

---

**Molekulare Charakterisierung der  
Response-Regulatoren ArsR (HP0166), HP1043 und  
HP1021 von *Helicobacter pylori***

---

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Jennifer Schär**  
aus Würzburg

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

Gutachter: PD. Dr. Dagmar Beier

Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

### *Erklärung*

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom Oktober 2001 bis August 2006 unter Betreuung von PD Dr. Dagmar Beier angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Außer dem Titel Diplom-Biologin (Univ.) habe ich bislang keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....

.....

## **Vielen Dank.....**

Zu allererst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Dagmar Beier für die Überlassung des spannenden Themas, die sehr gute fachliche Anleitung und für ihre hervorragende Betreuung bedanken. Außerdem habe ich die außerdienstlichen Veranstaltungen wie den Geburtstagsbrunch, die Spargelessen und das Frühstücken im Riverside sehr genossen.

Herrn Prof. Dr. Werner Goebel danke ich für die Bereitstellung des ehemaligen und des aktuellen Arbeitsplatzes und Herrn Prof. Dr. Roland Benz für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Besonders möchte ich mich bedanken bei den momentanen, kurzzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern von c207. Ohne Patricia wäre meine Anfangszeit im Labor bestimmt um einiges schwieriger gewesen. Dank Anto´s Sprachwirrungen war es nie langweilig bei der täglichen Arbeit. Der meiste Dank geht hier allerdings an meine „kleine“ Steffi, die inzwischen schon ganz groß ist und mich stets motiviert hat.

Bei allen MitarbeiterInnen des Instituts, insbesondere der Roy-Arbeitsgruppe bedanke ich mich für ein tolles Arbeitsklima, viele ermutigende Worte und hilfreiche Auskünfte.

Zwei ganz besondere Dankeschön gehen an Andrea und Doro, die beide trotz außergewöhnlichen Umständen (Andrea´s Arbeitsplatzwechsel; Doro´s dicker Bauch) beide die Zeit gefunden haben diese Arbeit kritisch zu lesen, mir gute Verbesserungsvorschläge gemacht und mich immer wieder aufgebaut haben.

Bedanken möchte ich mich auch beim ZDW, den Welt-besten Nachbarn die man haben kann, weil man sich immer auf sie verlassen kann, es dort das beste WM-Studio gab, ich bei Computerproblemen stets Unterstützung fand („Hilfe Pert, bitte schau ob wenigstens meine Festplatte noch intakt ist“) und aus vielen weiteren Gründen.

Nicht zu vergessen Simone, die mit mir die unendlichen Weiten des Marketing-Universums erkundet hat, regelmäßig gute und schlechte Filme im Kino mit mir konsumiert hat, ohne deren immense Bibliothek mir auf mancher Zugfahrt todlangweilig gewesen wäre und bei der ich auch mit den unmöglichsten Problemen bzw. Fragen zu Tag und Nacht Zeiten auftauchen kann.

Am meisten danke ich meiner tollen „patchwork“-Familie, meinem Vater Herbert, seiner bald Angetrauten Elke, meinem „richtigen“ Bruder Flo, meiner zukünftigen Schwägerin und guten Freundin Dana und meinen neuen Geschwistern Silke und Marcel. Ihr habt mich großartig in allen Lebenslagen unterstützt (physisch, psychisch, finanziell und vor allem kulinarisch). Und schließlich danke ich Markus von Herzen, der mir geduldig und liebevoll bei Seite gestanden hat und alle meine Launen ertragen musste.

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>A. Summary .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>A. Zusammenfassung.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>B. Einleitung .....</b>   | <b>5</b>  |
| 1. <i>Helicobacter pylori</i> .....  | 5         |
| 1.1 Allgemeine Charakterisierung von <i>H. pylori</i> .....  | 5         |
| 1.2 Pathogenität, Epidemiologie und Transmission von <i>H. pylori</i> .....                            | 7         |
| 1.3 Genetische Eigenschaften von <i>H. pylori</i> .....  | 10        |
| 1.4 Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i> .....  | 11        |
| 1.5 Transkriptionsregulation in <i>H. pylori</i> .....   | 17        |
| 1.6 Weitere Expressions-Regulationsmechanismen von <i>H. pylori</i> .....                              | 22        |
| 2. Zwei-Komponentensysteme .....   | 23        |
| 2.1 Allgemeine Charakterisierung.....  | 23        |
| 2.2 Zwei-Komponentensysteme in <i>H. pylori</i> .....  | 27        |
| 3. Zielsetzung.....  | 34        |
| <b>C. Material .....</b>   | <b>36</b> |
| 1. Bakterienstämme .....   | 36        |
| 2. Vektoren und rekombinante Plasmide.....   | 37        |
| 3. Oligonukleotide .....   | 40        |
| 4. Proteine .....  | 43        |
| 5. Antikörper .....  | 43        |
| 6. Verbrauchsmaterialien.....  | 43        |
| 6.1 Chemikalien .....  | 43        |
| 6.2 Enzyme .....   | 44        |
| 6.3 Sonstiges.....   | 44        |
| 7. Wachstumsmedien und Zusätze.....  | 44        |
| 7.1 Medien und Agarplatten für <i>E. coli</i> .....  | 44        |
| 7.2 Medien und Agarplatten für <i>H. pylori</i> .....  | 44        |
| 7.3 sonstige Medien .....  | 44        |
| 7.4 Medienzusätze.....   | 45        |
| 8. Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gelelektrophorese .....                                     | 45        |
| 9. Geräte .....  | 45        |
| <b>D. Methoden .....</b>   | <b>47</b> |
| 1. Arbeiten mit Bakterien .....  | 47        |
| 1.1 Anzucht von <i>H. pylori</i> (bzw. <i>C. jejuni</i> ) .....  | 47        |
| 1.1.1 Anzucht von <i>H. pylori</i> (bzw. <i>C. jejuni</i> ) auf Columbia Blutagarplatten .....         | 47        |
| 1.1.2 Anzucht von <i>H. pylori</i> in Flüssigkultur.....   | 47        |
| 1.2 Transformation .....   | 47        |
| 1.2.1 Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....                            | 47        |
| 1.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....   | 47        |
| 1.2.3 Transformation von natürlich kompetenten <i>H. pylori</i> (bzw. <i>C. jejuni</i> )-Stämmen ..... | 48        |
| 1.2.4 Transformation von <i>H. pylori</i> (bzw. <i>C. jejuni</i> ) mittels Elektroporation .....       | 48        |
| 2. Molekulargenetische Methoden .....  | 48        |
| 2.1 Isolierung von DNA .....   | 48        |

