erzeugt. Wie in Abb. 7 schematisch dargestellt, sind hier amino-terminale und carboxy-terminale Deletionsmutanten im Protein (A), Serin-Phosphorylierungsmutanten (B), Tyrosin-Phosphorylierungsmutanten (C) und Tyrosin-/Serin-Phosphorylierungsmutanten generiert worden. Bei den Punktmutationen in den oben genannten Phosphorylierungsstellen wurden sowohl phosphorylierungsinactive Mutanten (S>A, Y>A) als auch phosphorylierungsaktive Mutanten (S>D, Y>D, sog. phospho-*mimicking* Mutanten) erzeugt. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft und die unveränderte Expression im Westernblot mit anti-Cortactin bzw. anti-GFP-Antikörpern verifiziert (Daten nicht gezeigt).

5.2.2 Rolle von Cortactin für die Ausbildung des Elongationsphänotyps

Um die Funktion der einzelnen Domänen und Phosphorylierungsstellen in Cortactin für die Ausprägung des Elongationsphänotyps während der Infektion mit *H. pylori* näher zu untersuchen, wurden AGS-Zellen mit den oben beschriebenen Konstrukten für 48 Stunden transfiziert und anschließend mit Wildtyp *H. pylori* infiziert. Darüber hinaus wurden noch weitere Cortactin-Mutanten verwendet (W22A - Bindungsdefekt für den Arp2/3-Komplex; Y421/466/482F - defizient in Tyrosin-Phosphorylierung; Y421/466/482D - tyrosinphosphorylierungsaktiv; S405/418A - serinphosphorylierungs-inaktiv; S405/418D/ Δ SH3 - serinphosphorylierungsaktiv, aber SH3-inaktiv), die von Prof. Dr. Narcisa Martinez-Quiles von der Universität Madrid (Martinez-Quiles *et al.*, 2004) zur Verfügung gestellt worden sind. Die äquivalente Expression jeder dieser Konstrukte wurde im anti-GFP Westernblot nochmals überprüft. Nach 6-stündiger Infektion wurde der Elongationsphänotyp in jedem der einzelnen Ansätze quantifiziert. Wie in Abb. 8 zu sehen ist, wird der Elongationsphänotyp bei Überexpression von Wildtyp-Cortactin signifikant verstärkt ($P < 0,05$), was auf eine positive regulatorische Funktion von Cortactin hinsichtlich des Phänotyps hindeutet. Die Expression der W22A-, S113A-, S113D-, S113D/ Δ SH3- und S405/418A-Mutanten hatte einen signifikant inhibitorischen Effekt zur Folge, während die Expression der S405D- und S418D-Mutanten den Phänotyp signifikant verstärkten (Abb. 8). Letzterer Befund lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Phosphorylierung der Serinreste 405 und 418, aber nicht 113, einen verstärkenden Einfluss auf den Phänotyp hat. Interessanterweise, war dieser Effekt nicht bei der S405/418D-Doppelmutante ausgeprägt, während die S405/418D/ Δ SH3-Mutante den Phänotyp weitgehend unterdrückt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die SH3-Domäne ebenso in der Signaltransduktion involviert ist, die zum Phänotyp führt. Interessant ist darüber hinaus auch die Beobachtung, dass die Phosphorylierung von Cortactin am Tyrosinrest 466 den Phänotyp signifikant verstärkt und die Y466F-Mutante blockierend wirkt (Abb. 8). Zu bemerken ist auch, dass die Experimente mit einer Reihe von Cortactin-Konstrukten (vor allem die Deletionsmutanten, SH3- und Y421/466/482D-Mutanten) statistisch nicht auswertbar

waren, weil sich die Mehrzahl der transfizierten Zellen vom Substrat ablösten (Abb. 8, unten). Letztere Befunden zeigen damit aber auch ganz deutlich, das Cortactin unter bestimmten Voraussetzungen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion spielt.

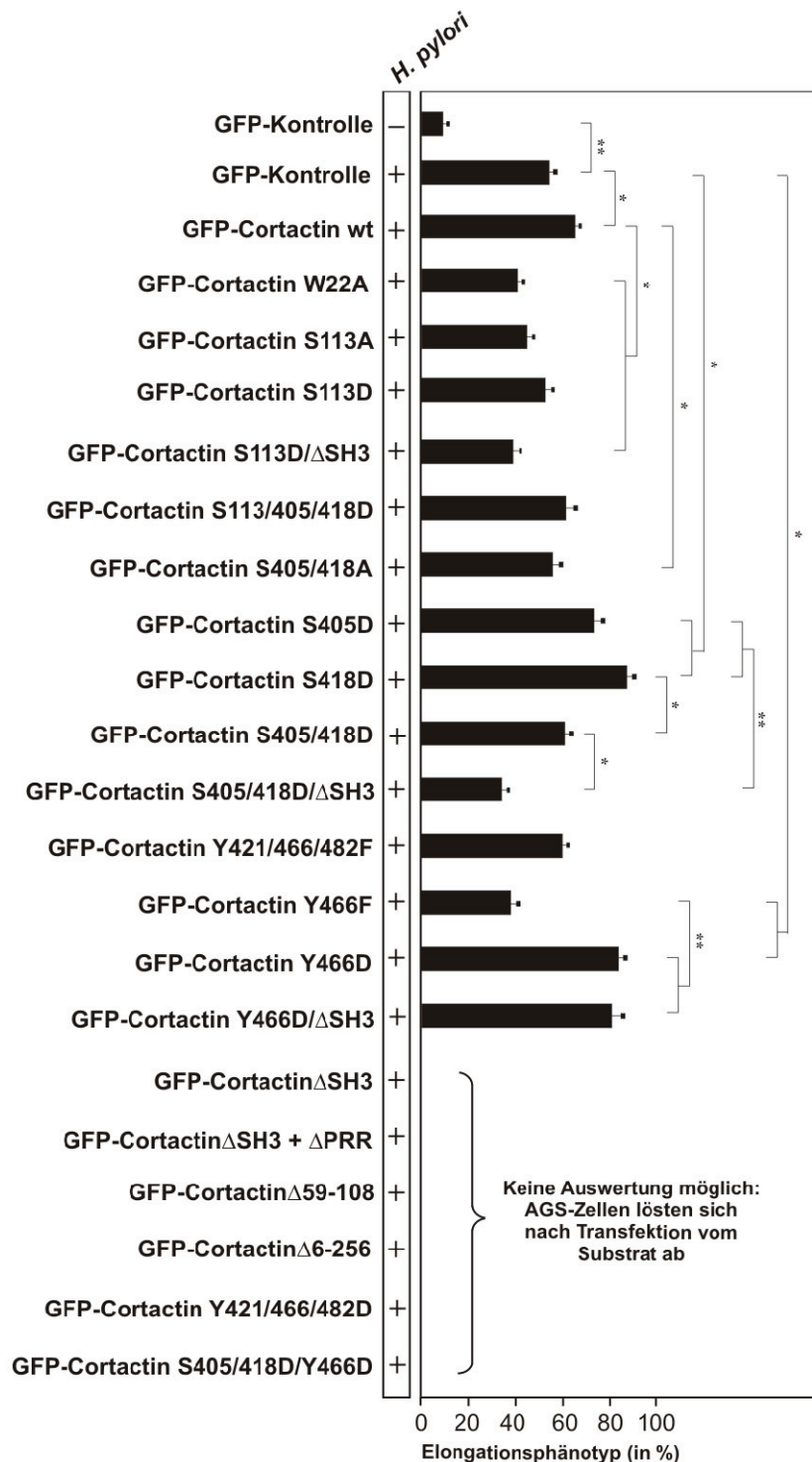


Abb. 8 Funktion der Expression von Cortactin-Mutanten für den Elongationsphänotyp in der Infektion mit *H. pylori*. AGS-Zellen wurden mit den verschiedenen GFP-Cortactin-Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden mit *H. pylori* für 6 Stunden infiziert. Die Anzahl der elongierten Zellen wurde jeweils aus zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($P < 0,005$ **, $P < 0,05$ *).

5.3 Subzelluläre Lokalisation von Cortactin während der Infektion mit *H. pylori*

5.3.1 Subzelluläre Lokalisation von Tyrosin-phosphoryliertem Cortactin

Die subzelluläre Lokalisation von Cortactin sowie der Phosphorylierungsstatus an den einzelnen Tyrosin- und Serinresten des Proteins während der Infektion mit *H. pylori* sind unbekannt. Um dieser wichtigen Fragestellung nachzugehen, wurden AGS-Zellen für 6 Stunden mit Wildtyp *H. pylori* und der Δ cagA-Deletionsmutante infiziert, gefolgt von einer biochemischen Trennung in Zytoplasma- und Membranfraktionen. Die Proteinproben wurden präpariert, in ihrer Proteinmenge abgeglichen und anschließend mit phosphospezifischen Antikörpern im Westernblot analysiert. Zunächst wurden die Proben mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY99 untersucht, der ein Gemisch von vielen Tyrosin-phosphorylierten Proteinen erkennt (Santa Cruz). Das Ergebnis bestätigt frühere Daten (Selbach *et al.*, 2003), das Cortactin an seinen Tyrosinresten in CagA-abhängiger Weise während der Infektion dephosphoryliert wird (Abb. 9A/B). Als Ladekontrolle wurden die Blots mit einem anti-Cortactin-Antikörper inkubiert, der gleiche Signale in allen Proben zeigte (Abb. 9D). Als Kontrolle für die Fraktionierung wurde ein membranspezifischer anti-Integrin- β 1-Antikörper verwendet, der erwartungsgemäß nur Signale in der Membranfraktion aber nicht in der Zytoplasmafraktion erbrachte (Abb. 9D). Um den Phosphorylierungsstatus an spezifischen Tyrosinresten genauer zu verfolgen, wurden dieselben Proben mit den ebenfalls kommerziell-verfügbaren phosphospezifischen anti-Cortactin-Y421 und anti-Cortactin-Y482 Antikörpern analysiert (Abb. 9B, unten). Die densitometrische Quantifizierung der Phospho-Banden im Westernblot ist in Abb. 9C dargestellt. Die erzielten Ergebnisse stimmen mit dem oben gezeigten Phosphotyrosin-Blot überein und zeigen, dass beide Tyrosinreste von Cortactin in nicht-infizierten AGS-Zellen phosphoryliert sind und nach Infektion in CagA-abhängiger Weise dephosphoryliert werden. Interessant ist weiterhin, dass sich die subzelluläre Lokalisation der Hauptmenge von Cortactin im Zytoplasma und der Membran nach Infektion mit beiden *H. pylori*-Stämmen nicht signifikant änderte (Abb. 9D) und dass sich die Population von Cortactin, welche an den Tyrosinresten 421 und 482 phosphoryliert ist, ausschließlich in der Membranfraktion befindet (Abb. 9B).

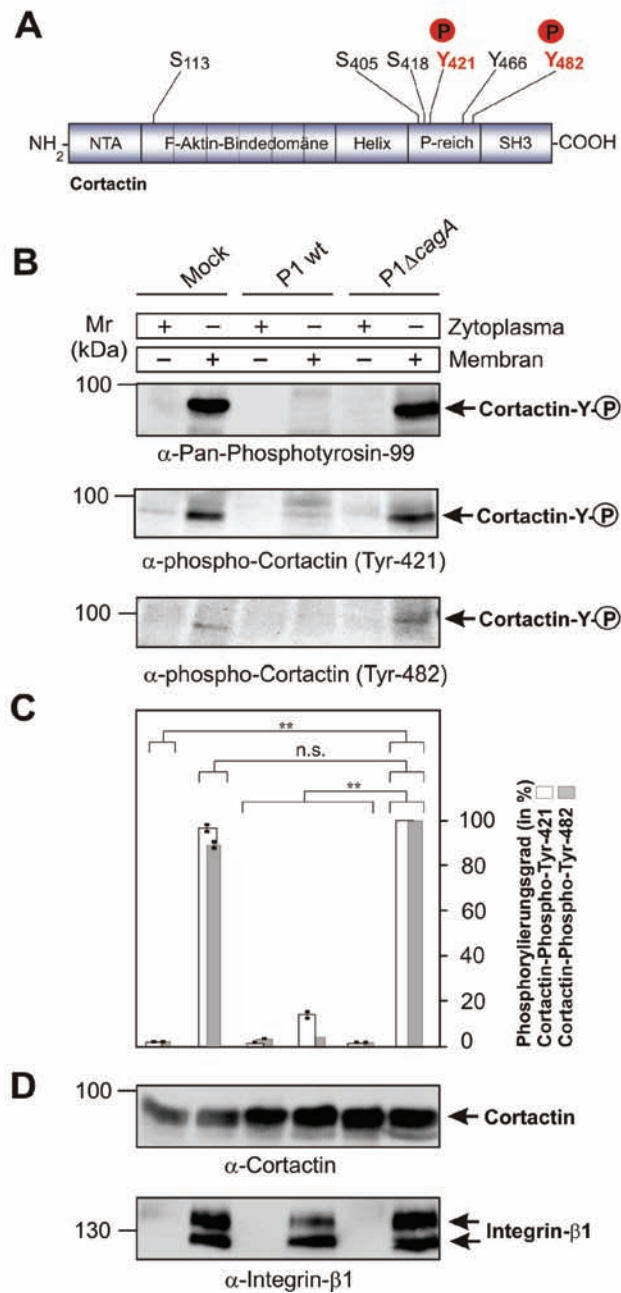


Abb. 9 Cortactin wird während der *H. pylori*-Infektion an den Tyrosinen 421 und 482 dephosphoryliert. (A) Domänenstruktur von Cortactin. Die untersuchten Tyrosin-Phosphorylierungsstellen sind rot hervorgehoben. (B) AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* P1 Wildtyp oder der P1ΔcagA Mutante für 6 Stunden infiziert und die zellulären Proteine in Membran- und Zytoplasmaproteine fraktioniert. Parallel dazu wurden die Proteine nicht-infizierter Zellen fraktioniert. Die Phosphorylierung von Cortactin an den eingezeichneten Tyrosinresten, sowie die subzelluläre Lokalisation des Proteins wurden mittels Westernblot unter Verwendung der entsprechenden phosphospezifischen Antikörper analysiert. Cortactin ist in nicht-infizierten Zellen an den Tyrosinresten Y-421 und Y-482 phosphoryliert und in der Membran lokalisiert. Diese Tyrosine werden in der Infektion mit Wildtyp *H. pylori* dephosphoryliert, nicht jedoch in der P1ΔcagA-Infektion. (C) Die Quantifizierung der Banden in den Westernblots erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM. Die Intensität der jeweils stärksten Bande pro Blot wurde als 100% definiert. ($P < 0,005$ **, n.s. nicht signifikant). (D) Die Kontrolle mit dem α-Cortactin-Antikörper zeigt, dass in allen Fraktionen ähnliche Mengen an Cortactin vorhanden sind. Die Analyse mit dem α-Integrin-β1 dient zur Kontrolle der Reinheit der Membranfraktion.

Im nächsten Experiment wurden die oben beschriebenen Fraktionen mit dem kommerziell verfügbaren phosphospezifischen anti-Cortactin-Y-466-Antikörper analysiert (Abb. 10A/B). Die densitometrische Quantifizierung der Phospho-Banden im Westernblot ist in Abb. 10C dargestellt. Die Ergebnisse zeigten überraschend, dass phosphoryliertes Cortactin am Tyrosinrest 466 im Gegensatz zu den anderen Populationen von Cortactin (phosphoryliert am Tyrosinrest 421 und 482) nicht in der Membran sondern in der Zytoplasmafraktion befindet. Signifikante Unterschiede in der Intensität der Cortactin-Phosphobanden für Tyrosin 466 wurden zwischen Wildtyp-*H. pylori* und der *cagA*-Mutante nicht beobachtet (Abb. 10B/C).

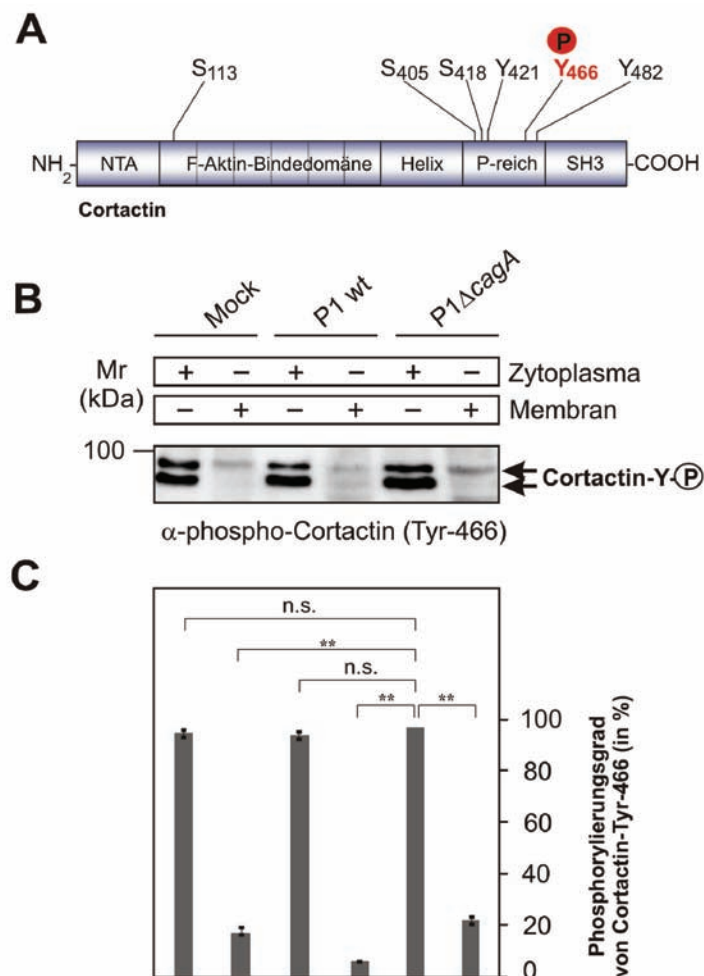


Abb. 10 Cortactin ist am Tyrosin-Y466 in AGS-Zellen phosphoryliert und ändert sich während der *H. pylori*-Infektion nicht signifikant. (A) Domänenstruktur von Cortactin. Die untersuchte Tyrosin-Phosphorylierungsstelle ist rot hervorgehoben. (B) AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* P1 Wildtyp oder P1ΔcagA für 6 h infiziert und die zellulären Proteine in Membran- und Zytoplasmaproteine fraktioniert. Parallel dazu wurden die Proteine nicht-infizierter Zellen fraktioniert. Die Phosphorylierung von Cortactin-Y-466, sowie die subzelluläre Lokalisation wurden mittels Westernblot unter Verwendung des entsprechenden phosphospezifischen Antikörpers analysiert. Cortactin-PY-466 bleibt sowohl in der P1 Wildtyp- als auch in der P1ΔcagA-Infektion phosphoryliert und ist im Zytoplasma lokalisiert. (C) Die Quantifizierung der Banden in den Westernblots erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-Software™. Die Intensität der jeweils stärksten Bande pro Blot wurde als 100% definiert. ($P < 0,005$ **, n.s. nicht signifikant).

5.3.2 Subzelluläre Lokalisation von Serin-phosphoryliertem Cortactin

Im nachfolgenden Experiment wurden die oben beschriebenen Proteinfractionen mit phosphospezifischen anti-Cortactin-Antikörpern gegen die bekannten Serinreste 113, 405 und 418 untersucht (Abb. 11A). Die entsprechenden Antikörper sind nicht kommerziell verfügbar und wurden auf Peptidbasis (siehe Material & Methoden) hergestellt und für meine Studien von PD Dr. Backert zur Verfügung gestellt. Wie in Abb. 11B zu sehen, sind alle drei Serinreste in den nicht-infizierten Kontrollzellen nicht phosphoryliert. Nach Infektion mit Wildtyp *H. pylori* wird die Phosphorylierung von Cortactin an allen drei Serinresten induziert und diese Cortactin-Populationen befinden sich ausschließlich in der Membranfraktion (Abb. 11B). Ähnliche Ergebnisse wurden mit der P1 Δ cagA-Mutante erzielt. Die densitometrische Quantifizierung aller Phospho-Banden im Westernblot ist in Abb. 11C dargestellt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *H. pylori* die Phosphorylierung der Serinreste 113, 405 und 418 in Cortactin einer CagA-unabhängigen Weise induziert.

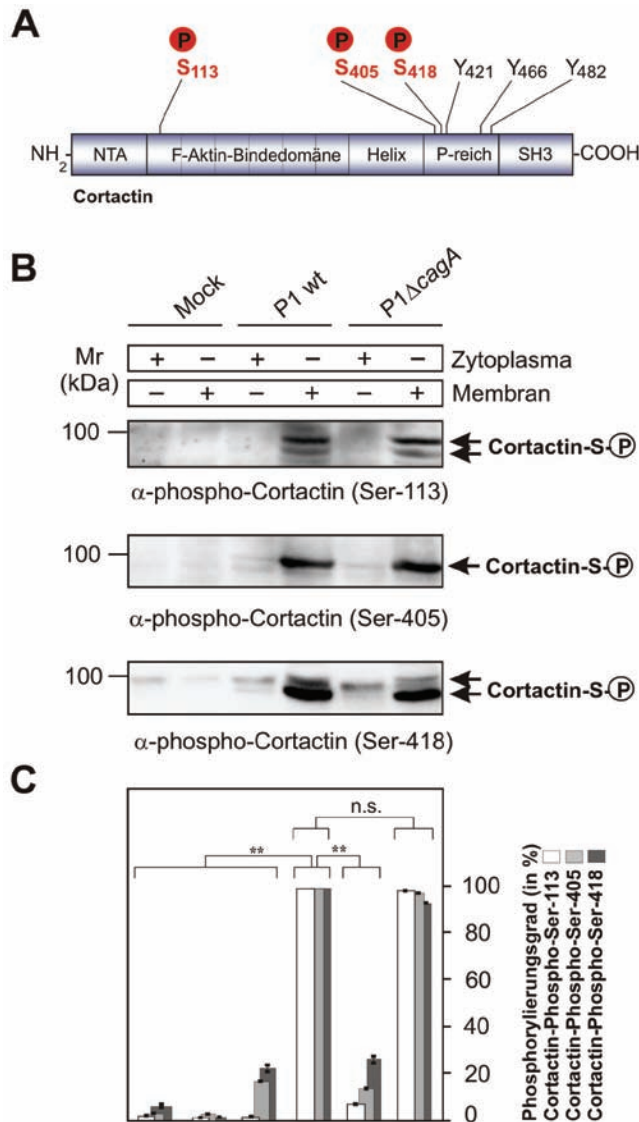


Abb. 11 Cortactin wird während der *H. pylori*-Infektion an den Serinen 405, 418 und 113 phosphoryliert. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Cortactin. Die Serin-Phosphorylierungsstellen sind rot hervorgehoben. (B) AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* P1 Wildtyp oder P1 Δ cagA für 6 Stunden infiziert und die Proteine in Membran- und Zytoplasmaproteine fraktioniert. Parallel dazu wurden auch die Proteine nicht-infizierter Kontrollzellen fraktioniert. Die Phosphorylierung von Cortactin an den bekannten Serinresten, sowie die subzelluläre Lokalisation wurde mittels Westernblot unter Verwendung der entsprechenden phosphospezifischen Antikörper analysiert. Cortactin wird in der P1 Wildtyp- und P1 Δ cagA-Infektion an den Serinresten 405, 418 und 113 phosphoryliert und ist in der Membran lokalisiert. Die Phosphorylierung dieser Serinreste ist demnach CagA-unabhängig. (C) Die Quantifizierung der Banden in den Westernblots erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM. Die Intensität der jeweils stärksten Bande pro Blot wurde als 100% definiert. ($P < 0,005$ **, n.s. nicht signifikant).

