

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl: Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Leitung: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

Einfluss bakterieller Virulenzfaktoren von *Helicobacter pylori*
auf die Chemotaxis und Migration humaner Leukozyten

DISSERTATION
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Desirée Saskia Placzek

aus Biberach an der Riß

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	PD Dr. Wolfgang Fischer
Mitberichterstatter:	PD Dr. Dimitrios Frangoulidis Prof. Dr. Frank Ebel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Benjamin Busch
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	07.11.2019

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Desirée Saskia Placzek, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Einfluss bakterieller Virulenzfaktoren von *Helicobacter pylori* auf die Chemotaxis und Migration humaner Leukozyten

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, den 11.11.2019

Desirée Saskia Placzek

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
1 Einleitung	6
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> : Ein Bakterium, viele Folgen	6
1.2 Diagnostik und Eradikation einer <i>H. pylori</i> -Infektion.....	8
1.3 Besiedelung der Magenmukosa: Virulenzfaktoren	10
1.3.1 Entlang des Säuregradienten zur Magenschleimhaut.....	10
1.3.2 Adhäsion an die Schleimhaut	11
1.3.3 Manipulation des Immunsystems: Sicherung der Infektion.....	12
1.4 Die Antwort des Immunsystems.....	13
1.5 Das Cag-Typ-IV-Sekretionssystem und das Effektorprotein CagA.....	14
1.6 Ziele dieser Arbeit	17
2 Material	18
2.1 Zelllinien.....	18
2.2 Bakterienstämme	18
2.3 Oligonukleotide und Plasmide.....	19
2.4 Chemikalien.....	21
2.5 Puffer und Lösungen	21
2.6 Nährmedien, Platten und Zusätze	23
2.6.1 Antibiotika und Antimykotika	23
2.7 Enzyme und Proteine	24
2.7.1 Antikörper	24
2.8 Molekulargewichtsmarker	25
2.9 Kommerziell erworbene Kits.....	25
3 Methoden	26
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	26
3.1.1 Bakterienkultur und Stammhaltung	26

3.2	Arbeiten mit Zellen.....	26
3.2.1	AGS-Zellen	26
3.2.2	HL-60-Zellen.....	27
3.2.3	Neubauer-Zählkammer.....	27
3.3	<i>In vitro</i> -Infektionen.....	27
3.4	Arbeiten mit DNA	28
3.4.1	Präparation chromosomaler <i>H. pylori</i> -DNA	28
3.4.2	Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	28
3.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
3.4.4	Agarosegel-Elektrophorese	29
3.4.5	DNA-Fragmentisolierung und –aufreinigung	30
3.4.6	Restriktionsenzymverdau	30
3.4.7	Ligation	30
3.4.8	DNA-Sequenzierung	30
3.4.9	Transformation von Bakterien	31
3.5	Proteinbiochemische Methoden	31
3.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.5.2	Western Blot.....	32
3.5.3	Immunpräzipitation	33
3.6	<i>Under-Agarose Cell Migration Assay</i>	34
3.6.1	Versuchsaufbau und Durchführung	34
3.6.2	Semiautomatische Filmanalyse mit Fiji und <i>TrackMate</i>	35
3.6.3	Datenauswertung mithilfe eines Python-Skripts	36
3.6.4	Statistische Auswertung mit GraphPad Prism 5	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Untersuchung der vermuteten Prozessierungsstelle von CagA.....	38
4.1.1	Herstellung der Prozessierungsmutanten P12(CagA-A3) und P12(CagA-A2) .	38

4.1.2	Untersuchung der Prozessierungsmutanten in Bezug auf Translokation, Phosphorylierung und Prozessierung in AGS- und dHL-60-Zellen	40
4.2	Untersuchung des C-terminalen Fragments von CagA	41
4.2.1	Herstellung der EPIFA-Mutanten	41
4.2.2	Untersuchung der EPIFA-Mutanten in Bezug auf Translokation, Phosphorylierung und Prozessierung in AGS- und dHL-60-Zellen	43
4.2.3	Herstellung der MKI-Varianten und -Deletionsmutanten.....	44
4.2.4	Untersuchung der MKI-Mutanten und -Varianten in Bezug auf Translokation, Phosphorylierung und Prozessierung in AGS- und dHL-60-Zellen	46
4.3	Zellmigrationsexperimente	47
4.3.1	Vorarbeiten mit Boyden-Chamber und <i>Under-Agarose-Cell-Migration-Assay</i>	47
4.3.2	Optimierung des <i>Under-Agarose-Assays</i> und der Auswertung	48
4.3.3	Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten nach Infektion mit phosphorylierungsdefekten, MKI-deletierten und variierten <i>H. pylori</i> -Mutanten.....	57
5	Diskussion.....	65
5.1	Optimierung des <i>Under-Agarose-Assays</i> und der Auswertung.....	65
5.2	Untersuchung der Prozessierung und Phosphorylierung von CagA	67
5.3	Einfluss verschiedener Chemoattraktanzien auf die Migration von Leukozyten.....	68
5.4	Abhängigkeit der Migrationshemmung von der Infektionsstärke	69
5.5	Einfluss der C-terminalen Motive von <i>H. pylori</i> auf das Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten	70
	Python-Skript	74
	Abkürzungsverzeichnis	80
	Abbildungsverzeichnis	85
	Tabellenverzeichnis.....	86
	Literaturverzeichnis.....	87
	Danksagung	96
	Lebenslauf.....	97

Zusammenfassung

Eine Infektion mit *Helicobacter pylori* gehört mit einer Besiedelung von etwa der Hälfte der Weltbevölkerung zu einer der häufigsten bekannten bakteriellen Infektionen weltweit. Über sein Typ-IV-Sekretionssystem injiziert *H. pylori* das Effektorprotein CagA in eukaryotische Zielzellen und beeinflusst Signalkaskaden, die an der Entstehung von Folgeerkrankungen wie Magenkarzinomen beteiligt sind. Neben der Translokation in Epithelzellen kommt *H. pylori* insbesondere bei einer chronischen Entzündung in Kontakt mit Leukozyten wie dendritischen Zellen, die daraufhin nicht vollständig maturieren, aber dennoch in Lymphknoten migrieren können. Es kann vermutet werden, dass *Helicobacter* auch in Kontakt mit neutrophilen Granulozyten, den ersten Zellen am Ort der Entzündung, kommt und dadurch einen Einfluss auf deren Migrationsverhalten nimmt.

Zudem ist bekannt, dass CagA in Phagozyten an einer konservierten Aminosäuresequenz von 5 bis 6 Asparaginresten in ein 100 kDa- und ein 35 kDa-großes Fragment gespalten wird. In dieser Arbeit sollte nun die konservierte Sequenz genauer charakterisiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass bereits ein Austausch von 2 Aminosäuren gegen Alanin zu einem Prozessierungsdefekt in Neutrophilen führt und die Erkennung der Schnittstelle verhindert.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit Migrationsversuche in einem zweidimensionalen *Under-Agarose-Assay* durchgeführt, um die Rolle der C-terminalen EPIYA- und MKI-Motive von CagA auf die Wanderung von neutrophilen Granulozyten zu beleuchten. Zur simultanen Beobachtung der Migrationseffekte mehrerer CagA-Mutanten wurde der *2-D-Under-Agarose-Assay* in einem *8-Well*-Format neu etabliert und mit verschiedenen Chemoattraktanzien inkubiert. Um die Unterschiede zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen optimal darstellen zu können, folgten Infektionsversuche mit *H. pylori* bei verschiedenen Infektionsstärken und Lockstoffkonzentrationen.

Da die Relevanz der Tyrosinphosphorylierung der EPIYA-Motive für die Migrationsinhibition von *H. pylori* bereits nachgewiesen wurde, sollte nun der Einfluss der einzelnen Motive auf migrierende Zellen genauer betrachtet werden. Hierfür wurden phosphorylierungsresistente Varianten kloniert, die an EPIYA-A und -B oder an den EPIYA-C-Motiven einen Aminosäureaustausch von Tyrosin gegen Phenylalanin hatten. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierungsabhängigen, inhibitorischen Effekte von CagA auf die Migration von Neutrophilen hauptsächlich über die EPIYA-C-Motive und weniger über die EPIYA-A- und -B-Motive vermittelt werden.

Weiterhin sollte die Rolle der MKI-Motive in der Prozessierung und Phosphorylierung von CagA und bei der Migrationshemmung von neutrophilen Granulozyten geklärt werden. Dafür wurden *H. pylori*-Stämme mit verschiedenen MKI-Varianten hergestellt. Es zeigte sich, dass die MKI-Motive keinen Einfluss auf die Prozessierung und Phosphorylierung von CagA haben, jedoch einen inhibitorischen Effekt auf die Migration von Leukozyten vermitteln. Dabei konnte die proklamierte Relevanz der Lysinreste an den Positionen 946, 980 und 1.014 im CagA-Protein nachgewiesen werden.

Abschließend konnten in dieser Arbeit Funktionen der C-terminalen Motive von CagA näher beleuchtet und Einblicke in deren Relevanz für die Migration humaner Leukozyten gewonnen werden.

1 Einleitung

1.1 *Helicobacter pylori*: Ein Bakterium, viele Folgen

Bereits seit 100.000 Jahren wird der menschliche Magen von *Helicobacter pylori*, einem gram-negativen, unipolar begeißelten und mikroaerophilen Bakterium besiedelt (Moodley *et al.*, 2012). Während früher ein Großteil der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert war, ist die Inzidenz aufgrund besserer Hygienestandards und sozioökonomischer Bedingungen in Europa in den letzten Jahrzehnten rückläufig bei 20 - 50 Prozent, wohingegen Entwicklungsländer bis heute mit Infektionsraten von 80 Prozent zu kämpfen haben (Dunn *et al.*, 1997). Dennoch zählt *H. pylori* immer noch zu den häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen weltweit (Suerbaum *et al.*, 2002). Aktuell geht man von einer frühkindlichen, oral-oralen oder fäkal-oralen Übertragung aus. (Dunn *et al.*, 1997).

Der erste Nachweis des zunächst als Vertreter der Spezies *Campylobacter* eingeordneten Keims gelang Marshall und Warren 1983 durch Anzucht des *Campylobacter pyloridis*-getauften Bakteriums aus dem Magenantrum eines infizierten Patienten (Marshall *et al.*, 1984). Davor galt der menschliche Magen mit seinem lebensfeindlichen pH-Wert als steril (Solnick *et al.*, 2001), obwohl bereits im 19. Jahrhundert von Bizzozero spiralförmige Stäbchen im Hundemagen beschrieben wurden (Bizzozero, 1893).

Marshall erfüllte durch einen Selbstversuch die Koch'schen Postulate, in dem er *C. pyloridis*-Suspension trank und daraufhin eine akute Gastritis entwickelte (Marshall *et al.*, 1985). Für seine Forschung erhielt er 2005 gemeinsam mit Warren den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. *C. pyloridis* wurde wegen seiner biochemischen und ultrastrukturellen Eigenschaften im Verlauf zu einer eigenen Spezies, dem ersten Vertreter der Gattung *Helicobacter*, erklärt.

Heute gilt *H. pylori*, als einziges im Magen dauerhaft lebensfähiges Bakterium, als ursächlich für chronische Typ B-Gastritis, Riesenfaltengastritis, Magen- und Duodenalulzera, Magenkarzinome sowie *mucosa associated lymphoid tissue*-(MALT)-Lymphome (Blaser, 1997). 90 Prozent der neu entdeckten Magentumoren weltweit sind mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert (Atherton, 2006). Aufgrund dieses onkogenen Potentials erklärte die *World Health Organisation* (WHO) *H. pylori* 1994 zum Karzinogen erster Klasse.

Eine Infektion mit *H. pylori* im Kindesalter bleibt in den meisten Fällen asymptomatisch. Sehr selten begleiten Dyspepsie und Magenschmerzen die akute Magenschleimhautentzündung, die mit einer verminderten Säureproduktion einhergeht (Dixon, 2001). Interessanterweise kann bei

fast allen Infizierten ein vorwiegend neutrophiles Entzündungsinfiltrat in der Schleimhaut beobachtet werden (Dooley *et al.*, 1989). Persistiert die Infektion bildet sich eine chronische Typ B-(Bakterien)-Gastritis mit Einwanderung von Lymphozyten in die Tunica mucosa aus. Auch diese bleibt häufig unerkannt, stellt jedoch über Jahre einen Risikofaktor für die Entwicklung von Folgeerkrankungen dar. Diese werden nach Lokalisation und Veränderung der Säureproduktion unterschieden (s. Abb. 1):

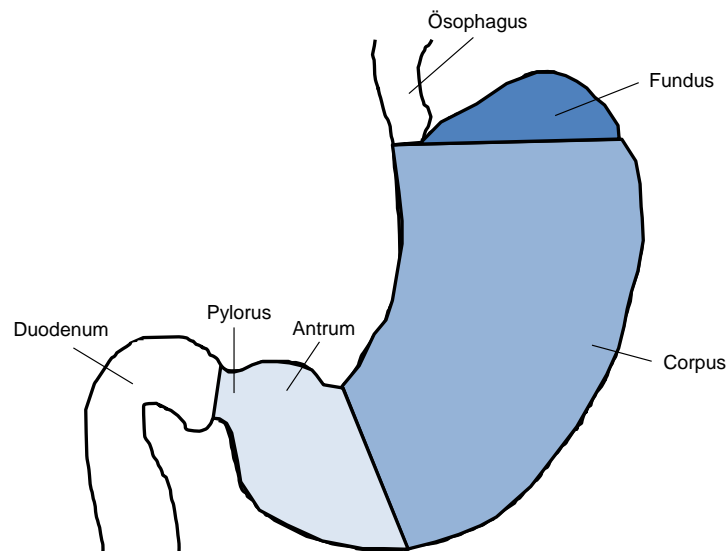


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Magens

H. pylori gelangt über die Speiseröhre in den menschlichen Magen. Hier besiedelt das Bakterium bevorzugt die Gegend um den Magenausgang (Antrum) oder den zentralen Teil (Corpus). In der Folge entsteht eine - meist beschwerdelose - akute Gastritis, die im Lauf der Jahre chronifizieren kann.

Eine vorwiegend im Antrum lokalisierte Entzündung führt zu einer starken Erhöhung der Säureproduktion durch Belegzell-Hyperplasie. In der Folge diese Hyperazidität kann es zur gastralen Metaplasie der Duodenalschleimhaut mit einer möglichen Besiedelung von *H. pylori*, Entzündung sowie Erosion der Zwölffingerdarm-Mukosa und damit zur Ausbildung von Ulzera kommen (Blaser *et al.*, 2004). In über 95 % der Fälle ist eine Infektion mit *H. pylori* Ursache eines Duodenalgeschwürs.

Nimmt die Entzündung einen nicht atrophischen Verlauf, kann sich eine Pangastritis mit normaler bis verminderter Säureproduktion ausbilden. Über Jahre hinweg entwickelt sich in sehr seltenen Fällen ein Marginalzonen-B-Zell-Lymphom, ein Tumor, der im *mucosa associated lymphoid tissue* entsteht und der zu den niedrigmalignen B-Zell-Lymphomen gezählt wird (Hagymasi *et al.*, 2014, Peek *et al.*, 2006).

Ein dritter Weg ist das Entstehen einer chronischen Gastritis, die hauptsächlich im Corpus stattfindet und die zur Verminderung von Belegzellen und damit konsekutiv zur Hypochlorhydrie bis Achlorhydrie führt (Fox *et al.*, 2007). Mögliche Folgen stellen gastrale Ulzera sowie die Ausbildung einer intestinalen Metaplasie mit Verschiebung der Antrum-Corpus-Grenze nach oral dar. Das metaplastisch veränderte Epithel ist eine fakultative Präkanzerose (Friis-Hansen, 2006), kann sich dementsprechend über Jahre entdifferenzieren und sich bis hin zum Adenokarzinom des Magens entwickeln (Watari *et al.*, 2014).

Aufgrund guter Diagnostikmöglichkeiten und flächendeckender Vorsorgeuntersuchungen und der damit einhergehenden konsequenten Behandlung symptomatischer *H. pylori*-Infektionen sind die schweren Folgeerkrankungen in Deutschland zunehmend rückläufig. Eine Spontanheilung im Kindesalter ist sehr selten (Rehmann *et al.*, 2005).

1.2 Diagnostik und Eradikation einer *H. pylori*-Infektion

Zur Verfügung stehen invasive und bevorzugt nicht invasive Tests, die mit einer Sensitivität und Spezifität von über 90 % in ihrer Aussagekraft vergleichbar sind (Thijs *et al.*, 1996). Im klinischen Alltag konnte sich der Harnstoff-Atemtest durchsetzen, bei dem der Patient eine Lösung mit schwerem ^{13}C -Harnstoff trinkt und in definierten Zeitabständen die Konzentration an $^{13}\text{CO}_2$ in der Ausatemluft massenspektrometrisch bestimmt wird. Bei vorhandener Infektion steigt diese an, da *Helicobacter pylori* zum Überleben im sauren Magen Urease produziert, ein Enzym, das Harnstoff in Ammoniak und CO_2 spaltet und dadurch den pH-Wert in einen alkalischeren Bereich verschiebt. Man spricht in diesem Fall von einem positiven Atemtest. Mögliche falsch negative Resultate können durch die Einnahme von säuremindernden Protonenpumpeninhibitoren entstehen, da es zeitgleich zu einer Reduktion der Keimdichte kommt und damit weniger ^{13}C -Kohlenstoffdioxid produziert und abgeatmet wird (Megraud *et al.*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit des Infektionsnachweises bietet eine Antikörpertestung mittels ELISA oder Western Blot. Ein Problem stellt die verminderte Aussagekraft nach einer versuchten *H. pylori*-Eradikation dar, da die serologischen Befunde dauerhaft positiv bleiben und damit eine Persistenz oder Elimination der Infektion nicht beurteilt werden kann.

Beim Antigen-Nachweis werden Stuhlproben abgenommen und auf *H. pylori*-Antigene untersucht. Auch dieser Test fällt bei PPI-Einnahme falsch negativ aus, weist jedoch nur die aktive

Infektion nach und eignet sich deshalb insbesondere im *Follow-up* einer Eradikation zur Erfolgskontrolle (Gisbert *et al.*, 2006).

Die invasive Diagnostik wird bei persistierenden Beschwerden, zur Kontrolle und Therapie von Folgeerkrankungen oder (in Deutschland) ab dem 50. Lebensjahr zur Vorsorge bevorzugt. Eine Gastroskopie bietet dabei die Möglichkeit sowohl interventionell tätig zu werden als auch histologische Proben aus Antrum und Corpus für weitere Analysen zu gewinnen. Anschließend wird ein Urease-Schnelltest durchgeführt, wobei sich eine Probe bei *H. pylori*-Infektion pink verfärbt. Ein weiteres Präparat wird histologisch untersucht und die Entzündungs- sowie Zellmorphologie beurteilt. Sollte der Magenspiegelung ein fehlgeschlagener Eradikationsversuch vorangegangen sein, werden Proben zur Kultivierung von *H. pylori* abgenommen. Diese können genetisch analysiert und eine Resistenzbestimmung durchgeführt werden.

Bei lymphozytärer oder Riesenfaltengastritis, peptischen Ulzera, MALT-Lymphomen sowie Adenokarzinomen des Magens mit gleichzeitiger *H. pylori*-Infektion ist eine Eradikation dringend empfohlen. Leitliniengerecht können auch Patienten mit funktioneller Dyspepsie und begleitender *H. pylori*-Infektion einer Therapie zugeführt werden (Fischbach *et al.*, 2016). Ziel ist die vollständige Elimination des Keims sowie beim MALT-Lymphom im Anfangsstadium die Heilung des Tumors. *First Line* bei niedrigen Resistenzraten ist die Gabe eines Protonenpumpeninhibitors (in zweifacher Standarddosierung) und 2 Antibiotika über 7 bis 14 Tage (Fallone *et al.*, 2016) (s. Tab. 1). Wegen zunehmendem Therapieversagen empfehlen neuere Studien eine Therapiedauer von 14 Tagen (Fallone *et al.*, 2016). Die italienische oder französische Triple-Therapie kann bei eradikationsnaiven Patienten bis zu 80 % der Patienten heilen (Fischbach *et al.*, 2007). Weitere Optionen der ersten Wahl bestehen aus der zusätzlichen Gabe eines weiteren Antibiotikums oder von Bismut im Rahmen einer Quadrupeltherapie sowie einer Sequenztherapie, die bis zu 90 % der Patienten heilen können (Liu *et al.*, 2014).

Einer der Hauptgründe für ein Therapieversagen ist neben der fehlenden Patientencompliance die Resistenzbildung in Bakterien. Neben der Clarithromycin-Resistenz, die in Deutschland innerhalb von 10 Jahren von 4,8 auf 10,9 % zugenommen hat (Wuppenhorst *et al.*, 2014) und die den Erfolg des italienischen Schemas um 33, den Erfolg des französischen Tripels um 66 Prozent reduziert (Fischbach *et al.*, 2007), spielen Metronidazol-Resistenzen eine immer größere Rolle. In Deutschland lagen diese in den Jahren 2011 und 2012 bei 36% (Wuppenhorst *et al.*, 2014).

Tabelle 1: Aktuelle Therapieoptionen modifiziert nach Fischbach *et al.*; 2016

Name	Schema	Linie	Dauer
Standard-Tripel-Therapie (italienisch)	PPI Clarithromycin Metronidazol	1. Wahl	7 - 14 Tage
Standard-Tripel-Therapie (französisch)	PPI Clarithromycin Amoxicillin	1. Wahl	7 - 14 Tage
Bismut-haltige Vierfachtherapie	PPI Bismut-Kalium-Salz Tetracyclin Metronidazol	1. oder 2. Wahl nach Standard-Tripel- Therapie	10 Tage
kombinierte Quadrupeltherapie	PPI Clarithromycin Metronidazol Amoxicillin	1. Wahl	7 Tage
Fluorchinolon-Tripel-Therapie	PPI Levo-/Moxifloxacin Amoxicillin	1. Wahl	10 Tage

1.3 Besiedelung der Magenmukosa: Virulenzfaktoren

Weitere Mechanismen, die der natürlichen Elimination der Bakterien durch das Immunsystem entgegenwirken, sind die im folgenden Kapitel näher beschriebenen Virulenzfaktoren. Diese speziellen Eigenschaften ermöglichen *H. pylori* das Überleben bei niedrigen pH-Werten sowie die langfristige Besiedelung und Schädigung der Magenschleimhaut.

1.3.1 Entlang des Säuregradienten zur Magenschleimhaut

Nach oraler Aufnahme ist *H. pylori* nur über kurze Zeit fähig seinen Zielort nahe der neutralen Magenmukosa zu erreichen. Schon nach einer Minute bei pH-Werten zwischen 1 und 3 verfällt das Bakterium in eine Säurestarre (Schreiber *et al.*, 2005), hat keine Chance mehr seine Sensibilität für pH-Gradienten zu nutzen und entlang diesem in neutralere Bereiche des Magenlumens zu gelangen (Yoshiyama *et al.*, 1999, Schreiber *et al.*, 2004), da es seine 2 bis 7 unipolar orientierten Geißeln nicht mehr bewegen kann (Suerbaum *et al.*, 1993). Ohne das Zusammenspiel von chemotaktischer Orientierung und gerichtete Bewegung verbleibt *H. pylori* im sauren

Milieu und wird durch die Peristaltik des Magens in den Darm transportiert. Eine Kolonialisierung der Schleimhaut bliebe aus.

Deshalb stellt neben den oben genannten Faktoren das Protein Urease eine der wichtigsten Eigenschaften für das Überleben im lebensfeindlichen Magen dar (Stingl *et al.*, 2005). Dieses Enzym hat dreierlei Funktionen, die essentiell für *H. pylori* sind: Zum einen dient es der Aufrechterhaltung eines neutralen pH-Werts im Umfeld des Bakteriums (Marshall *et al.*, 1990). Über einen pH-abhängigen Kanal wird Harnstoff aufgenommen und in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid katalysiert (Scott *et al.*, 2000). Je niedriger dabei der pH-Wert außerhalb des Bakteriums, desto mehr Harnstoff wird ins Zytoplasma transportiert und daraus resultierend Ammoniak produziert. Zum anderen sorgt die Anhebung des pH-Werts in der Umgebung des Keims zur Verflüssigung des zähen Mukus und damit zu einer schnelleren Fortbewegung entlang des Gradienten (Celli *et al.*, 2009). Nahe der Mukosa sorgt die Produktion von Ammoniak zudem für die Auflösung der zellverbindenden *tight junctions* und dadurch zum Verlust der epithelialen Zellpolarität (Lytton *et al.*, 2005).

1.3.2 Adhäsion an die Schleimhaut

Ein Großteil der Bakterien verbleibt nun im Mukus. Etwa ein Fünftel sucht jedoch den direkten Kontakt mit der Schleimhaut über äußere Membranproteine (Schreiber *et al.*, 2004), eine vielfältige Gruppe von geschätzt 60 Proteinen, die auch *Outer Membrane Proteins* (OMPs) oder *Helicobacter Outer Membrane Proteins* (Hop) genannt werden (Alm *et al.*, 2000).

Das erste entdeckte Adhäsın wurde aufgrund seiner spezifischen Eigenschaft an fucosylierte Lewis^b-Antigene auf der Oberfläche von Magenepithelzellen zu binden auf den Namen *Blood Group Antigen-Binding Adhesin* (BabA) getauft (Ilver *et al.*, 1998). Um einen Abtransport aus dem Magen zu verhindern, scheint BabA bei der Adhäsion pH-abhängig zu funktionieren und bei niedrigen pH-Werten die Bindung an die Zelle zu lösen (Bugaytsova *et al.*, 2017). Neben Magenepithelzellen findet sich BabA auch auf dem Muzin MUC5A, das sich in der Mukusschicht des Magens befindet (Ho *et al.*, 2004, Linden *et al.*, 2002, Van den Brink *et al.*, 2000). Als spezifisches Bindeprotein für das LacdiNac-Motiv von MUC5A wurde 2014 ein neues Adhäsın namens HopD oder LabA identifiziert (Rossez *et al.*, 2014). Ein Beispiel für die Induktion von Antigenen oder Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch den Kontakt mit *H. pylori* ist SabA (Sialinsäure-bindendes Adhäsın A), das mit den Blutgruppenantigenen Sialyl-Lewis^x und

Sialyl-Lewis^a interferiert. Erst bei der Infektion mit *H. pylori* wird deren Produktion und Präsentation hochreguliert (Mahdavi *et al.*, 2002). Die beiden homologen Proteine AlpA und AlpB (Adhärenz-assoziierte Lipoproteine A und B) binden an extrazelluläres Laminin auf der basolateralen Seite von Epithelzellen (Senkovich *et al.*, 2011). Sie werden mit einer Modulation der proinflammatorischen Immunantwort und einer starken Entzündung assoziiert (Lu *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HopQ über die Bindung an humane CEACAMs an der Translokation von CagA beteiligt ist (Koniger *et al.*, 2016, Javaheri *et al.*, 2016).

Die genannten Proteine dieser OMP-Familie sind also nicht nur wichtig für die Vermittlung der Adhäsion an epitheliale Magenzellen, sondern spielen durch ihren Einfluss auf zelluläre Signalkaskaden zusätzlich eine Schlüsselrolle zum Fortbestehen der Infektion.

1.3.3 Manipulation des Immunsystems: Sicherung der Infektion

Neben der Interaktion über Membranproteine hat *H. pylori* weitere Strategien entwickelt, um der Erkennung durch das adaptive und angeborene Immunsystem zu entgehen und damit eine Kolonisierung zu ermöglichen.

Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) erkennen sich wiederholende, charakteristische Muster an der bakteriellen Außenmembran und sind Teil der angeborenen Immunantwort. Insbesondere über die Veränderung von Proteinen und Strukturelementen, die durch *Toll-like-Rezeptoren* (TLR), eine Untergruppe der PRRs, identifiziert werden, modifiziert *H. pylori* diese Antwort zu seinem Vorteil (Salama *et al.*, 2013). So werden normalerweise bakterielle Flagellen von TLR-5 detektiert. Das Flagellin von *H. pylori* hingegen ist in der N-terminalen TLR-Erkennungsdomäne so verändert, dass diese der Erkennung entgeht (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Durch die Dephosphorylierung seines Lipopolysaccharides an der Lipid A-Domäne reduziert *H. pylori* im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Mikroorganismen dessen biologische Aktivität um den Faktor 1000 und umgeht zusätzlich die Aktivierung des proinflammatorisch wirksamen TLR-4 (Moran *et al.*, 1997, Cullen *et al.*, 2011).

Auch auf das adaptive Immunsystem nimmt *H. pylori* über die Sekretion von Virulenzfaktoren Einfluss. Dabei spielt neben der γ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT) das vakuolisierende Cytotoxin A (VacA) die größte Rolle (Salama *et al.*, 2013). Durch seine Fähigkeit unter *in vitro*-Bedingungen im Zytoplasma von Magenepithelzellen Vakuolen zu bilden, wurde VacA in der Forschungsgeschichte von *H. pylori* früh entdeckt (Cover *et al.*, 1992). Dieses Phänomen

entsteht wahrscheinlich durch die Zusammenlagerung mehrerer VacA-Proteine zu einem Hexamer und die folgende Ausbildung einer anionenselektiven Kanalaktivität in späten Endosomen (Szabo *et al.*, 1999). Die Fähigkeit der Porenbildung ist ein Hauptfaktor für die Virulenz von VacA und kann beispielsweise die Reifung von Phagosomen in Makrophagen inhibieren (Zheng *et al.*, 2003) oder die Apoptose von Mitochondrien induzieren (Cover *et al.*, 2003). Weiterhin ist das Toxin ursächlich für die verminderte Antigen-Präsentation auf B-Zellen (Molinari *et al.*, 1998) und nimmt über die Suppression der IL-2-Produktion von T-Zellen Einfluss auf deren Proliferation (Gebert *et al.*, 2003). Gemeinsam mit GGT verhindert VacA die Reifung von naiven T-Lymphozyten in T1-Helfer- beziehungsweise T17-Helfer-Zellen, die wichtig für die Elimination einer *H. pylori*-Infektion wären. Stattdessen bilden sich vermehrt regulatorische T-Zellen (Oertli *et al.*, 2013). GGT hat den zusätzlichen Effekt, dass es die Menge an Glutamin im entzündeten Bereich reduziert und dadurch den Zellzyklus von T-Lymphozyten anhält (Schmees *et al.*, 2007, Wustner *et al.*, 2015).

Interessanterweise beeinflussen sich auch VacA und das im folgenden Kapitel beschriebene Cytotoxin-assoziierte Gen A (*cagA*). Durch das Vorhandensein beider Toxine kommt es zur Verstärkung ihrer jeweiligen Folgen auf den Wirt und erleichtert zugleich das Überleben von *Helicobacter pylori* im Magen (Yokoyama *et al.*, 2005, Oldani *et al.*, 2009).

1.4 Die Antwort des Immunsystems

Wie bereits erwähnt, kommt es nach der kindlichen Infektion mit *H. pylori* zunächst zu einer akuten Gastritis mit Gewebsinfiltration von neutrophilen Granulozyten. Über eine vermehrte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 binden sie an das Gefäßendothel und transmigrieren entlang eines Chemokingradienten in die Submukosa (Innocenti *et al.*, 2002). Die Bewegung der Leukozyten erfordert dabei sowohl die Bewegung entlang einer zweidimensionalen Oberfläche als auch durch das dreidimensionale Gewebe. Ein typischer Lockstoff, der von infizierten Magenepithelzellen ausgeschüttet wird, ist beispielsweise IL-8 (Yamaoka *et al.*, 1998). Zudem produziert *H. pylori* selbst ein Protein, das Neutrophile anlockt, das sog. HP-NAP (*Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein) (Evans *et al.*, 1995).

Die Leukozyten werden während der Entzündung immer stärker von T-Lymphozyten verdrängt – die Erkrankung chronifiziert. Diese T-Lymphozyten sind CD4-positiv und meist vom Typ der proinflammatorischen Th1- und Th17-Helferzellen (Peek *et al.*, 1995, Bamford *et al.*,

1998). Als Gegenspieler werden regulatorische T-Zellen aktiviert. Sie sollen einen überschießende Immunantwort verhindern, unterdrücken jedoch durch ihre Modulation der T-Helferzell-Antwort eine adäquate Zellreaktion auf die *H. pylori*-Infektion (Lundgren *et al.*, 2005, Rad *et al.*, 2006).