---

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.1.1   | Minipräparation chromosomaler <i>H. pylori</i> -DNA (bzw. <i>C. jejuni</i> -DNA)             | 48 |
| 2.1.2   | Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (Myakishev <i>et al.</i> , 1995)                  | 49 |
| 2.1.3   | Plasmidpräparation im präparativen Maßstab   | 49 |
| 2.1.4   | EtOH-Fällung von Plasmid-DNA   | 50 |
| 2.1.5   | Konzentrationsbestimmung von DNA   | 50 |
| 2.2     | Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA-Fragmenten                                     | 50 |
| 2.2.1   | Horizontale Agarose-Gelelektrophorese  | 50 |
| 2.2.2   | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gelextraktionskit von QIAGEN | 50 |
| 2.3     | Enzymatische Modifikation von DNA  | 51 |
| 2.3.1   | Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen                                     | 51 |
| 2.3.2   | Vektorpräparation  | 51 |
| 2.3.3   | Ligation   | 51 |
| 2.4     | DNA-Amplifikation  | 52 |
| 2.4.1   | Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki <i>et al.</i> , 1988)                                   | 52 |
| 2.4.2   | Reinigung von PCR-Produkten mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification-Kit von QIAGEN           | 52 |
| 2.4.3   | PCR mit Zell-Lysaten als Template  | 53 |
| 2.5     | Sequenzierung  | 53 |
| 2.5.1   | Automatische DNA-Sequenzierung nach der Fluoreszenzmethode                                   | 53 |
| 2.5.2   | DNA-Sequenzierung mit radioaktivem $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP                               | 54 |
| 2.6     | Southern-Blot  | 54 |
| 2.7     | Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese mit dem QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit      | 55 |
| 3.      | Analyse von RNA  | 56 |
| 3.1     | RNA-Isolierung aus <i>H. pylori</i>  | 56 |
| 3.1.1   | RNA-Präparation mit TRIzol (Invitrogen)  | 56 |
| 3.1.2   | DNase-Verdau   | 57 |
| 3.1.3   | Reinigung und Fällung der RNA  | 57 |
| 3.2     | Arbeiten mit RNA   | 57 |
| 3.2.1   | Herstellung von cDNA   | 57 |
| 3.2.2   | RT-PCR   | 57 |
| 3.2.3   | Primer Extension   | 57 |
| 4.      | Proteinbiochemische Methoden   | 58 |
| 4.1     | Auftrennung und Analyse von Proteinen  | 58 |
| 4.1.1   | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)   | 58 |
| 4.1.2   | Bestimmung der Proteinkonzentration  | 60 |
| 4.2     | Gesamtproteinisolierung  | 60 |
| 4.2.1   | Isolierung von Gesamtzellproteinen von <i>H. pylori</i>                                      | 60 |
| 4.2.2   | Isolierung von Gesamtzellproteinen gram-negativer Bakterien (für die 2D-Gelelektrophorese)   | 61 |
| 4.3     | Proteinreinigung über eine Ni-NTA-Agarose-Säule  | 61 |
| 4.3.1   | Proteinexpression mit Hilfe der pQE-Plasmide   | 62 |
| 4.3.2   | Überexpression des rekombinanten Proteins  | 62 |
| 4.3.3   | Zellaufschluss   | 62 |
| 4.3.3.1 | Zellaufschluss durch die French-Press  | 62 |
| 4.3.3.2 | Zellaufschluss mittels BugBuster-Reagenz   | 62 |
| 4.3.4   | Vorbereitung der Säule   | 63 |
| 4.3.5   | Reinigung von löslichen Proteinen  | 63 |
| 4.3.6   | Reinigung von unlöslichen Proteinen  | 64 |
| 4.4     | Proteinreinigung über die Glutathion-Sepharose Säule   | 64 |
| 4.4.1   | Proteinexpression mit Hilfe der pGEX-Plasmide  | 64 |
| 4.4.2   | Überexpression des rekombinanten Proteins  | 64 |
| 4.4.3   | Zellaufschluss   | 64 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.4 Vorbereitung der Säule .....  | 64        |
| 4.4.5 Proteinreinigung.....   | 65        |
| 4.5 Western-Blot .....  | 65        |
| 4.5.1 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot).....   | 65        |
| 4.5.2 Immunoblot .....  | 66        |
| 4.6 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen <i>H. pylori</i> Proteine .....  | 66        |
| 4.7 Zweidimensionale Proteingelelektrophorese .....   | 66        |
| 4.7.1 Auftrennung von Proteinen in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung (IEF) .....   | 66        |
| 4.7.1.1 Rehydrierung der IPG-Strips im Reswelling-Tray .....  | 67        |
| 4.7.1.2 IEF im Manifold.....  | 67        |
| 4.7.2 Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....   | 67        |
| 4.7.2.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele .....   | 68        |
| 4.7.2.2 Herstellung von Molekulargewichts-Standards für die zweite Dimension .....  | 68        |
| 4.7.2.3 Vorbereitung der IEF-Gele und Starten der 2. Dimension .....  | 68        |
| 4.7.3 Proteinfärbung mit Silbernitrat .....   | 69        |
| 4.7.4 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie .....  | 69        |
| 4.7.5 Analyse der 2D-Gele.....  | 70        |
| 4.7.5.1 Western-Blot .....  | 70        |
| 4.7.5.2 MALDI-ToF-MS.....   | 70        |
| 4.7.5.3 Auswertung mit der Delta 2D Software von DECODON.....   | 70        |
| 4.8 Phosphorylierungsassays.....  | 70        |
| 4.8.1 Analyse der Autophosphorylierung von Histidin-Kinasen und des Phosphotransfers auf Response Regulatoren.....  | 70        |
| 4.8.2 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von Response-Regulatoren mit radioaktiv markiertem Acetylphosphat .....   | 71        |
| <b>E. Ergebnisse .....</b>  | <b>72</b> |
| 1. Ein genetisches Komplementationssystem für <i>H. pylori</i> .....  | 72        |
| 1.1 Das „knock-out“-Plasmid pSL-1021::km .....  | 74        |
| 1.2 Das „knock-out“-Plasmid pSL-1043::km2 .....   | 75        |
| 1.3 Das „knock-out“-Plasmid pSL-0166::km2 .....   | 75        |
| 2. Funktionelle Analyse des Response-Regulators ArsR (HP0166) <i>in vivo</i> .....  | 76        |
| 2.1 Analyse des Phosphotransfers von der Histidin-Kinase ArsS (HP0165) auf den mutierten Response-Regulator ArsR-D52N (HP0166-D52N) .....                     | 77        |
| 2.1.1 Konstruktion des mutierten Allels <i>hp0166-D52N</i> ( <i>arsR-D52N</i> ).....  | 77        |
| 2.1.2 Konstruktion des Überexpressionsplasmids pQE-0166-D52N und Aufreinigung des Fusionsproteins His <sub>6</sub> -0166-D52N.....                            | 78        |
| 2.1.3 Autophosphorylierung der Histidin-Kinase ArsS (HP0165) und Phosphotransfer auf die Response-Regulatoren ArsR (HP0166) und ArsR-D52N (HP0166-D52N) ..... | 79        |
| 2.2 <i>In vivo</i> -Komplementationsexperiment mit dem mutierten Allel <i>hp0166-D52N</i> .....   | 79        |
| 2.2.1 Konstruktion des merodiploiden Stammes <i>H. pylori</i> G27/0166-D52N .....   | 79        |
| 2.2.3 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>arsR</i> ( <i>hp0166</i> ) in <i>H. pylori</i> G27/0166-D52N.....                                  | 80        |
| 3. Komplementationsexperimente mit Derivaten von HP1043 und HP1021, die Mutationen der untypischen Aminosäuren der Receiver-Domäne aufweisen.....             | 82        |
| 3.1 Konstruktion der <i>H. pylori</i> -Stämme G27/1043-K8DΔ und G27/1043-K8N9DDΔ....  | 82        |
| 3.1.1 Konstruktion der merodiploiden <i>H. pylori</i> -Stämme G27/1043-K8D und G27/1043-K8N9DD.....   | 83        |
| 3.1.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>hp1043</i> in den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/1043-K8D und G27/1043-K8N9DD.....                  | 85        |
| 3.2 Konstruktion der <i>H. pylori</i> -Stämme G27/1021-S47DΔ, G27/1021- S48DΔ und G27/1021-S47S48DDΔ.....   | 86        |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.1 Konstruktion der merodiploiden <i>H. pylori</i> -Stämme G27/1021-S47D, G27/1021-S48D und G27/1021-S47S48DD .....  | 86  |
| 3.2.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>hp1021</i> in den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/1021-S47D, G27/1021-S48D und G27/1021-S47S48DD .....   | 88  |
| 4. Untersuchungen zur Phosphorylierung von HP1021 und HP1043 durch Acetylphosphat. 90   |     |
| 4.1 Versuche zur <i>in vitro</i> -Phosphorylierung von HP1021 und HP1043 mit radioaktiv markiertem Acetylphosphat.....  | 90  |
| 4.2 Untersuchungen zur <i>in vivo</i> -Phosphorylierung der Response-Regulatoren von <i>H. pylori</i> durch zelluläres Acetylphosphat .....   | 91  |
| 4.2.1 Konstruktion des „knock-out“-Plasmids zur Deletion der Gene <i>pta</i> und <i>ackA</i> in <i>H. pylori</i> G27 .....  | 92  |
| 4.2.2 Deletion der Gene <i>pta</i> und <i>ackA</i> in <i>H. pylori</i> G27.....   | 92  |
| 5. <i>In vivo</i> -Komplementationsexperimente mit Derivaten von HP1043 und HP1021, die Mutationen an der potentiellen Phosphorylierungsstelle aufweisen .....  | 94  |
| 5.1 Konstruktion von mutierten Derivaten von HP1043 .....   | 94  |
| 5.1.1 Konstruktion der merodiploiden <i>H. pylori</i> -Stämme G27/1043-S51N, G27/1043-D52N, G27/1043-S51A, G27/1043-S51D52AN und G27/1043-S51D52MN .....  | 95  |
| 5.1.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>hp1043</i> in den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/1043-S51N, G27/1043-D52N, G27/1043-S51A, G27/1043-S51D52AN und G27/1043-S51D52MN.....  | 97  |
| 5.2 Konstruktion von mutierten Derivaten von HP1021 .....   | 98  |
| 5.2.1 Konstruktion der merodiploiden <i>H. pylori</i> -Stämme G27/1021-S47N, G27/1021-S48N und G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48AA, G27/1021-S47S48NA, G27/1021-S47S48NL und G27/1021-S47S48MN.....  | 98  |
| 5.2.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>hp1021</i> in den merodiploiden <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/1021-S47N, G27/1021-S48N, G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48AA, G27/1021-S47S48NA, G27/1021-S47S48NL und G27/1021-S47S48MN ..... | 101 |
| 6. <i>In vivo</i> -Komplementationsexperimente mit den Output-Domänen der Response-Regulatoren HP1043, HP1021 und ArsR (HP0166).....  | 104 |
| 6.1 Komplementationsexperimente mit der Output-Domäne von HP1043.....   | 104 |
| 6.1.1 Konstruktion des <i>H. pylori</i> -Stammes G27/P <sub>hp1043</sub> -1043-O .....  | 104 |
| 6.1.2 Deletion des Gens <i>hp1043</i> in dem <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>hp1043</sub> -1043-O .....  | 105 |
| 6.1.3 Analyse der Expression von HP1043-O in dem rekombinanten <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>hp1043</sub> -1043-O mittels Western-Blot Analyse.....  | 106 |
| 6.2 Komplementationsexperimente mit der Outputdomäne von HP1021 .....   | 106 |
| 6.2.1 Konstruktion des <i>H. pylori</i> -Stammes G27/P <sub>hp1018</sub> -1021-O .....  | 106 |
| 6.2.2 Deletion des Gens <i>hp1021</i> in dem <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>hp1018</sub> -1021-O .....  | 107 |
| 6.2.3 Analyse der Expression von HP1021-O in dem rekombinanten <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>hp1018</sub> -1021-O mittels Western-Blot-Analyse .....   | 107 |
| 6.3 Komplementationsexperimente mit der Outputdomäne von ArsR (HP0166).....   | 108 |
| 6.3.1 Konstruktion des <i>H. pylori</i> -Stammes G27/P <sub>hp0166</sub> -0166-O .....  | 108 |
| 6.3.2 Inaktivierung des Gens <i>arsR</i> ( <i>hp0166</i> ) in dem <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>hp0166</sub> -0166-O .....   | 109 |
| 6.3.3 Analyse der Expression von ArsR-O (HP0166-O) in dem <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>hp0166</sub> -0166-O mittels Western-Blot-Analyse .....  | 110 |
| 7. Versuche zur Komplementation von HP1043, HP1021 und ArsR durch die orthologen Response-Regulatoren aus <i>C. jejuni</i> und <i>W. succinogenes</i> .....   | 110 |
| 7.1 Komplementationsexperimente mit den zu HP1043 orthologen Response-Regulatoren CJ0355 und WS0306 .....   | 111 |
| 7.1.1 Konstruktion der <i>H. pylori</i> -Stämme G27/P <sub>hp1043</sub> -cj0355 und G27/P <sub>hp1043</sub> -ws0306 .....   | 112 |
| 7.1.2 Deletion des Gens <i>hp1043</i> in den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/P <sub>hp1043</sub> -cj0355 und G27/P <sub>hp1043</sub> -ws0306 .....  | 113 |



