

**Modulation des kanonischen Wnt/ β -Catenin-
Signalweges in der *Helicobacter pylori*-
Infektion**

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-Biologe Thorsten Gnad

geb. am 27.07.1977 in Kandel

Gutachter: Prof. Dr. Michael Naumann

Prof. Dr. Michael Lohoff

eingereicht am 26.10.2009

verteidigt am 22.02.2010

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle Innere Medizin unter Leitung von Prof. Dr. Michael Naumann angefertigt. Ohne viele Worte möchte ich an dieser Stelle all denen herzlich danken, die mich im Laufe der letzten Jahre immer unterstützt, motiviert und begleitet haben und ohne die diese Arbeit niemals zu Stande gekommen wäre:

Prof. Dr. Michael Naumann

Prof. Dr. Uwe Lehndeckel

Ute Thiel

Dr. Alicia Bukowska

Dr. Carmen Wolke

Katja Mook

Doris Trzeczak

Astrid Giese

Bärbel Behrens

Cornelia Rieke

Wiebke Schirrmeister

Anja Papendieck

allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Innere Medizin

Prof. Dr. Oliver Stork

Maria Feoktistova

meinen Doktorandenkollegen des GRK 1167

meinen Eltern

meinen Freunden

Verwendete Abkürzungen

Neben den gebräuchlichen SI-Einheiten werden folgende Abkürzungen verwendet:

(v/v)	Volumen/Volumen Verhältnis
(w/v)	Gewichts/Volumen Verhältnis
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Ala	Alanin
AlpA	<i>Adherence-associated lipoprotein A</i>
AlpB	<i>Adherence-associated lipoprotein B</i>
BabA	<i>Blood group antigen binding adhesion</i>
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
CagA	<i>Cytotoxin-associated gen A</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK1 α	Casein Kinase 1 α
CK1 γ	Casein Kinase 1 γ
Cox-2	Cyclooxygenase-2
DEP	Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIX	Dishevelled/Axin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	<i>Deoxycholic Acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Erk 1/2	<i>Extracellular signal-related kinase 1/2</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Abkürzungen

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glu	Glutamin
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Lef	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
NapA	<i>Neutrophil activating protein</i>
NF- κ B	<i>Nuclear-factor κB</i>
OD	Optische Dichte
OipA	<i>Outer membrane inflammatory protein A</i>
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD-95, DLG, ZO-1
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC α	Protein-Kinase C α
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid

Abkürzungen

Rac1	<i>Ras-related-C3-botulinum-toxin-substrate 1</i>
RIPA	<i>Radioimmune precipitation assay buffer</i>
<i>RhoA</i>	<i>Ras-homology A</i>
ROR2	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan-receptor 2</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RYK	<i>Related to receptor tyrosine kinase</i>
SF	<i>Scatter factor</i>
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfat</i>
Ser	Serin
shRNAmir	<i>short hairpin Ribonukleinsäure microRNA</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SFRP	<i>Secreted Frizzled-related protein</i>
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Tcf	<i>T-cell factor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tyr	Tyrosin
VacA	<i>Vacuolating cytotoxin A</i>
WIF	<i>Wnt-inhibitory factor</i>

1. EINLEITUNG	8
1.1 <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Pathogenese der <i>H. pylori</i> -Infektion	8
1.1.3 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	10
1.2 Der Wnt/β-Catenin Signalweg	14
1.2.1 Die Rolle des Wnt/ β -Catenin Signalweges bei der Entstehung von Magenkrebs	21
1.2.2 Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges durch <i>H. pylori</i>	22
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	24
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Chemikalien	25
3.1.2 Gebrauchsmaterialien	25
3.1.3 Geräte	25
3.1.4 Verwendete Kits	27
3.1.5 Antibiotika	27
3.1.6 Antikörper	27
3.1.7 Enzyme und Proteine	28
3.1.8 Protein- und DNA-Marker	28
3.1.9 Puffer und Lösungen	28
3.1.10 DNA-Oligonukleotide	29
3.1.11 DNA-Konstrukte	30
3.1.12 Lentivirale Konstrukte	30
3.1.13 Nährmedien und Agarplatten zur Kultivierung von Bakterien	31
3.1.14 Computerprogramme und Datenbanken	32
3.1.15 Bakterienstämme	32
3.2 Methoden	33
3.2.1 Bakterienkultur	33
3.2.1.1 Kultivierung von <i>H. pylori</i>	33
3.2.1.2 Transformation und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	33
3.2.1.3 Infektion von NCI-N87 mit <i>H. pylori</i>	34
3.2.2 Kultivierung von NCI-N87-Zellen	35
3.2.3 Molekular- und Proteinbiochemische Methoden	35
3.2.3.1 Plasmidisolierung im Midimaßstab	35
3.2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA	36
3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	36
3.2.3.4 Reverse-Transkriptase-PCR	36
3.2.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR	37
3.2.3.6 Transfektion eukaryotischer Zellen	38
3.2.3.8 Herstellung von stabilen <i>knockdown</i> Zelllinien	39
3.2.3.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	39

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.10 Immunpräzipitation	40
3.2.3.11 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE	40
3.2.3.12 Western blot	41
3.2.4 Statistik	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1 <i>H. pylori</i> -induzierte Aktivierung von β -Catenin	43
4.2 Freisetzung von β -Catenin aus dem Degradationskomplex nach <i>H. pylori</i> -Infektion	45
4.3 <i>H. pylori</i> -Infektion führt zu GSK3 β -Inhibierung	46
4.4 <i>H. pylori</i> induziert eine T4SS-abhängige LRP6-Phosphorylierung	46
4.5 Infektion mit <i>H. pylori</i> führt zu einer Translokation von Dvl und Axin an die Plasmamembran	48
4.6 Herstellung von stabil transfizierten Dvl2, Dvl3 und LRP6 knockdown Zelllinien	49
4.7 Die <i>H. pylori</i> -induzierte Phosphorylierung von LRP6 ist abhängig von Dvl	50
4.8 Die <i>H. pylori</i> -induzierte Kernakkumulation von β -Catenin, die Lef/Tcf-Transaktivierung sowie die Expression von Zielgenen ist abhängig von Dvl2, Dvl3 und LRP6	51
5. DISKUSSION	54
5.1 Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch <i>H. pylori</i>	54
5.2 LRP6-Aktivierung durch <i>H. pylori</i>	57
5.3 Die Aktivierung von β -Catenin durch <i>H. pylori</i> ist abhängig von LRP6, Dvl2 und Dvl3	60
6. ZUSAMMENFASSUNG	64
7. LITERATURVERZEICHNIS	65
Lebenslauf	79
Wissenschaftliche Publikationen	81
Erklärung	82
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	83

1. Einleitung

1.1 *Helicobacter pylori*

H. pylori ist ein Gram-negatives, spiralförmiges, microaerophiles Bakterium, welches sehr erfolgreich die Antrum- und Korpusregionen des menschlichen Magens kolonisiert, jedoch ist auch eine Ausbreitung in das Duodenum möglich. Auf Grund seiner lophotrichen Begeißelung (2-6 Flagellen) ist das Bakterium sehr beweglich und in der Lage die Mukosa des Magens zu durchdringen (O' Toole *et al.*, 2000). Das saure Gewebe des menschlichen Magens ist das einzig bekannte Habitat von *H. pylori* und nachdem es jahrzehntelang als unmöglich galt, dass Bakterien in diesem Milieu überleben können, wurde es 1983 erstmals aus Magenbiopsien von Barry James Marshall und John Robin Warren isoliert (Warren und Marshall, 1984). Bis heute wurden erst drei von über 350 nachgewiesenen Stämmen vollständig sequenziert, J99, 26695 und HPAG1. Das Genom von *H. pylori* ist mit durchschnittlich ca. 1,7 Millionen Basenpaaren im Vergleich zu anderen humanpathogenen Bakterien klein, der GC-Gehalt liegt bei 35-45 %. Der *H. pylori*-Stamm J99 besitzt 1491 Gene, der Stamm 26695 1587 Gene und das Genom von Stamm HPAG1 kodiert für 1536 Gene (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.* 2006). Bisher konnten etwa 1800 *H. pylori*-Proteine verifiziert werden (Bumann *et al.*, 2001), deren spezifische Funktion aber in den meisten Fällen nicht bekannt ist.

1.1.1 Epidemiologie

Infektionen mit *H. pylori* gehören zu den häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen des Menschen mit einer geschätzten weltweiten Prävalenz von etwa 50 %, wobei starke Unterschiede zwischen den westlichen Industrienationen und den Entwicklungsländern bestehen. Die Infektion erfolgt in der Regel während der frühen Kindheit, vermutlich auf oral-oralem oder fäkal-oralem Weg (Mitchell und Megraud, 2002) und kann, wenn unbehandelt, ein Leben lang persistieren.

1.1.2 Pathogenese der *H. pylori*-Infektion

Helicobacter pylori ist das einzige Bakterium, dem es gelingt den ansonsten sterilen Magen dauerhaft zu kolonisieren. Der Besitz eines Urease-Enzyms ermöglicht *H. pylori* die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid, was eine Erhaltung eines konstanten internen und periplasmatischen pH-Wertes sogar in

1 Einleitung

Gegenwart sehr hoher umgebender H^+ -Konzentrationen erlaubt (Scott *et al.*, 2002). Weiterhin erlaubt die starke Beweglichkeit von *H. pylori* dem Keim, die hochviskose Mukosa des Magens zu durchdringen und den Raum zwischen dieser und dem Magenepithel zu besiedeln (Segal *et al.* 1997). Mit Hilfe von bakteriellen Adhäsinen gelingt dem Keim eine starke Bindung an die Epithelzellen (Josehans und Suerbaum, 2002). Die Besiedelung des Magens durch *H. pylori* führt häufig zu einer lebenslangen chronischen Entzündung, die zumeist in der Ausbildung einer asymptomatisch verlaufenden chronischen Gastritis resultiert. Für die Entstehung nachfolgender Erkrankungen spielt die Lokalisierung der Gastritis eine wichtige Rolle. Eine Gastritis des Antrums ist meist assoziiert mit einer Überproduktion von Magensäure, was in der Regel ein geringes Risiko für die Entwicklung von Magenkrebs nach sich zieht, jedoch oft in einer Ulkuserkrankung des Duodenums resultiert (Hansson *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu führt eine Gastritis der Korpusregion zu einer Hypochlorhydrie und Atrophie des Magens, was mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Magenkrebs verbunden ist (Uemura *et al.* 2001). Bei etwa 10-15 % aller mit *H. pylori* infizierten Menschen entwickeln sich Geschwüre des Magens oder des Zwölffingerdarms und in seltenen Fällen, etwa bei 2 % aller Infizierten, kommt es zur Entstehung von Magenkarzinomen oder MALT-Lymphomen. Aus diesem Grund wurde *H. pylori* 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Karzinogen der Klasse 1 eingestuft. Neben der Virulenz der unterschiedlichen *H. pylori*-Stämme spielen weitere Faktoren bei der Entstehung bösartiger Veränderungen des Magens eine Rolle. So ist beispielsweise bei erblichen Magenkrebserkrankungen sehr häufig das Gen CDH1, welches für das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin kodiert, mutiert (Firth *et al.*, 2005). Weitere genetische Faktoren des Wirtes sind Polymorphismen für das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β und seines Rezeptors IL-1RA (El-Omar *et al.*, 2000; Rad *et al.*, 2004), sowie TNF- α , IL-8 und IL-10 (El-Omar *et al.*, 2003, Ohyauchi *et al.*, 2005), wobei IL-10 interessanterweise ein anti-inflammatorisches Zytokin darstellt. Die Kombination von drei oder mehr dieser Polymorphismen und eine zusätzliche chronische Infektion mit *H. pylori* sorgen für eine signifikante Erhöhung des Risikos an Magenkrebs zu erkranken. Ernährungsgewohnheiten, insbesondere Salz- und Nitrat/Nitrit-haltige Nahrung sind ebenfalls positiv mit dem Risiko, an Magenkrebs zu erkranken, korreliert (Tokui *et al.*, 2005; Shikata *et al.*, 2005). Hingegen kann ein Mangel an

1 Einleitung

Vitamin C nicht abschließend als Risikofaktor eingestuft werden (Blejakovic *et al.*, 2004). Tabakkonsum ist ein vom *H. pylori*-Status unabhängiger starker Risikofaktor für die Entwicklung von Magenkarzinomen (Nishino *et al.*, 2006).

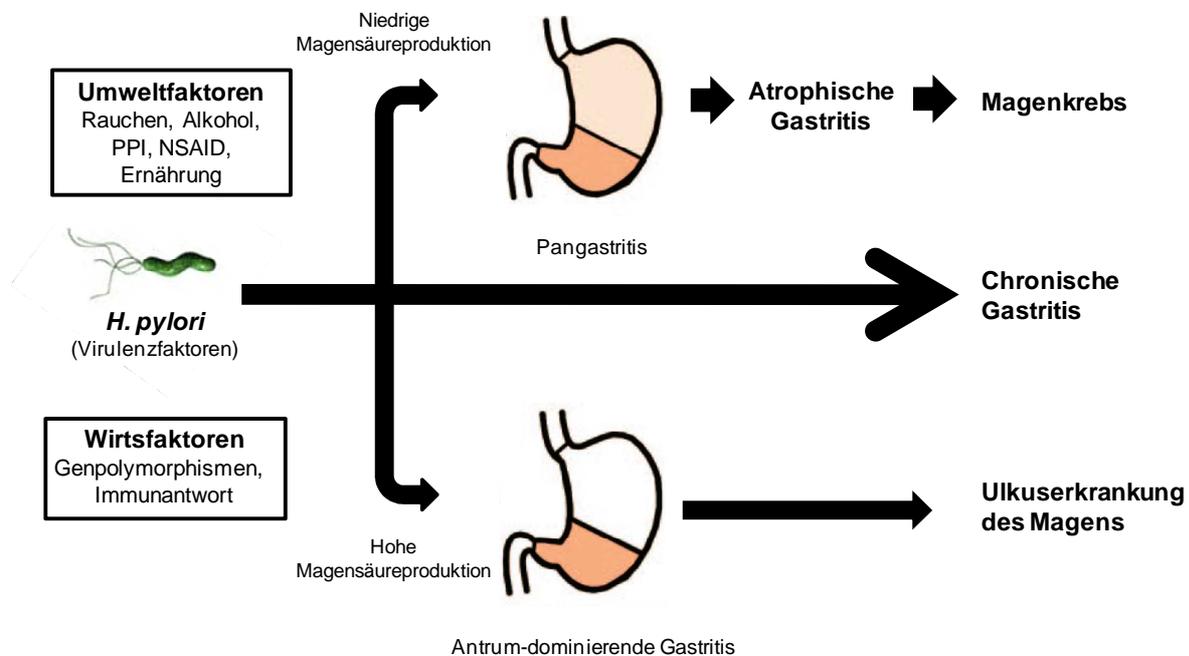


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Faktoren die zur Pathologie des Magens sowie den durch eine *H. pylori* Infektion verursachten Erkrankungen beitragen (in Anlehnung an Kusters *et al.*, 2006).

1.1.3 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren von *H. pylori*

Die hohe Beweglichkeit von *H. pylori* als Voraussetzung zur Durchquerung der Mukusschicht des Magens, sowie die sehr gute Fähigkeit des Bakteriums sich an Epithelzellen anzuheften, sind die Grundlagen für seine erfolgreiche Kolonisierung. In Tabelle 1.1 sind wichtige Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren sowie ihre Funktionen zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*

	Gen(e)	Funktion	Referenz
Virulenzfaktor			
Cag-Pathogenitätsinsel	cag PAI (27-31 Gene)	kodiert für Gene des T4SS und für CagA	Censini <i>et al.</i> , 1996

1 Einleitung

	Gen(e)	Funktion	Referenz
Zytotoxin-assoziiertes Gen A	cagA	Effektorprotein	Covacci <i>et al.</i> , 1993
Vakuolisierendes Zytotoxin A	vacA	Bildung von Vakuolen Induktion von Apoptose	Cover und Blaser, 1992 Galmiche <i>et al.</i> , 2000
Pathogenitätsfaktor			
Urease	ureA, ureB	Neutralisation der Magensäure	Labigne <i>et al.</i> , 1991
Amidasen	amiE, amiF	Neutralisation der Magensäure	Skouloubris <i>et al.</i> , 2001
Arginase	rocF	Neutralisation der Magensäure	McGee <i>et al.</i> , 1999
Flagellen	flaA, flaB	Beweglichkeit, Kolonisation	Suerbaum <i>et al.</i> , 1993
Adhäsine	babA1, babA2	Bindung an Magenepithelzellen	Kusters <i>et al.</i> , 2006
	sabA		Mahdavi <i>et al.</i> , 2002
	alpA, alpB	Bindung an Magenepithelzellen	de Jonge <i>et al.</i> , 2004
	oipA		Yamaoka <i>et al.</i> , 2000
Neutrophile-aktivierendes Protein A	napA	Aktivierung von neutrophilen Granulozyten	Evans <i>et al.</i> , 1995

Das Enzym Urease ist essentiell für das Überleben von *H. pylori* im sauren Lumen des Magens. Bakterielle Stämme, die keine Urease exprimieren, können die Mukosa des Magens *in vivo* nicht kolonisieren (Eaton *et al.* 1991). Ein Cluster aus sieben Genen ist verantwortlich für die Biosynthese des Enzyms. Die Gene kodieren für die beiden Untereinheiten UreA und UreB, sowie für fünf weitere Proteine, welche notwendig sind für die Aufnahme des Ko-Faktors Ni²⁺ der Urease (Labigne *et al.*, 1991). Der von der Urease gebildete Ammoniak ist toxisch für die Zellen des Magens

1 Einleitung

und kann weiterhin auch mit von neutrophilen Granulozyten gebildeten reaktiven Produkten zu karzinogenen Agentien reagieren (Sommi *et al.*, 1996; Kuwahara *et al.*, 2000). *H. pylori* besitzt weitere Enzyme, die für die Produktion von Ammoniak und für die Säureresistenz verantwortlich sind. Zum einen die beiden aliphatischen Amidasen AmiE und AmiF, die aus kurzkettigen Amiden die korrespondierenden organischen Säuren und Ammoniak produzieren (Skouloubris *et al.*, 2001), zum anderen eine Arginase, die vom Gen rocF kodiert wird. Sie katalysiert die Umsetzung von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff (McGee *et al.*, 1999). Trotz der relativen Säureresistenz von *H. pylori* ist ein schnelles Erreichen des Magenepitheliums unter der zähflüssigen Mukusschicht für ein Überleben essentiell, nicht bewegliche Stämme können den Magen nicht kolonisieren (Josenhans und Suerbaum, 2002). Verantwortlich für die Beweglichkeit ist der Besitz von 2-6 polaren Flagellen mit einer Länge von etwa 3 µm. Die Filamente der Flagellen werden jeweils aus zwei Untereinheiten aufgebaut, dem 53 kDa großen FlaA und dem 54 kDa großen FlaB (Suerbaum *et al.*, 1993). Insgesamt sind über 50 Proteine am Aufbau und der Regulation der Flagellen beteiligt (Niehus *et al.*, 2004). Nach der Durchquerung der Mukosa bindet *H. pylori* an die Epithelzellen des Magens, was vermutlich einen Schutz vor dessen Peristaltik und der Erneuerung der Mukosa darstellt. Darüber hinaus erlaubt es dem Bakterium einen leichteren Zugriff auf Nährstoffe (van Amsterdam und van der Ende, 2004) und eine bessere Translokation bakterieller Toxine in die Wirtszellen. Verantwortlich für die Bindung sind Adhäsine, eine Gruppe von Proteinen der äußeren Membran (Peck *et al.*, 1999). Das Adhäsin BabA vermittelt die Bindung an Lewis-b (Le^b) Blutgruppenantigene, die von menschlichen Magenepithelzellen exprimiert werden. Diese Bindung ist wichtig für eine erfolgreiche Kolonisierung und die Pathogenese von *H. pylori* (Rad *et al.*, 2002). Das Bakterium besitzt zwei Allele für babA: babA1 und babA2, wobei nur babA2 für ein vollständiges und funktionsfähiges Adhäsionsprotein kodiert. Ein ebenfalls vorhandenes babB-Gen kodiert für ein Protein mit bislang unbekannter Funktion (Pride und Blaser, 2002). Die durch eine *H. pylori* Infektion ausgelöste Gastritis fördert die Expression von Sialyl-Lewis^x-Antigenen auf der Oberfläche der entzündeten Mukosa. Das bakterielle Adhäsin SabA bindet an diese Glykoproteine und ermöglicht so vermutlich die Kolonisierung (Mahdavi *et al.*, 2002). *In vitro* ist *H. pylori* in der Lage an menschliche Granulozyten zu adhären, die ebenfalls diese Antigene auf ihrer Oberfläche

1 Einleitung

tragen. SabA ist vermutlich auch bei der Bindung von *H. pylori* an Laminin beteiligt, einem Protein der extrazellulären Matrix, was eine noch engere Assoziation des Bakteriums mit dem Epithel bewirken könnte (Kusters *et al.*, 2006). AlpA und AlpB sind zwei weitere Adhäsine, deren Bedeutung bei der Besiedelung des Magens im Meerschweinchen-Modell gezeigt werden konnte (de Jonge *et al.*, 2004). Möglicherweise spielt AlpA in frühen Phasen der Infektion eine wichtige Rolle, so ist hier auch die Transkriptionsrate des *alpA* Gens erhöht (Robki *et al.* 2001). Das 34 kDa große Protein OipA wurde ursprünglich als ein die Immunantwort stimulierendes Protein beschrieben, zählt aber vermutlich auch zu den Adhäsinen von *H. pylori* (Yamaoka *et al.*, 2000). Der Virulenzfaktor NapA wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und bewirkt ihre Anheftung an Endothelzellen (Evans *et al.*, 1995). Dies führt zu deren Aktivierung, sie gehen in Apoptose und es kommt zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (Obst *et al.*, 2000). Vermutlich ist NapA auch mitverantwortlich für Entzündungsreaktionen und ist an der Speicherung von Eisen beteiligt. Im Gegensatz zu vielen anderen Gram-negativen Bakterien ist das Lipopolysaccharid (LPS) von *H. pylori* nur ein schwacher Aktivator der angeborenen Immunantwort (Bliss *et al.*, 1998), es wird vom Immunsystem auf Grund seiner Ähnlichkeit mit körpereigenen Lewis-Antigenen nur schlecht erkannt. Jedoch zeigen *H. pylori*-Stämme ohne O-Antigen in ihrem LPS eine schlechtere Kolonisation im Mausmodell (Logan *et al.*, 2000).

