

國立臺灣大學醫學院免疫所

碩士論文

Graduate Institute of Immunology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

Role of intracellular localization and phosphorylation of
CagA in host cell activation.

CagA 分子在宿主細胞活化狀態下於細胞內的分布和磷

酸化的角色之研究

研究生:許莉苓

Graduated student: Li-Ling Hsu

指導教授: 許秉寧 博士

Adviser: Ping-Ning Hsu, Ph.D.

中華民國 一百零一年 七月

July, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

CagA 分子在宿主細胞活化狀態下於細
胞內的分布和磷酸化的角色之研究

本論文係許莉苓君（學號 R99449007）在國立臺灣大學
醫學院免疫學研究所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 07
月 24 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

許秉寧

（簽名）

（指導教授）

謝世良

許秉寧

系主任、所長

許 秉 寧

致謝

兩年的碩班生活一眨眼就過了，想當初懵懂無知的我，陌生地到台大免疫所報到，常常搞不清楚地開別間實驗室的冰箱拿 sample，到現在每台景物儀器都備感親切，真不敢相信我完成了碩士論文，這一切的一切都要歸功於許秉寧老師的指導，謝謝老師讓我進入 R511 的大家庭，讓我在充裕的環境中完成實驗，謝謝老師每週撥空聆聽我們的進度，適時地給予方向，認清自己需要加強的地方，老師對我們的指教方式雖然嚴厲，但是有壓力才有進步，這一點我非常地感謝老師，讓我能不斷地成長，了解研究人員對學術研究的謹慎態度以及報告的技巧，實在是非常謝謝老師。再來，謝謝口試委員謝世良老師與司徒惠康老師，給予我寶貴的建議與改進的方向。

謝謝實驗室的便便學長，你刻苦耐勞的實驗精神是我的榜樣，也謝謝學長不厭其煩地聽我討論實驗的東西，在我心情沮喪時鼓勵我，即使畢業了還是非常照顧我；謝謝小白學長總是讓實驗室氣氛和樂融融；謝謝鴻泰學長給予實驗上的建議和分析；謝謝秀蓉學姊親切地對待我，分享生活上的歡樂，並在難過時給我鼓勵；謝謝小橘學姊和丁丁學姊負責實驗室的娛樂策畫，並給我實驗和生活上的照顧；謝謝一起努力的超哥，耐心聽我分析實驗，提供改進的意見；謝謝獨立自主的琮皓學弟，在我很忙的時候，沒有打擾我，加油！努力會有成果的。也謝謝其他一同分享生活點滴的碩二同學們，很慶幸在一起歡笑、一起努力的日子有你們。謝謝互相打氣與分享的好朋友及南大同學們，讓我沒有隻身在台北的孤獨感。

最後謝謝我的爸爸、媽媽和哥哥，謝謝你們提供我生活費，讓我在台北生活無後顧之憂，謝謝你們在我無聊的時候陪我聊天說話，在我無法回家時抽空來台北看我，叮嚀我要好好照顧身體，忍受我不耐煩的脾氣。在此感謝所有陪伴在我身邊的人，因為有你們的幫忙、提攜與照顧，我才能完成碩士學位。

中文摘要

胃幽門桿菌(*Helicobacter pylori*)可造成胃癌、胃炎以及胃潰瘍等疾病，而 CagA 被認為是主要的致病分子，CagA 是一個 120-145 kDa 的蛋白質，可以透過胃幽門桿菌的線毛及其他 cag PAI 上分子的協助，利用第四型分泌系統(type IV secretion system)注入胃上皮細胞中，被細胞中的磷酸酶 Src family kinase 和 Abl 磷酸酶磷酸化，而被磷酸化的 CagA 可與 SHP-2 結合，形成活化態 SHP-2，引起 SHP-2 將 focal adhesion kinase(FAK)去磷酸化，也透過 E-cadherin 和 β -catenin 等路徑，改變細胞與細胞間的交互作用，造成細胞型態的改變，成為延長狀偽足的表現型。而 SHP-2 不正常持續的活化情形被證實與癌症的生成有關，因此，認為 CagA 是一個可引起癌症的致癌蛋白。我們實驗室發現 CagA 可以轉運至 B 淋巴細胞內，同樣的在細胞質中被磷酸化形成 phospho-CagA，phospho-CagA 也會與 SHP-2 交互作用，而在 CagA 的影響下，活化 p38、Erk、抗凋亡分子 Bcl-2 和 Bcl-XL。

但是，目前對於 CagA 進入 B 淋巴細胞後所存在的胞內位置及作用仍不清楚。而 *H. pylori*⁺ 黏膜相關淋巴組織淋巴瘤患者組織切片染色發現 CagA 表現在細胞的細胞核區域，因此，本研究想探討 CagA 進入細胞內的位置以及 CagA 是否會進入 B 細胞核內。我們將 B 細胞株轉染 CagA 質體 DNA 或與胃幽門桿菌共同培養，皆觀察到 CagA 有在細胞質和細胞核中，證明了 CagA 分布在細胞質與細胞核內，同樣於胃上皮細胞 AGS 細胞株中觀察到 CagA 分佈在細胞核內的結果，同時也發現到細胞核中的 CagA 表現量比細胞質多，代表 CagA 在細胞核內具有一定的角色。再製作不同片段的 CagA 質體 DNA 轉染進 AGS 細胞中，觀察 CagA 進核的方式，我們發現到 CagA 的磷酸化修飾的有無對於 CagA 進入細胞核中並沒有影響，胺基端序列對於 CagA 進入細胞核有重要性的角色，我們再利用 CagA 抗體作免疫沉澱法，發現細胞核內 phospho-CagA 與 SHP-2 可共沉澱在一起，顯示它們具有交互作

用，但是，幫助 CagA 進入細胞核確切的片段和 CagA 在細胞核中主要的角色仍需要深入探討。希望將來我們的研究結果對於 CagA 如何造成 B 淋巴細胞的活化將具有重要的啟發與貢獻。



Abstract

Helicobacter pylori could cause gastritis, duodenal ulcer, and gastric cancer. CagA is regarded as a master virulent factor. CagA of *H. pylori*, a 120-145 kDa protein, is injected into gastric epithelial cells cytoplasm by type IV secretion system, which is accomplished by pilus and the *cag* PAI genes. Furthermore, the cytoplasmic CagA is phosphorylated by eukaryotic Src family kinase and Abl kinase. The phospho-CagA interacts with SHP-2 which becomes constitutive activated. The activated SHP-2 not only dephosphorylates focal adhesion kinase but also disrupts the E-cadherin and β -catenin pathway, leading to destroy the epithelial cell-cell junction. It is characterized by the spreading and elongated filopodia called hummingbird phenotype. The aberrant constitutive activation of SHP-2 is associated with tumor formation, therefore, CagA is considered as an oncoprotein. In the previous study, our lab firstly demonstrates that CagA could be directly translocated into human B lymphocytes from *Helicobacter pylori*. CagA is also phosphorylated in the cytoplasm, and then the phospho-CagA could bind to the phosphatase SHP-2. CagA activates p38, Erk, and anti-apoptosis molecules, Bcl-2 and Bcl-XL.

However, it is unclear about the intracellular location and the function of translocated CagA in B lymphocytes. In our previous study, it showed that CagA co-localized in nucleus in the immunohistochemistry staining of *H. pylori*⁺ mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma patients. Therefore, we want to study the intracellular location of CagA and to prove whether CagA would translocate into nucleus in B lymphocytes. We used B cells transfected with CagA plasmid or co-cultured with *H. pylori*, isolating the cytosolic and nuclear fraction. Our results indicated CagA could be detected in both cytoplasm and nucleus in B lymphocytes.

Similarly, we also observed CagA could be translocated in nucleus of gastric epithelial cell lines, AGS cells. The expression of CagA is more abundant in nucleus than in the cytoplasm. Our results suggest that CagA may have an important role in the nucleus. By transfecting different truncated CagA plasmids into AGS cells, we reveal phosphorylation is not required for CagA nuclear translocation. CagA nuclear translocation is dependent on the fragment of CagA amine-terminus. We also isolated the nuclear fraction, and we demonstrated that nuclear translocated CagA co-immunoprecipitated with SHP-2. But the specific amine-terminal sequences for nuclear translocation and the role of CagA in nucleus is still needed to be investigated. Our results in this study will provide a crucial insight and contribution on CagA-induced B lymphocytes activation.