Insbesondere die Hochregulation der regulatorischen T-Zellen scheint abhängig von der Interaktion von bakteriellen Virulenzfaktoren wie CagA, GGT und VacA mit dendritischen Zellen zu sein (Kaebisch *et al.*, 2014, Oertli *et al.*, 2013). Da sich *H. pylori* eigentlich auf der luminalen Seite des Magenepithels befindet, ist die Herstellung dieses Kontakts von besonderem Interesse. In der Literatur finden sich Hinweise, dass *H. pylori* intrazellulär oder auch in tieferen Gewebsschichten vorkommt, insbesondere nach einer längeren Besiedelung und Zerstörung der Mukosa (Dubois *et al.*, 2007, Necchi *et al.*, 2007). Zudem finden sich transepitheliale Ausläufer von dendritischen Zellen in murinen Mägen, die mit *H. pylori* infiziert wurden (Kao *et al.*, 2010).

Durch den Kontakt mit *H. pylori* werden die dendritischen Zellen (DCs) aktiviert und migrieren zur Antigenpräsentation in paragastrale Lymphknoten (Kranzer *et al.*, 2004, Hafsi *et al.*, 2004, Algood *et al.*, 2007). *CagPAI*-positive Stämme sorgen dabei durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 für eine unvollständige Reifung („Semimaturation“) der DCs, die einen steigenden Effekt auf die regulatorische T-Zell-Antwort hat (Kaebisch *et al.*, 2014).

1.5 Das Cag-Typ-IV-Sekretionssystem und das Effektorprotein CagA

Das Onkoprotein CagA ist in einer 37 kb langen GC-reichen Region des *H. pylori*-Genoms kodiert, die neben dem Cytotoxin-assoziierten Gen A auch zahlreiche weitere Gene enthält (Censini *et al.*, 1996, Tomb *et al.*, 1997). Zu diesen auf der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) liegenden Genen zählen auch solche, die die Proteine eines Typ-IV-Sekretionssystems (T4SS) kodieren.

Pathogenitätsinseln sind große mobile Bereiche in bakteriellen Genomen, die den Erreger virulenter und/oder infektiöser machen. Hier sind Enzyme oder andere Proteine, die beispielsweise Teile von Sekretionssysteme (SS) sein können, kodiert. Neben *Helicobacter* findet man SS auch bei *Salmonella* oder *Yersinia* (Shea *et al.*, 1996, Schubert *et al.*, 2004, Figueira *et al.*, 2012). Durch systematische Mutagenese konnte bisher die Funktion verschiedener *H. pylori*-

cagPAI-Gene entschlüsselt werden: 14 von 27 führen zur Produktion von Interleukin-8 in eukaryotischen Zielzellen und 17 sind an der Translokation von CagA beteiligt (Fischer *et al.*, 2001b).

Das Typ-IV-Sekretionssystem von *H. pylori* entspricht einer nadelähnlichen Struktur, über die CagA in Magenepithelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen injiziert wird (Backert *et al.*, 2000, Odenbreit *et al.*, 2000). Es ähnelt von der Struktur her am ehesten dem VirB/VirD4-Sekretionssystem von *Agrobacterium tumefaciens* (Covacci *et al.*, 1993, Buhrdorf *et al.*, 2003), einem Keim, der einzelsträngige Transfer-DNA in Pflanzenzellen einbringt und dadurch genetische Mutationen verursacht (Llosa *et al.*, 2000, Zupan *et al.*, 2000). Da es für jedes VirB/VirD4-kodierende Protein ein Analogon in der *cagPAI* gibt (Kutter *et al.*, 2008), aber das T4SS von *H. pylori* weitere Komponenten enthält, konnten bisher nur die Funktionen einiger Proteine geklärt werden: Manche sind Teil des Sekretionsapparats, andere wirken unterstützend oder sind an der Translokation von CagA, dem bisher einzigen bekannten Effektorprotein, beteiligt.

Der Kontakt dafür wird über CagI, CagL, CagY und auch CagA an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine hergestellt, die vornehmlich auf der basolateralen Seite der Epithelzellen zu finden sind (Kwok *et al.*, 2007, Jimenez-Soto *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus gilt bisher als nicht vollständig geklärt. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Bindung nicht essentiell für die Translokation von CagA ist, die Interaktion mit humanen CEACAMs über HopQ jedoch schon (Zhao *et al.*, 2018). Es folgt – auch in Abwesenheit von CagA - eine starke Ausschüttung des proinflammatorischen Chemokins IL-8 (Fischer *et al.*, 2001a, Odenbreit *et al.*, 2002) und eine Entzündung der Magenschleimhaut, die als Reaktion auf eine bakteriellen Infektion erstes neutrophile Granulozyten ins Gewebe lockt (Sharma *et al.*, 1995, Segal, 1997, Amulic *et al.*, 2012) (s. Kapitel 1.5).

In der Folge wird CagA, das ebenfalls in der *cagPAI* kodiert ist, in die Zielzellen transloziert. CagA selbst hat eine molare Masse von 128 – 145 kDa und enthält verschiedene Regionen, die wichtig für die Interaktion mit Wirtszellproteinen sind (s. Abb. 2): Im C-terminalen Bereich finden sich die sog. EPIYA-Motive. EPIYA steht für die Aminosäuren Glutamat, Prolin, Isoleucin, Tyrosin und Alanin. Anhand ihrer umgebenden Aminosäuresequenzen werden die Motive in EPIYA-A, -B-, -C- oder D. unterschieden, wobei C und D regionspezifisch sind. CagA-Isolate aus westlichen Ländern enthalten ein EPIYA-A- und -B-Motiv sowie ein oder mehrere EPIYA-C-Motive. Hingegen haben Isolate aus asiatischen Ländern nur jeweils ein EPIYA-A,

-B oder -D (Hatakeyama, 2004). An seinen Tyrosinresten wird das Protein von Kinasen der Src-Familie oder c-Abl phosphoryliert (Stein *et al.*, 2002, Tammer *et al.*, 2007).

Durch diese Modifikation wird die Interaktion zwischen CagA und Proteinen, die die Src-Homologie-Domäne-2 (SH-2) enthalten, möglich (Higashi *et al.*, 2002b). Die Bindung an die SHP2-Tyrosinphosphatase führt beispielsweise zur Dephosphorylierung wirtszelleigener Proteine wie Cortactin und gleichzeitig zur Inaktivierung fokaler Adhäsionskinasen (FAK), wodurch sich der *hummingbird*-Phänotyp mit seiner elongierten Zellform ausbildet (Segal *et al.*, 1999). SHP-2 gilt als Proto-Onkogen und wird mit der Tumorentstehung assoziiert (Mohi *et al.*, 2007).

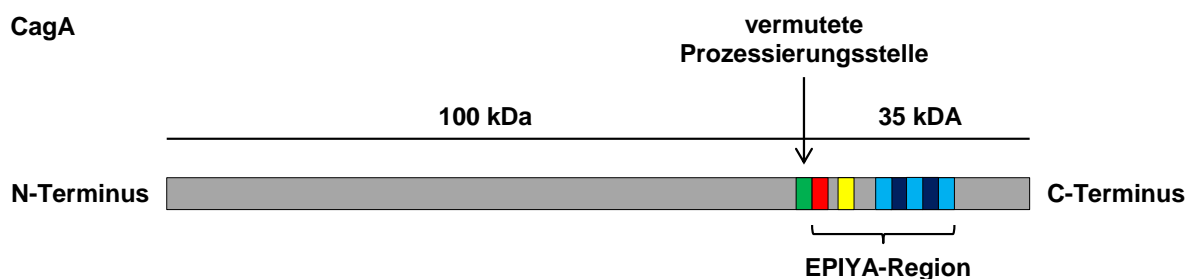


Abbildung 2: Schematische Darstellung des westlichen CagA-Proteins

A Die vereinfachte Darstellung zeigt das CagA-Protein mit den für diese Arbeit relevanten Regionen. CagA wird in Phagozyten vermutlich an einer Sequenz von 5 bis 6 Asparaginresten (grün) prozessiert. Diese befinden sich direkt vor dem EPIYA-A-Motiv (rot). Es folgen EPIYA-B (gelb) sowie EPIYA-C (dunkelblau) mit den umgebenden MKI-Motiven (hellblau).

Weitere Regionen im C-terminalen Teil sind unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der EPIYA-Motive und nennen sich MARK-Kinase-inhibierende (MKI-) oder Multimerisations-(CM-) Motive. Sie umgeben EPIYA-C beziehungsweise finden sich *upstream* von EPIYA-D. Durch ihre Interaktion mit Par1b/MARK2 kommt es zum Verlust der Polarität von Epithelzellen, zu Problemen bei der Ausbildung einer *leading edge* in mobilen Zellen wie Neutrophilen sowie zur Auflösung von *tight junctions* (Saadat *et al.*, 2007, Nesic *et al.*, 2010). Weiterhin kommt es durch die Bindung von Par1b/MARK2 zur Dimerbildung zwischen 2 CagA-Proteinen und dadurch zur Stabilisierung des CagA-SHP-2-Kontakts (Saadat *et al.*, 2007).

Die Struktur und Prozessierung von CagA stellen eine weitere Besonderheit des Proteins dar. Während sich der N-terminale Teil kristallisieren lässt, scheint der C-terminale Teil intrinsisch ungeordnet zu sein und keine Tertiärstruktur anzunehmen (Kaplan-Turkoz *et al.*, 2012, Hayashi *et al.*, 2012). In Phagozyten wird CagA außerdem in ein 100 kDa-großes Fragment und ein

kleineres 40 kDa-schweres Fragment prozessiert. Eine Phosphorylierung der EPIYA-Motive findet statt (Odenbreit *et al.*, 2001). In Magenepithelzellen findet sich keine Prozessierung von CagA, was auf eine spezifische Fähigkeit von Phagozyten schließen lässt.

1.6 Ziele dieser Arbeit

H. pylori kolonisiert erfolgreich den menschlichen Magen und konnte sich im Laufe der Evolution perfekt an die gegebenen Bedingungen anpassen. Durch die Translokation in Phagozyten gelangt das Effektorprotein CagA in direkten Kontakt mit intrazellulären Wirtsproteinen und wird prozessiert. Sowohl die Funktion als auch das schneidende Enzym und die Sequenz, an der die vermutete Schnittstelle erkannt wird, sind bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit sollte über den Austausch von Aminosäuren die Erkennungssequenz genauer charakterisiert werden.

Weiterhin sollte ein Fokus auf den C-terminalen Teil von CagA gelegt werden. Da *H. pylori*-Wildtypen mit einer Migrationshemmung von neutrophilen Granulozyten assoziiert sind, sollte über die Herstellung von Mutanten mit phosphorylierungsresistenten EPIYA-Motiven beziehungsweise veränderten MKI-Motiven deren Einfluss auf das zweidimensionale Migrationsverhalten von differenzierten HL-60-Zellen als Modellzellen betrachtet werden. Darüber sollte der Einfluss der einzelnen Motive auf die verschlechterte Chemotaxis von Wildtyp-infizierten Neutrophilen beleuchtet werden.

Um mehr als 4 Mutanten in einem Versuch zu untersuchen, sollte der zweidimensionale Assay für ein 8-Napf-Format angepasst werden. Um Rückschlüsse auf die Chemotaxis der Zellen zu ziehen, sollten zunächst verschiedene Lockstoffe beurteilt werden. Danach sollten verschiedene Infektionsstärken untersucht und die mit der größten Verschlechterung der chemotaktischen Orientierung als Grundlage für die oben beschriebenen Migrationsexperimente verwendet werden. Zur Vereinfachung der Auswertung sollten verschiedene Methoden verglichen und die am besten geeignete verwendet werden.

2 Material

2.1 Zelllinien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
AGS	Humane Magenadenokarzinom-Zelllinie	ATCC CRL-1739 (Barranco et al., 1983)
HL-60	Humane promyeloische Leukämiezellen	(Collins et al., 1978)

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli*- und *Helicobacter pylori*-Stämme

Stamm-hintergrund	Interne Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10		F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, (Grant et al., 1990)
<i>H. pylori</i> P12		Wildtyp; klinisches Isolat (888-0) der Universität Hamburg	(Schmitt et al., 1994)
<i>H. pylori</i> P12		P12 Δ <i>cagA</i>	(Odenbreit et al., 2000)
<i>H. pylori</i> P12		P12 Δ <i>cagPAI</i>	
<i>H. pylori</i> P12	DP-P01	P12 Δ <i>MKI</i> Δ <i>C2</i>	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	DP-P21	P12 Δ <i>MKI</i>	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	DP-P20	P12(K946A); veränderte CagA-MKI-Motive, 3 Lysinreste (K) sind durch Alanin (A) ersetzt, K946, 980, 1014A	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	DP-P10	P12(CagA-F2); veränderte CagA-EPIYA-A- und -B-Motive, 2 Tyrosinreste (Y) sind durch Phenylalanin (F) ersetzt	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	DP-P12	P12(CagA-F3); veränderte CagA-EPIYA-C-Motive, 3 Tyrosinreste (Y) sind durch Phenylalanin (F) ersetzt	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	DP-P14	P12(CagA-A3); veränderte CagA-Prozessierungsstelle N880-882A	diese Arbeit

Stamm-hintergrund	Interne Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>H. pylori</i> P12	DP-P15	P12(CagA-A2); veränderte CagA-Prozessierungsstelle N882-883A	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	DP-P19	P12 Δ napA	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> P12	CW-P01	P12[pCW1]	Christine Woischke
<i>H. pylori</i> P12	RW-P02	P12(CagA-A6); veränderte CagA-Prozessierungsstelle N880-885A	Ramona Weimer
<i>H. pylori</i> P12	WS-P250	P12(CagA-Y5); veränderte CagA-EPIYA-Motive, 5 Tyrosinreste (Y) sind dauerhaft phosphoryliert	Christine Woischke
<i>H. pylori</i> P12	WS-P251	P12(CagA-F5); veränderte CagA-EPIYA-Motive, 5 Tyrosinreste (Y) sind durch Phenylalanin (F) ersetzt	Christine Woischke

2.3 Oligonukleotide und Plasmide

Die in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgelisteten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers und Metabion bezogen. Die Plasmide pDP13 und pDP14 aus Tabelle 5 wurden durch Invitrogen GeneArt™ Gene Synthesis (ThermoFisher) synthetisiert.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Oligonukleotidsequenz 5' -> 3'
BB11	AAC AAC GCT GCG AAC AAC GGA CTC AAA AAC GAA CCC ATT TAT G
BB12	GCG GCC GCT AAC AAC AAC GGA CTC AAA AAC GAA CCC ATT TAT G
HP245	CGG CTC GAG TCA TAG TAT CTC CAT TTC AGC G
JP6	GGC CGA GCT CGG TAC CTT AAG ATT TTT GGA AAC CAC
RH136	ATA AGA ATG CGG CCG CTA AAT GAC TAA GGA AGC TAA AAT GGA G
RH137	ATA AGA ATG CGG CCG CTT ACG CCC CGC CCT GCC AC
WS391	ACC TGC GGC CGC TAA AGT GGA ATT TCA TGC
WS423	ACC GCT CGA GAA CCC TAG TCG GTA ATG GG
WS452	GCG GTA CCG TCG ACG ATC TTG AAA AAT CTC TAA AGA AAC

Name	Oligonukleotidsequenz 5' -> 3'
WS454	GAA ATT TCC AAG TTT TGC ATT C
WS593	ACG TCT CGA GCA ATT GGC TCA ACA AGC
WS596	ACT GGT CGA CGT TAC GAA TGG CGT TTC C
WS707	CGG GAT CCG CCC ATT TGG CTT AAG CGA C
WS708	ACT GGT CGA CAA TTT CAA ATG TTT TCA TCA AAA GTC
WS764	AGC CAT AGC GGA TAA GCT C
WS765	AAA CCC CGT AGG CTC TAT C
MKI-I <i>upstream</i>	CGC CGA GAT CAT CAA TCG TAG CAT AAA TGG GTT CAG GGC TAG CTG AAA GGC CCG CTG CTT GCC CTA CAC CAC CC
MKI-III <i>downstream</i>	CTT TCA GCT AGC CCT GAA CCC ATT TAT GCT ACG ATT GAT GAT CTC GGC GGA CCT CTT TCA AGG AAT CAA AAA TTG GCT C

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Eigenschaften
pCW2	Plasmidvektor pUC18 mit <i>cagA</i> -Sequenz von Position 613-1214 aus P12, <i>cat</i> -Kassette aus pWS336 und <i>cagA-downstream</i> -Sequenz von Position 39814-40435, Cam ^R
pDP01	pCW2Δ <i>MKIΔC2</i> , Cam ^R
pDP02	pCW2 + pWS267 <i>insert</i> , Cam ^R
pDP03	pCW2 + pWS268 <i>insert</i> , Cam ^R
pDP06	pCW2 mit Austausch der Asparaginreste der CagA-Prozessierungsstelle an Position 880-882 durch Alanin, Cam ^R
pDP10	pCW2 mit Austausch der Asparaginreste der CagA-Prozessierungsstelle an Position 882-883 durch Alanin, Cam ^R
pDP12	Deletionsplasmid aus pNapA mit <i>cat</i> -Kassette aus pWS336, Cam ^R
pDP13	pMK-RQ mit Austausch der Aminosäuren K946A, K980A, K1014A in den CagA-MKI-Motiven, Kan ^R
pDP14	pMK-RQ mit Deletion der CagA-MKI-Motive, Kan ^R
pNapA	NapA-Genkassette

Name	Eigenschaften
pWS267	pCagA-F2, Plasmid mit Austausch des phosphorylierbaren Tyrosinrests des CagA-EPIYA-A- und -B-Motivs durch Phenylalanin aus Stamm NCTC11637, Cam ^R
pWS268	pCagA-F3, Plasmid mit Austausch des phosphorylierbaren Tyrosinrests der CagA-EPIYA-C-Motive durch Phenylalanin aus Stamm NCTC11637, Cam ^R
pWS336	Chloramphenicol- <i>cat</i> -Genkassette
pWS376	Plasmid mit Vollängen-CagA, GSK-tag, <i>cat</i> -Kassette aus pWS336 und <i>cagA-downstream</i> -Sequenz von Position 39814-40435, Cam ^R
pWS627	pWS376 + pDP13 <i>insert</i> , Cam ^R , Amp ^R
pWS628	pWS376 + pDP14 <i>insert</i> , Cam ^R , Amp ^R

2.4 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Verwendungszweck oder Name	Zusammensetzung
<i>Infektionsexperimente</i>	
DPBS	Dulbecco's PBS ohne Kalzium, Magnesium oder Natriumbikarbonat (Life Technologies)
DPBS*	PBS mit Inhibitor-Mix
Inhibitor-Mix	1 mM Natrium-Orthovanadat, 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin
<i>Immunpräzipitationen</i>	
RIPA	125 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 (v/v), 6 mM Natrium-Deoxycholsäure
RIPA*	RIPA mit Inhibitor-Mix
<i>SDS-PAGE</i>	

Verwendungszweck oder Name	Zusammensetzung
2 x SDS-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl, 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8; z.T. 5% (v/v) β -Mercaptoethanol
Acrylamidlösung	29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgel-Puffer	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
SDS-Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
<i>Western Blot</i>	
Anodenpuffer I	300 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-n-Caprinsäure oder Glycin, pH 9,4
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
AP-Entwicklungslösung	0,1 M Tris-HCl, 7 mM MgCl ₂ , 0,1 g/l NBT, 50 mg/l BCIP, pH 9,6
Absättigungspuffer	TBS, 3% BSA, 0,007% Tween 20
Waschpuffer	TBS, 0,007% Tween 20
10 x Stripping-Puffer	250 mM Glycin, 10% SDS, pH 2,0
<i>Puffer für 2D-Experimente</i>	
2 x HBSS	0,74 g/l HBSS, pH 7,2
RPMI-Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin (phenolrotfrei), 20% FCS, pH 7,2
Absättigungslösung	3% BSA, PBS
<i>DNA-Auftrennung</i>	
TAE-Elektrophoresepuffer	40 mM Tris-HCl, 20mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,5
GEBS-Puffer	50 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 0,5% (w/v) N-Laurylsarkosin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Färbebad	1 mg/l Ethidiumbromid in Wasser
Methylenblaulösung	1 g/l Methylenblau

2.6 Nährmedien, Platten und Zusätze

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Medien, Platten und Zusätze für Bakterien- und Zellkultur

Medium oder Zusatz	Herstellung
LB-Medium	20 g/l Lennox-LB-Medium (Life Technologies)
LB-Platten	32 g/l Lennox-LB-Agar (Life Technologies)
Einfriermedium <i>E. coli</i>	LB-Medium, 20% Glycerin
BB-Medium	28 g/l <i>Brucella Broth</i> (Oxoid, Thermo Fisher)
Serumplatten	36 g/l GC-Agar-Basis (Oxoid); nach Autoklavierung Zugabe von 8% Pferdeserum, 1% Vitaminmix, 1 mg/l Nystatin und 5 mg/l Trimethoprim
Vitaminmix	100 g/l α -D-Glucose, 1 g/l Adenin, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 26 g/l L-Cystein, 1 g/l L-Cystin, 10 g/l L-Glutamin, 0,25 g/l Nicotinamidadeninucleotid (NAD), 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 3 mg/l Thiamin, 0,5 g/l Uracil, 10 mg/l Vitamin B12
Einfriermedium <i>H. pylori</i>	BB-Medium, 20% Glycerin, 10% FCS
DMEM-Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit L-Glutamin (Life Technologies)
RPMI-Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin (Life Technologies)
DMSO	(Sigma-Aldrich)
DPBS	Dulbecco's PBS ohne Kalzium, Magnesium oder Natriumbikarbonat (Life Technologies)
TE	Trypsin-EDTA, 1:10 (Gibco, Invitrogen)
Einfriermedium Zelllinien	FCS, 10% DMSO

2.6.1 Antibiotika und Antimykotika

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Hemmstoffe

Hemmstoffe und Zusätze	Arbeitskonzentration <i>E. coli</i>	Arbeitskonzentration <i>H. pylori</i>
Ampicillin (Sigma-Aldrich)	100 mg/l	
Chloramphenicol (Fluka)	30 mg/l	6 mg/l
Kanamycin (Sigma-Aldrich)	50 mg/l	8 mg/l
Trimethoprim (Sigma-Aldrich)		5 mg/l
Nystatin (Sigma-Aldrich)		1 mg/l

2.7 Enzyme und Proteine

Bovines Serumalbumin (BSA) (Biomol), N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) (Sigma Aldrich), fötales Kälberserum (FCS) (Life Technologies), humanes, rekombinantes C5a (Peprotech, Sigma Aldrich), LA Taq-DNA-Polymerase (TAKARA), humanes Leukotrien B₄ (LTB₄) (Santa Cruz Technologies), Pferdeserum (PAA), *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene), Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase (NEB), Proteinase K (Merck), Protein G-Agarose, Restriktionsendonukleasen (Fermentas, NEB, Roche), T4-DNA-Ligase (NEB).

2.7.1 Antikörper

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	eingesetzte Verdünnung
α -CagA (AK257)	Polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen CagA-Teil von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)	Western-Blot: 1:5.000
α -CagA (AK268)	Polyklonales Antiserum gegen den N-terminalen CagA-Teil von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)	Western-Blot: 1:1.000
α -CagA (AK299)	Polyklonales Antiserum gegen die EPIYA-Region des CagA von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)	Western-Blot: 1:5.000 IP: 1:500
α -P-Tyr (4G10)	Polyklonales Antiserum gegen Tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus); Überstand der Zelllinie 4G10	Western-Blot: 1:500
α -P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper gegen Tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus) (Santa Cruz Technologies)	Western-Blot: 1:2.000 IP: 1:100
α -MARK2 (ABIN484588)	Polyklonaler Antikörper gegen humane <i>microtubule Affinity-Regulating Kinase 2</i> (MARK2) (Kaninchen) (Assay BioTech)	Western-Blot: 1:1.000 IP: 1:100
α -RecA (AK263)	Polyklonales Antiserum gegen ein RecA-Fusionsprotein (Kaninchen) (Schmitt <i>et al.</i> , 1995)	Western-Blot: 1:2.500
α -Tubulin (ab56676)	Monoklonaler Antikörper gegen Tubulin (Maus) (abcam)	Western-Blot: 1:50.000

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	eingesetzte Verdünnung
α -Maus IgG-AP	Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Sigma-Aldrich)	Western-Blot: 1:5.000
α -Kaninchen IgG-POX	Peroxidase (POX)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Sigma-Aldrich)	Western-Blot: 1:10.000
α -Maus IgG-POX	Peroxidase (POX)-gekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege) (Sigma-Aldrich)	Western-Blot: 1:10.000
AP-gekoppeltes Protein A (Sigma-Aldrich)		Western-Blot: 1:5.000

2.8 Molekulargewichtsmarker

Tabelle 11: Molekulargewichtsmarker

Anwendung	Marker
DNA-Gelelektrophorese	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (MBI Fermentas)
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180kDa (MBI Fermentas/ Thermo Scientific)

2.9 Kommerziell erworbene Kits

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Kits

Verwendungszweck	Kit
Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
chromosomale DNA aus <i>H. pylori</i>	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
Aufreinigung von PCR- oder Restriktionsverdau-Fragmenten	illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Bakterienkultur und Stammhaltung

3.1.1.1 Helicobacter pylori

Helicobacter pylori-Bakterien wurden auf Serumplatten ausgestrichen und zunächst über 2 Tage unter mikroaeroben Bedingungen (37 °C, 10 % CO₂, 5 % O₂) bebrütet, ehe sie passagiert wurden. Vor der experimentellen Verwendung wurde *Helicobacter pylori* mindestens zweimal weitergestrichen. Die bakterielle Stammhaltung erfolgte bei -70 °C in *H. pylori*-Einfriermedium, wobei Material von mindestens einer halben Platte in einem Milliliter resuspendiert wurde.

3.1.1.2 Escherichia coli

Escherichia coli-Bakterien wurden entweder auf Luria-Bertani-(LB)-Agar mit Antibiotikumszusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator angezüchtet oder in LB-Flüssigmedium mit Antibiotikumszusatz angeimpft und über Nacht bei 180 rpm, 37 °C geschüttelt. Neue Stämme wurden in *E. coli*-Einfriermedium resuspendiert und bei -70 °C gelagert.

3.2 Arbeiten mit Zellen

3.2.1 AGS-Zellen

AGS-Zellen sind adhärente Zellen, die mit RPMI-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer 75 cm²-Kulturflasche (BD Falcon) kultiviert wurden. Vor der Verdünnung wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin-EDTA für 5 min im Inkubator abgelöst. Die Trypsinierung wurde im Anschluss mit 5 ml RPMI-Medium gestoppt. AGS-Zellen wurden im Verhältnis 1:5 (2 Tage) beziehungsweise 1:11 (3 Tage) verdünnt. Für Versuche wurde eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Napf einer 6-Well-Platte (Corning) in 2 ml Medium verwendet.

3.2.2 HL-60-Zellen

HL-60-Zellen wurden mit RPMI-Medium unter den gleichen Inkubationsbedingungen kultiviert. Die nicht adhärenen Suspensionszellen wurden alle 2 bis 3 Tage in einem Verhältnis von 1:3 beziehungsweise 1:5 mit frischem Medium verdünnt. Für Versuche wurde eine 75 cm²-Kulturflasche bei 100x g zentrifugiert und anschließend das Pellet mit RPMI-Medium und 1,3 % DMSO in eine 25 cm³-Kulturflasche überführt und für 6 Tage ohne Mediumswechsel zu Granulozyten-ähnlichen Makrophagen differenziert.

3.2.3 Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer Zählkammer dient der Bestimmung der Zellkonzentration in Flüssigkeiten und besteht aus 4 Feldern, die in 16 Quadrate unterteilt sind.

Vor der Auszählung wurden differenzierte HL-60-Zellen bei 100x g, RT über 5 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen. 10 µl der Zellsuspension wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau-Lösung gemischt und 10 µl davon wurden in die Neubauer Zählkammer pipettiert.

Die gefärbten Zellen in den 4 Feldern wurden in einem mäandernden Schema ausgezählt, sodass mittels Formel (siehe unten) auf die Anzahl der Zellen pro Milliliter geschlossen werden konnte. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden im Anschluss mit 1 ml RPMI-Medium in einen Napf einer 6-Well-Platte pipettiert.

Formel

gezählte Zellen / 4 * 10^5 (Verdünnungsfaktor) = Anzahl der Zellen / Milliliter

3.3 *In vitro*-Infektionen

H. pylori wurde mit einem sterilen Wattestäbchen von einer Serumplatte abgenommen und in RPMI mit 10 % FCS resuspendiert. Im Folgeschritt wurde die gewonnene Bakteriensuspension 1:100 verdünnt und ihre Absorption (= Optische Dichte (OD)) bei 550 nm in einem Photometer bestimmt. Bei Infektionen wurde eine Optische Dichte von 0,2 angestrebt, was einem Verhältnis von circa 60 Bakterien pro Zelle (= Multiplizität der Infektion (MOI) = 60) entspricht. Die Zell-Bakterien-Mischung wurde bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

Nach 4 h wurde die Infektion der adhärenen Zellen durch Inkubation auf Eis gestoppt, dann zweimal mit 2 ml PBS* gewaschen und mit einem Zellschaber abgelöst, ehe die Zell-Bakterien-Infektion für 5 min bei 600x g und 4 °C zentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde in 20 µl PBS* und 25 µl 2x SDS-PAGE-Puffer aufgenommen und bei 95 °C für 10 min denaturiert.

Suspensionszellen wurden nach 4 h in ein Eppendorfgesäß überführt, für 5 min bei 600x g und 4 °C zentrifugiert und das so entstandene Zellpellet zweimal mit 500 µl PBS* gewaschen. Das weitere Vorgehen war analog zu dem mit adhärenen Zellen.

3.4 Arbeiten mit DNA

3.4.1 Präparation chromosomaler *H. pylori*-DNA

Um genomische DNA von *H. pylori* zu isolieren, wurde mindestens ein Fünftel einer Serumplatte mit einem sterilen Wattestäbchen geerntet und in 300 µl ATL-Puffer resuspendiert. Das weitere Vorgehen richtete sich nach dem Protokoll des QIAamp DNA Mini Kit-Herstellers (QIAGEN).

3.4.2 Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien wurden zunächst über Nacht 2 ml LB-Flüssigmedium mit Antibiotikumszusatz mit einer Kolonie angeimpft und bei 37 °C, 180 rpm geschüttelt. Das weitere Vorgehen zur Aufreinigung und Isolation der Plasmide richtete sich nach dem Protokoll des QIAprep Spin Miniprep Kit-Herstellers (QIAGEN).

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ziel der Polymerase-Kettenreaktion ist die selektive Vervielfältigung eines DNA-Sequenzabschnittes. Für die PCR von kurzen, d.h. < 4.000 bp langen Fragmenten, wurde die LA Taq-Polymerase (TAKARA) in einem Versuchsansatz von 50 µl verwendet; für reverse Polymerase-Kettenreaktionen wurde die High Fidelity Phusion-Polymerase (TAKARA) in einem Ansatz von 20 µl eingesetzt. Die Präparation des PCR-Ansatzes erfolgte nach Herstellerangaben.

Für die LA Taq-Polymerase galt folgendes Protokoll: Denaturierung der Matrizen-DNA für 5 min bei 94 °C, dann ein dreißigfach wiederholter Zyklus aus 30 s DNA-Denaturierung bei 94 °C, 30 s bei 52 °C zur Anlagerung der Oligonukleotide und ein bis 4 min bei 68 °C zur Polymerisation des gewünschten Fragments. Danach folgte ein weiterer Elongationsschritt bei 68 °C über 10 min.

Reverse Polymerase-Kettenreaktionen mit der High Fidelity Phusion Polymerase wurden mit einem dreiminütigen Matrizen-DNA-Denaturierungsschritt bei 98 °C gestartet und die DNA zunächst über 10 Zyklen für 30 s bei 98 °C denaturiert, für 30 s bei 52 °C die Primer angelagert und für 8 min bei 68 °C elongiert. Darauf folgte ein zweiter, 25-fach wiederholter Zyklus, bei dem pro Zyklus zur Elongationszeit 5 s zusätzlich addiert wurden. Zum Ende der PCR wurden die DNA-Fragmente für weitere 10 min bei 68 °C polymerisiert. Eine Kontrolle der Fragmentgröße fand nicht statt.