|  |            |
|--|------------|
| 7.1.3 Analyse der Transkription von <i>ws0306</i> und <i>cj0355</i> ausgehend von P <sub>hp1043</sub> in den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/P <sub>hp1043</sub> - <i>ws0306</i> und G27/P <sub>hp1043</sub> - <i>cj0355</i> ..... | 113        |
| 7.2 Komplementationsexperimente mit den zu HP1021 orthologen Response-Regulatoren CJ1608 und WS1939 .....  | 115        |
| 7.2.1 Konstruktion der <i>H. pylori</i> -Stämme G27/P <sub>hp1018</sub> - <i>cj1608</i> und G27/P <sub>hp1018</sub> - <i>ws1939</i> .....  | 116        |
| 7.2.2 Deletion des Gens <i>hp1021</i> in den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/P <sub>hp1018</sub> - <i>cj1608</i> und G27/P <sub>hp1018</sub> - <i>ws1939</i> .....   | 118        |
| 7.2.3 Analyse der Transkription von <i>cj1608</i> und <i>ws1939</i> ausgehend von P <sub>hp1018</sub> in den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/P <sub>hp1018</sub> - <i>cj1608</i> und G27/P <sub>hp1018</sub> - <i>ws1939</i> ..... | 118        |
| 7.3 Komplementationsexperimente mit dem zu ArsR (HP0166) orthologen Response-Regulator WS1817 .....  | 119        |
| 7.3.1 Konstruktion von <i>H. pylori</i> G27/P <sub>hp0166</sub> - <i>ws1817</i> .....  | 120        |
| 7.3.2 Inaktivierung des Gens <i>arsR</i> ( <i>hp0166</i> ) in <i>H. pylori</i> G27/P <sub>hp0166</sub> - <i>ws1817</i> .....   | 121        |
| 7.3.3 Analyse der Transkription von <i>ws1817</i> ausgehend von P <sub>hp0166</sub> in dem <i>H. pylori</i> -Stamm G27-P <sub>hp0166</sub> - <i>ws1817</i> .....   | 121        |
| 8. Inaktivierung der Response-Regulatorgene <i>cj0355</i> und <i>cj1608</i> von <i>C. jejuni</i> 4344 .....  | 122        |
| 8.1 Konstruktion der „knock-out“-Plasmide pSL- <i>cj0355</i> ::kan und pSL- <i>cj1608</i> ::kan ..   | 122        |
| 8.2 Inaktivierung der Gene <i>cj0355</i> und <i>cj1608</i> in <i>C. jejuni</i> 4344 .....  | 123        |
| 9. Konstruktion von <i>H. pylori</i> -Stämme zur Identifizierung möglicher Targetgene der Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 durch Transkriptom- und Proteomanalysen. ....   | 124        |
| 9.1 Überexpression des Response-Regulatorgens <i>hp1043</i> .....  | 125        |
| 9.1.1 Konstruktion der <i>H. pylori</i> -Stämme G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Kan und G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Cm .....   | 125        |
| 9.1.2 Analyse der Transkription des Response-Regulatorgens <i>hp1043</i> unter der Kontrolle des P <sub>cagA</sub> -Promotors in <i>H. pylori</i> G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Kan .....  | 126        |
| 9.1.3 Analyse der Translation von HP1043 in dem rekombinanten <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Kan .....  | 127        |
| 9.1.4 Inaktivierung des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>hp1043</i> in <i>H. pylori</i> G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Cm .....  | 128        |
| 9.2 Überexpression von <i>cj0355</i> im <i>H. pylori</i> -Stamm G27 .....  | 128        |
| 9.2.1 Konstruktion des Plasmids pSL-cagACD-P <sub>cagA2</sub> - <i>cj0355</i> -Cm und Integration der P <sub>cagA2</sub> / <i>cj0355</i> -Fusion in das Chromosom von <i>H. pylori</i> G27 .....                                 | 129        |
| 9.2.2 Analyse der Transkription des Response-Regulatorgens <i>cj0355</i> unter der Kontrolle des P <sub>cagA2</sub> -Promotors in <i>H. pylori</i> G27-P <sub>cagA2</sub> - <i>cj0355</i> .....                                  | 130        |
| 9.2.3 Analyse der Translation des Response-Regulatorgens <i>cj0355</i> in dem rekombinanten <i>H. pylori</i> -Stamm G27/P <sub>cagA2</sub> - <i>cj0355</i> .....   | 131        |
| 9.2.4 Inaktivierung des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>hp1043</i> in <i>H. pylori</i> G27/P <sub>cagA2</sub> - <i>cj0355</i> .....  | 132        |
| 9.3 Überexpression des Response-Regulatorgens <i>hp1021</i> .....  | 133        |
| 9.3.1 Konstruktion der Plasmide pSL-cagACD-P <sub>cagA</sub> -1021-Cm und pSL-cagACD-P <sub>cagA</sub> -1021-Kan und Integration der P <sub>cagA</sub> / <i>hp1021</i> -Fusion in das Chromosom von <i>H. pylori</i> G27 .....   | 133        |
| 9.3.2 Analyse der Transkription des Response-Regulatorgens <i>hp1021</i> unter der Kontrolle des P <sub>cagA</sub> -Promotors in <i>H. pylori</i> G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Kan .....  | 134        |
| 9.3.3 Analyse der Translation des Response-Regulators HP1021 in den rekombinanten <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Cm, G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Kan und G27/P <sub>cagA</sub> -1021-CmΔ .....            | 135        |
| 9.3.4 Inaktivierung des wildtypischen Response-Regulatorgens <i>hp1021</i> in <i>H. pylori</i> G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Cm .....  | 135        |
| 9.3.5 Vergleichende Proteomanalyse mit den <i>H. pylori</i> -Stämmen G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Kan und 26695 1021Δ und den entsprechenden WT-Stämmen G27 und 26695 .....   | 136        |
| <b>F. Diskussion .....</b>   | <b>140</b> |
| <b>G. Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>160</b> |

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| <b>H. Anhang .....</b>         | <b>179</b> |
| 1. Abkürzungsverzeichnis ..... | 179        |
| 2. Curriculum vitae .....      | 182        |
| 3. Publikationsliste .....     | 183        |
| 3.1 Originalarbeiten .....     | 183        |
| 3.2 Posterpräsentationen ..... | 183        |
| 3.3 Vorträge .....             | 183        |

## A. Summary

Bacteria need to react instantaneously on changes in their environment. For the sensing of environmental changes many different signaltransduction-systems have been evolved and the most widespread and well-characterised mechanism for signal transduction among the bacteria are the so called two-component systems.

The genome of *Helicobacter pylori* encodes only a few proteins which are part of a two-component system. In addition to the chemotaxis-system there are just three histidine kinases, ArsS (HP0165), CrdS (HP1364) and HP0244, and five response regulators HP1021, HP1043, ArsR (HP0166), CrdR (HP1365) and HP0703, which are probably involved in transcriptional regulation (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Interestingly two of the response regulators, HP1043 and ArsR (HP0166) proved to be essential for the survival of *H. pylori*, while the response regulator HP1021 has a distinct influence on the cell-growth, as indicated by a severe growth defect when *hp1021* is deleted (Beier & Frank, 2000; McDaniel *et al.*, 2001; Schär, 2001).