目錄

| | |
|---|-----|
| 致謝..... | i |
| 中文摘要..... | i |
| Abstract..... | iii |
| 1. 胃幽門桿菌簡介..... | 1 |
| 2. CagA 與第四型分泌系統..... | 1 |
| 3. Phospho-CagA 和 SHP-2..... | 2 |
| 4. CagA 與 MALT lymphoma..... | 3 |
| 5. CagA 可以 translocate 至 B 細胞..... | 3 |
| 研究動機與目的..... | 5 |
| 實驗方法與材料..... | 6 |
| 1. 實驗方法..... | 6 |
| 2. 實驗材料..... | 8 |
| 實驗結果..... | 13 |
| 1. CagA 進入細胞後，可存在於真核細胞的細胞核中..... | 13 |
| 2. 胃幽門桿菌將 CagA 注入真核細胞的細胞質和細胞核中..... | 13 |
| 3. CagA 進入細胞核的方式..... | 14 |
| (1) CagA 進入細胞核的方式是 Phosphorylation-independent..... | 14 |
| (2) 胺基端序列具有決定 CagA 進入細胞核的角色..... | 15 |
| 4. 在細胞核內，SHP-2 分子與 CagA 有交互作用..... | 16 |
| 結果討論..... | 17 |
| 1. 在宿主細胞內的胃幽門桿菌 CagA 分子可以被轉運至細胞核內..... | 17 |
| 2. 胺基端對 CagA 轉運至細胞核內是重要的..... | 17 |

| | |
|------------------------|----|
| 3. CagA 在細胞核內的角色 | 18 |
| 4. 結論 | 19 |
| 參考文獻 | 20 |
| 圖表說明 | 24 |



研究背景

1. 胃幽門桿菌簡介

胃幽門桿菌於 1982 年由 Robin Warren 和 Barry Marshall 所分離出，和 *Campylobacter* 有所不同，屬於格蘭氏陰性的桿狀細菌，適於生長在攝氏 37 度的厭氧環境中(Marshall and Warren, 1984)，有 4~6 根鞭毛，以方便和宿主細胞交互作用及移動；世界上百分之五十的人口胃部組織中有胃幽門桿菌存在，在未致病前稱為潛伏階段，一旦黏膜組織發生受損、產生傷口，加上胃酸酸鹼值提高，使得胃幽門桿菌增殖，在免疫系統無法有效清除和防禦的狀況下，造成胃潰瘍、胃炎和胃癌等疾病，而胃癌是癌症第二大致死的疾病(Hatakeyama, 2004)，根據臨床研究指出，感染胃幽門桿菌的病患具有高風險的機會的到胃癌(Forman et al., 1991; Rugge et al., 1999)，也跟引起 gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma 有相當大的關聯性。

胃幽門桿菌的染色體含有一個約為 40 kb 的 cytotoxin-associated gene pathogenicity island(Cag PAI)基因座，可轉錄出三十多個基因分子，根據有無 cag 基因與否可將胃幽門桿菌分成第一型(cag⁺ strain)胃幽門桿菌和第二型(cag⁻ strain)胃幽門桿菌(Covacci, 1999)，然而，第一型胃幽門桿菌又比第二型胃幽門桿菌更可能導致胃癌發生(Parsonnet et al., 1997)；其中，在 cag PAI 基因座中有一個 120-145 kDa 的蛋白質 Cytotoxin-associated gene A(CagA)，目前被認為是主要的致癌基因，在 CagA 基因轉殖的小鼠實驗中，證明 CagA 可以造成腫瘤的生成(Ohnishi et al., 2008)，但 CagA 確切的致癌機制仍未清楚。

2. CagA 與第四型分泌系統

細菌可透過不同的分泌系統將細菌分子注入宿主細胞中，利用這些有害的蛋白分子，進而改變宿主細胞訊息傳遞，調控腸道組織免疫系統和環境(Ashida et al., 2012)。例如:enteropathogenic *Escherichia coli* 利用第三型分泌系統，經由

鞭毛運輸結構將 Tir 分子注入宿主細胞中，造成 actin remodeling，形成偽足型態(Kenny et al., 1997)。在先前的研究指出，胃幽門桿菌是利用第四型分泌系統將致癌分子 CagA 注入宿主細胞中，這個過程是透過纖毛上的分子和宿主細胞交互接合形成建橋，線毛上的蛋白分子 CagY、CagL 和宿主細胞的 integrin $\alpha 5\beta 1$ 結合，而 CagH 和 CagI 形成 100~200 nm 線毛通道後(Kwok et al., 2007; Shaffer et al., 2011; Terradot and Waksman, 2011) 形成聯結的結構，CagE (ATPase)負責提供能量，此時，CagA 分子進入宿主細胞中作用。

3. Phospho-CagA 和 SHP-2

CagA 羧基端附近有 EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)胺基酸序列，可被宿主細胞的磷酸酶 SFK(Src family kinase)和 Abl kinase 磷酸化，形成 phosphotyrosine-CagA (Asahi et al., 2000; Stein et al., 2002)，胃上皮細胞在感染 *H. pylori* 短時間內，主要是由 Src family kinase 將注入宿主細胞內 CagA 的 EPIYA-C 或 EPIYA-D 磷酸化，而 Abl kinase 則負責晚期 CagA EPIYA motif 磷酸化作用(Mueller et al., 2012)。胃上皮細胞中，phospho-CagA 可和 SHP-2 的羧基端及胺基端 SH2 domain interaction，導致 PTP (protein tyrosine phosphatase) domain 釋出，形成活化態(Higashi et al., 2002; Ren et al., 2006)，引起下游分子傳遞，導致 focal adhesion kinase 去磷酸化，形成去活化態，造成細胞與細胞之間的接合作用發生改變，形成延長狀的偽足型態，稱之為 humming bird(Stein et al., 2002)；phospho-CagA 也可和 Csk (C-terminal Src kinase)交互作用，進而磷酸化 SFK，而磷酸化的 SFK 形成去活化態，影響 CagA-SHP2 結合，因此，Csk 被認為具有負調控的功能(Hatakeyama, 2004; Jones et al., 2010; Murata-Kamiya, 2011)。在體外細胞轉染實驗中，也發現一段表現在 EPIYA motif 之間或下游的高保留 CagA multimerization 序列，調控著 CagA 和 SHP-2 之間的交互作用(Murata-Kamiya, 2011; Ren et al., 2006)；除此之外，在 *in vitro* Hep-2 細胞實驗

和 *in vivo* 老鼠實驗中，證明未磷酸化的 CagA 可引起促進癌化分子 STAT3 訊息傳遞(Bronte-Tinkew et al., 2009; Lee et al., 2010)。

4. CagA 與 MALT lymphoma

胃幽門桿菌和 MALT lymphoma 有百分之九十的關聯性，以抗生素去除胃幽門桿菌治療第一期 low-grade MALT lymphoma，可以得到有效得改善(Gisbert and Calvet, 2011)。研究也指出感染胃幽門桿菌的 C57BL/6 老鼠，十三個月後在腎臟、脾臟以及肝臟皆有細胞浸潤的情形，黏膜組織有淋巴瘤產生(Wang et al., 2000)；在表現 CagA 基因轉殖老鼠中發現，十八個月後老鼠在腸胃道有癌細胞的生成，並且有 B 淋巴細胞瘤產生(Ohnishi et al., 2008)；目前認為胃幽門桿菌 CagA 可以抑制 B 淋巴細胞的 p53 累積、增加 phospho-Erk、增加 phospho-p38、Bcl-2 和 Bcl-XL(Lin et al., 2010; Umehara et al., 2003; Zhu et al., 2007)，抑制細胞凋亡，影響 B 淋巴細胞的存活，這樣的分子訊息傳遞作用，有可能發展成 MALT lymphoma。

5. CagA 可以 translocate 至 B 細胞

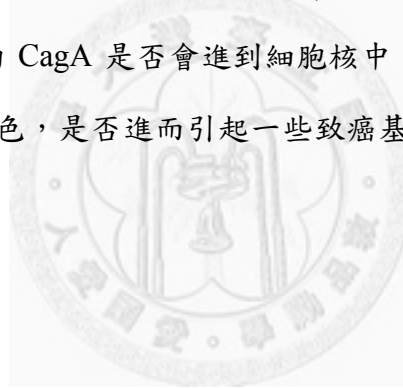
先前的研究指出胃幽門桿菌會吸引 T helper type 1 (Th1)細胞並且浸潤到胃幽門桿菌感染的發炎區域，分泌發炎的細胞素造成胃表皮細胞的損傷(Bamford et al., 1998)；同時胃幽門桿菌利用纖毛結構依附在胃表皮細胞將 CagA 分子送入細胞中，引起細胞內分子訊息傳遞，然後引發導致疾病的可能性。胃幽門桿菌的感染和胃部的黏膜相關淋巴瘤有相關性，但胃幽門桿菌是否會直接作用於 B 淋巴細胞上，造成胃部黏膜相關淋巴瘤的產生尚未清楚，我們實驗室之前發表的研究，第一個證明胃幽門桿菌會與 B 淋巴細胞作用，直接將 CagA 注入 B 淋巴細胞內，在細胞內進行酪胺酸的磷酸化，和 SHP-2 交互作用，並且活化 Erk 與 p38，活化抗凋亡因子 Bcl-2 和 Bcl-XL(Lin et al., 2010)，防止細胞的死亡，

推測胃幽門桿菌是藉由減少 B 淋巴細胞的死亡，而造成黏膜相關淋巴瘤的產生。



研究動機與目的

胃幽門桿菌會造成胃炎、胃潰瘍、胃癌和 MALT lymphoma，其中，MALT lymphoma 是在胃部組織的 B 淋巴細胞發生病變，所產生的淋巴癌，但是，胃幽門桿菌 CagA 究竟是如何導致循環到胃部組織中的 B 淋巴細胞發生病變情形，仍在研究當中。在體外細胞研究發現，胃幽門桿菌活化 B 淋巴細胞，也同樣地利用第四型分泌系統將 CagA 轉移到 B 淋巴細胞細胞質中，增加抗凋亡分子 Bcl-2 和 Bcl-XL 表現，另外，CagA 在細胞質中可以被磷酸化，形成 phospho-CagA 和 SHP-2 交互作用，並引起 MAPK 活化，促進 B 淋巴細胞的增生和抗凋亡(Lin et al., 2010)，因此和 MALT lymphoma 有的關聯性(Gisbert and Calvet, 2011)。同時，在病患組織切片圖中，發現 CagA 的表現位置與細胞核重疊(Lin et al., 2010)，因此，想要探討在 B 細胞，胃幽門桿菌的 CagA 是否會進到細胞核中，進入細胞核的機制為何，又具有什麼樣的作用和角色，是否進而引起一些致癌基因或增生分子等現象。



實驗方法與材料

1. 實驗方法

轉染(Transfection)

收集 8×10^6 L428 細胞，以 1500 rpm 離心 3 分鐘後，用 1 ml DPBS 清洗，移至 1.5 ml 微量離心管中，經 5000 rpm 離心 5 分鐘，取 96 μ l resuspension buffer (NeonTM, Invitrogen) 均勻沖開細胞，加入 12 μ g 質體 DNA，利用 electroporator，以電壓 1350V、電擊時間 40 ms，將質體 DNA 送入細胞內，於 24 小時收集細胞，利用西方墨點法分析目標蛋白質表現量。