Mittels reverser PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden vor der Aufreinigung zur Verdauung methylierter Matrizen-DNA mit ein bis 5 µl des Restriktionsenzym *DpnI* bei 37 °C für 30 min behandelt. Die Enden der Fragmente wurden im Anschluss mit 1 µl Pfu-Polymerase (Stratagene) und dNTPs bei 72 °C für 30 min geglättet.

3.4.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur DNA-Elektrophorese wurde ein einprozentiges Agarosegel gegossen und für etwa 1 h bei Raumtemperatur gehärtet. Als Platzhalter für Proben diente ein Kamm mit 10 bis 20 Zinken. In einer Gelelektrophorese-Kammer wurde das Gel mit TAE-Elektrophoresepuffer überschichtet und der Kamm gezogen, sodass die Taschen befüllt werden konnten. Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit 2x GEBS-Puffer gemischt und anschließend in eine Tasche pipettiert. Anschließend wurden 5 µl des Markers zugegeben. Die Gelelektrophorese fand bei 60 V über mindestens 60 min statt, danach erfolgte die Einfärbung des Gels in Ethidiumbromid für 15 bis 30 min. Die Richtigkeit von Polymerasekettenreaktionen und Plasmid-Testverdauen wurde so bestätigt.

Nach dem präparativen Verdau von Plasmiden wurden diese ebenfalls in ein einprozentiges Agarosegel gegeben. Nach der Elektrophorese wurde das Gel allerdings mit einer einprozentigen Methylenblaulösung für 30 min eingefärbt und im Anschluss bis zur Darstellung der Bänder mit Wasser ausgewaschen.

3.4.5 DNA-Fragmentisolierung und –aufreinigung

Für die DNA-Aufreinigung aus präparativen TAE-Agarosegelen, PCR-Reaktionen und Restriktionsenzymverdauen wurde das illustra GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit (GE) nach Herstellerangaben verwendet.

3.4.6 Restriktionsenzymverdau

Für einen analytischen Testverdau wurden insgesamt 10 µl einer Reaktionslösung bestehend aus 0,5 µl Restriktionsenzym, 1 µl 10x Puffer, 3 µl Plasmid beziehungsweise DNA sowie 5 µl doppelt destilliertem Wasser verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C. Konnte bei einem Doppelverdau mit zwei Enzymen nicht derselbe Puffer verwendet werden, so wurde das Gemisch zunächst über das GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit (GE) nach Herstellerangaben aufgereinigt und im Anschluss ein zweiter Verdau angesetzt. Die korrekte Fragmentgröße wurde mittels TAE-Agarosegel bestätigt.

Das Reaktionsgemisch für präparative Verdaue wurde in fünffacher Menge angesetzt und über 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde GEBS-Puffer im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und ein einprozentiges TAE-Agarosegel beladen. Die Banden wurden bei 60 V über mindestens 60 min aufgetrennt und mit 1 % Methylenblaulösung gefärbt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit (GE).

3.4.7 Ligation

DNA-Fragmente wurden in einem Verhältnis 7:1 (*Insert : Backbone*) zu 1 µl T4 DNA-Ligase und 1 µl 10x Puffer auf einen Reaktionsansatz von 10 µl gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.4.8 DNA-Sequenzierung

Plasmid- und PCR-Sequenzierungen zum Ausschluss von Mutationen wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

3.4.9 Transformation von Bakterien

3.4.9.1 Transformation von E. coli

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot chemisch kompetenter TOP 10 *E. coli*-Bakterien auf Eis angetaut und mit 1 bis 5 µl Plasmid- beziehungsweise 10 µl Ligationslösung versetzt. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42 °C über 45 s und ein Kälteschock auf Eis über 2 min durchgeführt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Flüssigmedium wurde die Bakterien-Plasmid-Mischung bei 37 °C, 1.200 rpm über 1 h geschüttelt und danach 100 µl auf eine Selektivantibiotikumsplatte ausplattiert.

3.4.9.2 Transformation von H. pylori

Die in dieser Arbeit verwendeten *H. pylori*-Stämme sind natürlich kompetente Bakterien, die keiner besonderen Vorbehandlung bedurften, um Plasmid-DNA aufzunehmen und in ihr Genom einzubauen. Ein Viertel einer Serumplatte wurde mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und in 1 ml vorgewärmten Brucella broth-Medium mit 10 % FCS resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C unter mikroaeroben Bedingungen wurden 5 µl eines Plasmids zur Flüssigkultur hinzugegeben und für weitere 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 5.000 rpm, RT über 5 min zentrifugiert, in 25 µl BB-Medium mit 10 % FCS resuspendiert und auf Serumplatten mit Antibiotikumszusatz zur Selektionierung ausplattiert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine proteinbiochemische Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen. Sie wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Zunächst wurde ein Trenngel nach der Anleitung von Sambrook (Sambrook *et al.*, 2001) gegossen, mit destilliertem Wasser überschichtet und für eine halbe Stunde ausgehärtet. Je nach der zu erwartenden Proteingröße beinhaltete es eine höhere oder niedrigere Konzentration an Acrylamid.

Im folgenden Schritt wurde das Wasser abgegossen und das Trenngel mit einem Sammelgel, bestehend aus einer fünfprozentigen Acrylamidlösung, überschichtet. Vor Aushärtung wurde zusätzlich ein Kamm in das Gel geschoben, sodass Taschen für die Proben ausgebildet wurden.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele mithilfe einer Gelkassette in vertikale Gelelektrophoresekammern (BioRad) gegeben, mit Elektrophoresepuffer überschichtet und mit 8 μ l der Proben beziehungsweise des Molekulargewichtsmarkers beladen. Die SDS-PAGE wurde bei 100 V gestartet, sodass sich die Proteine am Übergang von Sammel- zu Trenngel konzentrieren konnten und dann bei 130 V fortgeführt.

3.5.2 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine nach der Methode von Towbin (Towbin *et al.*, 1992) über ein semitrockenes Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurden zunächst zwei *Whatman*-Filterpapiere mit Anode I-Puffer getränkt und auf der Granitbasis der *Blotting*-Kammer platziert. Darauf folgten zwei dünne mit Anode-II-Puffer getränkte Filterpapiere sowie die PVDF-Membran, die davor für 5 s mit Methanol aktiviert und dann im Anode-II-Puffer feucht gehalten wurde. Die nächste Lage bildete das SDS-Gel, das mit je zwei dünnen und dicken, in Kathoden-Puffer getränkten Filterpapieren überschichtet wurde. Der Proteintransfer fand bei 65 mA pro Membran über 75 min statt. Im Anschluss wurde die nun mit Protein beladene PVDF-Membran getrocknet.

Zur Detektion einzelner Proteine wurde die Membran 2 s in Methanol aktiviert, in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und mindestens eine Stunde mit 5 ml Absättigungspuffer zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf einem Rollenmischer bei Raumtemperatur (wie alle folgenden Schritte) inkubiert. Dann wurde ein primärer Antikörper in der in Tabelle 9 beschriebenen Verdünnung hinzugegeben und für circa eine Stunde (α -Tubulin-IgG-Antikörper: 30 min) inkubiert, ehe die Flüssigkeit durch 5 ml Verdünnungspuffer ersetzt wurde. Dieser Waschschritt wurde im Abstand von 10 bis 15 min vier- bis sechsmal wiederholt. Danach wurde ein sekundärer Antikörper, der entweder POX- oder AP-gekoppelt war, in 5 ml Verdünnungspuffer auf die Membran gegeben und für 45 min inkubiert (s. Tabelle 10). Es folgte die gleiche Waschprozedur wie nach dem ersten Antikörper.

Bei Entwicklung mit einem AP-gekoppelten Antikörper wurde der Verdünnungspuffer verworfen und stattdessen 10 ml einer Entwicklungslösung in das Reaktionsgefäß hinzugegeben und

bis zum Erscheinen von Proteinbanden inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss getrocknet.

Für sensitivere Proteinnachweise wurden POX-gekoppelte Antikörper verwendet. Hier wurde nach dem letzten Waschschrift der Puffer verworfen und stattdessen je ein Milliliter einer Detektionslösung (Millipore) in das Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde die Membran für etwa 2 min auf den Rollenmischer gegeben und währenddessen eine Expositions-kassette mit Klarsichtfolie vorbereiten. In diese wurde die Membran zur Vermeidung von Austrocknung gelegt.

In der Dunkelkammer wurde darauf für ein bis 300 s ein unbelichteter Röntgenfilm gelegt, auf dem die Proteinbanden mit Hilfe einer Röntgenfilmentwicklungsmaschine sichtbar gemacht werden konnten.

3.5.3 Immunpräzipitation

Zunächst wurden 15 bis $20 \cdot 10^6$ HL-60-Zellen wie unter 3.3 beschrieben mit *H. pylori* bei einer MOI von 30 über einen Zeitraum von 4 h bei 37 °C, 5 % CO₂ infiziert. Im Anschluss wurde die Zellinfektion in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 5 min bei 100x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 525 µl RIPA* aufgenommen. 25 µl davon wurden in 20 µl 2x SDS-Laufpuffer und 5 % Mercaptoethanol aufgenommen und 10 min bei 95 °C denaturiert.

Die verbleibenden Mengen wurden auf Eis gestellt und für 5 min mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Es folgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 500x g und 4 °C. Der so entstandene Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert und über Nacht mit einem Antikörper (Verdünnungsverhältnis s. Tabelle 9) bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden 50 µl Protein-G-Agarose zur Zell-Bakterien-Suspension gegeben und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Darauf wurde das Pellet dreimal zentrifugiert (5.000 rpm, 4 °C, 5 min) und das Pellet in 500 µl RIPA* resuspendiert. Anschließend folgte die Aufnahme des Pellets in 25 µl RIPA*, 20 µl 2x SDS-Laufpuffer und 5 % Mercaptoethanol sowie die Denaturierung der Proteine bei 95 °C über 10 min.

3.6 Under-Agarose Cell Migration Assay

3.6.1 Versuchsaufbau und Durchführung

Ziel dieses Versuches ist die direkte Beobachtung von migrierenden Zellen unter einem farblosen Agarosegel. Die Methode wurde nach Heit (Heit *et al.*, 2003) modifiziert und gilt als Weiterentwicklung der Boyden-Chamber, mit der zwar eine Aussage über die Anzahl der migrierenden Zellen, jedoch nicht über das Verhalten auf der zurückgelegte Strecke getroffen werden konnte.

Zunächst wurden die benötigten Lösungen für die Beschichtung einer 8-Well-Platte (beziehungsweise eines 35 mm Plastikschälchens) (*ibidi*) hergestellt und im Anschluss steril filtriert. Im ersten Schritt wurden 300 μ l (3 ml) Absättigungslösung in einen Napf pipettiert und bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Währenddessen wurden 5 ml 2x HBSS mit 10 ml farblosem RPMI-Medium gemischt und auf 68 °C erwärmt sowie 0,24 g Ultrapure Agarose in 5 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst und für viermal 15 s in der Mikrowelle erhitzt. Zwischen jedem Erwärmungsschritt wurde die Agarosemischung mit einem Vortexer gemischt.

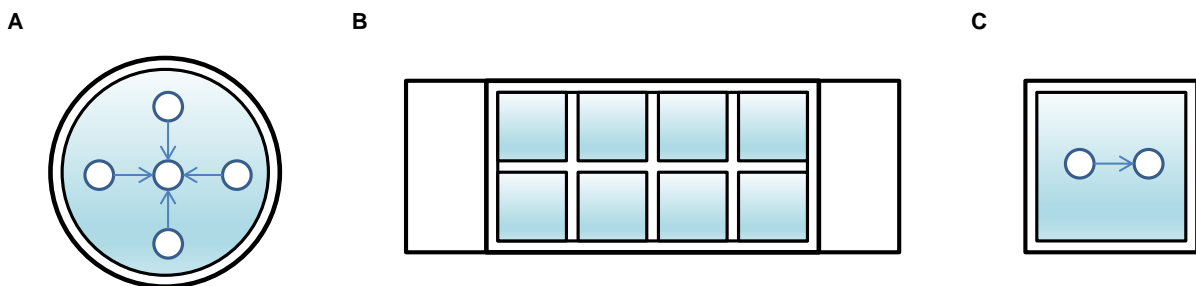


Abbildung 3: Vergleich zwischen Schälchen und 8-Well-Platte

A Im zentralen Loch des 35 mm-Schälchens befindet sich der Lockstoff. Die infizierten und uninfizierten Zellen werden rundherum angeordnet. **B** Durch Verwendung einer 8-Well-Platte können bis zu 7 Infektionen und eine uninfizierten Kontrolle beobachtet werden. **C** Vergrößerung eines Wells: Es werden 2 Taschen gestochen. In eine wird Chemoattraktans pipettiert und in die andere Tasche die Zellen. Die Richtung der Migration bleibt dabei immer dieselbe.

Nach 30 min wurde die Absättigungslösung abgesaugt und die Mediumsmischung mit der Agarose vermischt. 500 μ l (3 ml) des Agars wurden in ein Well pipettiert und für 12 min, RT abgekühlt, ehe er in einer feuchten Kammer bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert wurde. Nach einer Stunde wurden mittels eines Röhrchens mit 5 mm im Durchmesser je 2 Taschen pro Well gestanzt und gesäubert (s. Abb. 3). Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt von 1 h. In dieser Zeit wurden

$1 \cdot 10^6$ differenzierte HL-60-Zellen mit *H. pylori*-Varianten bei einer MOI = 10, OD₅₅₀ = 0,033 infiziert, sofern nicht anders beschrieben.

Danach wurde entstandenes Kondenswasser aus den Taschen abgesaugt. In eine Tasche pro *Well* wurden 15 μ l eines Chemoattraktans pipettiert, in die andere $1 \cdot 10^6$ dHL-60-Zellen beziehungsweise eine Zell-Bakterien-Suspension bestehend aus differenzierten HL-60 und *H. pylori*-Varianten. Zuvor wurde die Infektion 5 min bei 100x g, RT abzentrifugiert und in 15 μ l resuspendiert.

Bis zum Start der Filmaufnahme an einem konfokalen LEICA TCS SP5-Mikroskop (Leica Microsystems) mit fahrbarem Tisch und auf 37 °C beheizbarer Kammer wurden die infizierten Zellen im Gel für mindestens 15 min inkubiert. Pro *Well* wurde alle 30 s über 1 bis 2 h ein Bild der migrierenden Zellen erstellt.

3.6.2 Semiautomatische Filmanalyse mit Fiji und TrackMate

Die entstandenen *lif*-Filme wurden in Fiji (is just ImageJ) geladen und für die Weiterverarbeitung mit *TrackMate* vorbereitet: Dafür wurden zunächst die Bilder eines Films dupliziert und die Farben invertiert. Über die Funktion „*Subtract Background*“ mit einem „*Rolling Ball Radius*“ von 30 Pixeln wurde der Hintergrund vergleichmäßig. Um nun die Zellen vom Hintergrund abzuheben wurde der Kontrast erhöht.

TrackMate ist ein frei verfügbares Add-on für Fiji, das eine automatische Auswertung von sich bewegenden Objekten ermöglicht (Tinevez *et al.*, 2017). Zur Etablierung dieser Software wurden verschiedene Parameter getestet; die nachfolgenden Einstellungen haben sich dabei als am sinnvollsten zum Tracking der Zellen herausgestellt:

In der Startmaske lassen sich Kalibrierungseinstellungen wie Pixelweite und -höhe sowie das Zeitintervall zwischen den einzelnen Bildern einstellen. Die aktuelle Version 3.8.0 entnimmt diese Angaben direkt aus der *lif*-Datei. In weiteren Feldern lassen sich der Bildausschnitt und das zu betrachtende Zeitintervall wählen. In unserem Fall wurde ein Bildausschnitt in der Mitte der Filme gewählt, da sich im linken Bildbereich das nicht zu bewertende Zellreservoir befindet und die Zellen im rechten Bildbereich, insbesondere in den Ecken, außerhalb des Fokus sind.

Im folgenden Schritt wurde ein Detektor gewählt, der Partikel einer bestimmten Größe erkennt. Da differenzierte HL-60-Zellen annähernd einen Durchmesser von 20 μ m haben, verwendeten

wir den Laplacian of Gaussian-(LoG)-Detektor mit einer erwarteten Partikelgröße von 20 Micronen und einem Grenzwert von 2 Micronen. Dieser Wert dient der Reduktion der Datenmenge durch Aussortieren falsch positiv erkannter Partikel. Nach der Partikelsuche wurde ein weiterer Grenzwert anhand des Merkmals „Qualität“ gesetzt. Dies dient ebenfalls der Reduktion der benötigten Rechenleistung durch das Ignorieren von Zellen mit schlechter Qualität, das heißt von Zellen, die der Algorithmus mit hoher Wahrscheinlichkeit als falsch positiv und damit irrelevant identifiziert hat. Hier wurden alle Punkte links des Kurvenminimums verworfen.

Zur gemeinsamen Darstellung von Partikeln und ihren Spuren wurde der *HyperStack-Displayer* ohne die Einstellung von Filtern gewählt. Für die mathematische Auswertung der Zellbewegung wurde der *Simple LAP Tracker* gewählt, da in diesen Versuchen Zellteilung nicht vorkommen sollte und die Funktionen „*Split*“ und „*Merge*“ damit obsolet sind. Als maximale Verbindungsdistanz eines Punktes zwischen 2 Bildern wurden 30 Micronen als 1,5-fache Zelllänge gewählt. Die maximale Verbindungsdistanz zwischen 3 Bildern, in denen ein Partikel vom Algorithmus nicht erkannt wurde, beträgt 60 Micronen oder die dreifach Zelllänge. Um die Datenqualität zu erhöhen, wurden alle Partikelspuren mit einer minimalen Qualität von unter 10 – 15 (keine Einheit vorhanden) herausgefiltert. Über die „*Analysis*“-Schaltfläche wurden die benötigten Parameter wie zum Beispiel die Positionen X und Y einer Zelle zu jedem Zeitpunkt im Film zur Weiterverarbeitung der Daten automatisch errechnet und die „*Spots in Tracks Statistics*“ als *csv*-Datei abgespeichert.

3.6.3 Datenauswertung mithilfe eines Python-Skripts

Aufgrund der Entscheidung in *TrackMate* die Spuren von in bis zu 3 Bildern verlorenen Partikeln im vierten Bild fortzuführen, um die Länge eines Tracks zu verlängern, entstanden bei der analytischen Auswertung Lücken in den Zellspuren mit denen das „*Chemotaxis and Migration Tool*“ der Firma *ibidi* nicht umgehen konnte. In Zusammenarbeit mit Tobias Eßwein wurde ein Python-Skript erstellt, das zunächst die Größe der Lücke erkennt und die Bilder linear miteinander verbindet. Je nach Größe werden so ein bis maximal 3 Lücken gefüllt.

Für die statistische Auswertung wurden Zellspuren gewählt, die mindestens 40 Bilder beziehungsweise 20 min lang waren. Bei diesen Spuren wurden analog zum *Chemotaxis Tool* Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$, die akkumulierte Distanz (in μm), die euklidische Distanz (in μm),

die Direktionalität, beide *Forward Migration Indices* und das Zentrum der Masse berechnet (s. Anhang).

Die Direktionalität entspricht hierbei der euklidischen beziehungsweise kürzesten Verbindungslinie zwischen Anfangspunkt A und Endpunkt Z der nachverfolgten Zellspur geteilt durch die insgesamt zurückgelegte Strecke. Im Idealfall entsprechen sich diese beide Distanzen und der Endwert ist 1. Je größer die akkumulierte Weite im Vergleich zur kürzest möglichen Strecke wird, desto weniger geradlinig laufen die Zellen auf das Chemoattraktans zu. Die Direktionalität ist deshalb kein direkter Parameter für Chemotaxis.

Der *Forward Migration Index* bezieht sich auf die Endposition der Zelle in einem fiktiven Koordinatensystem mit x- und y-Achse. Dementsprechend gibt es einen FMI (x) beziehungsweise parallel (\parallel), der sich auf die parallele Bewegung der Zelle in Richtung Lockstoff bezieht und möglichst bei 1 sein sollte sowie einen FMI (y) oder FMI^{\perp} , der Auskunft gibt über die orthogonale Bewegung der Zelle entlang der y-Achse und der sich bei einem Trigger in x-Richtung der 0 annähern sollte. Beide Werte errechnen sich durch die x- beziehungsweise y-Position zum Endpunkt Z im Koordinatensystem geteilt durch die akkumulierte Distanz.

Das Zentrum der Masse ist ein starker Parameter zur Evaluation der Chemotaxis und gibt an, in welche Richtung sich Gesamtheit der Zellen bewegt hat. Es errechnet sich aus der Summe der x- beziehungsweise y-Verschiebung der Zellen vom Startpunkt A geteilt durch die Anzahl an Zellen.

Nach der Auswertung der genannten Parameter wurde pro Wiederholung eine Excel-Datei ausgegeben. Um die so gewonnen Daten besser vergleichbar zu machen, wurden der Mittelwert der Kontrolle gebildet und jeder Versuch auf diesen normalisiert.

3.6.4 Statistische Auswertung mit GraphPad Prism 5

Die normalisierten Daten wurden in GraphPad Prism 5 eingelesen und deren Normalverteilung über den D'Agostino und Pearson Omnibus Normalitätstest geprüft. Da dieser bei reinen Chemoattraktansexperimenten meistens negativ ausfiel, wurde zur Analyse der einzelnen Versuche der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test mit einem anschließenden Dunns Säulenvergleich gewählt. Die Infektionsexperimente waren meist normalverteilt, deshalb wurden diese mit einem One-Way-ANOVA und anschließendem Tukey-Test analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der vermuteten Prozessierungsstelle von CagA

Neben der Translokation in Magenepithelzellen wird CagA über das T4SS auch in Leukozyten injiziert. Hier wird das Effektorprotein in ein 100 kDa großes und ein kleineres C-terminales 35 kDa-großes Fragment gespalten (Kaplan-Turkoz *et al.*, 2013, Hayashi *et al.*, 2012). Die Funktion dieser Prozessierung ist aktuell nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre jedoch die Einflussnahme auf die Migration von Leukozyten. Bisher konnte eine Tertiärstruktur für das N-terminale Fragment bestimmt werden. Das kleinere C-terminale Spaltprodukt scheint intrinsisch strukturell ungeordnet zu sein und könnte an den Positionen 882 – 916 kurz vor dem EPIYA-A-Motiv beginnend eine Schleife ausbilden. Am Beginn dieser Schleife steht eine konservierte Aminosäuresequenz aus 5 bis 6 Asparaginresten, die auch bei Versuchen mit durch *E. coli* rekombinant produziertem CagA in verschiedenen Längen im Bereich dieser Stelle prozessiert wird (Angelini *et al.*, 2009, Nesic *et al.*, 2010).

Vorversuche unserer Gruppe, die ebendiese 6 Asparaginreste mutagenisierten und entweder durch einen Serinrest oder, um die Zahl der Aminosäuren beizubehalten, durch 6 Alaninreste ersetzt, zeigten die Relevanz ebendieser Asparaginreste für die Prozessierung. Im Folgenden sollte die genaue Erkennungssequenz weiter eingrenzt werden.

4.1.1 Herstellung der Prozessierungsmutanten P12(CagA-A3) und P12(CagA-A2)

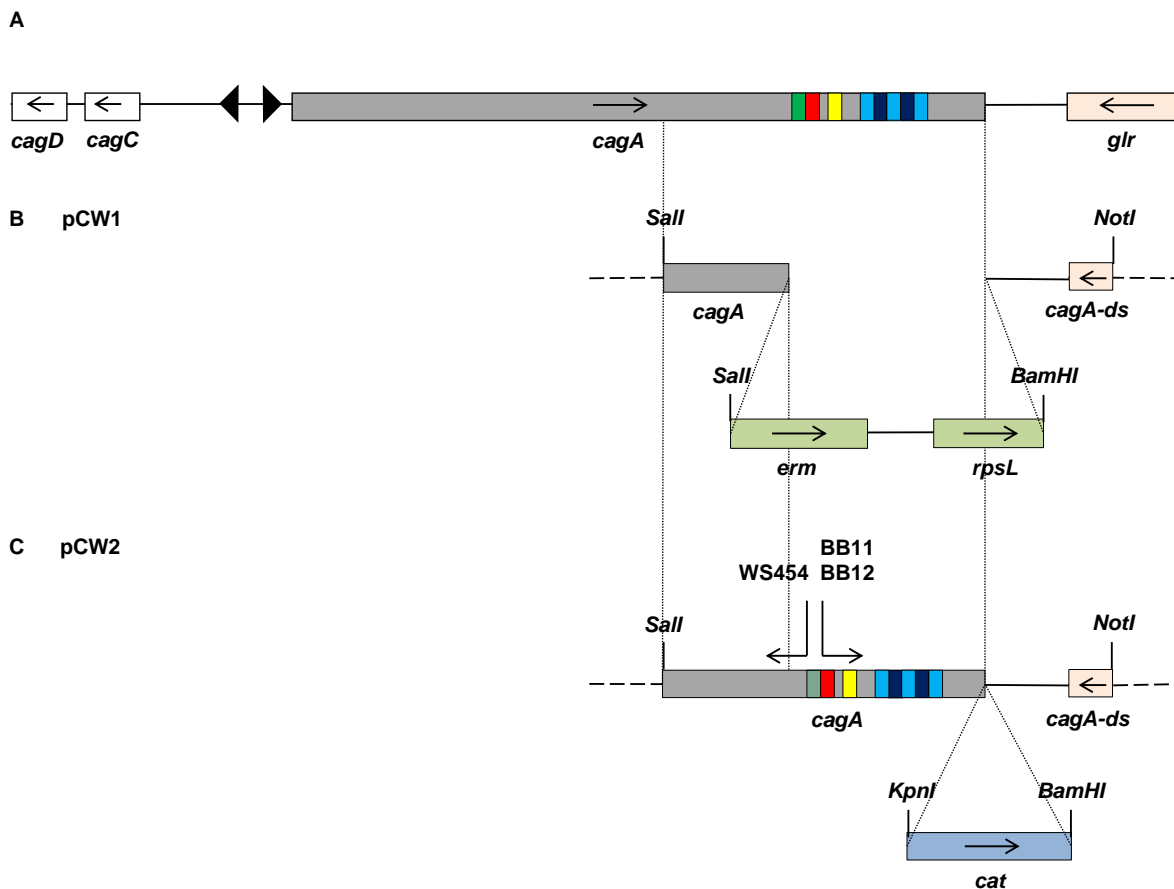
Zur Herstellung verschiedener Mutanten wurde P12[pCW1] und das zugehörige Komplementationsplasmid pCW2 verwendet. Das Deletionsplasmid pCW1 enthält dabei eine 500 bp lange *cagA*-Region (Codon 613 – 781) sowie eine 600 bp lange *downstream*-Region. Dazwischen wurde eine *rpsL-erm*-Resistenzgen-Kassette kloniert. Als Basis für pCW2 diente ein pUC18-Vektor. In diesen wurden ein Teil des *cagA*-Gens (Codon 613 – 1214) sowie eine 600 bp lange *downstream*-Region kloniert. Zwischen die beiden Genabschnitte wurde über *KpnI/BamHI* eine Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette eingefügt. Über dieses chromosomale Komplementationsverfahren konnten nun verschiedene Mutationen in *H. pylori* P12 eingebracht werden.

Für die Änderung der kodierenden Basen wurde eine reverse PCR von Plasmid pCW2 mit den Primern WS454 und BB11 oder BB12 angesetzt. Die letzteren Primer enthielten in *upstream*-Richtung einen überhängenden Teil, in dem 2 beziehungsweise 3 der Asparagin-codierenden

Basentriplets durch Alanin-codierende Triplets ersetzt wurden, und hefteten sich an der *cagA*-Position 886 – 894 an (s. Abb. 4).

Nach der PCR wurde das Produkt zum Verdau der methylierten *Template*-DNA (pCW2) mit *DpnI*, im Anschluss zum Glätten der Enden mit *Pfu*-Polymerase inkubiert und mittels Ligation zirkularisiert (s. Methoden 3.4.7). Die entstandenen Plasmide wurden in *E. coli* transformiert und auf Chloramphenicol-LB-Platten selektioniert. Nach der Präparation wurden 4 Plasmide sequenziert und auf die eingebrachten Mutationen kontrolliert. Da bei der Veränderung der vermuteten Prozessierungsstelle keine neue Schnittstelle für Restriktionsenzyme eingebracht wurde, fand vor der Sequenzierung kein Testverdau statt.

Die entstanden Plasmide pDP06 und pDP10 wurden aufgrund der natürlichen Kompetenz von *H. pylori* ohne zusätzliche Behandlung in den Stamm P12[pCW1] transformiert. Der Erfolg wurde durch Gewinnung genomischer DNA sowie eine anschließende PCR und Sequenzierung bestätigt.



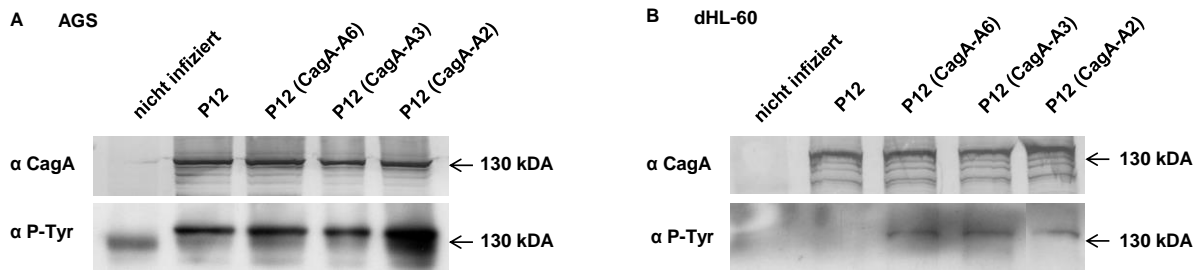


Abbildung 5: Translokation und Phosphorylierung von Wildtyp-CagA und Mutanten-CagA in AGS- und die Prozessierung in dHL-60-Zellen

A CagA wird in Magenepithelzellen phosphoryliert. Die Menge des translozierten CagA scheint dabei zwischen Wildtyp und Prozessierungsmutanten vergleichbar zu sein. **B** Auch in differenzierten HL-60-Zellen wird CagA transloziert und phosphoryliert. Eine Prozessierung ist jedoch nur beim Wildtyp nachzuweisen.

Im Western Blot mit uninfizierten beziehungsweise 4 h lang infizierten dHL-60-Zellen zeigte sich die typische Prozessierung und Phosphorylierung des P12-Wildtyp-CagAs mit einem C-terminalen Fragment von etwa 35 kDa, wohingegen die Mutanten P12(CagA-A2), P12(CagA-A3) und P12(CagA-A6) nicht gespalten wurden. Trotz dieses Prozessierungsdefekts fand sich eine tyrosinphosphorylierte Bande bei 135 kDa.

4.2 Untersuchung des C-terminalen Fragments von CagA

4.2.1 Herstellung der EPIFA-Mutanten

Um in Zellmigrationsexperimenten den Einfluss der phosphorylierungsabhängigen und unabhängigen CagA-Effekte zu beurteilen, wurden phosphorylierungsdefekte EPIYA-Mutanten sowie MKI-Deletions- und -Austauschmutanten hergestellt.

Über eine Schnittstellenklonierung wurden zunächst die beiden EPIYA-Varianten P12(CagA-F2) sowie P12(CagA-F3) hergestellt. P12(CagA-F2) sollte im EPIYA-A- und -B-Motiv statt eines Tyrosinrests einen phosphorylierungsresistenten Phenylalaninrest enthalten, P12(CagA-F3) den gleichen Aminosäureaustausch in den EPIYA-C-Motiven. Die Motive waren Teil von *cagA*-Varianten des Stamms NCTC11637, die 3 EPIYA-C-Motive beinhalten. Zunächst wurde pCW2 mit *Bgl*III und *Kpn*I verdaut, sodass ein Vektorfragment mit Chloramphenicol-Resistenz und *cagA*-downstream-Region entstand (s. Abb. 6). Als nächstes wurden die Plasmide pWS267 und pWS268 mit den gleichen Enzymen verdaut um die entsprechenden *cagA*-3'-Fragment zu erhalten, die dann in pCW2 ligiert wurden. Nach der

Transformation in *E. coli* und Selektion auf Chloramphenicol-LB-Agar wurden so die Plasmide mit den gewünschten EPIYA-Varianten kultiviert.