Obwohl eine Infektion mit *H. pylori* fast immer in einer chronischen Gastritis resultiert, gibt es bei den meisten Patienten keine weiteren Komplikationen und sie bleiben meist sogar frei von klinischen Symptomen. Ein Hauptgrund hierfür ist die unterschiedliche Virulenz verschiedener *H. pylori*-Stämme. Eine erhöhte Pathogenität dieser Stämme korreliert mit ihrer Fähigkeit, bei *in vitro*-kultivierten Zellen morphologische Veränderungen und Vakuolisierungen hervorzurufen. Mitverantwortlich hierfür ist das 120-145 kDa große Protein CagA, welches eine variable C-terminale Region besitzt und vom *cagA* (cytotoxin-associated gen A) Gen kodiert wird. Dieses Gen ist in etwa 50-70 % aller *H. pylori*-Stämme vorhanden und wird innerhalb der genomischen Pathogenitätsinsel (*cag* PAI) kodiert. Diese hat eine Größe von ca. 40 kB und kodiert, abhängig vom jeweils untersuchten Stamm, zwischen 27 und 31 Gene. Stämme, die die *cag* PAI besitzen, werden als Cag⁺-

1 Einleitung

Stamm bezeichnet. Patienten, die mit einem Cag⁺-Stamm infiziert sind, zeigen zumeist eine stärkere Entzündungsreaktion und sind deutlich gefährdeter für die Entwicklung eines Ulkus oder Magenkrebses in westlichen Populationen, nicht jedoch in asiatischen Populationen (Kusters *et al.*, 2006). Von den Genen der *cag* PAI kodieren 18 für ein bakterielles Typ-4-Sekretionssystem (T4SS), eine Art molekulare Spritze, mit deren Hilfe die Translokation von CagA, Peptidoglykan und möglicherweise weiterer bakterieller Faktoren in die Wirtszellen ermöglicht wird. Die Anheftung von Cag⁺-Stämmen resultiert in Veränderungen des Zytoskeletts und in einer erhöhten Zellmotilität in kultivierten Zellen. Nach der Translokation wird CagA am sogenannten EPIYA-Motiv (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) von Mitgliedern der Src-Familie von Tyrosin-Kinasen phosphoryliert (Hatakeyama, 2004) und beeinflusst die Signalkaskaden der Wirtszellen (Crabtree und Naumann, 2006).

Etwa 50 % aller *H. pylori*-Stämme sekretieren eine aktive Form des 95 kDA großen Proteins VacA, welches starke Vakuolisierungen in Epithelzellen *in vitro* (Cover und Blaser, 1992), nicht jedoch *in vivo* verursacht und das eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Ulkuserkrankungen und Magenkrebs hat, unter anderem durch den Verlust von Parietalzellen, was in einer reduzierten Säuresekretion resultiert (Neu *et al.*, 2002). Obwohl alle *H. pylori*-Stämme ein *vacA* Gen besitzen, gibt es starke Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den Stämmen. Grund hierfür ist die Heterogenität des *vacA* Gens, welches für eine Signalregion (s) und eine Mittelregion (m) kodiert. Es sind vier verschiedene Signalregionen (s1a, s1b, s1c, s2) und zwei verschiedene Mittelregionen (m1, m2) bekannt, deren verschiedene Kombinationen unterschiedlich starke Vakuolisierungen zeigen, wobei die Kombination s1/m1 am stärksten ist und die Kombination s2/m2 keinerlei Aktivität zeigt (van Amsterdam *et al.*, 2006).

1.2 Der Wnt/ β -Catenin Signalweg

Die Wnt-Liganden bilden eine große Familie von sekretierten, Lipid-modifizierten Wachstumsfaktoren, die bei der Regulation einer Vielzahl von Prozessen bei allen Metazoen sowohl in der frühen Ontogenese, insbesondere der Gastrulation, als auch im erwachsenen Organismus eine wichtige Rolle spielen. So können sie etwa so unterschiedliche Vorgänge wie Proliferation, Migration, Differenzierung, Polarität oder

1 Einleitung

Apoptose von Zellen steuern und haben eine wichtige Funktion bei der Regulation von Stammzell-Differenzierung. Man unterteilt die Wnt Liganden in zwei Klassen:

Die Wnt-5a Klasse: zu ihr gehören weiterhin die Wnts 4, 5, 7, und 11. Liganden dieser Klasse werden mit β -Catenin-unabhängigen Signalwegen assoziiert, vor allem mit Migrationsbewegungen des einwandernden Mesoderm während der Gastrulation, die auch als konvergente Extension bezeichnet werden.

Die Wnt-8 Klasse: zu ihr gehören weiterhin die Wnts 1, 3, 3a und 8. Liganden dieser Klasse sind in der Lage, epitheliale C57MG Brustdrüsenzellen der Maus in Tumorzellen zu transformieren oder in *Xenopus*-Embryonen eine sekundäre Achse zu induzieren. Für beide Vorgänge ist β -Catenin maßgeblich.

Die restlichen Wnts konnten bisher nicht eindeutig einer der beiden Klassen zugeordnet werden.

Beim sogenannten kanonischen Wnt-Signalweg führt die Bindung eines Wnt-Liganden an einen Rezeptor der Frizzeld Familie und an einen Ko-Rezeptor, LRP5 oder LRP6, zu einer intrazellulären Stabilisierung von β -Catenin und Kontext-abhängiger Gentranskription. Bis heute sind im menschlichen Genom 19 verschiedene Wnts und zehn verschiedene Frizzled Rezeptoren identifiziert worden (Miller, 2001).

β -Catenin ist das zentrale Protein dieses Signalweges, welches in der Zelle eine duale Rolle einnimmt. Zum einen ist es entscheidend beim Aufbau und dem Erhalt von Adhärenzverbindungen, indem es Cadherine über α -Catenin und dem Protein Vinculin sowie weitere Zytoskelett-assoziierte Proteine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbindet und so Zell-Zell-Adhäsion vermittelt. Auf der anderen Seite bildet β -Catenin Heterodimere zusammen mit Mitgliedern der Lef/Tcf-Familie von Transkriptionsfaktoren und steuert so eine Vielzahl von unterschiedlichsten Zielgenen, wie etwa Cadherine (Hadeball *et al.*, 1998), Zyklin D1, c-Myc (Polakis, 2000), oder MMPs (Schambony *et al.*, 2004). Daher führen auch Mutationen von Komponenten des Signalwegs, die zu dessen konstitutiver Aktivierung führen, sehr häufig zur Entwicklung oder Metastasierung von Tumoren (Logan und Nusse, 2004).

1 Einleitung

Die Regulation von β -Catenin ist hochkomplex. Die Menge an freiem β -Catenin im Zytoplasma wird in Abwesenheit von Wnt-Liganden durch einen sogenannten Degradationskomplex reguliert. Dieser besteht hauptsächlich aus den beiden Proteinen Axin und APC (adenomatous polyposis coli) sowie den beiden Serin/Threonin-Kinasen GSK3 β und CK1 α . Axin und APC bilden hierbei eine Art Plattform für β -Catenin und die beiden Kinasen, welche die Effektivität für die Phosphorylierung von β -Catenin signifikant erhöht (Dajani *et al.*, 2001). CK1 α phosphoryliert β -Catenin am Serinrest 45 und GSK3 β phosphoryliert die Serinreste 33 und 37, sowie den Threoninrest 41. Diese Phosphorylierungen führen zu einer Polyubiquitinylierung von β -Catenin durch die E3 Ligase SKP1-Cullin1-F-Box (SFC ^{β TrCP}) und zur anschließenden Degradation im 26S Proteasom (Kimelman und Wu, 2006). Die Anwesenheit von kanonischen Wnt Liganden führt zu einer komplexen Sequenz von Ereignissen, in deren Verlauf die Aktivität des Degradationskomplexes gestört wird, wodurch β -Catenin im Zytoplasma akkumuliert, in den Zellkern transloziert und dort Genexpression initiiert. Die Bindung von Wnt-Liganden sowohl an Frizzled-Rezeptoren als auch an LRP5/6 Ko-Rezeptoren führt als erstes Ereignis innerhalb der ablaufenden Signalkaskade zur Formierung eines ternären Frizzled-Wnt-LRP-Komplexes (Tamai *et al.*, 2000). Im weiteren Verlauf erfolgt eine Translokation von Axin und GSK3 β zur Plasmamembran, welche durch die zytoplasmatischen Phosphoproteine der Dishevelled (Dvl) -Familie vermittelt wird. Diese können sowohl mit ihrer DIX-Domäne an Axin, als auch mit ihrer PDZ-Domäne an den Frizzled-Rezeptor binden (Wallingford und Habas, 2005). An der Plasmamembran phosphorylieren nun die membrangebundene Kinase CK1 γ sowie GSK3 β C-terminale Aminosäurereste von LRP5 bzw. LRP6. Diese phosphorylierten Aminosäurereste wiederum bilden eine Bindestelle mit sehr hoher Affinität für Axin, welches nun nicht mehr für die Bildung des zytoplasmatischen Degradationskomplexes zur Verfügung steht, wodurch β -Catenin aktiviert wird. GSK3 β hat somit neben seiner starken negativen Rolle auch eine positive Rolle innerhalb der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade (Angers und Moon, 2009).

1 Einleitung

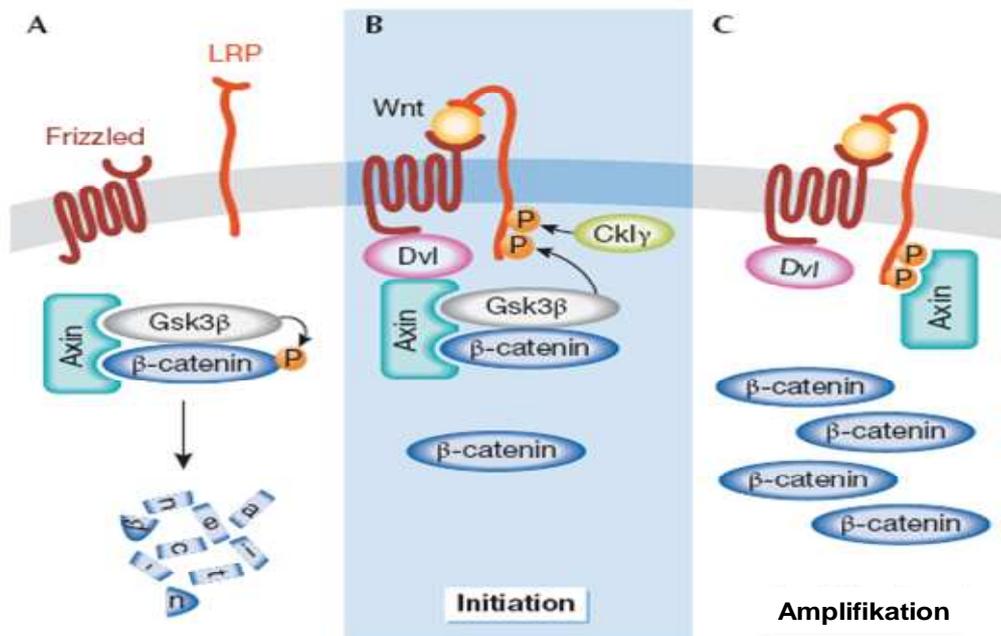


Abb. 1.2 Modell der Aktivierung des Wnt/β-Catenin Signalweges. **A** In Abwesenheit eines Wnt Liganden wird β-Catenin durch den Degradationskomplex aus Axin, GSK3β und weiteren Proteinen phosphoryliert und somit für den Abbau im 26S Proteasom markiert. **B** Nach der Bindung eines Wnt Liganden an den Frizzled Rezeptor und den LRP5/6 Ko-Rezeptor bindet Dishevelled an Frizzled und rekrutiert durch eine Interaktion mit Axin den Degradationskomplex an die Membran. Anschließend phosphoryliert GSK3β, ebenso wie CK1γ, Serin/Threoninreste im C-Terminus von LRP5/6. Diese bilden Bindestellen für Axin. **C** Die Bindung von Axin an LRP5/6 inhibiert den Degradationskomplex wodurch β-Catenin akkumuliert und Genexpression initiiert (in Anlehnung an Fuerer *et al.*, 2008).

Neben dem kanonischen Wnt/β-Catenin Signalweg gibt es noch mindestens zwei weitere durch Wnt-Liganden gesteuerte, aber β-Catenin-unabhängige Signalkaskaden. Zum einen existiert der sogenannte Wnt/PCP Signalweg, der wichtige Rollen bei Zell- und Gewebemigrationen während der Gastrulation, für die Polarität der Zellen des Innenohres, bei Gewebeseparationen oder auch bei der Entwicklung von Krebs besitzt. Generell reguliert der Signalweg eine Polarität höherer Ordnung innerhalb ganzer Gewebe. Diese Gewebepolarität, auch planare Zellpolarität (planar cell polarity, PCP) genannt, zeigt sich in der Polarisierung innerhalb einer Ebene der beteiligten Zellen, in senkrechter Richtung zu ihren apikal-basalen Achsen (Fanto und McNeill, 2004). Auch bei diesem Signalweg spielt das Dishevelled-Protein eine maßgebliche Rolle. Nachdem es durch die beiden Adapterproteine Strabismus und Prickle an die Membran gebunden wurde, aktiviert es anschließend die beiden kleinen GTPasen Rac1 und RhoA. Diese Aktivierung erfolgt unabhängig voneinander über verschiedene Domänen von Dishevelled. Rac1 vermittelt im Anschluss die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), RhoA

1 Einleitung

von ROCK1 (Rho-associated protein kinase) und diese Remodellieren das Aktin-Zytoskelett.

Der dritte und am wenigsten gut verstandene Wnt-abhängige Signalweg ist der sogenannte Wnt/Ca²⁺ Signalweg. Nach Bindung eines Liganden kommt es hier über G-Protein-gesteuerte Mechanismen und wiederum unter Beteiligung von Dishevelled zuerst zu einer Aktivierung der Phospholipase C β und als unmittelbare Konsequenz zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels. Die aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzten Kalziumionen aktivieren sowohl die Proteinkinase C als auch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CamK II), sowie den nuclear factor of activated T cells (NFAT). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Zweig der Wnt-Signalwege in der Lage ist, die Aktivierung von β -Catenin zu inhibieren (Kohn und Moon, 2005).

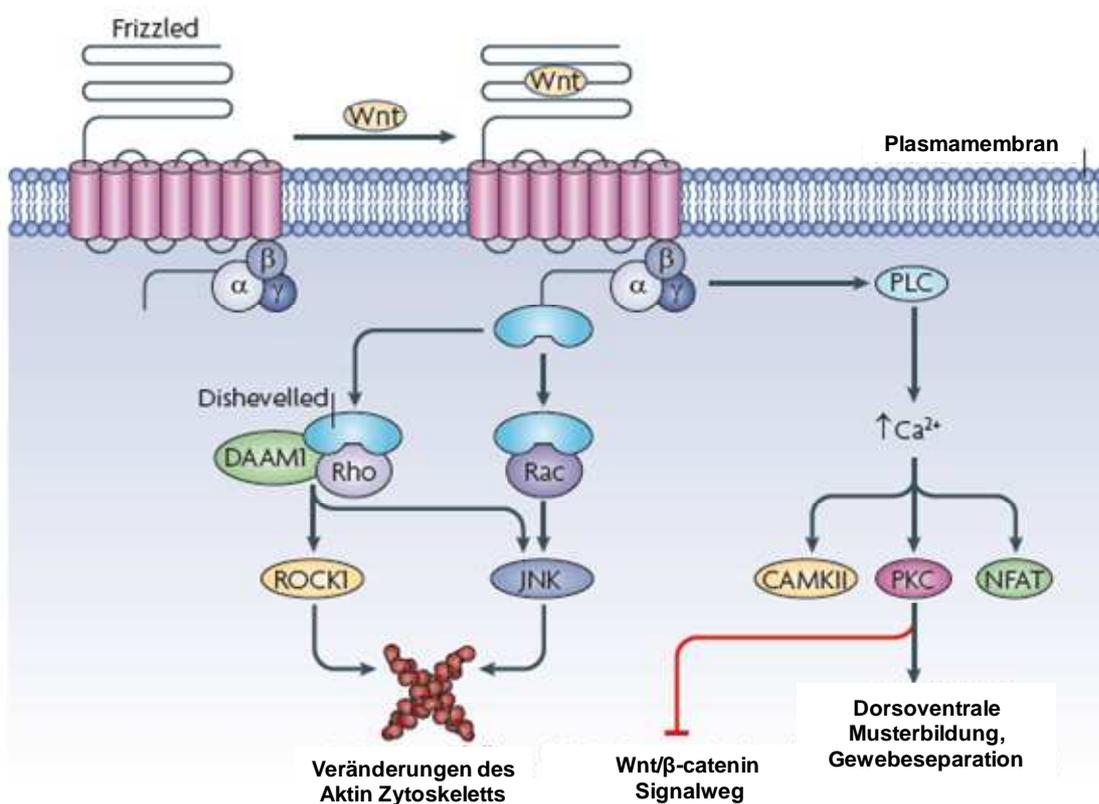


Abb. 1.3 β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege. Nach der Bindung von Wnt-Liganden an den Frizzled Rezeptor wird die folgende Signalkaskade durch heterotrimere G-Proteine und/oder Dishevelled-Proteine initiiert. Ein Zweig der nicht-kanonischen Signalwege, der Wnt/PCP Signalweg, führt zur Aktivierung der kleinen GTPasen RhoA und Rac1 und schließlich über ROCK1 bzw. JNK zur Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts. Der andere Zweig ist definiert über eine Phospholipase C-vermittelte Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels. Dies führt zu einer Aktivierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase, der Proteinkinase C und NFAT, wodurch dorsoventrale Musterbildung, Gewebeseparation und Inhibition des kanonischen Wnt Signalweges reguliert werden (in Anlehnung an Angers und Moon, 2009).

1 Einleitung

Wie genau einzelne Wnt-Liganden selektiv die jeweiligen Signalwege aktivieren, ist bisher nicht bekannt. Vermutlich sind sowohl der zelluläre Kontext als auch spezifische Wnt/Frizzled-Kombinationen entscheidend, jedoch gibt es hier schon 190 denkbare Kombinationen (van Amerongen *et al.*, 2008). Die Komplexität wird wiederum erhöht durch die Beteiligung weiterer Faktoren wie Ko-Rezeptoren oder auch Heparansulfatproteoglykane. Diese können an bestimmte Wnt-Liganden binden und deren Effektivität bei der Aktivierung der Signalkaskade erhöhen (Kikuchi *et al.*, 2009). Neueste Arbeiten konnten auch zeigen, dass bestimmte Wnt Liganden wie etwa Wnt5a, mehr als einen der genannten Signalwege aktivieren können (McDonald und Silver, 2009). Das Signal der Wnt-Liganden leiten die Dishevelled-Proteine mit Hilfe verschiedener charakteristischer Proteindomänen weiter, wobei beispielsweise die DIX-Domäne für den kanonischen Wnt Signalweg, sowie die PDZ- und DEP-Domäne für den Wnt/PCP Signalweg entscheidend sind (Wallingford und Habas, 2005).

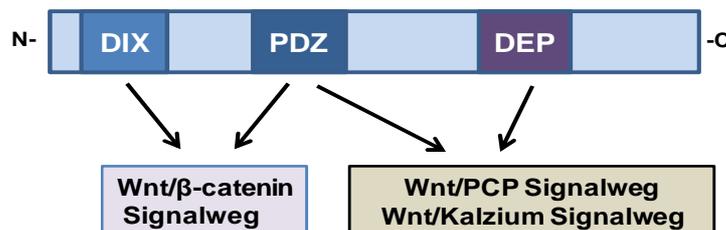


Abb. 1.4 Die konservierten Domänen der Dishevelled Proteine und ihre Beteiligung an den jeweiligen Wnt Signalwegen. Am N-Terminus von Dishevelled befindet sich die weitestgehend aus α -Helices bestehende DIX-Domäne. Sie ist essentiell für den kanonischen Wnt Signalweg. Im Zentrum des Proteins liegt eine PDZ-Domäne, die die Bindung an andere Proteine vermittelt und dadurch an der Aktivierung aller Wnt Signalwege beteiligt ist. Downstream der PDZ-Domäne liegt die aus drei α -Helices bestehende DEP-Domäne, welche essentiell für die Aktivierung des Wnt/PCP und des Wnt/Kalzium Signalweges ist.

Bis vor kurzem wurden die meisten bekannten Effekte von Wnt-Liganden einer Aktivierung von Frizzled-Rezeptoren zugeschrieben. Jedoch sind mittlerweile auch mehrere nicht-Frizzled-Rezeptoren für Wnts in verschiedenen Organismen von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) bis hin zum Menschen gefunden worden, die sowohl im positiven als auch im negativen Sinn die Aktivität der bekannten Wnt Signalwege regulieren und somit die von Wnt-Liganden kontrollierten biologischen Prozesse weiter modulieren können. Ein Beispiel ist die bei Vertebraten exprimierte

1 Einleitung

Rezeptor-Tyrosinkinase ROR2. Ihre extrazelluläre Cystein-reiche Domäne ist in der Lage mit Wnt5a zu interagieren (Oishi *et al.*, 2003). Dies führt zu einer Inhibierung von β -Catenin-abhängiger Genexpression und zu einer mit dem Wnt/PCP Signalweg vergleichbaren Aktivierung von JNK (Schambony und Wedlich, 2007). Interessanterweise ist für diese Signaltransduktion keine Kinaseaktivität von ROR2 nötig. Die atypische Rezeptor-Tyrosinkinase RYK, Derailed in *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), kontrolliert nach der Bindung von Wnt-Liganden über einen Src-Kinasen-abhängigen Signalweg das zielgerichtete Wachstum von Axonen (Wouda *et al.*, 2008). Befindet sich der Rezeptor zusammen mit Frizzled-Rezeptoren und Dishevelled-Proteinen in einem Komplex, so reguliert er vermutlich auch β -Catenin-abhängige Signaltransduktion.

Neben nicht-Frizzled-Rezeptoren, die an Wnt-Liganden binden können, wurden auch zwei sekretierte Proteine beschrieben, die den kanonischen Wnt-Signalweg durch ihre Interaktion mit Frizzled-Rezeptoren und LRP-Ko-Rezeptoren aktivieren können.

Das Protein Norrin bindet mit hoher Affinität an Frizzled 4 und aktiviert in LRP5/6-abhängiger Weise β -Catenin. Mutationen in Norrin sind beschrieben in der Norrie-Krankheit, einer Entwicklungsstörung, bei der es zu anormalen Vaskularisierungen des Auges und zu Blindheit kommt (Xu *et al.*, 2004). Ein weiteres Beispiel ist das Protein R-Spondin. Es kann synergistisch die Aktivität von Wnt-Liganden erhöhen, somit β -Catenin stabilisieren und steigert die Proliferationsrate von intestinalen Kryptenzellen (Kim *et al.*, 2005).