5.4 Bindungspartner von Cortactin nach Infektion mit *H. pylori*

Nachdem die Frage beantwortet ist, welche Phospho-Formen von Cortactin nach Infektion mit *H. pylori* in der Zelle vorhanden sind, sollte als nächstes geklärt werden, mit welchen Interaktionspartnern Cortactin anschließend interagiert. Wir erhoffen uns dadurch Rückschlüsse über die Signalweg(e), die durch Cortactin nach Infektion induziert werden. Von besonderem Interesse waren für uns zunächst die bekannten Interaktionspartner wie der Aktin-Nukleator N-WASP, der den Arp2/3-Komplex bindet und aktiviert, sowie filamentöses Aktin (F-Aktin). Um diese wichtige Frage zu klären, wurden AGS-Zellen für 6 Stunden mit Wildtyp-*H. pylori* und der P1 Δ cagA-Deletionsmutante infiziert, gefolgt von einer Immunpräzipitation (IP) mittels eines anti-Cortactin-Antikörpers. Die Proteinproben in den Präzipitaten wurden präpariert, in ihrer Proteinmenge abgeglichen und anschließend im Westernblot analysiert. Als Ladekontrolle wurden die Blots mit einem anti-Cortactin-Antikörper inkubiert, der gleiche Mengen von Cortactin in allen Proben zeigte (Abb. 12, oben). Anschließend wurden die Westernblots mit spezifischen anti-N-WASP und anti- β -Aktin-Antikörpern inkubiert. Überraschenderweise zeigen die erzielten Ergebnisse, dass N-WASP und Aktinmoleküle nur an Cortactin in der nichtinfizierten Kontrolle gebunden sind (Abb. 12A). Nur geringe oder keine Signale konnten für gebundenes N-WASP und Aktin in den infizierten Proben mit P1-Wildtyp oder der P1 Δ cagA-Mutante nachgewiesen werden (Abb. 12A/B). Weitere Westernblot-Experimente mit Antikörpern von anderen bekannten Cortactin-Interaktionspartnern (siehe Tabelle 1, Abb. 6A) zeigten, dass offenbar auch keines dieser Proteine nach Infektion mit *H. pylori* an Cortactin bindet (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die *H. pylori*-Infektion die Dissoziation des Cortactin/N-WASP-Komplexes in einer CagA-unabhängigen Weise induziert und gebundenes Aktin von Cortactin freisetzt.

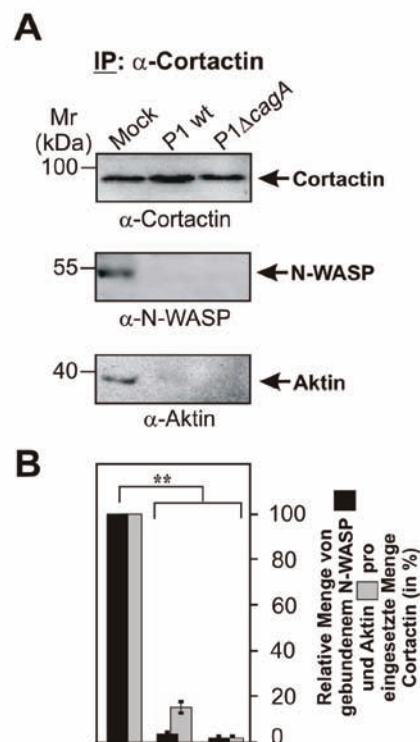


Abb. 12 Die Infektion mit *H. pylori* induziert die Dissoziation des Cortactin/N-WASP-Komplexes und setzt Aktin frei. (A) AGS-Zellen wurden für 6 Stunden mit P1 Wildtyp oder der P1 Δ cagA Mutante infiziert. Die Immunpräzipitation (IP) mit einem anti-Cortactin-Antikörper schloss sich an. Die Lysate der IP's wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Westernblot-Analysen mit α -Cortactin, α -N-WASP und α -Aktin zeigen, dass in nicht-infizierten Zellen (Mock) alle drei Proteine in einem Komplex vorliegen. Dieser Komplex ist nicht in P1 Wildtyp oder P1 Δ cagA-infizierten Zellen nachweisbar. (B) Die Quantifizierung der Banden in den Westernblots erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM. Die Intensität der jeweils stärksten Bande pro Blot, also in der nicht-infizierten Kontrolle, wurde als 100% definiert ($P < 0,005$ **).

5.5 Identifizierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) als neuen Interaktionspartner von Cortactin

5.5.1 FAK bindet an Cortactin während der Infektion mit *H. pylori*

Die Ergebnisse aus den oben beschriebenen Experimenten ließen uns vermuten, dass Cortactin nach Infektion mit *H. pylori* möglicherweise mit einem oder mehreren bisher unbekannt Proteinen interagiert. Um diese Frage zu klären, wurde die subzelluläre Lokalisation von Cortactin vor und nach Infektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurden AGS-Zellen infiziert, fixiert und Cortactin mit einem spezifischen monoklonalen anti-Cortactin Antikörper detektiert. Abbildung 13A zeigt die charakteristische Verteilung von Cortactin in AGS-Zellen (obere Reihe) oder in AGS-Zellen, die mit dem Wildtyp-Stamm P1 infiziert wurden (untere Reihe). Besonders auffällig sind Cortactin-Ansammlungen an der Basis und an der Spitze der zellulären Fortsätze nach *H. pylori*-Infektion (Abb. 13A, untere Reihe, rot, Pfeile). An diesen Stellen ist Cortactin sehr stark mit der Fokalen-Adhäsions-Kinase

FAK, einem bekannten Markerprotein für fokale Zellkontakte, assoziiert (Abb. 13A, obere Reihe, grün). Im Gegensatz dazu befindet sich Cortactin in nicht-infizierten Zellen hauptsächlich in kleinen, vesikelartigen Ansammlungen im Zytoplasma und der Zellmembran (Abb. 13A; Selbach *et al.*, 2003). In der nicht-infizierten AGS-Kontrolle waren sporadisch auch Bereiche von ko-lokalisierenden FAK- und Cortactin-Signalen zu sehen, diese waren allerdings weniger häufig und weniger stark ausgeprägt als in der *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen.

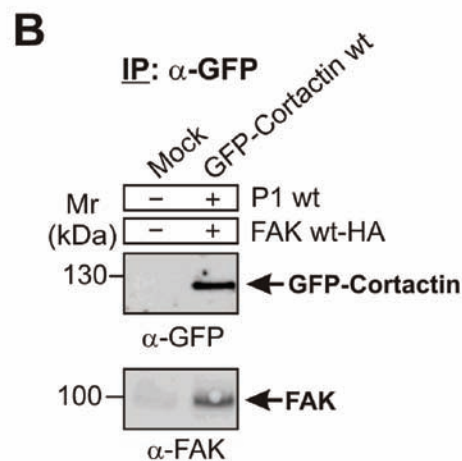
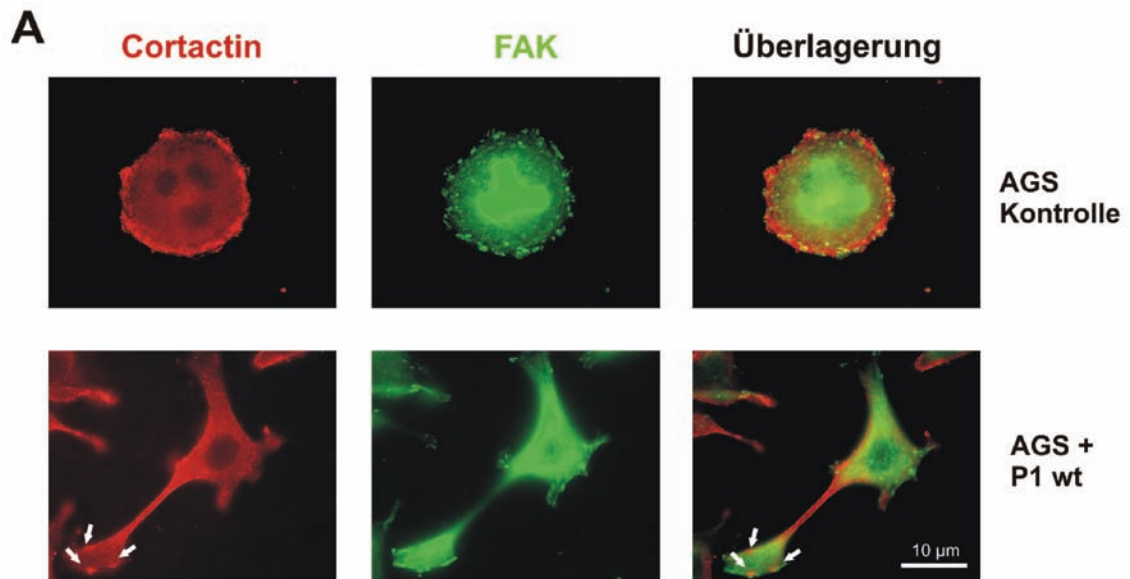


Abb. 13 Cortactin ko-lokalisiert mit FAK nach Infektion mit *H. pylori*. (A) Immunfluoreszenzanalyse von AGS-Zellen, die für 6 Stunden mit P1 Wildtyp infiziert oder nicht infiziert wurden. Anfärbt wurden Cortactin (rot) und FAK (grün). In nicht-infizierten Zellen ist Cortactin im Zytoplasma verteilt, während FAK in den fokalen Adhäsionen der Zelle lokalisiert ist. In *H. pylori*-infizierten Zellen ko-lokalisiert Cortactin dagegen mit FAK an den Spitzen der langgestreckten Zellen (durch Pfeile markiert). (B) AGS-Zellen wurden mit GFP-Cortactin und HA-FAK transfiziert und nach 48 Stunden mit *H. pylori* P1 Wildtyp für 6 Stunden infiziert und anschließend GFP-immunopräzipitiert. Westernblot-Analysen mit den angegebenen Antikörpern zeigen, dass Cortactin mit FAK einen Komplex bildet.

Die bisherigen Befunde lassen die Hypothese zu, dass Cortactin in die fokalen Zellkontakte rekrutiert wird und dort mit einem oder mehreren Proteinen interagiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden AGS-Zellen mit GFP-Cortactin und HA-markierten FAK-Konstrukten transfiziert. Anschließend wurde mit *H. pylori* für 6 Stunden infiziert, gefolgt von einer IP mittels eines anti-GFP Antikörpers. Die Proteinproben in den Präzipitaten wurden wie beschrieben präpariert und im Westernblot mit spezifischen anti-GFP- und anti-FAK-Antikörpern analysiert. Die Ergebnisse zeigen GFP-Cortactin und HA-FAK in einem Immunkomplex und lassen die Schlussfolgerung zu, dass beide Proteine möglicherweise in der Zelle miteinander interagieren (Abb. 13B). Diese Befunde sind insofern überraschend, da FAK bisher in keinem Zellsystem als ein Interaktionspartner von Cortactin identifiziert werden konnte (Daly, 2004; Selbach & Backert, 2005; Buday & Downward, 2007).

5.5.2 FAK ist essentiell für die Ausbildung des Elongationsphänotyps

Bevor die Interaktion von Cortactin mit FAK im Detail untersucht werden sollte, wurde überprüft, ob FAK tatsächlich für die Infektion mit *H. pylori* wichtig ist. Zu diesem Zweck wurde die Expression von FAK in AGS-Zellen mit Hilfe von inhibitorischer siRNS herunterreguliert. Im Westernblot mit einem spezifischen anti-FAK-Antikörper ist die deutliche Abnahme der Expression des Proteins ersichtlich (Abb. 14A).

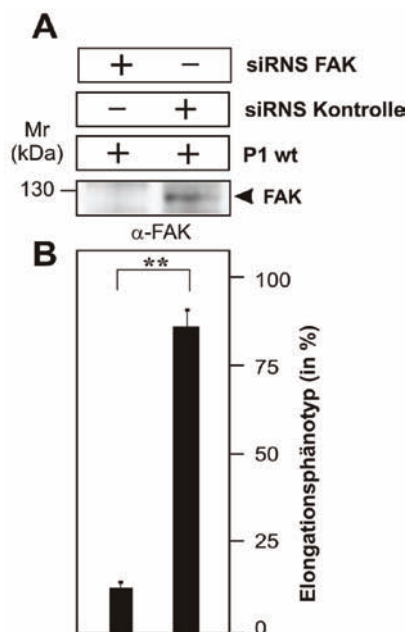


Abb. 14 Rolle von FAK für die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyps in AGS-Zellen. AGS-Zellen wurden mit FAK-siRNS oder einer Kontroll-siRNS transfiziert und nach 48 Stunden mit *H. pylori* für weitere 6 Stunden infiziert. (A) Die Verminderung der FAK-Expression wurde mittels Westernblot-Analyse kontrolliert. Die Westernblot-Analyse mit dem α -GAPDH-Antikörper stellt sicher, dass gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden (Daten nicht gezeigt). Der α -FAK-Blot wurde von Dr. Sabine Brandt zur Verfügung gestellt. (B) Die Anzahl der elongierten Zellen wurde jeweils aus zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert ($P < 0,005$ **). Die Ergebnisse zeigen, dass der *H. pylori*-induzierte Phänotyp in Gegenwart von FAK-siRNS, aber nicht mit der Kontroll-siRNS, inhibiert ist.

Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten im Lumi-Imager zeigte, dass die Expression von FAK um etwa 95% reduziert war (Daten nicht gezeigt). Zur Absicherung wurde eine unspezifische Kontroll-siRNS (Santa Cruz) in die AGS-Zellen transfiziert, die keinen Effekt auf die Expression von FAK zeigte (Abb. 14A). Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit dem *H. pylori*-Stamm P1 infiziert. Die Infektion mit Wildtyp-*H. pylori* erzeugte den Elongationsphänotyp in den Kontrollzellen. Die Entfaltung des Phänotyps war in Gegenwart der anti-FAK siRNS signifikant inhibiert (Abb. 14B). Diese Ergebnisse bestätigen, dass FAK an der Ausbildung des Elongationsphänotyps beteiligt ist.

5.5.3 Die SH3-Domäne von Cortactin bindet an FAK

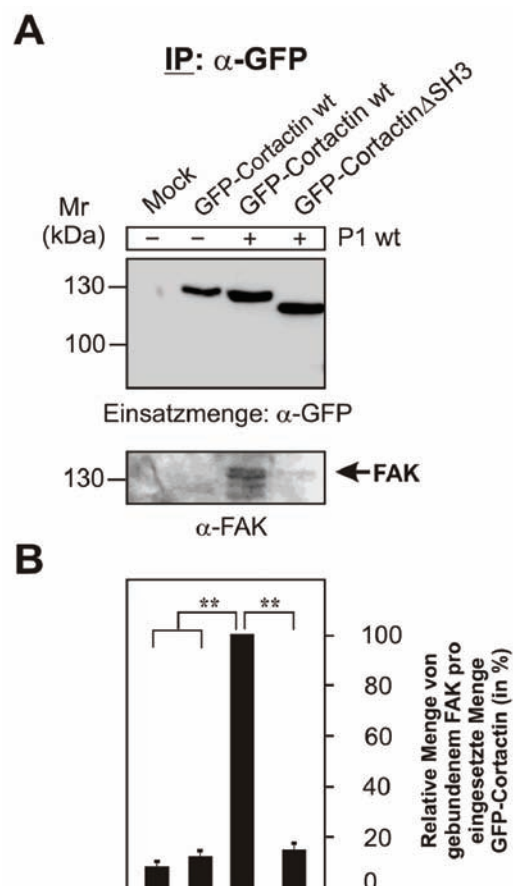


Abb. 15 Die SH3-Domäne von Cortactin ist für die Bindung an FAK essentiell. AGS-Zellen wurden mit GFP-Cortactin und der GFP-Cortactin Δ SH3 Mutante transfiziert. Nach 48 Stunden wurde mit *H. pylori* P1 Wildtyp (wt) für 6 Stunden infiziert und anschließend GFP-immunopräzipitiert. (A) Die Lysate der IP's wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Einsatzmenge der GFP-Cortactin-Konstrukte wurde unter Verwendung des α -GFP-Antikörpers im Westernblot kontrolliert. Die Westernblot-Analyse mit α -FAK zeigt, dass in der *H. pylori*-Infektion FAK im Komplex mit GFP-Cortactin Wildtyp (wt) vorliegt. FAK bildet weder mit den GFP-Cortactin-Deletionsmutanten, noch mit GFP-Cortactin Wildtyp in nicht-infizierten Zellen einen Komplex. (B) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM quantifiziert und die relative Menge an gebundenem FAK pro eingesetzte Menge GFP-Cortactin berechnet (GFP-Cortactin wt + P1 wt = 100 % gebundenes FAK, $P < 0,005$ **, $P < 0,05$ *).

Um weitere Beweise für die Interaktion von Cortactin und FAK zu sammeln und die molekulare Basis hierfür aufzuklären, wurden IP-Experimente mit den verschiedenen generierten GFP-Cortactin-Deletionsmutanten durchgeführt (Abb. 7A). Eine von uns favorisierte Hypothese ist, das Cortactin mit Hilfe seiner SH3-Domäne an eine der beiden bekannten prolinreichen Regionen in FAK bindet (Sieg *et al.*, 1999). Um dies zu überprüfen, wurden entsprechende Cortactin-Konstrukte in AGS-Zellen für 48 Stunden transfiziert und mit *H. pylori* für 6 Stunden infiziert. Es folgte eine IP mittels anti-GFP Antikörper; die Präzipitate wurden präpariert und im Westernblot überprüft. Der anti-GFP-Blot in Abb. 15A zeigt, dass gleiche Mengen an GFP-Cortactin aus den AGS-Zellen präzipitiert wurden. Der Blot wurde anschließend mit einem spezifischen anti-FAK-Antikörper analysiert zum Nachweis von gebundenem FAK. Der resultierende Westernblot zeigt, dass endogenes FAK im Komplex mit Cortactin nach Infektion mit *H. pylori* vorliegt. In Übereinstimmung mit der oben genannten Hypothese, war dagegen kein Immunkomplex von der GFP-Cortactin Δ SH3-Mutante mit endogenem FAK nachweisbar (Abb. 15A).

5.5.4 Rolle der Cortactin-Phosphorylierung für die Interaktion mit FAK

Ein wichtiges Ergebnis der bisherigen Experimente ist, das endogenes FAK im Komplex mit Cortactin nur nach Infektion mit *H. pylori* nachweisbar ist, ein Befund, der möglicherweise auf den definierten Phosphorylierungsstatus von Cortactin während der *H. pylori*-Infektion zurückzuführen sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden nachfolgend phosphorylierungsspezifische Konstrukte von GFP-Cortactin-Mutanten in Gegenwart von HA-FAK für 48 Stunden transfiziert (Abb. 16). Diese Proben wurden in diesem Experiment nicht mit *H. pylori* infiziert, sondern direkt geerntet, gefolgt von einer IP mittels anti-HA-Antikörper. Die Präzipitate wurden präpariert und im Westernblot überprüft. Der anti-HA-Blot in Abb. 16A zeigt, dass gleiche Mengen an HA-FAK in den verwendeten AGS-Zellen vorhanden sind. Der Blot wurde anschließend mit einem spezifischen anti-GFP-Antikörper analysiert zur Detektion von gebundenem GFP-Cortactin. Der entsprechende Westernblot zeigt wie erwartet ein schwaches Signal für nicht-modifiziertes Wildtyp GFP-Cortactin. Die stärksten Signale für gebundenes GFP-Cortactin wurden für die phosphoserin-aktiven S405D- und S418D-Mutanten detektiert, während moderate Signale für die S405/418D-Doppelmutante und die phosphotyrosin-inaktive Y421/466/482F-Mutante beobachtet wurden (Abb. 16A/B). Keine Signale von gebundenem GFP-Cortactin wurden hingegen für die phosphoserin-inaktive S405/418A- und die phosphotyrosin-aktive Y421/466/482D-Mutante nachgewiesen. Diese Befunde zeigen, dass die Phosphorylierung von Cortactin an den Serinresten 405 oder 418 (aber nicht bei der phosphoserin-aktiven S405/418D-Doppelmutante) die Interaktion von Cortactin mit FAK positiv reguliert und durch Phosphorylierung an den Tyrosinresten 421, 466 und 482 negativ reguliert. Diese Ergebnisse sind in sehr guter Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen zur Regulierung des Elongationsphänotyps durch dieselben Cortactin-Mutanten (Abb. 8) und stimmen mit den Beobachtungen zur Serin-

Phosphorylierung von Cortactin in der Membran während der *H. pylori*-Infektion ebenfalls überein (Abb. 11).

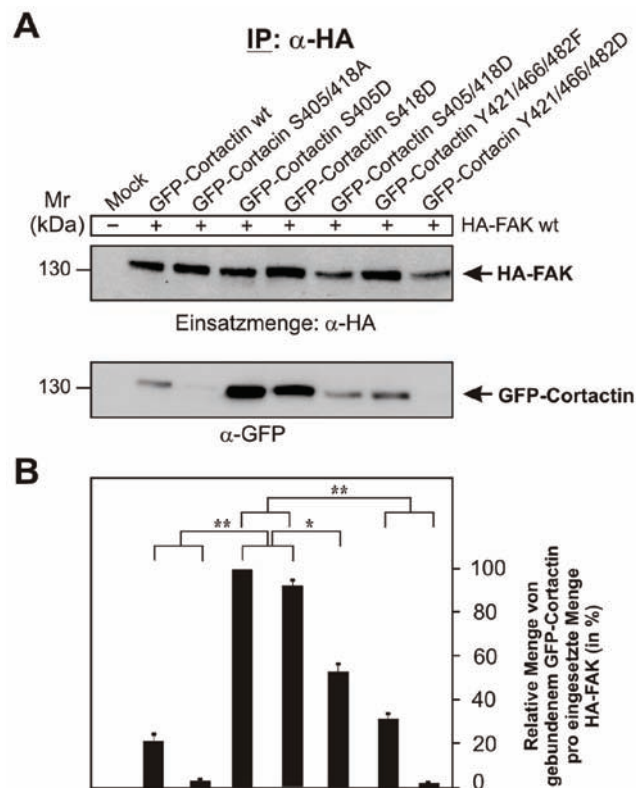


Abb. 16 Die Phosphorylierung von Cortactin an Serinresten 405 oder 418 ist für die Bindung an FAK erforderlich. AGS-Zellen wurden mit HA-FAK Wildtyp (wt) und den verschiedenen GFP-Cortactin-Phosphorylierungsmutanten ko-transfiziert und nach 48 Stunden mit einem HA-Antikörper immunopräzipitiert. (A) Die Lysate der IP's wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Einsatzmenge von HA-FAK wurde unter Verwendung des α -HA-Antikörpers im Westernblot kontrolliert. Die Westernblot-Analyse mit α -GFP zeigt, dass sowohl GFP-Cortactin S405D, als auch S418D an HA-FAK wt bindet. Die S→D-Mutanten ahmen somit eine Phosphorylierung an den entsprechenden Serinresten nach. (B) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung unter Verwendung der Lumi-Image-Software™ quantifiziert und die relative Menge an gebundenem GFP-Cortactin pro eingesetzte Menge HA-FAK berechnet (GFP-Cortactin S405D + HA-FAK wt = 100 % gebundenes GFP-Cortactin, $P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *).

5.5.5 Identifizierung der Cortactin-Bindungsdomäne in FAK

5.5.5.1 Die prolinreichen Regionen 1 und 2 in FAK binden nicht an Cortactin

Die o.g. Beobachtung, dass die SH3-Domäne von Cortactin für die Interaktion mit FAK notwendig ist, ließ uns postulieren, dass mindestens eine der beiden bekannten PxxP-Motive in den prolinreichen Domänen von FAK (PR1 und PR2) für die Interaktion mit Cortactin zuständig sein könnte (Abb. 17A). Es ist bekannt, dass PR1 und PR2 mit den SH3-Domänen von p130Cas bzw. GRAF interagieren können (Sieg *et al.*, 2000). Um die genannte Hypothese zu überprüfen, wurden FAK-defiziente *knockout*-Fibroblasten (FAK^{-/-}-Zellen) für 48 Stunden mit HA-FAK-Wildtyp bzw. HA-FAK Δ PR1- oder HA-FAK Δ PR1/ Δ PR2-Konstrukten transfiziert, die uns von Prof. Dr. Christoph Hauck

(Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt wurden. Die HA-FAK Δ PR1- und die HA-FAK Δ PR1/ Δ PR2-Mutante sind nicht mehr in der Lage, p130Cas bzw. GRAF zu binden (Sieg *et al.*, 2000). Die transfizierten Zellen wurden für weitere 6 Stunden mit *H. pylori* infiziert, gefolgt von einer IP von FAK mittels anti-HA-Antikörper. Die Präzipitate wurden präpariert und im Westernblot überprüft. Der anti-HA-Blot in Abb. 17B zeigt, dass ähnliche Mengen an HA-FAK aus den FAK^{-/-}-Zellen vorhanden sind. Der Blot wurde anschließend mit einem spezifischen anti-Cortactin-Antikörper analysiert zur Detektion von gebundenem endogenem Cortactin. Der entsprechende Westernblot und die densitometrische Auswertung der Banden zeigten unerwartet starke Signale für gebundenes Wildtyp-FAK bzw. die FAK Δ PR1/ Δ PR2-Mutante (Abb. 17B/C). Die Menge an gebundenem Cortactin mit der FAK Δ PR1-Mutante war sogar signifikant höher als bei den beiden anderen Konstrukten (Abb. 17B/C). Da diese Ergebnisse sehr überraschend sind, wurde das Experiment in den FAK^{-/-}-Zellen wiederholt und die IP mit einem anti-Cortactin-Antikörper durchgeführt. Die Westernblots wurden anschließend mit anti-Cortactin- und anti-HA-Antikörpern analysiert. Die Bindung der FAK Δ PR1- und FAK Δ PR1/ Δ PR2-Mutante an endogenes Cortactin war auch hier signifikant und in fünf unabhängigen Experimenten reproduzierbar (Abb. 18A/B). Ähnliche IP-Ergebnisse wurde für die Bindung von endogenem Cortactin an transfizierte HA-FAK-Konstrukte in AGS-Zellen beobachtet (Abb. 19A/B). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass beide PR-Regionen nicht direkt an der Bindung von Cortactin beteiligt sind, sondern im Falle einer Mutation in PR1 in FAK^{-/-}-Zellen war die Bindung in einigen Experimenten sogar verstärkt zu beobachten.