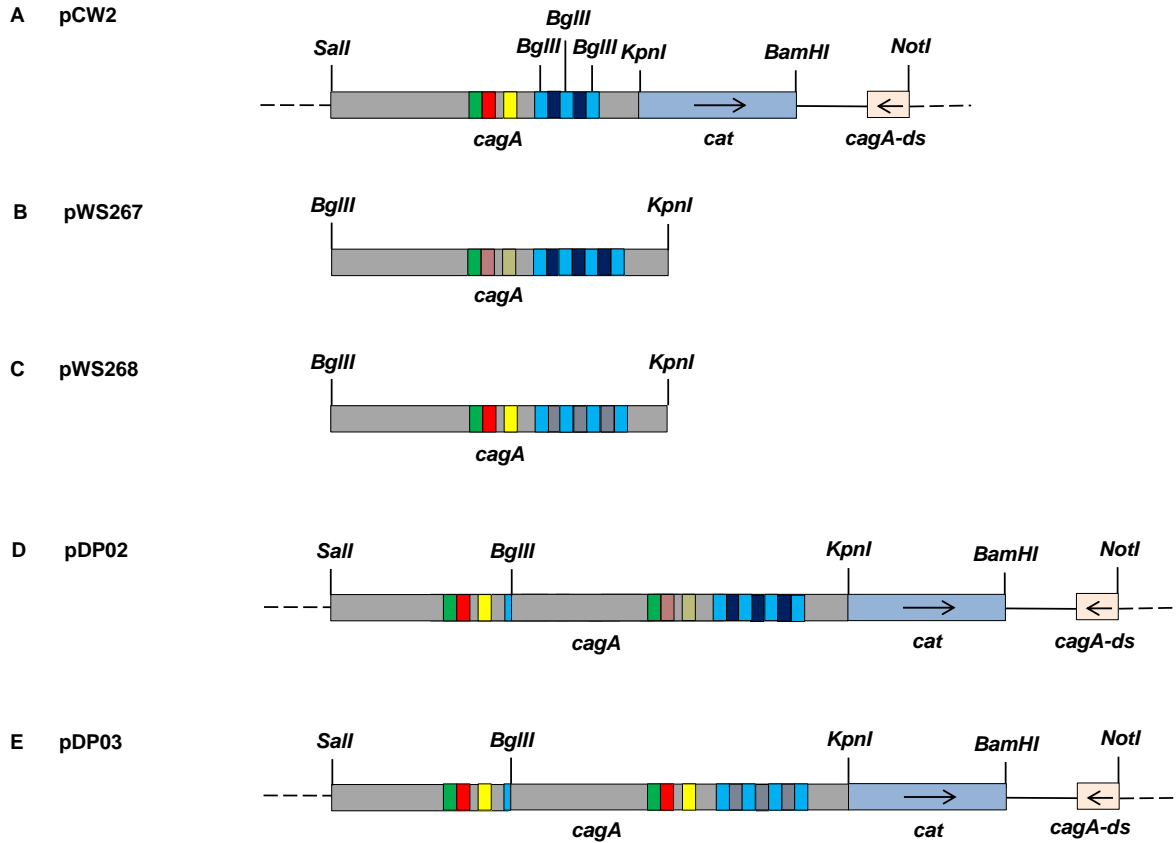


Abbildung 6: Herstellung der phosphorylierungsresistenten EPIYA-Mutanten

A Schematische Darstellung des Plasmids pCW2. *BglIII* schneidet dreifach in den MKI-Motiven (hellblau). **B+C** Darstellung der Vektorfragmente aus pWS267 und pWS268, die jeweils 1 A- (rot), B- (gelb), und 3 C-Motive (dunkelblau) aus *H. pylori*-Stamm NCTC11637 enthalten. Die Transparenz der Farbe zeigt die Phosphorylierungsresistenz durch Austausch von Tyrosin zu Phenylalanin an. Zudem eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *BglIII* und *KpnI*. **D+E** Klonierung der Plasmide pDP02 und pDP03. Durch Schnitt von *BglIII* an unterschiedlichen Stellen des CagA-Proteins kommt es zur Verdopplung der Schnittstelle (grün) sowie von EPIYA-A- und -B-Motiv.

Durch den Schnitt von *BglIII* im 1. MKI-Motiv von pCW2 und vor der vermuteten CagA-Prozessierungsstelle in pWS267 und pWS268 entstanden 2 neue Plasmide mit einer Verdoppelung von EPIYA-A- und EPIYA-B-Motiv. Dies wurde aufgrund der sehr guten Transformierbarkeit von pCW2 bewusst in Kauf genommen, da durch das *cagA-upstream*-Element in pCW2 eine korrekte Rekombination recht wahrscheinlich war. Nach Selektionierung der *H. pylori*-Mutanten auf Chloramphenicol-BB-Agar wurde genomische DNA gewonnen und der betreffende

Genomabschnitt mit PCR überprüft und im Anschluss sequenziert und so nur die korrekt re-kombinierten *H. pylori*-CagA-Varianten verwendet.

4.2.2 Untersuchung der EPIFA-Mutanten in Bezug auf Translokation, Phosphorylierung und Prozessierung in AGS- und dHL-60-Zellen

Die Zelllinien AGS und HL-60 wurden mit dem P12-Wildtyp und den hergestellten Mutanten infiziert. Das Verhalten des CagA-Protein im Wildtyps und in den Mutanten wurde anschließend in einem Western Blot überprüft. Wie erwartet, zeigte sich bei beiden Varianten ein im Vergleich zum P12 Wildtyp wenige kDa größeres Protein, das in die Magenzellen transloziert und danach phosphoryliert wird. Wie in der Literatur beschrieben wurden dabei die EPIYA-C-Motive stärker tyrosinphosphoryliert als das EPIYA-A- und -B-Motiv, weshalb die Mutante P12(CagA-F3) in der Färbung ein deutlich schwächeres Signal zeigt als P12(CagA-F2) (s. Abb. 7).

Im passenden dHL-60-Immunoblot wurden diese Feststellungen bestätigt und zusätzlich die Prozessierung in ein 100 kDa- und ein kleineres 40 kDa-Fragment der Mutanten gezeigt. Damit konnte die Unabhängigkeit von Phosphorylierung und Prozessierung nachgewiesen werden.

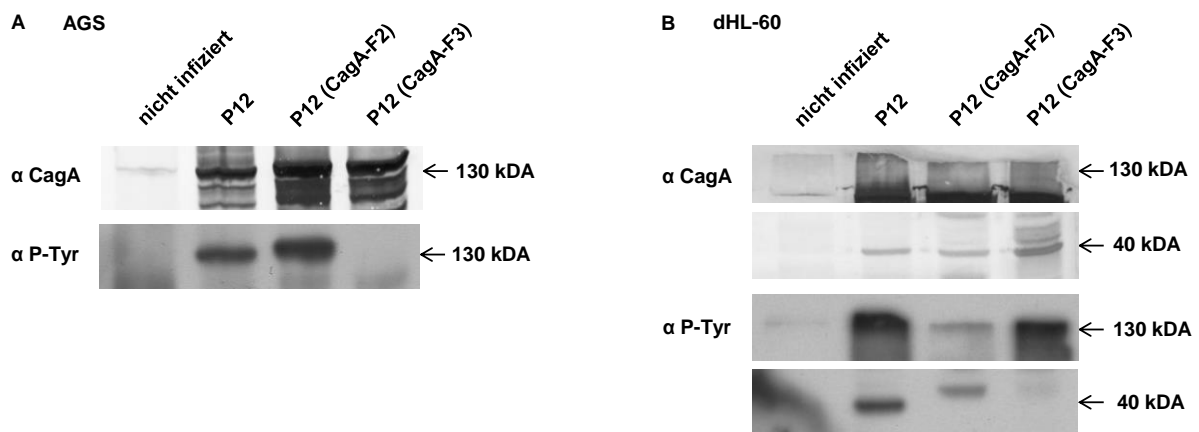


Abbildung 7: Translokation und Phosphorylierung von Wildtyp-CagA und EPIFA-Mutanten-CagA in AGS- und die Prozessierung in dHL-60-Zellen

A CagA wird in AGS-Zellen transloziert und phosphoryliert. Das Mutanten-CagA ist etwas größer als das Wildtyp-CagA. Das Protein von P12(CagA-F2) wird dabei vergleichbar phosphoryliert. Das CagA von P12(CagA-F2) wird ebenfalls transloziert, jedoch kann eine Phosphorylierung kaum nachgewiesen werden. **B** Sowohl das Wildtyp-Protein als auch das Mutanten-CagA wird in differenzierten HL-60 transloziert, phosphoryliert und prozessiert. Die Infektion mit P12(CagA-F3) zeigt eine schwächere CagA-Phosphorylierung als die mit P12(CagA-F2).

4.2.3 Herstellung der MKI-Varianten und -Deletionsmutanten

Phosphorylierungsunabhängige CagA-Effekte finden hauptsächlich über die Interaktion zwischen der zellulären MARK-Kinase und den sog. MARK-Kinase-inhibierenden-Motiven (MKI) im C-terminalen Teil des CagA-Proteins statt. Um deren Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von infizierten Zellen zu beurteilen, wurden zunächst 3 verschiedene Mutanten, darunter 2 Deletions- sowie eine Basenaustauschmutante, hergestellt.

Über eine inverse PCR von Plasmid pCW2 mit einem MKI-*downstream*-Oligonukleotid, das sich nach dem 3. MKI-Motiv des P12-CagA-Proteins anheften sollte und einen 5'-Überhang mit den Basentriplets für EPIYA-C beinhaltete, und einem MKI-*upstream*-Primer, der sich vor dem 1. MKI-Motiv anlagern sollte und ebenso einen EPIYA-C-kodierenden Überhang hatte, sollten alle MKI-Motive eliminiert und dabei die EPIYA-C-Motive erhalten bleiben (s. Abb. 8). Nach der PCR wurde das methylierte Ursprungsplasmid mittels *DpnI* verdaut und das Produkt im Anschluss mit *Pfu*-Polymerase behandelt. Die Sequenzierung der im Anschluss transformierten und ligierten Plasmide zeigte einen Verlust des 2. EPIYA-C-Motivs.

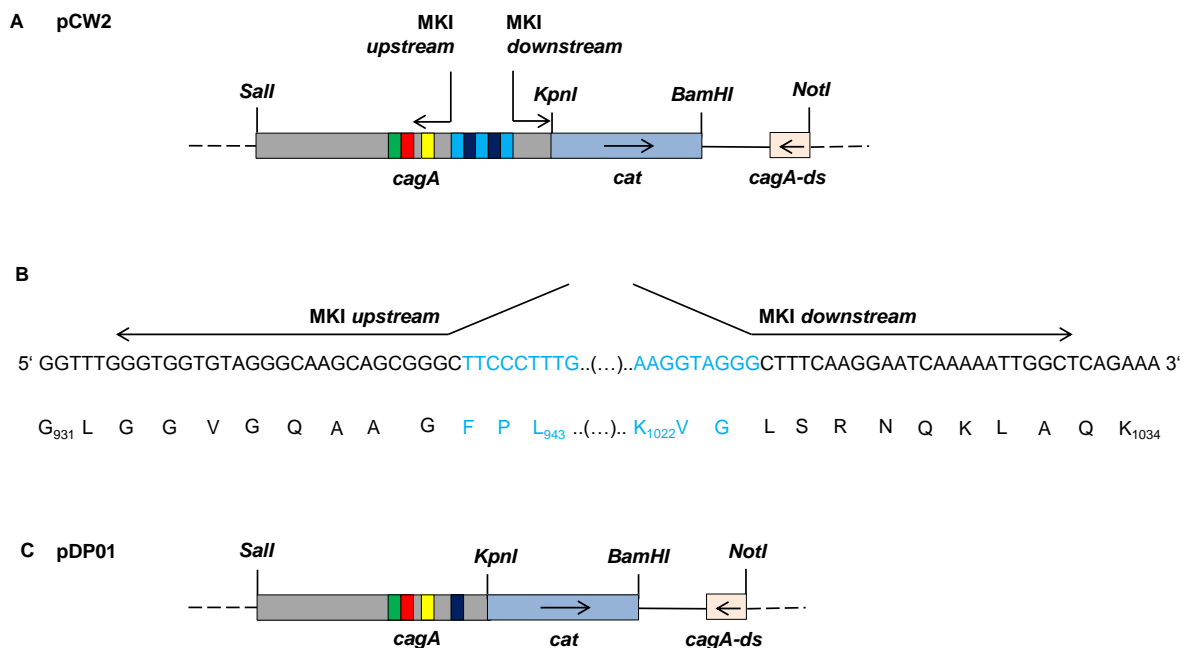


Abbildung 8: Herstellung der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante

A Das Plasmid pCW2 mit eingezeichneten MKI- (hellblau) und EPIYA-Motiven (rot, gelb, dunkelblau) sowie Restriktionsenzymstellen und dem verwendeten Primerpaar MKI *upstream* und MKI *downstream*. **B** Kodierende Basentriplets am Anfang des ersten und letzten MKI-Motivs mit zugehörigen Aminosäuren. Die erste und letzte AS ist nummeriert. Die Primer wurden mit EPIYA-C-kodierendem Überhang eingezeichnet. **C** Das ligierte Endplasmid pDP01 mit fehlendem EPIYA-C2-Motiv und deletierten MKI-Sequenzen.

Dennoch wurde ein Plasmid in P12[pCW1] transformiert und nach der Gewinnung genomischer DNA der Verlust des 2. EPIYA-C-Motivs erneut bestätigt.

Aufgrund der Probleme bei der Herstellung der MKI-Mutanten durch die repetitive EPIYA-Region in *cagA* wurden die betreffenden Genabschnitte in einem weiteren Ansatz durch Gen-synthese (ThermoFisher GeneArt) synthetisieren und in einen *pBluescript*-Vektor mit Kanamycin-Resistenz klonieren.

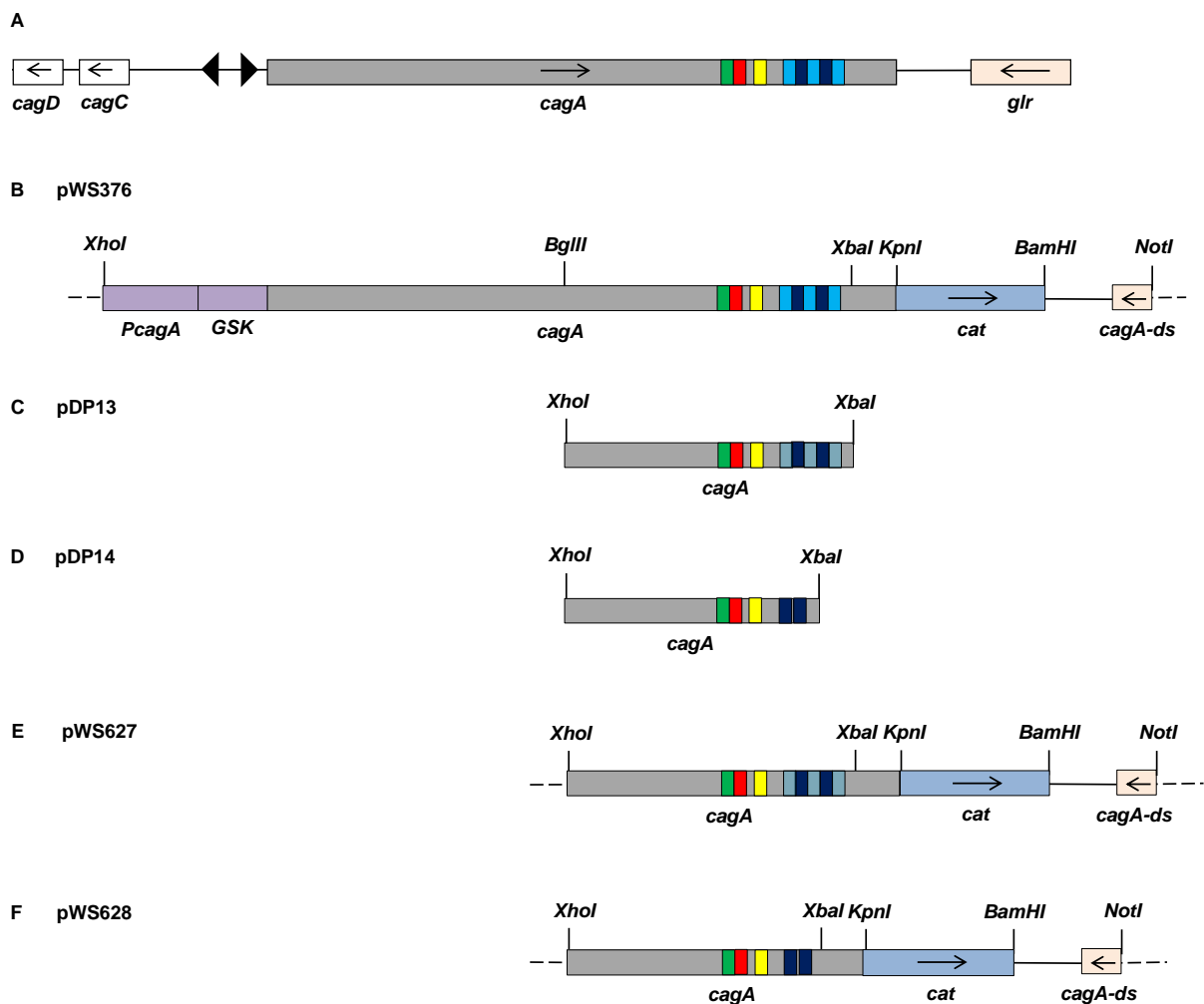


Abbildung 9: Herstellung der MKI-Mutanten P12(K946A) und P12 Δ MKI

A Schematische Darstellung von *cagA* innerhalb der *cagPAI*. **B** Darstellung von pWS376 mit Schnittstellen, Chloramphenicol-Resistenzgen und *cagA*-downstream-Region. **C+D** Schematische Darstellung der synthetisierten Genabschnitte. Plasmid pDP13 enthält MKI-Motive, die an den Positionen 946, 980 und 1014 Basentriplets für Alanin- statt Lysinreste haben. Bei pDP14 fehlen die MKI-Motive komplett. Zusätzlich eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Eine Erhöhung der Transparenz zeigte den Austausch der Aminosäuren an. **E+F** Klonierte Plasmide pWS627 und pWS628.

Die Vektorfragmente enthielten zum einen die kodierende Sequenz für einen Teil des CagA ohne die MKI-Motive und zum anderen die komplette Länge des Genabschnitts mit einem Basenaustausch der Lysin-kodierenden zu Alanin-kodierenden Triplets an den Positionen 946, 980 sowie 1.014. Ebendiese Lysine scheinen wichtig für die Funktion der MKI-Motive zu sein (Nesic *et al.*, 2010). Zusätzlich wurden die *cagA*-3'-Fragmente mit Schnittstellen für *XhoI* und *XbaI* versehen, sodass diese in pWS376 eingefügt werden konnten.

4.2.4 Untersuchung der MKI-Mutanten und -Varianten in Bezug auf Translokation, Phosphorylierung und Prozessierung in AGS- und dHL-60-Zellen

Zum Vergleich der Mutanten untereinander und mit dem P12-Wildtyp wurden AGS- und differenzierte HL-60-Zellen infiziert und die Zelllysate über eine SDS-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt.

Im Western Blot konnte der Größenunterschied der CagA-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein eindeutig sichtbar gemacht werden. Weiterhin konnten die Translokation und Phosphorylierung des CagA-Proteins in AGS-Zellen gezeigt werden. Die Phosphorylierung war dabei unabhängig von der Anwesenheit der MKI-Motive beziehungsweise unabhängig von den Lysinresten an den ausgetauschten Positionen (s. Abb. 10).

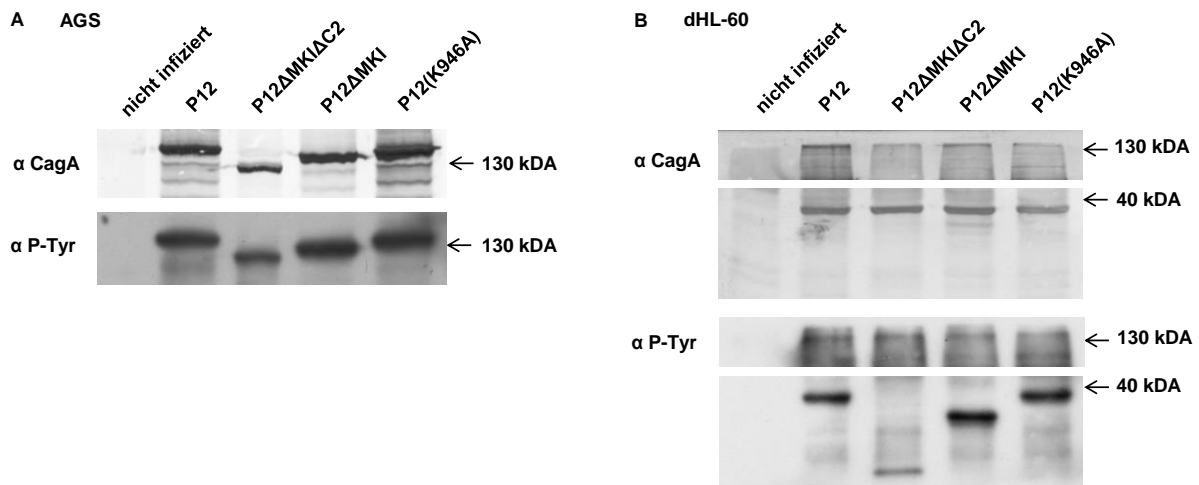


Abbildung 10: Translokation und Phosphorylierung von Wildtyp-CagA und MKI-Mutanten-CagA in AGS- und die Prozessierung in dHL-60-Zellen

A CagA wird in AGS-Zellen transloziert und hier phosphoryliert. Größenunterschiede zwischen den Deletionsmutanten und dem Wildtyp sind deutlich sichtbar. Das CagA der Variante P12(K946A) hat die gleiche Größe wie das Wildtyp-CagA-Protein. **B** Wildtyp- und Mutanten-CagA wird in differenzierte HL-60-Zellen transloziert, phosphoryliert und prozessiert. Aufgrund des fehlenden EPIYA-C2-Motivs zeigt die Mutante P12 Δ MKI Δ C2 ein schwächeres Signal.

Im Immunoblot der dHL-60-Infektionen zeigte sich der Größenunterschiede der prozessierten C-terminalen CagA-Fragmente und deren Phosphorylierung. Um diese CagA-Phosphorylierung der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante eindeutig nachzuweisen, wurde hier der Infektion noch eine Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphorylierte Proteine (α PY99) angeschlossen (s. Abb. 11).

Im Western Blot der Immunpräzipitation der uninfizierten Kontrolle, des P12-Wildtyps und der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante zeigten sich eine deutliche Anreicherung der phosphorylierten Bande bei 35 kDa, was der Größe des C-terminalen Wildtypfragments entspricht sowie der CagA-entsprechenden 25 kDa-Bande der MKI-Mutante, sodass damit eine Translokation mit nachfolgender Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte.

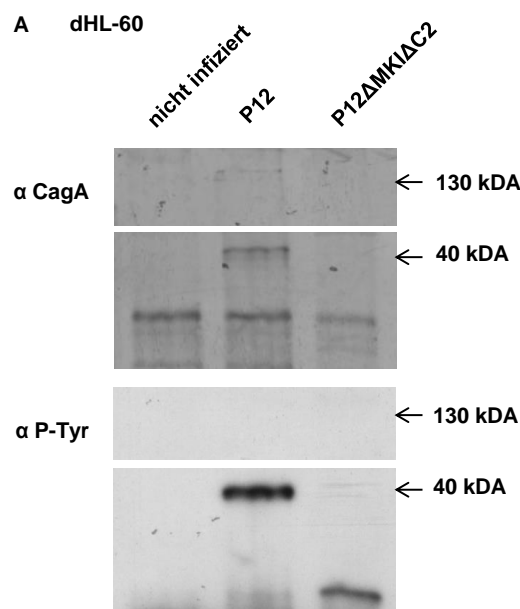


Abbildung 11: Western Blot der Immunpräzipitation der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante

A Immunpräzipitation mit α PY99 und anschließender Western Blot. Es reichert sich phosphoryliertes Wildtyp- und MKI-Mutanten-CagA an.

4.3 Zellmigrationsexperimente

4.3.1 Vorarbeiten mit Boyden-Chamber und *Under-Agarose-Cell-Migration-Assay*

Zur Untersuchung der Migration und Chemotaxis von Zellen stehen verschiedene Versuchsaufbauten zur Verfügung. In der Boyden-Chamber-Anordnung (Boyden, 1962) wird Medium beziehungsweise Chemoattraktans in eine Grundplatte mit Nöpfen pipettiert und in diese kleine Körbchen mit einer Zell-Medium-Suspension gegeben. Am Boden dieser Körbchen befinden

sich kleine Löcher durch die sich ein Chemoattraktansgradient ausbilden kann und durch die sich die Zellen in die Näpfe bewegen können. Damit sich die Zellen dafür aktiv verformen müssen, haben die Löcher einen dreifach geringeren Durchmesser als der Zelldurchmesser. Mithilfe eines Durchflusszytometrie-Geräts (FACS) kann die Zellzahl im Napf nach einigen Minuten bis Stunden gemessen werden und damit auf die chemotaktische Wahrnehmung des Lockstoffs durch die Zellen geschlossen werden. Ein großer Nachteil dieses Versuchs ist die fehlende Aussagekraft bezüglich Zellverhalten zwischen dem Anfangspunkt A und dem Endpunkt Z.

Durch die mikroskopische Beobachtung der migrierenden Zellen unter einem Gel lässt sich im *2-D-Under-Agarose-Cell-Migration-Assay* (Heit *et al.*, 2003) eine Aussage über die zurückgelegte Strecke der Zellen und jede Zellposition zum Zeitpunkt X treffen. Aus diesen Parametern lassen sich die Geschwindigkeit, die Direktionalität, das Zentrum der Masse und der sog. *Forward Migration Index* als Marker für die gerichtete Bewegung der Zellen ermitteln.

Nachdem Boyden-Chamber und *Under-Agarose-Assay* bereits mit teils unbefriedigenden Ergebnissen im Labor etabliert wurden (C. Woischke, R. Weimer, unveröffentlichte Daten) und die Auswertung kompliziert und langwierig war, sollte der Assay nun verbessert und die Auswertung der Zellmigration vereinfacht werden.

4.3.2 Optimierung des *Under-Agarose-Assays* und der Auswertung

Um zum einen verschiedene Lockstoffkonzentrationen auf einmal miteinander vergleichen zu können und zum anderen die Möglichkeit zu haben, die Migration von bis zu 7 Zell-Bakterien-Infektionen und eine nicht infizierte Kontrolle gleichzeitig zu beobachten, wurde der *Under-Agarose-Assay* auf ein 8-Well-Format angepasst. Jedes *Well* wurde dabei behandelt wie sonst das 35 mm Plastikschälchen. Als Unterschied wurden pro *Well* 2 Taschen im Abstand der doppelten Taschenbreite ausgestochen (s. Methoden).

Anstatt der händischen Auswertung am Computer wurde das semiautomatische Tracking der Zellen über *TrackMate*, einem frei im Internet verfügbaren Add-On für Fiji (is just ImageJ) etabliert. Im Anschluss daran mussten die Dateien weiterhin in Excel importiert und für das *Chemotaxis and Migration Tool* angepasst werden, das Lücken in den Partikelspuren nicht automatisch füllte und dadurch nur kurze Spuren auswerten konnte. Um dieses Problem und das folgende mühsame Abspeichern jeder einzelnen Infektion zu vereinfachen, erfolgte die

Automatisierung und Vereinfachung über ein von Tobias Eßwein kodiertes Python-Skript (s. Anhang) sowie ein Excel-Makro, das die Normalisierung der Daten übernahm.

4.3.2.1 Migrationsverhalten von dHL-60-Zellen bei verschiedenen Chemoattraktanzien: fMLP, LTB₄ und C5a

Vorversuche mit 100 nM fMLP konnten Veränderungen bei der Geschwindigkeit zwischen infizierten und uninfizierten dHL-60-Zellen auflösen, jedoch keine Unterschiede bei der chemotaktischen Migration zeigen, weshalb verschiedene Konzentrationen und Lockstoffe auf die Beeinflussung der Leukozytenmigration getestet werden sollten.

Zunächst wurde fMLP, ein Peptid, das beim Abbau von Bakterien oder Mitochondrien entsteht und ein in der Literatur beschriebenes potentes Chemoattraktans für dHL-60-Zellen, PMNs und Makrophagen darstellt (Carp, 1982, Marasco *et al.*, 1984), verwendet. Bei fMLP-Konzentrationen zwischen 10 nM und 1 µM wurden die Zellen etwa 60 Minuten im Gel inkubiert, bevor sie für 60 min gefilmt wurden. Die Zellen wurden bei einer mittleren Geschwindigkeit der Medium-Kontrolle von 10 µm/min über 40 Bilder beziehungsweise 200 µm verfolgt.

Es zeigte sich, dass fMLP ein ausgezeichnetes Chemoattraktans für differenzierte HL-60-Zellen darstellt (s. Abb. 12 und 13). Im Vergleich zum Medium erhöhte die Konzentration von 10 nM und 20 nM fMLP die zurückgelegte Distanz der Zellen um den Faktor 1,7 beziehungsweise 1,9. Die Direktionalität blieb dabei ähnlich. Im Gegensatz zum Medium bewegten sich die Zellen bei den oben genannten Konzentrationen mit einer fast doppelt so hohen Geschwindigkeit und der FMI parallel veränderte sich ähnlich.

Bei sehr hohen Lockstoffgradienten mit Konzentrationen von 100 nM bis 1000 nM fMLP wurde eine mit der Kontrolle vergleichbare akkumulierte Distanz und Geschwindigkeit erreicht, jedoch wurde weniger euklidische Strecke zurückgelegt. Auch der niedrige FMI bestätigte die veränderte Reaktion der Zellen auf die hohen fMLP-Werte. In den aufgenommenen Filmen ließ sich zunächst eine geradlinige Bewegung beobachten, die gefolgt war von einer Art chemokinetischem Zittern (Daten nicht gezeigt).