Eine weitere Modulation aller drei Wnt-Signalwege erfolgt durch sekretierte Faktoren, wie etwa den Mitgliedern der SFRP-Familie. Diese ähneln sehr stark der Wnt-Bindedomäne der Frizzled-Rezeptoren. Ein weiteres Beispiel sind die Proteine der WIF-Familie. Sie ähneln der extrazellulären Domäne des zuvor beschriebenen Wnt-Rezeptors RYK. Die Mitglieder beider Familie gelten als extrazelluläre Inhibitoren, da sie potentiell die Wnt Liganden von ihren Rezeptoren fernhalten. Jedoch wird auch eine aktivierende Rolle dieser Proteine diskutiert, so könnten sie beispielsweise Wnt Liganden vor Degradation schützen oder deren Transport erleichtern. Am besten charakterisiert von den sekretierten Wnt-Inhibitoren ist das Protein Dickkopf (Dkk). In Invertebraten konnten keine Dkk-Proteine gefunden werden, jedoch besitzen sowohl

die Maus als auch der Mensch mehrere Vertreter. Dkk bindet mit hoher Affinität an LRP5/6 Ko-Rezeptoren und verhindert so, dass LRP5/6 und Frizzled zusammen mit Wnt-Liganden einen ternären Komplex bilden. Weiterhin sorgt die Bindung von Dkk an LRP5/6 zusammen mit dem Protein Kremen für eine erhöhte Internalisierung von LRP5/6, wodurch der Ko-Rezeptor nicht mehr für die Bindung von Liganden zur Verfügung steht (Logan und Nusse, 2004).

1.2.1 Die Rolle des Wnt/ β -Catenin Signalweges bei der Entstehung von Magenkrebs

In etwa 30 % aller Magenkrebs Erkrankungen wurde die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges beschrieben, zumeist auf Grund von Mutationen im N-terminalen Bereich von β -Catenin, die eine normale Degradation verhindern (Park *et al.*, 1999; Clements *et al.*, 2002). Den gleichen Effekt haben auch Mutationen im Tumorsuppressorgen APC, das ein wichtiges Gerüstprotein des Degradationskomplexes ist. Veränderungen dieses Proteins sind gut bekannt von Kolonkarzinomen, wo sie sehr häufig auftreten. Etwa bei 50 % des intestinalen Subtyps vom Magenkarzinom findet man missense-Mutationen von APC und rund 20 - 40 % somatische Mutationen des APC Gens in Adenomen des Magens (Smith *et al.*, 2006). Neben Mutationen konnte aber auch eine erhöhte Menge an β -Catenin mRNA in einer Vielzahl von Magenkarzinomen des intestinalen Typs gezeigt werden, unabhängig vom *H. pylori* Status (Ebert *et al.*, 2002). Weiterhin kommt es regelmäßig zu Veränderungen im E-Cadherin/ β -Catenin Zelladhäsionskomplex, verbunden mit verstärkter Lokalisation von β -Catenin im Zellkern (Nabais *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2005). Ursache hierfür können sowohl Mutationen im Gen für E-Cadherin, als auch Hypermethylierung der Promoterregion sein. Eine solche Methylierung findet man auch bei den Genen für SFRP1, -2 und -5 in Magenkrebszellen und somit eine nicht vorhandene Expression dieser Wnt-Liganden-Antagonisten (Nojima *et al.*, 2007). Ein weiterer beschriebener Mechanismus ist eine Mutation in der β -TrCP-Ubiquitin-Ligase, welche zu mangelnder Polyubiquitylierung von β -Catenin und damit zu dessen Akkumulation führt (Kim *et al.*, 2007). Eine konstitutive Expression des kanonischen Liganden Wnt1 führt zu einer erhöhten Anzahl an undifferenzierten Magenepithelzellen bei der Maus. Es kommt zur Ausbildung von kleinen neoplastischen Läsionen, jedoch nicht zu einer Entwicklung von Tumoren. Erst

zusammen mit einer Aktivierung des Cox-2/PGE₂-Signalweges können erhöhte Mengen von Wnt-Liganden zu einer Krebsentstehung führen. Nach einer Infektion mit *H. pylori* steigt die Expression von Cox-2 schnell und stark an (Sung *et al.*, 2000). Das Enzym reguliert hierbei auch eine Reihe von Genen, die an der Modulation der Immunreaktion und der Reparatur und Integrität von Gewebe beteiligt sind (Walduck *et al.*, 2009). Im Mausmodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Cox-2-Signalweges zusammen mit einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, etwa durch die Mukosa infiltrierende Makrophagen (Oguma *et al.*, 2008), entscheidend für die Entstehung von Adenokarzinomen des Magens ist, nicht hingegen eine Aktivierung von β -Catenin alleine (Oshima *et al.*, 2009).

1.2.2 Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges durch *H. pylori*

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zu einer verstärkten Expression von Wnt 10A (Kirikoshi *et al.*, 2001), Wnt 10B (Saito *et al.*, 2001) und darüber hinaus zu einer Aktivierung von bekannten β -Catenin-Zielgenen, wie etwa Zyklin D1 (Udhayarkumar *et al.*, 2007) oder MMP-7 (Bebb *et al.*, 2003). Beide Tatsachen legen die Schlussfolgerung nahe, dass *H. pylori* die Aktivierung des β -Catenin-Signalweges induzieren kann und dieser anschließend an der Entwicklung von Magenkrebskrankungen des Menschen beteiligt ist. Einen ersten Einblick in den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus der *H. pylori*-induzierten Stabilisierung von β -Catenin gab eine Arbeit, die in primären epithelialen Madin-Darby-Canin-Kidney-Zellen (MDCK-Zellen) eine T4SS-unabhängige Aktivierung der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR)/PI3-Kinase/Akt-Kinase-Signalkaskade nach *H. pylori* Infektion zeigen konnte. Die Akt-Kinase phosphoryliert anschließend GSK3 β an Position Serin-9 und inhibiert diese somit. Dies resultiert in einer verminderten Serin/Threonin-Phosphorylierung von β -Catenin im Zytoplasma (Sokolova *et al.*, 2008). Weiterhin konnten Tabassam *et al.* 2009 eine EGFR-Phosphorylierung und eine anschließende Aktivierung der Akt Kinase nach *H. pylori*-Infektion der Magentumorzelllinien AGS, MKN 28 und MKN 45 zeigen. Diese war abhängig von cag PAI und dem Protein der äußeren Membran, OipA. Weitere Studien, in denen ebenfalls Tumorzellen verwendet wurden, zeigten eine PI3-Kinase-vermittelte Akt-Aktivierung in Abhängigkeit von CagA (Suzuki *et al.*, 2009), bzw. VacA (Nakayama *et al.*, 2008). Neben dem kanonischen Wnt-Signalwege können

1 Einleitung

noch eine Reihe weiterer Signalwege β -Catenin regulieren. Der Rezeptor für den Hepatozyten Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor, HGF), c-Met, ist in der Lage an E-Cadherin gebundenes β -Catenin an Tyrosin-142 zu phosphorylieren, wodurch dieses sich von E-Cadherin löst und anschließend als Transkriptionsfaktor Genexpression initiiert (Brembeck *et al.*, 2004). Fyn ist eine weitere Tyrosinkinase, die β -Catenin an Aminosäure Tyr-142 phosphorylieren kann (Piedra *et al.*, 2003) und es konnte gezeigt werden, dass beide Kinasen nach einer *H. pylori*-Infektion aktiviert werden (Churin *et al.*, 2003; Crabtree und Naumann, 2006).

Die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin wird nach einer *H. pylori*-Infektion in CagA-unabhängiger Weise abgespalten (Weydig *et al.*, 2008; Schirromeister *et al.*, 2009), was in einem Verlust von Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion resultiert und somit einen weiteren Mechanismus zur Freisetzung von β -Catenin darstellen könnte.

2. Zielsetzung der Arbeit

Helicobacter pylori besiedelt den menschlichen Magen und ist mitverantwortlich für die Entstehung von chronischer Gastritis, Magengeschwüren und in selteneren Fällen von Adenokarzinomen des Magens und sogenannten MALT-Lymphomen. Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist beteiligt an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, wie Differenzierung, Proliferation oder Migration und seine unkontrollierte Aktivierung ist in der Entstehung vieler Krebserkrankungen des Menschen involviert.

Die Infektion von Epithelzellen mit *H. pylori* führt zur Akkumulation und Aktivierung von β -Catenin. Über eine Beteiligung von Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges an dieser Aktivierung war zu Beginn der Arbeit nichts bekannt.

Der Fokus meiner Arbeit lag daher auf folgenden Schwerpunkten:

1. Untersuchung der Aktivierung von β -Catenin nach Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori*
2. Untersuchung der Rolle von proximalen Komponenten der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade bei der *H. pylori*-vermittelten Aktivierung von β -Catenin

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt wurden alle Chemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von folgenden Herstellern bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Sigma-Aldrich Chemie Laborchemikalien GmbH, Seelze
- Merck KGaA, Darmstadt
- AppliChem GmbH, Darmstadt

3.1.2 Gebrauchsmaterialien

Alle Gebrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

- Zellkulturflaschen, 6-well Platten und 10 cm Schalen: Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
- 6 cm Schalen, 96-well Platten und sterile Einmalpipetten: TPP, Trasadingen, Schweiz
- Pipettenspitzen: Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Pipettenspitzen: Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettenspitzen: Gilson Inc., Middleton, USA
- Reaktionsgefäße: Eppendorf AG, Hamburg

3.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterien Brutschrank ThermiconT	Heraeus, Hanau
Eismaschine AF 200	Scotsman, Mailand, Italien
Entwicklermaschine für Röntgenfilme Optimax	Protec, Oberstenfeld
Flachbettscanner PowerLook III	Umax, Willich
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen

Gefrierschrank Jouan -80°C	Thermo Scientific, Karlsruhe
Heizblock Techne Dri-Block DB-3	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
ICycler Real-Time PCR Maschine	Bio-Rad Laboratories, München
Imaging System Versa Doc	Bio-Rad Laboratories, München
Kühlschrank Revco 4°C	Thermo Scientific, Karlsruhe
Kühlzentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Milli-Q Anlage Synthesis A10	Millipore, Schwalbach
Mini Protean3 Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories, München
Mini Transblot Elektrophorese Transfersystem	Bio-Rad Laboratories, München
pH-Meter MP 230	Mettler Toledo, Giessen
Photometer Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare, München
Schüttelinkubator Multitron II	Infors, Bottmingen, Schweiz
Schüttler Rocker 25	Lapnet, Oakham, UK
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank Sterilgard	Baker Company, Sanford, USA
Stickstofftank Arpege 170	Air Liquide, Düsseldorf
Stromgerät Consort E861	Biocom Direct, Bridge of Weir, UK
Stromgerät Powerpack 200	Bio-Rad Laboratories, München
Thermalprinter DPU-414	Seiko Instruments, Neu-Isenburg
Thermoshaker	Schuttron, Wolf Labs. Lim., York, UK
Vortexer Mono-Mixer	Sarstedt, Nümbrecht
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkultur CO ₂ Brutschränke HeraCell	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 2.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Avanti J-E	Beckman-Coulter, Krefeld

3.1.4 Verwendete Kits

Proteo Extract Kit	Merck, Darmstadt
Revert Aid cDNA Synthese Kit	Fermentas, St. Leon-Roth
Qiagen Plasmid Midi Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SensiMix dT- Kit	Bioline, Luckenwalde
Jetstar 2.0 Plasmid Purification Kit	Genomed, Löhne
Protein Assay	Bio-Rad, München
DualGlow Reporter Assay System	Promega, Mannheim

3.1.5 Antibiotika

- Ampicillin, Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Vancomycin, ICN Biomedicals, Aurora, USA
- Penicillin/Streptomycin, PAA, Pasching, Österreich
- Puromycin, Merck, Darmstadt
- Zeocin, Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6 Antikörper

Folgende Antikörper wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Anweisung des Herstellers verwendet.

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
α -Axin	Santa Cruz, Heidelberg
α -Axin2	Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main
α - β -Catenin	BD Bioscience, Heidelberg
α -Dvl2	Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main
α -Dvl3	Santa Cruz, Heidelberg
α -GAPDH	Chemicon (Milipore), Schwalbach
α -GSK3 β	BD Bioscience, Heidelberg
α -pGSK3 β (Ser 9)	Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main
α -HDAC1	Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main

3 Material und Methoden

α -LRP6	Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main
α -pLRP6 (Ser 1490)	Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main
α -c-Myc	Santa Cruz, Heidelberg
α -TfR1	Santa Cruz, Heidelberg

sekundäre Antikörper

Pferd- α -Maus-HRP
Ziege- α -Kaninchen-HRP

Hersteller

Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main
Cell Signaling (NEB), Frankfurt Main

3.1.7 Enzyme und Proteine

- Accutase, PAA, Pasching, Österreich
- Fötale Kälberserum, PAA, Pasching, Österreich
- Trypsin, GIPCO (Invitrogen), Karlsruhe
- Rekombinantes Wnt3A, R & D Systems, Wiesbaden

3.1.8 Protein- und DNA-Marker

- Pre-stained Proteinmarker, Fermentas, St. Leon-Roth
- Pre-stained Proteinmarker Plus, Fermentas, St. Leon-Roth
- Gene Ruler 100bp DNA Marker, Fermentas, St. Leon-Roth

3.1.9 Puffer und Lösungen

- Acrylamid/Bisacrylamidlösung (29:1), AppliChem GmbH, Darmstadt
- Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O
- Ammoniumpersulfat: 10 % (w/v) in H₂O
- IP-Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Tween 20, 5 % (v/v) Glycerin
- BHI-Medium: 38 g Bacto BHI (BD, Maryland, USA) auf 1 l H₂O

3 Material und Methoden

- RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mM EDTA, 10 mM K₂HPO₄, 0,5 % (v/v) NP-40, 0,5 % (v/v) DOC, 20 mM NaF, 20 mM β-Glyzerophosphat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM Na₂MoO₄, 1 mM Na₃VO₄, 0,1 mM AEBSF, 1x Proteaseinhibitorcocktail
- Stripping-Puffer: 61,8 mM Tris pH 8,8, 2 % SDS, 0,9 % (v/v) β-Mercaptoethanol
- SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
- SDS-Probenpuffer (5x): 125mM Tris pH 6,8, 10 % SDS (w/v), 50 % Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; nach dem Verdünnen Zugabe von 10 % β-Mercaptoethanol
- SOB-Medium: 2 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 0,25 % (w/v) MgCl₂ x 6 H₂O, pH 7,0 mit 10 N NaOH, autoklavieren
- SOC-Medium: nach dem Autoklavieren werden zu SOB-Medium 20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄ und 20 mM Glukose zugegeben
- TBS: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl
- TBST: 1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20
- Transferpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol

3.1.10 DNA-Oligonukleotide

Zur Durchführung der quantitativen PCR wurden folgende Primer verwendet:

- Axin2 fwd: 5'-cat gag tag cgc tat gtt gg-3'
- Axin2 rev: 5'-ggg aag cac cgt ctt gat cg-3'
- c-Myc fwd: 5'-tac cct ctc aac gac agc agc tcg ccc aac tcc t-3'
- c-Myc rev: 5'-tct tga cat tct cct cgg tgt ccg agg acc t-3'
- GAPDH fwd: 5'-tcc aaa atc aag tgg ggc gat gct-3'

- GAPDH rev: 5'-acc acc tgg tgc tca gtg tga ccc-3'

3.1.11 DNA-Konstrukte

Für die Lef/Tcf-Reporterassays wurden folgende DNA-Konstrukte transfiziert:

- pRL-CMV (Promega, Mannheim)
- Super8x Topflash (Randall Moon, Universität Washington, Seattle, USA)
- Super8x Fopflash (Randall Moon, Universität Washington, Seattle, USA)

3.1.12 Lentivirale Konstrukte

Die Konstrukte für den Lentiviral-vermittelten *knockdown* von Dvl2, Dvl3 und LRP6 wurden ebenso wie das entsprechende Kontroll-Konstrukt von Open Biosystem (Thermo Scientific, Karlsruhe) gekauft. Der pGIPZ-Vektor, der die shRNAmir Sequenzen beinhaltet, kodiert zur Selektion eine Puromycin Resistenz und zur Überprüfung der Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz für ein GFP.

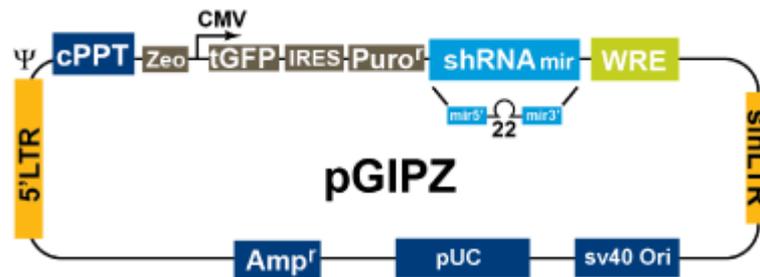


Abb. 3.1: Darstellung des lentiviralen pGIPZ-Vektors.

Nachfolgend sind die Sequenzen der prozessierten shRNAmir angegeben.

- Dvl2 fwd: 5'-cat tac atc tgg atc gtc t-3'
- Dvl2 rev: 5'-aga cga tcc aga tgt aat a-3'
- Dvl3 fwd: 5'-gcc aag cta cca tgc ttc a-3'
- Dvl3 rev: 5'-tga agc atg gta gct tgg c-3'
- LRP6 fwd: 5'-gaa ttt att gga ctg ata t-3'

3 Material und Methoden

- LRP6 *rev.*: 5'-ata tca gtc caa taa att c-3'
- Mock *fwd.*: 5'-agt gct gtt gac agt gag c-3'
- Mock *rev.*: 5'-aag tag tga agc cac aga t-3'

3.1.13 Nährmedien und Agarplatten zur Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *H. pylori* erfolgte auf GC-Agarplatten.

GC-Agar:

- 36 g/l GC-Agar (Acumedia, Lansing, USA)
- 7,5 g/l Bacto Protease Peptone (BD, Maryland, USA)
- 10 % v/v Pferdeserum (PAA, Pasching, Österreich)
- 1 % v/v Vitaminmix (0,5 M Dextrose, 69 mM L-Glutamin, 165 mM L-Cystein, 2,2 µM Cocarboxylase, 50 µM Fe(III)-Nitrat, 8,9 µM Thiamin-Chlorid, 95 µM p-Aminobenzoesäure, 380 µM Nikotinamidadenindinukleotid, 7,4 µM Vitamin B12, 4,6 mM L-Cystin, 7,4 mM Adenin, 160 mM Guanin-Chlorid, 0,7 mM L-Arginin, 4,5 mM Uracil, 5 mg/l Trimethoprim, 1 mg/l Nystatin

Nach dem Autoklavieren wurde 10 µg/ml Vancomycin und je nach Bakterienstamm zusätzlich 6 µg/ml Chloramphenicol hinzugefügt.

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf selektiven LB-Agarplatten bzw. LB-Medium.

- LB-Medium: 1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, mit *A. dest.* auf 1 l, pH 7,5 mit 10 N NaOH, autoklavieren
- *Low salt* LB-Medium: 1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,25 % (w/v) NaCl, mit *A. dest.* auf 1 l, pH 7,5 mit 10 N NaOH, autoklavieren
- LB-Agarplatten: 1,5 % (w/v) Agar (Roth, Karlsruhe) in 1x LB-Medium

3.1.14 Computerprogramme und Datenbanken

Für die Analyse und Darstellung der experimentellen Daten wurden folgende Programme verwendet:

- Quantity One, Version 4.6.6, Bio-Rad, München
- Origin 5.0, Microcal Software, Northampton, USA
- Photoshop CS3, Adobe, San Jose, USA

Literaturrecherche wurde mit folgender Datenbank durchgeführt:

- Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

3.1.15 Bakterienstämme

Die *H. pylori* Infektionsexperimente wurden mit den folgenden Bakterienstämmen durchgeführt:

Stamm	Mutation	Resistenz	Referenz
P1 wt	wildtyp	-	Schmitt und Haas, 1994
P1 cagA	cagA	Chloramphenicol	Backert et al., 2000
P1 virB7	virB7	Chloramphenicol	Backert et al, 2000
P 14	vacA	Chloramphenicol	Schmitt und Haas, 1994

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet, der folgenden chromosomalen Genotyp besitzt:

fhuA2 Δ (argF-lacZ); U169 phoA; glnV44 Φ 80; Δ (lacZ)M15; gyrA96; recA1; relA1; endA1; thi-1; hsdR17

3.1.16 Zellkulturen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die folgende epitheliale Zelllinie verwendet:

Name	Abstammung/Herkunft	Quelle
NCI-N87	Magenkarzinom/Lebermetastase	ATCC CRL-5822

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterienkultur

3.2.1.1 Kultivierung von *H. pylori*

Die Kultivierung von *H. pylori* erfolgte auf GC-Agarplatten (siehe 3.1.12) in Anaerobiergefäßen (Oxoid, Hamshire, UK) bei 37° C für 48-72 h. Eine mikroaerophile Atmosphäre (5 % O₂, 10 % Co₂, 85 % N₂) wurde durch die Verwendung von Campygen (Oxoid, Hamshire, UK) geschaffen. Die Bakterien wurden aus Glycerolstocks mit Hilfe einer sterilen Impföse ausgestrichen. Diese Vorkultur wurde anschließend mit einem sterilen Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann und Rauscher, Rengsdorf) aufgenommen und in sterilem PBS resuspendiert. Anschließend wurden zwei verschiedene Volumina (20 µl, 40 µl) auf frische Agarplatten pipettiert und mit einem Drigalskispatel ausplattiert und für weitere 48 h für die Infektionsexperimente wie beschrieben kultiviert. Je nach verwendetem Bakterienstamm wurde den Agarplatten das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugegeben.

Zur Stammerhaltung wurden zwei dicht bewachsene Platten in BHI-Medium resuspendiert und nach Zugabe von 20 % (v/v) Glycerin bei -80°C weggefroren.

3.2.1.2 Transformation und Kultivierung von *Escherichia coli*

Das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterien, beispielsweise reiner Plasmid-DNA, kann mit Hilfe eines Hitzeschocks bewerkstelligt werden.

Hitzeschock-Transformation: 2-10 µl der einzubringenden Plasmid-DNA werden mit 40 µl kompetenten Bakterien vorsichtig gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock, der zu einer Aufnahme der fremden DNA führt,

bei exakt 42° C für 45-50 Sekunden. Eine darauffolgende Inkubation auf Eis für mindestens zwei Minuten erhöht die Effizienz der Transformation. Nach Zugabe von 950 ml SOC-Medium zum Ansatz wird dieser für 90 Minuten bei 37° C mit 225 rpm geschüttelt. Diese Vorkultur wird zu 30 ml LB-Medium gegeben und zusammen mit einem selektiven Antibiotikum für 12-16 h bei 37° C und 225 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgt eine Plasmidisolierung im Midimaßstab.