Under standard growth-conditions, the deletion of *arsS* (*hp0165*), encoding the cognate histidine kinase of ArsR (HP0166), has no effect on the cell-growth of *H. pylori*. This observation argues for the hypothesis that the response regulator ArsR (HP0166) controls the transcription of two different sets of target-genes. Upon acid-induced phosphorylation via ArsS (HP0165), the response regulator ArsR (HP0166) regulates the transcription of genes which are involved in acid resistance mechanisms, while in an unphosphorylated state ArsR (HP0166) controls other target genes, of which at least one is essential for cell-growth. The regulon controlled by ArsR~P (HP0166~P) has been extensively studied (Dietz, 2002; Forsyth *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2004; Pflock *et al.*, 2006; Pflock *et al.*, 2005), while target genes of the unphosphorylated response regulator are so far unknown. In this work this hypothesis could be proven. It was shown that a derivative of ArsR (HP0166), with a mutation of the phosphorylation site D52 to N52, is able to substitute the wildtype protein functionally with respect to cell-growth.

In the case of the response regulators HP1021 and HP1043 no cognate histidine kinases have been identified so far (Beier & Frank, 2000). Interestingly the receiver domains of the response regulators differ from the consensus sequence at highly conserved aminoacid residues. To investigate the importance of the atypical primary sequences for the function of HP1021 and HP1043, mutated *H. pylori* strains expressing exclusively derivatives of HP1021 or HP1043 with receiver sequences matching the consensus sequence were constructed. As these mutants did not show differences in cell-growth in comparison to the wildtype strain, it was proven that the atypical receiver sequences are not crucial for cell growth.

Furthermore, indications could be found that HP1021 and HP1043 presumably differ from the common two component paradigm regarding their activation. Derivatives of HP1021 and HP1043 with mutations in their putative phosphorylation sites could functionally complement their wildtype counterparts with regards to cell growth. Therefore the phosphorylation of the receiver domain of these response regulators is not a pre-requisite for normal cell growth of *H. pylori*. In line with this hypothesis it could be demonstrated that there is no *in vitro* phosphorylation of the receiver domain of HP1021 and HP1043 with radioactive labelled acetylphosphate and that a *H. pylori* strain which a deletion of the genes *pta* and *ackA*, encoding proteins involved in the synthesis of acetylphosphate in the cell, showed a normal growth-phenotype. Moreover, when the protein HP1021, which was isolated by two-dimensional gelelectrophoreses, was analysed by mass spectrometry no evidence of a serine phosphorylation was obtained. Additionally the observation that deletion of *hp1043* can be complemented by the *C. jejuni* ortholog *cj0355* encoding a response regulator protein with an asparagine residue replacing the consensus phosphate-accepting aspartic acid residue supports this hypothesis. Therefore it is questionable whether *in vivo* there is a phosphorylation which is functional relevant at all at the receiver domain.

The mechanisms by which the activity of the Response-Regulators HP1021 and HP1043 is modulated still remain unclear. Here it could be demonstrated that strict transcriptional control of its expression is not relevant for the cell-growth associated function of HP1021. In contrast there are hints that the expression of HP1043 is controlled on a post-transcriptional and/or a post-translational level.

Up to now no target genes of HP1021 were known. Using comparative two-dimensional gelelectrophoresis some potential target genes have been identified, among others HP0695, FadA and the Catalase.

## A. Zusammenfassung

Bakterien müssen ständig in der Lage sein auf Veränderungen in ihrer Umwelt reagieren zu können. Zur Wahrnehmung dieser Veränderungen haben sich unterschiedliche Signaltransduktionssysteme entwickelt. Ein im Reich der Bacteria weit verbreiteter und gut charakterisierter Mechanismus zur Signaltransduktion sind die so genannten Zwei-Komponentensysteme.

Im Genom von *Helicobacter pylori* konnten anhand von Sequenzhomologien nur wenige Bestandteile von Zwei-Komponentensystemen identifiziert werden. Dazu zählen neben dem Chemotaxis-System lediglich drei Histidin-Kinasen, ArsS (HP0165), CrdS (HP1364) und HP0244, und fünf Response-Regulatoren HP1021, HP1043, ArsR (HP0166), CrdR (HP1365) and HP0703, die vermutlich Transkriptions-regulatorische Funktionen haben (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Erstaunlicherweise erwiesen sich zwei der Response-Regulatoren, HP1043 und ArsR (HP0166) als essentiell für das Überleben von *H. pylori*, während ein weiterer, HP1021, einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum hat, da ein ausgeprägter Wachstums-Defekt zu erkennen ist, wenn das entsprechende Gen *hp1021* deletiert wird (Beier & Frank, 2000; McDaniel *et al.*, 2001; Schär, 2001; Schär *et al.*, 2005).

Eine Deletion von *arsS*, dem Gen der zugehörigen Histidin-Kinase von ArsR (HP0166), hat unter Standard-Wachstumsbedingungen keine Auswirkung auf das Zellwachstum von *H. pylori*. Diese Beobachtung spricht für die Hypothese, dass der Response-Regulator ArsR (HP0166) die Transkription zweier unterschiedlicher Gruppen von Zielgenen kontrolliert. Demzufolge reguliert der Response-Regulator ArsR (HP0166) nach Säure-induzierter Phosphorylierung durch ArsS (HP0165) die Transkription von Genen, die zur Säureresistenz beitragen, während ArsR (HP0166) im nicht-phosphorylierten Zustand die Transkription von weiteren Zielgenen kontrolliert, von denen mindestens eines für das Zellwachstum essentiell sein sollte. Das durch ArsR~P (HP0166~P) kontrollierte Regulon konnte bereits weitgehend charakterisiert werden (Dietz, 2002; Forsyth *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2004; Pflock *et al.*, 2006; Pflock *et al.*, 2005), allerdings sind die Zielgene des unphosphorylierten Regulators bislang unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte die zuvor beschriebene Hypothese bestätigt werden, da gezeigt wurde, dass ein Derivat von ArsR (HP0166), mit einer Mutation der Phosphorylierungsstelle D52 zu N52, das wildtypische Protein bezüglich des Zellwachstums unter Standardbedingungen funktionell ersetzen kann.

Für die Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 konnte bislang keine zugehörige Histidin-Kinase identifiziert werden und interessanterweise findet man in der Receiver-Domäne dieser Response-Regulatoren atypische Abweichungen von der Konsensus-Sequenz. Um die Bedeutung dieser atypischen Primärsequenzen für die Funktion dieser

Response-Regulatoren zu untersuchen wurden mutierte *H. pylori*-Stämme konstruiert, die ausschließlich Derivate von HP1021 bzw. HP1043 exprimieren, die in ihrer Receiver-Sequenz der Konsensus-Sequenz entsprachen. Da diese Mutanten sich bezüglich ihres Zellwachstums nicht vom Wildtyp unterscheiden, konnte nachgewiesen werden, dass die atypischen Receiver-Sequenzen der beiden Response-Regulatoren nicht entscheidend für die Funktionen der Response-Regulatoren sind.

Weiterhin konnten Indizien dafür gesammelt werden, dass HP1021 und HP1043 hinsichtlich ihrer Aktivierung vermutlich vom üblichen Zwei-Komponentenparadigma abweichen. Derivate von HP1021 und HP1043 mit Mutationen ihrer putativen atypischen Phosphorylierungsstelle sind in der Lage ihre wildtypischen Pendanten hinsichtlich der bekannten Phänotypen funktionell zu ersetzen. Somit ist eine Phosphorylierung der Receiver-Domäne dieser Response-Regulatoren keine Voraussetzung für ein normales Zellwachstum von *H. pylori*. Diese Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass ein Ortholog von HP1043 aus *C. jejuni* CJ0355, das natürlicherweise an der potentiellen Phosphorylierungsstelle einen nicht phosphorylierbaren Aminosäurerest trägt, HP1043 in seiner Funktion ersetzen kann. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* keine Phosphorylierung durch radioaktiv markiertes Acetylphosphat stattfindet und dass ein *H. pylori*-Stamm mit einer Deletion der Gene *pta* und *ackA*, welche Proteine kodieren, die bei der Synthese von zellulärem Acetylphosphat benötigt werden, einen normalen Wachstums-Phänotyp zeigt. Zusätzlich konnten in einer massenspektrometrischen Analyse des Proteins HP1021, welches nach Zweidimensionaler Gelelektrophorese von Gesamtzellproteinlysaten aus *H. pylori* isoliert wurde, keine Hinweise auf eine Serinphosphorylierung entdeckt werden. Es ist daher sehr fraglich ob *in vivo* eine funktionell relevante Phosphorylierung stattfindet.