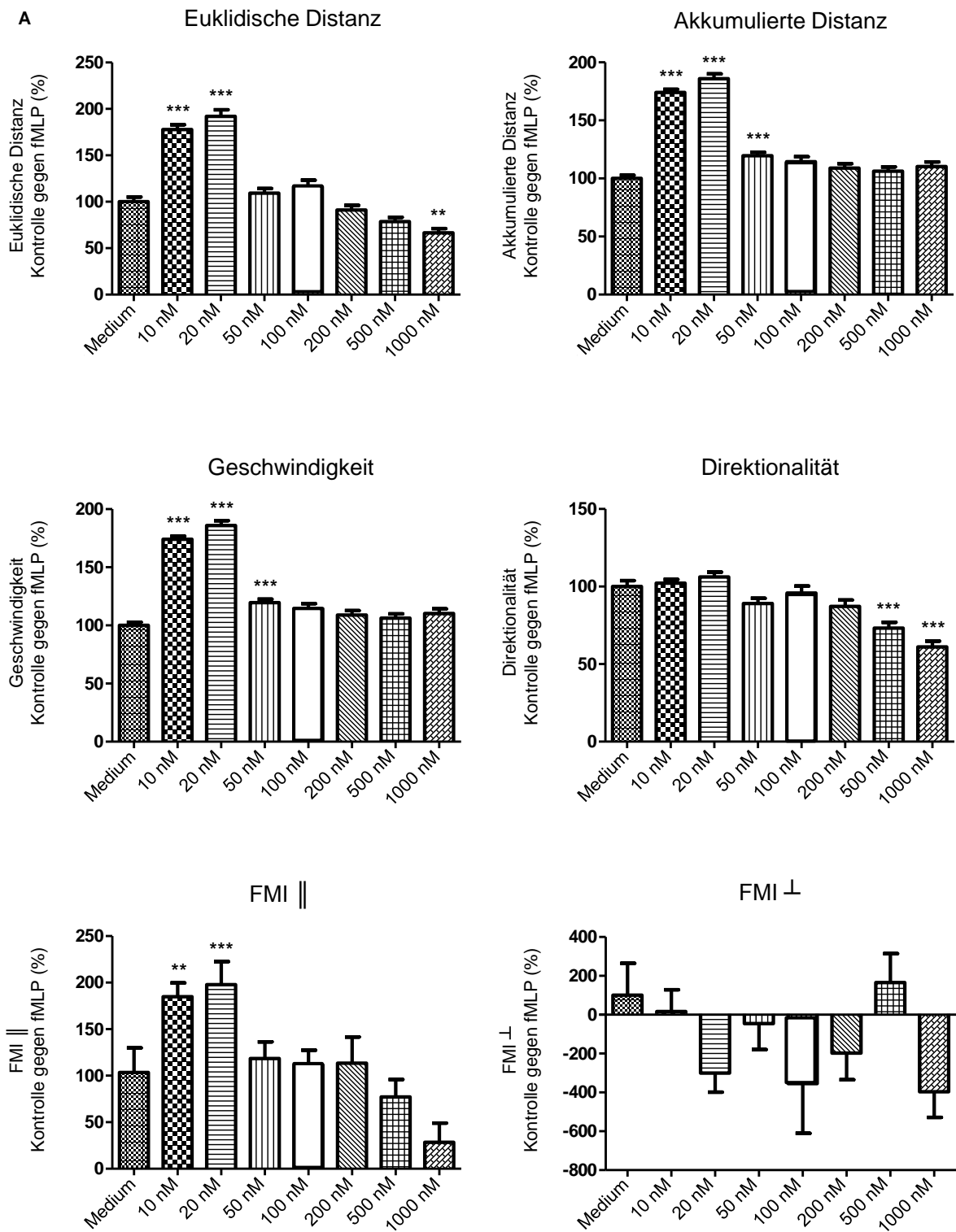


Abbildung 12: Migrationsversuche mit fMLP

A Vergleich der fMLP-Konzentrationen mit Medium. Signifikante Unterschiede zur Medium-Kontrolle wurden mit Sternchen markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Anzahl der Versuche n : 3. Mittelwerte der Mediumkontrolle: Euklidische Distanz: $64,9 \mu\text{m}$. Akkumulierte Distanz: $158,5 \mu\text{m}$. Direktionalität: 0,40. Geschwindigkeit: $7,9 \mu\text{m}/\text{min}$. $\text{FMI}_{||}$: 0,13. FMI_{\perp} : 0,03.

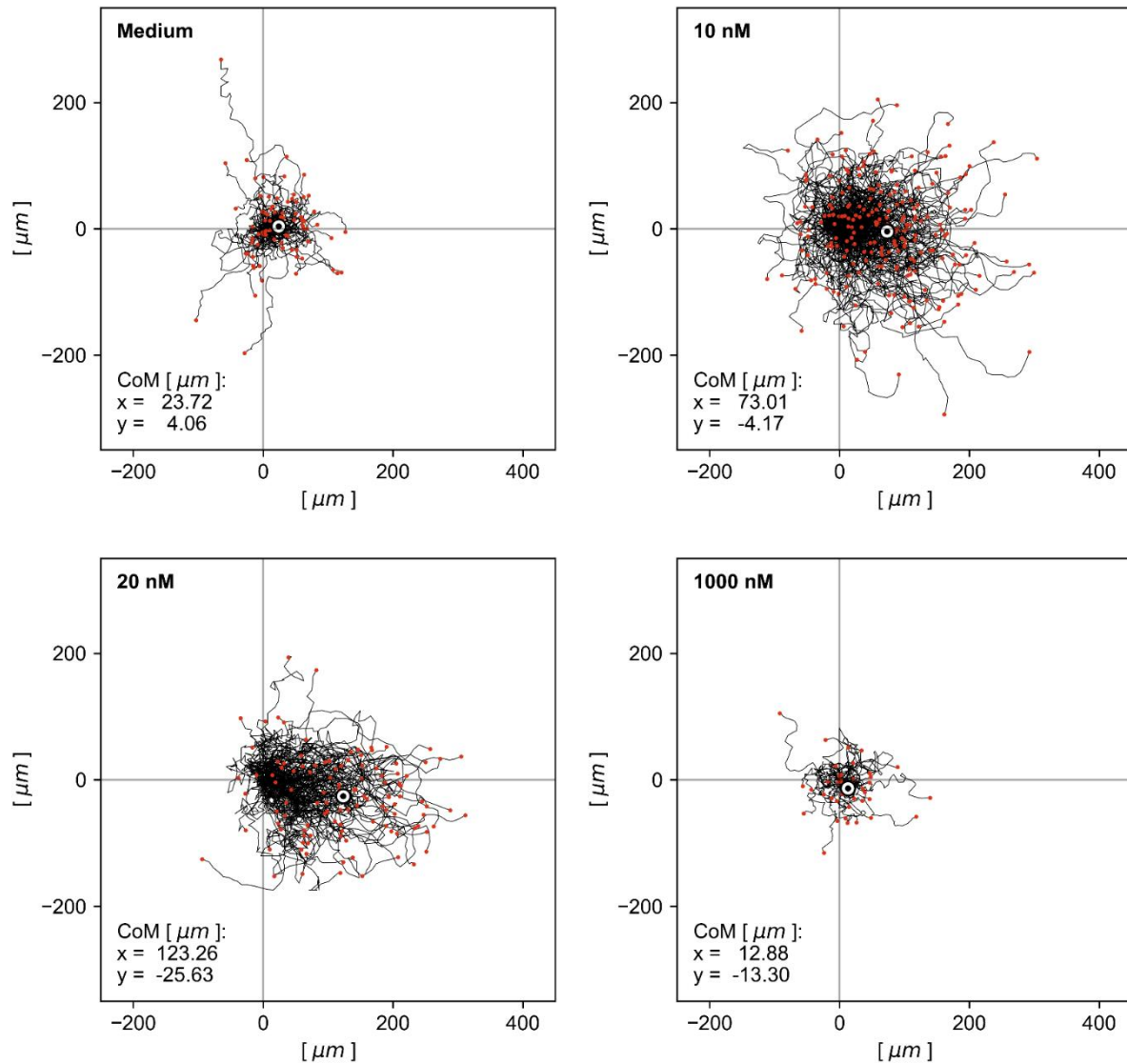


Abbildung 13: Optische Darstellung der Zellsuren mit fMLP-Konzentrationen

Bei fMLP-Konzentrationen zwischen 10 und 20 nM steigt die Anzahl der migrierenden Zellen an, das Zentrum der Masse (CoM) verlagert sich deutlich in Richtung des Lockstoffs. Bei sehr hohen Konzentrationen wirkt fMLP als Chemorepellent. Weniger Zellen migrieren in Richtung fMLP, das Zentrum der Masse bleibt in der Nähe des Startpunktes. Zellsuren (schwarz), Zentrum der Masse (Zielscheibe), Endpunkt einer Spur (rot).

Weiterhin wurde Leukotrien B₄ als Gewebelockstoff für neutrophile Granulozyten bei Entzündungen beschrieben (Afonso *et al.*, 2012). Bei Konzentrationen zwischen 1 pM und 1 μM und einer Inkubationszeit von 30 min zeigte sich nur bei der höchsten Konzentration eine Verlängerung der Distanz und eine Erhöhung der Geschwindigkeit. Ein chemotaktischer Effekt konnte nicht beobachtet werden (s. Abb. 14). Dies hängt möglicherweise mit der *TrackMate*-Auswertung zusammen, da LTB₄ zu einer massiven Einwanderung von differenzierten HL-60 führte und die Auflösung der einzelnen Zellen deutlich erschwert wurde (s. Abb. 15).

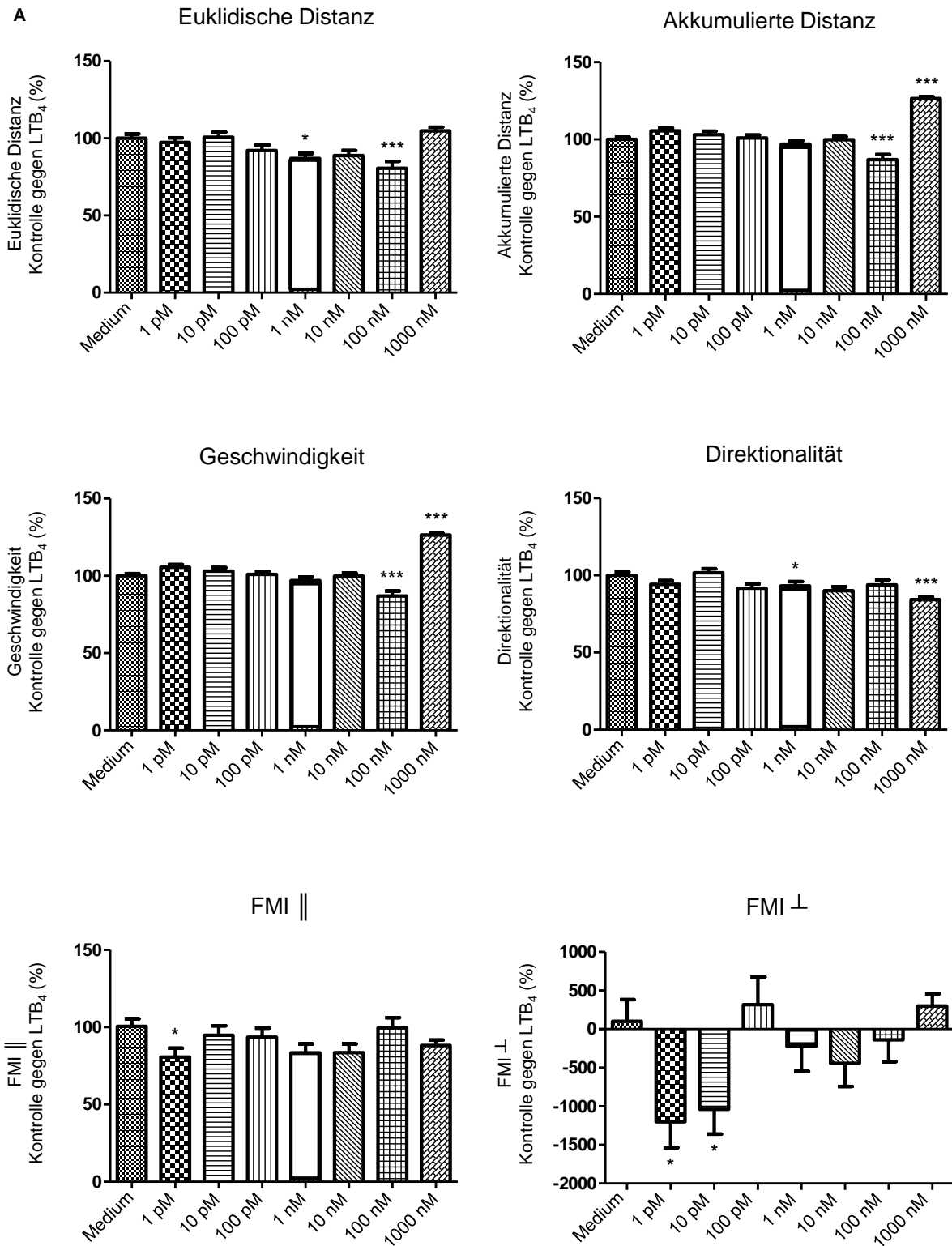


Abbildung 14: Migrationsversuche mit LTB₄

A Vergleich der LTB₄-Konzentrationen mit Medium. Signifikante Unterschiede zur Medium-Kontrolle wurden mit Sternchen markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Anzahl der Versuche n : 3. Mittelwerte der Mediumkontrolle: Euklidische Distanz: 140,3 μm . Akkumulierte Distanz: 265,2 μm . Direktionalität: 0,50. Geschwindigkeit: 13,3 $\mu\text{m}/\text{min}$. FMI ||: 0,36. FMI ⊥: -0,005.

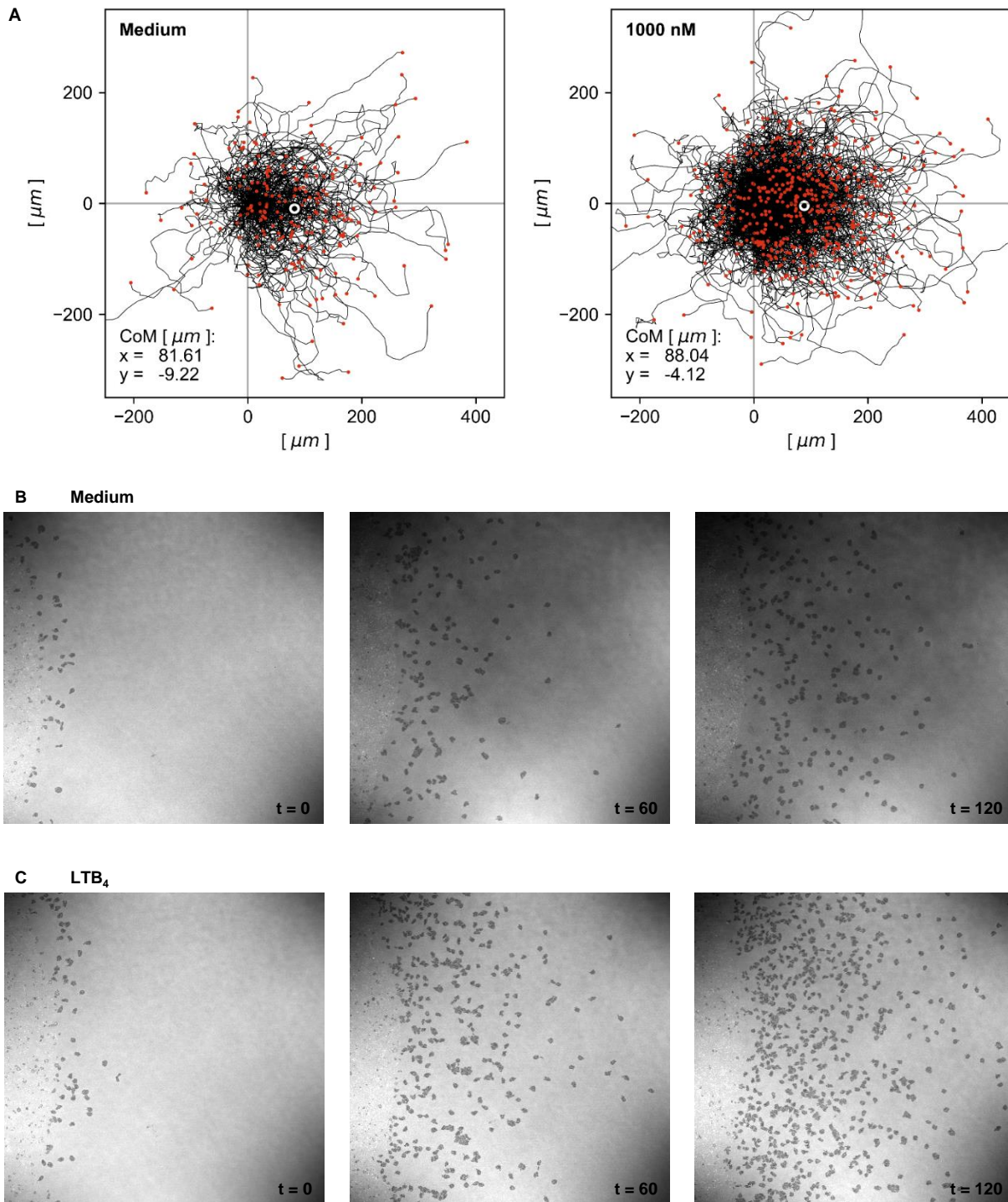


Abbildung 15: Zellspuren und mikroskopischer Vergleich zwischen Medium und 1000 nM LTB₄

A Zellspuren nach der *TrackMate*-Auswertung. Weniger Zellen scheinen von LTB₄ als von der Mediumkontrolle angezogen zu werden. **B+C** Ausgewählte Beispielbilder der Filme. Es wandern deutlich mehr Zellen auf LTB₄ zu als auf das Medium. *TrackMate* scheint mit der Masse an migrierenden Zellen überfordert.

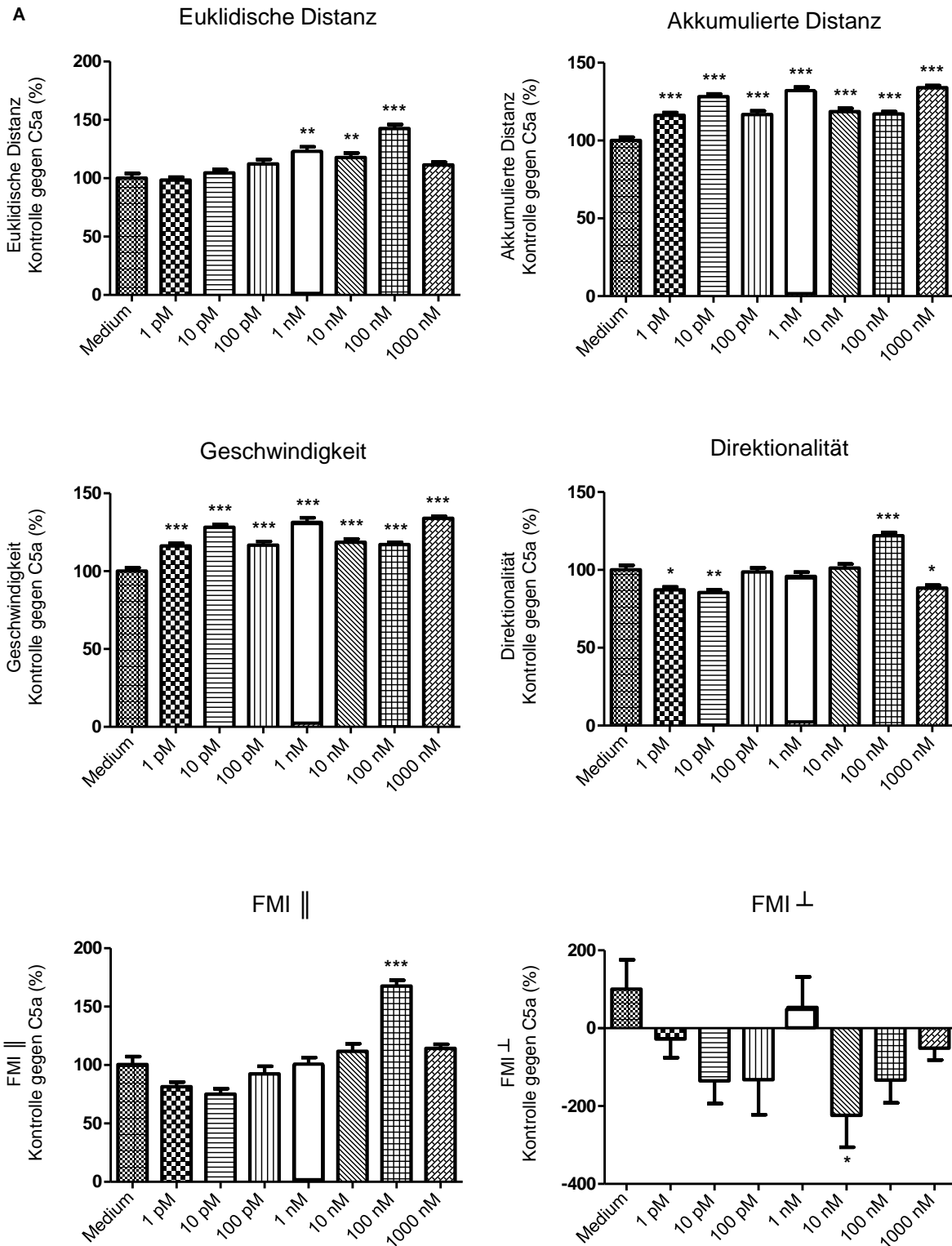


Abbildung 16: Migrationsversuche mit C5a

A Vergleich der C5a-Konzentrationen mit Medium. Signifikante Unterschiede zur Medium-Kontrolle wurden mit Sternchen markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Anzahl der Versuche n : 3. Mittelwerte der Mediumkontrolle: Euklidische Distanz: 148,2 μm . Akkumulierte Distanz: 303,1 μm . Direktionalität: 0,48. Geschwindigkeit: 15,16 $\mu\text{m}/\text{min}$. FMI ||: 0,29. FMI \perp : 0,04.

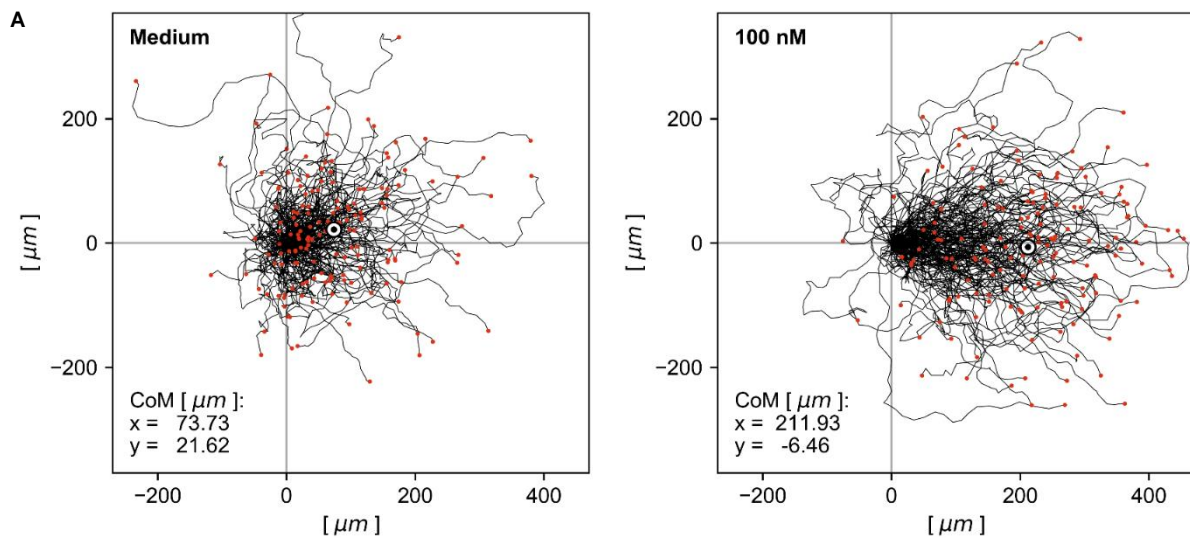


Abbildung 17: Vergleich der Zellspuren zwischen Medium und 100 nM C5a

A Deutlich mehr Zellen migrieren entlang des Chemoattraktansgradienten mit 100 nM C5a. Das Zentrum der Masse (Zielscheibe) verschiebt sich in Richtung der x-Achse.

Ein weiteres bekanntes Chemoattraktans zur Anlockung von Granulozyten ist C5a (Servant *et al.*, 1999). Es gehört als Teil des Komplementsystems zur angeborenen Immunantwort und dient der Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. In Versuchen mit Konzentrationen zwischen 1 pM und 1 µM bei einer Inkubationszeit von 30 min stellte es sich als starkes Chemoattraktans für dHL-60-Zellen dar, welches insbesondere bei 100 nM C5a-Konzentration, die Geradlinigkeit der Bewegung und die gerichtete Wanderung entlang des Lockstoffgradienten signifikant verbesserte (s. Abb. 16 und 17).

4.3.2.2 Migrationsverhalten von dHL-60-Zellen nach Infektion mit *H. pylori* P12 bei unterschiedlicher MOI

Um den Einfluss der Infektionsstärke auf die Migrationsunterschiede zwischen uninfizierten und infizierten Zellen genauer beurteilen zu können, wurden die maturierten Zellen mit P12 Wildtyp und einer *Multiplicity of Infection* von 5, 10 und 20 für eine Stunde infiziert bevor die Zellen und der Lockstoff in die Taschen der *Wells* pipettiert wurden und eine weitere halbe Stunde gemeinsam inkubierten. Als Lockstoff wurden 100 nM und 1000 nM C5a verwendet. Die Zellen wurden für 40 Bilder verfolgt.

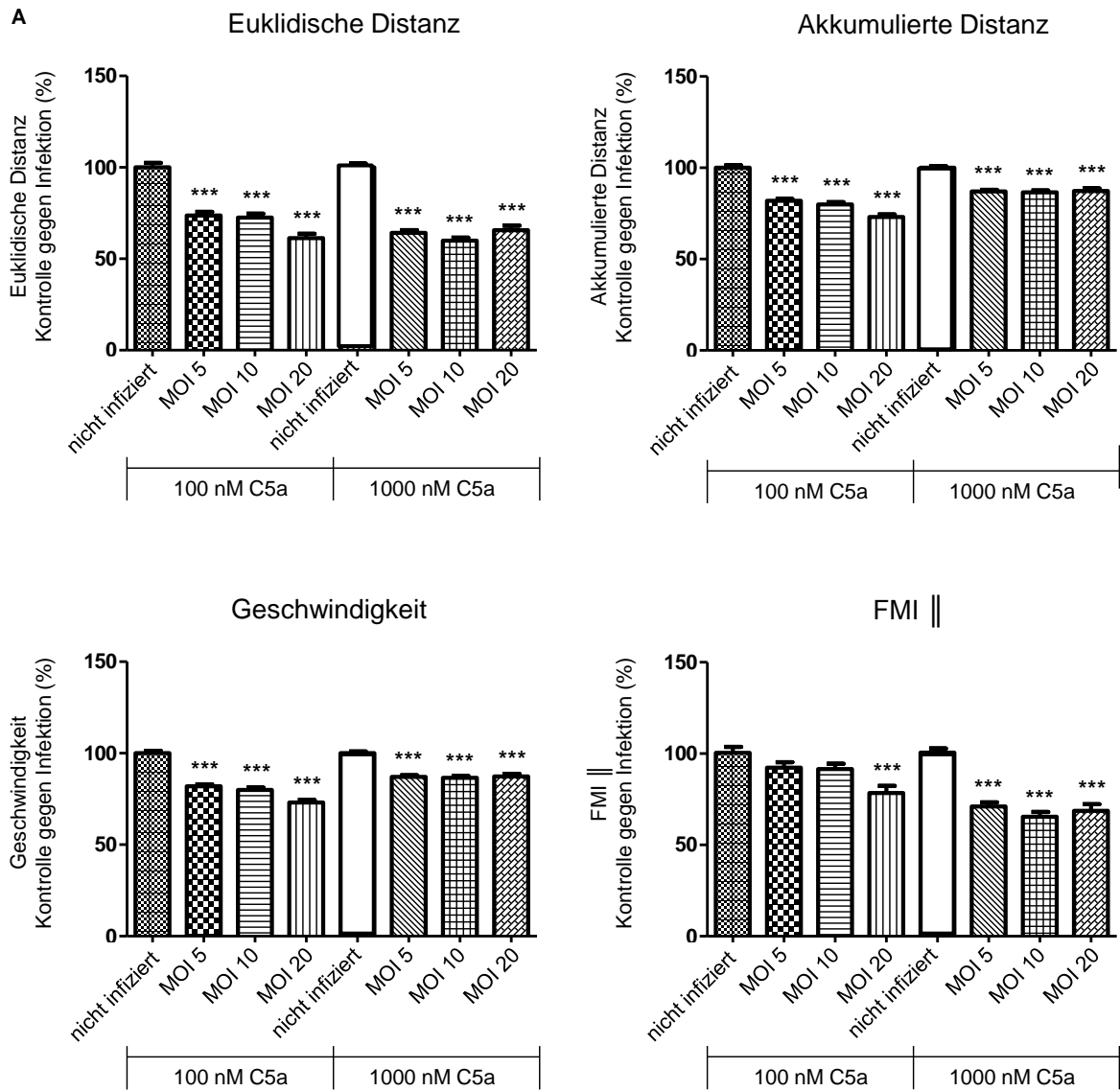


Abbildung 18: Migrationsversuche mit verschiedenen Infektionsstärken

A Vergleich der verschiedenen Infektionsstärken mit einer uninfizierten Kontrolle bei C5a-Konzentrationen von 100 nM und 1000 nM. Signifikante Unterschiede zur nicht infizierten Kontrolle wurden mit Sternchen markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Anzahl der Versuche $n: 3$. Mittelwerte der uninfizierten Kontrolle bei 100 nM: Euklidische Distanz: $168,9 \mu\text{m}$. Akkumulierte Distanz: $306,9 \mu\text{m}$. Direktionalität: $0,55$. Geschwindigkeit: $15,3 \mu\text{m}/\text{min}$. FMI ||: $0,44$. FMI \perp : $-0,05$. Mittelwerte der uninfizierten Kontrolle bei 1000 nM: Euklidische Distanz: $200,7 \mu\text{m}$. Akkumulierte Distanz: $328,6 \mu\text{m}$. Direktionalität: $0,60$. Geschwindigkeit: $16,4 \mu\text{m}/\text{min}$. FMI ||: $0,53$. FMI \perp : $0,01$.

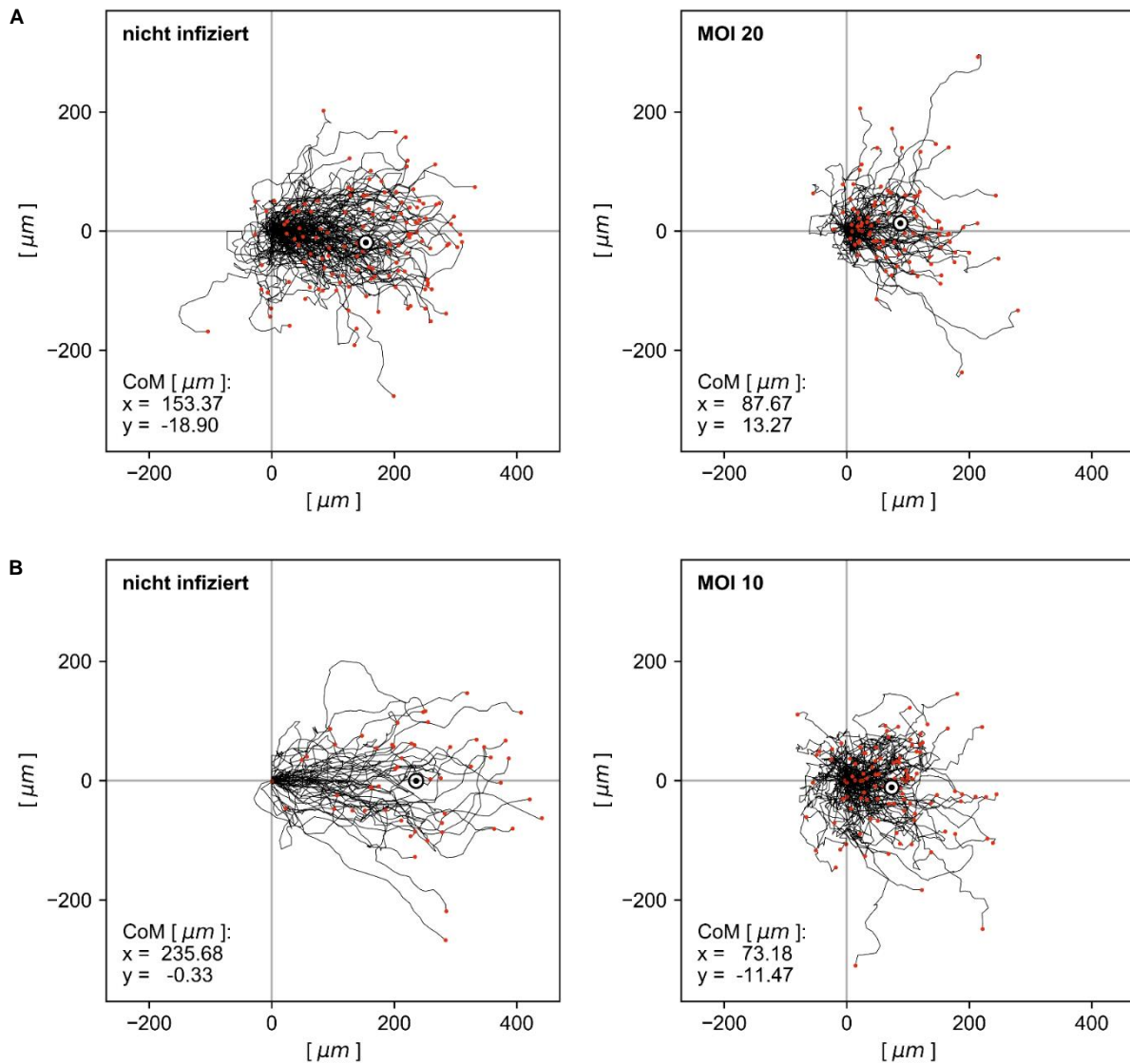


Abbildung 19: Zellspuren bei 100 nM und 1000 nM C5a und bei verschiedenen MOIs

A Darstellung der nicht infizierten Kontrolle und den Wildtyp-infizierten dHL-60-Zellen bei einer MOI von 20 und einer Konzentration von 100 nM C5a. Das Zentrum der Masse bewegt sich weniger weit in Richtung Lockstoff. **B** Darstellung der nicht infizierten Zellen und der P12-infizierten Zellen bei einer MOI von 10 und einer Konzentration von 1000 nM C5a. Die Gesamtheit der infizierten Zellen legt eine geringere Distanz zurück als die nicht infizierte Kontrolle.