1.5 ml 無血清的 RPMI 1640 培養液加入 60 μ l lipofectamine 2000，均勻混合靜置 5 分鐘，加入含有 20 μ g 質體 DNA 的 1.5 ml 無血清 RPMI 1640 培養液，均勻混合靜置 15 分鐘，加入 4×10^6 AGS 細胞中(含有 15 ml RPMI 1640 培養液)，5 小時後，更換培養液，於時間點收集細胞質與細胞和萃取液。

分離細胞萃取液(Isolation of cell extracts)

以 MOI=100 的方式將 26695 胃幽門桿菌和 1×10^6 BJAB 細胞共同培養於 10% 牛血清蛋白的 RPMI 培養液中，5 小時後，分別加入 gentamicin(200 μ g/ml) 或培養液，於 24、48、72 及 96 小時，將細胞沖洗下，用 1300 rpm 的速度離心 5 分鐘，將細胞離心收集。去除上清液後，利用 1 ml PBS 重新懸浮細胞並再次將細胞離心收集，(A)細胞總萃取液:去除上清液之後加入 100 μ l 均質緩衝液打破細胞。打破細胞後，待 30 分鐘，將樣本於 4^oC 5000 rpm 離心 5 分鐘後，取上清液保存在 -80^oC 中備用。(B)細胞質、細胞核萃取液: 去除上清液之後加入 100 μ l 的低張均質溶液打破細胞，待 1 分鐘後，將樣本於 4^oC 5000 rpm 離心 5 分鐘，取出 60 μ l 細胞質萃取液，其餘細胞沉澱物以低張均質溶液沖洗三次，並於 4^oC 5000 rpm 離心，捨去上清液，最後，以 20 μ l RIPA buffer 打破細

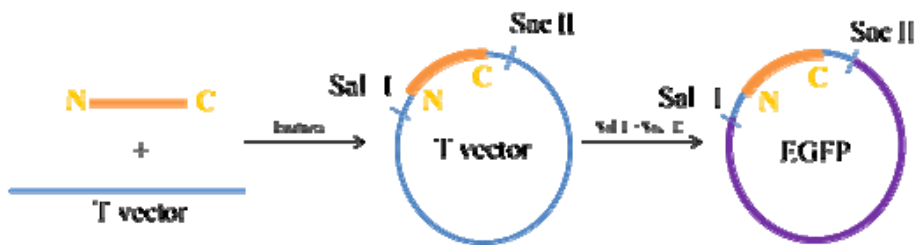
胞，30 分鐘後，將樣本於 4°C 5000 rpm 離心 5 分鐘後，取上清細胞核萃取液保存在 -80°C 中備用。

免疫螢光染色法(Immunofluorescence staining)

以 MOI=100 的方式將 26695 胃幽門桿菌和 1.6×10^6 BJAB 細胞共同培養於 10% 牛血清蛋白的 RPMI 培養液中，5 小時和 24 小時後，收將細胞沖洗下，用 1300 rpm 的速度離心 5 分鐘，將細胞離心收集。去除上清液後，利用 1 ml DPBS 重新懸浮細胞並再次將細胞離心收集，以 1 ml FACS 溶液清洗並懸浮細胞，離心後，用 0.3M glycine 的 4% 甲醛固定細胞半小時，1 ml DPBS 清洗和離心三次，將細胞黏附於 poly-L-lysine 的蓋玻片上，染 IgM 30 分鐘後，用 0.1 % saponin FACS 溶液穿孔細胞 30 分鐘，再依序染 EGFP 和細胞核，利用 mounting buffer 和指甲油封片，待乾後，於共軛焦顯微鏡觀察。

製作 truncated CagA plasmid

利用 taq polymerase 和 primer 放大 NCTC 11637 CagA template 片段，將 PCR 片段和 T vector 接合，放於 4°C 冰箱 16 小時；ligation product 加到 XCL-blue competent cell 中，混合均勻，放於室溫 15 分鐘，依 heat shock protocol(一分鐘 42°C，兩分鐘 4°C)，於無菌操作台內操作，加入 1 ml LB broth，放於 37°C incubator 30 分鐘，1300 rpm 離心 30 秒，留下約 100 μ l 上清液，與沉澱物混合後，塗於 Amp agar plate，放在 37°C incubator 16 小時；挑 colony 種於 3 ml LB broth 16 小時，抽取 plasmids，將正確接合方向的 plasmid，以 Sal I 和 Sac II 切下帶有 restriction enzyme site 的 PCR 片段，接合至 EGFP-C1 plasmids 上，轉型至 competent cell 中，於 kanamycin plate 塗盤，挑選 colony 放大 plasmid。



免疫沉澱法

先去除可與 beads A 結合的非專一性的蛋白，將萃取液加入 20 μ l beads A 於 4°C 迴轉式試管混合器反應十分鐘，以 4°C 13000 rpm 離心五分鐘，將懸浮液移至微量離心管中，將萃取液做蛋白質定量後，加入抗體於 4°C 迴轉式試管混合器反應 2 小時，以 4°C 13000 rpm 離心至最高轉速後，加入 20 μ l beads A 於 4°C 迴轉式試管混合器反應四十五分鐘，4°C 13000 rpm 離心三十秒，丟棄懸浮液後，加入 1 ml lysis buffer 清洗，重覆三次，最後加入 SDS sample buffer，100°C 反應 10 分鐘，即可做 SDS 膠體電泳，西方點墨法分析。

2. 實驗材料

細胞株和菌種

使用 BJAB、L428 和 AGS 細胞株，培養於 10% FBS 的 RPMI 1640 培養液、5% 二氧化碳、攝氏 37 度培養箱中。胃幽門桿菌 26695 及 26695 cagA-EGFP knock-in 菌種培養於綿羊血盤上，放置於含有 10% 二氧化碳、5% 氧氣、85% 氮氣、攝氏 37 度的厭氧箱中，分盤培養兩天後，將菌種刮下，種於含有 10% 牛血清蛋白的 Brucella broth 中，培養 16 小時，與細胞共同培養。

抗體

Anti-rabbit IgG-HRP

Cell signaling

Anti-mouse IgG-HRP

Cell signaling

| | |
|------------------------------------|----------------|
| Anti-human IgM-Texa red | Rockland |
| Anti-mouse FITC | Rockland |
| Anti-SHP-2 (C-18) | Santa Cruz |
| Rabbit anti-HDAC1 | Cell signaling |
| Rabbit anti-alpha-tubulin | Genetex |
| Mouse anti-CagA (A-10) | Santa Cruz |
| Mouse anti-phospho-tyrosine (pY99) | Santa Cruz |
| Mouse anti-actin | Chemicon |
| Mouse anti-GFP | MBL |

培養液與試劑

RPMI1640 培養液

RPMI1640 culture medium containing 10% FBS

Brucella broth

2.8 % Brucella broth powder dissolved in ddH₂O, autoclaved, and then add 10% FBS, 6 µg/ml Vancomycin and 2 µg/ml Amphotericin B

BHI based blood agar plate

Autoclaved 5.2 % BHI agar, 10 % sheep blood, 6 µg/ml Vancomycin and 2 µg/ml Amphotericin B

Triton X-100 lysis buffer

1 % Triton-X, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA in ddH₂O

RIPA buffer

50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.1 % SDS, 1 % Sodium deoxycholate

Hypotonic buffer

3 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH=7.4), 0.5 % NP-40, 2 mM EDTA

Hypotonic wash buffer

3 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH=7.4)

FACS buffer

DPBS containing 1% FBS

1X PBS

100 Mm Na₂HPO₄, 18 Mm KH₂PO₄, 0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, pH =7.4

4X SDS sample buffer (Western blotting)

200 Mm Tris-HCl (pH =6.8), 200Mm DTT, 0.4 % Bromophenol blue, 40 % Glycerol, 8 %SDS

10X running buffer (Western blotting)

192 Mm Glycine, 25 Mm Tris-HCl, 1 % SDS, pH=8.3

10X transfer buffer (Western blotting)

195 Mm Glycine, 240 Mm Tris-HCl, 1.185 % SDS, pH =8.4. Dilute before use with ddH₂O and add 20 % Methanol

10X wash buffer (Western blotting)

100Mm Tris-HCl (pH =7.4), 9 % NaCl, 2 % Tween-20

Primer

| | | |
|----------------|---------|-----------------------------|
| Truncated CagA | 5'→3' | |
| CagA1-892 | Forward | atgactaacg aaactattga ccaa |
| | Reverse | ttaaattgggt tcgttttcca gtcc |

| | | |
|---------------|---------|----------------------------|
| CagA1-1094 | Forward | atgactaacg aaactattga ccaa |
| | Reverse | tcagagcttg tctatcgttt gctc |
| CagA1083-1247 | Forward | atgttttta gcaatctaga gcaa |
| | Reverse | ttaagatttt tggaaaccac ctt |

