

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: Max Planck Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., hier: MPI für Infektionsbiologie, Abteilung Molekulare Biologie (MPIIB)

Förderkennzeichen: 0315435A

Vorhabenbezeichnung: ERA-NET PathoGenoMics 2: **FunGen:** Functional genomics of host-pathogen interactions using high throughput screenings: a novel approach towards indentifying therapeutic/ prophylactic targets: WP5. *Helicobacter pylori* mutants deficient in inflammatory host cell signalling

Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2009 – 31.01.2012, die letzten 12 Monate als kostenneutrale Verlängerung

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung,

Die Infektion mit dem Magenbakterium *Helicobacter* führt in der menschlichen Zelle zu einer Aktivierung der proinflammatorischen Signalwege, ein Umstand der sowohl für die Kolonisation als auch für die Pathogenese von entscheidender Bedeutung ist. Einer der prominentesten Signaltransduktionswege, der sowohl mit der Steuerung des menschlichen Immunsystems als auch mit der Bakterien-assoziierten Entwicklung von Magenkrebs in Verbindung steht, ist der NF-kappaB abhängige Signalweg. Dieser wird von einem der wichtigsten bakteriellen Virulenzfaktoren, dem sog. Typ IV Sekretionssystem (T4SS), aktiviert. Zum Zeitpunkt der Antragstellung war nicht bekannt, welche bakteriellen Faktoren in die T4SS-abhängige Induktion von NF-kappaB, involviert sind.

Im Rahmen des Arbeitspaketes 5 des FunGen-Projektes sollten bakterielle Faktoren identifiziert werden, die an der Stimulation dieses prominenten Signaltransduktionswegs beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollte eine Bibliothek von circa 3.000 bakteriellen Transposonmutanten des *Helicobacter pylori* Stammes G27 in einem genomweiten Screen auf die Fähigkeit getestet werden, die Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF-kappaB in der Wirtszelle zu aktivieren. P65 transloziert nach Aktivierung aus dem Zytoplasma in den Nukleus. Mit Hilfe einer klonalen, humanen gastrischen Epithelzelllinie, die p65 stabil als GFP-Fusionsprotein exprimiert, sollte ein Nachweissystem für die Hochdurchsatzanalyse etabliert werden, um die p65 Translokalisierung verfolgen und damit die NF-kappaB Aktivierung detektieren zu können. Die Auswertung erfolgte mittels Hochdurchsatz-Mikroskopie.

Der Vor- und Hauptscreens, die Qualitätskontrolle und die Datenanalyse als auch die Validierung der vom MPIIB selektierten Hits sollte die Firma RNAX GmbH, eine Ausgründung des MPIIB, durchführen. Das für den weiteren Verlauf entscheidende Data Mining und die Auswahl der primären Hits für die Validierung sollte das MPIIB übernehmen. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen sollte die Rolle der vielversprechendsten bakteriellen Faktoren in weiteren Detailanalysen näher untersucht werden.

Im Folgenden sind die Projektziele nochmals zusammengefasst:

- 1) Etablierung eines Nachweissystems für den *Helicobacter* Mutanten Screen (MPIIB)
- 2) Transfer des Assays auf die Screening Plattform und Durchführung des Pre-Screens (MPIIB, RNAX)
- 3) Durchführung des Hauptscreens (RNAX) inklusive Datenanalyse (RNAX, MPIIB)
- 4) Validierung der Hits (RNAX) und Sequenzierung bestimmten *Helicobacter* Mutanten zur Lokalisation des Transposonlokus (MPIIB)
- 5) Detailanalyse einzelner aus dem Screen resultierender, validierter Hits (MPIIB)

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Das MPIIB verfügte bereits zu Beginn des Projektes über eine ausgewiesene Expertise auf dem Gebiet der *Helicobacter* Infektion sowie über umfangreiches Know How zur Etablierung

von Testsystemen für die Hochdurchsatzanalyse und zur bioinformatischen Auswertung der Screening Ergebnisse (Data Mining). Darüber hinaus stand eine am MPIIB etablierte Reporterzelllinie, die die p65 Untereinheit von NF-kappaB stabil als fluoreszierendes GFP-Fusionsprotein exprimiert, für das Testsystem zur Verfügung.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Mit Hilfe einer humanen gastrischen NF-kappaB Reporterzelllinie, die ein p65-GFP Fusionsprotein stabil exprimiert, wurde die NF-kappaB Aktivierung im Hochdurchsatzverfahren analysiert. Die Translokation des p65-GFP Fusionsproteins wurde mit einem Hochdurchsatzkompatiblen Mikroskop und anschließend mit Computer-gesteuerten Analysen ausgewertet.