4.3.3 Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten nach Infektion mit phosphorylierungsdefekten, MKI-deletierten und variierten *H. pylori*-Mutanten

Da die Migrationsexperimente mit 1000 nM C5a den größten Unterschied zwischen nicht infizierten und infizierten dHL-60-Zellen zeigte, wurden in den folgenden Experimenten mit dieser Konzentration und einer MOI von 20 gearbeitet.

Es zeigte sich eine signifikante Migrationshemmung der Wildtyp- und Mutanten-infizierten Zellen in Bezug auf zurückgelegte Distanz und Geschwindigkeit. Lediglich die Infektion mit

der Mutante P12 Δ cagPAI hatte keine Auswirkungen auf das Migrationsverhalten der Zellen (s. Abb. 20). Auch im Vergleich zum P12-Wildtyp und zur P12 Δ cagA-Mutante legten die P12 Δ cagPAI-infizierten Zellen signifikant mehr Strecke bei einer höheren Geschwindigkeit zurück. Während die P12 Δ MKI Δ C2-Mutante einen mit P12 Δ cagA vergleichbaren Effekt auf die Zellmigration hatte, beeinflussten die EPIFA-Mutanten die Zellgeschwindigkeit und Distanz auf ähnliche Weise wie der P12-Wildtyp. Der FMI parallel-Wert als Marker für Chemotaxis zeigte tendenziell eine reduzierte Wahrnehmung des Lockstoffs im Vergleich mit Wildtyp und Mutanten.

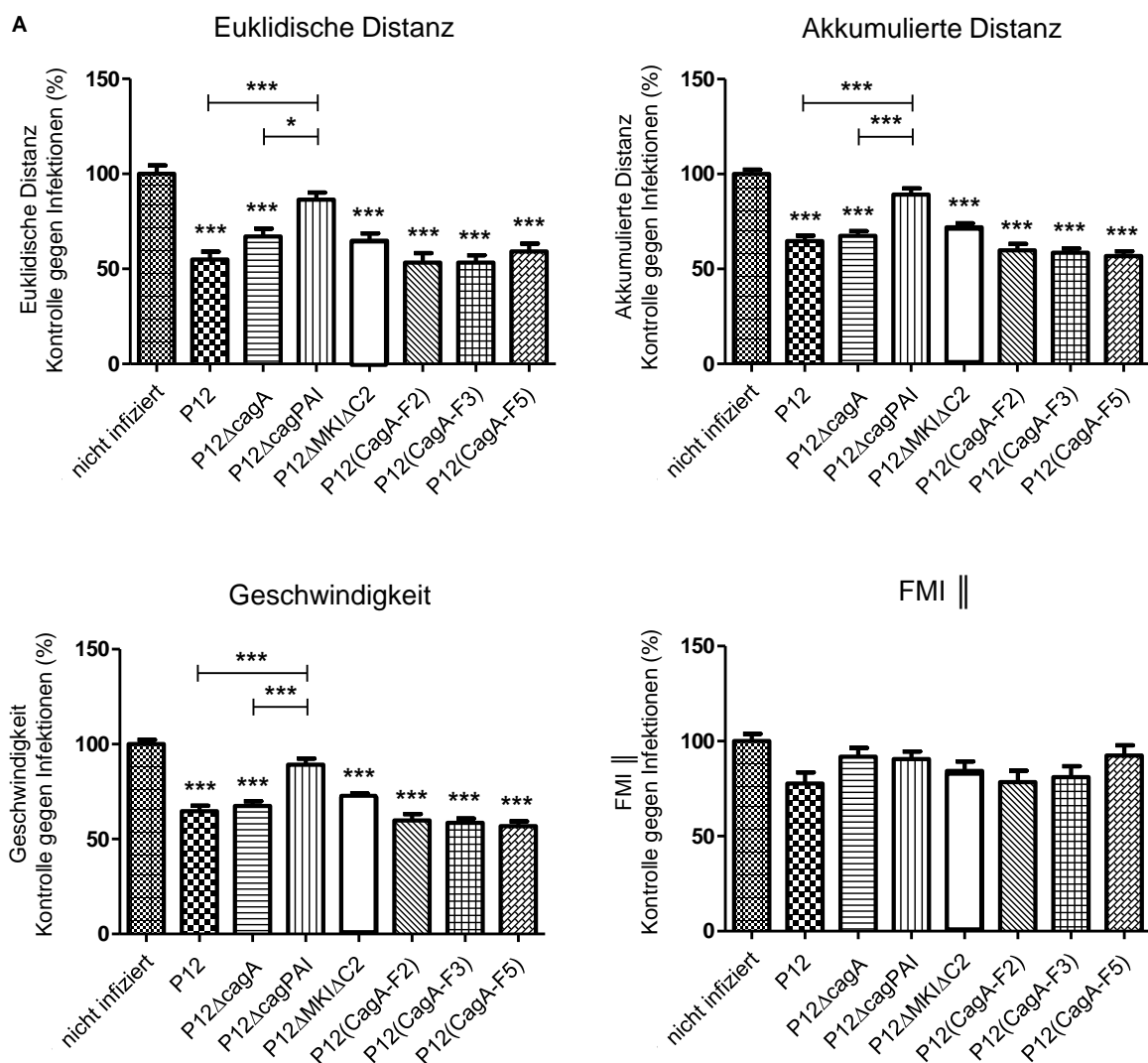
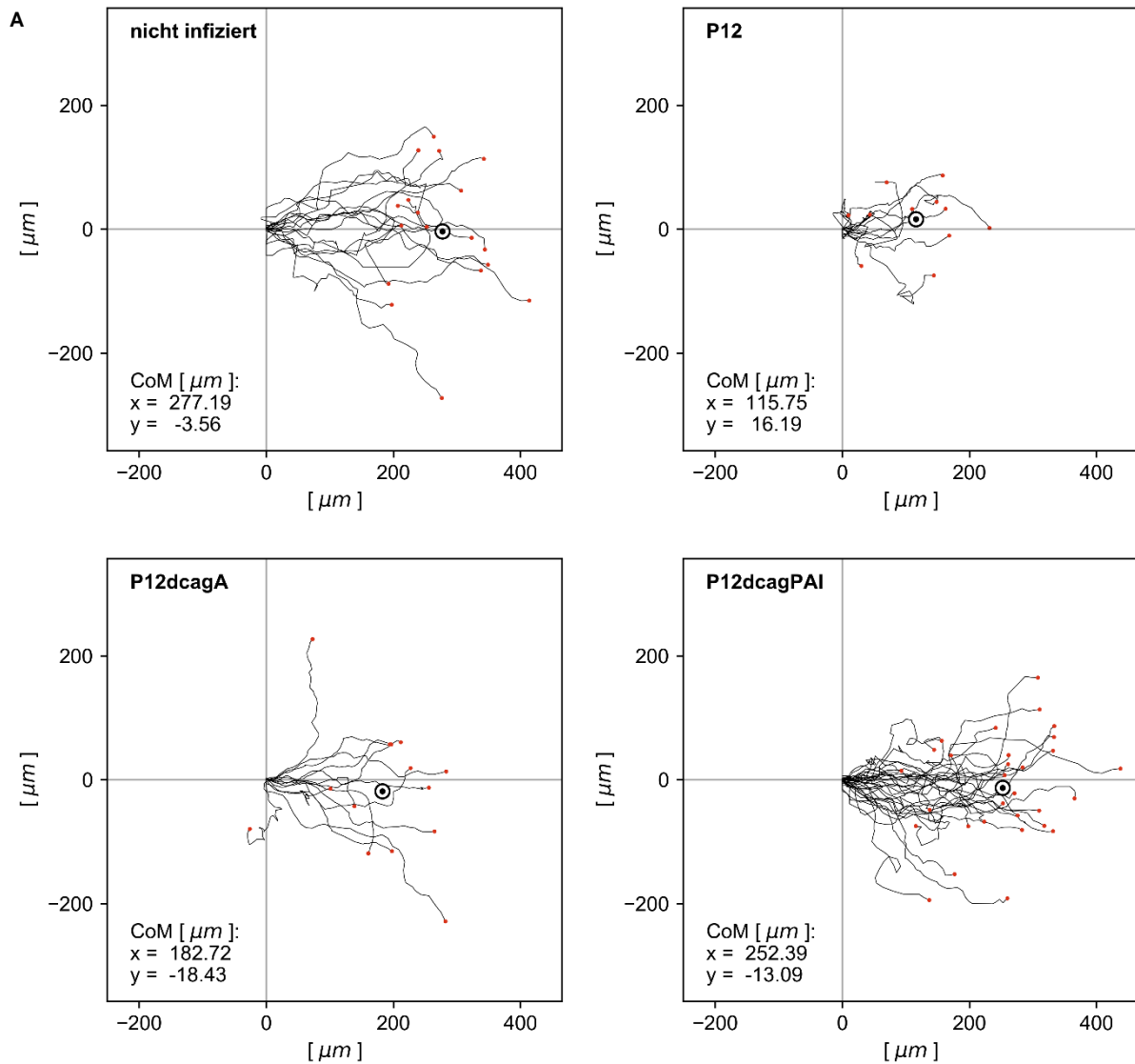


Abbildung 20: Infektionen und Migrationsexperimente mit 1000 nM C5a

Differenzierte HL-60 wurden mit *H. pylori* P12-Varianten und -Mutanten infiziert und die Migration der Zellen nach einer Stunde beurteilt. Signifikante Unterschiede zur nicht infizierten Kontrolle wurden mit Sternchen markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Anzahl der Versuche $n = 3$. Mittelwerte der uninfizierten Kontrolle: Euklidische Distanz: 280,3 μm . Akkumulierte Distanz: 369,4 μm . Geschwindigkeit: 16,4 $\mu\text{m}/\text{min}$. FMI ||: 073.

Bei einem optischen Vergleich der Spuren der nicht infizierten Zellen und der infizierten Zellen konnte man eine Bewegung der Zellen entlang der x-Achse parallel zum Lockstoff beobachten (s. Abb. 21). Insbesondere der P12-Wildtyp und die EPIFA-Mutanten reduzierten diese Bewegung. Die P12 Δ cagPAI- und P12 Δ cagA infizierten Zellen zeigen ein ähnliches Bewegungsmuster mit einer ähnlichen Translokation des Zentrums der Masse (CoM) entlang der x-Achse.



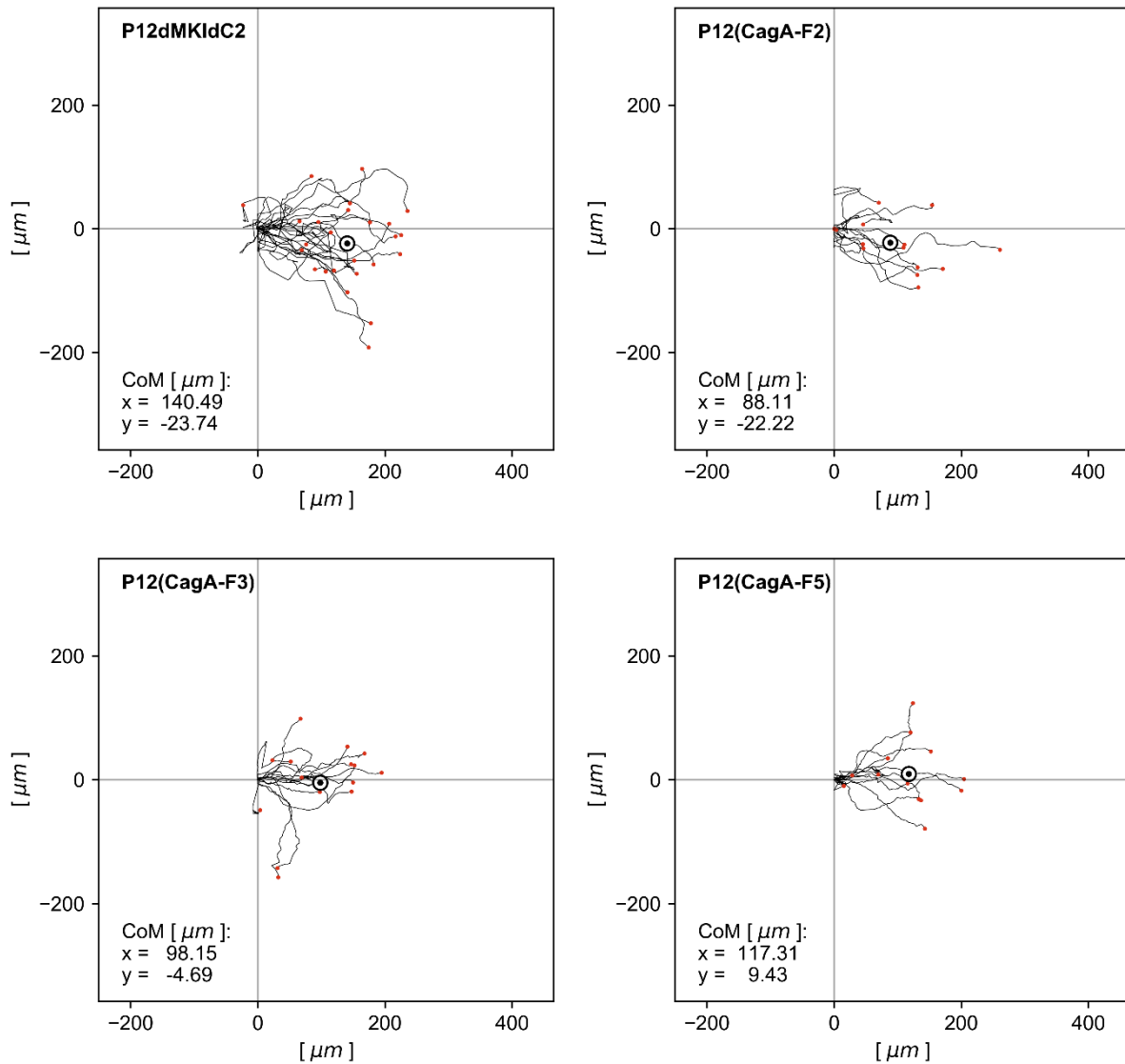


Abbildung 21: Optischer Vergleich zwischen nicht infizierten Zellen, P12 und Mutanten

A Aufgetragene Zellspuren der nicht infizierten und infizierten Zellen im Vergleich. Ein der Kontrolle ähnliches Migrationsmuster zeigten die P12 ΔcagPAI und P12 ΔcagA -infizierten Zellen. Insbesondere die Wildtyp-infizierten Zellen zeigten eine unstrukturierte Bewegung, die nicht parallel zum Lockstoffgradienten entlang der x-Achse verlief.

Aufgrund der guten Lockstoff-Eigenschaften wurden zusätzlich Migrationsversuche mit 10 nM fMLP und einer MOI von 10 durchgeführt. Dabei zeigte sich weiterhin, dass Wildtyp- und P12 $\Delta\text{MKI}\Delta\text{C2}$ -infizierte dHL-60-Zellen eine signifikant geringere euklidische Distanz zurücklegten als nicht infizierte Zellen. Auch die akkumulierte Distanz, Geschwindigkeit und FMI parallel zeigten eine ähnliche Tendenz, waren aber nicht signifikant verändert (s. Abb. 22). Im Vergleich zum Wildtyp hatten P12 ΔcagPAI und die P12(CagA-F5)-Variante eine signifikant größere Strecke und höhere Geschwindigkeit. Die Mutante P12(CagA-F3) beeinflusste die

Migration der dHL-60-Zellen weniger als die Mutante P12(CagA-F2) mit den phosphorylierungsresistenten EPIYA-A- und -B-Motiven.

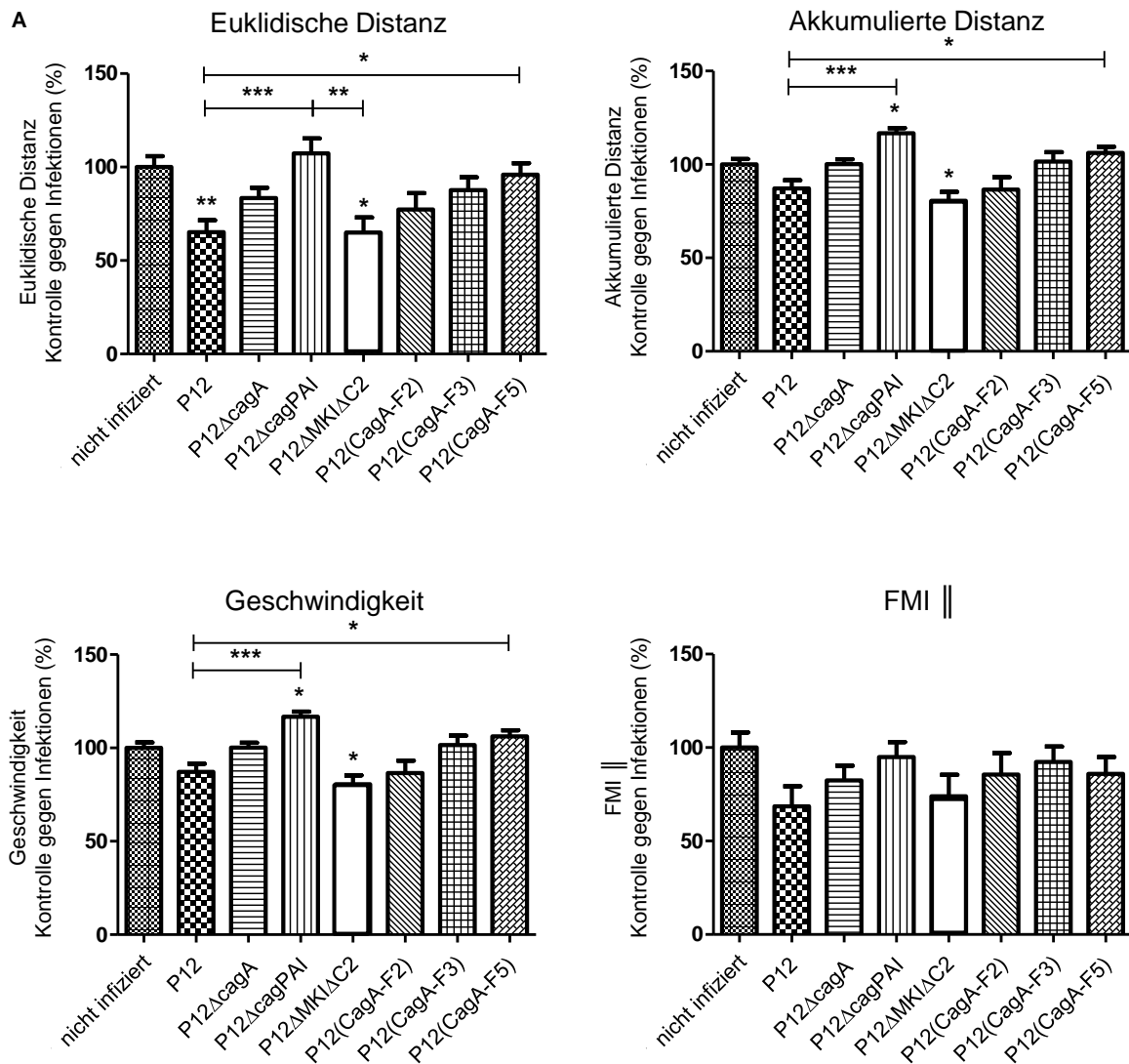


Abbildung 22: Migrationsversuche mit fMLP und P12-Mutanten

Differenzierte HL-60 wurden für eine Stunde mit *H. pylori* infiziert. Signifikante Unterschiede zur nicht infizierten Kontrolle wurden mit Sternchen markiert (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). Anzahl der Versuche n: 2. Mittelwerte der uninfizierten Kontrolle: Euklidische Distanz: 229,0 μm. Akkumulierte Distanz: 334,4 μm. Geschwindigkeit: 19,3 μm/min. FMI ||: 0,55.

Weitere Versuche wurden mit 10 nM fMLP bei einer MOI von 10 und den P12-MKI- sowie einer P12ΔNAP-Mutante durchgeführt (s. Abb. 23 und 24). Auch unter diesen Bedingungen inhibierten der P12-Wildtyp und die P12ΔMKIΔC2-Mutante die Migration der Zellen.

Interessanterweise bewegten sich die P12 Δ MKI- und die P12(K946A)-infizierten HL-60-Zellen mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie die P12 Δ cagA-Mutante und legten eine ähnliche Strecke zurück. Die Deletion des *neutrophil-activating-Protein A* von *H. pylori* hatte einen ähnlichen Effekt auf die Migration der Zellen.

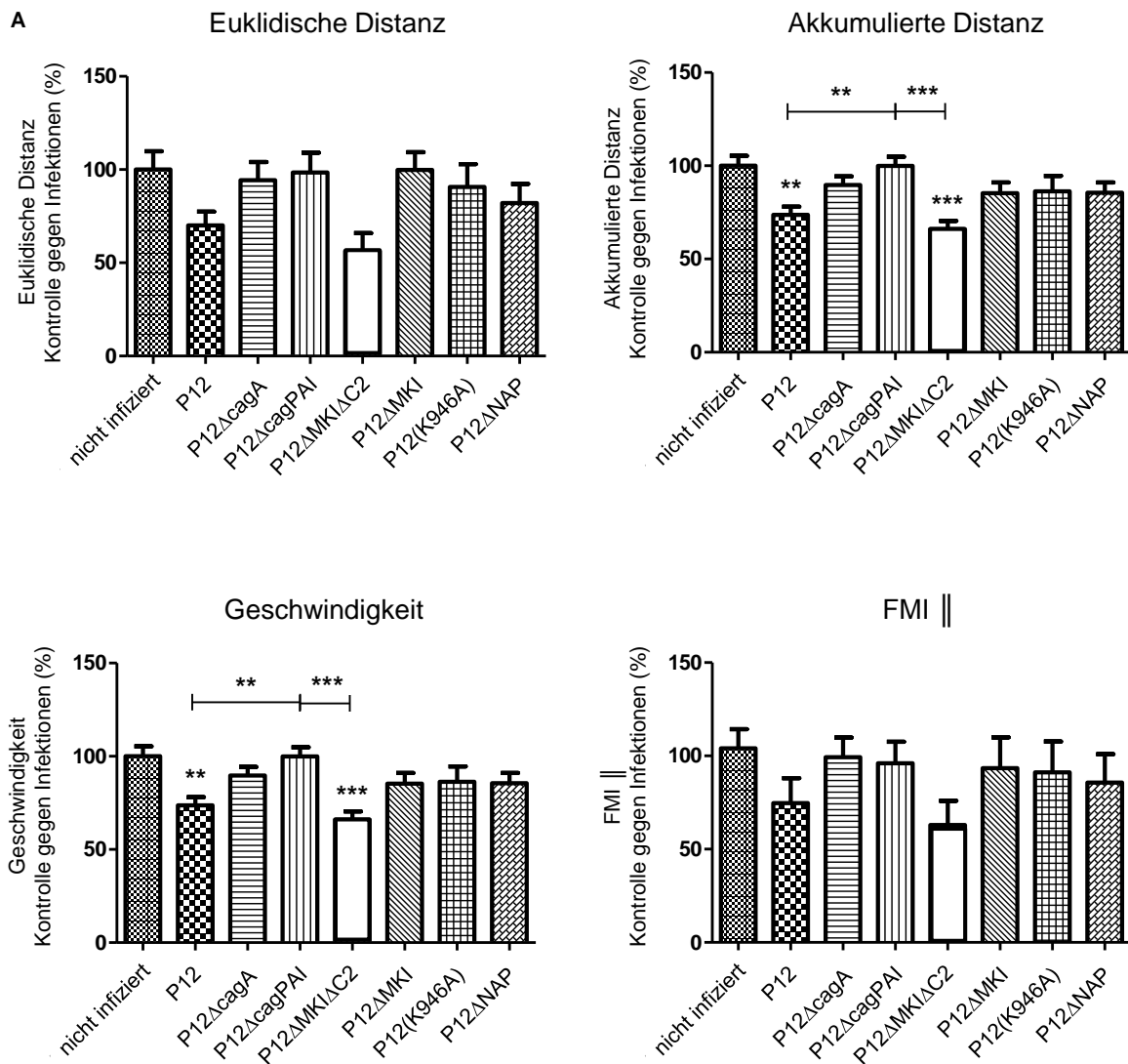
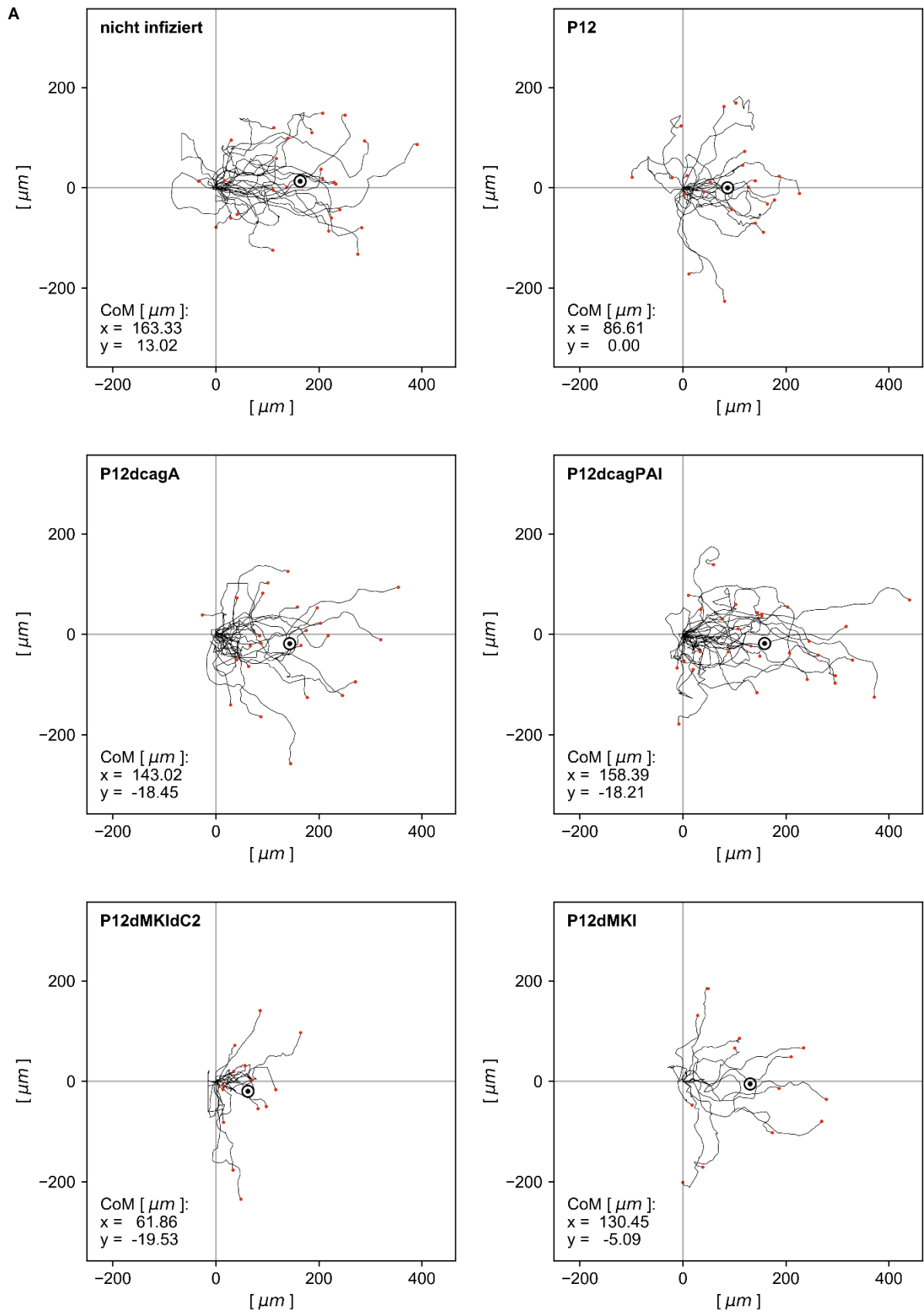


Abbildung 23: Migrationsversuche mit fMLP und P12-MKI-Mutanten

Differenzierte HL-60 wurden für eine Stunde mit *H. pylori* infiziert. Signifikante Unterschiede zur Medium-Kontrolle wurden mit Sternchen markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Anzahl der Versuche n : 1. Werte der uninfizierten Kontrolle: Euklidische Distanz: 191,3 μm . Akkumulierte Distanz: 307,4 μm . Geschwindigkeit: 15,4 $\mu\text{m}/\text{min}$. FMI ||: 0,52.



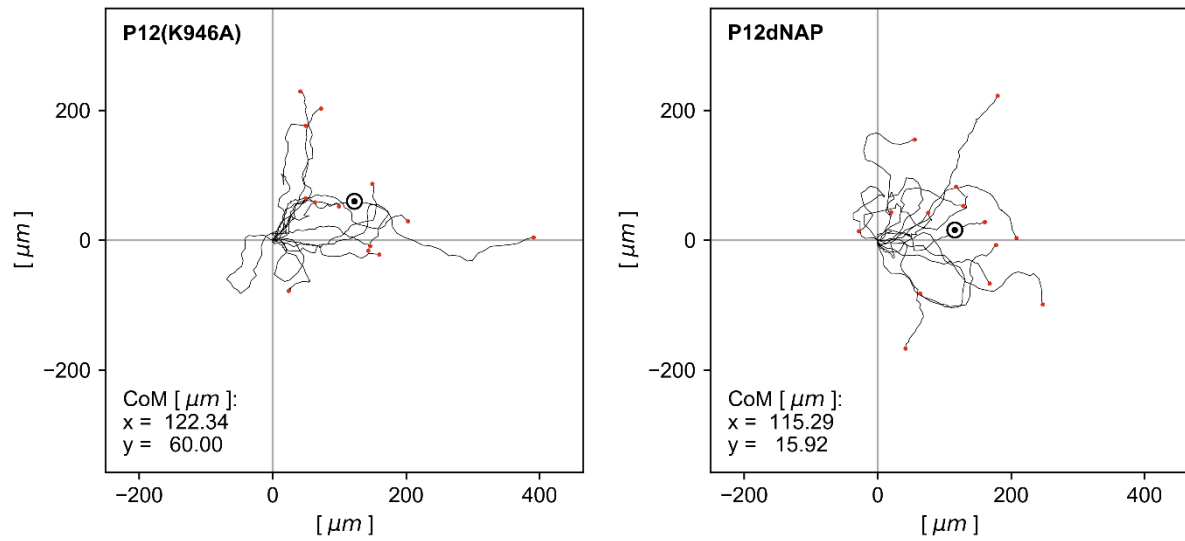


Abbildung 24: Optischer Vergleich zwischen uninfizierten und *H. pylori*-infizierten Zellen

5 Diskussion

Im menschlichen Magen interagiert *H. pylori* zunächst über Oberflächenproteine mit den Epithelzellen der Magenmukosa. Es folgt dann im Rahmen der Entzündungsreaktion die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Submukosa (Amulic *et al.*, 2012). Durch das Fehlen einer eradizierenden Immunantwort persistieren die Keime und die Entzündung chronifiziert. Es folgt ein zunehmender Zelluntergang und die Zerstörung der Epithelintegrität, durch die *H. pylori* in den Kontakt mit dendritischen Zellen und möglicherweise auch neutrophilen Granulozyten kommt (Dubois *et al.*, 2007, Necchi *et al.*, 2007, Necchi *et al.*, 2009). Bisher konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen nach diesem Kontakt geringere Mengen an MHC-II-Oberflächenmolekülen präsentieren (Kaebisch *et al.*, 2014) und in paragastrale Lymphknoten migrieren (Algood *et al.*, 2007). Auch auf die Migration weiterer Leukozyten könnte *H. pylori* Einfluss haben. In dieser Arbeit wurde die promyeloische Leukämiezelllinie HL-60 mithilfe von DMSO in neutrophilen-ähnliche Zellen differenziert und als Modellzelllinie für den Einfluss bakterieller Virulenzfaktoren auf die Migration von polymorphkernigen Leukozyten beziehungsweise Granulozyten verwendet.