化學藥品

| | |
|--|-----------------------|
| Acetic acid | Merck |
| Agarose | BMA |
| Ammonium persulfate (APS) | Fluka Biochemica |
| Amphotericin B | Sigma-Aldrich |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich |
| Acrylamide | SERVA |
| β -mercaptoethanol (2-ME) | Sigma-Aldrich |
| Bovine serum albumin (BSA) | BioShop |
| Brain Heart Infusion agar (BHI agar) | Becton Dickinson |
| Brucella broth | Becton Dickinson |
| Dimethyl sulfoxide | Sigma-Aldrich |
| Dulbecco's phosphate-buffered saline (10X) | GIBCO |
| Fatal bovine serum (FBS) | Biological Industries |
| Glycerol | Sigma-Aldrich |
| Glycine | USB |
| Gentamicin | MDBio |
| Kanamycin | MDBio |
| Magnesium chloride (MgCl ₂) | BioShop |
| Methanol | Merck |

| | |
|--|------------------|
| Miller's LB broth | Becton Dickinson |
| Poly-L-lysine | Sigma-Aldrich |
| Sheep Blood | 銳誠企業股份有限公司 |
| Sodium bicarbonate (NaHCO ₃) | USB |
| Sodium chloride (NaCl) | USB |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) | SERVA |
| Tris-base | USB |
| Triton-X | USB |
| Trypan blue | Sigma-Aldrich |
| Tween-20 | USB |
| TEMED | USB |
| Vancomycin | Sigma-Aldrich |



實驗結果

1. CagA 進入細胞後，可存在於真核細胞的細胞核中

本實驗室先前的研究結果顯示 CagA 可以 translocate 至 B 淋巴細胞內，暗示著 CagA 可能導致 low-grade MALT lymphoma 的形成。且在 *H. pylori*⁺ MALT lymphoma 患者組織切片染色發現 CagA 似乎表現在細胞核區域(Lin et al., 2010)，但是，切片組織中沒辦法區分 CagA 究竟是表現在哪種細胞上，也沒辦法排除是平面重疊影像，所造成細胞質的 CagA 表現在細胞核的結果。而且，目前對於 CagA 在細胞內的位置仍不清楚。為了確認 CagA 會進入細胞核內，我們利用電穿孔的方式將 EGFP-CagA 質體 DNA 轉染進入 L428 B 細胞株內，於 24 小時後，分離細胞質與細胞核萃取液，以 SDS 膠體電泳和西方點墨法，觀察 CagA 是否會運送並表現在細胞核內，由圖一(A)結果顯示，不管是細胞質或細胞核，都有 CagA 的表現，並且細胞核內的 CagA 表現量比細胞質多；我們也嘗試將 EGFP-CagA 質體 DNA 以 lipofectamine 轉染進胃表皮細胞株 AGS 細胞中，想要確認 CagA 進入細胞核中的現象，是否只專一地表現在 B 淋巴細胞中，如圖一(B)顯示，EGFP-CagA 轉染 12 小時的時間點，表現量最多，因此，我們分離轉染 12 小時時間點的細胞質與細胞核萃取物，同樣地發現 CagA 存在細胞質與細胞核，又以細胞核中表現量較多，另外，值得注意的是，在細胞核中的 CagA 也有磷酸化修飾的現象，綜合以上實驗，我們證明了 CagA 的確可存在於細胞核內。

2. 胃幽門桿菌將 CagA 注入真核細胞的細胞質和細胞核中

為了證明自然生理狀況下，胃幽門桿菌的 CagA 會進入細胞核中，將 26695 胃幽門桿菌種在體外和 BJAB 細胞共同培養 5 小時後，處理 gentamicin 抗生素，並於 24、48、72 和 96 小時後，分離細胞質與細胞核萃取液，以 SDS 膠體電泳

和西方點墨法，觀察 CagA 是否會進入細胞核內並表現，由圖二(A)結果顯示，胃幽門桿菌會將 CagA 注入細胞質中，而且 CagA 大量表現在細胞核內，CagA 分子有磷酸化的修飾，隨著時間的增加，細胞核中 CagA 磷酸化也逐漸變多。為了進一步確認 CagA 會進入細胞核中，我們利用會表現出螢光之 CagA-EGFP knock-in 菌株 26695 CagA-EGFP 胃幽門桿菌種和 BJAB 細胞株共同培養 5 和 24 小時後，固定並染色，以共軛焦顯微鏡觀察 CagA 是否有進入細胞核內的情形，如圖二(B)影像圖顯示，發出綠螢光的 CagA 分子明顯地分布於細胞質與細胞核內，隨著時間的增加，有更多的 CagA 分子進入細胞核中；圖二(C)，胃表皮細胞 AGS 細胞株在胃幽門桿菌共同培養 24 小時，形成蜂鳥狀的表現型，CagA 分子分布於細胞質和細胞核中，細胞核的 CagA 分子表現量比細胞質多，不管是在細胞質或細胞核內，CagA 分子都有磷酸化修飾。圖二的結果，讓我們藉由生化分析及影像分析再次證明在胃幽門桿菌可將 CagA 注入真核細胞內，轉運於細胞質與細胞核中。

3. CagA 進入細胞核的方式

由圖一(B)和圖二(A) (C)我們發現到，CagA 分子在細胞核中有磷酸化的修飾，為了進一步探討，CagA 的磷酸化是否對於進入細胞核是必須的，我們建立出 CagA 磷酸化之突變菌株以確認這些磷酸化是必須的。

(1) CagA 進入細胞核的方式是 Phosphorylation-independent

EPIYA-motif 是由 Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala 胺基酸序列所組成的片段，其中，真核細胞的 tyrosine 磷酸酶可以磷酸化 CagA EPIYA-motif 的 tyrosine 胺基酸，為了探討磷酸化是否影響 CagA 進入細胞核，因此，將 EGFP、EGFP-CagA 和 EGFP-PR-CagA (EGFP-phosphorylation resistance-CagA) 質體 DNA，利用 lipofectamine 2000 將 CagA 質體 DNA 轉染入 AGS 胃表皮細胞株內，於 12 小時後，分離細胞質與細胞核萃取液，以西方點墨法觀察 CagA 分子是否會運送

並表現在細胞核內，如圖三顯示，不管是 EGFP-CagA 或 EGFP-PR-CagA 都表現於細胞質與細胞核中，CagA 在細胞核中的表現量都比細胞質多，代表不管 CagA 分子有無磷酸化，都可以進入細胞核中，而 CagA 進入細胞核的方式是 phosphorylation-independent。

根據圖三結果顯示 CagA 是透過 phosphorylation-independent 的方式進入細胞核中，想要更進一步探討 CagA 分子的哪一段片段會幫助 CagA 進入細胞核中，因此我們製作不同的 truncated CagA 質體 DNA，分別探討 CagA 分子胺基端、EPIYA 和 CM motif 以及羧基端對於 CagA 分子進入細胞核的影響，圖四(A)以 NCTC11637 CagA 為模板，製作 truncated CagA 質體 DNA，如圖四(B)所示，為了確認 truncated CagA 質體 DNA 的表現，我們將 truncated CagA plasmid 轉染至 293T 細胞，CagA1-1094 和 full length CagA 因具有 EPIYA motif 可被磷酸化，藉由 EGFP 抗體確認 EGFP-CagA1-892、EGFP-CagA1-1094、EGFP-CagA1083-1247 融合蛋白分子量分別為 127、149、47 kDa。

(2) 胺基端序列具有決定 CagA 進入細胞核的角色

為了探討 CagA 是透過哪一片段的作用，進入細胞核內，因此將不同的 truncated CagA plasmid，利用 lipofectamine 將 CagA 質體 DNA 轉染入 AGS 細胞內，於 12 小時後，分離細胞質與細胞核萃取液，用西方點墨法觀察不同 CagA 片段是否會運送並表現在細胞核內，分別轉染 EGFP-CagA1-892(只含胺基端)、EGFP-CagA1-1094(含有胺基端和 EPIYA-motif)和 EGFP-CagA1083-1247(只含羧基端)，EGFP 及 EGFP-CagA (full length CagA)當作對照組，如圖三(D)顯示，EGFP-CagA1-892 和 EGFP-CagA1-1094 與 EGFP-CagA 一樣，表現於細胞質與細胞核中，代表 EPIYA-motif 和 CM motif 的與否和 CagA 進入細胞核是無關的，而 EGFP-CagA1083-1247 大量表現於細胞質，不同於其他 truncated CagA plasmid，只有少部分存在於細胞核，顯示出只含羧基端的 CagA 大部分會存在細胞質中，比較這些 truncated CagA 質體 DNA 和細胞質細胞核表現量之後，

我們發現只要含有胺基端的 CagA 會大量表現於細胞核內，因此，我們推測胺基端序列具有讓 CagA 進入細胞核的功能。

4. 在細胞核內，SHP-2 分子與 CagA 有交互作用

為了更清楚瞭解 CagA 分子在細胞核中的作用，是否與其他分子有交互作用，我們將 L428 細胞和胃幽門桿菌共同培養之後，分離細胞核萃取物，利用 CagA 抗體做免疫沉澱法，如圖五所示，我們發現在細胞核內的 CagA 和 SHP-2 可共沉澱在一起，顯示彼此之間有交互作用，代表著 SHP-2 在 phospho-CagA 影響下，一起進入細胞核中，但是 CagA 和 SHP-2 進入細胞核的作用還未清楚。



結果討論

1. 在宿主細胞內的胃幽門桿菌 CagA 分子可以被轉運至細胞核內

CagA⁺胃幽門桿菌與十二指腸潰瘍、胃潰瘍和胃癌有關，也與發生在胃部黏膜組織的淋巴癌相關，有趣的是，根據病理部提供的 MALT lymphoma 病患組織切片(Lin et al., 2010)，我們發現到 CagA 似乎與細胞核的位置重疊，為了驗證 CagA 是否有進入細胞核中，我們分別利用轉染、共同培養以及共軛焦顯微鏡影像的實驗，證明 CagA 有在細胞核中的現象，並且發現細胞核中 CagA 分子的表現量比細胞質來的多。由於，胃幽門桿菌與細胞共同培養時，胃幽門桿菌會緊密地與細胞膜黏附在一起，很難排除黏附在細胞膜上的胃幽門桿菌於細胞質與細胞核萃取液，但是，根據轉染質體 DNA 實驗，我們排除共同培養時的疑慮，仍然發現 CagA 分子分布於細胞核，代表 CagA 分子確實有在細胞核中，CagA 分子在細胞核中也具有重要的角色。在我們共軛焦顯微鏡的結果顯示綠色螢光 CagA 分子在細胞質較多，與西方點墨法 CagA 分子表現在細胞核較多的結果不同，推測是因為 construct 質體 DNA 轉染至細胞中，如圖四(B)顯示，EGFP-CagA 分子會表現出兩個分子(145 kDa、120 kDa)，可能是由於 EGFP-CagA 分子與 CagA 分子表現分布有所不同，造成圖二(B) EGFP-CagA 分子分布於細胞質較多的結果，為了排除這樣的疑慮，可在細胞與野生型胃幽門桿菌共同培養，用 CagA 抗體染色，以共軛焦顯微鏡觀察。