Die Mechanismen zur Modulation der Regulator-Aktivität von HP1043 und HP1021 bleiben unklar. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass eine strikte Transkriptionskontrolle nicht für die Zellwachstums-assoziierten Funktionen von HP1021 von Bedeutung ist. Dagegen wurden Hinweise darauf erzielt, dass die Expression von HP1043 auf einem posttranskriptionellen und/oder auf einem posttranslationellen Level reguliert wird.

Es waren bislang keine Zielgene von HP1021 bekannt. Durch vergleichende Zweidimensionale Gelelektrophorese der *H. pylori* Stämme 26695 und 26695 1021 $\Delta$  konnten nun einige potentielle Zielgene des Response-Regulators HP1021, unter anderen HP0695, FadA und die Katalase, identifiziert werden.

## B. Einleitung

### 1. *Helicobacter pylori*

#### 1.1 Allgemeine Charakterisierung von *H. pylori*

Der menschliche Magen galt lange Zeit als steril und als Habitat für Bakterien ungeeignet, obwohl schon im 19. Jahrhundert spiralförmige Bakterien im menschlichen Magen beobachtet wurden. Mit folgenden Worten beschrieb 1882 der italienische Pathologe Giulio Bizzozero zum ersten Mal das Vorkommen von *Helicobacter* Spezies (siehe Abb. 1) im Magen von Säugetieren (Bizzozero, 1893):

„..Ancora più curiosi sono degli spirilli che ho trovato costanti nello stomaco del cane e che, oltre all'essere numerosi nello strato di muco che riveste la mucosa, penetrano nel lume delle ghiandole tanto del piloro quanto del fondo ed arrivano talora fino al fondo del cieco terminale..“

„..Noch merkwürdiger sind Spirillen, die ich konstant im Magen des Hundes fand und die nicht nur zahlreich in der die Schleimhaut bedeckenden Schleimschicht vorkommen, sondern auch in das Lumen der Drüsen sowohl des Pylorus als des Magengrundes dringen und zuweilen bis zum blinden Ende gelangen..“

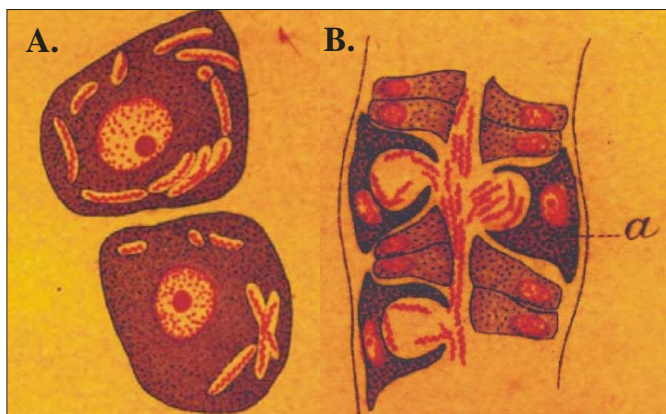


Abb. 1: Gewebeschnitte aus dem Magen des Hundes (nach Bizzozero, 1893) A. Zwei Belegzellen eines Drüsenhalses des Magen-fundus. Im Proteoplasma finden sich mehrere Spirillen. B. Ausschnitt aus demselben Drüsenhals. Im Lumen befinden sich zahlreiche Spirillen, die auch in weite, in den Belegzellen (a) ausgegrabene Hohlräume dringen. (Ehrlich'sche Fuchsinlösung, Alkohol, Kanadabalsam).

Heutzutage werden diese Organismen als *H. canis*, *H. felis* und/oder *H. heilmannii* klassifiziert. Bizzozeros Arbeit wurde durch Salomon weitergeführt und dieser beobachtete die Infektion von Mäusen mit *H. felis* und beschrieb detailliert die flagellare Struktur der Bakterien sowie ihre Motilität im tierischen Wirt. Im 20. Jahrhundert beobachteten einige Anatomen und Pathologen von Zeit zu Zeit spiralförmige Organismen in der menschlichen Magenmukosa in Verbindung mit Karzinomen. Zu dieser Zeit galt allerdings noch die generelle Meinung, dass die saure Umgebung im Magen mit einem pH-Wert bis zu 1,5 kein bakterielles Überleben zulässt und somit traten diese Beobachtungen zunächst in den Hintergrund (reviewed in Marshall, 2001).

Die australischen Mediziner Robin Warren und Barry Marshall entdeckten ähnliche spiralförmige Mikroorganismen im Jahre 1982 wieder. Sie waren in der Lage diese schwer kultivierbaren Bakterien aus Patienten mit chronischer oberflächlicher und chronischer aktiver Gastritis zu isolieren. Barry Marshall infizierte sich in einem Selbstversuch mit einer Reinkultur des isolierten Bakteriums und zeigte nach kurzer Zeit Symptome einer Gastritis. Außerdem konnte der Mikroorganismus aus einer Biopsieprobe, die Barry Marshall 10 Tage nach der Infektion entnommen wurde, reisoliert werden (Marshall & Warren, 1984). Somit konnten die Wissenschaftler die Koch'schen Postulate erfüllen, die den optischen Keimnachweis bei Kranken (erstes Postulat), die Keimanzucht in Kultur außerhalb von Wirtsorganismen (zweites Postulat) und den Pathogenitätsnachweis (drittes Postulat) fordern. Das schwedische Karolinska-Institut erkannte den beiden Forschern für ihre "bemerkenswerte und unerwartete" Entdeckung den Nobelpreis für Physiologie und Medizin 2005 zu.

Das isolierte Magenbakterium wurde taxonomisch zunächst dem Genus *Campylobacter* zugeordnet und *C. pyloridis* genannt. Kurze Zeit später wurde aufgrund von 16S-rRNA (ribosomal ribonucleic acid) Analysen das neue, eigenständige Genus *Helicobacter* postuliert (Goodwin *et al.*, 1989). Zu diesem Genus zählen neben dem vorher beschriebenen humanpathogenen *H. pylori* auch einige tierpathogene Keime, wie *H. felis*, *H. mustelae*, *H. bizzozeronii* und *H. bilis* (Fox *et al.*, 1994). Man unterscheidet hierbei gastrische und enterohepatische *Helicobacter*-Spezies, die den Intestinaltrakt und das hepatobiliäre System besiedeln (Solnick & Schauer, 2001).

*H. pylori* (siehe Abb. 2) ist ein Gram-negatives, mikroaerophiles, bewegliches Bakterium, dessen Name (helicos, griechisch: die Windung) von seiner spiralförmigen Morphologie mit 1-3 Windungen, abgeleitet wurde.



Abb. 2: Elektronenmikroskopie von wild-typischen *H. pylori* G27, negativ gefärbt mit Kalium Phosphorylwolframsäure (pH 7,0)

(Mit freundlicher Genehmigung Dietz, 2002)

Phylogenetisch wird *H. pylori*, ebenso wie oben genannte weitere *Helicobacter* Spezies und die beiden nah verwandten Arten *Wolinella spp.* und *Campylobacter spp.*, der  $\epsilon$ -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet (Goodwin *et al.*, 1989; Madigan *et al.*, 1997). Das Bakterium hat eine Länge von 2,5 bis 4  $\mu\text{m}$  und einen Zelldurchmesser von 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$ . Es



ist monopolar polytrich mit zwei bis acht Geißeln bestückt (siehe Abb. 2), die essentiell für die Beweglichkeit des Bakteriums sind (Geis *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1995).

Während einer Infektion weisen die meisten in der Wirtsmukosa vorhandenen Bakterien eine spiralförmige Form auf. *In vitro* konnten auch kokkoide Formen beobachtet werden (Chan *et al.*, 1994), die meist in älteren Kulturen oder unter schlechten Kulturbedingungen auftreten. Ihr Stoffwechsel ist zwar noch aktiv, aber sie lassen sich *in vitro* nicht mehr rekultivieren (Bode *et al.*, 1993). Die Meinungen über die Rolle dieser kokkoiden Formen für die Pathogenese sind sehr kontrovers. Es wird diskutiert, dass es sich um lebensfähige und infektiöse Dauerformen von *H. pylori* handeln könnte. Studien mit Tiermodellen resultierten in unterschiedlichen Ergebnissen. *In vitro* nicht kultivierbare kokkoide Bakterien scheinen in Mäusen infektiös zu sein, in Ferkeln hingegen nicht (Cellini, 1996; Cellini *et al.*, 1994; Eaton *et al.*, 1995). Andere Studien interpretieren die Beobachtung von einem nicht nachweisbaren Membranpotential, einem veränderten Proteinmuster und Abbauprozessen der ribosomalen RNA bei den kokkoiden Formen als einen Übergang zum Zelltod (Kusters *et al.*, 1997; Monstein & Jonasson, 2001).

## 1.2 Pathogenität, Epidemiologie und Transmission von *H. pylori*

*H. pylori* ist ein obligat humanpathogener Keim, der in der gastrischen Mukosa des menschlichen Magens vorkommt. Der menschliche Magen ist in die vier Regionen Kardial, Fundus, Korpus und Antrum (siehe Abb. 3) unterteilt.