5.1 Optimierung des *Under-Agarose-Assays* und der Auswertung

Der zweidimensionale *Under-Agarose-Assay* im runden Plastikschälchen ist ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung der Zellmigration auf Oberflächen wie beispielsweise Endothelien. Aufgrund der Geometrie ist die Anzahl der Versuchsbedingungen auf 4 bis 5 beschränkt, da die Zellreservoirs sonst sehr nahe beieinander sind und eine Interaktion dazwischen nicht mehr vollständig auszuschließen ist. Ein weiterer Nachteil sind die unterschiedlichen Winkel und Migrationsrichtungen der Zellen, die eine manuelle Anpassung nötig machen. Für den Übertrag des Assays in ein *8-Well*-Schälchen wurden die verwendeten Mengen entsprechend skaliert und die *Wells* ansonsten gleichbehandelt. Durch die Lage des Zell- und des Chemokinreservoirs in einer horizontalen Linie musste der Migrationswinkel nicht mehr angepasst werden und gleichzeitig konnten nun bis zu 7 Infektionen mit einer nicht infizierten Zellkontrolle verglichen werden.

Als nächstes wurde das manuelle Tracking durch die Etablierung einer semiautomatischen Auswertung mit *TrackMate* ersetzt. Es zeigten sich keine Unterschiede in den beiden Auswertungsverfahren, jedoch reduzierte sich die benötigte Zeit für die Auswertung eines Migrationsexperiments auf einen Bruchteil der ursprünglichen Zeit. Bei den ersten Versuchen mit

Chemokinkonzentrationen wurden alle Zellen in einem zentralen Fenster innerhalb von 150 Bildern ausgewertet und davon 40 im nächsten Schritt beurteilt. Es stellte sich heraus, dass die Zellen, die erst zu späteren Zeitpunkten in das Fenster wanderten eine schlechtere Chemotaxis zeigten. Dies hängt möglicherweise mit einem verringerten *sensing* des Chemokingradienten zusammen, der durch die voran wandernden Zellen verändert wird. Bei der statistischen Auswertung ergaben sich dadurch anstelle einer Gauß-Normalverteilung am ehesten eine zweihügelige Verteilung der Zellen. Eine weitere Erklärung dieses Phänomens könnten physikalische Effekte und Nährstoffmangel im Zellreservoir darstellen, die Zellen auch ohne die Chemokinwahrnehmung zur Auswanderung aus dem Reservoir bewegen. Als Schlussfolgerungen wurden in den folgenden Versuchen lediglich die ersten 60 Bilder durch *TrackMate* ausgewertet und dabei ein Ausschnitt in der Mitte des Bildes gewählt, der zum Zeitpunkt $t = 0$ nur die vorderste Front an migrierenden Zellen einschloss. So ließen sich eine Normalverteilung der Zellen erreichen und die Werte für die Geschwindigkeit, Distanz und Chemotaxis verbessern.

Ein Nachteil der neu etablierten Auswertung stellte die Begrenzung des Algorithmus dar, große Partikelmengen, die mit einem hohen Kontakt dieser untereinander einherging, aufzulösen und einzelne Partikel aufgrund gesetzter Kriterien zu verlieren. Diese ein- und ausschließenden Kriterien wurden auf der anderen Seite gewählt, um die Auflösung des Algorithmus zu verbessern. Dieses Problem ließ sich mit der Vergrößerung der Lücken zwischen Bildern verringern. So entstanden aber unvollständige Partikelspuren, die das *Chemotaxis and Migration Tool* der Firma ibidi nicht verarbeiten konnte.

Um dieses Problem zu umgehen und die folgenden Arbeitsschritte am Computer zu reduzieren, wurde das angehängte Python-Skript erstellt. Über die Angabe des Verzeichnisses, der Ordnerbezeichnung, der *.csv*-Dateinamen und der gewünschten Bilddauer wurden zunächst die (bis zu 3) Lücken gefüllt und danach die gewünschten Werte analog zum *Chemotaxis and Migration Tool* errechnet und in einer gemeinsamen *.xls*-Datei ausgegeben. Zusätzlich wurden die Zellspuren in ein Koordinatensystem eingezeichnet und das Zentrum der Masse eingetragen. Die Größe des Koordinatensystems konnte symmetrisch auf die Länge der Spuren angepasst werden, sodass es zu keiner Verzerrung kam. Über ein Excel-Makro wurden die errechneten Werte auf die nicht infizierte beziehungsweise reine Medium-Kontrolle normalisiert und zur statistischen Auswertung in GraphPad Prism eingelesen.

In der Summe wurde der *2-D-Under-Agarose-Assay* in ein *8-Well*-Format mit reproduzierbaren Ergebnissen übertragen und die Auswertung mit *TrackMate* etabliert. Zudem wurden die

darauffolgenden arbeitsintensiven Schritte stark vereinfacht und nach dem Eintragen weniger Informationen automatisiert.

5.2 Untersuchung der Prozessierung und Phosphorylierung von CagA

Nachdem *H. pylori* an Immunzellen gebunden hat, wird CagA über das T4SS transloziert, im Anschluss phosphoryliert und in ein 100 kDa- sowie ein C-terminales 35 kDa-großes Fragment gespalten (Odenbreit *et al.*, 2001). Der Zweck der Prozessierung konnte bisher nicht erklärt werden, jedoch wurde die Prozessierungsstelle inzwischen auf eine konservierte Aminosäuresequenz aus 5 – 6 Asparaginresten eingegrenzt. Diese bilden möglicherweise eine Loop-artige Struktur aus, an der das Protein erkannt und gespalten werden kann (Angelini *et al.*, 2009).

Bisher wurde gezeigt, dass der Austausch dieser Sequenz gegen einen Serinrest die Translokation und Phosphorylierung des CagA-Proteins weder in AGS noch in dHL-60-Zellen beeinflusst. Auch eine Mutante mit einem Austausch von 6 Asparaginresten- gegen 6 Alaninreste zeigte keine Defekte dieser Art (Busch *et al.*, 2015). Da die Prozessierung beider Mutanten in Phagozytenzelllinien fehlte, sollte nun die benötigte Anzahl an Asparaginresten für das spaltende Enzym eingegrenzt werden. Hierzu wurden *H. pylori*-Mutanten hergestellt, die 2 beziehungsweise 3 Asparaginreste der konservierten Sequenz gegen Alanin ausgetauscht hatten. Interessanterweise wurden die Mutanten in AGS- und dHL-60-Zellen transloziert und phosphoryliert, aber keine der beiden mehr prozessiert. Diese könnte hinweisend sein, dass nur eine intakte Sequenz aus 5 bis 6 Asparaginresten erkannt und gespalten werden kann.

Weiterhin wurde bereits untersucht, ob die Prozessierung abhängig von der Tyrosinphosphorylierung der EPIYA-Motive ist. Dazu wurde die Mutante P12(CagA-F5) kloniert, die an den EPIYA-A-, -B- und -C-Motiven einen Aminosäureaustausch von Tyrosin auf Phenylalanin hat und dementsprechend nicht mehr phosphoryliert werden kann. Auch bei dieser phosphorylierungsdefekten CagA-Varianten fand eine Spaltung des Proteins statt, wodurch die Unabhängigkeit von Phosphorylierung und Prozessierung voneinander gezeigt werden konnte (Busch *et al.*, 2015). Dementsprechend verhielten sich die Varianten P12(CagA-F2) und P12(CagA-F3) mit teilweise phosphorylierungsresistenten EPIYA-Motiven, wobei die im Immunoblot dargestellte Tyrosinphosphorylierung an EPIYA-A und -B ein kaum sichtbares Signal zeigte, da die Phosphorylierung bevorzugt an den EPIYA-C-Motiven stattfindet (Higashi *et al.*, 2002a). Um einen Einfluss der MKI-Motive auf die Translokation von CagA

auszuschließen sowie das Verhalten innerhalb der Zelle zu beurteilen, wurde auch mit den entsprechenden CagA-Varianten die Phosphorylierung und die Prozessierung nach Translokation untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl der vollständige Verlust der MKI-Motive als auch der spezifische Basenaustausch von Lysin gegen Alanin an den Positionen 946, 980 und 1.014 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und Prozessierung von CagA hat. Der Verlust des zweiten EPIYA-C-Motivs sowie aller MKI-Motive führte nicht wie zunächst angenommen zu einem Phosphorylierungsdefekt, sondern nur zu einer schwächeren Tyrosinphosphorylierung wie im Western Blot der Immunpräzipitation gezeigt werden konnte.

5.3 Einfluss verschiedener Chemoattraktanzien auf die Migration von Leukozyten

Nachdem in *Under-Agarose*-Migrationsversuchen mit infizierten dHL-60-Zellen lediglich Geschwindigkeitsunterschiede dargestellt werden konnten, sollte der Assay mit verschiedenen Lockstoffen und Chemokingradienten optimiert werden. Dafür bot sich der Übertrag in ein *8-Well*-Format an. Die Menge an Flüssigkeit und die Dicke der Agaroseschicht wurden dafür verhältnismäßig angepasst.

Zunächst wurde die optimale Konzentration für N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin ermittelt, bei der dHL-60-Zellen den besten chemotaktischen Effekt zeigten. Formylierte Peptide spielen *in vivo* eine Rolle als primäre Botenstoffe bei der Nekrose von Zellen und dienen der Anlockung von Neutrophilen zum Ort der Entzündung (McDonald *et al.*, 2010). Speziell fMLP fällt auch in sehr geringer Menge als Nebenprodukt im bakteriellen Stoffwechsel wie dem von *H. pylori* an und vermittelt eine starke Chemotaxis von Monozyten und Granulozyten (Anton *et al.*, 1998). In 2-D-Migrationsversuchen stellte sich ein Maximum der positiven Chemotaxis mit einer erhöhten zurückgelegten Distanz und Geschwindigkeit sowie einem gesteigertem FMI parallel bei Chemokinkonzentrationen zwischen 10 und 20 nM fMLP dar. Interessanterweise kam es bei sehr hohen fMLP-Konzentrationen zur einem gegenteiligen Effekt, da sich die Zellen eher vermindert und nicht mehr gezielt entlang des Gradienten bewegten. Eine mögliche Ursache dafür könnte die gestörte Verarbeitung der Signale durch die Masse an anfallendem und stimulierendem fMLP sein.

Da fMLP bereits als Chemoattraktans im Labor etabliert war, wurden zudem die Effekte von Leukotrien B₄ und C5a auf dHL-60-Zellen im *Under-Agarose-Assay* untersucht. LTB₄ gilt als

sekundärer Lockstoff, der von Makrophagen und Neutrophilen als Reaktion auf formylierte Peptide ausgeschüttet wird (Ribeiro *et al.*, 1997, Monteiro *et al.*, 2011), um die Extravasation von Neutrophilen aus den Blutgefäßen zu steigern (Soehnlein *et al.*, 2009) und um den Weg zum Ort der Entzündung zu markieren (Afonso *et al.*, 2012). In zweidimensionalen Migrationsversuchen reagierten dHL-60-Zellen prompt auf LTB₄ und zeigten ein schwärmendes Verhalten entlang des Chemokingradienten insbesondere bei hohen Konzentrationen. Dennoch konnte kein positiver Effekt auf die Chemotaxis der neutrophilen-artigen Zellen nachgewiesen werden. Teilweise bewegten sich die Zellen sogar langsamer und weniger gerichtet als die Medium-Kontrolle. Dies könnte am mangelnden Auflösungsvermögen von *TrackMate* liegen, da die Software zunächst alle im Bild vorhandenen Partikel sucht und die Punkte im Film, die am wahrscheinlichsten die gleiche Zelle darstellen, miteinander verbindet. Bei sehr hohen Zellzahlen wird der Algorithmus immer ungenauer, da 2 nahe aneinander liegende Zellen eher als ein Partikel gewertet werden und dadurch die getrackte Spur abbricht oder falsch verknüpft wird.

Der Komplementfaktor C5a dient als Teil des angeborenen Immunsystems der Abwehr von Mikroorganismen und hat durch seine chemotaktischen Eigenschaften das Ziel Neutrophile und andere Phagozyten zum Infektionsherd zu leiten. Es gilt als etabliertes Chemoattraktans zur Untersuchung der Migration von Leukozyten (Gerard *et al.*, 1991). Unter zweidimensionalen Bedingungen im *Under-Agarose-Assay* wurden die Geschwindigkeit und akkumulierte Distanz der dHL-60-Zellen bei allen C5a-Konzentrationen erhöht. Bei einem steilen Gradienten mit 100 nM wurden jedoch auch die Zellbewegung geradliniger und auch der chemotaktisch relevante FMI parallel besser. Für weitere Migrationsexperimente war deshalb eine Konzentration von 100 nM C5a mit einer Verlängerung der euklidischen Wegstrecke von 148,2 µm auf 211,5 µm optimal. Um die größten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen herauszuarbeiten, wurde weiterhin getestet, ob sich eine Lockstoffkonzentration am Wahrnehmungsoptimum oder in schlechteren Bereichen besser zur Darstellung eignete. Die folgenden Migrationsexperimente wurden deshalb nicht nur mit 100 nM, sondern zusätzlich mit einer Konzentration von 1000 nM C5a durchgeführt.

5.4 Abhängigkeit der Migrationshemmung von der Infektionsstärke

Die Migration von Leukozyten stellt einen komplexen Vorgang aus Chemokinwahrnehmung („*sensing*“), Adhäsion, zellmorphologischen Veränderungen wie der Polarisierung und dem Rearrangement von Rezeptoren sowie einer gerichteten, chemotaktischen Bewegung dar

(Mocsai *et al.*, 2015). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass dieses Zusammenspiel von einigen Typ-III- und Typ-IV-Sekretionssystem-tragenden Bakterien wie *Salmonella enterica* und *Legionella pneumophila* gestört wird und es zu einer Inhibition der Leukozytenmigration kommt (McLaughlin *et al.*, 2009, Simon *et al.*, 2014). Zudem ist bekannt, dass *H. pylori* über die Translokation von CagA in Immunzellen ähnliche Effekte erzielt; die vollständige Migrationshemmung jedoch über das gemeinsame Vorhandensein von CagPAI und CagA vermittelt wird und unabhängig von VacA ist (Busch *et al.*, 2015).

Um Migrationseffekte zu beobachten, sollte deshalb eine ausreichende Translokation von CagA in dHL-60-Zellen sichergestellt werden. Bei einer *Multiplicity of Infection* von 50 werden innerhalb einer Stunde mehr als 90 % der Zellen infiziert, bei einer MOI von 25 etwa 60 % (Schindele *et al.*, 2016). In phasenkontrastmikroskopischen Bildern wurde gezeigt, dass nach einer Stunde Inkubationszeit bei einer MOI von 10 an mehr als 95 % der dHL-60-Zellen *H. pylori* adhäriert war (Busch *et al.*, 2015), weshalb die Zellen auch in weiterführenden Versuchen eine Stunde mit den Bakterien vorinkubiert wurden. In unseren Experimenten zeigten alle Zellen bei Infektion mit *H. pylori*, unabhängig von der Infektionsstärke, eine signifikant langsamere und kürzere Migration entlang des Chemokingradienten von 100 oder 1000 nM C5a. Interessanterweise veränderte sich die chemotaktische Bewegung der infizierten Zellen, die einem Trigger von 100 nM C5a ausgesetzt waren, erst bei einer Infektionsstärke von 20. Dies hängt möglicherweise mit einem besseren *sensing* des Gradienten zusammen, das erst bei einer höheren Infektionslast beziehungsweise stärkeren Translokation von CagA gestört wird. Im Vergleich dazu zeigten dHL-60-Zellen auf die vermeintlich schlechtere Konzentration von 1000 nM C5a schon bei einer MOI von 5 ein verminderte Direktionalität und schlechtere Chemotaxiswerte, aber nur eine geringere Reduktion von Geschwindigkeit und zurückgelegter Strecke. Da insbesondere der Chemotaxis-inhibierende Effekt von *H. pylori* von Interesse war, wurden die Migrationsexperimente mit den klonierten Mutanten bei einer Konzentration von 1000 nM C5a durchgeführt.

5.5 Einfluss der C-terminalen Motive von *H. pylori* auf das Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten

Während bisher nur der N-terminale Teil von CagA kristallisiert werden konnte, gilt das C-terminale Fragment weiterhin als intrinsisch ungeordnet (Kaplan-Turkoz *et al.*, 2012, Hayashi *et al.*, 2012). Bekannt sind jedoch einige Regionen und Funktionen des kürzeren Fragments,

die Einfluss auf verschiedene Signalwege innerhalb der eukaryotischen Zellen haben. Die Folgen der Translokation von CagA werden in phosphorylierungsabhängige (EPIYA-)Effekte und phosphorylierungsunabhängige (MKI-)Effekte unterteilt, je nachdem, welches C-terminale Motiv von CagA mit welchen Zellproteinen interagiert.

Die EPIYA-Motive sind repetitive Segmente innerhalb des Carboxy-terminalen Teils, die an ihren Tyrosinresten durch Kinasen der Src-Familie und c-Abl phosphoryliert werden (Stein *et al.*, 2002, Tammer *et al.*, 2007) und dadurch mit den Zellproteinen Csk-, SHP2- und PI3K interagieren können (Hatakeyama, 2017). Während den EPIYA-A- und -B-Motiven hauptsächlich eine Rolle in der Membranassoziation von CagA zugeschrieben wird (Higashi *et al.*, 2005), sind die EPIYA-C- beziehungsweise -D-Motive mit der Deregulation der Ras-ERK-Kaskade und der Inhibition der fokalen Adhäsionskinase (FAK) vergesellschaftet (Tsutsumi *et al.*, 2006, Higashi *et al.*, 2004). Die sog. FAK vermittelt nicht nur die zelluläre Adhäsion, sondern auch die Bewegung von Zellen wie beispielsweise die Invasivität von Brustkrebszellen (Chan *et al.*, 2009). Daneben sind die EPIYA-C umgebenden MKI- beziehungsweise Multimerisations-Motive ursächlich für die Interaktion zwischen CagA und der Serin-Threonin-Kinase *Partitioning defective-1* (Par1) (Saadat *et al.*, 2007, Zeaiter *et al.*, 2008). Dieses Enzym befindet sich im basolateralen Membranbereich von polarisierten Epithelzellen und erhält von dort aus die apikal-basale Polarisierung (Suzuki *et al.*, 2006) aufrecht. Weitere Funktionen sind die Beeinflussung der Mikrotubulistabilität sowie Aktinfilamentveränderungen, weshalb Par1 auch Mikrotubuli-Affinitäts-regulierenden Kinase (MARK) genannt wird und Einfluss auf die Migration von Leukozyten ausüben kann. Die vorherrschende Isoform des Enzyms in Epithelzellen ist dabei Par1b/MARK2. Um die Kinase-Eigenschaft von Par1 zu inhibieren, imitieren die MKI-Motive von CagA zelleigene Substrate und blockieren damit das aktive Zentrum des Enzyms (Saadat *et al.*, 2007, Nesic *et al.*, 2010).

Bisher konnte in zweidimensionalen Migrationsexperimenten neben den Effekten von T4SS und CagA ein Einfluss der EPIYA-Phosphorylierung auf die Migrationsinhibition durch *H. pylori* gezeigt werden (Busch *et al.*, 2015). In weiterführenden Versuchen sollte nun der Einfluss der verschiedenen EPIYA-Motive sowie der MKI-Motive auf diese Hemmung untersucht werden. In den Versuchen mit 1000 nM C5a ließen sich jedoch lediglich signifikante Effekte der CagPAI auf die Migrationsinhibition der dHL-60-Zellen zeigen sowie der tendenziellen Einfluss des CagA-Proteins und der MKI-Motive. Weitere CagA-Mutanten beziehungsweise -Varianten inhibierten die Bewegung auf ähnliche Weise wie der Wildtyp-*H. pylori*. Auch die

Veränderung der chemotaktischen Wahrnehmung der Zellen konnte nicht wie in den Vorversuchen dargestellt werden.

C5a und fMLP sind Chemoattraktanzien, die an der primären Anlockung von Neutrophilen zum Ort der Entzündung beteiligt sind und deren Erkennungsrezeptoren beide zur Rhodopsin-Superfamilie gehören (Gerard *et al.*, 1991). Die Weiterleitung des Signals in Zellen erfolgt über GTP-bindende Proteine, wobei C5a hauptsächlich Einfluss auf den MAP-Kinase-Signalweg nimmt (Monk *et al.*, 2007), der von den MKI-Motiven manipuliert wird. Dies könnte die Ursache für die mit P12 vergleichbaren Effekte der phosphorylierungsresistenten Mutanten auf die Migration im Assay mit C5a sein und eine Erklärung, warum in diesem Aufbau die Deletion der MKI-Motive mit der vollständigen Deletion von CagA vergleichbar ist.

Um mögliche Effekte aufgrund des gewählten Chemoattraktans auszuschließen, wurden die klonierten *H. pylori*-Mutanten ebenfalls mit 10 nM fMLP und einer MOI von 10 inkubiert. FMLP bindet an Formyl-Peptid-Rezeptoren, die neben der MAP-Kinase zahlreiche weitere Signalwege aktivieren (Weiss *et al.*, 2018). Daraus folgt, dass die gezeigten Effekte nicht nur über die MKI-Motive vermittelt werden. Neben dem bereits untersuchten Verhalten von *H. pylori* bestätigte sich der stärkere Einfluss der EPIYA-C-Motive auf die Inhibition der Migration in zweidimensionalen Experimenten, da sich die Variante mit phosphorylierungsresistenten EPIYA-C-Motiven vom Zellverhalten zwischen dem noch inhibierenden CagA und der komplett resistenten P12(CagA-F5)-Variante einordnete. Ein Aminosäureaustausch an den EPIYA-A- und -B-Motiven führte zu keiner Veränderung der CagA-Virulenz im *Under-Agarose-Assay*. Interessanterweise verhielt sich die Neutrophilen-ähnlichen Zellen bei einer Infektion mit der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante mit einem deletierten EPIYA-C- und allen entfernten MKI-Motiven in diesen Versuchen ähnlich wie die Wildtyp-infizierten dHL-60-Zellen. Dies könnte mit einer erhöhten Virulenz der Mutante durch ein einfaches EPIYA-C-Motiv zusammenhängen, da auch für ostasiatische CagA-Varianten mit nur einem EPIYA-D eine höhere biologische Aktivität beschrieben wurde (Higashi *et al.*, 2002a). Auf der anderen Seite wird eine mehrfache Wiederholung der EPIYA-C-Motive eher mit der Ausbildung von Folgeerkrankungen wie Magenkarzinomen assoziiert (Li *et al.*, 2017). Möglich wäre auch eine Verstärkung der phosphorylierungsunabhängigen Effekte von CagA durch das Fehlen des EPIYA-C-Motivs.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante mit C5a und fMLP klonierten wir weitere CagA-Mutanten beziehungsweise MKI-Varianten. Das Multimerisations-(CM-)Motiv besteht aus einer konservierten Sequenz von 16 Aminosäuren. Diese Struktur

kann wie auch die EPIYA-Motive in eine westliche (FPLKRHDKVDDLKVG) und eine ostasiatische Variante (FPLRRSAAVNDLKVG) unterteilt werden, die weniger als 70 % übereinstimmende Aminosäuren haben (Lu *et al.*, 2008). Neben der Inhibition der MARK-Kinase ist das MKI-Motiv an der Multimerisation zweier CagA-Proteine *in vivo* beteiligt. Diese Dimerbildung ist neben der Phosphorylierung des EPIYA-C- oder -D-Motivs essentiell für die Interaktion zwischen CagA und der SH2-Phosphatase (SHP2) und damit nicht nur an der Ausbildung des *hummingbird*-Phänotyps beteiligt, sondern auch an der Vermittlung eines Teil des karzinogenen Potentials von CagA (Ren *et al.*, 2006). In Experimenten sollten deshalb Zellen, die mit einer vollständig MKI-deletierte Mutante infiziert wurden, keinen *hummingbird*-Phänotyp mehr ausbilden können und auch in Migrationsexperimenten ein ähnliches Verhalten wie nach der Infektion mit der phosphorylierungsresistenten EPIYA-C-Variante zeigen. In einem Versuch bestätigte sich diese Vermutung und es zeigte sich, dass die MKI-Motive eine wichtige Rolle bei den migrationshemmenden und Chemotaxis-verändernden Effekten von *H. pylori* einnehmen. Auch die Variante mit den gegen Alanin ausgetauschten Lysin an den Positionen 946, 980 und 1.014 inhibierte die dHL-60-Zellen im zweidimensionalen Migrationsversuch nicht mehr im selben Ausmaß wie der Wildtyp, was die Relevanz dieser Aminosäuren für die Funktion der MKI-Motive bei der Dimerisation zweier CagA-Proteine beziehungsweise bei der Inhibition der Zellpolarisierung unterstreicht (Saadat *et al.*, 2007, Nesic *et al.*, 2010).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Migration von Neutrophilen in zweidimensionalen Umgebungen die Proteine des T4SS sowie dessen einziges bekanntes Effektorprotein CagA eine Bedeutung haben. Bei der genaueren Untersuchung des C-terminalen Teils des CagA-Proteins konnte die Relevanz der EPIYA-C-Phosphorylierung für die migrationsinhibitorischen Effekte von *H. pylori* dargestellt werden. Weiterhin konnte die Relevanz der MARK-Kinase-inhibierenden Motive um das EPIYA-C- und -D-Motiv gezeigt werden. In weiterführenden Untersuchung sollten nun die beobachteten Auswirkungen der MKI-Motive auf die Migration von Neutrophilen verifiziert und ggf. auch in einer dreidimensionalen Umgebung gezeigt werden. Interessant wäre hier auch die Darstellung des Polaritätsverlusts in Zellen z.B. über die Fusion eines grünfluoreszierenden Proteins (GFP) an die PH-Domäne des AKT-Proteins, das sich in migrierenden Zellen an der apikale Seite beziehungsweise die *leading edge* lokalisiert.

Python-Skript

function for importing data from .csv to numpy array

```
```python
load data into object
def import_data(file_name):

 ## define imports
 import pandas as pd
 import numpy as np

 df = pd.read_csv(file_name, sep=',')

 pos = []
 k = 0

 gb = df.groupby(["TRACK_ID"])
 particles = [gb.get_group(x) for x in gb.groups]

 for i in range(len(particles)):
 tmp = np.zeros([3,len(particles[i])])
 tmp[0,:] = particles[i].FRAME
 tmp[1,:] = particles[i].POSITION_X
 tmp[2,:] = particles[i].POSITION_Y
 pos.append(tmp)

 return pos
```
```

function to fill gaps (up to 3 missing points) in trajectories

```
```python
def fillgaps(pos):
 #print("Filling gaps...")