2. 胺基端對 CagA 轉運至細胞核內是重要的

根據圖三與圖四的結果，我們排除 CagA 進入細胞核是需要磷酸化修飾和 CM motif 的可能性，含有胺基端的 CagA 都會進入細胞核中，而且細胞核的表現量又比細胞質來的多，只含有羧基端的 CagA 在細胞中的表現量卻是細胞質比細胞核多，因此，我們推測 CagA 是透過胺基端的序列來調控進入細胞核。目前已知可以進入細胞核內的蛋白質，一類為新合成的蛋白質，胺基端具有細

胞核的運送訊息片段，細胞核上的通道蛋白依此片段，然後將蛋白質運送到細胞核內執行功能；另外一類為轉錄因子，這些轉錄因子透過磷酸化或抑制蛋白來調控進入細胞核的與否。在此，我們發現到胃幽門桿菌 CagA 分子會進入細胞核，但是，原核細胞蛋白質可以進入真核宿主細胞中的例子非常少見，只有在 *E. coli* 中發現調控 DNA 複製的 Tus 蛋白，具有哺乳類細胞核標的訊息胺基酸片段，且多為帶正電的胺基酸(Kaczmarczyk et al., 2010)，但是 CagA 與現今的蛋白質皆沒有相似性，胃幽門桿菌菌種 NCTC 11637 CagA 分子 70 到 78 胺基酸序列與 Tus 細胞核標的訊息胺基酸片段只有五個胺基酸相同。統整 Tus 細胞核標的序列與我們的實驗結果，接下來我們可以進一步探討 CagA 是藉由哪一段胺基端序列來調控 CagA 進入細胞核，是否主要由 CagA 分子 70~78 胺基酸序列調控進入細胞核的現象。

3. CagA 在細胞核內的角色

文獻指出 CagA 可以引起抗凋亡分子的產生(Lin et al., 2010; Umehara et al., 2003; Zhu et al., 2007)，推測 CagA 在細胞核內的角色是轉錄一些抗凋亡的分子，但是，CagA 是直接或間接地去引起轉錄仍未清楚。

在 HEP-2 細胞和蒙古沙鼠實驗中發現，CagA 可以活化 STAT3 進入細胞核內轉錄基因，這樣的現象是透過 CagA phosphorylation-independent 路徑，引起 gp130 和 IL-6R 形成二聚體結構，造成 STAT3 磷酸化，進入細胞核中 (Bronte-Tinkew et al., 2009)；在 CagA 分子影響下，gp130 受體藉由 JAK 磷酸化 STAT3，促進細胞遷移，而 phospho-CagA 則與 SHP-2 在 gp130 上交互作用，活化 MAPK/ERK 路徑，同時具有抑制 JAK 和 STAT3 活化的作用(Lee et al., 2010)，CagA 分子的磷酸化經由 gp130 來調控宿主細胞的訊息傳遞，形成一個負回饋調控路徑。另外，有趣的是，乳腺細胞在泌乳激素刺激下，去磷酸化酶 SHP-2 的 SH2 domain 可以維持轉錄因子 STAT5 的磷酸化，並且一起進入細胞

核中，結合在酪蛋白的啟動子序列上(Chughtai et al., 2002)，證明了 SHP-2 可以進入細胞核中，具有增加基因轉錄的角色。因此，我們推測 CagA 可能是伴隨轉錄因子 STAT3 或 SHP-2 分子一起進入細胞核中，影響細胞轉錄抗凋亡分子。先前研究指出，CagA 與 SHP-2 在細胞質中有交互作用，CagA 和 SHP-2 交互作用主要是透過 phospho-CagA 的磷酸化修飾和 SHP-2 的 SH2 domain 結合，而在我們的研究中，利用免疫沉澱法，發現細胞核內的 CagA 和 SHP-2 有交互作用，但是 SHP-2 和 CagA 之間在細胞核內的角色本篇研究尚未釐清，CagA 分子在細胞核內是否與 STAT3 直接地交互作用，有待將來做更深入的研究。

4. 結論

在此研究中，我們發現 translocated CagA 不僅表現在真核細胞質中，還表現於細胞核內，細胞核內 CagA 的表現量比細胞質多，同時，細胞核內的 CagA 具有磷酸化修飾，而 CagA 進入細胞核的方式是 phosphorylation-independent，主要是透過胺基端序列來調控是否進入細胞核中；另外，我們也利用免疫共沉澱法發現，細胞核內萃取液的 CagA 可共沉澱 SHP-2，代表 CagA 和 SHP-2 之間在細胞核內有交互作用，暗示著 CagA 進入細胞核內具有重要的功能和角色。

参考文献

Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., *et al.* (2000). *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* *191*, 593-602.

Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2012). Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol* *8*, 36-45.

Bamford, K.B., Fan, X., Crowe, S.E., Leary, J.F., Gourley, W.K., Luthra, G.K., Brooks, E.G., Graham, D.Y., Reyes, V.E., and Ernst, P.B. (1998). Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* *114*, 482-492.

Bronte-Tinkew, D.M., Terebiznik, M., Franco, A., Ang, M., Ahn, D., Mimuro, H., Sasakawa, C., Ropeleski, M.J., Peek, R.M., Jr., and Jones, N.L. (2009). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res* *69*, 632-639.

Chughtai, N., Schimchowitsch, S., Lebrun, J.J., and Ali, S. (2002). Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the beta-casein gene promoter in mammary cells. *J Biol Chem* *277*, 31107-31114.

Covacci, A. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* *284*, 1328-1333.

Forman, D., Newell, D.G., Fullerton, F., Yarnell, J.W.G., Stacey, A.R., Wald, N., and Sitas, F. (1991). Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer evidence from a prospective investigation. *BMJ* *302*, 1302-1305.

Gisbert, J.P., and Calvet, X. (2011). Review article: common misconceptions in the management of *Helicobacter pylori*-associated gastric MALT-lymphoma. *Aliment Pharmacol Ther* *34*, 1047-1062.

Hatakeyama, M. (2004). Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* *4*, 688-694.

Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and

Hatakeyama, M. (2002). SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295, 683-686.

Jones, K.R., Whitmire, J.M., and Merrell, D.S. (2010). A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. *Front Microbiol* 1, 115.

Kaczmarczyk, S.J., Sitaraman, K., Hill, T., Hartley, J.L., and Chatterjee, D.K. (2010). Tus, an *E. coli* protein, contains mammalian nuclear targeting and exporting signals. *PLoS one* 5, e8889.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511-520.

Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W., and Backert, S. (2007). *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449, 862-866.

Lee, I.O., Kim, J.H., Choi, Y.J., Pillinger, M.H., Kim, S.Y., Blaser, M.J., and Lee, Y.C. (2010). *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 285, 16042-16050.

Lin, W.C., Tsai, H.F., Kuo, S.H., Wu, M.S., Lin, C.W., Hsu, P.I., Cheng, A.L., and Hsu, P.N. (2010). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res* 70, 5740-5748.

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.

Mueller, D., Tegtmeyer, N., Brandt, S., Yamaoka, Y., De Poire, E., Sgouras, D., Wessler, S., Torres, J., Smolka, A., and Backert, S. (2012). c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Invest* 122, 1553-1566.

Murata-Kamiya, N. (2011). Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect* 13, 799-807.

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

Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., and Vogelmann, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40, 297-301.

Ren, S., Higashi, H., Lu, H., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2006). Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol Chem* 281, 32344-32352.

Rugge, M., Busatto, G., Cassaro, M., Shiao, Y.H., Russo, V., Leandro, G., Avellini, C., Fabiano, A., Sidoni, A., and Covacci, A. (1999). Patients younger than 40 years with gastric carcinoma. *Cancer* 85, 2506-2511.

Shaffer, C.L., Gaddy, J.A., Loh, J.T., Johnson, E.M., Hill, S., Hennig, E.E., McClain, M.S., McDonald, W.H., and Cover, T.L. (2011). *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS pathogens* 7, e1002237.

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

Terradot, L., and Waksman, G. (2011). Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. *The FEBS journal* 278, 1213-1222.

Umehara, S., Higashi, H., Ohnishi, N., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2003). Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 22, 8337-8342.