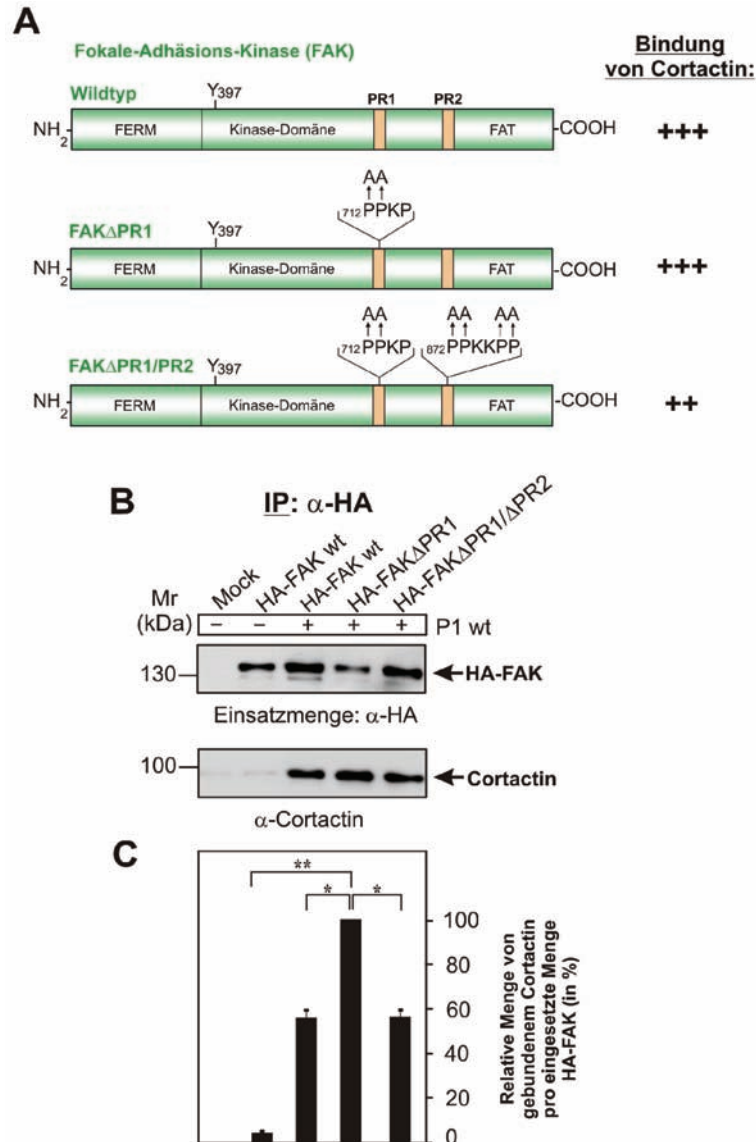


Abb. 17 Die Bindung von Cortactin an transfiziertes HA-FAK in FAK^{-/-}-Fibroblasten ist unabhängig von den prolinreichen Regionen PR1 und PR2. (A) Schematische Darstellung der verwendeten FAK-Konstrukte: FAK wt, FAK Δ PR1 und FAK Δ PR1/PR2 und deren Fähigkeit Cortactin zu binden. FAK ist eine 125 kDa Protein-Tyrosin-Kinase und besteht aus einer N-terminalen FERM (4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne, einer zentralen Kinase-Domäne, prolinreichen Regionen (PR1 und PR2) und einer C-terminalen FAT (*focal-adhesion targeting*)-Domäne. Tyrosin-397 ist die Autophosphorylierungsstelle von FAK, die für die Aktivierung der Kinaseaktivität entscheidend ist. In den FAK-Mutanten Δ PR1 und Δ PR1/PR2 wurden die entsprechend gekennzeichneten Proline durch Alaninreste ausgetauscht (Sieg *et al.*, 2000). Alle FAK-Konstrukte wurden von Prof. Dr. Christof Hauck zur Verfügung gestellt. Bindung von Cortactin; +++: stark ; ++: mäßig stark. (B) FAK^{-/-}-Fibroblasten wurden mit den verschiedenen HA-FAK-Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden mit *H. pylori* P1 wt für 6 Stunden infiziert und anschließend HA-immunopräzipitiert. Die Lysate der IP's wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Einsatzmenge der HA-FAK-Konstrukte wurde unter Verwendung des α -HA-Antikörpers im Westernblot kontrolliert. Die Westernblot-Analyse mit α -Cortactin zeigt, dass Cortactin in *H. pylori*-infizierten Zellen sowohl an HA-FAK wt, als auch an die beiden Mutanten HA-FAK Δ PR1 und HA-FAK Δ PR1/PR2 bindet. In nicht-infizierten Zellen ist hingegen keine Bindung nachweisbar. (C) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM quantifiziert und die relative Menge an gebundenem Cortactin pro eingesetzte Menge HA-FAK berechnet (HA-FAK Δ PR1 + P1 wt = 100 % gebundenes Cortactin, $P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *).

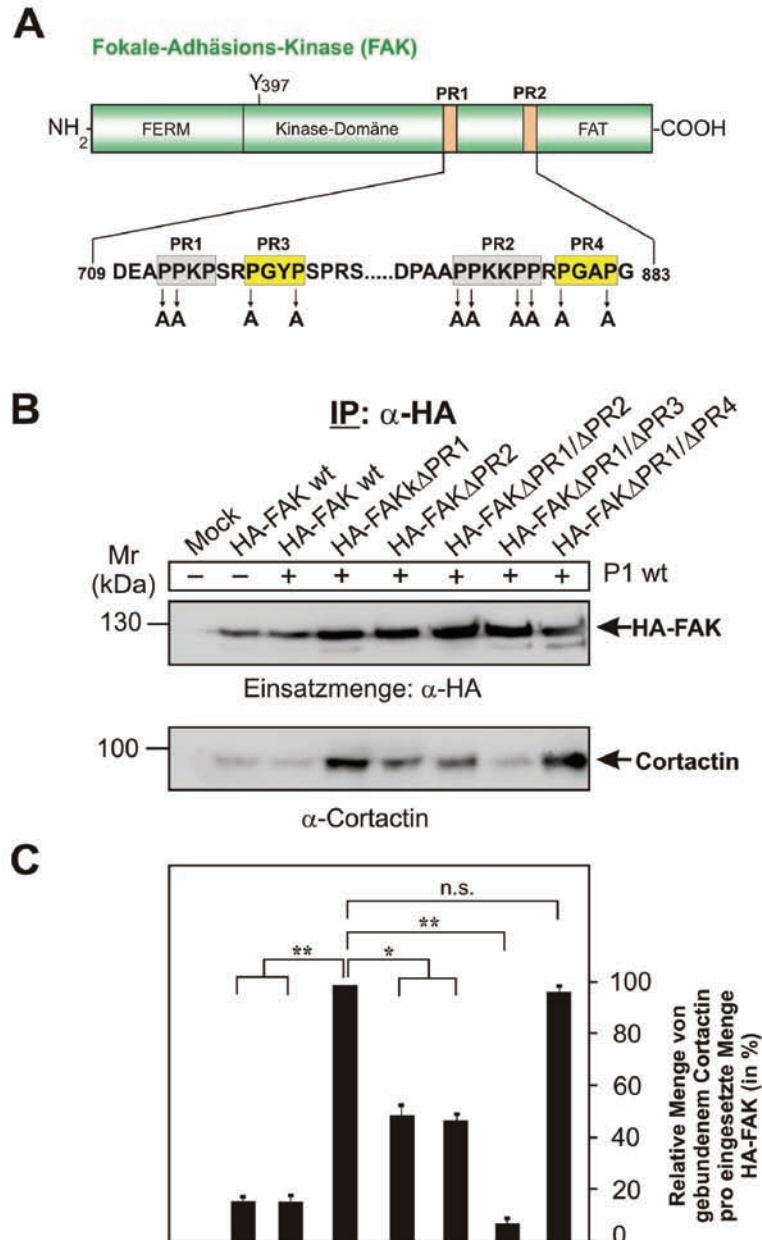


Abb. 20 Die PR3-Region in FAK ist für die Bindung an Cortactin essentiell. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von FAK und dessen prolinreichen Regionen. Neben den bereits bekannten prolinreichen Regionen PR1 und PR2 (grau unterlegt dargestellt) wurden in dieser Studie zwei weitere prolinreiche Regionen in FAK identifiziert, die mit PR3 und PR4 bezeichnet wurden (gelb unterlegt dargestellt). Zur Herstellung weiterer Mutanten wurden in dieser Arbeit die Proline der PR3- und PR4-Region ebenfalls zu Alanin ausgetauscht. (B) AGS-Zellen wurden mit den verschiedenen HA-Fak-Mutanten transfiziert und nach 48 Stunden mit *H. pylori* P1 Wildtyp (wt) für weitere 6 Stunden infiziert und anschließend HA-immunopräzipitiert. Die Einsatzmenge der HA-Fak-Konstrukte wurde mittels des α -HA-Antikörpers im Westernblot kontrolliert. Die Westernblot-Analyse mit α -Cortactin zeigt, dass die HA-FAK Δ PR1/PR3-Mutanten kaum Cortactin bindet und somit die prolinreiche Region PR3 an der Interaktion beteiligt ist. (C) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung unter Verwendung der Lumi-Image-Software™ quantifiziert und die relative Menge an gebundenem Cortactin pro eingesetzte Menge HA-Fak berechnet (HA-Fak Δ PR1 + P1 wt = 100 % gebundenes Cortactin; $P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *; n.s. nicht signifikant).

Um die Hypothese zu überprüfen, dass PR3 und/oder PR4 an der Bindung von Cortactin involviert sind, wurden beide Prolinreste in jedem der zwei Motive gegen Alanine im Hintergrund der Δ PR1-Mutante ausgetauscht (Abb. 20A). Die resultierenden Konstrukte wurden als HA-FAK Δ PR1/ Δ PR3- und HA-FAK Δ PR1/ Δ PR4-Mutanten bezeichnet. Beide Konstrukte wurden anschließend für 48 Stunden in AGS-Zellen transfiziert und dann für weitere 6 Stunden mit *H. pylori* infiziert, gefolgt von einer IP von FAK mittels anti-HA-Antikörper. Die Präzipitate wurden präpariert und im Westernblot überprüft. Der anti-HA-Blot in Abb. 20B zeigt, dass ähnliche Mengen an HA-FAK in den untersuchten AGS-Zelllysaten vorhanden sind. Der Blot wurde anschließend mit dem anti-Cortactin-Antikörper analysiert zur Detektion von gebundenem endogenem Cortactin. Der entsprechende Westernblot und die densitometrische Auswertung der Banden zeigen erneut die stärksten Signale für gebundenes Cortactin mit der FAK Δ PR1-Mutante als auch in der FAK Δ PR1/ Δ PR4-Doppelmutante, aber nicht mit der FAK Δ PR1/ Δ PR3-Doppelmutante (Abb. 20B/C). Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass die PR3-Region und nicht die PR4-Region direkt an der Bindung von Cortactin beteiligt ist.

5.5.5.3 Die Bindung von Cortactin ist mit erhöhter FAK-Kinaseaktivität assoziiert

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bindung von Cortactin an FAK während der *H. pylori*-Infektion für die Ausbildung des Elongationsphänotyps von Bedeutung sein könnte. Nachfolgend sollte nun die Frage geklärt werden, welchen Einfluss die verschiedenen Mutationen in den prolinreichen Regionen auf die Kinaseaktivität von FAK während der Infektion mit *H. pylori* haben. Um diese Frage zu beantworten, wurden die mit einem HA-Antikörper präzipitierten HA-FAK-Konstrukte aus Abb. 20 mit einem aktivierungsspezifischen anti-Phospho-FAK Antikörper untersucht. Nach Stimulierung wird FAK am Tyrosinrest 397 autophosphoryliert, was als ein Maß für die FAK-Kinaseaktivität herangezogen wird (Mitra & Schlaepfer, 2006). Der entsprechende Westernblot wurde folglich mit einem Antikörper inkubiert, der die phosphorylierte Form am Tyrosin 397 erkennt. Die densitometrische Auswertung der Banden zeigt die stärksten Signale für aktiviertes FAK bei der FAK Δ PR1- und der FAK Δ PR2-Mutante (Abb. 21A/B). Moderate FAK-Aktivität wurde dagegen für Wildtyp-FAK und die FAK Δ PR1/ Δ PR2-Mutante nach Infektion beobachtet, während die Kinaseaktivität bei den FAK Δ PR1/ Δ PR3- und FAK Δ PR1/ Δ PR4-Doppelmutanten in Gegenwart von *H. pylori* nur sehr gering ist – ähnlich dem Wildtyp-FAK in der nicht-infizierten Kontrolle (Abb. 21A/B). Interessant ist hier, dass die nachgewiesene FAK-Aktivität bei den Konstrukten mit dem Bindungsvermögen von Cortactin korreliert (Abb. 20). Ausgenommen davon ist nur die FAK Δ PR1/ Δ PR4-Doppelmutante, die eine starke Bindung an Cortactin aufweist, aber nur über wenig FAK-Aktivität zeigt. Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass die Bindung von Cortactin einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität von FAK hat. Neben der prolinreichen Region PR3 in FAK, die für die Assoziation mit

Cortactin entscheidend ist, spielen somit noch weitere Faktoren eine Rolle, die in zukünftigen Studien untersucht werden müssen.

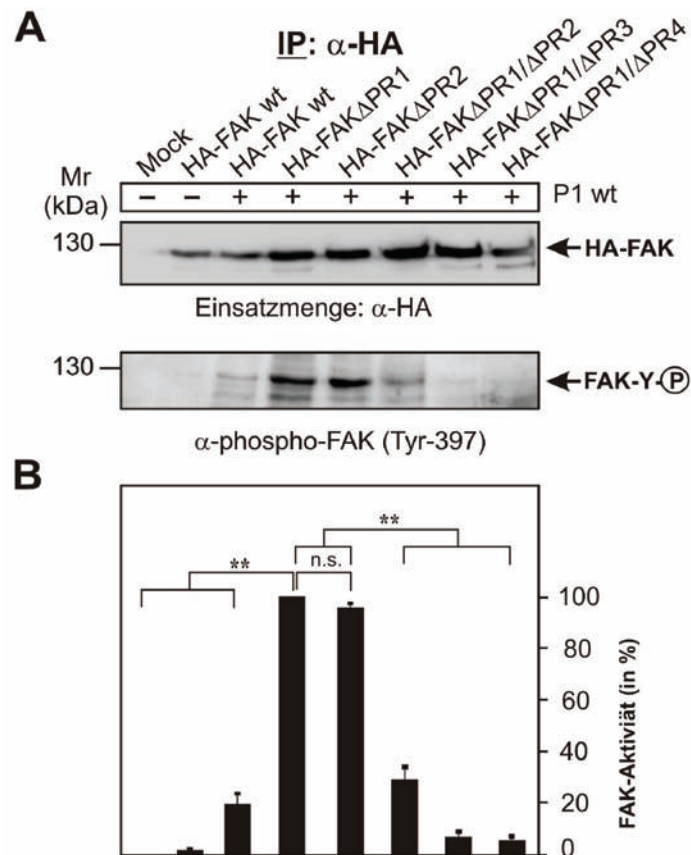


Abb. 21 Die Bindung von Cortactin an FAK ist assoziiert mit erhöhter FAK-Kinaseaktivität. AGS-Zellen wurden mit den verschiedenen HA-FAK-Mutanten transfiziert und nach 48 Stunden mit *H. pylori* P1 Wildtyp für weitere 6 Stunden infiziert und anschließend mit dem anti-HA-Antikörper immunopräzipitiert. (A) Die Einsatzmenge der HA-FAK-Konstrukte wurde im Westernblot kontrolliert. Es wurden dieselben Proben verwendet wie in Abb. 20B gezeigt. Die Aktivität der FAK-Kinase wurde im Westernblot mittels α -phospho-FAK (Tyr-397)-Antikörper analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass HA-FAK Δ PR1 und HA-FAK Δ PR2 in der Infektion mit *H. pylori* sehr stark aktiviert werden. Bei den anderen FAK-Konstrukten war hingegen keine bzw. nur eine schwache Aktivität nachweisbar. (B) Die Aktivität der FAK-Kinase wurde densitometrisch analysiert. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten im Westernblot erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM. (HA-FAK Δ PR1 = 100 % FAK-Aktivität, $P < 0,005$ **; n.s. nicht signifikant).

5.5.6 Das *H. pylori* CagA-Protein spielt eine wichtige Rolle für die Cortactin-FAK-Interaktion und erhöhte FAK-Aktivität

Bisher wurde die Bindung von FAK an Cortactin unter zu Hilfenahme von überexprimierenden Transfektionskonstrukten gezeigt. Eine weitere wichtige Frage war deshalb, ob die endogenen Proteine während der *H. pylori*-Infektion miteinander interagieren und ob das bakterielle CagA-Protein hierbei eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurden AGS-Zellen mit Wildtyp-*H. pylori* und einer isogenen Δ cagA-Mutante unter identischen Bedingungen für 6 Stunden infiziert. Die infizierten Zellen wurden geerntet, gefolgt von einer IP mittels anti-Cortactin-Antikörper. Die Immunpräzipitate

wurden präpariert und im Westernblot überprüft. Die Expression von Cortactin wird offenbar durch die Infektion von *H. pylori* stimuliert und das CagA-Protein scheint hierbei involviert zu sein (Daten nicht gezeigt). Es war deshalb sehr schwierig identische Mengen des Proteins in einer IP zu bekommen. Der anti-Cortactin-Blot in Abb. 22A ist Ausdruck dessen und zeigt deshalb unterschiedliche Mengen des Proteins. Die Cortactin-Mengen wurden folglich densitometrisch gemessen, um quantifizierte Daten für die Präzipitation von FAK pro Einsatzmenge Cortactin zu erhalten (Abb. 22B). Die Quantifizierungsdaten zeigen, dass endogenes Cortactin nach Infektion mit *H. pylori* sehr stark an endogenes FAK bindet und dass diese Bindung in der Infektion mit der $\Delta cagA$ -Mutante signifikant herabgesetzt, aber nicht vollständig blockiert ist. Die Aktivität des an Cortactin gebundenen FAK wurde im Immunoblot mit dem phosphospezifischen anti-FAK-PY-397 Antikörper bestimmt und ist mehr als 100-fach höher in der Wildtyp-Infektion im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle, während der Wert für die $\Delta cagA$ -Mutante bei etwa 42% des Wildtyps liegt (Abb. 22B). Diese Daten zeigen eindeutig, das (i) die endogenen FAK- und Cortactin-Proteine nach Infektion mit *H. pylori* interagieren, das (ii) diese Interaktion mit erhöhter FAK-Aktivität korreliert und das (iii) diese Aktivität bei Infektion mit der $\Delta cagA$ -Mutante signifikant abgeschwächt ist.

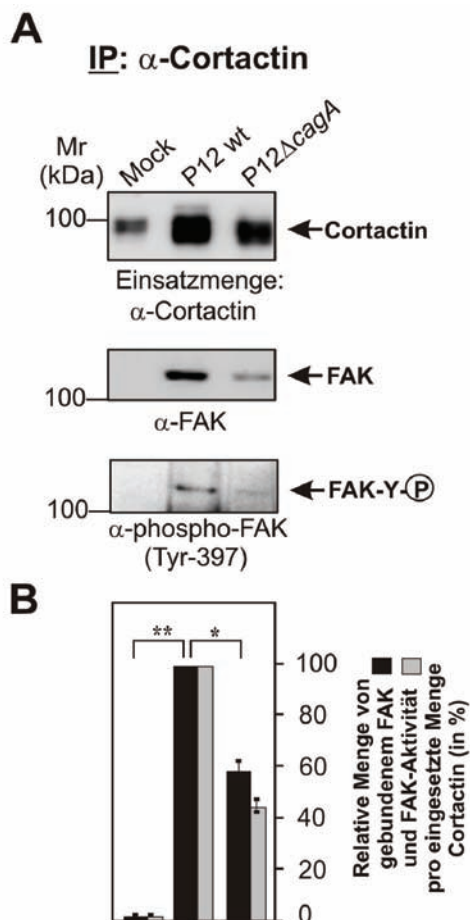


Abb. 22 Endogenes Cortactin bildet einen Komplex mit aktiviertem FAK nach Infektion mit *H. pylori* und Rolle des CagA-Proteins. (A) AGS-Zellen wurden für 6 Stunden mit P12 Wildtyp (wt) oder der P12 $\Delta cagA$ -Mutante infiziert. Anschließend wurde die Immunpräzipitation (IP) mit einem anti-Cortactin-Antikörper durchgeführt. Die Lysate der IP's wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Westernblot-Analysen mit α -Cortactin, α -FAK und α -phospho-FAK (Tyr-397) zeigen, dass Cortactin und aktiviertes FAK in einem Komplex vorliegen bei der Infektion mit Wildtyp-*H. pylori*. Dieser Komplex ist in nicht-infizierten gar nicht nachweisbar und in P12 $\Delta cagA$ -infizierten Zellen deutlich blockiert. (B) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM quantifiziert. Die relative Menge an gebundenem FAK pro eingesetzte Menge Cortactin sowie die FAK-Aktivität wurden berechnet (P12 wt = 100 % gebundenes FAK, $P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *).

5.6 Identifizierung von Vav2 als neuen Interaktionspartner von Cortactin

5.6.1 Phosphorylierung von Cortactin am Tyrosinrest 466 ist ausreichend für die Interaktion mit Vav2

Die Daten aus den Kapiteln 5.3.1-5.3.2 zeigen in der *H. pylori*-Infektion, dass neben der Serin-phosphorylierten Form von Cortactin in der Membran auch eine am Tyrosinrest 466 phosphorylierte Form im Zytoplasma der infizierten Zellen spezifisch angereichert ist. Diese Daten sprechen für ein Modell, in dem die Serin-phosphorylierte Form von Cortactin in der Membranfraktion im Komplex mit FAK vorliegt und deren Kinaseaktivität stimuliert, doch welche Funktion hat die Tyrosin-phosphorylierte Form von Cortactin? Ein bedeutender Phänotyp in der *H. pylori*-Infektion ist die induzierte hohe Zellmotilität und Cortactin wird in mehreren Publikationen mit dynamischen Aktin-zytoskeletalen Veränderungen in Verbindung gebracht (Daly, 2004; Selbach & Backert, 2005). Wir haben deshalb postuliert, dass die am Tyrosinrest 466 phosphorylierte Form von Cortactin entweder direkt mit einer kleinen Rho-GTPase (z.B. Rac1) bzw. über ein Guanin-Austauschfaktor (GEF) interagieren könnte. Ein sehr guter Kandidat für ein solches GEF war z.B. Vav2, ein spezifischer Bindungspartner und Aktivator von Rac1, der in seiner Sequenz über eine SH2-Domäne für die Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinresten verfügt (Hornstein *et al.*, 2004; Abb. 24A). Ich habe deshalb IP-Experimente von entsprechenden Proteinproben aus Abb. 22 (vor und nach Infektion mit *H. pylori*-Stämmen) mit einem anti-Cortactin-Antikörper durchgeführt und die Westernblots mit anti-Rac1- und anti-Vav2-Antikörpern analysiert. Der resultierende Westernblot zeigt eine starke Bande für präzipitiertes Rac1 in der Infektion mit Wildtyp-*H. pylori* und eine Bande mit 65% verminderter Intensität bei der $\Delta cagA$ -Mutante (Abb. 23A/B). Dieses Ergebnis war in vier unabhängigen Experimenten reproduzierbar nachweisbar, dagegen wurde keine Bande im anti-Vav2-Blot beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund lässt uns vermuten, dass Cortactin direkt oder indirekt mit Rac1 interagieren kann. Die Abwesenheit eines Signals für Vav2 ist möglicherweise auf eine geringe Expression des Proteins in der Zelle zurückzuführen oder das Protein wird nur schwach von den kommerziell-verfügbaren Antikörpern erkannt (z.B. Vav2-Antikörper der Firma Santa Cruz). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese haben die Ergebnisse von Westernblots nur ganz schwache Banden von Vav2 im totalen Zellysat ergeben (Daten nicht gezeigt).