3.2.1.3 Infektion von NCI-N87 mit *H. pylori*

Für die Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* wurden pro 10 cm Petrischale 2 x 10⁶ Zellen in 6 ml RPMI-1640 Medium (PAA, Pasching, Österreich) supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 16 h in RPMI-1640 Medium ohne FCS und Antibiotika inkubiert. Nach dieser Serumverarmten Kultivierung wurden die Zellen dann bei einer Konfluenz von 70-90 % mit den jeweiligen *H. pylori*-Stämmen infiziert. Hierzu wurden die Bakterien (siehe 3.2.1.1) mit einem sterilen Wattestäbchen in PBS resuspendiert und die Konzentration photometrisch bei einer Optischen Dichte von 550 nm bestimmt. Die Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100 infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend für die jeweils angegebenen Zeiträume bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor dem Sammeln der Proben wurden die Zellen zweimal auf Eis mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers mit 600 µl eiskaltem RIPA-Puffer gesammelt und nach 10 Minuten Inkubation auf Eis mit einer Insulinspritze (0.45mm, 40.I.U., Omnifix) homogenisiert. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 Minuten bei 4° C und 13000 rpm zentrifugiert, anschließend die Überstände in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Herstellung verschiedener subzellulärer Fraktionen wurden die Zellen nacheinander mit den jeweiligen Puffern des ProteoExtract Kits nach Angaben des Herstellers bei 4° C inkubiert. Sollte aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert werden, wurden die Zellen nach dem Waschen auf Eis in je 500 µl eiskaltem PBS gesammelt und anschließend sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

3.2.2 Kultivierung von NCI-N87-Zellen

Die NCI-N87 Zelllinie wurde aus einer Lebermetastase eines Magenkarzinoms isoliert und wurde in der vorliegenden Arbeit für die Infektionsexperimente mit *H. pylori* verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in RPMI-1640 Medium supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin angezogen. Konfluente Zellen werden nach zweimaligem Waschen mit Kalzium- und Magnesium-freien 1 x PBS (PAA, Pasching, Österreich) mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach Zugabe von 10 ml RPMI-1640 Medium wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (1000 rpm für 5 Minuten), anschließend mit RPMI-1640 Medium resuspendiert, sorgfältig vereinzelt und in einer 1:3 Verdünnung in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. NCI-N87-Zellen mit einem stabilen *knockdown* für LRP6, Dvl2 oder Dvl3 wurden identisch behandelt, aber mit 10 µg/ml Puromycin ständig selektioniert. Für die Infektionsexperimente wurden die Zellen 48 h vor Beginn der Experimente in normales Vollmedium ohne Puromycin überführt. HEK 293T-Zellen zur Herstellung von Lentiviralen Partikeln wurden genau wie NCI-N87 kultiviert.

Für eine Langzeitlagerung wurden Aliquots der Zellen eingefroren bzw. bei Bedarf aufgetaut. Für das Einfrieren wurden etwa 4 Millionen Zellen wie beschrieben trypsiniert, pelletiert und anschließend in 1,5 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Einfriereröhrchen (Greiner Bio One, Frickenhausen) überführt. Die Zellen wurden zunächst für 24-48 h bei -80°C gelagert und danach in flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung aufbewahrt.

Gefrorene Zellen wurden schnell bei 37°C aufgetaut, mit RPMI-1640 Medium versetzt und zentrifugiert (1000 rpm für 5 Minuten). Das Zellpellet wurde wiederum in Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium nochmals gewechselt und anschließend die Zellen wie beschrieben weiterkultiviert.

3.2.3 Molekular- und Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Plasmidisolierung im Midimaßstab

Werden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt wird diese mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit aus einer 30 ml Übernachtskultur (12-16 Stunden) transformierter Bakterien isoliert. Die Durchführung erfolgt nach der Vorschrift des Herstellers.

Die Methode beruht auf einer alkalischen Lyse gefolgt von einer Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule unter niedrigen Salz- und pH-Bedingungen. Ein Waschschrift entfernt RNA, Proteine und andere Verunreinigungen, anschließend wird die DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert und mit Isopropanol präzipitiert.

3.2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen RNEasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers. In flüssigem N₂ gefrorene Zellpellets (siehe 3.1.2.3) wurden zuerst mit RLT-Puffer überschichtet und anschließend auf Eis sonifiziert. Der RLT-Puffer denaturiert und inaktiviert RNAsen. Nach Zugabe von Ethanol wird die Gesamt-RNA an eine Silica-Membran gebunden und Protein- und DNA-Kontaminationen mit zwei Waschschriften entfernt. Die Gesamt-RNA wird anschließend mit 50 µl DEPC-behandeltem Wasser von der Membran eluiert und bei -80°C weggefroren.

3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationen von DNA und RNA werden über eine Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Eine OD von 1,0 bei 260 nm entspricht hierbei einer Konzentration von 50 mg/ml. Weiterhin lässt sich über das Verhältnis der OD 260 und der OD 280 eine Aussage über die Reinheit der gemessenen Probe machen. Bei 280 nm absorbieren Proteine und Phenol, das Verhältnis sollte idealerweise bei 2,0 liegen. Hohe Absorptionen bei 230 nm sprechen hingegen für Kontaminationen beispielsweise mit Kohlenhydraten, Peptiden oder aromatischen Verbindungen. Das Verhältnis OD 260/OD 230 sollte daher möglichst größer als 2,0 sein.

3.2.3.4 Reverse-Transkriptase-PCR

Die reverse-Transkriptase-PCR wird unter anderem zur Detektion der Genexpression, zur Quantifizierung von mRNA oder als Ausgangspunkt für eine Real-Time-PCR durchgeführt. Für das Umschreiben der RNA in DNA wurde dabei das RevertAid cDNA Synthese Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Kit verwendet die M-MuLV Reverse Transkriptase, die eine sehr niedrige RNAse H-Aktivität besitzt. Als Primer zum Umschreiben der Gesamt-RNA wurden

random Hexamer-Primer verwendet, mit denen alle RNAs der Lösung umgeschrieben werden. Eingesetzt wurde je Probe 1 µg Gesamt-RNA. Die Reverse-Transkriptase-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Anlagerung der Primer:	25°C für 10 min
Verlängerung:	42°C für 60 min
Termination der Reaktion:	72°C für 10 min

Die erhaltene cDNA wurde nach Beendigung der PCR entweder bei -20° C weggefroren oder direkt für die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR verwendet.

3.2.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Untersuchung der mRNA-Expression von Axin2 und c-Myc nach Infektion von NCI-N87 mit *H. pylori* wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR verwendet. Amplifizierte PCR-Produkte werden hierbei durch die Messung von Fluoreszenz nachgewiesen. Die Messung erfolgt während den Zyklen der exponentiellen Phase eines Laufs, nur hier ist die Quantifizierung korrekt möglich. Der Anstieg an Fluoreszenz verhält sich proportional zum Anstieg der PCR-Produkte. Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde für die PCR der Sensi dT-Mix (Bioline, Luckenwalde) nach Angaben des Herstellers und ein iCycler (Bio-Rad, München) verwendet. Die eingesetzte cDNA wurde 1:3 verdünnt. Der Sensi dT-Mix enthält den Cyan-Farbstoff *SYBR Green 1*, der an doppelsträngige DNA bindet. Der resultierende Farbstoff-DNA-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Max}} = 494$ nm und emittiert Licht bei $\lambda_{\text{Max}} = 521$ nm. Nach abgelaufener PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Mit dieser kann die Fragmentlänge des PCR-Produktes kontrolliert und damit die Spezifität der Reaktion sichergestellt werden. Für die Quantifizierung der erhaltenen PCR-Produkte wurde GAPDH als Referenz-Gen herangezogen. Die unterschiedliche Expression der Zielgene in nicht-infizierten bzw. infizierten Proben wird als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes angegeben. Ct beschreibt hierbei den Zyklus der Reaktion, bei dem der Fluoreszenzwert erstmals signifikant über den Hintergrundwert ansteigt. Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Protokoll verwendet:

3 Material und Methoden

1x	10 min	95°C	Aktivierung der Polymerase
40x	10 s	95°C	
	30 s	56°C	PCR-Lauf
	30 s	72°C	
1x	2 min	72°C	
1x	30 s	50-95°C	Schmelzkurvenanalyse

3.2.3.6 Transfektion eukaryotischer Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der Transfektion unterscheidet man zwischen dem zeitweiligen Einbringen von DNA in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion).

Für die Transfektion von HEK 293T-Zellen zur Generierung von Lentiviralen Partikeln (siehe 3.2.3.7) wurden die Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. In einem Gemisch aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Kalziumphosphat. Diese ausgefallenen Kristalle werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

Für den Lef/Tcf-Reporterassay (siehe 3.2.3.8) wurden die Zellen mit ICAfectin 441 (Eurogentec, Köln) nach Vorgabe des Herstellers transfiziert. Das Reagenz bildet zusammen mit der DNA etwa 200 nm große Strukturen, die von der Zelle sehr gut aufgenommen werden. Vorteilhaft ist weiterhin, dass die Transfektion in Gegenwart von Serum möglich ist.

3.2.3.7 Dual-Luziferase-Reporterassay

Für den Lef/Tcf-Reporterassay wurden jeweils 10^4 NCI-N87-Zellen bzw. die jeweiligen *knockdown* Zellen pro *well* in eine 96-*well* Platte eingesät. 24 h später wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 70 % entweder mit dem 8 x SuperTopflash oder 8 x SuperFopflash sowie dem Renilla-Referenzplasmid transfiziert. Pro *well* wurde eine Gesamtmenge von 150 ng DNA in einem Verhältnis von Reporterplasmid zu Referenzplasmid von 9:1 transfiziert. Zwei Tage später

erfolgte die Infektion mit *H. pylori*. Die Zellen wurden nach Vorgabe des Herstellers gesammelt und anschließend die Luziferase-Aktivität mit dem DualGlow Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim) bestimmt. Zur Messung wurde das Lumat LB 9507 Photometer von Berthold mit folgendem Protokoll verwendet:

Volumen Injektion 1 [μ l]:	50
Volumen Injektion 2 [μ l]:	0
Nulleffekt-Messung:	nein
Verzög. n. letzter Injekt./Messung [s]:	2
Messzeit [s]:	20

Alle Proben wurden als Dreifach-Ansatz bearbeitet.

3.2.3.8 Herstellung von stabilen *knockdown* Zelllinien

Für die Herstellung von lentiviralen Viruspartikeln wurden zuerst HEK 293T-Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode mit 3 μ g pMD2.G, 5 μ g pMD1g/pRRE und 2.5 μ g pRSV-Rev (Diessenbacher *et al.*, 2008) zusammen mit je 1 μ g eines pGIPZ-Konstrukts für die shRNAmir Expression von Dvl2, Dvl3, LRP6 und einer Kontrollsequenz transfiziert. Die Überstände wurden 24 h nach der Transfektion geerntet, filtriert (45 μ m Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) und per Zentrifugation konzentriert (19500 x g, 2 h bei 12° C). Die konzentrierten Viruspartikel wurden anschließend zusammen mit 5 μ g/ml Polybren (Milipore, Schwalbach) zu NCI-N87-Zellen gegeben und diese mit Hilfe einer Zentrifugation infiziert. Polybren ist ein kationisches Polymer, das die Effizienz der viralen Transduktion der Zellen erhöht. Lentiviral-transduzierte Zellen wurden für eine Woche mit 10 μ g/ml Puromycin selektioniert. Die Anzahl shRNAmir-exprimierender Zellen wurde vor und nach der Selektion mit Hilfe einer FACS-Analyse bestimmt.

3.2.3.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Für die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde das Protein Assay-Reagenz von Bio-Rad (München) verwendet. Es folgt der Methode nach Bradford (Bradford, 1976), bei der der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in saurer Lösung mit positiv-geladenen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm

hin zu 595 nm und diese Zunahme bei 595 nm kann photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Konzentration der Proteinlösung. Zur Kalibrierung wird zusätzlich eine Standardkurve mit BSA verwendet. Zur Bestimmung der Konzentration der hier gesammelten Proben wurden je nach Anzahl verwendeter Zellen 1-4 µl Zellysate eingesetzt.

3.2.3.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) ermöglicht die Isolierung eines bestimmten Antigens und seiner Interaktionspartner mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus einer nativen Proteinlösung. Für die IP wurden die jeweiligen Proben mit RIPA-Puffer hergestellt. Je Probe wurden 500 µg Proteinlösung eingesetzt und mit je 1 µg spezifischen Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von jeweils 30 µl Protein-G-Sepharose, die zuvor dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen wurde. Die Ansätze wurden anschließend bei 4°C für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Protein-G-Sepharose zusammen mit den gebundenen Immunkomplexen zentrifugiert (500 x g bei 4°C für 2 min). Diese Immunpräzipitate wurden dreimal mit eiskaltem IP-Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine weitestgehend zu entfernen. Nach dem letzten Waschen wurde nochmals zentrifugiert und anschließend die Immunpräzipitate mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und mittels SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese analysiert.

3.2.3.11 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in einem elektrischen Feld hängt von der Nettoladung des Moleküls, einem spezifischen Reibungskoeffizienten und der angelegten elektrischen Feldstärke ab. Mit Hilfe der SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird eine Trennung eines Proteingemisches lediglich nach dem Molekulargewicht der beteiligten Proteine bewerkstelligt. Dies gelingt durch Verwendung von Natriumdodekylsulfat (*Sodium Dodecylsulfate*, SDS), einem anionischen Detergenz, welches sich an Aminosäurereste anlagert und dadurch die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt. Ebenso kommt es zum Verlust aller nichtkovalenten Bindungen innerhalb eines Proteins und damit weitestgehend zum Verlust von Sekundär- und Primärstrukturen. Zur Probenvorbereitung werden die Proteine für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht. Das im Ladepuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert hierbei

Disulfidbrücken der Proteine, wodurch diese endgültig in eine gestreckte Form überführt und eine Trennung nach der molekularen Masse ermöglicht wird. Als Gelmatrix verwendet man Polyakrylamid, welches chemisch inert ist und durch Kopolymerisation von Akrylamidmonomeren und vernetzendem Bisakrylamid hergestellt wird. Diese Polymerisation wird durch die beiden Katalysatoren TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und Ammoniumpersulfat ausgelöst. Zur Auftrennung überschichtet ein weitporiges Sammelgel (pH 6,8/5 % Akrylamid) ein engmaschiges Trenngel (pH 8,8/7,5-15 % Akrylamid). Im Sammelgel kommt es zu einer starken Konzentrierung der Proteine innerhalb einer schmalen Zone von 19 µm (*stacking*-Effekt). Im Trenngel werden die Proteine anhand ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Große Proteine wandern dabei langsamer durch die Poren der Gelmatrix als Kleine. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine verwendet man einen Protein-Marker. Die angelegte Spannung beträgt 80 V während sich die Proben im Sammelgel und 120-160 V während sie sich im Trenngel befinden. Der Lauf wird beendet, wenn das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau die Unterkante des Gels verlässt.

Standardmäßig wurden 20 µg Proteinlösung pro Probe auf die Gele geladen. Zur Detektion von phosphorylierten LRP6 wurden 40 µg Proteinlösung auf die Gele geladen.

3.2.3.12 Western blot

Mit Hilfe der Western blot-Methode ist es möglich Proteine auf eine Membran zu transferieren und somit zu immobilisieren. Proteine von Interesse können anschließend mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Nachdem man die Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt hat werden sie durch Anlegen einer konstanten Spannung (100 V für 90-120 Minuten) aus dem Gel nach der *Wet*-Methode und einem Mini TransBlot Elektrophorese Transfersystem auf eine PVDF-Membran übertragen und dort immobilisiert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer fünf Minuten mit Methanol aktiviert und anschließend für fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Transferpuffer wurde vor der Verwendung vorgekühlt und während des Transfers wurde ein Kühlakku benutzt. Dieser wurde nach der Hälfte der Transferzeit gewechselt. Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran führt man eine

Ponceau S-Färbung durch. Diese färbt Proteine unspezifisch an und dient dem Nachweis eines erfolgreichen Transfers. Nach kurzer Entfärbung mit destilliertem Wasser erfolgt die Blockierung der freien Proteinbindestellen der Membran um nicht-spezifische Bindungen des primären Antikörpers an die Membran zu verhindern. Hierzu inkubiert man die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 20 ml Blockierungslösung (je nach Primärantikörper 5 % w/v BSA in 1 x TBST oder 5 % w/v Milchlösung in 1 x TBST). Anschließend wird die Membran 5 Minuten mit 1 x TBST gewaschen. Daraufhin folgt die Inkubation mit einem primären, spezifischen Antikörper, der nur das Protein von Interesse erkennt bei 4° C über Nacht in einer 1:1000 Verdünnung. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal für 15 Minuten mit 1 x TBST gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Zweitantikörper, an den eine Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, in einer Verdünnung von 1:2000-1:5000 in 3 % BSA bzw. 3 % Milchlösung in 1 x TBST bei Raumtemperatur für eine Stunde. Dieser Antikörper bindet an den spezifischen primären Antikörper und damit indirekt an das Protein von Interesse. Um ungebundenen Zweitantikörper zu entfernen wird nochmals gewaschen, sechsmal für 15 Minuten mit 1 x TBST. Anschließend erfolgt der eigentliche Nachweis mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion (SuperSignal Dura, Pierce). Die Peroxidase katalysiert hierbei die Oxidation von Luminol. Im Verlauf der Reaktion kommt es zu einer Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 430 nm welches mit Röntgenfilmen bzw. Chemilumineszenzfilmen (AGFA Curix, Mortsel, Belgien; Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) detektiert wird.

3.2.4 Statistik

Die Daten der Reporterassays und der quantitativen Echtzeit-PCR wurden als Mittelwerte +/- Standardfehler dargestellt. Die Auswertung der Daten und erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes Origin 5.0 unter Verwendung eines ANOVA-Tests und eines Student'schen t-Tests für unverbundene Stichproben. Die p-Werte sind in den jeweiligen Bildunterschriften angegeben.

4. Ergebnisse

Frühere Studien zur Aktivierung von β -Catenin durch *H. pylori* verwendeten zumeist gastrische Tumorzelllinien wie MKN 28, MKN 45, AGS (Murata-Kamiya *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2005) oder die primäre epitheliale MDCK Zelllinie (Sokolova *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde die gastrische epitheliale Zelllinie NCI-N87 verwendet, die dem Phänotyp eines Magenepithels relativ gut ähnelt, da sie sowohl intakte Adhärenzverbindungen besitzt sowie Magenhormone, beispielsweise PG5 oder GHL (Basque *et al.*, 2001) produziert und freisetzt. Die Fragestellung dieser Doktorarbeit war, ob eine Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* neben β -Catenin auch Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges reguliert.

4.1 *H. pylori*-induzierte Aktivierung von β -Catenin

Die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweges führt zur Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und anschließend zu dessen Translokation in den Zellkern. Letztere resultiert wiederum in einer Expression von Zielgenen. Wie in Abbildung 4.1 A dargestellt ist, führt die Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* zu einer erhöhten Menge an β -Catenin in Kernfraktionen innerhalb einer Stunde nach Infektion. Ebenso war eine β -Catenin-Akkumulation im Kern nach Behandlung der Zellen mit rekombinanten Wnt3A zu beobachten. Hitze-inaktivierte *H. pylori* konnten jedoch keine β -Catenin-Translokation in den Zellkern induzieren, was einen Hinweis darauf darstellt, dass eine physische Interaktion lebender Bakterien mit den Zellen benötigt wird, um β -Catenin zu aktivieren. Zur Untersuchung einer β -Catenin-abhängigen Genexpression wurde als nächstes ein Lef/Tcf-Reporterassay durchgeführt. Hierbei wurden NCI-N87-Zellen mit einem Luziferase-Reporterkonstrukt transfiziert, welches entweder acht Kopien einer nicht-mutierten (8xSuperTopflash) oder einer mutierten (8xSuperFopflash) Lef/Tcf-Bindestelle enthält (Veeman *et al.*, 2003) und anschließend mit *H. pylori* infiziert. Nach einer Infektionsdauer von sechs Stunden zeigten die mit SuperTopflash transfizierten Zellen eine signifikant höhere Luziferase-Reporteraktivität verglichen mit SuperFopflash-transfizierten oder nicht-infizierten Zellen. Die Behandlung der Zellen mit rekombinantem Wnt3A führte ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität in SuperTopflash transfizierten Zellen (Abb. 4.1 B).