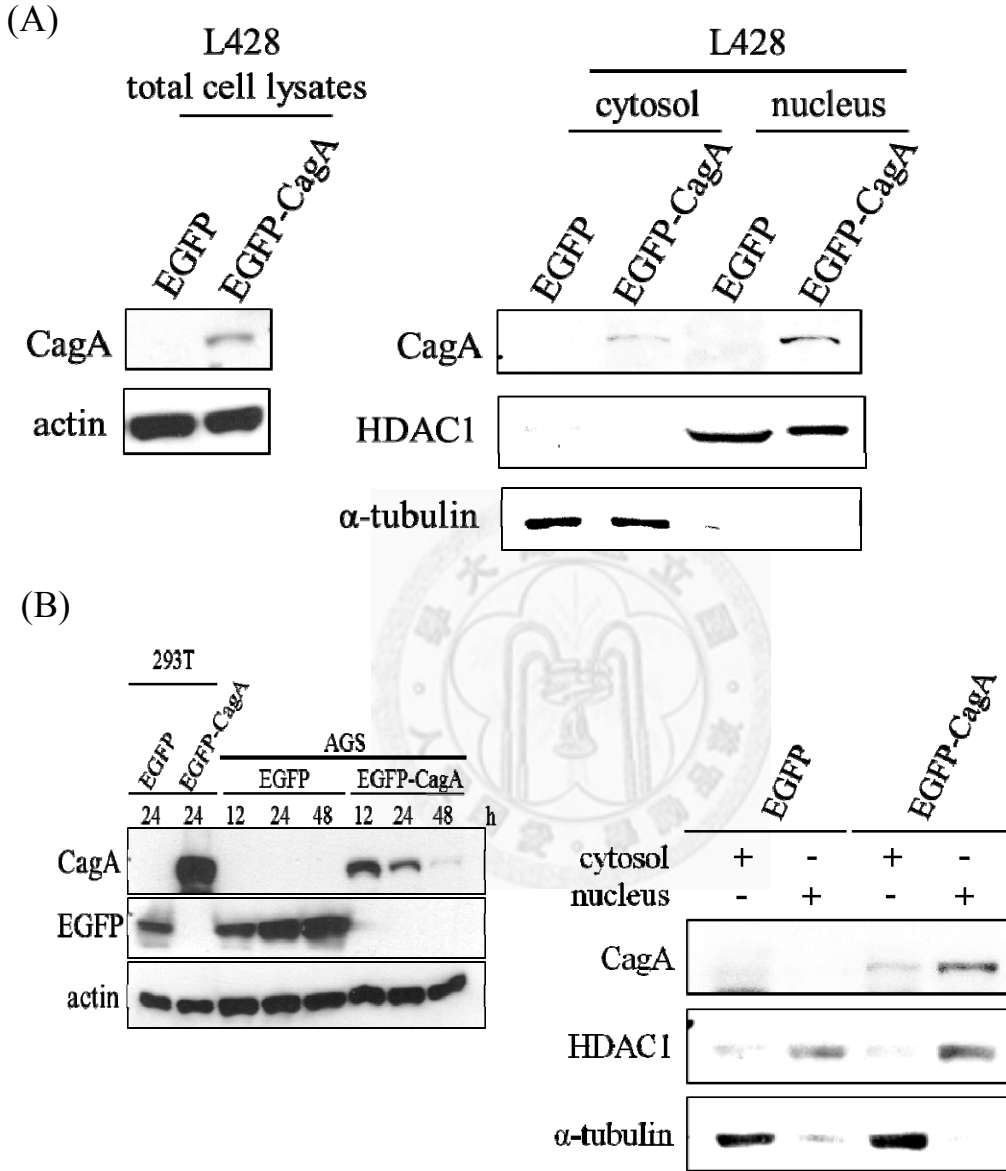
Wang, X., Willen, R., Andersson, C., and Wadstrom, T. (2000). Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *APMIS* 108, 503-508.

Zhu, Y., Wang, C., Huang, J., Ge, Z., Dong, Q., Zhong, X., Su, Y., and Zheng, S. (2007). The *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes Erk1/2-mediated Bad phosphorylation in lymphocytes: a mechanism of CagA-inhibited lymphocyte apoptosis. *Cell Microbiol* 9, 952-961.



圖表說明

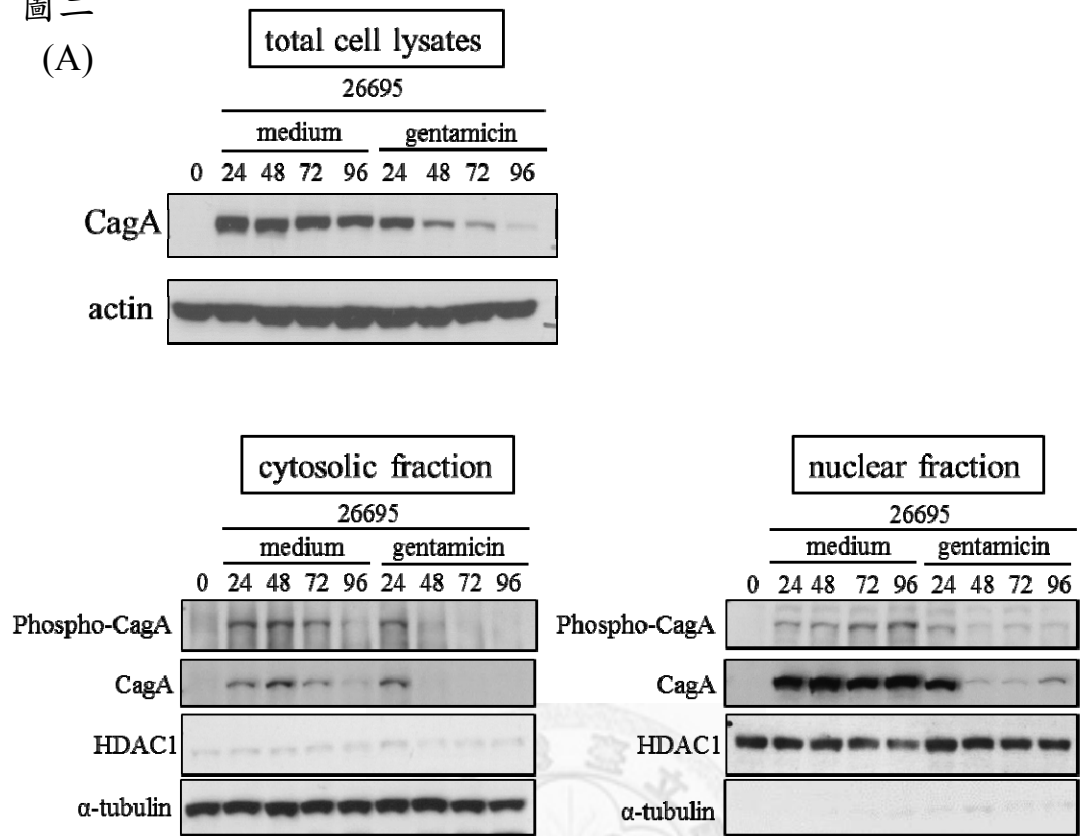
圖一



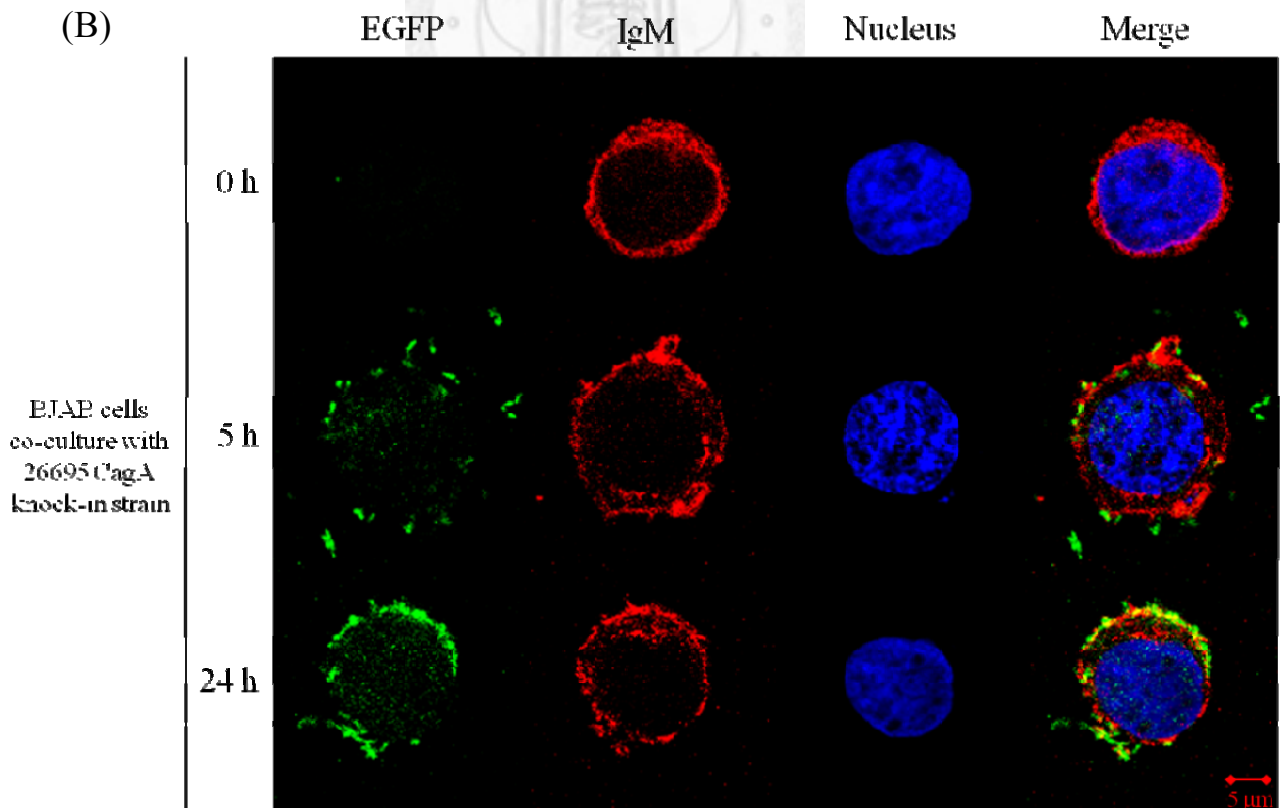
圖一、CagA 進入細胞後，可存在於真核細胞的細胞核中

(A) 8×10^6 L428 細胞，分別取 12 μ g EGFP 或 EGFP-CagA 質體 DNA 以電穿孔的方式轉染進細胞內，二十四小時後，分別收集細胞萃取液(左)或細胞質和細胞核萃取液(右) (B) 以 lipofectamine 轉染 6.7 μ g 質體 DNA 進入 1.6×10^6 AGS 細胞，分別收集細胞萃取液(左，293T 細胞為對照組)，收集轉染 12 小時細胞質和細胞核萃取液(右)，經 SDS 膠體電泳，轉漬於 PVDF 膜上，利用 pY99、CagA、actin、HDAC1 和 α -tubulin 抗體偵測蛋白質的表現。