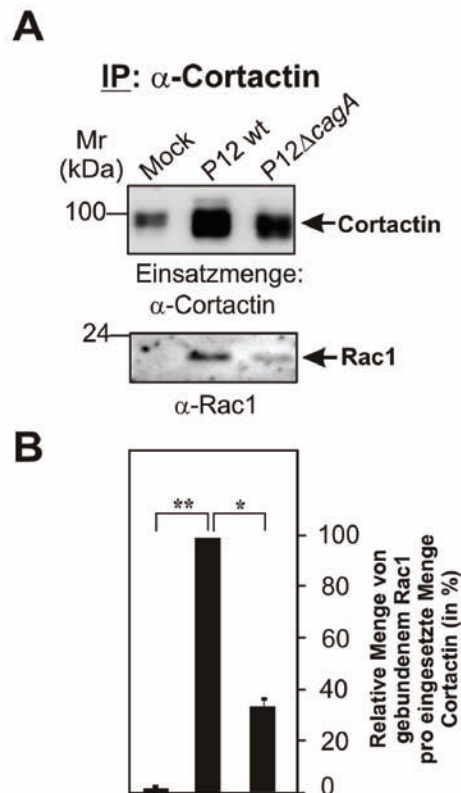


Abb. 23 Cortactin bildet einen Immunkomplex mit der Rho-GTPase Rac1 während der Infektion mit *H. pylori*. (A) AGS-Zellen wurden für 6 Stunden mit P12 Wildtyp (wt) oder der P12 Δ cagA-Mutante infiziert. Anschließend wurde die Immunpräzipitation (IP) mit einem anti-Cortactin-Antikörper durchgeführt (Ergebnisse von diesem Experiment wurden bereits in Abb. 22A gezeigt). Die Lysate der IP's wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Westernblot-Analysen mit α -Cortactin und α -Rac1 zeigen, dass in mit P12 Wildtyp-infizierten Zellen Cortactin und Rac1 in einem Komplex vorliegen. Dieser Komplex ist nicht in nicht-infizierten Zellen und nur in einem geringeren Maße in P12 Δ cagA-infizierten Zellen nachweisbar. (B) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM quantifiziert und die relative Menge an gebundenem Rac1 pro eingesetzte Menge Cortactin berechnet (P12 wt = 100 % gebundenes Rac1).

Kleine Rho GTPasen wie Rac1 benötigen für ihre Aktivierung die Interaktion mit einem GEF (Hall, 1998; Jeanteur, 1999). Bisher gibt es keine Berichte darüber, dass Cortactin selbst als ein GEF funktionieren könnte (Daly, 2004; Selbach & Backert, 2005). Deshalb wurde eine genaue Analyse der Aminosäuresequenz von Cortactin durchgeführt, die allerdings auch keine Hinweise auf Homologien zu einem bekannten GEF ergaben. Wir haben deshalb postuliert, dass Cortactin möglicherweise nicht direkt mit Rac1 interagiert sondern indirekt über die Bindung zu Vav2 (Abb. 24A). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde HA-fusioniertes Vav2 in AGS-Zellen in Gegenwart der hergestellten GFP-Cortactin-Konstrukte transient exprimiert. Die transfizierten Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet, gefolgt von einer IP mittels anti-HA-Antikörper. Die Immunpräzipitate wurden präpariert und im Westernblot überprüft. Die Präsenz von GFP-Cortactin im IP-Ansatz wurde mit einem anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Der Westernblot und die densitometrische Auswertung in Abb. 24B/C zeigen, dass Wildtyp-Vav2 nicht mit Wildtyp-GFP-Cortactin interagiert. Dagegen

wurden starke Banden für die phosphorylierungsaktive Cortactin Y421/466/482D-Mutante aber nicht für die phosphorylierungsdefiziente Y421/466/482F-Mutante nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob der phosphorylierte Tyrosinrest 466 wie vermutet direkt an der Bindung zu Vav2 beteiligt ist, habe ich die entsprechenden Y466D- und Y466F-Mutanten von GFP-Cortactin hergestellt und im Experiment verwendet. Interessant ist, dass die phosphorylierungsaktive Y466D-Mutante sogar mit höherer Effizienz an Vav2 bindet als die Y421/466/428D-Mutante (Abb. 24B/C). In den entsprechenden IPs waren reproduzierbar immer zwei GFP-Cortactin-Banden bei etwa 125 und 130 kDa nachweisbar. Die Natur dieser beiden Banden ist nicht eindeutig nachgewiesen, könnte aber durch ein unterschiedliches Muster in der Tyrosin- bzw. Serin-Phosphorylierung des Proteins zu erklären sein (Daly, 2004; Selbach & Backert, 2005). Interessant ist auch, dass Cortactin in der IP mit der Y466F-Mutante ebenfalls beobachtet wurde, aber nur die obere 130 kDa-Bande sichtbar ist (Abb. 24B). Diese Befunde könnten daraufhin deuten, dass zwei verschiedene Formen von Cortactin an Vav2 binden. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass der phosphorylierte Tyrosinrest 466 in Cortactin ausreichend für die beobachtete Interaktion mit Vav2 ist.

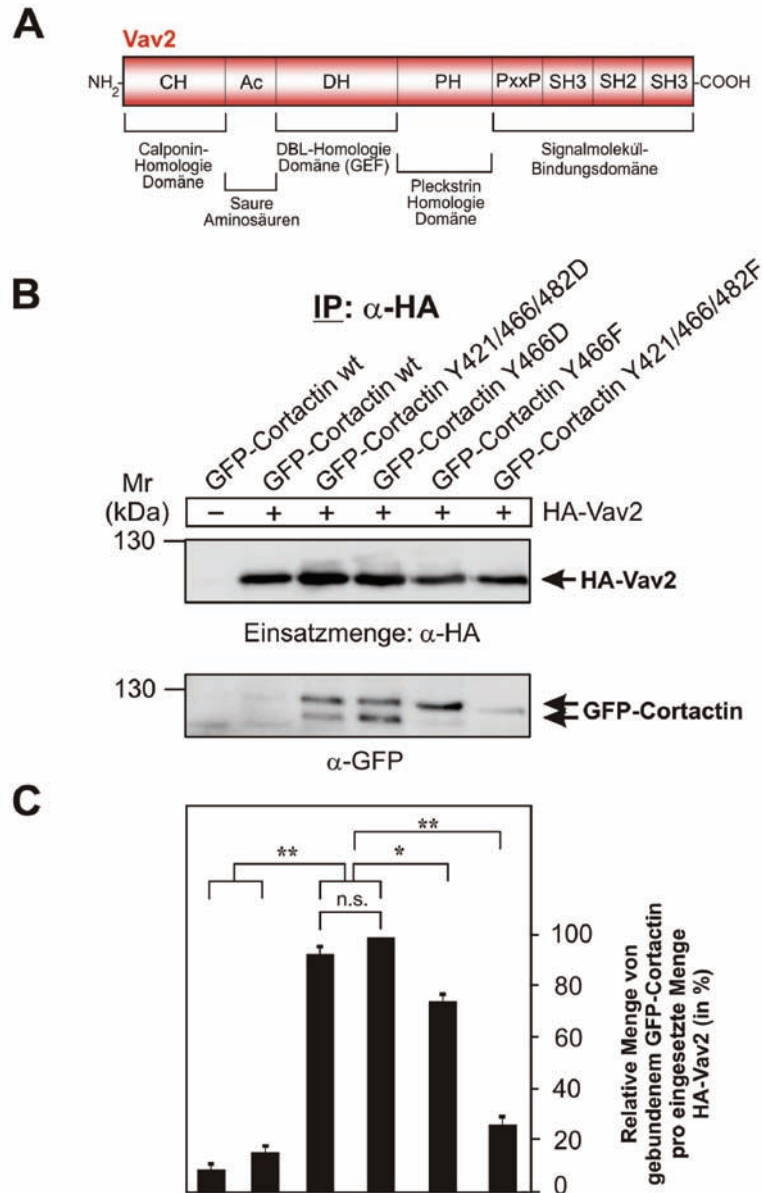


Abb. 24 Die Phosphorylierung von Cortactin am Tyrosinrest 466 ist ausreichend für die Interaktion mit Vav2. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Vav2. (B) AGS-Zellen wurden mit HA-Vav2 Wildtyp und GFP-Cortactin wt oder mit GFP-Cortactin-Tyrosin-Phosphorylierungsmutanten ko-transfiziert und nach 48 Stunden erfolgte die Immunopräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper. Die Einsatzmenge von HA-Vav2 wurde im Westernblot unter Verwendung des α -HA-Antikörpers kontrolliert. Die Westernblot-Analyse mit dem α -GFP-Antikörper zeigt, dass die phosphotyrosin-aktiven Y421/466/482D- und Y466D-Cortactin-Mutanten an HA-Vav2 binden, wohingegen keine Bindung bei der phosphotyrosin-inaktiven Y421/466/482F-Mutante nachweisbar ist. Eine schwächere Bindung zeigt sich zwischen HA-Vav2 und GFP-Cortactin-Y466F. (C) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung unter Verwendung der Lumi-Image-Software™ quantifiziert und die relative Menge an gebundenem GFP-Cortactin pro eingesetzte Menge HA-Vav2 berechnet (GFP-Cortactin Y466D = 100 % gebundenes HA-Vav2, $P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *, n.s. nicht signifikant).

5.6.2 Interaktion von Vav2 mit anderen Wirtszellproteinen

Neben der nachgewiesenen Interaktion von Vav2 bzw. FAK mit Cortactin, wurde nach weiteren Interaktionspartnern der beteiligten Proteine in Abhängigkeit von der *H. pylori*-Infektion gesucht. Zu diesem Zweck wurden AGS-Zellen für 6 Stunden mit Wildtyp-*H. pylori* sowie isogenen $\Delta cagA$ - und $\Delta virB11$ -Mutanten unter identischen Bedingungen infiziert. Die infizierten Zellen wurden geerntet, gefolgt von einer IP mittels anti-Vav2-Antikörper. Die Immunpräzipitate wurden präpariert und im Westernblot überprüft. Die Expression von Vav2 war ähnlich in allen Proben und entsprechende Blots wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine inkubiert. Ein sehr interessantes Ergebnis wurde im anti-FAK-Blot erzielt, wo Signale für die nicht-infizierte Kontrolle und die CagA-sekretionsdefiziente $\Delta virB11$ -Mutante nachgewiesen wurden (Abb. 25A/B). Keine FAK-Banden wurden hingegen in der Infektion mit Wildtyp-*H. pylori* und der $\Delta cagA$ -Mutante beobachtet (Abb. 25A/B). Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass Vav2 in nicht-infizierten Zellen (oder in der Infektion mit der $\Delta virB11$ -Mutante) im Komplex mit FAK vorliegt. Dieser Komplex wird durch die Infektion mit Wildtyp-*H. pylori* in CagA-unabhängiger Weise zerstört und beide Proteine liegen anschließend in separaten Komplexen mit Cortactin vor, entweder mit der Serin-phosphorylierten Form (FAK) oder der Tyrosin-phosphorylierten Form (Vav2).

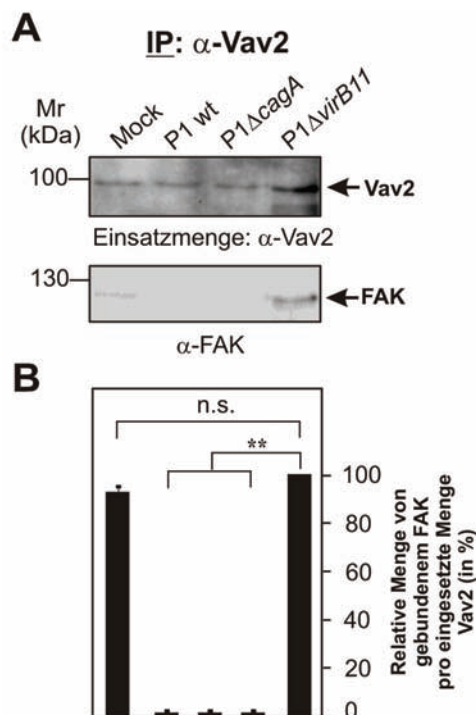


Abb. 25 Interaktion von Vav2 mit FAK. (A) AGS-Zellen wurden für 6 Stunden mit P1 Wildtyp (wt) bzw. der P1 Δ cagA- oder P1 Δ virB11-Mutante infiziert und anschließend Vav2-immunopräzipitiert. Die Westernblot-Analyse mit α -FAK zeigt, dass Vav2 und FAK in nicht-infizierten Zellen in einem Komplex vorliegen, der nach Infektion in CagA-unabhängiger Weise zerstört wird. (B) Die Bandenintensitäten wurden durch densitometrische Auswertung quantifiziert und die relative Menge an gebundenem FAK pro eingesetzte Menge Vav2 berechnet (P1 Δ virB11 = 100 % gebundenes FAK, $P < 0,005$ **; n.s. nicht signifikant).

5.6.3 Induktion von Rac1-abhängiger Zellmotilität während der *H. pylori*-Infektion

Die o.g. Ergebnisse sprechen für ein Modell, in dem am Tyrosinrest 466 phosphoryliertes Cortactin im Zytoplasma spezifisch an Vav2 bindet, und anschließend die kleine GTPase Rac1 in den Komplex rekrutiert und aktiviert. Um zu demonstrieren, dass Rac1 tatsächlich während der Infektion mit *H. pylori* aktiviert wird, wurde aktiviertes GTP-Rac1 im so genannten CRIB-Pulldown präpariert und im Westernblot mit einem anti-Rac1 Antikörper nachgewiesen. Abbildung 26A zeigt, dass *H. pylori* Rac1 über einen Zeitraum von 3 Stunden kontinuierlich aktiviert. Die Rac1-Aktivierung korreliert zeitlich mit der Entstehung des Elongationsphänotyps zwischen 2-3 Stunden nach Infektion (Abb. 26B).

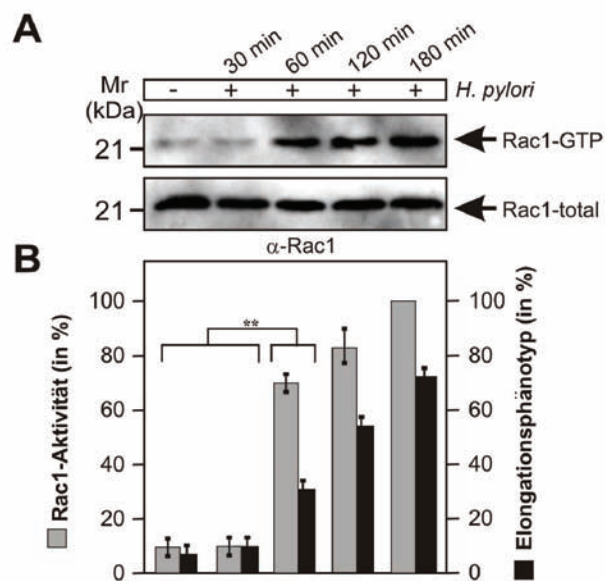


Abb. 26 Aktivierung von Rac1 während der *H. pylori*-Infektion. (A) AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* für 30, 60, 120 und 180 min infiziert und aktiviertes GTP-Rac1 wurde im CRIB-GST-Pulldown präpariert. Die Westernblot-Analyse der Pulldowns mit α -Rac1 (oben) zeigt, dass während der *H. pylori*-Infektion Rac1 kontinuierlich aktiviert wird. Die Analyse der Zellysate mit dem α -Rac1-Antikörper (unten) zeigt, dass überall gleiche Mengen an Rac1 vorhanden sind. Die α -Rac1-Blots wurden von Dr. Sabine Brandt zur Verfügung gestellt. (B) Die Rac1-Aktivität wurde zu jedem Zeitpunkt densitometrisch analysiert. Die Quantifizierung der Banden in den Westernblots erfolgte unter Verwendung der Lumi-Image-SoftwareTM. Die Anzahl der elongierten Zellen wurde zu jedem Zeitpunkt der Infektion aus jeweils zehn verschiedenen 0,25-mm² großen Gesichtsfeldern quantifiziert (180 min = 100 % Rac1-Aktivität, $P < 0,005$ **).

Frühere Berichte aus der Gruppe von PD Dr. Steffen Backert zeigten, das ein funktionelles Ausschalten von Rac1 durch dominant-negative Konstrukte oder bestimmte GTPase-inaktivierende Toxine (z.B. ToxB oder TcdBF) mit einer Blockierung der Zellmigration und des Elongationsphänotyps einhergehen (Brandt *et al.*, 2007). Um nun zu zeigen, welchen Einfluß die Phosphorylierung von Cortactin am Tyrosinrest 466 auf die Rac1-abhängige Zellmotilität hat, wurden die phosphorylierungsaktives GFP-Cortactin Y466D und phosphorylierungsinaktives GFP-Cortactin Y466F für 48 Stunden in konfluente AGS-Zellen transfiziert, gefolgt von

einer Infektion mit *H. pylori* in einem so genannten Wundheilungs-Assay (*woundhealing* oder *scratch-wound migration Assay*). Mit einem solchen Assay untersucht man die Fähigkeit von Zellen, eine künstliche Wunde zu schließen, die man durch das Zufügen eines schmalen Ritzes in den Zellrasen bringt. Wie in Abb. 27A zu sehen, sind die AGS-Kontrollzellen ohne *H. pylori*-Infektion nicht in der Lage, die künstliche Wunde nach 24 Stunden Inkubation zu schließen. Die Fähigkeit zum Wundverschluss wurde wie im Material & Methodenteil beschrieben quantifiziert und ist signifikant erhöht, wenn phosphorylierungsaktives GFP-Cortactin Y466D in den Zellen exprimiert ist, während die Expression von phosphorylierungsinaktivem GFP-Cortactin Y466F diese Fähigkeit unterdrückt (Abb. 27B). Diese Daten zeigen eindeutig, daß Rac1 von *H. pylori* während der Infektion zeitabhängig aktiviert wird und das die Rac1-abhängige Zellmigration durch Cortactin (phosphoryliert am Tyrosinrest 466) positiv stimuliert wird.

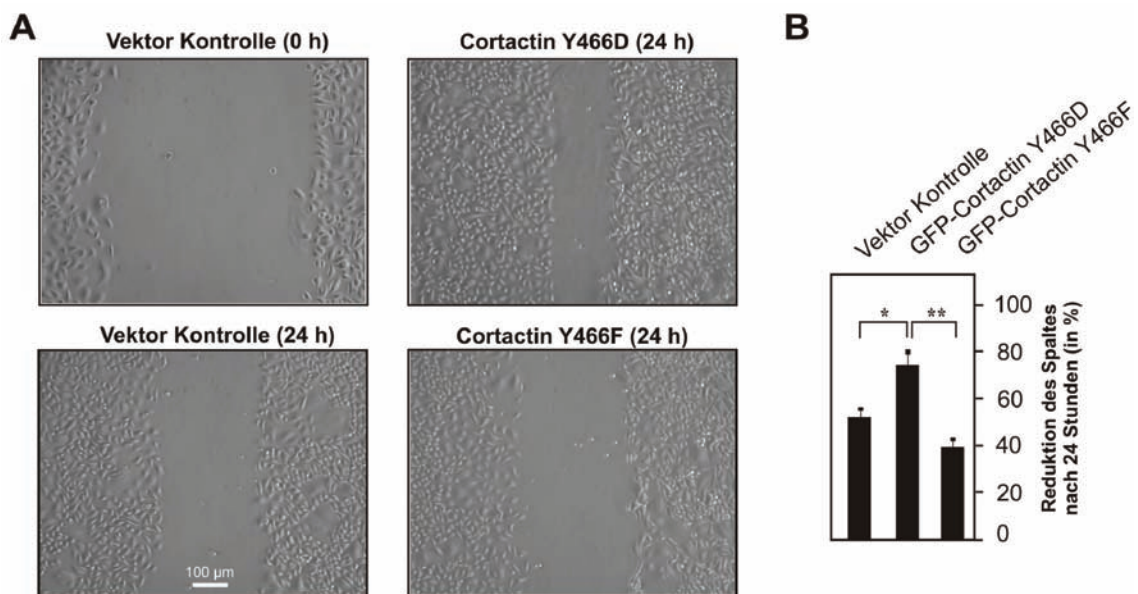


Abb. 27 Untersuchung des Migrationsvermögens von *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen in Abhängigkeit von der Expression von phosphorylierungsaktiven/-inaktiven GFP-Cortactin. (A) Phasenkontrastmikroskopie von AGS-Zellen nach 0 bzw. 24 Stunden (B) Dargestellt ist die Quantifizierung der Spaltreduktion der verschiedenen Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Geschwindigkeit der Spaltreduktion in den GFP-Cortactin Y466D-Zellen signifikant erhöht. Die Spaltreduktion der GFP-Cortactin Y466F-Zellen ist vergleichbar mit der Reduktion in den Kontrollzellen. Ausgewertet wurden drei unabhängige Versuchsansätze (n=3). Pro Spalt wurde ein Mittelwert aus zehn Messungen gebildet. Die Phasenkontrastaufnahmen stellen einen repräsentativen Versuchsansatz dar. ($P < 0,005$ **; $P < 0,05$ *).

6 DISKUSSION

Helicobacter pylori ist ein sehr erfolgreiches Pathogen in der Evolution, das die Magenschleimhaut des Menschen bei etwa 50% der Weltbevölkerung besiedelt. Die Infektion mit *H. pylori* ist die Ursache von 80-90 % der Gastritiden, nahezu aller Zwölffingerdarmgeschwüre und etwa 80 % aller Magengeschwüre (Peek, Jr. & Blaser, 2002; Monack *et al.*, 2004; Backert & Meyer, 2006; Suerbaum & Josenhans, 2007). Epidemiologische Studien zeigten, dass *H. pylori*-Stämme, welche die *cag*-Pathogenitätsinsel und das CagA-Protein exprimieren, häufiger Erkrankungen wie Gastritis, Magengeschwüre und sogar Magenkrebs auslösen als Stämme, denen die Pathogenitätsinsel fehlt. CagA wird in das Zytoplasma von *in vitro* kultivierten Wirtszellen transloziert und durch Src- und Abl-Kinasen phosphoryliert (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007). Obwohl CagA keine Sequenzhomologie zu einem bekannten eukaryontischen oder prokaryontischen Protein hat, scheint es in seiner dreidimensionalen Struktur und Funktion ein eukaryontisches Protein nachzuahmen und zelluläre Signaltransduktionsprozesse in infizierten Magenepithelzellen direkt zu beeinflussen (Blaser & Atherton, 2004; Backert & Meyer, 2006; Backert & Selbach, 2008; Hatakeyama, 2008). Die Infektion von gastrischen Epithelzellen mit CagA-positiven *H. pylori*-Stämmen *in vitro* führt zu Aktin-zytoskelettalen Veränderungen und zur Dissoziation der Zell/Zell-Verbindungen. Über die molekularen Mechanismen der *H. pylori*-induzierten Signalwege war zu Beginn der vorliegenden Arbeit wenig bekannt.

Ziel meiner Arbeiten war die Aufklärung der Funktion des Aktin-bindenden Proteins Cortactin und dessen Signalkaskaden während der Infektion von gastrischen Epithelzellen mit *H. pylori in vitro*. Cortactin ist ein multifunktionelles Protein und spielt in diversen Signalwegen von gesunden und Karzinomzellen eine bedeutende Rolle (siehe Kapitel 1.5); über die molekulare Regulierung des Proteins ist allerdings nur sehr wenig publiziert (Daly, 2004; Selbach & Backert, 2005). Die Verwendung der gastrischen Epithelzelllinie AGS als Infektionsmodell und die Anwendung von molekularbiologischen, biochemischen und zellbiologischen Methoden in meiner Arbeit, führten zu wichtigen neuen Erkenntnissen zur molekularen Funktion des Proteins. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cortactin über CagA-abhängige und CagA-unabhängige Signalwege im Phosphorylierungsmuster an jeweils drei Tyrosin- und Serinresten verändert wird. Dies führt dazu, dass die subzelluläre Lokalisation von Cortactin während der Infektion variiert wird. Folglich wird auch das Vermögen von Cortactin zur Bindung und Aktivierung weiterer Signalfaktoren nachhaltig beeinflusst. Insgesamt wurden in dieser Arbeit zwei neue Interaktionspartner von Cortactin identifiziert und die entsprechende Interaktion, Signaltransduktion sowie phänotypische Veränderungen im Detail beschrieben.