4 Ergebnisse

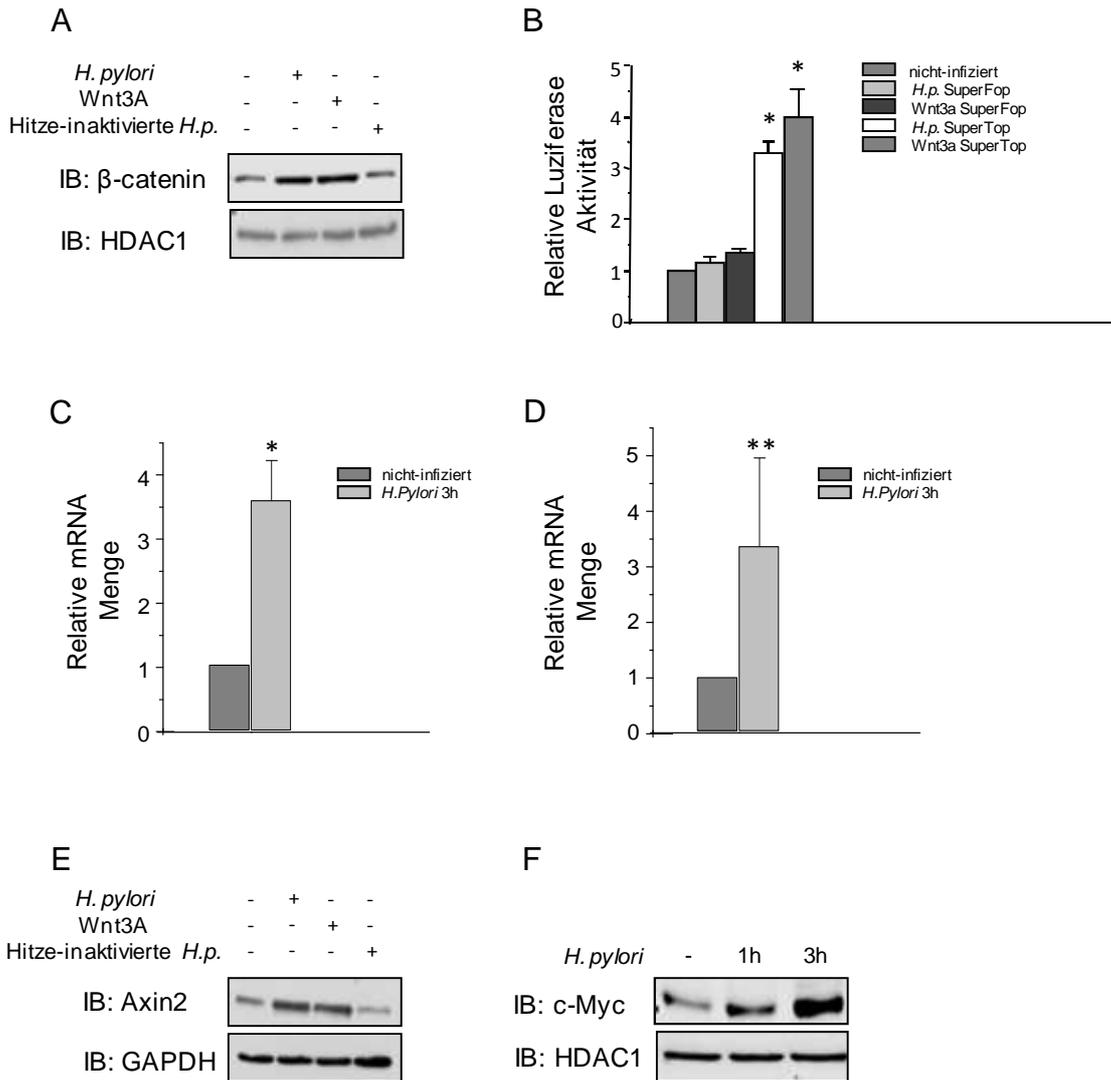


Abb. 4.1: *H. pylori* induziert eine β -Catenin Kerntranslokation, Lef/Tcf Aktivierung und die Expression von Wnt-Zielgenen. **A** NCI-N87-Zellen wurden mit *H. pylori* für 1 h infiziert oder mit rekombinantem Wnt3A oder Hitze-inaktivierten Bakterien behandelt. Kernfraktionen wurden präpariert und anschließend eine Western blot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Die Infektion mit lebenden Bakterien und die Behandlung mit rekombinantem Wnt3A, nicht jedoch mit hitzeinaktivierten *H. pylori* resultieren in erhöhten Mengen an β -Catenin. **B** NCI-N87-Zellen wurden transient transfiziert mit 8xSuperTopflash oder 8xSuperFopflash und ko-transfiziert mit einem Renilla-Luziferase-Konstrukt. 24 h später wurden die Zellen mit *H. pylori* für 6 h infiziert oder mit rekombinantem Wnt3A inkubiert, lysiert und anschließend die Firefly-/Renilla-Luziferase-Aktivität gemessen. Die Balken repräsentieren die durchschnittlichen x-fachen Änderungen der Aktivität sowie den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils dreifach durchgeführt wurden. * $p < 0,01$, relativ zu nicht-infizierten Zellen. **C, D** NCI-N87-Zellen wurden für 3 h mit *H. pylori* infiziert. Anschließend wurde die Menge an Axin2 bzw. c-Myc mRNA per quantitativer RT-PCR bestimmt. Ein Abgleich erfolgte gegen das Haushaltsgen GAPDH. Die Balken repräsentieren die x-fache Änderung der mRNA-Menge sowie den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,01$, relativ zu nicht-infizierten Zellen. ** $p < 0,05$, relativ zu nicht-infizierten Zellen. **E** NCI-N87-Zellen wurden mit *H. pylori* für 3 h infiziert oder mit rekombinantem Wnt3A oder Hitze-inaktivierten Bakterien behandelt. Zytosolfractionen wurden präpariert und anschließend eine Western blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Die Infektion mit lebenden Bakterien und die Behandlung mit rekombinantem Wnt3A, nicht jedoch mit Hitze-inaktivierten *H. pylori* resultieren in erhöhten Mengen an Axin2. **F** NCI-N87-Zellen wurden mit *H. pylori* für 1 h und 3 h infiziert. Kernfraktionen wurden präpariert und anschließend eine Western blot-Analyse mit den aufgeführten Antikörpern durchgeführt.

Zum weiteren Nachweis einer β -Catenin-Aktivierung wurde die Expression der Wnt-Zielgene Axin2 und c-Myc nach *H. pylori*-Infektion sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht. Nach einer Infektion von NCI-N87-Zellen für jeweils 3 h wurden die jeweiligen mRNA Mengen von Axin2 und c-Myc mit Hilfe einer Echtzeit-PCR bestimmt. Sowohl die Menge an Axin2 mRNA (Abb. 4.1 C), als auch die Menge an c-Myc mRNA (Abb. 4.1 D) waren gegenüber nicht-infizierten Zellen signifikant erhöht. Diese Induktion der beiden Zielgene auf Proteinebene konnte mit Western blot Experimenten gezeigt werden. Nach einer Infektion von 3 h war die Proteinmenge von Axin2 in zytosolischen Fraktionen gegenüber einer nicht-infizierten Kontrolle erhöht. Das gleiche Ergebnis war nach einer Behandlung der Zellen mit rekombinantem Wnt3A zu beobachten. Analog dem Ergebnis für β -Catenin waren Hitze-inaktivierte *H. pylori* nicht ausreichend für eine Induktion von Axin2 (Abb. 4.1 E). Die Proteinmenge von c-Myc war nach einer Infektionsdauer von 3 h in Kernfraktionen ebenfalls deutlich erhöht (Abb. 4.1 F).

Zusammenfassend führt eine Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* zu einer Kerntranslokation von β -Catenin und darüber hinaus zu dessen Aktivierung als Transkriptionsfaktor, resultierend in einer erhöhten Expression von Wnt-Zielgenen.

4.2 Freisetzung von β -Catenin aus dem Degradationskomplex nach *H. pylori*-Infektion

In Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird die Menge an freiem β -Catenin mit Hilfe des sogenannten Degradationskomplexes reguliert. Dieser besteht, neben β -Catenin und GSK3 β , hauptsächlich aus den beiden Proteinen Axin und APC. Die Freisetzung von β -Catenin aus dem Komplex ist ein Kennzeichen für die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweges durch Wnt-Liganden der Wnt-8 Klasse. Nach einer Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* konnten nach 15 Minuten geringere Mengen an β -Catenin mit Axin ko-immunpräzipitiert werden. Dieser Effekt verstärkt sich noch bei längerer Infektionsdauer (Abb. 4.2 A). Einen vergleichbaren Effekt hat die Infektion auf die Menge an β -Catenin, die mit APC ko-immunpräzipitiert werden kann. Auch hier wird β -Catenin bereits nach 15 Minuten freigesetzt und der Effekt verstärkt sich noch im Fortgang der Infektion. Weiterhin kann nach einer Infektion Axin nicht mehr zusammen mit APC präzipitiert werden (Abb. 4.2 B).

4 Ergebnisse

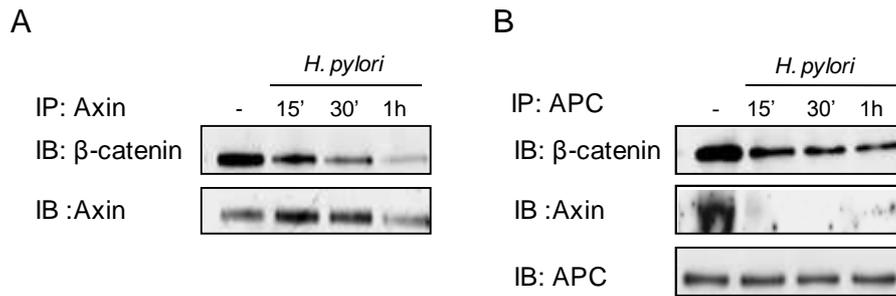


Abb. 4.2: Infektion von NCI-N87 mit *H. pylori* führt zu einer Freisetzung von β -Catenin aus dem Degradationskomplex. **A** NCI-N87-Zellen wurden mit *H. pylori* infiziert und mit den präparierten Lysaten eine Immunpräzipitation mit einem Axin-spezifischen Antikörper durchgeführt, gefolgt von einer Western blot Analyse der Immunpräzipitate mit den angegebenen Antikörpern. **B** NCI-N87-Zellen wurden mit *H. pylori* infiziert und mit den präparierten Lysaten eine Immunpräzipitation mit einem APC-spezifischen Antikörper durchgeführt, gefolgt von einer Western blot Analyse der Immunpräzipitate mit den angegebenen Antikörpern.

4.3 *H. pylori*-Infektion führt zu GSK3 β -Inhibierung

GSK3 β ist eine multifunktionale Kinase, die über eine Reihe verschiedener Signalwege kontrolliert werden kann (Grimes und Jope, 2001). Die bereits zuvor erwähnten Arbeiten zur Aktivierung von β -Catenin nach einer Infektion mit *H. pylori* beschreiben allesamt eine Phosphorylierung von GSK3 β an Serin-9, wodurch diese Kinase inhibiert wird. Für die Phosphorylierung ist die Akt-Kinase verantwortlich. Die Inhibierung von GSK3 β führt zu einer verminderten Phosphorylierung von β -Catenin, welche wiederum notwendig für dessen Degradation ist. Eine Inhibierung von GSK3 β resultiert also in einer Aktivierung von β -Catenin. Die Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* resultiert ebenfalls in einer Serin-9-Phosphorylierung von GSK3 β , welche bereits nach 15 Minuten beobachtet werden kann (Abb. 4.2).

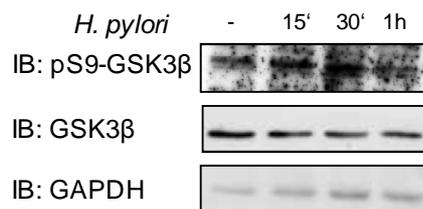


Abb. 4.3: Infektion mit *H. pylori* resultiert in GSK3 β -Inhibierung. NCI-N87 wurden mit *H. pylori* für die angegebenen Zeitpunkte infiziert. Zytosolische Fraktionen wurden isoliert und die anschließende Western blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt.

4.4 *H. pylori* induziert eine T4SS-abhängige LRP6-Phosphorylierung

Die Phosphorylierung des Ko-Rezeptors LRP6 des kanonischen Wnt-Signalweges ist notwendig für die Aktivierung des Signalweges und unabdingbar für die

4 Ergebnisse

Stabilisierung von β -Catenin. Um die Phosphorylierung von LRP6 nach einer Infektion zu untersuchen, wurden NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* infiziert und anschließend die Zellysate mit Hilfe eines Western blot-Experimentes analysiert. Wie in Abbildung 4.4 A zu sehen ist, führt eine Infektion nach 30 Minuten zu einer Phosphorylierung von LRP6.

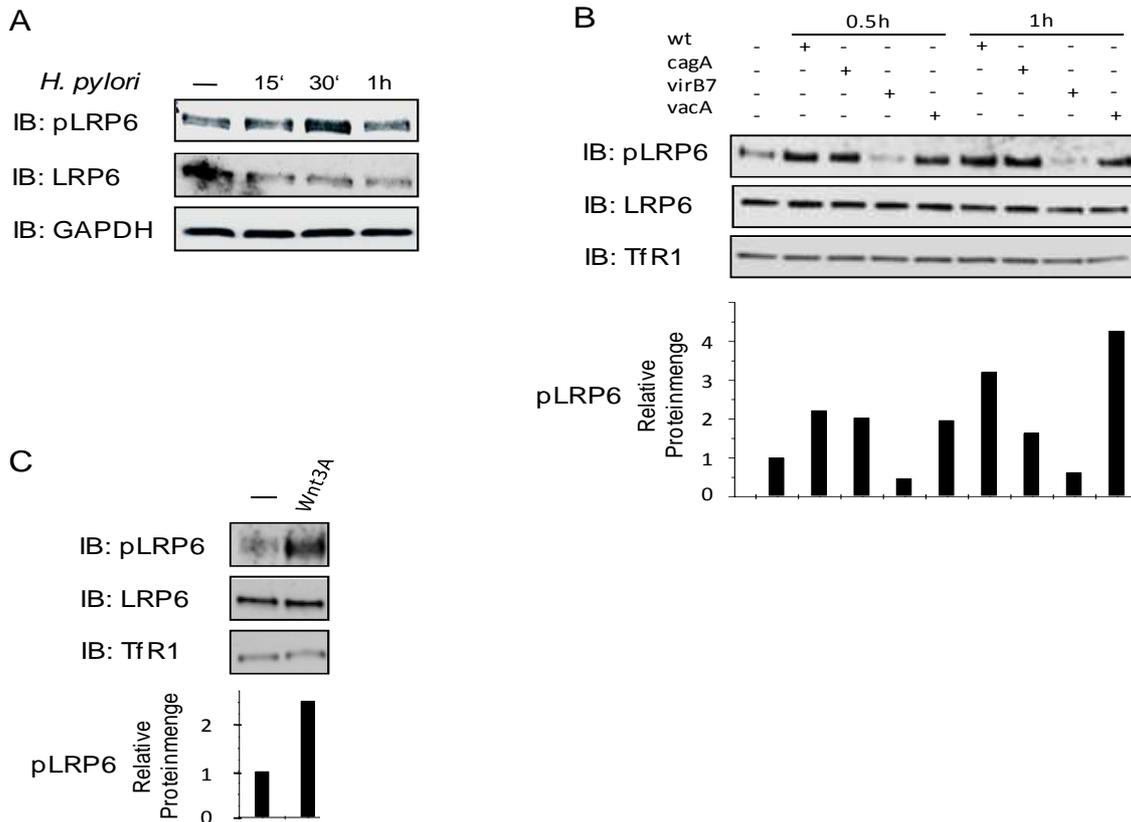


Abb. 4.4 Eine Infektion von NCI-N87 mit *H. pylori* führt zur Phosphorylierung von LRP6. **A** NCI-N87-Zellen wurden mit *H. pylori* für die angegebene Dauer infiziert und anschließend die Zellysate mittels Western blot mit den angegebenen Antikörpern untersucht. **B** NCI-N87-Zellen wurden für 30 Minuten bzw. 1 h mit Wildtyp oder verschiedenen mutierten isogenen *H. pylori*-Stämmen infiziert. Anschließend wurden Membranfraktionen isoliert und eine Western blot-Analyse durchgeführt. Das Balkendiagramm zeigt eine Quantifizierung für pLRP6. Die densitometrischen Werte der Proteinbanden wurden gegen LRP6 und TfR1 jeder Probe normalisiert und im Verhältnis zu den Werten der nicht-infizierten Zellen dargestellt. **C** NCI-N87-Zellen wurden als Kontrolle mit rekombinantem Wnt3A (50 nM) für 0,5 h inkubiert und anschließend mittels Western blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die densitometrischen Werte der Proteinbanden wurden gegen LRP6 und TfR1 jeder Probe normalisiert und im Verhältnis zu den Werten der nicht-infizierten Zellen dargestellt.

Um eine genauere Aussage über eine LRP6-Phosphorylierung nach einer Infektion treffen zu können, wurden in einem weiteren Experiment NCI-N87-Zellen mit Wildtyp *H. pylori* oder mit mutierten isogenen Stämmen, die entweder kein CagA Protein, kein VacA Protein oder kein virB7 Protein, und damit kein funktionelles T4SS besitzen, infiziert und anschließend Membranfraktionen isoliert. Diese wurden

wiederum mittels Western blot-Analyse untersucht. Eine Phosphorylierung von LRP6 wurde wiederum nach 30 Minuten induziert und war auch nach einer Stunde noch detektierbar, unabhängig davon, ob die Bakterien CagA oder VacA exprimierten. Jedoch führt eine Infektion mit einem bakteriellen Stamm, der kein funktionelles T4SS besitzt, nicht zu einer Phosphorylierung von LRP6 (Abb. 4.4 B). Eine Inkubation von NCI-N87-Zellen mit rekombinantem Wnt3A führt ebenfalls zu einer Phosphorylierung von LRP6, deren Zunahme mit der bei einer *H. pylori*-Infektion beobachteten vergleichbar ist (Abb. 4.4 C).

4.5 Infektion mit *H. pylori* führt zu einer Translokation von Dvl und Axin an die Plasmamembran

Die Proteine der Dvl-Familie sind wichtige Komponenten innerhalb der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade. Sind sie in Abwesenheit eines Liganden im Zytoplasma lokalisiert, so werden sie nach Bindung von kanonischen Wnts auf bisher unbekannte Art aktiviert, binden über eine DIX-Domäne an Axin und translozieren zusammen mit diesem an die Plasmamembran. Um zu untersuchen, ob *H. pylori* einen vergleichbaren Effekt wie kanonische Wnt-Liganden auf die Dvl-Proteine hat, wurden NCI-N87-Zellen für 30 Minuten mit Wildtyp oder den zuvor beschriebenen isogenen Stämmen infiziert. Anschließend wurden Membranfraktionen präpariert und Western blot-Analysen durchgeführt.

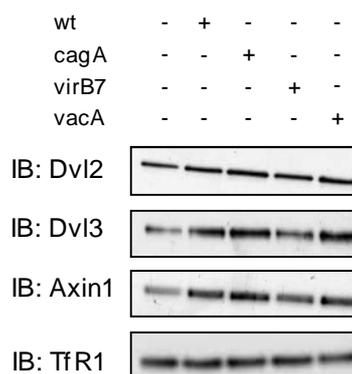


Abb. 4.5 *H. pylori* induziert eine Translokation von Dvl2, Dvl3 und Axin an die Plasmamembran. NCI-N87-Zellen wurden mit Wildtyp oder verschiedenen mutierten isogenen *H. pylori*-Stämmen für 0,5 h infiziert. Membranfraktionen wurden hergestellt und anschließend per Western blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

Die Infektion mit *H. pylori* führt zu einer Membran-Translokation von Dvl2 und Dvl3 sowie von Axin. Der Effekt ist hierbei für Dvl2 schwächer ausgeprägt als für Dvl3.

Analog den Ergebnissen für die Phosphorylierung von LRP6 ist die Translokation der drei Proteine unabhängig von CagA und VacA, jedoch abhängig von einem funktionierenden T4SS (Abb. 4.5).

4.6 Herstellung von stabil transfizierten Dvl2, Dvl3 und LRP6 *knockdown* Zelllinien

Die Beobachtung, dass eine Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* sowohl zu einer Phosphorylierung von LRP6 als auch zu einer Membrantranslokation von Dvl führt, legt den Schluss nahe, dass diese proximalen Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges auch an der durch *H. pylori*-induzierten Stabilisierung und Aktivierung von β -Catenin beteiligt sind. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Lentiviral-transduzierte stabile *knockdown* Zellen für Dvl2, Dvl3 und LRP6 sowie eine Kontroll-Zelllinie hergestellt.

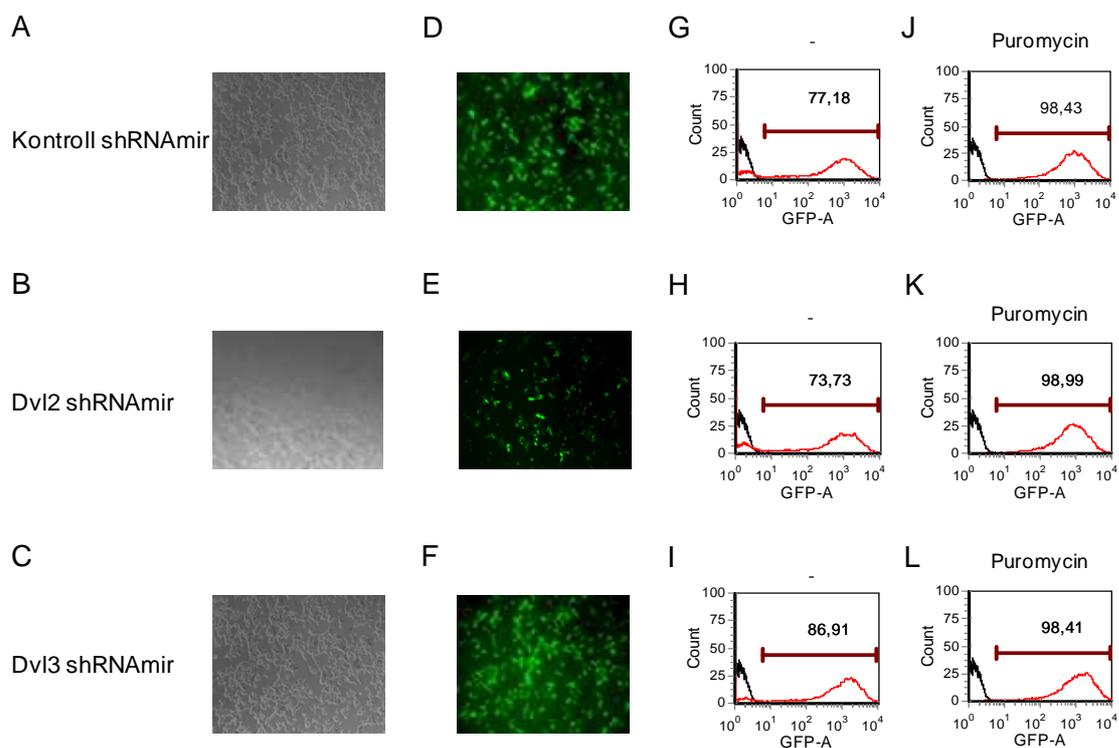


Abb. 4.6 Herstellung von stabilen *knockdown* Zelllinien. Lentivirale Konstrukte wurden zuerst zur Herstellung von Viruspartikeln in HEK 293T-Zellen transfiziert, der Erfolg durch Mikroskopie kontrolliert. **A, B, C** Lichtmikroskopische Aufnahme von HEK 293T-Zellen drei Tage nach Transfektion der lentiviralen Konstrukte. **D, E, F** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der GFP-Expression der in A, B und C dargestellten Bildausschnitte. **G, H, I** FACS-Analyse für GFP-positive NCI-N87-Zellen einen Tag nach der Transduktion der Viruspartikel. **J, K, L** FACS-Analyse für GFP-positive NCI-N87-Zellen nach fünf Tagen Selektion mit Puromycin (10 μ g/ml).

Zuerst wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden lentiviralen Vektor- und Verpackungskonstrukten transfiziert. Diese produzieren dadurch die jeweiligen Viruspartikel, die anschließend ins Zellkulturmedium sezerniert werden. Der Erfolg der Transfektion wurde nach drei Tagen mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert, da die jeweiligen Konstrukte auch für GFP kodieren (Abb. 4.6 D, E, F). NCI-N87-Zellen wurden anschließend mit diesen Viruspartikelhaltigen Überständen infiziert. Die Effizienz dieser viralen Transduktion wurde einen Tag später mittels FACS-Analyse wiederum über die GFP-Expression gemessen (Abb. 4.6 G, H, I). Eine weitere Analyse der GFP-Expression der lentiviral transduzierten Zelllinien erfolgte nach fünf Tagen unter Puromycin-Selektion. Wie in Abbildung 4.6 J, K, L zu sehen ist, war die Effizienz dieser Methode sehr hoch, mehr als 98% der Zellen waren positiv für eine GFP-Expression. Die Herstellung der Zelllinie mit einem stabilen knockdown für LRP6 war vergleichbar erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

4.7 Die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung von LRP6 ist abhängig von Dvl

In der aktuellen Modellvorstellung der Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges rekrutieren Rezeptoren der Frizzled-Familie das zytoplasmatische Protein Dvl an die Plasmamembran. Dishevelled wiederum rekrutiert Axin sowie die Kinase GSK3 β an die Membran, letztere phosphoryliert anschließend LRP6 an Position Serin-1490 (Bilic *et al.*, 2007). Aus diesem Grund sind die Dvl-Proteine notwendig für eine Stabilisierung von β -Catenin. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von LRP6 nach einer *H. pylori*-Infektion abhängig von einer Regulation durch Dvl Proteine ist, wurden die in Kapitel 4.6 beschriebenen stabilen Zelllinien mit einem *knockdown* von Dvl2 und Dvl3 sowie die Kontroll-Zelllinie verwendet. Alle drei Zelllinien wurden mit *H. pylori* für eine Stunde infiziert, anschließend wurden Membranfraktionen für eine Western blot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern verwendet. Die Phosphorylierung von LRP6 war reduziert in den beiden für Dvl2 und Dvl3 defizitären Zelllinien, nicht jedoch in den unbehandelten NCI-N87-Zellen oder mock transfizierten Zellen (Abb. 4.7). Die Effekte des *knockdown* von Dvl2 und Dvl3 waren vergleichbar stark.