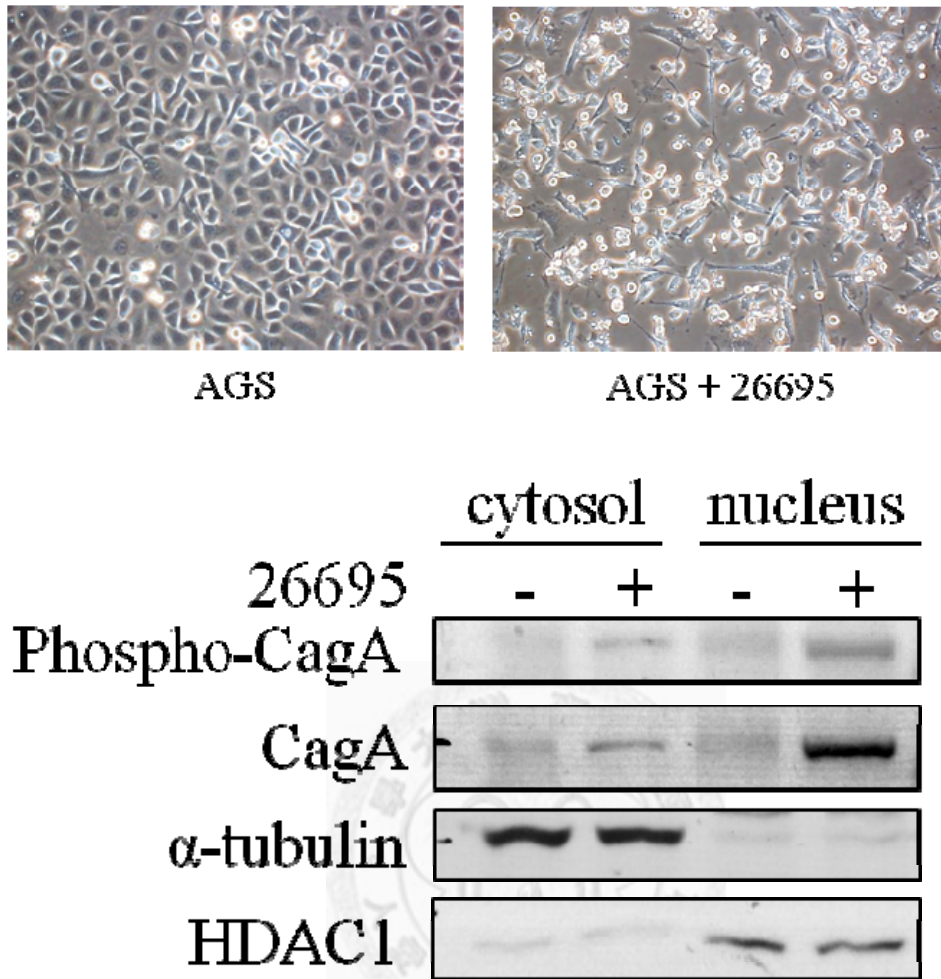
圖二
(A)



(B)



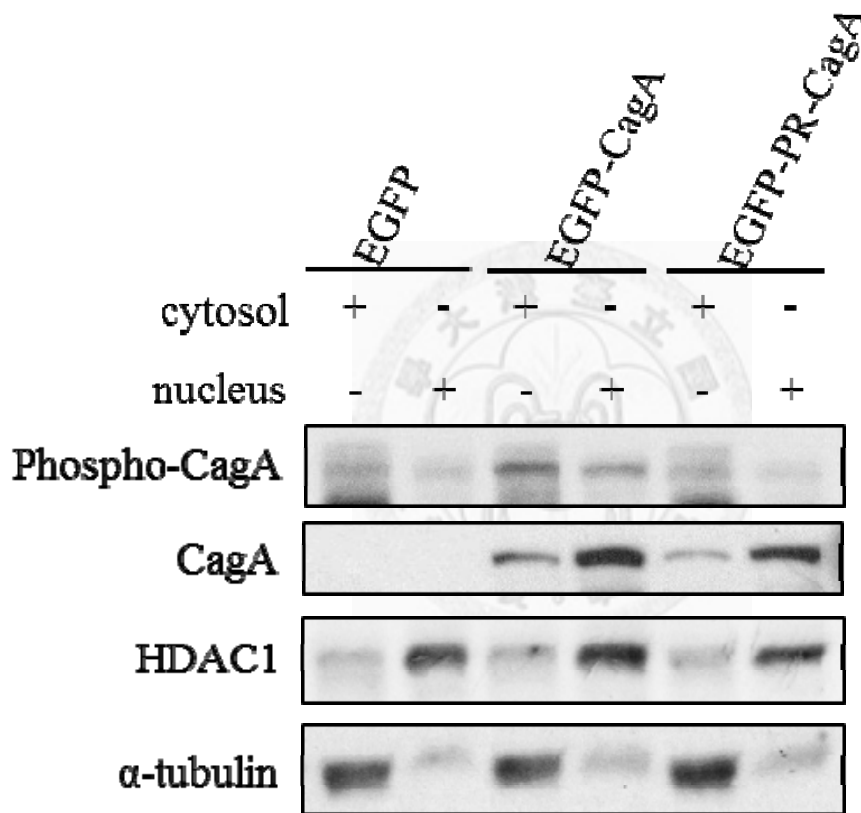
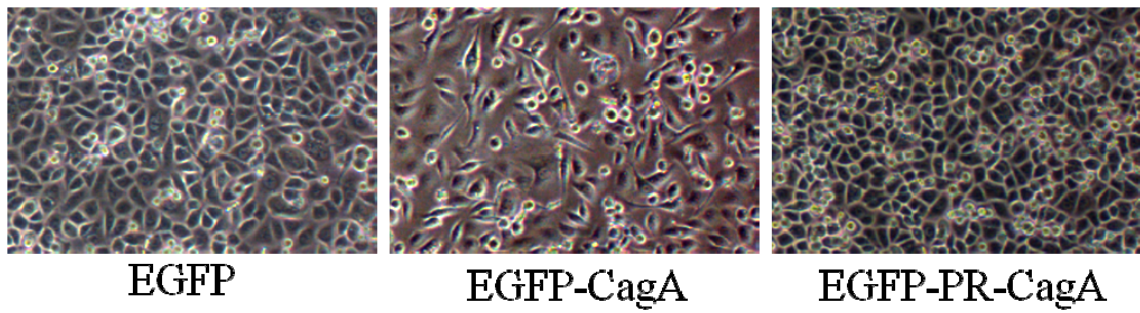
(C)



圖二、胃幽門桿菌將 CagA 注入真核細胞的細胞質和細胞核中

胃幽門桿菌菌種 26695 與 B 淋巴細胞以 MOI=100 的方式共同培養: (A)L428 細胞株，供養五小時後，加入 200 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin 殺死胃幽門桿菌，再於 24、48、72、96 小時後，收集細胞萃取液、細胞質和細胞核萃取液，跑 SDS 膠體電泳，轉漬到 PVDF 膜上，利用 CagA、actin、HDAC1 和 α -tubulin 抗體偵測蛋白質的表現 (B)共同培養 5、24 小時後，依序固定、染色和封片，以共軛焦顯微鏡觀察 CagA 表現情形 (C)胃幽門桿菌 26695 菌種以 MOI=100 的方式和 1×10^6 AGS 細胞共同培養，24 小時後，分離細胞質和細胞核萃取液，跑 SDS 膠體電泳，轉漬到 PVDF 膜上，利用 CagA、pY99、HDAC1 和 α -tubulin 抗體偵測蛋白質的表現。