Nach erfolgreicher Etablierung der Infektionsversuche mit den Mutantenstämmen und Ermittlung geeigneter Infektionszeitpunkte, wurde die Hochdurchsatzkompatible Kultivierung einzelner bakterieller Klone aus der Transposon-Bibliothek etabliert. Es wurden sowohl Einzelklone des Wildtypstamms als auch T4SS-Mutanten eingesetzt werden. Das Testsystem wurde im Hinblick auf Robustheit und geringe Standardabweichungen optimiert und auf die automatisierte Plattform transferiert. Nachdem ein Pre-Screen mit 30 Mutanten erfolgreich durchgeführt wurde, erfolgte der Haupt-Screen in dem ~ 3000 verschiedene Mutanten getestet wurden. Die Mutanten, für die eine Modulation der Helicobacter-vermittelten p65-Translokation nachgewiesen wurde, in zwei weiteren Validierungsrunden mit der gleichen Methode untersucht. Anschließend wurden die Transposon-Loci der finalen Hits sequenziert, um das mutierte Gen zu lokalisieren. In weiter führenden Analysen wurden einige der Hits genauer auf ihre Funktion hin untersucht. Hierbei kamen Vitalitätstests, Adhärenz-Assays, Motilitäts-Assays und zellmorphologische Untersuchungen zum Einsatz.

Neben NF-kappaB gehört die Aktivierung von MAP Kinasen zu den wichtigsten proinflammatorischen Signalkaskaden, die in Abhängigkeit eines funktionalen T4SSs aktiviert werden. Um auch für diesen Signalweg bakterielle Faktoren zu identifizieren, wurde ein Antikörper-basierter Auslesemechanismus herangezogen. Unter Einsatz eines phosphospezifischen ERK1/2 Antikörpers, der die Aktivierung der MAPkinasen ERK1/2 nachweist, wurden zusammen mit einem Antikörper gegen ERK2, der das Gesamtprotein-Level von ERK2 erkennt, Mutanten identifiziert, die einen Defekt in der ERK1/2 Induktion aufweisen. Für diesen Screen wurden die bereits für den NF-kappaB Screen verwendeten Platten gefärbt und mikroskopisch analysiert. Vielversprechende Hits wurden funktional analysiert.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zu Beginn des Projektes war aus der wissenschaftlichen Literatur bereits bekannt, dass *Helicobacter* den NF-kappaB und den MAPK Signaltransduktionsweg aktiviert und für beide Signalkaskaden ein funktionsfähiges T4SS benötigt wird. Unklar war jedoch welche bakteriellen Faktoren über das T4SS transloziert werden, um anschließend NF-kappaB und MAP Kinasen zu aktivieren. Mit Hilfe eines Helicobacter Mutanten Screens sollten die beteiligten bakteriellen Faktoren identifiziert werden.

- **Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,**

Nach Wissen des MPIIB wurden bei der Durchführung des Projektes keine bestehenden Patente oder Schutzrechte tangiert.

- **Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste**

Zur Literaturrecherche wurden internationale Veröffentlichungen zu den Stichworten NF-kappaB, *Helicobacter pylori* und MAP Kinasen herangezogen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Weiterführende Recherchen zu der Rolle der identifizierten bakteriellen Faktoren wurden mit Hilfe folgender Informationsdienste durchgeführt:

- Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>)
- STRING Database for functional protein association networks (<http://string.embl.de/>)
- KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>)
- AmiGO Gene Ontology Database (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/browse.cgi>)

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Mutanten Komplementation erfolgte in Kollaboration mit Herrn Rainer Haas (Max von Pettenkofer Institut; LMU, Munich). Die bakterielle Transposon-Bibliothek wurde von Frau Nina Salama (5Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, 98109, USA) zur Verfügung gestellt. Phylogenetische Studien von einem identifizierten bakteriellen Faktor (Hop Q) wurden von Herrn Yuri Taras (Research Group Insect Symbiosis, Max Planck Institute for Chemical Ecology, D-07745, Jena, Germany) durchgeführt.