4 Ergebnisse

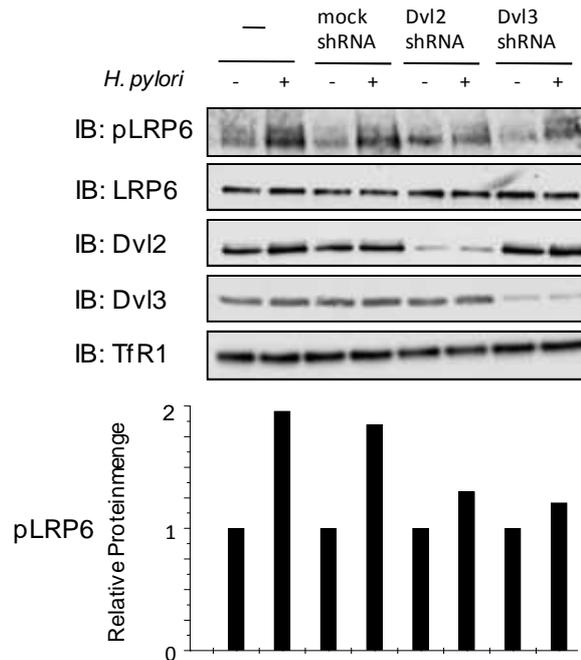


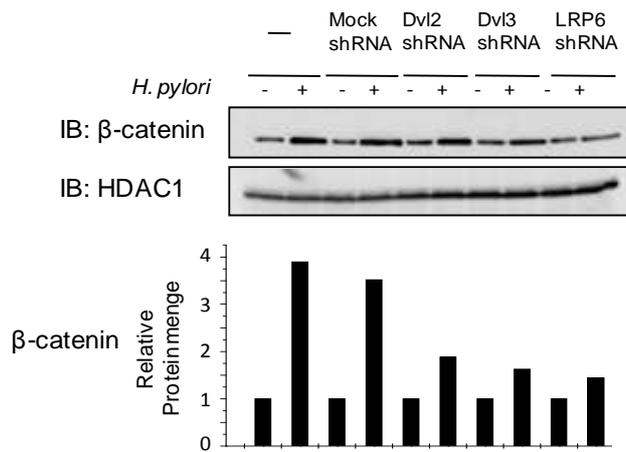
Abb. 4.7 Die LRP6-Phosphorylierung ist reduziert in Dvl2 und Dvl3 *knockdown* Zelllinien. NCI-N87-Zellen, Kontroll-shRNA Zellen, Dvl2-shRNA Zellen und Dvl3-shRNA Zellen wurden für 1 h mit *H. pylori* infiziert. Membranfraktionen wurden hergestellt und eine Western blot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Die Menge an pLRP6 war reduziert in Dvl2 und Dvl3 *knockdown* Zellen, nicht jedoch in unbehandelten NCI-N87 oder mock-transfizierten shRNA Zellen.

4.8 Die *H. pylori*-induzierte Kernakkumulation von β -Catenin, die Lef/Tcf-Transaktivierung sowie die Expression von Zielgenen ist abhängig von Dvl2, Dvl3 und LRP6

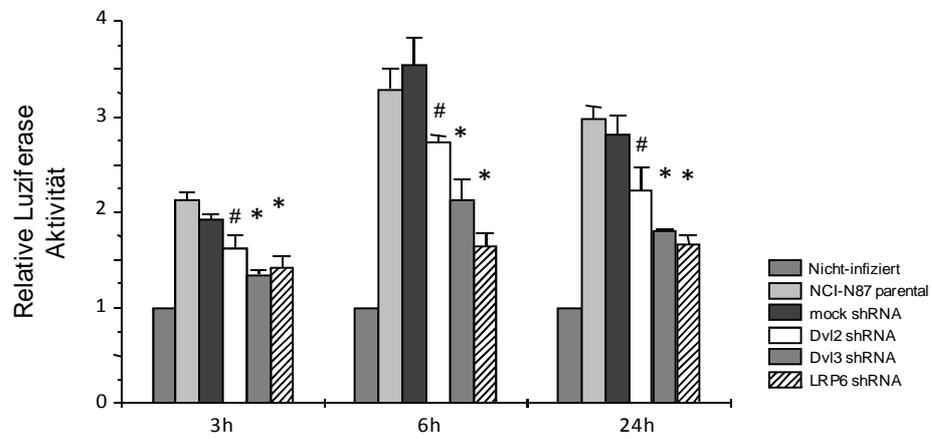
Um zu untersuchen, ob die *H. pylori*-induzierte Akkumulation von β -Catenin im Zellkern abhängig ist von Dvl oder LRP6, wurde ein Infektionsexperiment mit den stabilen *knockdown* Zelllinien defizitär für Dvl2, Dvl3 oder LRP6 durchgeführt. Die Menge an β -Catenin im Zellkern nach Infektion war in den Zelllinien ohne Dvl2, Dvl3 oder LRP6 gegenüber mock-transfizierten oder unbehandelten Zellen deutlich reduziert (Abb. 4.8 A) und bei allen drei Zelllinien vergleichbar stark. Weiterhin wurde nach verschiedenen Infektionszeitpunkten (3 h, 6 h, 24 h) die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin in den infizierten Zellen untersucht. Die Reporteraktivierung war signifikant reduziert in Zellen ohne Dvl2, Dvl3 oder LRP6 (Abb. 4.8 B). Das Signifikanzniveau der Dvl2 Zelllinie erreicht jedoch nicht ganz das der Zelllinien, die defizitär für Dvl3 und LRP6 sind.

4 Ergebnisse

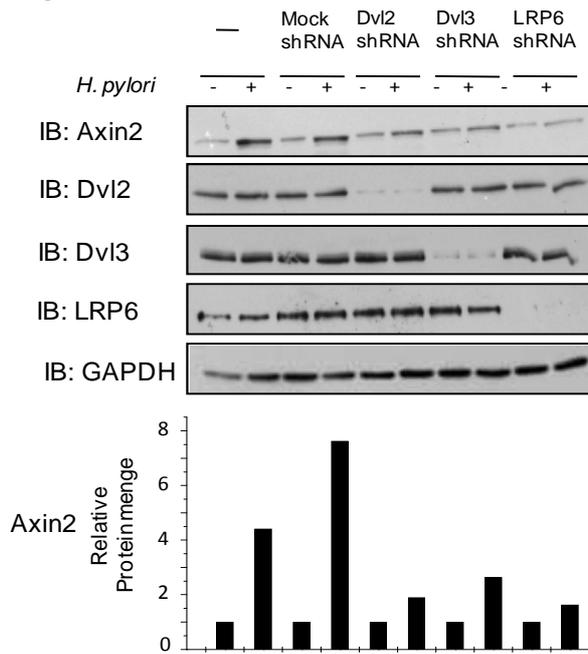
A



B



C



4 Ergebnisse

Abb. 4.8 Die *H. pylori*-induzierte Kernakkumulation von β -Catenin, die Lef/Tcf-Transaktivierung sowie die Expression des Zielgenes Axin2 sind abhängig von Dvl2, Dvl3 und LRP6. **A** NCI-N87-Zellen, Kontroll-shRNA Zellen, Dvl2-shRNA Zellen, Dvl3-shRNA Zellen und LRP6-shRNA Zellen wurden für 1 h mit *H. pylori* infiziert. Kernfraktionen wurden präpariert und eine Western blot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Das Balkendiagramm zeigt eine Quantifizierung für β -Catenin. Die densitometrischen Werte der Proteinbanden wurden gegen HDAC1 jeder Probe normalisiert und im Verhältnis zu den Werten der nicht-infizierten Zellen dargestellt. **B** NCI-N87-Zellen wurden transient transfiziert mit 8xSuperTopflash oder 8xSuperFopflash und ko-transfiziert mit einem Renilla-Luziferase-Konstrukt. 24 h später wurden die Zellen mit *H. pylori* für die angegebenen Zeitpunkte infiziert, lysiert und anschließend die Firefly-/Renilla-Luziferase-Aktivität gemessen. Die Balken repräsentieren die durchschnittlichen x-fachen Änderungen der Aktivität sowie den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils dreifach durchgeführt wurden. * $p < 0,05$, relativ zu nicht-infizierten Zellen. # $p < 0,1$, relativ zu nicht-infizierten Zellen. **C** NCI-N87-Zellen, Kontroll-shRNA, Dvl2-shRNA, Dvl3-shRNA und LRP6-shRNA Zellen wurden für 3 h mit *H. pylori* infiziert. Anschließend wurden RIPA-Lysate hergestellt und eine Western blot Analyse mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. In den Zellen mit *knockdown* für Dvl2, Dvl3 und LRP6, nicht aber in der Kontroll Zelllinie war die Expression von Axin2 reduziert im Vergleich zu parentalen NCI-N87-Zellen. Das Balkendiagramm zeigt eine Quantifizierung für Axin2. Die densitometrischen Werte der Proteinbanden wurden gegen GAPDH jeder Probe normalisiert und im Verhältnis zu den Werten der nicht-infizierten Zellen dargestellt.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge des Wnt-Zielgenes Axin2 3 h nach Infektion mit *H. pylori* stark vermindert ist in den *knockdown* Zelllinien für Dvl2, Dvl3 und LRP6 (Abb. 4.8 C).

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die in Abb. 4.1 dargestellte Aktivierung von β -Catenin nach einer Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* von den Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges Dvl2, Dvl3 und LRP6 reguliert wird.

5. Diskussion

Die Kolonisation der Mukosa des menschlichen Magens durch das Gram-negative Bakterium *H. pylori* führt sehr häufig zu einer lebenslangen chronischen Entzündung, die zumeist in einer chronischen Gastritis resultiert. Darüber hinaus kommt es zur Ausbildung von Folgeerkrankungen wie Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüren und in seltenen Fällen zur Entstehung von Magenkarzinomen und MALT-Lymphomen (Parsonnet *et al.*, 1991; Covacci *et al.*, 1993; Parsonnet *et al.*, 1994; Peek & Blaser, 2002). Die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges spielt sowohl in der frühen Embryonalentwicklung als auch bei der Entstehung vieler Krebserkrankungen des Menschen eine wichtige Rolle, einschließlich der Entstehung von Magenkarzinomen. Grund hierfür ist die Tatsache, dass Zielgene des Signalweges an der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Migration, Differenzierung oder der Selbsterneuerung von Stammzellen beteiligt sind (Logan und Nusse, 2004; Nusse, 2008).

Ziel meiner Arbeit war die Aufklärung der Frage, ob eine Infektion von gastrischen Epithelzellen mit *H. pylori* die Aktivierung von β -Catenin mit Hilfe von proximalen Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges reguliert. Mit Hilfe von molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden konnte (1) die Aktivierung von β -Catenin nach Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori*, sowie (2) die Regulation der *H. pylori*-vermittelten β -Catenin-Aktivierung durch von LRP6, Dvl2 und Dvl3 gezeigt werden.

5.1 Die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch *H. pylori*

Mutationen des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges verursachen eine Reihe von menschlichen Erbkrankheiten und sind an der Initiation und Progression von verschiedenen Krebserkrankungen beteiligt (Polakis, 2000), zumeist verursacht durch eine nicht angemessene Akkumulation und Aktivierung von β -Catenin. Die Entstehung von Magenkrebs konnte ebenfalls mit einer Veränderung der Expression bzw. einer veränderten Lokalisation von β -Catenin in Verbindung gebracht werden (Park *et al.*, 1999; Nabais *et al.*, 2003). Insbesondere Mutationen des Proteins im N-terminalen Bereich, der für seine geregelte Degradation entscheidend ist, sind mit der Tumorigenese assoziiert (Clements *et al.*, 2002). Die Aktivierung von β -Catenin

nach Infektion von Epithelzellen mit *H. pylori* konnte erstmals mit Hilfe von Lef/Tcf- bzw. Zyklin D1-Reporterassays gezeigt werden (Franco *et al.*, 2005; Murata-Kamiya *et al.*, 2007). Analog zu diesen Ergebnissen konnte in den hier verwendeten NCI-N87-Zellen eine Kernakkumulation von β -Catenin 1 h nach Beginn der Infektion mit *H. pylori* beobachtet werden. Hitze-inaktivierte Bakterien waren nicht in der Lage, eine Kerntranslokation von β -Catenin zu initiieren, was einen Hinweis darauf darstellt, dass dafür vermutlich eine physische Interaktion lebender Bakterien benötigt wird. Entsprechend der beobachteten Kerntranslokation von β -Catenin konnte auch eine Lef/Tcf-Transaktivierung gezeigt werden. Diese ist in ihrer Stärke vergleichbar mit einer Behandlung der Zellen mit Wnt3A, gleiches gilt für die Kernakkumulation von β -Catenin. Für den Wnt/ β -Catenin Signalweg sind bis heute über 100 verschiedene Zielgene beschrieben. Eine Verstärkung der Expression einiger dieser Gene durch *H. pylori* konnte bereits gezeigt werden (Bebb *et al.*, 2003; Udhayarkumar *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008), jedoch können eine Vielzahl dieser Gene auch von anderen Signalwegen reguliert werden. In dieser Arbeit konnte die Verstärkung der Expression von Axin2 und c-Myc sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Axin2 gilt als negatives Feedback-Protein des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und soll darüber hinaus Kontext-unabhängig von Wnt-Liganden reguliert werden (Lustig *et al.*, 2002).

Der β -Catenin-Degradationskomplex sitzt im Zentrum des kanonischen Wnt-Signalweges und spielt eine wichtige Rolle beim konstanten Abbau von β -Catenin in Abwesenheit eines exogenen Wnt-Signals. Veränderungen innerhalb des Komplexes, beispielsweise durch Mutationen eines oder mehrerer Komponenten, führen häufig zur Entstehung von Tumoren (Reya und Clevers, 2005). Der exakte Mechanismus, durch den der Degradationskomplex nach Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzled-Rezeptor und den LRP5/6-Ko-Rezeptor inhibiert wird, ist noch nicht aufgeklärt. Eine wichtige Rolle spielt vermutlich die Bindung von Dishevelled an Axin, was eine Konformationsänderung von Axin bewirken könnte und darüber hinaus Axin aus dem Zytoplasma an die Zellmembran rekrutiert (Kimelman und Xu, 2006). Der Verlust der Bindung von β -Catenin an Axin und APC ist eines der Markenzeichen für die Aktivierung des Signalweges. Nach Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* können bereits nach 15 Minuten nur noch verminderte

Mengen von β -Catenin mit Axin bzw. APC ko-immunpräzipitiert werden, was für die Freisetzung von β -Catenin aus dem Degradationskomplex spricht, vergleichbar den Vorgängen, die der aktuellen Modellvorstellung entsprechend nach der Bindung eines kanonischen Wnt-Liganden an seine Rezeptoren ablaufen. Zusätzlich kann nach einer Infektion Axin nicht mehr zusammen mit APC präzipitiert werden.

Einen genaueren Einblick über die der β -Catenin-Aktivierung zu Grunde liegenden Signalkaskade gab die Arbeit von Sokolova *et al.*, die in MDCK-Zellen eine T4SS-unabhängige Aktivierung des EGFR/PI3-Kinase/Akt-Kinase-Signalweges zeigen konnte. Die aktivierte Akt-Kinase inhibiert GSK3 β durch Phosphorylierung an Position Serin-9, resultierend in einer verminderten Serin/Threonin-Phosphorylierung im N-terminalen Bereich von β -Catenin (Sokolova *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu diesen Daten steht eine Arbeit, bei denen die Magentumorzelllinien AGS, MKN 28 und MKN 45 verwendet wurden. Diese zeigen zwar ebenfalls eine EGFR-vermittelte Aktivierung der Akt-Kinase, jedoch ist diese Aktivierung abhängig von cag PAI und dem bakteriellen Protein der äußeren Membran, OipA (Tabassam *et al.*, 2009). Weitere Arbeiten, bei denen ebenfalls Magentumorzellen verwendet wurden, zeigen eine PI3-Kinase vermittelte Akt-Aktivierung, die von CagA (Suzuki *et al.*, 2009) bzw. VacA (Nakayama *et al.*, 2008) abhängig ist. Zudem wird in diesen Arbeiten die Akt-vermittelte Inhibierung von GSK3 β in einem Zeitraum von 30 Minuten bis hin zu 24 h nach Infektion beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die inhibierende Serin-9-Phosphorylierung von GSK3 β ebenfalls gezeigt werden. An dieser Stelle sei erwähnt, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges durch kanonische Wnt-Liganden unabhängig von einer inhibierenden Phosphorylierung von GSK3 β verläuft.

Eine Aktivierung von β -Catenin durch andere humane Pathogene, die wie etwa *Bordetella pertussis*, *Brucella suis* oder *Legionella pneumophila* ebenfalls ein T4SS besitzen, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Jedoch ist ein nicht-pathogener *Salmonella typhimurium*-Stamm, dem das bakterielle Effektorprotein AvrA fehlt in der Lage, in verschiedenen epithelialen Zelllinien β -Catenin zu aktivieren, resultierend in einer erhöhten Zellproliferation und einer erhöhten Expression von c-Myc. Verantwortlich hierfür ist eine Inhibierung der Ubiquitylierung von β -Catenin durch

das Bakterium (Sun *et al.*, 2004). *Salmonella* kodiert für ein T3SS, mit Hilfe dessen der Keim ebenfalls bakterielle Faktoren in die Wirtszelle injizieren kann.

Das Acyl-Homoserin-Lakton (HLS) *quorum sensing* Molekül von *Pseudomonas aeruginosa* ist in epithelialen Caco-2-Zellen in der Lage, E-Cadherin-vermittelte Adhärenzverbindungen zu zerstören, was in einer Redistribution von β -Catenin und erhöhter parazellulärer Zellpermeabilität resultiert (Vikström *et al.*, 2009). Ebenfalls in Caco-2-Zellen konnte gezeigt werden, dass enteropathogene *Escherichia coli* eine PKC α -vermittelte Dissoziation des E-Cadherin/ β -Catenin-Komplexes verursachen, bei der es zu einer Redistribution von β -Catenin von der Membran ins Zytoplasma kommt (Malladi *et al.*, 2004). Das IpaC-Protein von *Shigella* ist essentiell für die Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle und zerstört ebenfalls Adhärenzverbindungen durch Bindung an den C-terminalen Bereich von β -Catenin (Shaikh *et al.*, 2003).

5.2 LRP6-Aktivierung durch *H. pylori*

Die Bindung von Wnt-Liganden an Mitglieder der Familie der Frizzled-Rezeptoren und an die Ko-Rezeptoren LRP5 oder LRP6 aktiviert den Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Dies führt zur Stabilisierung von β -Catenin und zu Kontext-abhängiger Expression von Zielgenen. Obwohl Wnt-Liganden auch allein an Frizzled-Rezeptoren binden können, ist für die Aktivierung von β -Catenin die Anwesenheit von Arrow in *Drosophila* (Wehrli *et al.*, 2000) bzw. LRP5 oder LRP6 in Vertebraten essentiell (Tamai *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus, mit dem die Bindung des Liganden an die Rezeptoren die Stabilisierung von β -Catenin steuert, ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt. In verschiedenen Magenkrebs-Zelllinien, sowie in primären Tumorzellen zeigen verschiedene Mitglieder der Frizzled-Familie eine erhöhte mRNA-Expression, dies konnte jedoch nicht nach Infektion von MKN 45-Zellen mit *H. pylori* beobachtet werden (Kirikoshi *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung des C-Terminus von LRP5 oder LRP6 ist eines der ersten Ereignisse innerhalb der ablaufenden Signalkaskade nach Bindung eines Wnt-Liganden (Tamai *et al.*, 2004) oder R-Spondin (Wei *et al.*, 2007). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Phosphorylierung von LRP6 oder eine veränderte Expression der beiden Ko-Rezeptoren nach Infektion mit *H. pylori* wurde bisher weder in Primärkulturen noch in permanenten Zellkulturlinien beschrieben. Auch rekombinante Wnt3A Liganden induzierten in der hier verwendeten NCI-N87-

Zelllinie eine Phosphorylierung von LRP6, was das Vorhandensein eines funktionellen Wnt-Signalweges in dieser Zelllinie nahe legt.

Erhöhte Mengen von phosphorylierten LRP6 konnten 30 Minuten nach Beginn der Infektion mit *H. pylori* nachgewiesen werden. Die Zunahme an pLRP6 nach Infektion war hierbei vergleichbar mit der Zunahme, die nach Behandlung der Zellen mit rekombinanten Wnt3A-Liganden beobachtet werden konnte. Für die Zunahme der LRP6-Phosphorylierung ist ein funktionelles T4SS notwendig, was darauf hindeuten könnte, dass ein in die Wirtszelle translozierter bakterieller Faktor an der Regulation der Phosphorylierung von LRP6 beteiligt ist. Dieser Virulenzfaktor ist jedoch nicht CagA, der verschiedene Signalkaskaden der Wirtszelle modulieren kann (Crabtree und Naumann, 2006). Andere injizierte Faktoren sind die aus bakteriellen Peptidoglykan entstehenden Muropeptide. Diese werden in der Wirtszelle von NOD1 erkannt und aktivieren den NF- κ B-Signalweg (Viala *et al.*, 2004). Muropeptide von *H. pylori* wurden bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Aktivierung von β -Catenin beschrieben. Auch Bakterien, die defizitär für den sekretierten Virulenzfaktor VacA sind, induzierten eine vergleichbare Zunahme an phosphorylierten LRP6, wodurch eine Beteiligung an der Phosphorylierung des Ko-Rezeptors ausgeschlossen scheint. Ebenso wäre denkbar, dass der T4SS-Apparat an einen zellulären Rezeptor binden muss, um die Phosphorylierung von LRP6 zu induzieren. Eine solche Bindung wurde beispielsweise für den Virulenzfaktor VacA gezeigt, der Sphingomyelin der Plasmamembran als Rezeptor benutzt, wodurch seine Assoziation mit *lipid rafts* möglich wird (Gupta *et al.*, 2008).