 ## define imports
 import numpy as np

 for i in range(len(pos)):

 ## check if point count differs from length
 if np.size(pos[i],1) != int(pos[i][0,-1] - pos[i][0,0] + 1):
 #print("DIFF length discovered at " + str(i))

 ## fill single gap
 for k in range(np.size(pos[i],1)):

 ## check for a single missing timestep in pos-array
 check1 = (pos[i][0,k] == (pos[i][0,k-1] + 2))
 check2 = (k != 0)
 if check1 and check2:
 ## interpolate single missing timestep
 temp0 = ((pos[i][:,k] - pos[i][:,k-1])/2 + pos[i][:,k-1]).reshape((3,1))
 pos[i] = np.concatenate((pos[i][:,:k], temp0, pos[i][:,k:]),1)
 #print(" 1 gap filled at " + str(k))
 continue

 ## check for two missing timesteps in pos-array
 check1 = (pos[i][0,k] == (pos[i][0,k-1] + 3))
 check2 = (k != 0)
 check3 = (k != 1)
 if check1 and check2 and check3:
 ## interpolate single missing timestep
 temp1 = (1*(pos[i][:,k] - pos[i][:,k-1])/3 + pos[i][:,k-1]).reshape((3,1))
 temp2 = (2*(pos[i][:,k] - pos[i][:,k-1])/3 + pos[i][:,k-1]).reshape((3,1))
 pos[i] = np.concatenate((pos[i][:,:k], temp1, temp2, pos[i][:,k:]),1)
 #print(" 2 gaps filled at " + str(k))
 continue

 ## check for three missing timesteps in pos-array

```

```

 check1 = (pos[i][0,k] == (pos[i][0,k-1] + 4))
 check2 = (k != 0)
 check3 = (k != 1)
 check4 = (k != 2)
 if check1 and check2 and check3 and check4:
 ## interpolate three missing timesteps
 temp1 = (1*(pos[i][:,k] - pos[i][:,k-1])/4 + pos[i][:,k-1]).reshape((3,1))
 temp2 = (2*(pos[i][:,k] - pos[i][:,k-1])/4 + pos[i][:,k-1]).reshape((3,1))
 temp3 = (3*(pos[i][:,k] - pos[i][:,k-1])/4 + pos[i][:,k-1]).reshape((3,1))
 pos[i] = np.concatenate((pos[i][:,k], temp1, temp2, temp3,
pos[i][:,k:]),1)
 #print(" 3 gaps filled at " + str(k))
 continue

 #print("Filling succeeded.")
 return pos
...

function to calculate stuff
http://ibidi.com/fileadmin/products/software/chemotaxis_tool/IN_XXXXX_CT_Tool_2_0.pdf
(05.2017)
https://ibidi.com/img/cms/products/software/chemotaxis_tool/IN_XXXXX_CT_Tool_2_0.pdf (02.2018)

```python
def calculate_stuff(pos, min_length, plot_steps):
    import numpy as np
    ## http://ibidi.com/fileadmin/products/software/chemotaxis\_tool/IN\_XXXXX\_CT\_Tool\_2\_0.pdf
    eukl_dist = []
    accu_dist = []
    x_end = []
    y_end = []

    for traj in range(0,len(pos)):
        if len(pos[traj][0,:]) > min_length:

            eukl_dist.append( np.sqrt(pos[traj][1,plot_steps]**2 + pos[traj][2,plot_steps]**2)
)

            accu_dist_temp = 0
            for i in range(1,plot_steps):
                accu_dist_temp += np.sqrt( (pos[traj][1,i] - pos[traj][1,i-1])**2 +
                    (pos[traj][2,i] - pos[traj][2,i-1])**2)
            accu_dist.append(accu_dist_temp)

            x_end.append(pos[traj][1,plot_steps])
            y_end.append(pos[traj][2,plot_steps])

    x_end = np.asarray(x_end)
    y_end = np.asarray(y_end)
    eukl_dist = np.asarray(eukl_dist)
    accu_dist = np.asarray(accu_dist)
    directness = eukl_dist / accu_dist
    velocity = accu_dist / plot_steps * 2
    x_FMI = x_end / accu_dist
    y_FMI = y_end / accu_dist

    return [eukl_dist, accu_dist, directness, velocity, x_FMI, y_FMI]
...

## function to plot each particle path of one experiment

```python
def plot_trajectories(pos, save_name, min_length, lim_max_p, lim_max_m, curr_file_name):

 ## define imports
 import os
 import matplotlib.pyplot as plt

 ##### DEFINE RELEVANT PARTICLES
 #min_length = 60
 plot_steps = min_length

```

```

SET ALL STARTING POINTS TO (0,0)
for traj in range(0,len(pos)):
 pos[traj][1,:] = pos[traj][1,:] - pos[traj][1,0]
 pos[traj][2,:] = pos[traj][2,:] - pos[traj][2,0]

PLOT STUFF
plot each particles trajectory
plotted_particle_count = 0
com_sum_x = 0
com_sum_y = 0

#afont = {'fontname':'Arial'}
plt.rcParams["font.family"] = "Arial"

fig = plt.figure(figsize=(4,4))
ax = fig.add_subplot(1, 1, 1)

for traj in range(0,len(pos)):
 if len(pos[traj][0,:]) > min_length:
 ax.plot(pos[traj][1,:plot_steps],pos[traj][2,:plot_steps],'k-', linewidth=0.33,
alpha=1)
 #ax.plot(pos[traj][1,plot_steps-1],pos[traj][2,plot_steps-1],'r.', markersize = 2)
 com_sum_x += pos[traj][1,plot_steps-1]
 com_sum_y += pos[traj][2,plot_steps-1]
 plotted_particle_count += 1

for traj in range(0,len(pos)):
 if len(pos[traj][0,:]) > min_length:
 ax.plot(pos[traj][1,plot_steps-1],pos[traj][2,plot_steps-1],'.', markersize = 2,
color=[.85, .2, .1])

#plt.xlim([plt.xlim()[0], plt.xlim()[1]])
#plt.ylim([plt.ylim()[0], plt.ylim()[1]])
ax.plot([0,0], [plt.ylim()[0], plt.ylim()[1]], 'b')
ax.plot([plt.xlim()[0], plt.xlim()[1]], [0,0], 'b')

com_x = com_sum_x/plotted_particle_count
com_y = com_sum_y/plotted_particle_count
ax.plot(com_x, com_y,'ko', markersize=7)
ax.plot(com_x, com_y,'wo', markersize=5)
ax.plot(com_x, com_y,'ko', markersize=2)
ax.text(0.05, 0.035, 'CoM [μ m $\$$]:\nx = { : 7.2f}\ny = { : 7.2f}'.format(com_x,com_y),
horizontalalignment='left', verticalalignment='bottom', transform=ax.transAxes)
ax.text(0.05, 0.965, '{}'.format(curr_file_name),
horizontalalignment='left', verticalalignment='top', transform=ax.transAxes,
fontweight='bold')

#ax.set_title(str(os.path.splitext(os.path.split(save_name)[-1])[0]) + ":\nNumber of par-
ticles with " + str(min_length) + " steps: " + str(plotted_particle_count))
ax.set_xlabel('[μ m $\$$]')
ax.set_ylabel('[μ m $\$$]')
ax.set_xticks([-400,-300,-200,-100,0,100,200,300,400])
ax.set_yticks([-400,-300,-200,-100,0,100,200,300,400])
ax.set_xticks([-400,-200,0,200,400])
ax.set_yticks([-400,-200,0,200,400])

#plt.savefig(save_name + "_b.pdf", dpi=300)

#lim_max = max(abs(plt.xlim()[0]), abs(plt.xlim()[1]), abs(plt.ylim()[0]),
abs(plt.ylim()[1]))
#lim_max = 500
alph = .33
center (0,0) by adjusting xlim and ylim
#ax.grid(True)
ax.set_xlim([-lim_max_m, lim_max_p])
ax.set_ylim([-lim_max_m+lim_max_p)/2, (lim_max_m+lim_max_p)/2])
draw blue dotted lines through (0,0)
ax.plot([0,0], [plt.ylim()[0], plt.ylim()[1]], '-k', linewidth=1, alpha=alph)
ax.plot([plt.xlim()[0], plt.xlim()[1]], [0,0], '-k', linewidth=1, alpha=alph)

fig.savefig(os.path.join(save_name[:-4] + "_c.png"), dpi=600, bbox_inches='tight')
fig.savefig(os.path.join(save_name[:-4] + "_c.pdf"), dpi=600, bbox_inches='tight')

plt.close(fig)
...

```

```
function to export each experiment to a xls-file
```

```
```python
def export_to_xls( pos, save_name, min_length):
    import xlswriter
    import os
    import numpy as np

    ##### DEFINE RELEVANT PARTICLES
    #min_length = 60
    plot_steps = min_length

    ##### SET ALL STARTING POINTS TO (0,0)
    for traj in range(0,len(pos)):
        pos[traj][1,:] = pos[traj][1,:] - pos[traj][1,0]
        pos[traj][2,:] = pos[traj][2,:] - pos[traj][2,0]

    ##### CALCULATE STUFF
    [eukl_dist, accu_dist, directness, velocity,
     x_FMI, y_FMI] = calculate_stuff(pos, min_length, plot_steps)

    ## create new .xlsx file
    wb = xlswriter.Workbook( save_name + '.xlsx')
    ## create new worksheet
    wsl = wb.add_worksheet()

    ## write header into first row
    wsl.write(0,0,os.path.splitext(os.path.split(save_name)[-1])[0])
    wsl.write(0,1,'Eukl dist')
    wsl.write(0,2,'Accu dist')
    wsl.write(0,3,'Directness')
    wsl.write(0,4,'Velocity')
    wsl.write(0,5,'x_FMI')
    wsl.write(0,6,'y_FMI')

    ## add data column by column
    for k in range(0,len(eukl_dist)):
        wsl.write(k+1,0, k)
        wsl.write(k+1,1, eukl_dist[k])
        wsl.write(k+1,2, accu_dist[k])
        wsl.write(k+1,3, directness[k])
        wsl.write(k+1,4, velocity[k])
        wsl.write(k+1,5, x_FMI[k])
        wsl.write(k+1,6, y_FMI[k])

    ## close .xlsx file
    wb.close()
...

```

```
## function to export all experiments to one xls-file
```

```
```python
def export_single_xlsx(pos_storage, min_length, values, sorting):
 import pandas as pd
 import os
 import numpy as np

 ##### DEFINE RELEVANT PARTICLES
 #min_length = 60
 plot_steps = min_length

 ## open excel file / create new excel file
 writer = pd.ExcelWriter(os.path.join(os.path.split(pos_storage[0][0])[0],
 'all_data.xlsx'))

 for k in range(len(pos_storage)):

 pos = pos_storage[k][1]

 ##### SET ALL STARTING POINTS TO (0,0)
 for traj in range(0,len(pos)):

```



```

 pos[traj][1,:] = pos[traj][1,:] - pos[traj][1,0]
 pos[traj][2,:] = pos[traj][2,:] - pos[traj][2,0]

CALCULATE STUFF
[eukl_dist, accu_dist, directness, velocity,
 x_FMI, y_FMI] = calculate_stuff(pos, min_length, plot_steps)

EXPORT DATA to .xlsx
for value_ in values:
 curr_file = os.path.splitext(os.path.split(pos_storage[k][0])[-1])[0]
 sorted_col = sorting.index(curr_file.split("_")[0])
 df = pd.DataFrame({ curr_file: eval(value_)})
 df.to_excel(writer, sheet_name=value_, startcol=sorted_col, index=False)
...

run program
Beim ersten Start oben "Cell" -> "Run All"

Strg + Enter zum Ausführen

```python
if __name__ == "__main__":
    import os
    import time

    start_time = time.time()

    #####
    ### OPTIONS

    min_length = 40

    lim_max_p = 465
    lim_max_m = 250

    data_directory = '../TrackMate/C5a_DD.MM.YY'

    values = [ 'eukl_dist', 'accu_dist', 'directness', 'velocity', 'x_FMI', 'y_FMI' ]
    sorting = [ 'Kontrolle', '10nM', '20nM', '50nM', '100nM', '200nM', '500nM', '1000nM', ]

    #####

    csv_file_list = [f for f in os.listdir(data_directory) if f.endswith('.csv')]
    pos_storage = []

    end_import = 0
    end_fillgaps = 0
    end_plot = 0
    end_export = 0
    ## loop through all .csv in directory
    for file_ in csv_file_list:
        ## combine path and filename
        start_import = time.time()
        path_and_filename = os.path.join(data_directory, file_)
        ## import data from csv into list with numpy array for each particle
        pos = import_data(path_and_filename)
        end_import += time.time() - start_import
        ## fill possible gaps (up to 3 frames) with linear regression in between
        start_fillgaps = time.time()
        pos = fillgaps(pos)
        end_fillgaps += time.time() - start_fillgaps
        ## create line plot for all particles of one experiment
        start_plot = time.time()
        curr_file_name = file_.split('_')[0]
        plot_trajectories(pos, path_and_filename, min_length, lim_max_p, lim_max_m,
curr_file_name)
        end_plot += time.time() - start_plot
        ## export key results to a single xlsx file
        start_export = time.time()
        export_to_xls(pos, path_and_filename, min_length)
        ## save name and pos in memory
        pos_storage.append([path_and_filename, pos])
        end_export += time.time() - start_export

```

```
if not not pos_storage:
    start_export = time.time()
    export_single_xlsx(pos_storage, min_length, values, sorting)
    end_export += time.time() - start_export

end_time = time.time() - start_time

print('Finished in {:.6.2f} seconds'.format(end_time))
print('  Import:   {:.6.2f} s'.format(end_import))
print('  Fillgaps: {:.6.2f} s'.format(end_fillgaps))
print('  Plot:     {:.6.2f} s'.format(end_plot))
print('  Export:   {:.6.2f} s'.format(end_export))
...
```

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (im Gen) oder Alanin (im Protein)
Abb.	Abbildung
Abl	Kinase, engl.: <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
AK	Antikörper
AlpA	Adhärenz-assoziiertes Lipoprotein A
AlpB	Adhärenz-assoziiertes Lipoprotein B
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BabA	Adhäsion, engl.: <i>blood group antigen-binding adhesin</i>
BB	Medium, engl.: <i>Brucella broth</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C	carboxyterminaler Bereich
C5a	Komplementkomponente 5, Fragment a
ca.	circa
cag	engl.: <i>cytotoxin-associated gene</i>
cagA-ds	engl.: <i>cytotoxin-associated gene A-downstream-Region</i>
cagC	engl.: <i>cytotoxin-associated gene C</i>
cagD	engl.: <i>cytotoxin-associated gene D</i>
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
cat	Chloramphenicolresistenz-Genkassette
CEACAM	Integrin, engl.: <i>carcino-embryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
CM	Multimerisationsmotive

CoM	Zentrum der Masse, engl.: <i>center of mass</i>
Csk	C-terminale Src-Kinase
csv	Dateityp, engl.: <i>comma separated values</i>
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle, engl.: <i>dendritic cell</i>
dHL-60	differenzierte HL-60-Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	PBS nach der Rezeptur von Dulbecco
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
EPIFA	Proteinmotiv: Glutamat-Prolin-Isoleucin-Phenylalanin-Alanin
EPIYA	Proteinmotiv: Glutamat-Prolin-Isoleucin-Tyrosin-Alanin
Erk	Kinase, engl.: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
erm	Erythromycinresistenz-Genkassette
et al.	und andere, lateinisch: <i>et alii</i>
F	Phenylalanin
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	fötales Kälberserum, engl.: <i>fetal calf serum</i>
FMI	engl.: <i>Forward Migration Index</i>
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
G	Guanin (im Gen), Glycin (im Protein)
GEBS	Puffer
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GGT	γ -Glutamyl-Transpeptidase
glr	Glutamat-Racemase
GTP	Guanosintriphosphat

HBSS	Puffer, engl.: <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
Hop	engl.: <i>Helicobacter outer membrane protein</i>
I	Isoleucin
ICAM-1	Integrin, engl.: <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IL	Interleukin
K	Lysin
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LabA	LacdiNac-bindendes Adhäsion
LB	Medium, Luria Bertani
lif	Dateityp, engl.: <i>Leica image file</i>
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MALT	engl.: <i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAP	engl.: <i>mitogen-activated protein</i>
MARK2	mikrotubulaffinitätsregulierende Kinase-2, auch PAR1b genannt
MKI	MARK-Kinase-Inhibitor
MOI	Multiplizität der Infektion, engl.: <i>multiplicity of infection</i>
N	N-terminale Domäne, Asparagin (im Protein)
NAP	engl.: <i>neutrophil-activating protein</i>
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
N-Terminus	aminoterminaler Bereich eines Proteins
OD	optische Dichte
OMP	engl.: <i>outer membrane protein</i>
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese, engl.: <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAI	Pathogenitätsinsel
Par1b	Kinase, engl.: <i>partitioning defective-1</i>

PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PH	engl.: <i>Pleckstrin-homology domain</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	Polymorph-nukleäre Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PRR	engl.: <i>pattern recognition receptor</i>
P-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RIPA	Puffer
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: <i>rounds per minute</i>
RPMI	Medium, Roswell Park Memorial Institute
rpsL	Streptomycinresistenz-Genkassette
S	Serin
s.	siehe
SabA	Sialinsäure-bindendes Adhäsins A
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH2	Src-Homologie-Domäne 2
SHP2	Phosphatase, engl.: <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
SKF	Src-Kinasen-Familie
Src	Kinase, auch c-Src, engl.: <i>cellular sarcoma kinase</i>
SS	Sekretionssystem
T	Thymidin

T4SS	Typ-IV-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	Puffer
TBS	engl.: <i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	engl.: <i>Toll-like receptor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan
tub	Tubulin
U	Einheit, engl.: <i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt, Valin (im Protein)
VacA	Vakuolisierendes Cytotoxin A
VCAM-1	Integrin, engl.: <i>vascular cell adhesion protein 1</i>
x g	x-faches der Erdbeschleunigung
xls	Dateityp, engl.: <i>Excel file format</i>
α	anti
Δ	Deletion

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Magens	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung des westlichen CagA-Proteins.....	16
Abbildung 3: Vergleich zwischen Schälchen und 8-Well-Platte	34
Abbildung 4: Herstellung der Prozessierungsmutanten	40
Abbildung 5: Translokation und Phosphorylierung von Wildtyp-CagA und Mutanten-CagA in AGS- und die Prozessierung in dHL-60-Zellen	41
Abbildung 6: Herstellung der phosphorylierungsresistenten EPIFA-Mutanten	42
Abbildung 7: Translokation und Phosphorylierung von Wildtyp-CagA und EPIFA-Mutanten-CagA in AGS- und die Prozessierung in dHL-60-Zellen.....	43
Abbildung 8: Herstellung der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante	44
Abbildung 9: Herstellung der MKI-Mutanten P12(K946A) und P12 Δ MKI.....	45
Abbildung 10: Translokation und Phosphorylierung von Wildtyp-CagA und MKI-Mutanten-CagA in AGS- und die Prozessierung in dHL-60-Zellen.....	46
Abbildung 11: Western Blot der Immunpräzipitation der P12 Δ MKI Δ C2-Mutante.....	47
Abbildung 12: Migrationsversuche mit fMLP	50
Abbildung 13: Optische Darstellung der Zellspuren mit fMLP-Konzentrationen.....	51
Abbildung 14: Migrationsversuche mit LTB ₄	52
Abbildung 15: Zellspuren und mikroskopischer Vergleich zwischen Medium und 1000 nM LTB ₄	53
Abbildung 16: Migrationsversuche mit C5a	54
Abbildung 17: Vergleich der Zellspuren zwischen Medium und 100 nM C5a	55
Abbildung 18: Migrationsversuche mit verschiedenen Infektionsstärken	56
Abbildung 19: Zellspuren bei 100 nM und 1000 nM C5a und bei verschiedenen MOIs	57
Abbildung 20: Infektionen und Migrationsexperimente mit 1000 nM C5a.....	58
Abbildung 21: Optischer Vergleich zwischen nicht infizierten Zellen, P12 und Mutanten	60
Abbildung 22: Migrationsversuche mit fMLP und P12-Mutanten	61
Abbildung 23: Migrationsversuche mit fMLP und P12-MKI-Mutanten	62
Abbildung 24: Optischer Vergleich zwischen uninfizierten und <i>H. pylori</i> -infizierten Zellen.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktuelle Therapieoptionen modifiziert nach Fischbach <i>et al.</i> ; 2016	10
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.....	18
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete <i>Escherichia coli</i> - und <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme..	18
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	19
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	20
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Medien, Platten und Zusätze für Bakterien- und Zellkultur	23
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Hemmstoffe	23
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper	24
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper.....	25
Tabelle 11: Molekulargewichtsmarker.....	25
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Kits.....	25

Literaturverzeichnis

- Afonso, *et al.*, (2012) LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Dev. Cell* **22**: 1079-1091.
- Algood, *et al.*, (2007) Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**: 577-586.
- Alm, *et al.*, (2000) Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect. Immun.* **68**: 4155-4168.
- Amulic, *et al.*, (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**: 459-489.
- Andersen-Nissen, *et al.*, (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 9247-9252.
- Angelini, *et al.*, (2009) Expression of *Helicobacter pylori* CagA domains by library-based construct screening. *Febs j* **276**: 816-824.
- Anton, *et al.*, (1998) Mucosal subepithelial binding sites for the bacterial chemotactic peptide, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP). *Gut* **42**: 374-379.
- Atherton, (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **1**: 63-96.
- Backert, *et al.*, (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* **2**: 155-164.
- Bamford, *et al.*, (1998) Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* **114**: 482-492.
- Barranco, *et al.*, (1983) Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **43**: 1703-1709.
- Bizzozero, (1893) Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch. Mikr. Anat.* **42**: 82.
- Blaser, (1997) Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *J. Clin. Invest.* **100**: 759-762.
- Blaser, *et al.*, (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* **113**: 321-333.
- Boyden, (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **115**: 453-466.
- Bugaytsova, *et al.*, (2017) *Helicobacter pylori* Adapts to Chronic Infection and Gastric Disease via pH-Responsive BabA-Mediated Adherence. *Cell Host Microbe* **21**: 376-389.
- Buhrdorf, *et al.*, (2003) Topological analysis of a putative virB8 homologue essential for the cag type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**: 213-217.
- Busch, *et al.*, (2015) *Helicobacter pylori* interferes with leukocyte migration via the outer membrane protein HopQ and via CagA translocation. *Int. J. Med. Microbiol.* **305**: 355-364.

- Carp, (1982) Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* **155**: 264-275.
- Celli, *et al.*, (2009) Helicobacter pylori moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 14321-14326.
- Censini, *et al.*, (1996) cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 14648-14653.
- Chan, *et al.*, (2009) FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J. Cell Biol.* **185**: 357-370.
- Collins, *et al.*, (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**: 2458-2462.
- Covacci, *et al.*, (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 5791-5795.
- Cover, *et al.*, (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori. *J. Biol. Chem.* **267**: 10570-10575.
- Cover, *et al.*, (2003) Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* **63**: 951-957.
- Cullen, *et al.*, (2011) Helicobacter pylori versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog.* **7**: e1002454.
- Dixon, (2001) Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. In: Helicobacter pylori: Physiology and Genetics. Mobley, Mendz & Hazell (eds). Washington (DC): ASM Press
ASM Press., pp.
- Dooley, *et al.*, (1989) Prevalence of Helicobacter pylori infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N. Engl. J. Med.* **321**: 1562-1566.
- Dubois, *et al.*, (2007) Helicobacter pylori is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell. Microbiol.* **9**: 1108-1116.
- Dunn, *et al.*, (1997) Helicobacter pylori. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 720-741.
- Evans, *et al.*, (1995) Characterization of a Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* **63**: 2213-2220.
- Fallone, *et al.*, (2016) The Toronto Consensus for the Treatment of Helicobacter pylori Infection in Adults. *Gastroenterology* **151**: 51-69.e14.
- Figueira, *et al.*, (2012) Functions of the Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology* **158**: 1147-1161.
- Fischbach, *et al.*, (2007) Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for Helicobacter pylori. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **26**: 343-357.

- Fischbach, *et al.*, (2016) [S2k-guideline *Helicobacter pylori* and gastroduodenal ulcer disease]. *Z. Gastroenterol.* **54**: 327-363.
- Fischer, *et al.*, (2001a) Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **69**: 6769-6775.
- Fischer, *et al.*, (2001b) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**: 1337-1348.
- Fox, *et al.*, (2007) Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest.* **117**: 60-69.
- Friis-Hansen, (2006) Achlorhydria is associated with gastric microbial overgrowth and development of cancer: lessons learned from the gastrin knockout mouse. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **66**: 607-621.
- Gebert, *et al.*, (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**: 1099-1102.
- Gerard, *et al.*, (1991) The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* **349**: 614-617.
- Gisbert, *et al.*, (2006) Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **101**: 1921-1930.
- Grant, *et al.*, (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 4645-4649.
- Hafsi, *et al.*, (2004) Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *J. Immunol.* **173**: 1249-1257.
- Hagymasi, *et al.*, (2014) *Helicobacter pylori* infection: new pathogenetic and clinical aspects. *World J. Gastroenterol.* **20**: 6386-6399.
- Hatakeyama, (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 688-694.
- Hatakeyama, (2017) Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **93**: 196-219.
- Hayashi, *et al.*, (2012) Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe* **12**: 20-33.
- Heit, *et al.*, (2003) Measuring chemotaxis and chemokinesis: the under-agarose cell migration assay. *Sci. STKE* **2003**: P15.
- Higashi, *et al.*, (2004) *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J. Biol. Chem.* **279**: 17205-17216.
- Higashi, *et al.*, (2002a) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14428-14433.

- Higashi, *et al.*, (2002b) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**: 683-686.
- Higashi, *et al.*, (2005) EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 23130-23137.
- Ho, *et al.*, (2004) The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig. Dis. Sci.* **49**: 1598-1606.
- Ilver, *et al.*, (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**: 373-377.
- Innocenti, *et al.*, (2002) *Helicobacter pylori*-induced activation of human endothelial cells. *Infect. Immun.* **70**: 4581-4590.
- Javaheri, *et al.*, (2016) *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol* **2**: 16189.
- Jimenez-Soto, *et al.*, (2009) *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog.* **5**: e1000684.
- Kaebisch, *et al.*, (2014) *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A impairs human dendritic cell maturation and function through IL-10-mediated activation of STAT3. *J. Immunol.* **192**: 316-323.
- Kao, *et al.*, (2010) *Helicobacter pylori* immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. *Gastroenterology* **138**: 1046-1054.
- Kaplan-Turkoz, *et al.*, (2012) Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with beta1 integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 14640-14645.
- Kaplan-Turkoz, *et al.*, (2013) [Structure and mode of injection of the oncoprotein CagA of *Helicobacter pylori*]. *Med. Sci. (Paris)* **29**: 33-36.
- Koniger, *et al.*, (2016) *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat Microbiol* **2**: 16188.
- Kranzer, *et al.*, (2004) Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **72**: 4416-4423.
- Kutter, *et al.*, (2008) Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J. Bacteriol.* **190**: 2161-2171.
- Kwok, *et al.*, (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**: 862-866.
- Laemmli, (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li, *et al.*, (2017) Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **96**: e6620.
- Linden, *et al.*, (2002) Strain- and blood group-dependent binding of *Helicobacter pylori* to human gastric MUC5AC glycoforms. *Gastroenterology* **123**: 1923-1930.

- Liu, *et al.*, (2014) Ten day sequential versus 10 day modified bismuth quadruple therapy as empirical firstline and secondline treatment for *Helicobacter pylori* in Chinese patients: an open label, randomised, crossover trial. *Gut* **63**: 1410-1415.
- Llosa, *et al.*, (2000) The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 3437-3445.
- Lu, *et al.*, (2008) Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci.* **99**: 2004-2011.
- Lu, *et al.*, (2007) Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J. Biol. Chem.* **282**: 6242-6254.
- Lundgren, *et al.*, (2005) Mucosal FOXP3-expressing CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect. Immun.* **73**: 523-531.
- Lytton, *et al.*, (2005) Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. *Microbiology* **151**: 3267-3276.
- Mahdavi, *et al.*, (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578.
- Marasco, *et al.*, (1984) Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**: 5430-5439.
- Marshall, *et al.*, (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* **142**: 436-439.
- Marshall, *et al.*, (1990) Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* **99**: 697-702.
- Marshall, *et al.*, (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**: 1311-1315.
- McDonald, *et al.*, (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* **330**: 362-366.
- McLaughlin, *et al.*, (2009) The *Salmonella* SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PLoS Pathog.* **5**: e1000671.
- Megraud, *et al.*, (2007) *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 280-322.
- Mocsai, *et al.*, (2015) Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc. Res.* **107**: 373-385.
- Mohi, *et al.*, (2007) The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**: 23-30.
- Molinari, *et al.*, (1998) Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* **187**: 135-140.

- Monk, *et al.*, (2007) Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br. J. Pharmacol.* **152**: 429-448.
- Monteiro, *et al.*, (2011) Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. *J. Immunol.* **186**: 6562-6567.
- Moodley, *et al.*, (2012) Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog.* **8**: e1002693.
- Moran, *et al.*, (1997) Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **179**: 6453-6463.
- Necchi, *et al.*, (2007) Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, pre-neoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **132**: 1009-1023.
- Necchi, *et al.*, (2009) Evidence for transepithelial dendritic cells in human H. pylori active gastritis. *Helicobacter* **14**: 208-222.
- Nesic, *et al.*, (2010) *Helicobacter pylori* CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 130-132.
- Odenbreit, *et al.*, (2001) Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* **3**: 21-31.
- Odenbreit, *et al.*, (2002) CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from alpAB, HopZ and bab group outer membrane proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**: 257-266.
- Odenbreit, *et al.*, (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**: 1497-1500.
- Oertli, *et al.*, (2013) *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and vacuolating cytotoxin promote gastric persistence and immune tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 3047-3052.
- Oldani, *et al.*, (2009) *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. *PLoS Pathog.* **5**: e1000603.
- Peek, *et al.*, (2006) *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J. Pathol.* **208**: 233-248.
- Peek, *et al.*, (1995) Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab. Invest.* **73**: 760-770.
- Rad, *et al.*, (2006) CD25+/Foxp3+ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology* **131**: 525-537.
- Rehmann, *et al.*, (2005) [Spontaneous elimination of *Helicobacter pylori* infection in children]. *Klin. Padiatr.* **217**: 15-17.
- Ren, *et al.*, (2006) Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 32344-32352.

- Ribeiro, *et al.*, (1997) Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112**: 27-35.
- Rossez, *et al.*, (2014) The lacdiNAc-specific adhesin LabA mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* **210**: 1286-1295.
- Saadat, *et al.*, (2007) *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* **447**: 330-333.
- Salama, *et al.*, (2013) Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 385-399.
- Sambrook, *et al.*, (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, *et al.*, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 5463-5467.
- Schindele, *et al.*, (2016) Quantitative analysis of CagA type IV secretion by *Helicobacter pylori* reveals substrate recognition and translocation requirements. *Mol. Microbiol.* **100**: 188-203.
- Schmees, *et al.*, (2007) Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* **132**: 1820-1833.
- Schmitt, *et al.*, (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* **12**: 307-319.
- Schmitt, *et al.*, (1995) Cloning of the *Helicobacter pylori* recA gene and functional characterization of its product. *Mol. Gen. Genet.* **248**: 563-572.
- Schreiber, *et al.*, (2005) Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect. Immun.* **73**: 1584-1589.
- Schreiber, *et al.*, (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 5024-5029.
- Schubert, *et al.*, (2004) The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 83-94.
- Scott, *et al.*, (2000) Expression of the *Helicobacter pylori* ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. *Infect. Immun.* **68**: 470-477.
- Segal, (1997) Consequences of attachment of *Helicobacter pylori* to gastric cells. *Biomed. Pharmacother.* **51**: 5-12.
- Segal, *et al.*, (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14559-14564.
- Senkovich, *et al.*, (2011) *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infect. Immun.* **79**: 3106-3116.
- Servant, *et al.*, (1999) Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1163-1178.

- Sharma, *et al.*, (1995) Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect. Immun.* **63**: 1681-1687.
- Shea, *et al.*, (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 2593-2597.
- Simon, *et al.*, (2014) Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by *Legionella* is antagonized by a translocated Ran GTPase activator. *Cell. Microbiol.* **16**: 977-992.
- Soehnlein, *et al.*, (2009) Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* **114**: 4613-4623.
- Solnick, *et al.*, (2001) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 59-97.
- Stein, *et al.*, (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol.* **43**: 971-980.
- Stingl, *et al.*, (2005) Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 307-315.
- Suerbaum, *et al.*, (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.
- Suerbaum, *et al.*, (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **347**: 1175-1186.
- Suzuki, *et al.*, (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci.* **119**: 979-987.
- Szabo, *et al.*, (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* **18**: 5517-5527.
- Tammer, *et al.*, (2007) Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* **132**: 1309-1319.
- Thijs, *et al.*, (1996) Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. *Am. J. Gastroenterol.* **91**: 2125-2129.
- Tinevez, *et al.*, (2017) TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**: 80-90.
- Tomb, *et al.*, (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.
- Towbin, *et al.*, (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-149.
- Tsutsumi, *et al.*, (2006) Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 261-276.
- Van den Brink, *et al.*, (2000) H pylori colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* **46**: 601-607.

- Watari, *et al.*, (2014) Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, pre-cancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J. Gastroenterol.* **20**: 5461-5473.
- Weiss, *et al.*, (2018) Formyl-Peptide Receptors in Infection, Inflammation, and Cancer. *Trends Immunol.* **39**: 815-829.
- Wuppenhorst, *et al.*, (2014) Prospective multicentre study on antimicrobial resistance of Helicobacter pylori in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**: 3127-3133.
- Wustner, *et al.*, (2015) Helicobacter pylori gamma-glutamyltranspeptidase impairs T-lymphocyte function by compromising metabolic adaptation through inhibition of cMyc and IRF4 expression. *Cell. Microbiol.* **17**: 51-61.
- Yamaoka, *et al.*, (1998) Chemokines in the gastric mucosa in Helicobacter pylori infection. *Gut* **42**: 609-617.
- Yokoyama, *et al.*, (2005) Functional antagonism between Helicobacter pylori CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 9661-9666.
- Yoshiyama, *et al.*, (1999) Chemotaxis and motility of Helicobacter pylori in a viscous environment. *J. Gastroenterol.* **34 Suppl 11**: 18-23.
- Zeaiter, *et al.*, (2008) Analysis of detergent-resistant membranes of Helicobacter pylori infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell. Microbiol.* **10**: 781-794.
- Zhao, *et al.*, (2018) Integrin but not CEACAM receptors are dispensable for Helicobacter pylori CagA translocation. *PLoS Pathog.* **14**: e1007359.
- Zheng, *et al.*, (2003) Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell. Microbiol.* **5**: 25-40.
- Zupan, *et al.*, (2000) The transfer of DNA from agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* **23**: 11-28.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Wolfgang Fischer, der mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, sondern auch immer Zeit für meine Anliegen hatte. Ohne ihn als Ansprech- und Diskussionspartner hätte sich meine Arbeit im Labor anders entwickelt. Prof. Dr. Rainer Haas danke ich für seine fachlichen Anmerkungen und die Chance, meine Daten beim SFB-Retreat in Italien vorzustellen.

Ein Großteil meines methodischen Wissens habe ich von Dr. Benjamin Busch gelernt. Für die Geduld beim Erklären und seine Offenheit für neue Ideen und Ansätze möchte ich ihm danken.

Neben diesen dreien gilt mein Dank den wunderbaren Haasen. Ihr habt mich herzlich in eure naturwissenschaftlichen Reihen aufgenommen und mit eurem Humor für eine Atmosphäre gesorgt, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe. Evelyn und Friederike, ihr beide habt mir in euren jeweiligen Reichen viel beigebracht und mich mit eurer Neugier und eurem Interesse motiviert am Ball zu bleiben.

Ohne das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität wäre diese Doktorarbeit so nicht zustande gekommen. Nicht nur die lehrreichen Seminare und Präsentationen sowie die finanzielle Unterstützung haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, auch die Freundschaften, die sich dadurch entwickelten, bedeuten mir viel.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Großmutter. Neben eurem elterlichen Verständnis und eurer Unterstützung, wenn es mal nicht so gut lief, haben mir besonders die Diskussionen mit Silja bei der Datenauswertung und der hohe Konsum von Kaffee und süßen Stückchen, der erst durch meine Omi ermöglicht wurde, geholfen. Ich habe euch alle sehr lieb!

Tobias, du bist mein bester Freund, mein Fels in der Brandung und ein wahrer Python-Künstler. Allein durch deinen Optimismus wärst du mir eine große Hilfe gewesen; dass du dir dazu noch Zeit für die Datenauswertung genommen und meine zahlreichen Sonderwünsche umgesetzt hast, ehrt dich sehr. Du bist ein toller Mensch. Danke, dass du ein Teil meines Lebens bist.