Darüber hinaus wurde im Rahmen des Arbeitspaketes 6 in Kooperation mit dem Institut Pasteur ein Testsystem für die *Legionella pneumophila* vermittelte NFκB Aktivierung erfolgreich etabliert. Es wurden Wildtyp Stämme und TSFF Mutanten eingesetzt.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die erfolgreiche Etablierung eines Nachweissystems für den Helicobacter Mutanten Screen, die Koordination mit der Firma RNAX, die den Screen durchführte und die Hitanalyse mittels Data Mining erforderte ebenso wie die funktionelle Analyse einzelner Targets den Einsatz eines erfahrenen promovierten Wissenschaftlers. Der Mutanten Screen selbst wurde im Rahmen eines Unterauftrags von der Firma RNAX GmbH erfolgreich durchgeführt.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Im Wesentlichen wurden die Fördermittel zur Finanzierung eines promovierten Wissenschaftlers eingesetzt. Die Mittel für Sachaufwendungen wurden zum größten Teil für molekularbiologische Reagenzien und Sequenzierungen verwendet. Darüber hinaus erhielt die Firma RNAX rund 50.000 € für die Durchführung eines Helicobacter Mutanten Screen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das Forschungsvorhaben erforderte einen finanziellen Aufwand von rund 266.000 €, der aus Institutsmitteln nicht hätte getätigt werden können. Gleichzeitig führte der H.p. Mutanten Screen zur Identifizierung bakterieller Faktoren, die an der Helicobacter vermittelten Aktivierung des NFκB und ERK Signalweges beteiligt sind. Diese Ergebnisse liefern einen bedeutenden Beitrag für die Aufklärung der Mechanismen, die der Pathogenese und Immunantwort zugrunde liegen und stellen eine wichtige Voraussetzung für die Erforschung der damit verbundenen molekularen Interaktionen dar.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Rahmen des Projektes wurden bisher keine Patente angemeldet.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Von anderen Stellen wurden keine Ergebnisse bekannt, die Einfluss auf den Verlauf des Projektes gehabt hätten.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Die Ergebnisse der Forschungsarbeit wurden auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert und sollen in einer international renommierten, hochrangigen, ‚peer-reviewed‘ Zeitschrift unter folgendem Titel publiziert werden:

Helicobacter pylori HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor, Elena Belogolova^{1*}, Bianca Bauer^{1*}, Hiroshi Asakura^{1*}, Malvika Pompaiah¹, Volker Brinkman², Claudia Ertl³, Sina Bartfeld^{1,7}, Taras Y. Nechitaylo⁴, Rainer Haas³, Nikolaus Machuy¹, Nina Salama⁵, Yuri Churin^{1,6§} and Thomas F. Meyer^{1§}

¹Department of Molecular Biology and ²Core Facility Microscopy, Max Planck Institute for Infection Biology, D-10117, Berlin, Germany

³Department of Bacteriology, Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, D-80336, Munich, Germany

⁴Research Group Insect Symbiosis, Max Planck Institute for Chemical Ecology, D-07745, Jena, Germany

⁵Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, 98109, USA

IV. Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -----	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Helicobacter pylori mutants deficient in inflammatory host cell signalling (WP5) Within ERA-NET PathoGenoMics 2- FunGen: Functional genomics of host-pathogen interactions using high throughput screenings: a novel approach towards indentifying therapeutic/ prophylactic targets	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Bianca Bauer Thomas F. Meyer	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.01.2011 plus kostenneutrale Verlängerung bis 31.01.2012
	6. Veröffentlichungsdatum ----
	7. Form der Publikation -----
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) MPI für Infektionsbiologie Abteilung Molekulare Biologie Charitéplatz 1 10117 Berlin	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -----
	10. Förderkennzeichen 0315435A
	11. Seitenzahl ----
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben -----
	14. Tabellen -----
	15. Abbildungen -----
16. Zusätzliche Angaben -----	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -----	

18. Kurzfassung

Im Zuge dieses Projektes sollten bakterielle Faktoren identifiziert werden, die an der Helicobacter-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde eine Bibliothek von rund 3.000 bakteriellen Transposonmutanten des *Helicobacter pylori* Stammes G27 in einem genomweiten Screen untersucht. Mit Hilfe einer zuvor generierten klonalen, humanen gastrischen Epithelzelllinie, die die p65 Untereinheit von NFkappaB stabil als GFP-Fusionsprotein exprimiert, wurde die Aktivierung von NFkappaB über die Translokalisierung von p65 aus dem Cytoplasma in den Kern detektiert. Die Datenanalyse und anschließende Überprüfung der validierten Hits mittels Sequenzanalyse resultierte in der Identifizierung zahlreicher Mutationen, die die p65 Translokalisierung beeinflussen. Der überwiegende Teil dieser Mutationen wurde in der „Cag pathogenicity island“ von H.p. (CagPAI) gefunden, nur ein geringer Teil befand sich außerhalb dieser Region. Einzelne bakterielle Faktoren wurden in weiter führenden Studien detaillierter untersucht. Ein Manuskript, in dem die erzielten Ergebnisse dargestellt sind, wird in Kürze bei einer hochrangigen Fachzeitschrift eingereicht. Insgesamt wurden im Rahmen des Projektes neue Virulenzfaktoren identifiziert, die für die Helicobacter-vermittelte NFkappaB Aktivierung erforderlich sind und damit Ausgangspunkt für neue Therapieansätze darstellen.

19. Schlagwörter

Helicobacter, NFkappaB

20. Verlag

21. Preis