圖三

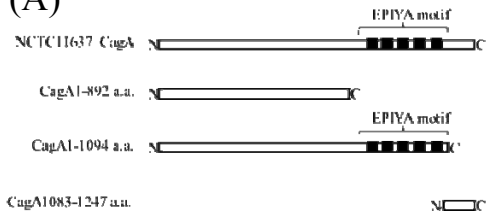


圖三、CagA 進入細胞核的方式是 phosphorylation-independent

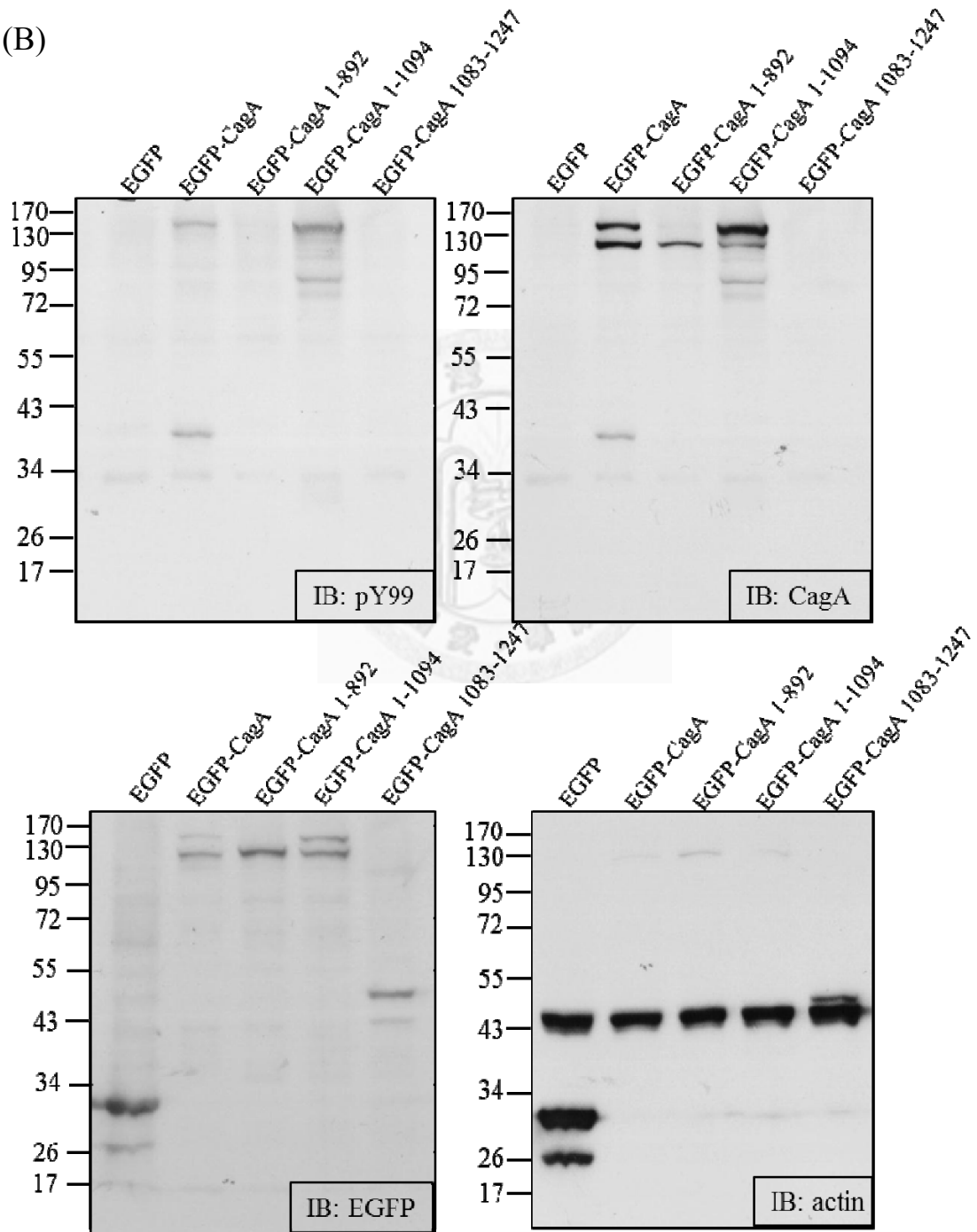
4×10^6 AGS 細胞轉染 $20 \mu\text{g}$ 質體 DNA，12 小時後，收集細胞質和細胞核萃取液，跑 SDS 膠體電泳，轉漬於 PVDF 膜上，利用 pY99、CagA、GFP、HDAC1 和 α -tubulin 抗體偵測蛋白質的表現。

圖四

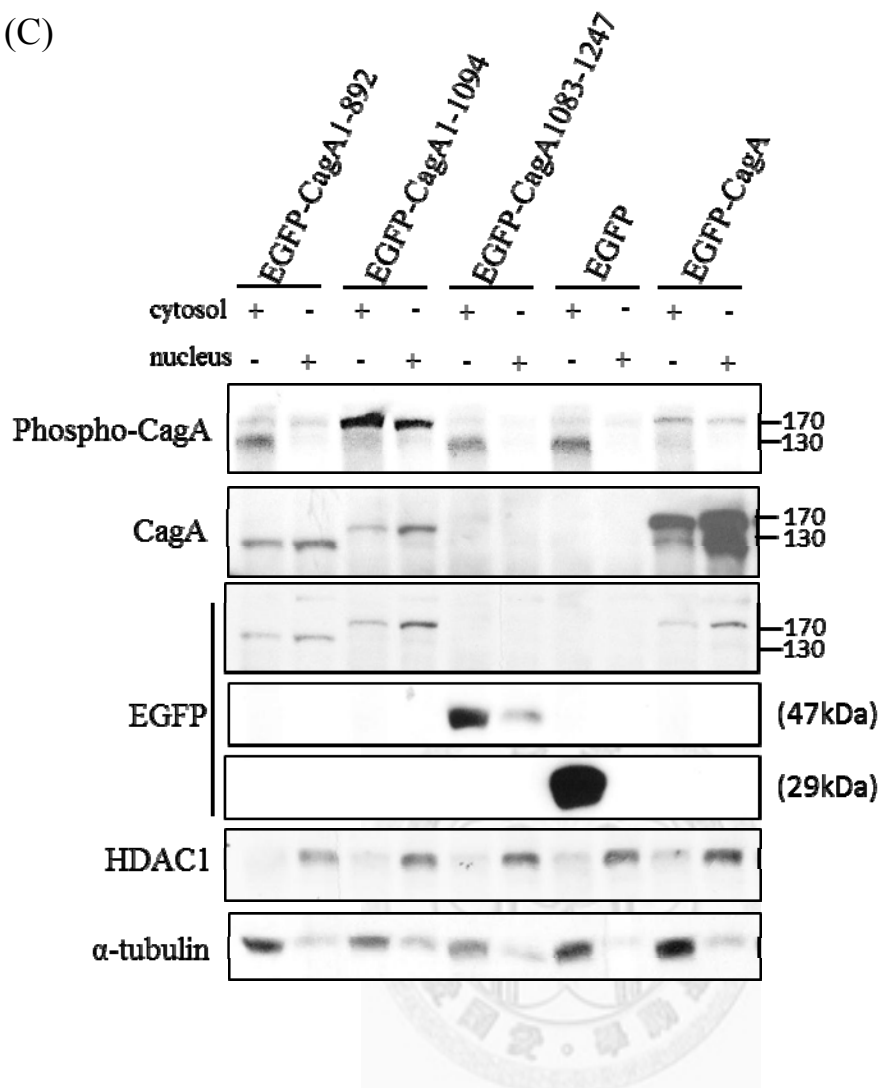
(A)



(B)



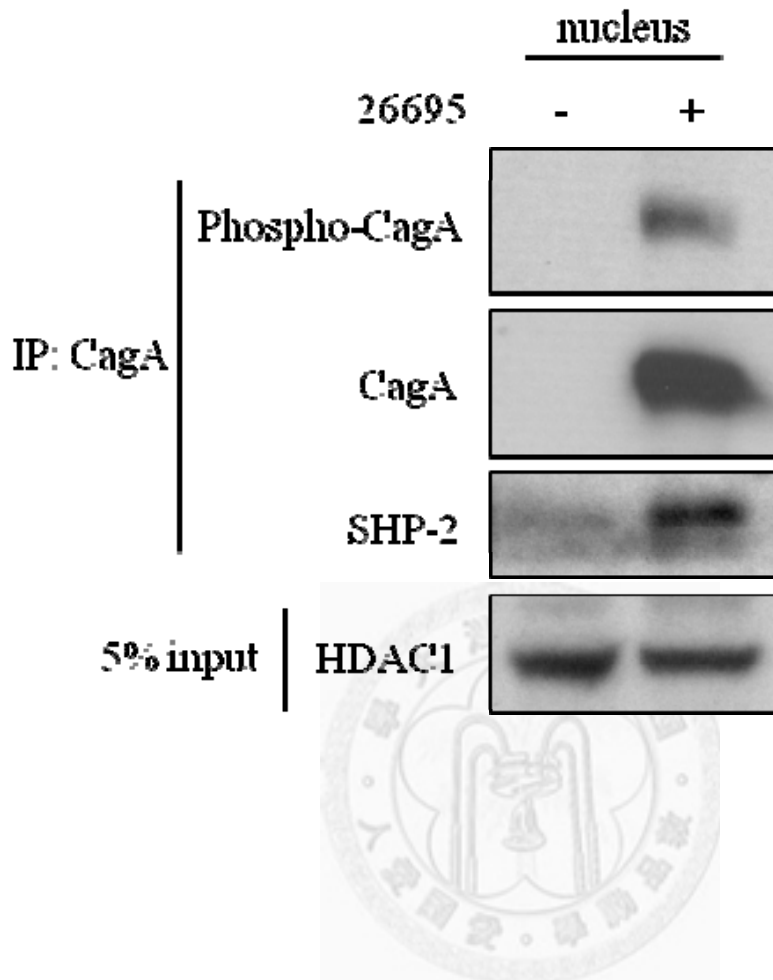
(C)



圖四、胺基端序列具有決定 CagA 進入細胞核的角色

(A) truncated CagA 分別為缺乏羧基端與 EPIYA-motif 的 CagA1-892、缺乏羧基端的 CagA1-1094 以及只含有羧基端(缺乏胺基端)CagA1083-1247 (B)將 truncated CagA plasmid 轉染到 293T 細胞中，確定 truncated CagA 蛋白的表現，EGFP-CagA1-892、EGFP-CagA1-1094、EGFP-CagA1083-1247 融合蛋白分別為 127、149、47 kDa (C) 4×10^6 AGS 細胞轉染 $20 \mu\text{g}$ 質體 DNA，12 小時後，收集細胞質和細胞核萃取液，跑 SDS 膠體電泳，轉漬於 PVDF 膜上，利用 pY99、CagA、GFP、HDAC1 和 α -tubulin 抗體偵測蛋白質的表現。

圖五



圖五、SHP-2 分子在細胞核內與 CagA 交互作用

5×10^6 L428 細胞，以 MOI=100 方式共同培養胃幽門桿菌菌種 26695，24 小時後，收集細胞核萃取液，以 CagA 抗體做免疫沉澱，跑 SDS 膠體電泳，用西方點墨法偵測。