6.1 Regulierung von Cortactin durch Kinasen der Erk-, PAK- und Src-Familie

Cortactin spielt eine wichtige Rolle bei der Dynamik und Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Das Protein wurde vor über 15 Jahren als Aktinfilament-Bindeprotein und Hauptsubstrat der onkogenen Tyrosin-Kinase v-Src (*viral sarcoma*) entdeckt (Wu *et al.*, 1991; Wu & Parsons, 1993) und gilt mittlerweile als ein zentrales Signalprotein, das an zahlreichen Aktin-basierten zellulären Prozessen beteiligt ist, wie z.B. an Zelladhäsion (Vuori & Ruoslahti, 1995), Endozytose (Schafer *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2003; Sauvonnnet *et al.*, 2005), Zellwanderung (Huang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999), Tumorerkrankung (Weaver, 2008), synaptischer Organisation (Redecker *et al.*, 2001; Racz & Weinberg, 2004) und Zellmorphogenese (Hou *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999). Bei diesen Prozessen wirkt Cortactin als Adaptorprotein für eine Vielzahl von bekannten Interaktionspartnern und beeinflusst somit verschiedene Signaltransduktionswege. Diese Funktionen werden durch die einzelnen Domänen des Proteins ausgeübt und durch extrazelluläre Stimuli ausgelöst (Abb. 28A).

Die prolinreiche Region in Cortactin trennt die C-terminale SH3-Domäne von der Helix- und der F-Aktin-Bindungsdomäne. Sie enthält drei Tyrosin-Reste (an Position 421, 466 und 482), die durch die Src-Kinase phosphoryliert werden können (Huang *et al.*, 1998). Darüber hinaus gibt es drei Serin-Phosphorylierungsstellen – zwei für die MAP-Kinase Erk (S405, S418; Campbell *et al.*, 1999) und eine PAK-Phosphorylierungsstelle (S113) im ersten Sequenzmotiv der F-Aktin-Bindungsdomäne (Webb *et al.*, 2006). Man vermutet, dass diese Phosphorylierungsstellen eine regulatorische Funktion für die Aktivität von Cortactin besitzen; *in vivo* Daten hierzu gab es vor der Studie allerdings nicht. Nach einem *in vitro* Modell von Martinez-Quiles *et al.* (2004) ist die SH3-Domäne von nicht-phosphoryliertem Cortactin teilweise verdeckt und somit für die Interaktion mit anderen Proteinen nicht frei zugänglich (Abb. 28B, oben). Interessanterweise enthält die prolinreiche Region von Cortactin zwei benachbarte PxxP-Motive, die als Bindestellen für die eigene oder andere SH3-Domänen dienen können. Demnach könnte die eigene SH3-Domäne „umklappen“ und eine intramolekulare Bindung mit seiner prolinreichen Region eingehen (Abb. 28B, oben). Da sowohl die Serin- als auch die Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von Cortactin auch in dieser Prolin-reichen Region lokalisiert sind, könnte die SH3-Domäne infolge der Phosphorylierung wieder freigesetzt werden. In der Tat konnte in *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierung der Serinreste 405 und 418 in Cortactin die Bindung von N-WASP an die SH3-Domäne stark erhöht war (Martinez-Quiles *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde diese Aktivität durch die Phosphorylierung der Tyrosine 421, 466 und 482 stark reduziert und unterdrückte sogar die Aktivität von Serin-phosphoryliertem Cortactin (Martinez-Quiles *et al.*, 2004). Diese Befunde sprechen dafür, dass die Phosphorylierung der Serine die PxxP/SH3-Interaktion unterbricht, eine Konformationsänderung hervorruft und so die SH3-Domäne für Effektormoleküle, wie N-WASP, frei zugänglich macht (Abb. 28B, Mitte). Die Phosphorylierung der Tyrosine hingegen könnte eine andere Konformation

hervorrufen, die die Interaktionen von Effektormolekülen mit der SH3-Domäne beendet. Die Tyrosinreste 421, 466 und 482 liegen sehr nahe an der SH3-Domäne. Daher haben wir postuliert, dass Interaktionspartner aus sterischen Gründen nicht mehr an die SH3-Domäne von Tyrosin-phosphoryliertem Cortactin binden könnten (Abb. 28B, unten). Nach diesem Modell könnte die Erk/Src-Phosphorylierung von Cortactin als ein molekularer „Schalter“ agieren, der die Bindung und Aktivierung von Effektormolekülen kontrolliert (Martinez-Quiles *et al.*, 2004; Selbach & Backert, 2005). Ziel dieser Arbeit war es folglich, dieses Modell während der Infektion mit *H. pylori* zu überprüfen und die molekulare Funktion von Cortactin aufzuklären.

Um die Rolle der Phosphorylierung von Cortactin während der Infektion mit *H. pylori* näher zu untersuchen, wurde zunächst die Aktivität der Erk-, PAK- und Src-Kinase während der Infektion bestimmt. Mit Hilfe von aktivierungsspezifischen Phospho-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der beiden Serin-/Threonin-Kinasen Erk und PAK während der Infektion kontinuierlich bis 8 Stunden ansteigt, während die Src-Kinase, in Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Selbach *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003), nur temporär zwischen 0,5-2 Stunden aktiv ist und dann inaktiviert wird. Die Aktivierung der Erk- und PAK-Kinasen während der *H. pylori*-Infektion ist in der Literatur bereits beschrieben. Die Erk-Kinase wird durch mehrere Signalwege aktiviert, z.B. über die EGF-Rezeptor→Ras→c-Raf→Erk oder Shp-2→Rap1→b-Raf→Mek→Erk Signalkaskaden (Blaser & Atherton, 2004; Backert & Meyer, 2006; Backert & Selbach, 2008; Hatakeyama, 2008). Hier spielen verschiedene bakterielle Faktoren eine Rolle, unter anderem auch CagA und bisher unbekannte *cagPAI*-abhängige Signalkomponenten. Die PAK-Kinase hingegen wird durch einen Rac1/Cdc42→PAK-Signalweg aktiviert, wobei der bakterielle Faktor noch unbekannt ist (Naumann & Crabtree, 2004; Backert *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wird die Src-Kinase nur zu sehr frühen Zeitpunkten der Infektion durch das pilus-assoziierte CagL-Protein über einen CagL→Integrin β 1→FAK→Src-Signalweg aktiviert (Kwok *et al.*, 2007). Parallel wird das CagA-Protein durch einen Typ IV-Sekretionsapparat in die Wirtszellen eingeschleust und durch die Src-Kinase phosphoryliert. Phosphoryliertes CagA kann hierbei direkt mit seiner Kinase c-Src interagieren (Selbach *et al.*, 2003). Diese Interaktion führt nach etwa 2 Stunden Infektion zu einer deutlichen Abnahme der c-Src-Autophosphorylierung am Tyrosinrest 416 und zur Inaktivierung der Kinaseaktivität durch Phosphorylierung des negativen Regulierungsmotives am Tyrosinrest 527 (Selbach *et al.*, 2003). Darüber hinaus interagiert phosphoryliertes CagA mit der SH2-Domäne von Csk und stimuliert somit die Csk-Kinaseaktivität, die dann den Tyrosinrest 527 in Src phosphoryliert (Tsutsumi *et al.*, 2003). Somit wird c-Src über einen klassischen Regelkreis mit negativer Rückkopplung inhibiert (Selbach *et al.*, 2003). Zusammenfassend lassen die Beobachtungen zur Kinaseaktivität von Erk und PAK die Hypothese zu, dass die Serinreste 113, 405 und 418 in Cortactin möglicherweise während der Infektion phosphoryliert werden, während die Tyrosinreste 421, 466 und 482 durch die Inaktivierung von Src dephosphoryliert werden.

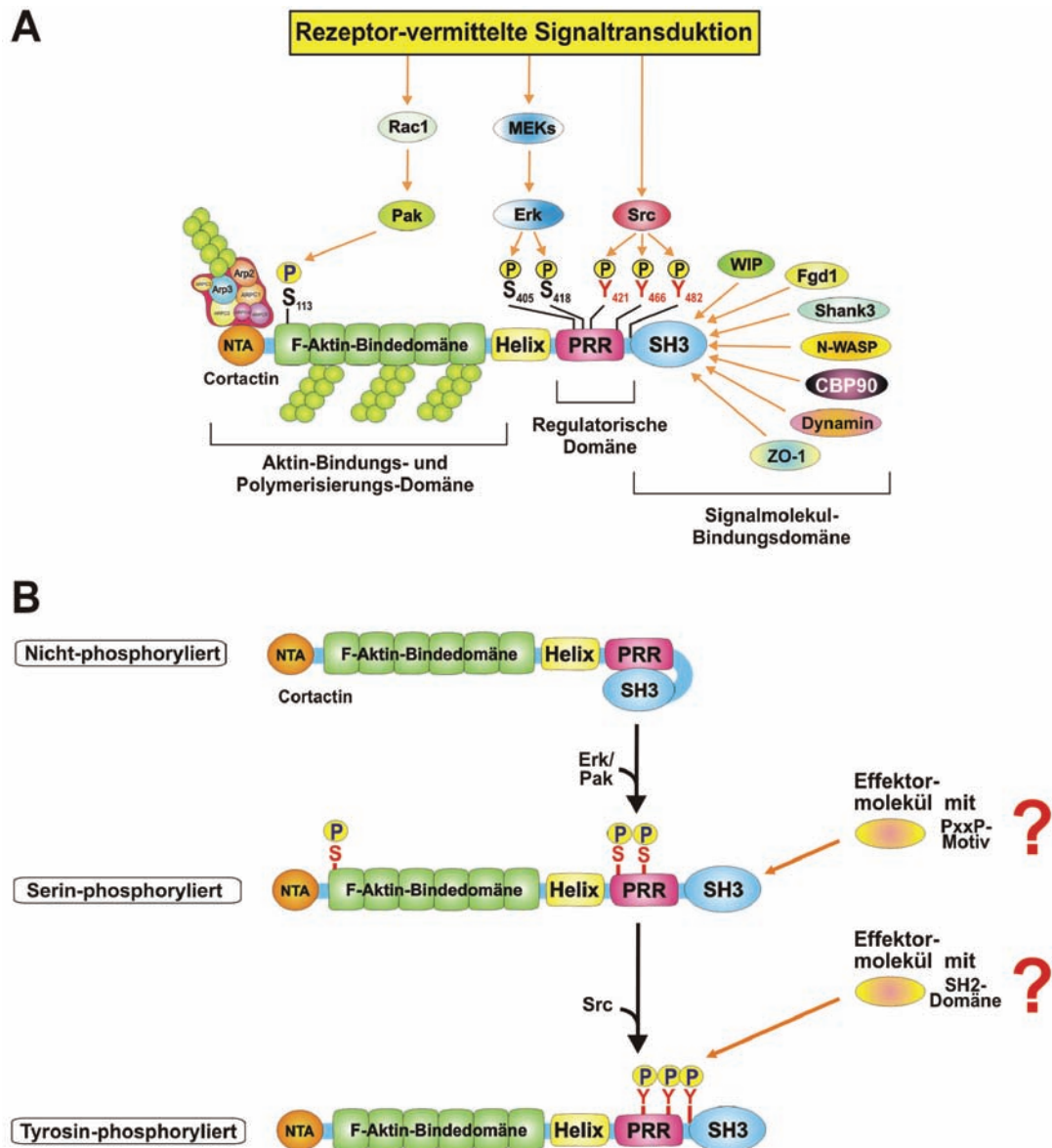


Abb. 28 Modell für die Generierung und Funktion von serin- und tyrosinphosphorylierten Formen von Cortactin durch ein Wechselspiel verschiedener Kinasen. (A) Schematische Darstellung der Cortactin-Domänenstruktur, einschließlich der bekannten Erk-, PAK- und Src-Phosphorylierungsstellen und den Serinresten 113, 405 und 418 sowie den Tyrosinresten 421, 466 und 482. Die beschriebenen Kinase-Signalwege und ausgewählte Interaktionspartner für die SH3-Domäne sind eingezeichnet. (B) Es wurde postuliert, dass die C-terminale SH3-Domäne im Komplex mit der eigenen prolinreichen Region PRR in der nicht-phosphorylierten Form von Cortactin vorliegt und somit nicht zugänglich ist für Interaktionspartner (Martinez-Quiles *et al.*, 2004; Selbach & Backert, 2005). In dieser prolinreichen Region liegen die Serin-Phosphorylierungsstellen 405 und 418. *In vitro* Daten zeigten, dass die SH3-Domäne nach Phosphorylierung an diesen Serinresten „aufklappt“ und somit für Interaktionspartner mit sog. PxxP-Motiven zugänglich wird. Die Bindungsfähigkeit von Signalfaktoren wie N-WASP an die SH3-Domäne *in vitro* ist blockiert durch die Tyrosin-Phosphorylierung von Cortactin. Die Tyrosinreste 421, 466 und 482 liegen sehr nahe an der SH3-Domäne. Daher wird angenommen, dass Interaktionspartner aus sterischen Gründen nicht mehr an die SH3-Domäne binden können. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass nun andere Interaktionspartner, z.B. mit einer SH2-Domäne, an diese phosphorylierten Tyrosinreste binden könnten. Diese Interaktionspartner nach Infektion mit *H. pylori* waren allerdings zu Beginn der Studie nicht bekannt.

6.2 Phosphorylierungsmuster und subzelluläre Lokalisation von Cortactin

Die subzelluläre Lokalisation von Cortactin sowie der Phosphorylierungsstatus an den einzelnen Tyrosin- und Serinresten wurden in nachfolgenden Fraktionierungsexperimenten vor und nach der Infektion mit *H. pylori* untersucht. Die entsprechenden Daten sind in Abb. 29A/B zusammengefasst. Zunächst wurden die Proben mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY99 analysiert, der ein Gemisch von phosphorylierten Tyrosinresten in verschiedenen Proteinen erkennt (Santa Cruz). Das erzielte Ergebnis bestätigte frühere Daten, das Cortactin an seinen Tyrosinresten in CagA-abhängiger Weise während der Infektion dephosphoryliert wird (Selbach *et al.*, 2003). Mit Hilfe von kommerziell-verfügbaren Antikörpern gegen jedes der einzelnen phosphorylierten Tyrosine ergab allerdings sehr überraschend, dass der PY99-Antikörper den phosphorylierten Tyrosinrest 466 in Cortactin nicht erkennt. Während die Tyrosinreste 421 und 482 tatsächlich in den Kontroll-Zellen phosphoryliert sind und nach Infektion in CagA-abhängiger Weise dephosphoryliert werden, wurde die am Tyrosinrest 466 phosphorylierte Form von Cortactin in früheren Studien übersehen (Selbach *et al.*, 2003). In der jetzigen Studie konnte somit gezeigt werden, dass phosphoryliertes Cortactin am Tyrosinrest 466 während der Infektion nicht dephosphoryliert, sondern sogar stabilisiert wird. Interessant ist weiterhin, dass nachgewiesen werden konnte, dass dieses am Tyrosinrest 466 phosphorylierte Cortactin-Molekül nicht gleichzeitig an Serinresten phosphoryliert ist. Dieses Cortactin-Molekül wird spezifisch im Zytoplasma angereichert, während die anderen Tyrosin-phosphorylierten Cortactin-Formen ausschließlich in der Membran zu finden sind.

Im nachfolgenden Experiment wurden dieselben Membran- und Zytoplasmafraktionen mit phosphospezifischen anti-Cortactin-Antikörpern gegen die bekannten Serinreste 113, 405 und 418 untersucht. Die entsprechenden Antikörper sind nicht kommerziell verfügbar und wurden zu diesem Zweck auf Peptidbasis hergestellt, im Labor von PD Dr. Backert auf ihre Spezifität überprüft und für meine Studien von PD Dr. Backert zur Verfügung gestellt. Nach Infektion mit Wildtyp *H. pylori* wird die Phosphorylierung von Cortactin an allen drei Serinresten induziert und diese Cortactin-Populationen befinden sich ausschließlich in der Membranfraktion (Abb. 29B). Ähnliche Ergebnisse wurden nicht nur mit Wildtyp-*H. pylori*, sondern auch mit der P1Δ*cagA*-Mutante erzielt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *H. pylori* die Phosphorylierung der Serinreste 113, 405 und 418 von Cortactin in einer CagA-unabhängigen Weise induziert.

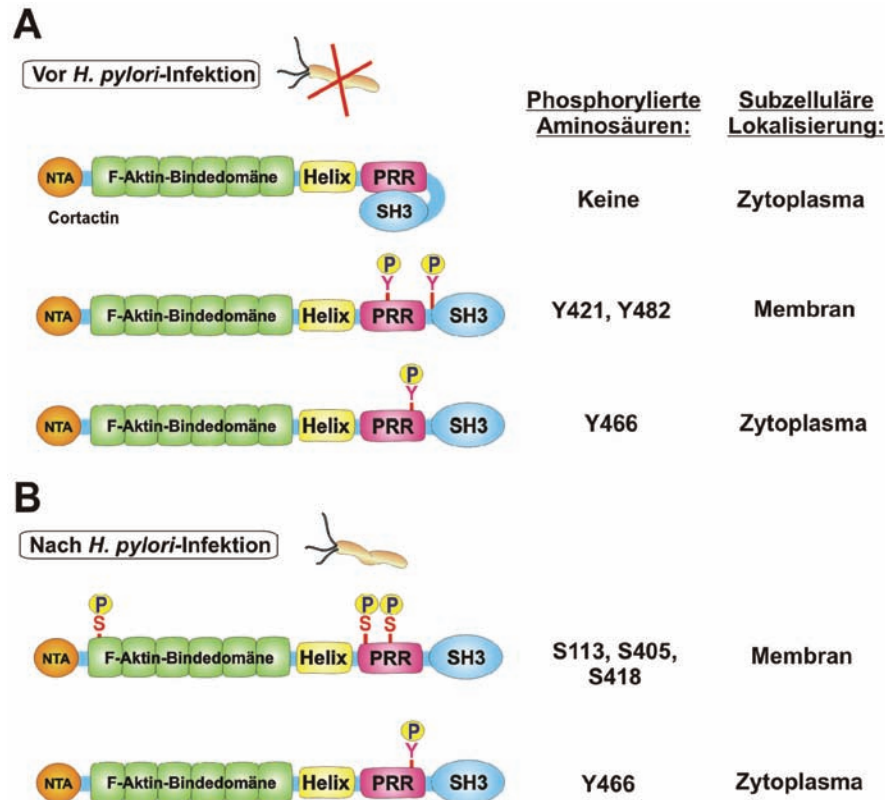


Abb. 29 Phosphorylierungsmuster und subzelluläre Lokalisation von Cortactin vor und nach Infektion mit *H. pylori*. Schematische Darstellung der Cortactin-Domänenstruktur, einschließlich der bekannten Erk-, PAK- und Src-Phosphorylierungsstellen an den Serinresten 113, 405 und 418 sowie den Tyrosinresten 421, 466 und 482. Die Daten der Westernblots mit phosphospezifischen Antikörpern in der zellulären Fraktionierung aus dem Kapitel 5.3 sind hier zusammengefasst. Die Ergebnisse für die nicht-infizierten AGS-Kontrolle (A) und für AGS-Zellen nach 6-stündiger Infektion mit Wildtyp *H. pylori* (B) sind dargestellt.

6.3 Molekulare Basis der Interaktion von Cortactin mit FAK

Nachdem die Frage beantwortet worden ist, welche Phospho-Formen von Cortactin nach Infektion mit *H. pylori* in der Zelle vorhanden sind, sollte als nächstes geklärt werden, mit welchen Bindungspartnern Cortactin interagiert. Wir erhoffen uns dadurch Rückschlüsse über gebundene Effektorproteine und die Signalwege, die durch Cortactin während der Infektion induziert werden. Zu Beginn der Experimente war für uns vor allem der bekannte Interaktionspartner und Aktin-Nukleator N-WASP, der den Arp2/3-Komplex bindet und aktiviert, sowie filamentöses Aktin (F-Aktin) von besonderem Interesse. Beide Proteine waren allerdings mit Cortactin nur in der nicht-infizierten Kontrolle assoziiert und nicht nach Infektion nachweisbar. Stattdessen haben wir in der vorliegenden Arbeit jeweils einen neuen Interaktionspartner für Serin- und Tyrosinphosphoryliertes Cortactin während der Infektion mit *H. pylori* identifiziert. Ich diskutiere nachfolgend zuerst den Interaktionspartner FAK. Die Beobachtung, dass FAK mit Cortactin interagieren kann, ist sehr überraschend, da FAK bisher in keinem Zellsystem als ein Interaktionspartner von Cortactin identifiziert werden konnte (Daly,

2004; Selbach & Backert, 2005; Buday & Downward, 2007). Die generierten Daten zur FAK/Cortactin-Interaktion sind einem Modell zusammengefasst (Abb. 30A).

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Cortactin nach Infektion mit *H. pylori* sehr stark mit der Fokalen-Adhäsions-Kinase FAK, einem bekannten Markerprotein für fokale Zellkontakte, assoziiert ist. Im Gegensatz dazu befindet sich Cortactin in nicht-infizierten Zellen hauptsächlich in kleinen, vesikelartigen Ansammlungen im Zytoplasma und der Zellmembran (Selbach *et al.*, 2003; diese Studie). Wir haben deshalb vermutet, dass Cortactin während der Infektion in die fokalen Zellkontakte rekrutiert wird und dort mit FAK direkt interagieren könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die dies letztlich eindeutig bestätigten. Die Interaktion beider Proteine wurde in der IP der endogenen Cortactin- und FAK-Proteine als auch nach IP von überexprimierten GFP- und HA-markierten Proteinen nachgewiesen.

Um weitere Beweise für die direkte Interaktion von Cortactin und FAK zu erhalten, wurden IP-Experimente mit den verschiedenen generierten GFP-Cortactin-Deletionsmutanten durchgeführt. Eine zu Beginn der Arbeiten von uns favorisierte Hypothese war, dass Cortactin mit Hilfe seiner SH3-Domäne an eine der beiden bekannten prolinreichen Regionen in FAK bindet. Um dies zu überprüfen, wurde eine entsprechende GFP-Cortactin Δ SH3-Mutante in AGS-Zellen transfiziert und die resultierenden Westernblots von IPs zeigten, dass endogenes FAK in einem Komplex mit Cortactin in Abhängigkeit von der Präsenz der SH3-Domäne vorliegt. Die stärksten Signale für an FAK gebundenes GFP-Cortactin wurden für die Phosphoserin-aktiven S405D- und S418D-Mutanten detektiert, während moderate Signale für die S405/418D-Doppelmutante und die Phosphotyrosin-inaktive Y421/466/482F-Mutante beobachtet wurden. Keine Signale von gebundenem GFP-Cortactin wurden hingegen für die Phosphoserin-inaktive S405/418A- und die Phosphotyrosin-aktive Y421/466/482D-Mutante nachgewiesen. Diese Befunde demonstrieren, dass die Phosphorylierung von Cortactin an den Serinresten 405 oder 418 (aber nicht bei der Phosphoserin-aktiven S405/418D-Doppelmutante) die Interaktion mit FAK positiv reguliert und durch Phosphorylierung an den Tyrosinresten 421, 466 und 482 negativ reguliert. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Beobachtungen zur positiven und negativen Regulierung des Elongationsphänotyps nach Überexpression derselben Cortactin-Mutanten in der *H. pylori*-Infektion überein. Darüber hinaus sind diese Befunde auch in sehr guter Übereinstimmung mit den Daten zur Serin-Phosphorylierung von membranständigem Cortactin während der Infektion. Abschließend sei hierzu bemerkt, dass die Phosphorylierung von Cortactin am Serinrest 113 keine Bedeutung für die Interaktion mit FAK und die Ausbildung des *H. pylori*-induzierten Elongationsphänotyp hatte. Die Phosphorylierung dieser Aminosäure hat somit offenbar eine andere Funktion in der Zelle, die in späteren Studien untersucht werden sollte.