Das Protein Axin, das eine bedeutende Rolle bei der Degradation von β -Catenin in Abwesenheit eines Wnt-Liganden spielt, ist in der Lage, an den C-terminalen Bereich von LRP5 bzw. LRP6 zu binden. Diese Interaktion wird sehr schnell nach der Bindung eines Liganden an Frizzled, LRP5 oder LRP6 initiiert (Mao *et al.*, 2001). Mechanistisch wird diese Interaktion durch fünf Pro-Pro-Ser-Pro-Motive im C-terminalen Bereich von LRP5 und LRP6 vermittelt. Diese Bereiche sind ausreichend für die Aktivierung des Signalweges, was durch Mutationsanalysen gezeigt werden konnte (Tamai *et al.*, 2004). Cluster von Serin- und Threoninresten im C-Terminus von LRP5 oder -6, die Pro-Pro-Ser-Pro-Sequenzmotive beinhalten, werden nach Bindung von Wnt-Liganden phosphoryliert und diese Phosphorylierung erhöht

vermutlich die Affinität der Bindung von Axin an LRP5 oder -6. Die phosphorylierten Sequenzmotive führen dadurch weiterhin zu einer spezifischen Inhibierung der Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β im Zytoplasma (Piao *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009). Das zytoplasmatische Protein Dishevelled ist in der Lage, über seine DIX-Domäne an Axin zu binden (Kishida *et al.*, 1999) und ist darüber hinaus auch an der Phosphorylierung der Ko-Rezeptoren beteiligt, was nach *knockdown* von Dvl-Proteinen mit Hilfe von RNAi in *Drosophila* und siRNA in embryonalen Mäusefibroblasten gezeigt werden konnte (Bilic *et al.*, 2007). Derzeit gibt es zwei Modelle für die Rolle von Dvl bei der Wnt-vermittelten Phosphorylierung von LRP5/6. Zum einen könnte Dvl nach Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzled-Rezeptor rekrutiert und Axin sowie GSK3 β dabei ko-rekrutiert werden. Das zweite Modell beschreibt die Bildung von Multi-Proteinkomplexen nach Stimulation von Zellen mit Wnt-Liganden. Dabei bilden die ansonsten gleichmäßig über die Plasmamembran verteilten LRP6-Ko-Rezeptoren Membran-assoziierte Aggregate zusammen mit Axin, Dvl, Frizzled und GSK3 β . Dieses resultiert in der Phosphorylierung von LRP6 und anschließend in der Akkumulation von β -Catenin. Die Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* führt analog der beschriebenen Modellvorstellung zu einer Translokation von Dvl-Proteinen an die Zellmembran. Ebenso zeigen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten eine erhöhte Menge von Axin in Membranfraktionen nach Infektion. Analog den Ergebnissen für die Phosphorylierung von LRP6 ist dieser Effekt wiederum abhängig von einem funktionalen T4SS, nicht jedoch von den beiden Virulenzfaktoren CagA oder VacA. Dies könnte wiederum bedeuten, dass ein von *H. pylori* in die Wirtszelle injizierter Faktor möglicherweise die Translokation von Dvl-Proteinen oder Axin reguliert und dass in Abwesenheit dieses Faktors eine Phosphorylierung von LRP6 nicht möglich ist. Ebenso könnte dies durch eine Bindung des T4SS an einen zellulären Rezeptor reguliert werden. Entsprechend dieser Vermutung ist die Phosphorylierung von LRP6 nach Infektion mit *H. pylori* signifikant vermindert in Zellen, die defizitär für Dvl2 oder Dvl3 sind.

Als für die Phosphorylierung von LRP6 verantwortlich wurden die beiden Kinasen CK1 γ und GSK3 β identifiziert (Davidson *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005). CK1 γ ist die einzige Membran-verankerte Casein-Kinase und phosphoryliert Aminosäurereste sowohl *upstream* als auch *downstream* der Pro-Pro-Ser-Pro-Motive in *Drosophila*

und Vertebraten. GSK3 β hat nach dieser Modellvorstellung neben seiner starken inhibierenden Rolle im Wnt- β -Catenin-Signalweg auch eine aktivierende Rolle. Ob die beiden Kinasen auch für die *H. pylori*-induzierte Phosphorylierung von LRP6 nach Infektion verantwortlich sind, scheint fraglich. Für die Aktivierung von Casein-Kinasen durch *H. pylori*, einschließlich CK1 γ , gibt es keine Literaturdaten. GSK3 β jedoch wird nach Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* durch Phosphorylierung an Serin-9 bereits nach 15 Minuten inhibiert. Ob ein bestimmter Anteil an GSK3 β durch eine Dvl/Axin-vermittelte Translokation an die Plasmamembran dieser Inhibierung entgehen kann, oder ob ein Membran-assoziiertes Pool von GSK3 β existiert, der auch nach Infektion noch aktiv LRP6 phosphorylieren kann, muss in zukünftigen Studien gezeigt werden.

Eine kürzlich publizierte Arbeit beschreibt eine neue Klasse von Membran-assoziierten Serin-/Threonin-Kinasen, die an der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beteiligt sind. Die G-Protein-Rezeptor-gekoppelten Kinasen 5 und 6 (GRK5/6) sind in der Lage, LRP6 direkt zu phosphorylieren und ein *knockdown* von GRK5 resultiert in signifikant geringeren Mengen an phosphorylierten LRP6 in Wnt3A-behandelten in MEF- und HEK 293-Zellen. Versuche beim Zebrafisch zeigen darüber hinaus eine geringere Expression von Wnt-Zielgenen nach Morpholino-*knockdown* von GRK5 (Chen *et al.*, 2009). Eine Aktivierung von GRK5 oder GRK6, die bisher beschrieben war für die Desensitivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nach Infektion von Epithelzellen mit *H. pylori*, wurde bisher noch nicht publiziert.

5.3 Die Aktivierung von β -Catenin durch *H. pylori* ist abhängig von LRP6, Dvl2 und Dvl3

Für die Stabilisierung von β -Catenin durch kanonische Wnt-Liganden sind die Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 bzw. Arrow in *Drosophila* essentiell. Eine Mutation von LRP6 in Mäusen zeigt den gleichen Phänotyp wie eine Mutation von kanonischen Wnt-Liganden (Pinson *et al.*, 2000). Wnt5A, ein Ligand der sowohl β -Catenin-abhängige als auch unabhängige Signaltransduktion reguliert, bindet an LRP5 und aktiviert zusammen mit Frizzled4 β -Catenin (Mikels und Nusse, 2006). Mutationen von LRP5 spielen eine Rolle bei der Entstehung von Hyperparathyroidtumoren

(Björklund *et al.*, 2007) sowie bei der Regulation der Knochendichte (Boyden *et al.*, 2002). Darüber hinaus soll LRP6 die Aufnahme und Lethalität des Anthrax-Toxins in humanen und murinen Zellen vermitteln (Wei *et al.*, 2006), jedoch wird diese Tatsache kontrovers diskutiert (Young *et al.*, 2007). Dishevelled ist ebenso wie die LRP-Ko-Rezeptoren unabdingbar für die Stabilisierung von β -Catenin. In *Drosophila* ist ein konstitutiv-aktives Fusionsprotein aus Frizzled2 und Arrow ohne Dvl nicht in der Lage, β -Catenin zu aktivieren (Tolwinski *et al.*, 2003). Nach Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* war die Akkumulation von β -Catenin in Kernfraktionen signifikant reduziert nach *knockdown* von LRP6, Dvl2 oder Dvl3. Gleiches gilt für die Aktivierung des Lef/Tcf-Reporters und die Expression des Wnt-Zielgens Axin2. Interessanterweise scheint nach meinen hier vorgelegten Daten (siehe Abb. 4.8B) Dvl2 für die Aktivierung von β -Catenin weniger wichtig zu sein als Dvl3. Ähnliches wurde bereits in F9 Teratokarzinomazellen der Maus beschrieben (Lee *et al.* 2008). Weitergehende Studien sind erforderlich, um die Frage zu klären, ob Dvl2 und Dvl3 verschiedene Funktionen in *H. pylori*-infizierten Zellen besitzen.

Die Aktivierung von β -Catenin kann neben der bereits dargestellten Inhibierung von GSK3 β nach Infektion mit *H. pylori* noch durch eine Reihe weiterer Faktoren reguliert werden. So hat β -Catenin neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor auch eine wichtige Rolle bei der Bildung und dem Erhalt von Zell-Zell-Adhärenzverbindungen, indem es E-Cadherin über α -Catenin und einer Reihe weiterer Proteine an das Aktin-Zytoskelett bindet. Die Regulation dieser Adhäsion ist hochkomplex und erfolgt auf mehreren Ebenen (Gumbiner 2000; Lilien *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von Tyrosin-142 von β -Catenin führt zu einem Verlust der Verbindung zu α -Catenin. Sowohl der Rezeptor für HGF/SF, c-Met, als auch die Tyrosin-Kinase Fyn sind in der Lage, β -Catenin an Position Tyr-142 zu phosphorylieren (Piedra *et al.*, 2003; Brembeck *et al.*, 2004) und beide Kinasen werden durch eine Infektion mit *H. pylori* aktiviert (Churin *et al.*, 2003; Naumann und Crabtree, 2004). Eine andere Arbeit zeigt, dass eine Infektion mit *H. pylori* zu einer Komplexbildung von E-Cadherin, CagA, c-Met und p120-Catenin führt. Diese Komplexbildung verhindert die Aktivierung von c-Met, führt aber zu einer Destabilisierung des Cadherin-Catenin-Komplexes und zu erhöhten Mengen von β -Catenin im Kern (Oliveira *et al.*, 2009). Eine weitere Arbeit, die die MCF-7-Zelllinie verwendet, konnte eine CagA-

unabhängige Loslösung des Cadherin-Catenin-Komplexes vom Aktin-Zytoskelett zeigen (Weydig *et al.*, 2008). Weitere Studien zeigen, dass eine Überexpression von CagA in der Lage ist, die Komplexbildung von E-Cadherin und β -Catenin zu inhibieren (Murata-Kamiya *et al.*, 2007) oder zeigen einen CagA-unabhängigen Effekt auf den Cadherin-Catenin-Komplex (Bebb *et al.*, 2006). Darüber hinaus trägt eine CagA-unabhängige proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne von E-Cadherin nach Infektion mit *H. pylori* zur Desintegration der Adhärenzverbindung bei (Schirrmeyer *et al.*, 2009).

Eine weitere Möglichkeit der *H. pylori*-vermittelten Regulation von β -Catenin könnte durch p38-Kinase erfolgen. Die Infektion von gastrischen Epithelzellen führt zu einer schnellen Aktivierung von p38. Sowohl Wnt3A als auch Wnt4 sind in der Lage, in mesenchymalen Stammzellen bzw. F9 Teratokarzinomazellen p38 zu aktivieren (Bikkavilli *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von p38 zu einer Inhibierung von GSK3 β führt und damit zu einer Aktivierung von β -Catenin (Thornton *et al.*, 2008). JNKs, die eine wichtige Rolle im Wnt/PCP Signalweg besitzen, können die kanonische Wnt-Signalkaskade ebenfalls modulieren. Aktivierte JNK phosphoryliert und aktiviert c-Jun. Dieses ist in der Lage, mit dem Transkriptionsfaktor Tcf4 zu interagieren (Nateri *et al.*, 2005). Die Inkubation von NIH3T3-Zellen mit Wnt3A aktiviert Erk und stimuliert die Zellproliferation über den Raf-1/MEK/Erk-Signalweg. Der Einsatz von spezifischen Erk-Inhibitoren verringert Lef/Tcf-abhängige Genexpression nach Behandlung der Zellen mit Wnt3A, nicht jedoch die Akkumulation von β -Catenin (Bikkavilli und Malbon, 2009). Sowohl JNK als auch Erk werden in Folge einer Infektion mit *H. pylori* aktiviert.

Die hier vorgelegten Daten zeigen vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur eindeutig, dass die Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges bedingt, was in einer Kernakkumulation von β -Catenin und einer Expression von bekannten Zielgenen resultiert. Die Aktivierung des Signalweges wird über eine Phosphorylierung des Wnt-Ko-Rezeptors LRP6 vermittelt, für die Dvl2 und Dvl3 essentiell sind. Die Translokation von β -Catenin in den Zellkern, die Lef/Tcf-Transaktivierung, sowie die Expression von Zielgenen ist abhängig ist von LRP6, Dvl2 und Dvl3.

5 Diskussion

Zusammenfassend ergibt sich daraus ein neues Modell der *H. pylori*-vermittelten Aktivierung von β -Catenin in gastrischen Epithelzellen, in dem neben der Inaktivierung von GSK3 β und der Deregulation des Cadherin-Catenin-Komplexes auch die proximalen Komponenten des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges LRP6, Dvl2 und Dvl3 eine wichtige Rolle spielen (siehe Abb. 5.1).

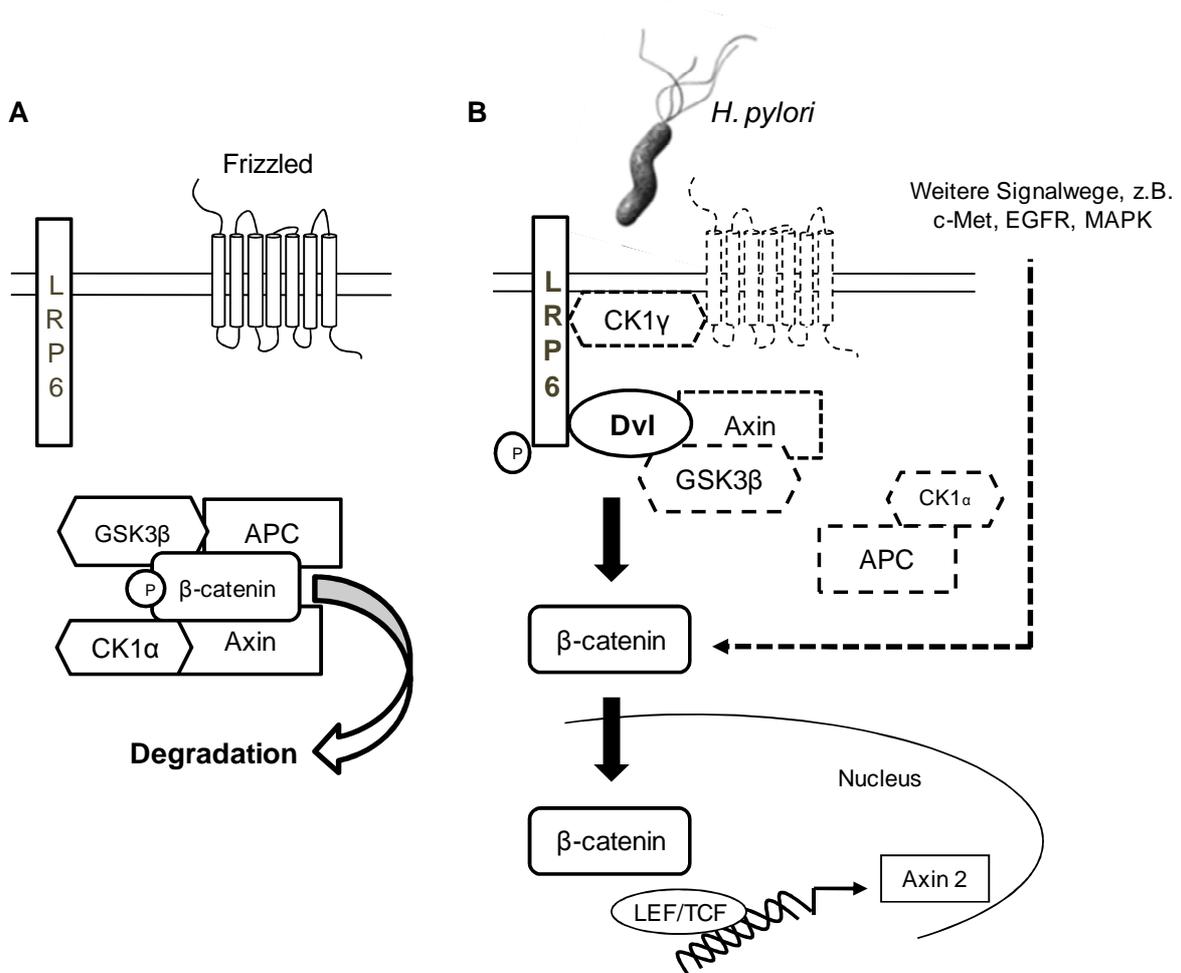


Abb. 5.1 Die *H. pylori*-induzierte Aktivierung von β -Catenin ist abhängig von LRP6 und Dvl. **A** In nicht-infizierten Zellen wird β -Catenin mit Hilfe eines Degradationskomplexes bestehend aus Axin, APC, CK1 α und GSK3 β phosphoryliert und anschließend im 26S-Proteasom degradiert. **B** Die Infektion von NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* induziert die Dvl-abhängige Phosphorylierung von LRP6 und die Aktivierung von β -Catenin in LRP6- und Dvl-abhängiger Weise, resultierend in Translokation von β -Catenin in den Zellkern und der Expression von Wnt-Zielgenen (Axin2). Andere Faktoren, wie beispielsweise EGFR, c-Met oder MAP-Kinasen tragen zur Aktivierung der β -Catenin-Signalkaskade nach *H. pylori*-Infektion bei.

6. Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *H. pylori* besiedelt die Magenschleimhaut im Bereich der Antrum- und Korpusregion und ist als ein Hauptverursacher bei der Entstehung von chronischen Gastritiden und der peptischen Ulkuskrankheit identifiziert, in selteneren Fällen kann es zur Entstehung von malignen Tumoren des Magens kommen. Der kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung, Apoptose oder der Regulation der Stammzell-Differenzierung. Zentraler Bestandteil des Signalweges ist β -Catenin, ein Protein mit dualer Rolle. Zum einen vermittelt es Zell-Zell-Adhäsion und zum anderen reguliert es als Transkriptionsfaktor über 100 beschriebene Zielgene. Eine konstitutive Aktivierung von β -Catenin ist in vielen Krebserkrankungen des Menschen, einschließlich Magenkrebs, beschrieben. *H. pylori* ist in der Lage β -Catenin zu regulieren und Ziel dieser Arbeit war es Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu identifizieren, die an dieser Regulation beteiligt sind.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden folgende wichtige Ergebnisse erzielt:

- I. Die Infektion von gastrischen NCI-N87-Zellen mit *H. pylori* führt zu einer Aktivierung von β -Catenin. Dies zeigt sich neben einer Kernakkumulation von β -Catenin auch in einer Lef/Tcf-Transaktivierung und in einer erhöhten Expression von Zielgenen sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene.
- II. Die *H. pylori*-Infektion führt zu einer Phosphorylierung des Wnt-Ko-Rezeptors LRP6. Diese ist abhängig von einem funktionellen T4SS der Bakterien.
- III. Die *H. pylori*-vermittelte Aktivierung von β -Catenin ist abhängig von LRP6, Dvl2 und Dvl3.

7. Literaturverzeichnis

Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F., and Trust, T. J. (14-1-1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**: 176-180.

Angers, S., Moon, R. T. (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature* **10**: 468-477.

Basque, J. R., Chenard, M., Chailier, P., Menard, D. (2001) Gastric cancer cell lines as models to study human digestive functions. *J Cell Biochem* **81**: 241-251.

Bebb, J. R., Letley, D. P., Thomas, R. J., Aviles, F., Collins, H. M., Watson, S. A., Hand, N. M., Zaitoun, A., Atherton, J. C. (2003) *Helicobacter pylori* upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells *in vivo* and *in vitro* in a Cag dependent manner. *Gut* **52**: 1408-1413.

Bebb, J. R., Leach, L., Zaitoun, A., Hand, N., Letley, D. P., Thomas, R., Atherton, J. C. (2006) Effects of *Helicobacter pylori* on the cadherin-catenin complex. *J Clin Pathol* **59**: 1261-1266.

Bikkavilli, R. K., Feigin, M. E., Malbon, C. C. (2008) p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt- β -catenin signalling by inactivation of GSK3 β . *J Cell Sci* **121**: 3598-607.

Bikkavilli, R. K., Malbon, C. C. (2009) Mitogen-activated protein kinases and Wnt/ β -catenin signaling. *Communicative & Integrative Biology* **2**: 46-49.

Bilic, J., Huang, Y. L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C. M., Bienz, M., Niehrs, C. (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes Dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**: 1619-1622.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R.G., Gluud, C. (2004) Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Database of Systematic Reviews* Issue 4.

Björklund, P., Akerström, G., Westin, G. (2007) An LRP5 receptor with internal deletion in hyperparathyroid tumors with implications for deregulated WNT/ β -catenin signaling. *PLoS Med* **4**: 1829-1841.

Bliss Jr., C. M., Golenbock, D. T., Keates, S., Linevsky, J. K., Kelly, C. P. (1998) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of

interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. *Infect Immun* **66**: 5357-5363.

Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., Wu, D., Insogna, K., Lifton, R. P. (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* **346**: 1513-1521.

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

Brembeck, F. H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., Birchmeier, W. (2004) Essential role of Bcl9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* **18**: 2225-2230.

Bumann, D., Meyer, T. F., and Jungblut, P. R. (2001) Proteome analysis of the common human pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics* **1**: 473-479.

Chen, M., Phillip, M., Wang, J., Premont, R. T., Garrison, T. R., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Chen, W. (2009) G protein-coupled receptor kinases phosphorylate LRP6 in the Wnt pathway. *J Biol Chem* Epub ahead of print

Cheng, X. X., Wang, Z. C., Chen, X. Y., Sun, Y., Kong, Q. Y., Liu, J., Gao, X., Guan H. W., Li, H. (2005) Frequent loss of membranous E-cadherin in gastric cancers: A cross-talk with Wnt to determine the fate of β -catenin. *Clin Exp Metastas* **22**: 85-93

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

Chang, J., Sonoyama, W., Wang, Z., Jin, Q., Zhang, C., Krebsbach, P. H., Giannobile, W., Shi, S., Wang, C. Y. (2007) Noncanonical Wnt-4 signalling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *J Biol Chem* **282**: 30938-48.

Churin, Y., Al-Ghoul, L., Kepp, O., Meyer, T. F., Birchmeier, W., Naumann, M. (2003) *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol* **161**: 249-255.

Clements, W. M., Wang, J., Sarniak, A., Kim, O. J., MacDonald, J., Fenoglio-Preiser, C., Groden, J., Lowy, A. M. (2002) β -catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res* **62**: 3503-3506.

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

Cover, T. L. und Blaser, M. J. (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **267**: 10570-10575.

Crabtree, J. E., Naumann, M. (2006) Epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori* infection. *Curr Signal Transduc Ther* **1**: 53-65

Dajani, R., Fraser, E., Roe, M. S., Young, N., Good, V., Dale, T. C., Pearl, L. H. (2001) Crystal structure of Glycogen Synthase Kinase 3 β : Structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105**: 721-732.

Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., Niehrs, C. (2005) Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**: 867-872.

de Jonge, R., Durrani, Z., Rijpkema, S. G., Kuipers, E. J., van Vliet, A. H., Kusters, J. G. (2004) Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J Med Microbiol* **53**: 375–379.

Diessenbacher, P., Hupe, M., Sprick, M. R., Kerstan, A., Geserick, P., Haas, T. L., Wachter, T., Neumann, M., Walczak, H., Silke, J., Leverkus, M. (2008) NF-kappaB inhibition reveals different mechanisms of TNF versus TRAIL-induced apoptosis upstream or at the level of caspase-8 activation independent of cIAP2. *J Invest Dermatol* **128**: 1134-1147.

Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., Krakowka, S. (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **59**: 2470-2475.

Ebert, M. P. A., Fei, G., Kahmann, S., Müller, O., Yu, J., Sung J. J. Y., Malfertheiner, P. (2002) Increased β -catenin mRNA levels and mutational alterations of the APC and β -catenin gene are present in intestinal-type gastric cancer. *Carcinogenesis* **23**: 87-91.

El-Omar, E. M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E., Bream, J. H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C. C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni Jr., J. F., Rabkin, C. S. (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* **404**: 398-402.

El-Omar, E. M., Rabkin, C. S., Gammon, M. D., Vaughan, T. L., Risch, H. A., Schoenberg, J. B., Stanford, J. L., Mayne, S. T., Goedert, J., Blot, W. J., Fraumeni

- Jr., J. F., Chow, W. H. (2003) Increases risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* **124**: 1193-1201.
- Evans Jr., D. J., Evans, D. G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H. C., Graham, D. Y., Granger, D. N., Kviety, P. R. (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* **63**: 2213-2220.
- Fanto, M., McNeill, H. (2004) Planar polarity from flies to vertebrates. *J Cell Sci* **117**: 527-533
- Firth, V. F., Hurst, J. A., Hall, J. G. (2005) *Oxford Desk Reference: Clinical genetics*. New York: Oxford University Press: 450-451.
- Franco, A. T., Israel, D. A., Washington, M. K., Krishna, U., Fox, J. G., Rogers, A. B., Neish, A. S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G., Hatakeyama, M., Whitehead, R., Gaus, K., O' Brien, D. P., Romero-Gallo, J., Peek Jr, R. M. (2005) Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 10646-10651.
- Fuerer, C., Nusse, R., ten Berge, D. (2008) Wnt signalling in development and disease. *EMBO reports* **9**: 134-138
- Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J. C., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E., Boquet, P. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* **19**: 6361-6370.
- Grimes, C. A., Jope, R. S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* **65**: 391-426.
- Gumbiner, B. M. (2000) Regulation of Cadherin Adhesive Activity, *J Cell Biol* **148**: 399-403.
- Gupta, V. R., Patel, H. K., Kostolansky, S. S., Ballivian, R. A., Eichberg J., Blanke, S. R. (2008) Sphingomyelin functions as a novel receptor for *Helicobacter pylori* VacA. *PloS Pathogens* **4**: 1-12.
- Hadeball, B., Borchers, A., Wedlich, D. (1998) *Xenopus* cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal. *Mech Dev* **72**: 101-113.
- Hansson, L. E., Nyrén, O., Hsing, A.W., Bergstroem, R., Josefsson, S., Chow, W.H., Fraumeni Jr., J. F., Adami H. O. (1996) The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med* **335**: 242-249.

- Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature* **4**: 688-694.
- Josenhans, C. and Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605-614.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A. (2009) Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* **19**: 119-129
- Kim, K. A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., Funk, W. D., Tomizuka, K. (2005) Mitogenic influence of human R-Spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* **309**: 1256-1259
- Kim, C. J., Song, J. H., Cho, Y. G., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Nam, S. W., Yoo, N. J., Lee, J. Y., Park, W. S (2007) Somatic mutations of the beta-TrCP gene in gastric cancer. *APMIS* **115**: 127-133.
- Kimelman, D., Xu, W. (2006) β -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**: 7482–7491.
- Kirikoshi, H., Sekihara, H., Katoh, M. (2001) Up-regulation of Wnt10A by tumor necrosis factor alpha and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Int J Oncol* **19**: 533–536.
- Kirikoshi, H., Sekihara, H., Katoh, M. (2001) Expression profile of 10 members of Fizzled gene family in human gastric cancer. *Int J Oncol* **19**: 767-771.
- Kohn, A. D., Moon, R. T. (2005) Wnt and Calcium signaling: β -catenin-independent pathways. *Cell Calcium* **38**: 439-446
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., Kuipers, E. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**: 449-490.
- Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., Maeda, H. (2000). *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun* **68**: 4378–4383.
- Labigne, A., Cussac, V., Courcoux, P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* **173**: 1920–1931.
- Lee, Y. N, Gao, Y., Wang, H. Y. (2008) Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell Signal* **20**: 443-452.
- Lilien, J., Balsamo, J., Arregui, C., Xu, G. (2002) Turn-Off, Drop-Out: Functional State Switching of Cadherins, *DevDynam* **224**: 18-29.

Logan, S. M., Conlan, J. W., Monteiro, M. A., Wakarchuk, W. W., Altman, E. (2000) Functional genomics of *Helicobacter pylori*: identification of a beta-1,4 galactosyltransferase and generation of mutants with altered lipopolysaccharide. *Mol Microbiol* **35**: 1156–1167.

Logan, C. Y., Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 781-810.

Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W., Behrens, J. (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of Conductin/Axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* **22**: 1184-1193.

Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K. E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B. B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L., Boren, T. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578.

Malladi, V., Shankar, B., Williams, P. H., Balakrishnan, A. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce changes in cadherin junctions of Caco-2 cells through activation of PKC α . *Microbes Infect* **6**: 38-50.

Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G. H., der Dritte Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., Wu, D. (2001) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* **7**: 801–809.

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

McDonald, S. L., Silver, A. (2009) The opposing roles of Wnt5a in cancer. *Brit J Cancer* **101**: 209-214.

McGee, D. J., Radcliff, F. J., Mendz, G. L., Ferrero, R. L., Mobley, H. L. (1999) *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection *in vitro* but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J Bacteriol* **181**: 7314-7322.

Mikels, A. J., Nusse, R. (2006) Purified Wnt5a protein activates or inhibits β -catenin-Tct signaling depending on receptor context. *PLoS Biology* **4**: 0570-0582.

Miller, J. D. (2001) The Wnts. *Genome Biol* **3**: 3001.1-3001.15.

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

Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek Jr, R. M., Azuma, T., Hatakeyama, M. (2007) *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the β -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **26**: 4617-4626.

Nabais, S., Machado, J. C., Lopes, C., Seruca, R., Carneiro, F., Sobrinho-Simoes, M. (2003) Patterns of β -catenin expression in gastric carcinoma: clinicopathological relevance and mutation analysis. *Int J Surg Pathol* **11**: 1-9.

Nakayama, M., Hisatsune, J., Yamasaki, E., Isomoto, H., Kurazono, H., Hatakeyama, M., Azuma, T., Yamaoka, Y., Yahiro, K., Moss, J., Hirayama, T. (2008) *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 β through the PI3K/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* **284**: 1612-1619.

Nateri, A. S., Spencer-Dene, B., Behrens, A. (2005) Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* **437**: 281-285.

Naumann, M., Crabtree, J. E. (2004) Helicobacter-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *TRENDS in Microbiol* **12**: 29-36.

Neu, B., Randlkofer, P., Neuhofer, M., Volland, P., Mayerhofer, A., Gerhard, M., Schepp, W., Prinz, C. (2002) *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**: G309–G318.

Niehus, E., Gressmann, H., Ye, F., Schlapbitch, R., Dehio, M., Dehio, C., Stack, A., Meyer, T. F., Snerbaurn, S., Josenhans, C. (2004) Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **52**: 947–961.

Nishino, Y., Inoue, M., Tsuji, I., Wakai, K., Nagata, C., Mizoue, T., Tanaka, K., Tsugane, S. (2006) Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol* **36**: 800–807.

Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., Sasaki, Y., Mita, H., Nishikawa, N., Yamaguchi, K., Hirata, K., Itoh, F., Tokino, T., Mori, M., Imai, K., Shinomura, Y. (2007) Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* **26**: 4699-4713.

Nusse, R. (2008) Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res* **18**: 523-527.

O' Toole, P. W., Lane, M. C., Porwollik, S. (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* **2**: 1207-1214.

Obst, B., Wagner, S., Sewing, K. F., Beil, W. (2000) *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* **21**: 1111–1115.

Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M. M., Oshima, M. (2008) Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor- α in gastric tumor cell. *EMBO J* **27**: 1671–81.

Oh, J. D., Kling-Backhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R. S., Fulton, L. A., Cordum, H. S., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., Mardis, E. R., Engstrand, L. G., and Gordon, J. I. (2006) The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 9999-10004.

Ohyauchi, M., Imatani, A., Yonechi, M., Asano, N., Miura, A., Iijima, K., Koike, T., Sekine, H., Ohara, S., Shimosegawa, T. (2005) The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. *Gut* **54**: 330-335

Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., Minami, Y. (2003) The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in noncanonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**: 645–654.

Oliveira, M. J., Costa, A. M., Costa, A. C., Ferreira, R. M., Sampaio, P., Machado, S. C., Seruca, R., Mareel, M., Figueiredo, C. (2009) CagA Associates with c-Met, E-Cadherin, and p120-Catenin in a Multiproteic Complex That Suppresses *Helicobacter pylori*-Induced Cell-Invasive Phenotype. *J Inf Dis* **200**: 745-755.

Oshima, H., Oguma, K., Du, Y. C., Oshima, M. (2009) Prostaglandin E₂, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* **100**: 1779-1786.

Park, W. S., Oh, R. R., Park, J. Y., Lee, S. H., Shin, M. S., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Lee, H. K., Kim, P. J., Oh, S. T., Yoo, N. J., Lee, J. Y. (1999) Frequent somatic mutations of the β -catenin in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* **59**: 4257-4260.

Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., Sibley, R. K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* **325**: 1127-1131.

Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A. B., Warnke, R. A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J. H., Friedman, G. D. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* **330**: 1267-1271.

Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K. D., Hundt, E., Knapp, B. (1999) Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* **27**: 3325–3333.

Peek Jr, R. M., Blaser, M. J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* **2**: 28-37.

Piao, S., Lee, S. H., Kim, H., Yum, S., Stamos, J. L., Xu, Y., Lee, S. Y., Lee, J., Oh, S., Han, J. K., Park, B. J., Weis, W. I., Ha, N. C. (2008) Direct Inhibition of GSK3 β by the Phosphorylated Cytoplasmic Domain of LRP6 in Wnt/ β -Catenin Signaling. *PLoS One* **3**

Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H. G., Heisterkamp, N., de Herreros, A. G., Dunach, M. (2003) p120 catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate β -catenin tyr-142 phosphorylation and β -catenin- α -catenin interaction. *Mol Cell Biol* **23**: 2287-2297.

Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J., Skarnes, W. C. (2005) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**: 535-538.

Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**: 1837-1851.

Pride, D. T., Blaser, M. J. (2002) Concerted evolution between duplicated genetic elements in *Helicobacter pylori*. *J Mol Biol* **316**: 629–642.

Rad, R., Gerhard, M., Lang, R., Schoniger, M., Rosch, T., Schepp, W., Becker, I., Wagner, H., Prinz, C. (2002). The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* **168**: 3033–3041.

Rad, R., Dossumbekova, A., Neu, B., Lang, R., Bauer, S., Saur, D., Gerhard, M., Prinz, C. (2004) Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **53**: 1082-1089.

Reya, T., Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**: 843-850.

Robki, B., Sequin, D., Guy, B., Mazarin, V., Vidor, E., Mion, F., Cadoz, M., Quentin-Millet, M. J. (2001) Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse

and gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. *Infect Immun* **69**: 4759-4766.

Saitoh, T., Kirikoshi, H., Mine, T., Katoh, M. (2001) Proto-oncogene Wnt10B is up-regulated by tumor necrosis factor alpha in human gastric cancer cell line MKN 45. *Int J Oncol* **19**: 1187-1192.

Schambony, A., Kunz, M., Gradl, D. (2004) Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion. *Differentiation* **72**: 307-318.

Schambony, A., Wedlich, D. (2007) Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* **12**, 779–792.

Schirrmester, W., Gnad, T., Wex, T., Higashiyama, S., Wolke, C., Naumann, M., Lendeckel, U. (2009) Ectodomain shedding of E-cadherin and c-Met is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Exp Cell Res* online veröffentlicht; vor dem Druck

Scott, D. R., Marcus, E. A., Weeks, D. L., and Sachs, G. (2002) Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **123**: 187-195.

Segal, E. D., Lange C., Covacci A., Tompkins L. S., Falkow S. (1997) Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7595-7599.

Shaikh, N., Terajima, J., Watanaba, H. (2003) IpaC of Shigella binds to the C-terminal domain of beta-catenin. *Microbe Pathog* **35**: 107-117.

Shikata, K., Kiyohara, Y., Kubo, M., Yonemoto, K., Ninomiya, T., Shirota, T., Tanizaki, Y., Doi, Y., Tanak, K., Oishi, Y., Matsumoto, T., Iida, M. (2006) A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int J Cancer* **119**: 196–201.

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

Smith, M. G., Hold, G. L., Tahara E., El-Omar, E. (2006) Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol* **12**: 2979-2990.

Sokolova, O., Bozko, P. M., Naumann, M. (2008) *Helicobacter pylori* suppresses GSK3 β activity to promote β -catenin activity. *J Biol Chem* **238**: 29367-29374.

Sommi, P., Ricci, V., Fiocca, R., Romano, M., Ivey, K. J., Cova, E., Solcia, E., Ventura, U. (1996) Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions

induced by *Helicobacter pylori*: an *in vitro* study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion* **57**: 299-304.

Suerbaum, S., Josenhans, C., Labigne, A. (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* **175**: 3278-3288.

Sun, J., Hobert, M. E., Rao, A. S., Neish, A. S., Madara, J. L. (2004) Bacterial activation of β -catenin signaling in human epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**: G220-G227

Sung, J. J., Leung, W. K., Go, M. Y., To, K. F., Cheng, A. S., Ng, E. K., Chan, F. K. (2000) Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* **157**: 729-735.

Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N., Morikawa, H., Nagai, S., Koyasu, S., Gimán, R. H., Kersulyte, D., Berg, D. E., Sasakawa, C. (2009) *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe* **5**: 23-34.

Udhayarkumar, G., Jayanthi, V., Devaraj, N., Devaraj, H. (2007) Interaction of MUC1 with beta-catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in *H. pylori*-induced gastric cancer. *Mol Carcinog* **46**: 807-817.

Tabassam, F. H., Graham, D. Y., Yamaoka, Y. (2009) *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. *Cell Microbiol* **11**: 70-82

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P., He, X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**: 530–535.

Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., He, X. (2004) A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* **13**: 149-156.

Thornton, T. M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C. D., Aronshtam, A., Clements, J. L., Sabio, G., Davis, R. J., Matthews, D. E., Doble, B., Rincon, M. (2008) Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation. *Science* **320**: 667-70.

Tokui, N., Yoshimura, T., Fujino, Y., Mizoue, T., Hoshiyama, Y., Yatsuya, H., Sakata, K., Kondo, T., Kikuchi, S., Toyoshima, H., Hayakawa, N., Kobo, T., Tamakoshi, A.

(2005) Dietary habits and stomach cancer risk in the JACC Study. *J Epidemiol* **15** (Suppl 2): 98-108.

Tolwinski, N. S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., diNardo, S., Wieschaus, E. (2003). Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3 β activity. *Dev Cell* **4**: 407-418.

Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karp, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., and Venter, J. C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.

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

Yamaoka, Y., Kwon, D. H., Graham, D. Y. (2000) A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7533-7538.

van Amerongen, R., Mikels, A., Nusse, R. (2008) Alternative Wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Science* **1**: 1-5

van Amsterdam, K., van der Ende, A. (2004) Nutrients released by gastric epithelial cells enhance *Helicobacter pylori* growth. *Helicobacter* **9**: 614-621.

Veemann, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Hallagan-Louie, S., Moon, R. T. (2003) Zebrafish Prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* **13**: 680-685.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J., Ferrero, R. L. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**: 1166-1174.

Vikstroem, E., Biu, L., Konradsson, P., Magnusson, K. E. (2009) The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Exp Cell Res* **315**: 313-326.

Walduck, A. K., Weber, M., Wunder, C., Juettner, S., Stolte, M., Vieth, M., Wiedenmann, B., Meyer, T. F., Naumann, M., Hoecker, M. (2009) Identification of novel cyclooxygenase-2-dependent genes in *Helicobacter pylori* infection *in vivo*. *Mol Cancer* **8**: 22.

Wallingord, J. B., Habas. R. (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**: 4421-4436.

Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell. K., O' Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., diNardo, S. (2000) Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for wingless signalling. *Nature* **407**: 527-530.

Wei, W., Lu, Q., Chaudry, G. J., Leppla, S. H., Cohen, S. N. (2006) The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* **124** 1141-1154.

Wei, Q., Yokota, C., Semenov, M. V., Doble, B., Woodgett, J., He, X. (2007) R-Spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and β -catenin signaling. *J Biol Chem* **282**: 15903-15911.

Weydig, C., Starzinski-Powitz, A., Carra, G., Löwer, J., Wessler, S. (2007) CagA-independent disruption of adherence junction complexes involves E-cadherin shedding and implies multiple steps in *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Exp Cell Res* **313**: 3459-3471.

Wouda, R. R., Bansraj, M. R., de Jong, A. W., Noordermeer, J. N., Fradkin, L. G. (2008) Src family kinases are required for WNT5 signaling through the Derailed/RYK receptor in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* **135**: 2277–2287.

Wu, G., Huang, H., Abreu J. G., He, X. (2009) Inhibition of GSK3 inhibition of β -catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. *PloS One* **4**

Xu, Q., Wang, Y. Dabdoub, A., Smallwood, P. M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M. W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., Nathans, J. (2004) Vascular development in the retina and inner ear: Control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **116**: 883–895.

Young, J. J., Bromberg-White, J. L., Zylstra, C., Church, J. T., Boguslawski, E., Resau, J. H., Williams, B. O., Duesbery, N. S. (2007) *PloS Pathogens* **3**.

7 Literaturverzeichnis

Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., He, X. (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**: 873-877.

Zhu, Y., Shu, X., Chen, J., Xie, Y., Xu, P., Huang, D. Q., Lu, N. H. (2008) Effect of *Helicobacter pylori* eradication on oncogenes and cell proliferation. *Eur J Clin Invest* **38** : 628-633.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Familienname	Gnad
Vorname	Thorsten Oliver
Anschrift	Heidestraße 3a 39112 Magdeburg
E-Mail-Adresse	thorstengnad@web.de
geboren am/in	27.07.1977/ Kandel
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULBILDUNG

09/1984 – 06/1988	Grundschule Kandel
09/1988 – 06/1997	Europagymnasium Wörth am Rhein
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife (2,9)

HOCHSCHULSTUDIUM

10/1998 – 04/2005	Studium der Biologie (Diplom)
Name der Hochschule	Universität Karlsruhe (TH)
Fachsemester inkl. Diplomarbeit	13
Fachbereich	Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften
Hauptfächer	Genetik Zoologie
Nebenfächer	Mikrobiologie Organische Chemie
01/2002	Vordiplom mit dem Gesamtergebnis „gut“
06/2004 – 04/2005	Diplomarbeit „Ansätze zur Untersuchung der funktionellen Interaktion von <i>Xenopus</i> PAPC

Lebenslauf

20. April 2005

und Frizzled 7“ im Institut für molekulare
Entwicklungs- und Zellphysiologie
Diplomzeugnis (1,6)

PROMOTION

09/2005-10/2009

Promotionsarbeit zum Dr. rer. nat.

09/2005-09/2008

Mitglied des DFG Graduiertenkollegs 1167/1

„Zell-Zell Kommunikation in Nerven- und
Immunsystem“

Name der Hochschule

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Institut

Experimentelle Innere Medizin

Betreuer

Prof. Dr. Michael Naumann

26.10.2009

Einreichung der Dissertationsarbeit

„Modulation des Wnt/ β -catenin Signalweges
in der *H. pylori*-Infektion

Magdeburg, den 26.10. 2009

Thorsten Gnad

Wissenschaftliche Publikationen

1. Schirrmeister, W^{*}, **Gnad, T^{*}**, Wex, T., Higashiyama, S., Wolke, C., Naumann, M., Lendeckel, U. (2009) Ectodomain shedding of E-cadherin and c-Met is induced by *Helicobacter pylori* infection. *Experimental Cell Research* online veröffentlicht; vor dem Druck

* Beide Erstautor

2. **Gnad, T.**, Feoktistova, M., Leverkus, M., Lendeckel, U., Naumann, M. (2010) *Helicobacter pylori*-induced activation β -catenin signaling pathway involves low density lipoprotein receptor-related protein 6 and Dishevelled. *Molecular Cancer* **9**:31

Erklärung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

Modulation des kanonischen Wnt/ β -catenin Signalweges in der *H. pylori*-Infektion

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 naturalium* (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 26.10.2009

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Faktoren die zur Pathologie des Magens sowie den durch eine <i>H. pylori</i> Infektion verursachten Erkrankungen beitragen.....	10
Abb. 1.2 Modell der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges.....	17
Abb. 1.3 β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalwege.....	18
Abb. 1.4 Die konservierten Domänen der Dishevelled Proteine und ihre Beteiligung an den jeweiligen Wnt Signalwegen.....	19
Abb. 3.1: Darstellung des lentiviralen pGIPZ-Vektors.....	30
Abb. 4.1: <i>H. pylori</i> induziert eine β -Catenin Kerntranslokation, Lef/Tcf Aktivierung und die Expression von Wnt-Zielgenen.....	44
Abb. 4.2: Infektion von NCI-N87 mit <i>H. pylori</i> führt zu einer Freisetzung von β -Catenin aus dem Degradationskomplex.....	46
Abb. 4.3: Infektion mit <i>H. pylori</i> resultiert in GSK3 β -Inhibierung.....	46
Abb. 4.4 Eine Infektion von NCI-N87 mit <i>H. pylori</i> führt zur Phosphorylierung von LRP6.....	47
Abb. 4.5 <i>H. pylori</i> induziert eine Translokation von Dvl2, Dvl3 und Axin an die Plasmamembran.....	48
Abb. 4.6 Herstellung von stabilen <i>knockdown</i> Zelllinien.....	49
Abb. 4.7 Die LRP6-Phosphorylierung ist reduziert in Dvl2 und Dvl3 <i>knockdown</i> Zelllinien.....	51
Abb. 4.8 Die <i>H. pylori</i> -induzierte Kernakkumulation von β -Catenin, die Lef/Tcf-Transaktivierung sowie die Expression des Zielgenes Axin2 sind abhängig von Dvl2, Dvl3 und LRP6.....	52