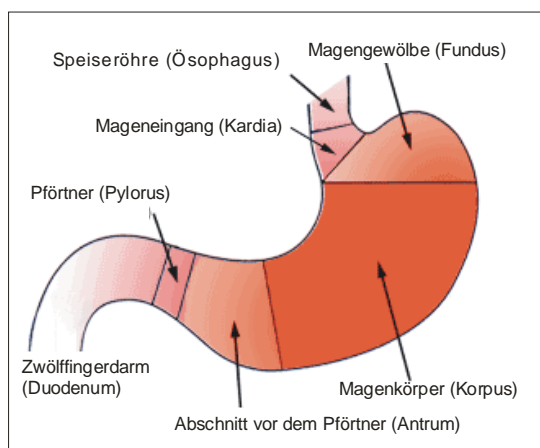


Abb. 3: schematischer Aufbau des menschlichen Magens, Unterteilung in die vier Hauptregionen: Kardial, Fundus, Korpus und Antrum (modifiziert, <http://www.sanderbusch.de>)

Man findet *H. pylori* bevorzugt in der antralen Region des Magens in der Nähe des Pylorus (Pförtner). Die Säuresekretion findet in der Region des Fundus, genauer gesagt in den Drüsen des Fundus statt. Diese Drüsen enthalten stark spezialisierte Zellen, die Parietalzellen (Belegzellen), welche die gastrische  $H^+$ -,  $K^+$ -ATPase zur Säuresekretion exprimieren (Berglindh *et al.*, 1979).

Eine *H. pylori*-Infektion führt nach einer kurzen akuten Phase meist zu einer chronischen Gastritis. Diese verläuft in 80-90 % der Fälle asymptomatisch (Suerbaum & Michetti, 2002). Bei den übrigen 10-20 % kann es im Verlauf der über Monate oder Jahre persistierenden Infektion zu schweren gastrointestinalen Krankheiten wie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren, Adenokarzinomen des Magens oder MALT-(mucosa associated lymphoid tissue)-Lymphomen kommen (Dunn *et al.*, 1997; Eslick *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 1994; Parsonnet *et al.*, 1991; Uemura *et al.*, 2001). Bakterielle Faktoren und verschiedene Wirtsfaktoren beeinflussen den klinischen Verlauf einer schweren *H. pylori*-Infektion, wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt. (Blaser & Berg, 2001; Nogueira *et al.*, 2001).

Meist ist die Infektion mit *H. pylori* im Bereich des Antrums lokalisiert. Dies scheint einherzugehen mit einer erhöhten Säureproduktion im Magen und zieht oft den häufigsten Typ des symptomatischen klinischen Verlaufs nach sich, den Ulcus duodeni (Zwölffingerdarm-Geschwür). Findet die Gastritis hingegen dominierend im Korpus statt, führt dies eher zu Ulcera ventriculi (Magengeschwür) und in einigen Fällen zu einem Magenkarzinom. Im Zuge der körpereigenen Immunantwort kann es, ausgelöst durch *H. pylori*, zur Einwanderung von B-Lymphozyten in die Mukosa kommen, wodurch eine Ansammlung von lymphatischem Gewebe in der Magenschleimhaut (MALT) und somit die Entwicklung bösartiger MALT-Lymphome auftreten kann (Suerbaum & Michetti, 2002). Daher wurde *H. pylori* bereits 1994 von der WHO (Weltgesundheitsbehörde) als Kanzerogen erster Klasse eingestuft (Dixon & Ectors, 1995).

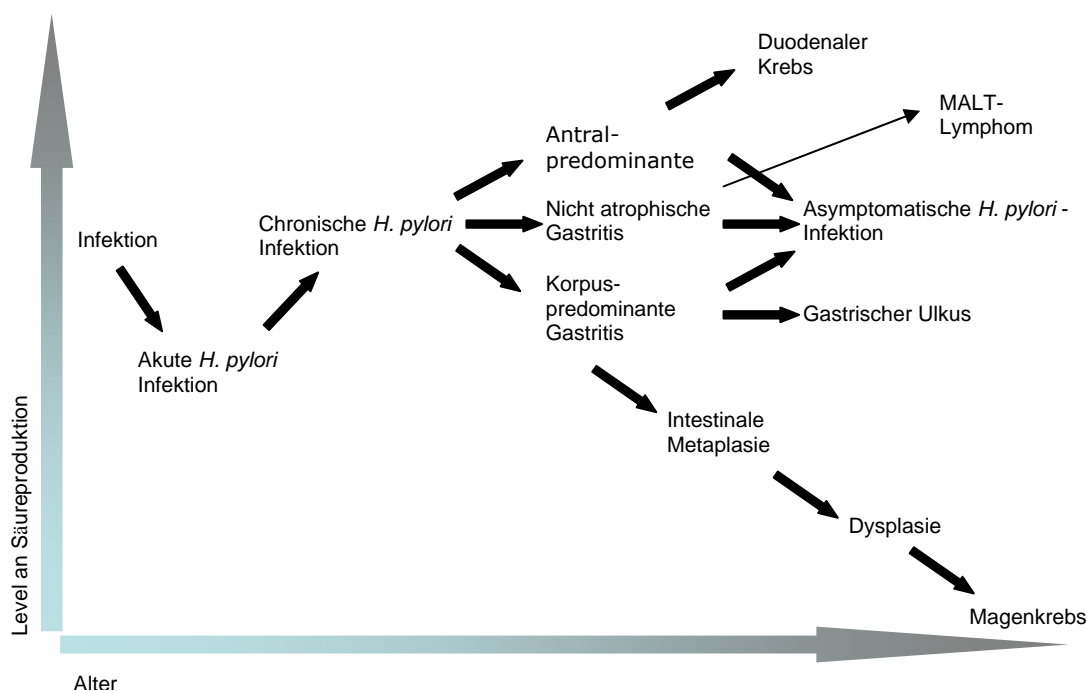


Abb. 4: Verlauf einer *H. pylori*-Infektion, Erklärungen im Text (modifiziert, Suerbaum & Michetti 2002).

Die Standardprozedur zur Eradikation von *H. pylori* ist eine „triple“-Therapie, die einen Protonenpumpen-Inhibitor und zwei Antibiotika beinhaltet, meist entweder Amoxicillin und Metronidazol oder Amoxicillin und Clarithromycin. Problematisch hierbei ist die Zunahme der Resistenzen, insbesondere für Metronidazol (Megraud, 1998, 2003).

*H. pylori* ist ein sehr weit verbreitetes Bakterium. Die Infektion mit *H. pylori* gilt mittlerweile als die zweithäufigste bakterielle Infektion, nach der Karies verursachenden Infektion mit *Streptococcus mutans*. Es wird geschätzt, dass ca. 50 % der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist, wobei sich sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen Ländern große Unterschiede hinsichtlich der Infektionsrate zeigen. Diese ist in den Entwicklungsländern mit 70-90 % sehr hoch, während in Industrieländern die Prävalenz einer Infektion mit 20-50 % deutlich geringer ist (Dunn *et al.*, 1997; Megraud, 1995a). Eine Infektion mit *H. pylori* wird meist im Kindesalter erworben, etwa um das dritte Lebensjahr (Malaty *et al.*, 2002a), und *H. pylori* kann ohne eine Behandlung ein Leben lang im Magenmucus des Wirtes persistieren (Cullen *et al.*, 1993). Es wird spekuliert, ob die höhere Infektionsrate im Kindesalter mit dem höheren pH-Wert des Magenlumens von Kindern korreliert. Die durch den sauren pH-Wert geschaffene natürliche Barrierefunktion ist hier nicht so stark ausgeprägt (Malaty *et al.*, 2002a; Malaty *et al.*, 2002b). Außerdem spielt der sozioökonomische Status während der Kindheit eine große Rolle für den Erwerb einer *H. pylori* Infektion. Bei Untersuchungen in verschiedenen sozialen Schichten in den Vereinigten Staaten konnte festgestellt werden, dass die Häufigkeit der *H. pylori*-Infektion umgekehrt proportional zum Sozialstatus ist. Die Infektionsrate der niedrigsten sozialen Schicht lag bei 85 %, während nur etwa 11 % der Angehörigen aus der höchsten sozialen Schicht infiziert waren (Malaty & Graham, 1994). Untersuchungen an eineiigen Zwillingen ergaben, dass auch die genetische Prädisposition eine Rolle bei der Infektion spielt (Malaty *et al.*, 1994).

Der genaue Übertragungsweg von *H. pylori* ist bislang noch nicht vollständig geklärt, wobei verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Die geringste Bedeutung kommt dabei der iatrogenen Übertragung zu. Hierbei erfolgt die Transmission durch schlecht desinfizierte endoskopische Instrumente im medizinischen Bereich (Akamatsu *et al.*, 1996). Eine größere Bedeutung kommt der oral-oralen und der oral-fäkalen Transmission zu (Megraud, 1995b). Fäkal kontaminiertes Wasser ist ebenfalls eine mögliche Infektionsquelle, da gezeigt wurde, dass die Herkunft des Wassers mit dem Auftreten einer *H. pylori*-Infektion korreliert. Bislang konnte der Organismus jedoch nicht aus Wasser isoliert werden, obwohl in mehreren Studien beschrieben wurde, dass *H. pylori*-spezifische DNA in unterschiedlichen Wasserquellen nachweisbar war (Hulten *et al.*, 1998; Hulten *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1991; Nurgalieva *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 1999).