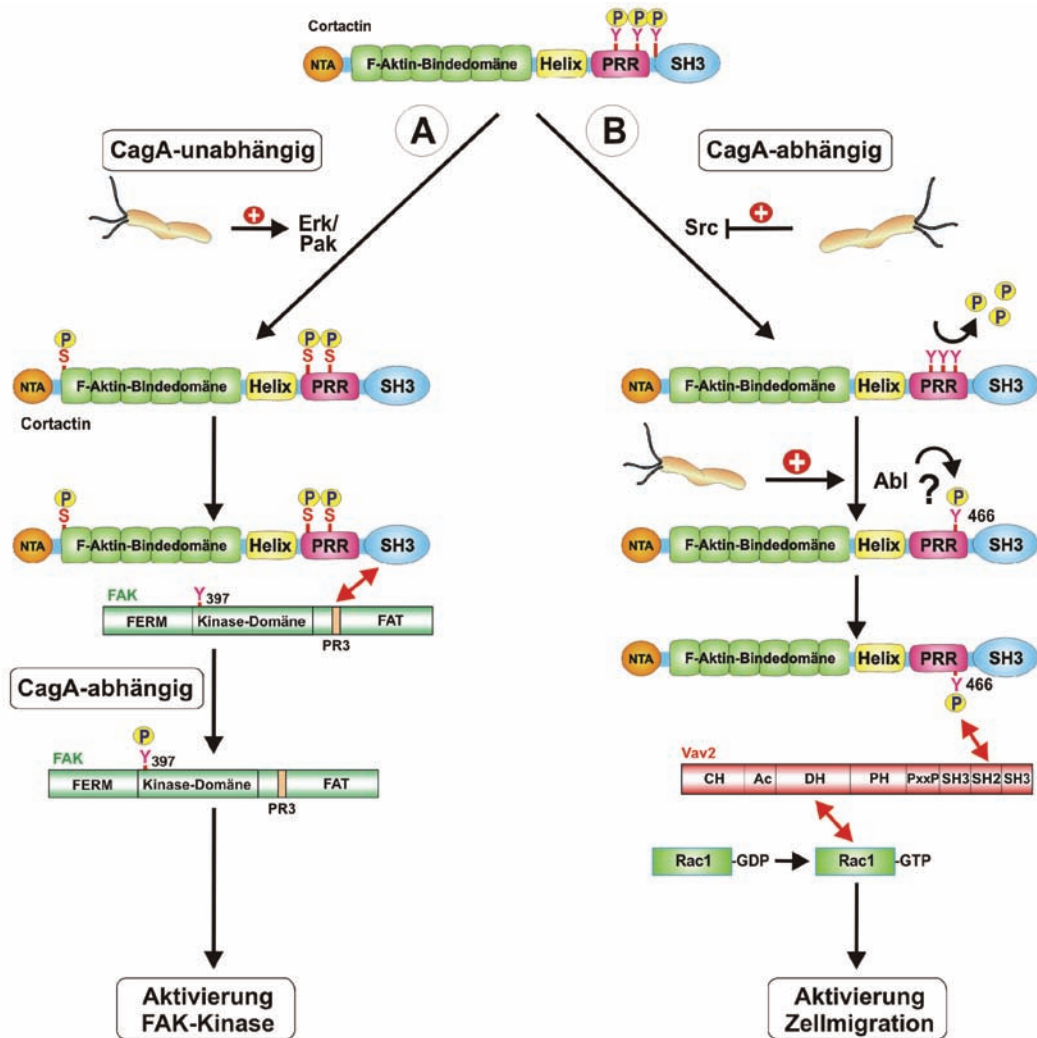


Abb. 30 Modell für die Funktion der Serin- und Tyrosin-phosphorylierten Formen von Cortactin für die Aktivierung der FAK-Kinase bzw. der Vav2→Rac1-induzierten Zellmigration. Schematische Darstellung der Cortactin-Domänenstruktur, einschließlich der bekannten Erk-, PAK- und Src-Phosphorylierungsstellen. Zwei Signalwege (A und B) werden durch die Serin- und Tyrosin-phosphorylierte Formen von Cortactin aktiviert, die nachfolgend beschrieben werden. Interaktionen von bestimmten Proteinen sind durch rote Doppelpfeile gekennzeichnet. (A) Über einen CagA-unabhängigen Signalweg werden die Erk- und PAK-Kinasen durch *H. pylori* aktiviert. Diese Kinasen phosphorylieren Cortactin an den Serinresten 113, 405 bzw. 418. Die phosphorylierten Serinreste 405 oder 418, aber nicht 113, spielen eine zentrale Rolle für die Interaktion der Cortactin SH3-Domäne mit der Fokalen-Adhäsions-Kinase FAK. Als Interaktionsmotiv in FAK wurde die prolinreiche Region PR3 identifiziert. Die Interaktion von Cortactin mit FAK induziert die Phosphorylierung von FAK am Tyrosinrest 397 und die Kinaseaktivität von FAK wird signifikant erhöht. (B) In der nicht-infizierten Zelle ist Cortactin an den Tyrosinresten 421, 466 und 482 durch basale Src-Aktivität phosphoryliert. Nach Infektion mit *H. pylori* für 2 Stunden wird die Src-Kinase über einen CagA-abhängigen Signalweg inaktiviert (Selbach *et al.*, 2003). Die Tyrosinreste 421 und 482 in Cortactin werden folglich nicht mehr phosphoryliert und werden zeitabhängig dephosphoryliert. Die Phosphorylierung von Tyrosinrest 466 in Cortactin ist dagegen nicht davon betroffen und wird in der phosphorylierten Form sogar stabilisiert. Wir postulieren, dass diese Stabilisierung durch konstitutive Aktivierung der Abl-Kinase in der *H. pylori*-Infektion erreicht wird (Tammer *et al.*, 2007), die ebenfalls als Tyrosinkinase von Cortactin beschrieben wurde (Boyle *et al.*, 2007) und den Tyrosinrest 466 phosphorylieren könnte. Phosphoryliertes Tyrosin 466 geht dann eine Bindung mit der SH2-Domäne des GEFs Vav2 ein, welches die kleine Rho GTPase Rac1 aktiviert, die ebenfalls im Komplex vorhanden ist. Die Aktivierung von Rac1 durch Cortactin resultiert in einer Zell/Zell-Dissoziation und erhöhten Zellmigration der infizierten Zellen.

FAK besitzt zwei bekannte PxxP-Motive (PR1 und PR2), die mit den SH3-Domänen von p130Cas bzw. GRAF interagieren können (Sieg *et al.*, 2000). Mit der Hilfe von FAK PxxP-Mutanten haben wir überraschend beobachtet, dass keine dieser beiden Motive für die Bindung an Cortactin essentiell ist. Im Gegenteil, in einigen Experimenten wurden sogar größere Mengen an gebundenen Cortactin gefunden. Daraufhin wurde die FAK-Aminosäuresequenz auf die mögliche Präsenz weitere PxxP-Motive untersucht. Interessanterweise ergab diese Sequenzanalyse die Anwesenheit von zwei weiteren PxxP-Motiven, die nachfolgend als PR3 und PR4 bezeichnet wurden. Beide Prolinreste in jedem der zwei Motive wurden anschließend gegen Alanine im Hintergrund der Δ PR1-Mutante ausgetauscht. IP-Experimente zeigten, dass PR3 aber nicht PR4 an der direkten Interaktion mit Cortactin involviert ist (Abb. 30A). Interessant ist weiterhin, dass diese Interaktion die Kinaseaktivität von FAK signifikant stimuliert. Moderate FAK-Aktivität wurde dagegen für Wildtyp-FAK und die FAK Δ PR1/ Δ PR2-Mutante nach Infektion beobachtet, während die Kinaseaktivität bei den FAK Δ PR1/ Δ PR3- und FAK Δ PR1/ Δ PR4-Doppelmutanten in Gegenwart von *H. pylori* nur sehr gering ist – ähnlich dem Wildtyp-FAK in der nicht-infizierten Kontrolle. Allerdings ist die Bindung von Cortactin an FAK *per se* nicht ausreichend für die Aktivierung von FAK, weil auch eine starke Bindung der FAK Δ PR1/ Δ PR4-Doppelmutante an FAK gefunden wurde, die aber nur wenig FAK-Aktivität erzeugte. Diese Ergebnisse lassen zusammenfassend darauf schließen, dass die Bindung von Cortactin an FAK über eine klassische Interaktion einer SH3-Domäne mit einem PxxP-Motiv hergestellt wird. Darüber hinaus kann postuliert werden, dass diese Interaktion während der *H. pylori*-Infektion für die Ausbildung des Elongationsphänotyps von Bedeutung ist. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde beobachtet, dass der *knockdown* der FAK- oder Cortactin-Expression mit Hilfe von siRNS einen blockierenden Einfluss auf den Phänotyp hatte. Möglicherweise wird der *turnover* der fokalen Adhäsionsstellen der Zellen durch die FAK/Cortactin-Interaktion während der Infektion mit *H. pylori* empfindlich gestört, was in der zellulären Elongation mündet. Weiterhin ist zu bemerken, dass die Interaktion von FAK mit Cortactin abhängig vom CagA-Protein ist, weil diese Interaktion nach Infektion mit einer *H. pylori* Δ cagA-Mutante nur abgeschwächt beobachtet wurde. Dieser Befund lässt uns schlussfolgern, dass neben der CagA-unabhängigen Serin-Phosphorylierung von Cortactin noch mindestens ein weiterer CagA-abhängiger Signalweg beteiligt ist. Dieser Signalweg muss in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

6.4 Molekulare Basis der Interaktion von Cortactin mit Vav2 und Rac1

Neben der Serin-phosphorylierten Form von Cortactin, die mit FAK interagiert, konnte gezeigt werden, dass auch eine am Tyrosinrest 466 phosphorylierte Form im Zytoplasma der infizierten Zellen spezifisch angereichert ist. Es wurde deshalb postuliert, dass die am Tyrosinrest 466 phosphorylierte Form von Cortactin entweder direkt mit einer kleinen Rho-GTPase (z.B. Rac1) bzw. über ein Guanin-Austauschfaktor

(GEF), wie Vav2, interagieren könnte. Kleine Rho GTPasen wie Rac1 benötigen für ihre Aktivierung die Interaktion mit einem GEF (Hall, 1998; Jeanteur, 1999) und es gibt keine Hinweise, dass Cortactin selbst als ein GEF funktionieren könnte (Daly, 2004; Selbach & Backert, 2005). Vav2 ist ein spezifischer Bindungspartner und Aktivator von Rac1, der in seiner Sequenz über eine SH2-Domäne für die Interaktion mit phosphorylierten Tyrosinresten verfügt (Romero & Fischer, 1996; Hornstein *et al.*, 2004). Folglich wurde eine Reihe von IP-Experimenten von endogenem Cortactin, Rac1 und Vav2, sowie mit entsprechenden Cortactin- und Vav2-Konstrukten vor und nach Infektion mit *H. pylori* durchgeführt. IPs mit einem anti-Cortactin-Antikörper zeigten im Westernblot starke Banden für präzipitiertes Rac1 in der Infektion mit Wildtyp-*H. pylori* und eine Bande mit 65% verminderter Intensität bei der $\Delta cagA$ -Mutante. Dieses Ergebnis war in vier unabhängigen Experimenten reproduzierbar nachweisbar und bestätigte unsere Hypothese, dass Cortactin tatsächlich entweder direkt oder indirekt mit Rac1 interagieren kann. Ein Problem in der Untersuchung von Vav2 in AGS-Zellen war, dass im Westernblot nur schwache Signale für dieses Protein detektierbar sind. Die Abwesenheit eines Signals für endogenes Vav2 in der Cortactin-IP könnte auf eine geringe Expression des Proteins in der Zelle zurückzuführen sein. Wir können auch nicht ausschließen, dass das Protein nur schwach von den kommerziell verfügbaren Antikörpern der Firma Santa Cruz erkannt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem durch die Expression von HA-markierten Vav2-Konstrukten in infizierten AGS-Zellen gelöst. Die Ergebnisse hierzu sind zusammenfassend in Abb. 30B dargestellt.

HA-fusioniertes Vav2 wurde in AGS-Zellen in Gegenwart der hergestellten GFP-Cortactin-Konstrukte transient exprimiert. Die IP-Ergebnisse zeigen, dass Wildtyp-Vav2 in der nicht-infizierten Zelle nicht mit Wildtyp-GFP-Cortactin interagiert, sondern dort in einem Komplex mit FAK vorliegt. Dagegen wurden nach Infektion starke Banden für die phosphorylierungsaktive Cortactin Y421/466/482D-Mutante, aber nicht für die phosphorylierungsdefiziente Y421/466/482F-Mutante nachgewiesen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der phosphorylierte Tyrosinrest 466 in Cortactin direkt an der Bindung zu Vav2 beteiligt ist. Entsprechende Y466D- und Y466F-Mutanten von GFP-Cortactin wurden hergestellt und im Experiment verwendet. Die phosphorylierungsaktive Y466D-Mutante bindet sogar mit höherer Effizienz an Vav2 als die Y421/466/482D-Mutante. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der phosphorylierte Tyrosinrest 466 in Cortactin ausreichend für die beobachtete Interaktion mit Vav2 ist.

In den entsprechenden IPs waren immer zwei GFP-Cortactin-Banden bei etwa 125 und 130 kDa reproduzierbar beobachtet worden. Die Herkunft dieser beiden Banden ist nicht eindeutig nachgewiesen, könnte aber durch ein unterschiedliches Muster in der Tyrosin- bzw. Serin-Phosphorylierung des Proteins zu erklären sein (Daly, 2004; Selbach & Backert, 2005). Das Erkennungsmuster der phosphospezifischen Cortactin-Antikörper ist hierbei allerdings sehr komplex, so dass diese zwei Banden nicht einer bestimmten Phosphorylierung an einer Aminosäure allein

zuzuordnen sind. Möglicherweise sind auch noch weitere Phosphorylierungen oder andere posttranslationale Modifikationen von Cortactin involviert, die zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden sollten.

Zusammenfassend sprechen die erzielten Ergebnisse für ein Modell, in dem am Tyrosinrest 466 phosphoryliertes Cortactin im Zytoplasma spezifisch an Vav2 bindet, und anschließend die kleine GTPase Rac1 in den Komplex rekrutiert und aktiviert (Abb. 30B). Tatsächlich konnte in sog. Wundheilungs-Assays abschließend nachgewiesen werden, dass phosphorylierungsaktives GFP-Cortactin Y466D, aber nicht GFP-Cortactin Y466F, die Zellmigration und den damit verbundenen Wundverschluss signifikant aktiviert. Diese Befunde korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen der CRIB-GST-Pulldown Assays, in denen gezeigt werden konnte, dass Rac1 während der Infektion mit *H. pylori* über einen Zeitraum von 3 Stunden kontinuierlich aktiviert wird. Frühere Berichte aus unserer Arbeitsgruppe stimmen mit diesen Ergebnissen und Schlußfolgerungen sehr gut überein. Das funktionelle Ausschalten von Rac1 durch dominant-negative Konstrukte oder die Verwendung bestimmter GTPase-inaktivierende Toxine (z.B. ToxB oder TcdBF) resultierten in einer Blockierung der *H. pylori*-induzierten Zellmigration sowie des Elongationsphänotyps (Brandt *et al.*, 2007). Diese Daten zeigen eindeutig, dass Rac1 von *H. pylori* während der Infektion zeitabhängig aktiviert wird und dass die Rac1-abhängige Zellmigration durch Cortactin (phosphoryliert am Tyrosinrest 466) signifikant stimuliert wird.

6.5 Mögliche Bedeutung von Cortactin für *H. pylori*

Eine ständig wachsende Anzahl von pathogenen Mikroorganismen nutzt das Aktin-Zytoskelett des eukaryontischen Wirtes für seine Zwecke zielgerichtet aus (siehe Kapitel 1.5.2). Dadurch ermöglichen sie pathogene Prozesse, wie z.B. die Anheftung und die Invasion in die Wirtszelle, die Bewegung innerhalb und zwischen den Zellen, die Bildung von Vakuolen sowie die Unterdrückung oder Vermeidung der Phagozytose (Galan & Collmer, 1999; Gruenheid & Finlay, 2003; Cossart & Sansonetti, 2004; Rottner *et al.*, 2005; Selbach & Backert, 2005; Backert & Selbach, 2005). Die Pathogen-induzierte Manipulation des Aktin-Zytoskeletts in der Wirtszelle ist ein hochkomplexes Szenario, an dem unter anderem die kleinen GTPasen der Rho-Familie, Phosphoinositide und Aktin-Bindeproteine beteiligt sind. Cortactin scheint allerdings ein bevorzugtes Angriffsziel von einer Vielzahl von Mikroben zu sein (Selbach & Backert, 2005), was möglicherweise auf seine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion zurückzuführen ist (Weed & Parsons, 2001; Daly, 2004). Studien über die molekulare Grundlage von Infektionen mit Pathogenen wie EPEC, *Shigella* und Vaccinia-Virus, haben gezeigt, dass Cortactin eine entscheidende Rolle in der Invasion, Aktin-basierter Bewegung und Aktinpodest-Bildung spielt. Die Infektion mit *H. pylori* erscheint hierbei allerdings als ein Sonderfall. *Helicobacter pylori* induziert *in vivo* und *in vitro* die Zell/Zell-Dissoziation, die mit einer lokalen Zerstörung der epithelialen Barrierefunktion und entzündlichen Prozessen im Magen einhergeht. Diese

Beobachtungen resultieren unter bestimmten Umständen in der Entstehung und Progression diverser *H. pylori*-assoziierter Erkrankungen des Menschen, wie chronische Gastritis, Ulkuskrankheit oder Magenkarzinom. Der Vorteil dieser Prozesse für die Bakterien selbst ist allerdings nach wie vor ein großes Rätsel (Amieva & El Omar, 2008). Ziel von *H. pylori* ist es sicherlich nicht, seinen Wirt zu töten, sondern lebenslang im Magen zu überleben, bis er einen neuen Wirt gefunden hat. Deshalb könnte postuliert werden, dass *H. pylori* durch induzierte Signalwege hin zum Cortactin die lokale Zerstörung des epithelialen Gewebes ermöglicht. Warum hat *H. pylori* eine solche Strategie? Möglicherweise will *H. pylori* in tiefere Gewebsschichten als die Magenschleimhaut vordringen, um sich z.B. dort eine weitere Nische für sein Überleben zu sichern oder um dort an lebenswichtige Nährstoffe zu gelangen, die im Magenlumen nicht verfügbar sind (Necchi *et al.*, 2007; Backert & Selbach, 2008; Wessler & Backert, 2008; Amieva & El Omar, 2008). Darüber hinaus wurde z.B. im Menschen und Tiermodell gezeigt, dass *H. pylori* durch diverse Signaltransduktionsprozesse eine starke Entzündungsreaktion hervorruft, die *H. pylori* selbst aber nicht eliminieren kann (Blaser & Atherton, 2004; Backert & Meyer, 2006; Backert & Selbach, 2008; Hatakeyama, 2008). Diese entzündlichen Prozesse könnten es *H. pylori* ermöglichen, andere Bakterien als „lästige Konkurrenten“ zu eliminieren, die den Magen mit der Nahrung passieren, um somit eine persistente Infektion zu gewährleisten (Hornsby *et al.*, 2008). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hier dargestellten Ergebnisse zur Forschung an Cortactin nicht nur wichtige und grundlegende Erkenntnisse zur allgemeinen Funktion des Proteins in der eukaryontischen Zelle liefern, sondern auch wichtige neue Erkenntnisse zur Pathogenese von *H. pylori*.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Cortactin ist ein multifunktionelles Protein und hat eine wichtige Funktion in diversen Signalkaskaden der eukaryontischen Zelle. Das Protein wurde als Aktinfilament-Bindeprotein und Hauptsubstrat der onkogenen v-Src-Kinase entdeckt und gilt mittlerweile als ein zentrales Signalprotein, das an zahlreichen Aktin-basierten zellulären Prozessen beteiligt ist. Cortactin spielt bei der Zelladhäsion, Endozytose, Zellwanderung, Tumorerkrankung, Zellmorphogenese und in mikrobiellen Infektionen eine bedeutende Rolle; über die Regulation des Proteins auf molekularer Ebene ist allerdings nur sehr wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es folglich, die molekulare Funktion von Cortactin im AGS-Infektionsmodell aufzuklären. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Cortactin über zwei Signalwege im Phosphorylierungsmuster an jeweils drei Tyrosin- und Serinresten verändert wird. Ein Wechsel in der Phosphorylierung führt dazu, dass die Lokalisation von Cortactin in der Zelle variiert. Folglich wird auch das Vermögen von Cortactin zur Bindung und Aktivierung weiterer Signalfaktoren nachhaltig beeinflusst. Insgesamt wurden in dieser Arbeit zwei neue Interaktionspartner von Cortactin identifiziert (Fokale Adhäsions-Kinase FAK und Guanin-Austauschfaktor Vav2) und die entsprechende Interaktion, Signaltransduktion sowie phänotypische Veränderungen wurden im Detail untersucht. Zusammenfassend wurden fünf wichtige Erkenntnisse gewonnen: (1) Cortactin wird über zwei Serin-/Threonin-Kinasen (Erk und Pak) an drei Serinresten phosphoryliert (S-113, S-405 und S-418); (2) Serin-phosphoryliertes Cortactin interagiert über seine SH3-Domäne mit einer bisher unbekanntem prolinreichen Region in FAK, die als PR3 bezeichnet wurde, und stimuliert somit die Kinaseaktivität von FAK; (3) Cortactin wird an zwei Tyrosinresten (Y-421 und Y-482) in der Infektion dephosphoryliert, während ein weiterer Tyrosinrest (Y-466) in seiner Phosphorylierung stabilisiert wird; (4) Tyrosin-phosphoryliertes Cortactin interagiert mit der SH2-Domäne von Vav2 und aktiviert somit die kleine Rho GTPase Rac1 und (5) der Cortactin/Vav2/Rac1-Komplex induziert die Zell/Zell-Dissoziation und eine erhöhte Zellmigration. Diese Prozesse spielen offenbar bei der Infektion mit Mikroben und bestimmten Krankheiten des Menschen eine besondere Rolle, z.B. bei der chronischen Gastritis, der Ulkuskrankheit und dem Magenkarzinom. Die Resultate zur Cortactin-abhängigen Signaltransduktion geben somit wichtige neue Ansatzpunkte für die Funktion und Bedeutung dieses wichtigen Signalproteins.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agerer,F., Lux,S., Michel,A., Rohde,M., Ohlsen,K. & Hauck,C.R. (2005) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J.Cell Sci.*, **118**, 2189-2200.
- Ahern-Djamali,S.M., Comer,A.R., Bachmann,C., Kastenmeier,A.S., Reddy,S.K., Beckerle,M.C., Walter,U. & Hoffmann,F.M. (1998) Mutations in *Drosophila* enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains. *Mol.Biol.Cell*, **9**, 2157-2171.
- Ahuja,R., Pinyol,R., Reichenbach,N., Custer,L., Klingensmith,J., Kessels,M.M. & Qualmann,B. (2007) Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, **131**, 337-350.
- Amann,K.J. & Pollard,T.D. (2001) Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 15009-15013.
- Amieva,M.R. & El Omar,E.M. (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, **134**, 306-323.
- Artym,V.V., Zhang,Y., Seillier-Moiseiwitsch,F., Yamada,K.M. & Mueller,S.C. (2006) Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.*, **66**, 3034-3043.
- Aszodi,A., Pfeifer,A., Ahmad,M., Glauner,M., Zhou,X.H., Ny,L., Andersson,K.E., Kehrel,B., Offermanns,S. & Fassler,R. (1999) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.*, **18**, 37-48.
- Ayala,I., Baldassarre,M., Caldieri,G. & Buccione,R. (2006) Invadopodia: a guided tour. *Eur.J.Cell Biol.*, **85**, 159-164.
- Bachmann,C., Fischer,L., Walter,U. & Reinhard,M. (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J.Biol.Chem.*, **274**, 23549-23557.
- Backert,S., Churin,Y. & Meyer,T.F. (2002) *Helicobacter pylori* type IV secretion, host cell signalling and vaccine development. *Keio J.Med.*, **51 Suppl 2**, 6-14.
- Backert,S., Feller,S.M. & Wessler,S. (2008) Emerging roles of Abl family tyrosine kinases in microbial pathogenesis. *Trends Biochem.Sci.*, **33**, 80-90.
- Backert,S. & Meyer,T.F. (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr.Opin.Microbiol.*, **9**, 207-217.
- Backert,S., Moese,S., Selbach,M., Brinkmann,V. & Meyer,T.F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol.Microbiol.*, **42**, 631-644.

- Backert,S., Schwarz,T., Miehke,S., Kirsch,C., Sommer,C., Kwok,T., Gerhard,M., Goebel,U.B., Lehn,N., Koenig,W. & Meyer,T.F. (2004) Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infection and Immunity*, **72**, 1043-1056.
- Backert,S. & Selbach,M. (2005) Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol.*, **13**, 476-484.
- Backert,S. & Selbach,M. (2008) Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.*, **10**, 1573-1581.
- Backert,S., Ziska,E., Brinkmann,V., Zimny-Arndt,U., Fauconnier,A., Jungblut,P.R., Naumann,M. & Meyer,T.F. (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol.*, **2**, 155-164.
- Bailly,M., Macaluso,F., Cammer,M., Chan,A., Segall,J.E. & Condeelis,J.S. (1999) Relationship between Arp2/3 complex and the barbed ends of actin filaments at the leading edge of carcinoma cells after epidermal growth factor stimulation. *J.Cell Biol.*, **145**, 331-345.
- Ballweber,E., Hannappel,E., Huff,T., Stephan,H., Haener,M., Taschner,N., Stoffler,D., Aebi,U. & Mannherz,H.G. (2002) Polymerisation of chemically cross-linked actin:thymosin beta(4) complex to filamentous actin: alteration in helical parameters and visualisation of thymosin beta(4) binding on F-actin. *J.Mol.Biol.*, **315**, 613-625.
- Bamburg,J.R. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **15**, 185-230.
- Bashaw,G.J., Kidd,T., Murray,D., Pawson,T. & Goodman,C.S. (2000) Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell*, **101**, 703-715.
- Baum,B. & Kunda,P. (2005) Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own. *Curr.Biol.*, **15**, R305-R308.
- Bear,J.E., Loureiro,J.J., Libova,I., Fassler,R., Wehland,J. & Gertler,F.B. (2000) Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell*, **101**, 717-728.
- Birnboim,H.C. & Doly,J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Birukov,K.G., Birukova,A.A., Dudek,S.M., Verin,A.D., Crow,M.T., Zhan,X., DePaola,N. & Garcia,J.G.N. (2002) Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **26**, 453-464.
- Bishop,A.L. & Hall,A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.*, **348 Pt 2**, 241-255.
- Blanchoin,L., Pollard,T.D. & Mullins,R.D. (2000) Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr.Biol.*, **10**, 1273-1282.
- Blaser,M.J. & Atherton,J.C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J.Clin.Invest.*, **113**, 321-333.

- Bosch,M., Le,K.H., Bugyi,B., Correia,J.J., Renault,L. & Carlier,M.F. (2007) Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Mol.Cell*, **28**, 555-568.
- Bougneres,L., Girardin,S.E., Weed,S.A., Karginov,A.V., Olivo-Marin,J.C., Parsons,J.T., Sansonetti,P.J. & Van Nhieu,G.T. (2004) Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during Shigella invasion of epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, **166**, 225-235.
- Bowden,E.T., Barth,M., Thomas,D., Glazer,R.I. & Mueller,S.C. (1999) An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC mu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene*, **18**, 4440-4449.
- Bowden,E.T., Onikoyi,E., Slack,R., Myoui,A., Yoneda,T., Yamada,K.M. & Mueller,S.C. (2006) Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, **312**, 1240-1253.
- Boyle,S.N., Michaud,G.A., Schweitzer,B., Predki,P.F. & Koleske,A.J. (2007) A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation. *Curr.Biol.*, **17**, 445-451.
- Brandt,S., Shafikhani,S., Balachandran,P., Jin,S., Hartig,R., Konig,W., Engel,J. & Backert,S. (2007) Use of a novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII phosphorylation in Helicobacter pylori-induced host cell actin cytoskeletal rearrangements. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, **50**, 190-205.
- Bryce,N.S., Clark,E.S., Leysath,J.L., Currie,J.D., Webb,D.J. & Weaver,A.M. (2005) Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Current Biology*, **15**, 1276-1285.
- Buday,L. & Downward,J. (2007) Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim.Biophys.Acta*, **1775**, 263-273.
- Butt,E., Abel,K., Krieger,M., Palm,D., Hoppe,V., Hoppe,J. & Walter,U. (1994) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J.Biol.Chem.*, **269**, 14509-14517.
- Campbell,D.H., Sutherland,R.L. & Daly,R.J. (1999) Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin. *Cancer Research*, **59**, 5376-5385.
- Campellone,K.G. & Leong,J.M. (2003) Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic E-coli and enterohemorrhagic E-coli O157 : H7. *Current Opinion in Microbiology*, **6**, 82-90.
- Cantarelli,V.V., Takahashi,A., Akeda,Y., Nagayama,K. & Honda,T. (2000) Interaction of enteropathogenic or enterohemorrhagic Escherichia coli with HeLa cells results in translocation of cortactin to the bacterial adherence site. *Infection and Immunity*, **68**, 382-386.
- Cantarelli,V.V., Takahashi,A., Yanagihara,I., Akeda,Y., Imura,K., Kodama,T., Kono,G., Sato,Y., Iida,T. & Honda,T. (2002) Cortactin is necessary for F-actin accumulation in pedestal structures induced by enteropathogenic Escherichia coli infection. *Infection and Immunity*, **70**, 2206-2209.
- Cao,H., Chen,J., Huang,B., Orth,J.D. & McNiven,M.A. (2001) Cortactin localizes to clathrin-coated pits and participates in receptor mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 88A.
- Cao,H., Orth,J.D., Chen,J., Weller,S.G., Heuser,J.E. & McNiven,M.A. (2003) Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 2162-2170.

- Cao,H., Weller,S., Orth,J.D., Chen,J., Huang,B., Chen,J.L., Starnes,M. & McNiven,M.A. (2005) Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nature Cell Biology*, **7**, 483-U45.
- Carlier,M.F., Didry,D., Erk,I., Lepault,J., Van Troys,M.L., Vandekerckhove,J., Perelroizen,I., Yin,H., Doi,Y. & Pantaloni,D. (1996) Tbeta 4 is not a simple G-actin sequestering protein and interacts with F-actin at high concentration. *J.Biol.Chem.*, **271**, 9231-9239.
- Carlier,M.F., Laurent,V., Santolini,J., Melki,R., Didry,D., Xia,G.X., Hong,Y., Chua,N.H. & Pantaloni,D. (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J.Cell Biol.*, **136**, 1307-1322.
- Carlier,M.F., Nioche,P., Broutin-L'Hermite,I., Boujemaa,R., Le Clainche,C., Egile,C., Garbay,C., Ducruix,A., Sansonetti,P. & Pantaloni,D. (2000) GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J.Biol.Chem.*, **275**, 21946-21952.
- Carraway,A.C. (2000) *Cytoskeleton: Signalling and Cell Regulation: A Practical Approach*. Oxford Univ Press.
- Casella,J.F., Craig,S.W., Maack,D.J. & Brown,A.E. (1987) Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle. *J.Cell Biol.*, **105**, 371-379.
- Castellano,F., Le Clainche,C., Patin,D., Carlier,M.F. & Chavrier,P. (2001) A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J.*, **20**, 5603-5614.
- Celli,J., Deng,W.Y. & Finlay,B.B. (2000) Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cellular Microbiology*, **2**, 1-9.
- Chakrabarti,A., Kelkar,D.A. & Chattopadhyay,A. (2006) Spectrin organization and dynamics: new insights. *Biosci.Rep.*, **26**, 369-386.
- Chen,X.M., Huang,B.Q., Splinter,P.L., Cao,H., Zhu,G., McNiven,M.A. & LaRusso,N.F. (2003) Cryptosporidium parvum invasion of biliary epithelia requires host cell tyrosine phosphorylation of cortactin via c-Src. *Gastroenterology*, **125**, 216-228.
- Chhabra,E.S. & Higgs,H.N. (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat.Cell Biol.*, **9**, 1110-1121.
- Collard,C.D., Park,K.A., Montalto,M.C., Alapati,S., Buras,J.A., Stahl,G.L. & Colgan,S.P. (2002) Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J.Biol.Chem.*, **277**, 14801-14811.
- Colowick,S.P. (1991) *Molecular Motors and the Cytoskeleton: 196 (Methods in Enzymology)*. Academic Press Inc.
- Colowick,S.P. (1998) *Molecular Motors and the Cytoskeleton, Part B: 298 (Methods in Enzymology)*. Academic Press Inc.
- Comerford,K.M., Lawrence,D.W., Synnestvedt,K., Levi,B.P. & Colgan,S.P. (2002) Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in PKA-induced changes in endothelial junctional permeability. *FASEB J.*, **16**, 583-585.

- Cooper, J.A. & Schafer, D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Current Opinion in Cell Biology*, **12**, 97-103.
- Cosen-Binker, L.I. & Kapus, A. (2006) Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 352-361.
- Cossart, P. & Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: The paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, **304**, 242-248.
- Cottet, S., Corthesy-Theulaz, I., Spertini, F. & Corthesy, B. (2002) Microaerophilic conditions permit to mimic in vitro events occurring during in vivo *Helicobacter pylori* infection and to identify Rho/Ras-associated proteins in cellular signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 33978-33986.
- Crostella, L., Lidder, S., Williams, R. & Skouteris, G.G. (2001) Hepatocyte Growth Factor/scatter factor induces phosphorylation of cortactin in A431 cells in a Src kinase-independent manner. *Oncogene*, **20**, 3735-3745.
- Cullen, B.R. (2002) RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat. Immunol.*, **3**, 597-599.
- Daly, R.J. (2004) Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochemical Journal*, **382**, 13-25.
- Dehio, C., Prevost, M.C. & Sansonetti, P.J. (1995) Invasion of Epithelial-Cells by *Shigella-Flexneri* Induces Tyrosine Phosphorylation of Cortactin by A Pp60(C-Src)-Mediated Signaling Pathway. *Embo Journal*, **14**, 2471-2482.
- Derry, J.M.J., Ochs, H.D. & Francke, U. (1994) Isolation of A Novel Gene Mutated in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell*, **78**, 635-644.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P. & Bard, F. (2003) Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 407-416.
- Di Ciano, C., Nie, Z.L., Szaszi, K., Lewis, A., Uruno, T., Zhan, X., Rotstein, O.D., Mak, A. & Kapus, A. (2002) Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **283**, C850-C865.
- Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K. & Scita, G. (2005) Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**, 955-970.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A. & Nosworthy, N.J. (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.*, **83**, 433-473.
- Du, Y., Weed, S.A., Xiong, W.C., Marshall, T.D. & Parsons, J.T. (1998) Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 5838-5851.
- Dudek, S.M., Birukov, K.G., Zhan, X. & Garcia, J.G. (2002) Novel interaction of cortactin with endothelial cell myosin light chain kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 511-519.

- Dustin,M.L., Olszowy,M.W., Holdorf,A.D., Li,J., Bromley,S., Desai,N., Widder,P., Rosenberger,F., van der Merwe,P.A., Allen,P.M. & Shaw,A.S. (1998) A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*, **94**, 667-677.
- El Sayegh,T.Y., Arora,P.D., Fan,L.Z., Laschinger,C.A., Greer,P.A., McCulloch,C.A. & Kapus,A. (2005) Phosphorylation of N-cadherin-associated cortactin by Fer kinase regulates N-cadherin adhesion strength. *Molecular Biology of the Cell*, **16**, 5514-5527.
- El Sayegh,T.Y., Arora,P.D., Laschinger,C.A., Lee,W., Morrison,C., Overall,C.M., Kapus,A. & McCulloch,C.A.G. (2004) Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, **117**, 5117-5131.
- Emmons,S., Phan,H., Calley,J., Chen,W., James,B. & Manseau,L. (1995) Cappuccino, a Drosophila maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. *Genes Dev.*, **9**, 2482-2494.
- Erickson-Viitanen,S., Ruggieri,S., Natalini,P. & Horecker,B.L. (1983) Thymosin beta 10, a new analog of thymosin beta 4 in mammalian tissues. *Arch.Biochem.Biophys.*, **225**, 407-413.
- Etienne-Manneville,S. & Hall,A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-635.
- Faix,J. & Grosse,R. (2006) Staying in shape with formins. *Dev.Cell*, **10**, 693-706.
- Fawaz,F.S., vanOoij,C., Homola,E., Mutka,S.C. & Engel,J.N. (1997) Infection with Chlamydia trachomatis alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infection and Immunity*, **65**, 5301-5308.
- Fischer,R.S. & Fowler,V.M. (2003) Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.*, **13**, 593-601.
- Frankel,S. & Mooseker,M.S. (1996) The actin-related proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **8**, 30-37.
- Friederich,E., Vancompernelle,K., Louvard,D. & Vandekerckhove,J. (1999) Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro. *J.Biol.Chem.*, **274**, 26751-26760.
- Frischknecht,F., Cudmore,S., Moreau,V., Reckmann,I., Rottger,S. & Way,M. (1999) Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not Listeria or Shigella. *Current Biology*, **9**, 89-92.
- Frischknecht,F. & Way,M. (2001) Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol.*, **11**, 30-38.
- Fukuoka,M., Suetsugu,S., Miki,H., Fukami,K., Endo,T. & Takenawa,T. (2001) A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *J.Cell Biol.*, **152**, 471-482.
- Galan,J.E. & Collmer,A. (1999) Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**, 1322-1328.
- Gallet,C., Rosa,J.P., Habib,A., Lebret,M., Levy-Toledano,S. & Maclouf,J. (1999) Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with Syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change. *J.Biol.Chem.*, **274**, 23610-23616.

- Garcia Arguinzonis, M.I., Galler, A.B., Walter, U., Reinhard, M. & Simm, A. (2002) Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *J. Biol. Chem.*, **277**, 45604-45610.
- Geese, M., Loureiro, J.J., Bear, J.E., Wehland, J., Gertler, F.B. & Sechi, A.S. (2002) Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2383-2396.
- Gertler, F.B., Comer, A.R., Juang, J.L., Ahern, S.M., Clark, M.J., Liebl, E.C. & Hoffmann, F.M. (1995) Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev.*, **9**, 521-533.
- Gertler, F.B., Doctor, J.S. & Hoffmann, F.M. (1990) Genetic suppression of mutations in the Drosophila abl proto-oncogene homolog. *Science*, **248**, 857-860.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. & Soriano, P. (1996) Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**, 227-239.
- Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S.A. & Linder, S. (2008) Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 235-241.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Furman, M.I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V.T. & Pollard, T.D. (1992) The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell*, **3**, 1015-1024.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Baldassare, J.J. & Pollard, T.D. (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*, **247**, 1575-1578.
- Goley, E.D. & Welch, M.D. (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 713-726.
- Goode, B.L. & Eck, M.J. (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 593-627.
- Grosse, R., Copeland, J.W., Newsome, T.P., Way, M. & Treisman, R. (2003) A role for VASP in RhoA-Diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. *EMBO J.*, **22**, 3050-3061.
- Gruenheid, S. & Finlay, B.B. (2003) Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, **422**, 775-781.
- Gunning, P., O'Neill, G. & Hardeman, E. (2008) Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev.*, **88**, 1-35.
- Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S.M. & Walter, U. (1995) Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *EMBO J.*, **14**, 19-27.
- Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P. & Walter, U. (1990) Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3088-3093.
- Halbrugge, M. & Walter, U. (1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 41-50.

- Hall,A. (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*, **249**, 635-640.
- Hall,A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Hall,A. & Nobes,C.D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **355**, 965-970.
- Hatakeyama,M. (2008) SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr.Opin.Microbiol.*, **11**, 30-37.
- Hauser,W., Knobloch,K.P., Eigenthaler,M., Gambaryan,S., Krenn,V., Geiger,J., Glazova,M., Rohde,E., Horak,I., Walter,U. & Zimmer,M. (1999) Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 8120-8125.
- Head,J.A., Jiang,D., Li,M., Zorn,L.J., Schaefer,E.M., Parsons,J.T. & Weed,S.A. (2003) Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol.Biol.Cell*, **14**, 3216-3229.
- Helwani,F.M., Kovacs,E.M., Paterson,A.D., Verma,S., Ali,R.G., Fanning,A.S., Weed,S.A. & Yap,A.S. (2004) Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *Journal of Cell Biology*, **164**, 899-910.
- Higashi,H., Tsutsumi,R., Muto,S., Sugiyama,T., Azuma,T., Asaka,M. & Hatakeyama,M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, **295**, 683-686.
- Higgs,H.N. (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem.Sci.*, **30**, 342-353.
- Hoffmann,I., Eugene,E., Nassif,X., Couraud,P.O. & Bourdoulous,S. (2001) Activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Journal of Cell Biology*, **155**, 133-143.
- Hollinshead,M., Rodger,G., Van Eijl,H., Law,M., Hollinshead,R., Vaux,D.J.T. & Smith,G.L. (2001) Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *Journal of Cell Biology*, **154**, 389-402.
- Hornsby,M.J., Huff,J.L., Kays,R.J., Canfield,D.R., Bevins,C.L. & Solnick,J.V. (2008) *Helicobacter pylori* induces an antimicrobial response in rhesus macaques in a cag pathogenicity island-dependent manner. *Gastroenterology*, **134**, 1049-1057.
- Hornstein,I., Alcover,A. & Katzav,S. (2004) Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal.*, **16**, 1-11.
- Hou,P., Estrada,L., Kinley,A.W., Parsons,J.T., Vojtek,A.B. & Gorski,J.L. (2003) Fgd1, the Cdc42 GEF responsible for Faciogenital Dysplasia, directly interacts with cortactin and mAbp1 to modulate cell shape. *Hum.Mol.Genet.*, **12**, 1981-1993.
- Huang,C., Liu,J.L., Haudenschild,C.C. & Zhan,X. (1998) The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 25770-25776.

- Huang,C., Ni,Y., Wang,T., Gao,Y., Haudenschild,C.C. & Zhan,X. (1997) Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, **272**, 13911-13915.
- Huang,J.H., Asawa,T., Takato,T. & Sakai,R. (2003) Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 48367-48376.
- Huang,R., Cao,G.J., Guo,H., Kordowska,J. & Albert Wang,C.L. (2006) Direct interaction between caldesmon and cortactin. *Arch.Biochem.Biophys.*, **456**, 175-182.
- Ichetovkin,I., Grant,W. & Condeelis,J. (2002) Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr.Biol.*, **12**, 79-84.
- Imaoka,T., Horseman,N.D., Lockefer,J.A., Mori,T. & Matsuda,M. (2002) Cortactin-binding protein 90 (CBP90) expression in the mouse mammary glands during prolactin-induced lobuloalveolar development. *Zoolog.Sci.*, **19**, 443-448.
- Innocenti,M., Zucconi,A., Disanza,A., Frittoli,E., Areces,L.B., Steffen,A., Stradal,T.E., Di Fiore,P.P., Carlier,M.F. & Scita,G. (2004) Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat.Cell Biol.*, **6**, 319-327.
- Jeanteur,P. (1999) *Cytoskeleton and Small G Proteins*. Springer-Verlag, Berlin.
- Jockusch,B.M., Murk,K. & Rothkegel,M. (2007) The profile of profilins. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, **159**, 131-149.
- Kaksonen,M., Peng,H.B. & Rauvala,H. (2000) Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J.Cell Sci.*, **113 Pt 24**, 4421-4426.
- Kapus,A., Di Ciano,C., Sun,J., Zhan,X., Kim,L., Wong,T.W. & Rotstein,O.D. (2000) Cell volume-dependent phosphorylation of proteins of the cortical cytoskeleton and cell-cell contact sites. The role of Fyn and FER kinases. *J.Biol.Chem.*, **275**, 32289-32298.
- Kapus,A., Szaszi,K., Sun,J., Rizoli,S. & Rotstein,O.D. (1999) Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. *J.Biol.Chem.*, **274**, 8093-8102.
- Katsube,T., Takahisa,M., Ueda,R., Hashimoto,N., Kobayashi,M. & Togashi,S. (1998) Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both Drosophila and mouse. *J.Biol.Chem.*, **273**, 29672-29677.
- Kempiak,S.J., Yamaguchi,H., Sarmiento,C., Sidani,M., Ghosh,M., Eddy,R.J., Desmarais,V., Way,M., Condeelis,J. & Segall,J.E. (2005) A neural Wiskott-Aldrich Syndrome protein-mediated pathway for localized activation of actin polymerization that is regulated by cortactin. *J.Biol.Chem.*, **280**, 5836-5842.
- Kenny,B., DeVinney,R., Stein,M., Reinscheid,D.J., Frey,E.A. & Finlay,B.B. (1997) Enteropathogenic E-coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, **91**, 511-520.
- Kenny,B. & Finlay,B.B. (1997) Intimin-dependent binding of enteropathogenic Escherichia coli to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. *Infect.Immun.*, **65**, 2528-2536.

- Kerkhoff,E. (2006) Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol.*, **16**, 477-483.
- Khurana,S. & George,S.P. (2008) Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective. *FEBS Lett.*, **582**, 2128-2139.
- Kim,L. & Wong,T.W. (1998) Growth factor-dependent phosphorylation of the actin-binding protein cortactin is mediated by the cytoplasmic tyrosine kinase FER. *J.Biol.Chem.*, **273**, 23542-23548.
- Kinley,A.W., Weed,S.A., Weaver,A.M., Karginov,A.V., Bissonette,E., Cooper,J.A. & Parsons,J.T. (2003) Cortactin interacts with WIP in regulating Arp2/3 activation and membrane protrusion. *Curr.Biol.*, **13**, 384-393.
- Komaletdinova,F.M. & Pinaev,G.P. (2006) [The filamin in cell signaling]. *Tsitologiya*, **48**, 924-934.
- Kostyukova,A.S. (2008) Tropomodulins and tropomodulin/tropomyosin interactions. *Cell Mol.Life Sci.*, **65**, 563-569.
- Kovar,D.R. (2006) Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **18**, 11-17.
- Kowalski,J.R., Egile,C., Gil,S., Snapper,S.B., Li,R. & Thomas,S.M. (2005) Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *Journal of Cell Science*, **118**, 79-87.
- Krause,M., Sechi,A.S., Konradt,M., Monner,D., Gertler,F.B. & Wehland,J. (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.*, **149**, 181-194.
- Krueger,E.W., Orth,J.D., Cao,H. & McNiven,M.A. (2003) A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 1085-1096.
- Krugmann,S., Jordens,I., Gevaert,K., Driessens,M., Vandekerckhove,J. & Hall,A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr.Biol.*, **11**, 1645-1655.
- Kwok,T., Zabler,D., Urman,S., Rohde,M., Hartig,R., Wessler,S., Misselwitz,R., Berger,J., Sewald,N., Konig,W. & Backert,S. (2007) Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, **449**, 862-866.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lassing,I. & Lindberg,U. (1988) Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex. *J.Cell Biochem.*, **37**, 255-267.
- Laurent,V., Loisel,T.P., Harbeck,B., Wehman,A., Grobe,L., Jockusch,B.M., Wehland,J., Gertler,F.B. & Carlier,M.F. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J.Cell Biol.*, **144**, 1245-1258.
- Lawrence,D.W., Comerford,K.M. & Colgan,S.P. (2002) Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca²⁺ switch. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **282**, C1235-C1245.
- Leader,B. & Leder,P. (2000) Formin-2, a novel formin homology protein of the cappuccino subfamily, is highly expressed in the developing and adult central nervous system. *Mech.Dev.*, **93**, 221-231.

- Lee, J.F., Ozaki, H., Zhan, X., Wang, E., Hla, T. & Lee, M.J. (2006) Sphingosine-1-phosphate signaling regulates lamellipodia localization of cortactin complexes in endothelial cells. *Histochem. Cell Biol.*, **126**, 297-304.
- Li, R. & Gundersen, G.G. (2008) Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 860-873.
- Lin, J., Liu, J., Wang, Y., Zhu, J., Zhou, K., Smith, N. & Zhan, X. (2005) Differential regulation of cortactin and N-WASP-mediated actin polymerization by missing in metastasis (MIM) protein. *Oncogene*, **24**, 2059-2066.
- Linder, S. & Aepfelbacher, M. (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in Cell Biology*, **13**, 376-385.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. & Aepfelbacher, M. (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 9648-9653.
- Liu, J., Huang, C. & Zhan, X. (1999) Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene*, **18**, 6700-6706.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M.F. (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, **401**, 613-616.
- Lommel, S., Benesch, S., Rohde, M., Wehland, J. & Rottner, K. (2004) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cellular Microbiology*, **6**, 243-254.
- Loureiro, J.J., Rubinson, D.A., Bear, J.E., Baltus, G.A., Kwiatkowski, A.V. & Gertler, F.B. (2002) Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2533-2546.
- Lua, B.L. & Low, B.C. (2004) BPGAP1 interacts with cortactin and facilitates its translocation to cell periphery for enhanced cell migration. *Faseb Journal*, **18**, C233.
- Lynch, D.K., Winata, S.C., Lyons, R.J., Hughes, W.E., Lehrbach, G.M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S. & Daly, R.J. (2003) A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, **278**, 21805-21813.
- Ma, L., Rohatgi, R. & Kirschner, M.W. (1998) The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 15362-15367.
- Machesky, L.M. (2000) Putting on the brakes: a negative regulatory function for Ena/VASP proteins in cell migration. *Cell*, **101**, 685-688.
- Machesky, L.M. & Gould, K.L. (1999) The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 117-121.
- Machesky, L.M. & Insall, R.H. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.*, **8**, 1347-1356.