Der Nachweis von *H. pylori* bei infizierten Personen erfolgt über unterschiedliche invasive und nicht-invasive Tests. Bei den invasiven Tests wird endoskopisch entnommenes Gewebe mittels Urease-Test, Histologie und/oder Kultivierung getestet. Zu den nicht-invasiven Nachweis-Methoden zählen die Serologie, der  $C^{13}/C^{14}$ -Atemtest, der fäkale Antigentest und der Urin-Antikörpertest (Marshall, 2003).

### 1.3 Genetische Eigenschaften von *H. pylori*

Ein Vorteil für die wissenschaftlichen Arbeiten mit *H. pylori* stellt die Verfügbarkeit der kompletten Genomsequenzen zweier unterschiedlicher Patientenisolate, *H. pylori* 26695 und *H. pylori* J99, dar. Es wurde eine durchschnittliche Genomgröße der beiden Genome von ca. 1,7 Mb ermittelt, was etwa einem Drittel des Genoms von *E. coli* entspricht. Beide Genome weisen einen G (Guanidin)+C (Cytosin)-Gehalt von ca. 39 % auf. Es wurden 1496 putative ORFs (open reading frames) im Stamm *H. pylori* J99 identifiziert, im Stamm *H. pylori* 26695 sind es 1590. Eine Microarray-Analyse von 15 unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen ergab, dass das funktionale „core“-Genom 1281 Gene umfasst, während 362 (das entspricht 22 %) bei mindestens einem Stamm nicht vorhanden waren (Salama *et al.*, 2000). Jedes Isolat besitzt ca. 6 % stammspezifische Gene. Einen Großteil (48 %) der stammspezifischen Gene findet man in hoch variablen Regionen des Genoms, den Plastizitätszonen. Der niedrigere G+C-Gehalt von 35 % dieser Regionen weist darauf hin, dass die dort kodierten Gene vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben wurden. Eine weitere Region mit sehr hoher Plastizität ist die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI), die ebenfalls im G+C-Gehalt vom restlichen Genom abweicht (Israel *et al.*, 2001) und in TypII-Stämmen fehlt (Xiang *et al.*, 1995). Zudem wurde gezeigt, dass eine Plastizitätszone von *H. pylori* 26695 Gensequenzen enthält, die als Teil des Plasmids pHPM186 identifiziert wurden (Burnham *et al.*, 1998).

Bei nur etwa 85 % der homologen Gene konnte flankierend eine homologe Sequenz identifiziert werden (Alm *et al.*, 1999; Beji *et al.*, 1988; Tomb *et al.*, 1997) was zeigt, dass zwischen den Isolaten ein hohes Maß an genetischer Diversität besteht (Akopyants *et al.*, 1992). Es konnte bislang keine Bakterienspezies identifiziert werden, deren Isolate eine höhere genetische Diversität aufweisen (Suerbaum, 2000). Die durchschnittliche Nukleotid-Identität der orthologen Gene der beiden sequenzierten Isolate liegt bei 92,6 % (Doig *et al.*, 1999). Bei den Sequenz-Abweichungen handelt es sich meist um „stille“ Mutationen, welche die dritte Base der Kodons (Wobble-Position) betreffen. Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der beiden Isolate lieferte eine durchschnittliche Identität von 94 % (Jiang *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1992).

Zu den Ursachen für die hohe genetische Diversität zählen unter anderen erhöhte Mutationshäufigkeiten, unvollständige DNA (desoxyribonucleinacid)-Reparatursysteme und eine extreme Rekombinationshäufigkeit (Marshall *et al.*, 1998; Suerbaum *et al.*, 1998). Die genetische Variabilität wird zusätzlich durch die Aufnahme und Integration von Fremd-DNA (horizontaler Gentransfer) vermittelt. Der horizontale Gentransfer wird durch die natürliche

Kompetenz von *H. pylori* ermöglicht und ist vor allem von Bedeutung, wenn ein Patient mit unterschiedlichen Isolaten von *H. pylori* infiziert ist (Marshall *et al.*, 1998; Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990).

Weiterhin wurden repetitive DNA-Elemente in der chromosomalen DNA beobachtet (Go *et al.*, 1996) und zwei unterschiedliche genomische Insertionselemente (IS-Elemente) identifiziert. Im Stamm 26695 findet man fünf vollständige Kopien von IS605 und zwei Kopien von IS606 (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Diese Elemente sind für Rekombinationsereignisse und somit für chromosomale Rearrangements mitverantwortlich.

#### **1.4 Virulenzfaktoren von *H. pylori***

Für eine erfolgreiche *H. pylori*-Infektion sind eine Reihe von Virulenzfaktoren von großer Bedeutung. Bakterielle Virulenzfaktoren sind einzelne Faktoren, die essentiell für die Wirtsschädigung und das Überleben im Wirt sind. Der Verlust dieser führt zu einer signifikanten Herabsetzung der Pathogenität des Bakteriums (Salyers & Whitt, 1994).

Für eine effektive Kolonisierung des Magens, muss *H. pylori* kurze Zeit im extrem sauren Milieu des Magenlumens überleben können. *H. pylori* vermag zwar kurzzeitig die Einwirkung eines niedrigen pH-Wertes in Anwesenheit von Harnstoff zu tolerieren, der optimale pH-Wert für eine Vermehrung liegt aber zwischen pH 4 und pH 8. Das Enzym Urease ist essentiell für das Überleben von gastrischen *Helicobacter*-Spezies bei niedrigem pH-Wert (Stingl *et al.*, 2002b; Tsuda *et al.*, 1994a), da Urease-negative Mutanten nicht in der Lage sind gnotobiotische Ferkel, Nacktmäuse oder Frettchen zu kolonisieren (Andrutis *et al.*, 1995; Eaton *et al.*, 1991; Tsuda *et al.*, 1994a; Tsuda *et al.*, 1994b). Bereits unter neutralen Bedingungen bildet *H. pylori* eine große Menge an Urease, hier macht das Protein ungefähr 15 % der zellulären Proteine aus (Mobley *et al.*, 1995). Durch niedrigen pH-Wert wird die Expression der Urease induziert und ihre Aktivität nimmt zu. Die Urease ist ein Nickel-enthaltendes Metalloenzym, das in der Lage ist, die Hydrolyse von Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid zu katalysieren. Der entstandene Ammoniak diffundiert in das Periplasma und wird dort zu Ammonium protoniert. Somit gewährleistet die Urease in Anwesenheit von Harnstoff die Aufrechterhaltung eines konstanten zytoplasmatischen und periplasmatischen pH-Wertes, um den Zusammenbruch des Membranpotentials zu verhindern (Hu & Mobley, 1990; Meyer-Rosberg *et al.*, 1996; Stingl *et al.*, 2002a).

Das funktionelle Holoenzym ist ein 550 kDa großes hexamerer Komplexes Enzym, das aus jeweils sechs Untereinheiten UreA (26,5 kDa) und UreB (60,3 bis 61 kDa), sowie insgesamt zwölf Nickelionen besteht (Cussac *et al.*, 1992; Mobley *et al.*, 1995). Das Urease-Gencluster besteht aus sieben Genen: es beinhaltet die beiden Strukturgene *ureA* und *ureB*, sowie die akzessorischen Gene *ureIEFGH* (Akada *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997). Die Proteine UreEFGH sind am Zusammenbau des Urease-Enzyms und dessen Aktivierung beteiligt. So werden z.B. die beiden akzessorischen Komplexe, UreE/G und UreE/F für den Einbau von