- Machesky,L.M., Mullins,R.D., Higgs,H.N., Kaiser,D.A., Blanchoin,L., May,R.C., Hall,M.E. & Pollard,T.D. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 3739-3744.
- Machesky,L.M., Reeves,E., Wientjes,F., Mattheyse,F.J., Grogan,A., Totty,N.F., Burlingame,A.L., Hsuan,J.J. & Segal,A.W. (1997) Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem.J.*, **328 (Pt 1)**, 105-112.
- Mandel,M. & Higa,A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol.*, **53**, 159-162.
- Marshall,B.J. & Warren,J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1**, 1311-1315.
- Martinez,J.J. & Cossart,P. (2004) Early signaling events involved in the entry of Rickettsia conorii into mammalian cells. *Journal of Cell Science*, **117**, 5097-5106.
- Martinez-Quiles,N., Ho,H.Y.H., Kirschner,M.W., Ramesh,N. & Geha,R.S. (2004) Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 5269-5280.
- Martinez-Quiles,N., Rohatgi,R., Anton,I.M., Medina,M., Saville,S.P., Miki,H., Yamaguchi,H., Takenawa,T., Hartwig,J.H., Geha,R.S. & Ramesh,N. (2001) WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nature Cell Biology*, **3**, 484-491.
- Maruyama,S., Kurosaki,T., Sada,K., Yamanashi,Y., Yamamoto,T. & Yamamura,H. (1996) Physical and functional association of cortactin with Syk in human leukemic cell line K562. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 6631-6635.
- Matsudaira,P. (1994) The fimbrin and alpha-actinin footprint on actin. *J.Cell Biol.*, **126**, 285-287.
- McNiven,M.A., Kim,L., Krueger,E.W., Orth,J.D., Cao,H. & Wong,T.W. (2000) Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J.Cell Biol.*, **151**, 187-198.
- Miki,H., Miura,K. & Takenawa,T. (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo Journal*, **15**, 5326-5335.
- Miki,H., Suetsugu,S. & Takenawa,T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.*, **17**, 6932-6941.
- Miki,H. & Takenawa,T. (2003) Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J.Biochem.*, **134**, 309-313.
- Mitra,S.K. & Schlaepfer,D.D. (2006) Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **18**, 516-523.
- Mizutani,K., Miki,H., He,H., Maruta,H. & Takenawa,T. (2002) Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Research*, **62**, 669-674.

- Moese,S., Selbach,M., Brinkmann,V., Karlas,A., Haimovich,B., Backert,S. & Meyer,T.F. (2007) The Helicobacter pylori CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cell Microbiol.*, **9**, 1148-1161.
- Monack,D.M., Mueller,A. & Falkow,S. (2004) Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat.Rev.Microbiol.*, **2**, 747-765.
- Mullins,R.D., Heuser,J.A. & Pollard,T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 6181-6186.
- Mullins,R.D. & Pollard,T.D. (1999) Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **9**, 244-249.
- Nachmias,V.T. (1993) Small actin-binding proteins: the beta-thymosin family. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **5**, 56-62.
- Nanda,A., Buckhaults,P., Seaman,S., Agrawal,N., Boutin,P., Shankara,S., Nacht,M., Teicher,B., Stampfl,J., Singh,S., Vogelstein,B., Kinzler,K.W. & St Croix,B. (2004) Identification of a binding partner for the endothelial cell surface proteins TEM7 and TEM7R. *Cancer Res.*, **64**, 8507-8511.
- Naumann,M. & Crabtree,J.E. (2004) Helicobacter pylori-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol.*, **12**, 29-36.
- Necchi,V., Candusso,M.E., 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.
- Nelson,W.J., Kleinzeller,A. & Benos,D.J. (1996) *Membrane Protein-Cytoskeleton Interactions (Current Topics in Membranes)*. Academic Press Inc.
- Newsome,T.P., Scaplehorn,N. & Way,M. (2004) Src mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. *Science*, **306**, 124-129.
- Niebuhr,K., Ebel,F., Frank,R., Reinhard,M., Domann,E., Carl,U.D., Walter,U., Gertler,F.B., Wehland,J. & Chakraborty,T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of Listeria monocytogenes and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.*, **16**, 5433-5444.
- Nolte,C., Eigenthaler,M., Schanzenbacher,P. & Walter,U. (1991) Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors. *J.Biol.Chem.*, **266**, 14808-14812.
- Obergfell,A., Judd,B.A., del Pozo,M.A., Schwartz,M.A., Koretzky,G.A. & Shattil,S.J. (2001) The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIb beta3 to the actin cytoskeleton. *J.Biol.Chem.*, **276**, 5916-5923.
- Ohoka,Y. & Takai,Y. (1998) Isolation and characterization of cortactin isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90. *Genes to Cells*, **3**, 603-612.
- Omary,M.B. (2004) *Intermediate Filament Cytoskeleton: 78 (Methods in Cell Biology)*. Academic Press Inc.

- Ono,S. (2007) Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int.Rev.Cytol.*, **258**, 1-82.
- Onodera,Y., Hashimoto,S., Hashimoto,A., Morishige,M., Mazaki,Y., Yamada,A., Ogawa,E., Adachi,M., Sakurai,T., Manabe,T., Wada,H., Matsuura,N. & Sabe,H. (2005) Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *Embo Journal*, **24**, 963-973.
- Orth,J.D. & McNiven,M.A. (2003) Dynamin at the actin-membrane interface. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 31-39.
- Otto,J.J. (1994) Actin-bundling proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **6**, 105-109.
- Pan,S., Wang,R., Zhou,X., He,G., Koomen,J., Kobayashi,R., Sun,L., Corvera,J., Gallick,G.E. & Kuang,J. (2006) Involvement of the conserved adaptor protein Alix in actin cytoskeleton assembly. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 34640-34650.
- Pantaloni,D., Boujemaa,R., Didry,D., Gounon,P. & Carlier,M.F. (2000) The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nature Cell Biology*, **2**, 385-391.
- Pantaloni,D. & Carlier,M.F. (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*, **75**, 1007-1014.
- Paunola,E., Mattila,P.K. & Lappalainen,P. (2002) WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett.*, **513**, 92-97.
- Peek,R.M., Jr. & Blaser,M.J. (2002) Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat.Rev.Cancer*, **2**, 28-37.
- Phillips,N., Hayward,R.D. & Koronakis,V. (2004) Phosphorylation of the enteropathogenic E-coli receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nature Cell Biology*, **6**, 618-625.
- Pollard,T.D. (1999) Profilins. *Guidebook to the Cytoskeleton and Motor Proteins* (ed. by T.Kreis and R.Vale), pp. 117-120. Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
- Pollard,T.D., Blanchoin,L. & Mullins,R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*, **29**, 545-576.
- Popowicz,G.M., Schleicher,M., Noegel,A.A. & Holak,T.A. (2006) Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem.Sci.*, **31**, 411-419.
- Quinlan,M.E., Heuser,J.E., Kerkhoff,E. & Mullins,R.D. (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, **433**, 382-388.
- Quinlan,M.E., Hilgert,S., Bedrossian,A., Mullins,R.D. & Kerkhoff,E. (2007) Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *J.Cell Biol.*, **179**, 117-128.
- Racz,B. & Weinberg,R.J. (2004) The subcellular organization of cortactin in hippocampus. *J.Neurosci.*, **24**, 10310-10317.

- Ramesh,N., Anton,I.M., Hartwig,J.H. & Geha,R.S. (1997) WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 14671-14676.
- Redecker,P., Gundelfinger,E.D. & Boeckers,T.M. (2001) The cortactin-binding postsynaptic density protein proSAP1 in non-neuronal cells. *J.Histochem.Cytochem.*, **49**, 639-648.
- Reinhard,M., Giehl,K., Abel,K., Haffner,C., Jarchau,T., Hoppe,V., Jockusch,B.M. & Walter,U. (1995a) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.*, **14**, 1583-1589.
- Reinhard,M., Jarchau,T. & Walter,U. (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem.Sci.*, **26**, 243-249.
- Reinhard,M., Jouvenal,K., Tripier,D. & Walter,U. (1995b) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 7956-7960.
- Reinhard,M., Rudiger,M., Jockusch,B.M. & Walter,U. (1996) VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.*, **399**, 103-107.
- Renault,L., Bugyi,B. & Carlier,M.F. (2008) Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol.*, **18**, 494-504.
- Revenu,C., Athman,R., Robine,S. & Louvard,D. (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **5**, 635-646.
- Rietdorf,J., Ploubidou,A., Reckmann,I., Holmstrom,A., Frischknecht,F., Zettl,M., Zimmermann,T. & Way,M. (2001) Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nature Cell Biology*, **3**, 992-1000.
- Robinson,R.C., Turbedsky,K., Kaiser,D.A., Marchand,J.B., Higgs,H.N., Choe,S. & Pollard,T.D. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, **294**, 1679-1684.
- Rohatgi,R., Ma,L., Miki,H., Lopez,M., Kirchhausen,T., Takenawa,T. & Kirschner,M.W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, **97**, 221-231.
- Rohatgi,R., Nollau,P., Ho,H.Y., Kirschner,M.W. & Mayer,B.J. (2001) Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J.Biol.Chem.*, **276**, 26448-26452.
- Romero,F. & Fischer,S. (1996) Structure and function of vav. *Cell Signal.*, **8**, 545-553.
- Rottner,K., Behrendt,B., Small,J.V. & Wehland,J. (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat.Cell Biol.*, **1**, 321-322.
- Rottner,K., Stradal,T.E. & Wehland,J. (2005) Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev.Cell*, **9**, 3-17.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. & Maniatis,T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sanger,F., Nicklen,S. & Coulson,A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **74**, 5463-5467.
- Sauvonnet,N., Dujeancourt,A. & Dautry-Varsat,A. (2005) Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *J.Cell Biol.*, **168**, 155-163.
- Schafer,D.A., Jennings,P.B. & Cooper,J.A. (1996) Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: Uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *Journal of Cell Biology*, **135**, 169-179.
- Schafer,D.A., Weed,S.A., Binns,D., Karginov,A.V., Parsons,J.T. & Cooper,J.A. (2002) Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Current Biology*, **12**, 1852-1857.
- Schafer,D.A., Welch,M.D., Machesky,L.M., Bridgman,P.C., Meyer,S.M. & Cooper,J.A. (1998) Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. *J.Cell Biol.*, **143**, 1919-1930.
- Schuuring,E., Verhoeven,E., Litvinov,S. & Michalides,R.J. (1993) The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol.Cell Biol.*, **13**, 2891-2898.
- Sechi,A.S. & Wehland,J. (2004) ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics. *Front Biosci.*, **9**, 1294-1310.
- Segal,E.D., Cha,J., Lo,J., Falkow,S. & Tompkins,L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 14559-14564.
- Selbach,M. & Backert,S. (2005) Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends in Microbiology*, **13**, 181-189.
- Selbach,M., Moese,S., Backert,S., Jungblut,P.R. & Meyer,T.F. (2004) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics*, **4**, 2961-2968.
- Selbach,M., Moese,S., Hauck,C.R., Meyer,T.F. & Backert,S. (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 6775-6778.
- Selbach,M., Moese,S., Hurwitz,R., Hauck,C.R., Meyer,T.F. & Backert,S. (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo Journal*, **22**, 515-528.
- Sieg,D.J., Hauck,C.R., Ilic,D., Klingbeil,C.K., Schaefer,E., Damsky,C.H. & Schlaepfer,D.D. (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat.Cell Biol.*, **2**, 249-256.
- Sieg,D.J., Hauck,C.R. & Schlaepfer,D.D. (1999) Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J.Cell Sci.*, **112** (Pt 16), 2677-2691.
- Silacci,P., Mazzolai,L., Gauci,C., Stergiopoulos,N., Yin,H.L. & Hayoz,D. (2004) Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol.Life Sci.*, **61**, 2614-2623.
- Sjoblom,B., Salmazo,A. & Djinovic-Carugo,K. (2008) Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol.Life Sci.*, **65**, 2688-2701.

- Small,J.V., Auinger,S., Nemethova,M., Koestler,S., Goldie,K.N., Hoenger,A. & Resch,G.P. (2008) Unravelling the structure of the lamellipodium. *J.Microsc.*, **231**, 479-485.
- Sohn,R.H., Chen,J., Koblan,K.S., Bray,P.F. & Goldschmidt-Clermont,P.J. (1995) Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *J.Biol.Chem.*, **270**, 21114-21120.
- Sohn,R.H. & Goldschmidt-Clermont,P.J. (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays*, **16**, 465-472.
- Stein,M., Bagnoli,F., Halenbeck,R., Rappuoli,R., Fantl,W.J. & Covacci,A. (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular Microbiology*, **43**, 971-980.
- Stevenson,B.R. & Keon,B.H. (1998) The tight junction: morphology to molecules. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **14**, 89-109.
- Stradal,T.E., Rottner,K., Disanza,A., Confalonieri,S., Innocenti,M. & Scita,G. (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.*, **14**, 303-311.
- Stylli,S.S., Kaye,A.H. & Lock,P. (2008) Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. *J.Clin.Neurosci.*, **15**, 725-737.
- Suerbaum,S. & Josenhans,C. (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat.Rev.Microbiol.*, **5**, 441-452.
- Suetsugu,S., Miki,H. & Takenawa,T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.*, **17**, 6516-6526.
- Sun,H.Q., Kwiatkowska,K. & Yin,H.L. (1996) beta-Thymosins are not simple actin monomer buffering proteins. Insights from overexpression studies. *J.Biol.Chem.*, **271**, 9223-9230.
- Sun,H.Q., Yamamoto,M., Mejillano,M. & Yin,H.L. (1999) Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 33179-33182.
- Suzuki,T., Miki,H., Takenawa,T. & Sasakawa,C. (1998) Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*. *Embo Journal*, **17**, 2767-2776.
- Suzuki,T. & Sasakawa,C. (2001) Molecular basis of the intracellular spreading of *Shigella*. *Infection and Immunity*, **69**, 5959-5966.
- Suzuki,Y., Demoliere,C., Kitamura,D., Takeshita,H., Deuschle,U. & Watanabe,T. (1997) HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *Journal of Immunology*, **158**, 2736-2744.
- Svitkina,T.M. & Borisy,G.G. (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J.Cell Biol.*, **145**, 1009-1026.
- Svitkina,T.M., Bulanova,E.A., Chaga,O.Y., Vignjevic,D.M., Kojima,S., Vasiliev,J.M. & Borisy,G.G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J.Cell Biol.*, **160**, 409-421.

- Swimm,A., Bommarius,B., Li,Y., Cheng,D., Reeves,P., Sherman,M., Veach,D., Bornmann,W. & Kalman,D. (2004) Enteropathogenic Escherichia coli use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 3520-3529.
- Takai,Y., Kaibuchi,K., Kikuchi,A., Sasaki,T. & Shirataki,H. (1993) Regulators of small GTPases. *Ciba Found.Symp.*, **176**, 128-138.
- Takai,Y., Sasaki,T. & Matozaki,T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.*, **81**, 153-208.
- Tammer,I., Brandt,S., Hartig,R., Konig,W. & Backert,S. (2007) Activation of Abl by Helicobacter pylori: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology*, **132**, 1309-1319.
- Tehrani,S., Faccio,R., Chandrasekar,I., Ross,F.P. & Cooper,J.A. (2006) Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly. *Molecular Biology of the Cell*, **17**, 2882-2895.
- Tepass,U. (2002) Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays*, **24**, 690-695.
- Theriot,J.A. (1997) Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J.Cell Biol.*, **136**, 1165-1168.
- Thomas,G.H. (2001) Spectrin: the ghost in the machine. *Bioessays*, **23**, 152-160.
- Tian,L.J., Chen,L., McClafferty,H., Sailer,C.A., Ruth,P., Knaus,H.G. & Shipston,M.J. (2006) A noncanonical SH3 domain binding motif links BK channels to the actin cytoskeleton via the SH3 adapter cortactin. *Faseb Journal*, **20**, 2588-+.
- Touyz,R.M., Yao,G., Quinn,M.T., Pagano,P.J. & Schiffrin,E.L. (2005) p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells - Role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **25**, 512-518.
- Towbin,H., Staehelin,T. & Gordon,J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, **24**, 145-149.
- Tran,V.N., Bourdet-Sicard,R., Dumenil,G., Blocker,A. & Sansonetti,P.J. (2000) Bacterial signals and cell responses during Shigella entry into epithelial cells. *Cell Microbiol.*, **2**, 187-193.
- Trichet,L., Sykes,C. & Plastino,J. (2008) Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J.Cell Biol.*, **181**, 19-25.
- Tsutsumi,R., Higashi,H., Higuchi,M., Okada,M. & Hatakeyama,M. (2003) Attenuation of Helicobacter pylori CagA-SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 3664-3670.
- Ueda,T., Kikuchi,A., Ohga,N., Yamamoto,J. & Takai,Y. (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J.Biol.Chem.*, **265**, 9373-9380.
- Urano,T., Liu,J.L., Li,Y.S., Smith,N. & Zhan,X. (2003) Sequential interaction of actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin

- during branched actin filament network formation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 26086-26093.
- Urano,T., Liu,J.L., Zhang,P.J., Fan,Y.X., Egile,C., Li,P., Mueller,S.C. & Zhan,X. (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nature Cell Biology*, **3**, 259-266.
- Vasioukhin,V., Bauer,C., Yin,M. & Fuchs,E. (2000) Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell*, **100**, 209-219.
- Vidal,C., Geny,B., Melle,J., Jandrot-Perrus,M. & Fontenay-Roupie,M. (2002) Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood*, **100**, 4462-4469.
- Vogelstein,B. & Gillespie,D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **76**, 615-619.
- Volkman,N., Amann,K.J., Stoilova-McPhie,S., Egile,C., Winter,D.C., Hazelwood,L., Heuser,J.E., Li,R., Pollard,T.D. & Hanein,D. (2001) Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science*, **293**, 2456-2459.
- Vuori,K. & Ruoslahti,E. (1995) Tyrosine Phosphorylation of P130(Cas) and Cortactin Accompanies Integrin-Mediated Cell-Adhesion to Extracellular-Matrix. *Molecular Biology of the Cell*, **6**, 680.
- Walders-Harbeck,B., Khaitlina,S.Y., Hinssen,H., Jockusch,B.M. & Illenberger,S. (2002) The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett.*, **529**, 275-280.
- Waller,B.J. & Alberts,A.S. (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, **13**, 435-446.
- Wanger,M., Keiser,T., Neuhaus,J.M. & Wegner,A. (1985) The actin treadmill. *Can.J.Biochem.Cell Biol.*, **63**, 414-421.
- Weaver,A.M. (2008) Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Letters*, **265**, 157-166.
- Weaver,A.M., Heuser,J.E., Karginov,A.V., Lee,W.L., Parsons,J.T. & Cooper,J.A. (2002) Interaction of cortactin and N-WASP with Arp2/3 complex. *Curr.Biol.*, **12**, 1270-1278.
- Weaver,A.M., Karginov,A.V., Kinley,A.W., Weed,S.A., Li,Y., Parsons,J.T. & Cooper,J.A. (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current Biology*, **11**, 370-374.
- Webb,B.A., Eves,R. & Mak,A.S. (2006a) Cortactin regulates podosome formation: Roles of the protein interaction domains. *Experimental Cell Research*, **312**, 760-769.
- Webb,B.A., Zhou,S.T., Eves,R., Shen,L., Jia,L. & Mak,A.S. (2006b) Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **456**, 183-193.
- Weed,S.A., Du,Y.R. & Parsons,J.T. (1998) Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *Journal of Cell Science*, **111**, 2433-2443.
- Weed,S.A., Karginov,A.V., Schafer,D.A., Weaver,A.M., Kinley,A.W., Cooper,J.A. & Parsons,J.T. (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *Journal of Cell Biology*, **151**, 29-40.

- Weed,S.A. & Parsons,J.T. (2001) Cortactin: coupling, membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*, **20**, 6418-6434.
- Weeds,A. & Maciver,S. (1993) F-actin capping proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **5**, 63-69.
- Weiner,M.P., Costa,G.L., Schoettlin,W., Cline,J., Mathur,E. & Bauer,J.C. (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, **151**, 119-123.
- Welch,M.D. (1999) The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.*, **9**, 423-427.
- Welch,M.D., Iwamatsu,A. & Mitchison,T.J. (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, **385**, 265-269.
- Welch,M.D. & Mullins,R.D. (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **18**, 247-288.
- Wessler,S. & Backert,S. (2008) Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.*, **16**, 397-405.
- Witke,W. (2004) The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.*, **14**, 461-469.
- Wu,H. & Parsons,J.T. (1993) Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J.Cell Biol.*, **120**, 1417-1426.
- Wu,H., Reynolds,A.B., Kanner,S.B., Vines,R.R. & Parsons,J.T. (1991) Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol.Cell Biol.*, **11**, 5113-5124.
- Xu,Y., Moseley,J.B., Sagot,I., Poy,F., Pellman,D., Goode,B.L. & Eck,M.J. (2004) Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*, **116**, 711-723.
- Yang,C., Huang,M., DeBiasio,J., Pring,M., Joyce,M., Miki,H., Takenawa,T. & Zigmond,S.H. (2000) Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J.Cell Biol.*, **150**, 1001-1012.
- Yang,L., Kowalski,J.R., Zhan,X., Thomas,S.M. & Luscinskas,F.W. (2006) Endothelial cell cortactin phosphorylation by Src contributes to polymorphonuclear leukocyte transmigration in vitro. *Circ.Res.*, **98**, 394-402.
- Yarar,D., D'Alessio,J.A., Jeng,R.L. & Welch,M.D. (2002) Motility determinants in WASP family proteins. *Mol.Biol.Cell*, **13**, 4045-4059.
- Yarar,D., To,W., Abo,A. & Welch,M.D. (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr.Biol.*, **9**, 555-558.
- Zettl,M. & Way,M. (2001) New tricks for an old dog? *Nature Cell Biology*, **3**, E74-E75.
- Zhan,X., Hu,X., Hampton,B., Burgess,W.H., Friesel,R. & Maciag,T. (1993) Murine cortactin is phosphorylated in response to fibroblast growth factor-1 on tyrosine residues late in the G1 phase of the BALB/c 3T3 cell cycle. *J.Biol.Chem.*, **268**, 24427-24431.

- Zhou,S.T., Webb,B.A., Eves,R. & Mak,A.S. (2006) Effects of tyrosine phosphorylation of cortactin on podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **290**, C463-C471.
- Zhu,J.W., Zhou,K., Hao,J.J., Liu,J.L., Smith,N. & Zhan,X. (2005) Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits. *Journal of Cell Science*, **118**, 807-817.
- Zigmond,S.H., Evangelista,M., Boone,C., Yang,C.S., Dar,A.C., Sicheri,F., Forkey,J. & Pring,M. (2003) Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Current Biology*, **13**, 1820-1823.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang König danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die Möglichkeit, hier unter sehr guten Arbeitsbedingungen zu promovieren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Steffen Backert für die Bereitstellung des Themas und die sehr gute Betreuung der Arbeit in allen Entwicklungsphasen. Seine kontinuierliche Unterstützung und Interesse an meiner Arbeit, sowie seine fachliche Kompetenz trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Sabine Brandt für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, wenn die Motivation nachzulassen drohte, sowie für den Spaß, den wir im gemeinsamen Labor- und Büroalltag hatten. Danken möchte ich außerdem Ruth Wittelsberger, Gosia Krause-Gruszczynska, Corinna Gagell und Manja Böhm für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Diana Schmidt und Dana Zabler danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft und für die gute Atmosphäre im Labor.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Roland Hartig für seine Unterstützung und Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie.

Außerdem danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden, die mich die ganze Zeit über begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Nicole Tegtmeyer
Geburtsdatum: 16.12.1976
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse:: Wolfenbütteler Str. 69, 39112 Magdeburg

Schulische Ausbildung

07/1983 – 07/1989 Finow-Grundschule, Berlin
08/1989 – 05/1997 Friedrich-Ebert-Gymnasium, Berlin
22.05.1997 Abitur

Hochschulausbildung

10/1997 – 12/2004 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
04/2004 – 12/2004 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin: *Funktionelle Bestandteile des Replikons vom Yersinia-Prophagen PY54: das repA-Gen überlappt den origin*
20.12.2004 Diplom-Biologin

Berufserfahrung

06/2001 – 07/2001 Praktikantin am Robert-Koch-Institut, Berlin:
Molekularbiologische Charakterisierung der Integrationsstelle des Shiga-Toxin codierenden Bakteriophagens V1 in E. coli
10/2005 – 10/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Magdeburg: *Untersuchung molekularer Mechanismen der Infektion von Helicobacter pylori*
seit 11/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Magdeburg: *Molekulare Funktion von Cortactin in der Signaltransduktion und Pathogenese von gastrischen Epithelzellen*

PUBLIKATIONSLISTE

Ziegelin,G., Tegtmeyer,N., Lurz,R., Hertwig,S., Hammerl,J., Appel,B. & Lanka,E. (2005) The repA gene of the linear *Yersinia enterocolitica* prophage PY54 functions as a circular minimal replicon in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, **187**, 3445-3454.

Tegtmeyer,N., Zabler,D., Schmidt,D., Hartig,R., Brandt,S. & Backert,S. (2008) Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signaling for host cell elongation and scattering induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cellular Microbiology* - **in press**.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema: „Molekulare Funktion von Cortactin in der Signaltransduktion und Pathogenese von gastrischen Epithelzellen“ selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

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

Magdeburg, den 25.11.2008