Nickel in das Apoenzym benötigt. Diese Heterodimere binden an UreB um die Nickelinsertion zu ermöglichen (Bauerfeind *et al.*, 1997; Mobley *et al.*, 1995; Voland *et al.*, 2003). Bei UreI handelt es sich um ein integrales Membranprotein der inneren Membran mit sechs Transmembrandomänen, wobei der N-(amino) und der C-(carboxy) Terminus im Periplasma liegen. Es bildet einen pH-abhängigen Membrankanal, über den Harnstoff in die Zelle gelangen kann (Weeks *et al.*, 2000). Der pH-Wert bzw. die Konzentration an vorhandenen Protonen bestimmen die Aktivität des UreI-Kanals (Scott *et al.*, 2000; Weeks & Sachs, 2001). Unter neutralen oder alkalischen Bedingungen ist der UreI-Kanal geschlossen, um eine zusätzliche Alkalisierung des umgebenen Mediums zu verhindern. Kürzlich wurde auch die Bedeutung von UreI für die Kolonisierung eines Wirtes durch *H. pylori* demonstriert, da UreI negative Mutanten nicht in der Lage waren, Mäuse oder Gerbils zu kolonisieren (Mollenhauer-Rektorschek *et al.*, 2002; Skouloubris *et al.*, 1998). Weiterhin konnten für UreI aus *H. pylori* inzwischen einige Homologe identifiziert werden, darunter UreI von *H. hepaticus* (Beckwith *et al.*, 2001) und *Streptococcus salivarius* (Chen *et al.*, 1998). Eine große strukturelle Ähnlichkeit besteht auch zu dem Gen-Produkt von *amiS* aus dem Amidase-Gencluster von *Pseudomonas aeruginosa*, welches allerdings nicht am Transport von Harnstoff, sondern am Transport von Amiden beteiligt ist (Chebrou *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1995). Zudem stimuliert das Enzym die Immunantwort des Wirtes, da es die proinflammatorische Zytokininduktion durch Phagozyten induziert (Tanahashi *et al.*, 2000). Neben der Urease gibt es noch weitere Mechanismen, die zur Säureresistenz von *H. pylori* beitragen. Beispielsweise weisen die meisten Proteine der inneren und äußeren Membran von *H. pylori* im Vergleich mit anderen Bakterien einen höheren isoelektrischen Punkt auf. Dieser hohe isoelektrische Punkt verlangsamt unter sauren Bedingungen den Protonen-Influx über die äußere Membran und erleichtert auf diese Weise das Abpuffern des Periplasmas. Als Beispiel sei die c-Untereinheit der F<sub>0</sub>-Komponente der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase von *H. pylori* genannt, die einen isoelektrischen Punkt von 8,9 im Vergleich zum homologen Protein aus *Escherichia coli*, mit einem isoelektrischen Punkt von 6,3, aufweist (Sachs *et al.*, 2003). Ein weiteres Protein welches eine Rolle bei der Säureresistenz spielt ist der Eisenaufnahme-Regulator Fur, der im Kapitel B 1.5 näher beschrieben wird. Fur hat Einfluss auf die Aktivität der Amidasen AmiE und AmiF (NH<sub>3</sub>-produzierende Enzyme), deren Expression durch einen niedrigen pH-Wert stark induziert wird (Bijlsma *et al.*, 2002; van Vliet *et al.*, 2003). Weiterhin konnte erst vor kurzem gezeigt werden, dass die periplasmatische  $\alpha$ -Carbonatanhydrase ( $\alpha$ -CA) bei der Säureresistenz eine Rolle spielt.  $\alpha$ -CA generiert HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> im Periplasma, um eintretende Säure zu neutralisieren und das Periplasma abzupuffern (Marcus *et al.*, 2005; Stähler *et al.*, 2005).

Eine wichtige Voraussetzung für die Kolonisierung eines Wirtes durch *H. pylori* ist die Motilität des Bakteriums. *H. pylori* ist monopolar polytrich mit zwei bis acht Geißeln bestückt. Durch Rotation der Flagellen gelingt dem Bakterium der Durchtritt durch den

viskosen Mukus. Die Flagellenfilamente sind aus den Flagellinproteinen FlaA und FlaB aufgebaut (Haas *et al.*, 1993; Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993). Wie Studien mit isogenen *H. pylori* Mutanten gezeigt haben, sind beide Flagellinproteine gleichermaßen für eine uneingeschränkte Motilität nötig (Josenhans *et al.*, 1995). Eine Membranhülle (Flagellenhülle), die mit der Zellmembran verbunden ist, und eine ähnliche molekulare Zusammensetzung wie diese aufweist, ummantelt die Flagellen (Geis *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1995). Diese Flagellenhülle schirmt die Flagellen vor der Magensäure ab und verhindert eine Opsonisierung durch Antikörper (Geis *et al.*, 1993; Suerbaum, 1995; Suerbaum & Josenhans, 1999; Suerbaum *et al.*, 1993). Die Flagellen-vermittelte Motilität ist im Tiermodell für die erfolgreiche Kolonisierung essentiell (Eaton *et al.*, 1992).

Einen weiteren essentiellen Faktor für die Kolonisierung eines Wirtes stellt die Kollagenase dar, da Mutanten, bei denen das Gen *hp0169*, welches die Kollagenase codiert, inaktiviert wurde nicht in der Lage waren mongolische Gerbils zu kolonisieren. Der Nutzen dieses Enzyms für das Bakterium ist bislang nicht geklärt. Möglicherweise könnte der Abbau von Kollagen durch dieses sekretierte Protein *H. pylori* als Quelle für die Aufnahme bestimmter Aminosäuren oder kurzer Peptide dienen. Eine weitere Hypothese ist, dass die Kollagenase die dicke viskose Mucinschicht verdaut, um dem Bakterium die Passage zu den Epithelzellen zu erlauben (Covacci & Rappuoli, 2003; Kavermann *et al.*, 2003; Rieder *et al.*, 2005).

Nach der Passage durch den Magenmucus, bindet *H. pylori* spezifisch an die Epithelzellen. Die Bindung an spezifische Wirtszellrezeptoren wird durch Adhäsine vermittelt. Die Adhäsine sind Oberflächenstrukturen, die entweder an Kohlenhydrate, Phospholipide oder Glykoproteine binden (Karlsson, 1998). In histologischen Schnitten infizierter Magenepithelzellen und an *in vitro* infizierten Zelllinien konnte die Adhärenz des Bakteriums und teilweise die Ausbildung von Adhäsionsplattformen („adhesion pedestals“) beobachtet werden (Clyne & Drumm, 1993; Dytoc *et al.*, 1993; Hessey *et al.*, 1990; Noach *et al.*, 1994). Bislang wurden die Proteine BabA2, AlpA, AlpB, HopZ und SabA als Adhäsine von *H. pylori* charakterisiert. Sie gehören zu einer Gruppe von 32 äußeren Membranproteinen von *H. pylori*, die durch vergleichende Genomanalysen identifiziert wurden (Tomb *et al.*, 1997). Für AlpA und AlpB, die an der Adhärenz an KatoIII-Zellen beteiligt sind (Odenbreit *et al.*, 1999), sowie für HopZ konnten bislang keine eukaryontischen Bindepartner gefunden werden (Peck *et al.*, 1999). BabA2 bindet an das fukosylierte Blutgruppenantigen Lewis b (Ilver *et al.*, 1998). Das gehäufte Auftreten von BabA positiven Stämmen in Patienten mit Geschwüren und Magenkrebs deutet auf die klinische Relevanz des Proteins hin (Gerhard *et al.*, 1999). SabA bindet an sialysierte Lewis x-Strukturen (Mahdavi *et al.*, 2002) und kürzlich wurde gezeigt, dass SabA an der Aktivierung von menschlichen Neutrophilen beteiligt ist (Unemo *et al.*, 2005). *H. pylori* vermag außerdem über eine Komponente der Flagellenscheide, HpaA, an Sialinsäure und andere sialysierte Glykokonjugate zu binden (Evans *et al.*, 1993), was

eventuell der Grund für eine verminderte Adhärenz von unflagellierten *H. pylori* Mutanten an AGS-Zellen ist (Foyne *et al.*, 1999). Zusätzlich ist *H. pylori* in der Lage über sein LPS (Lipopolysaccharid) an Lewis-x-Antigenstrukturen (Osaki *et al.*, 1998) und Laminin zu binden (Valkonen *et al.*, 1994). Kürzlich wurden weitere Proteine identifiziert, die an der Adhäsion beteiligt sind. Darunter das Protein HP0721, welches an Sialinsäure bindet, sowie die beiden Proteine HP1188 und HP1430, deren Bindungspartner bislang nicht bekannt sind (Bennett & Roberts, 2005; Rubinsztein-Dunlop *et al.*, 2005).

Das HP-NAP (neutrophil activating protein) kommt sezerniert oder an die Zellwand gebunden vor, in beiden Fällen übernimmt es unterschiedliche Funktionen. Zellwand-assoziiert kann es eine Bindung an die gastrische Mucinschicht vermitteln. Hier wird die Bindung über sulfathaltige Kohlenhydrate vermittelt (Namavar *et al.*, 1998; Teneberg *et al.*, 1997). Andererseits kann es als sezerniertes Protein an spezifische Rezeptoren auf neutrophilen Zellen des Wirtes binden und so die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale und Superoxide in der Zelle induzieren, was zu einer Schädigung der Epithelzellen und zu einer Entzündung der Magenschleimhaut führt (Evans *et al.*, 1995; Satin *et al.*, 2000).

Das LPS von *H. pylori* spielt neben seiner Funktion als Adhäsion noch eine Rolle bei der Evasion der Immunantwort. Es besitzt eine ca. 1000-fach niedrigere immunogene und pyrogene Wirkung im Vergleich zum LPS anderer gram-negativer Bakterien. Das *H. pylori*-LPS kann zwar eine proinflammatorische Immunantwort des Wirtes induzieren, die Immunantwort ist aber nicht so stark, dass es zu einer Eliminierung des Erregers kommt (Muotiala *et al.*, 1992). Die O-spezifischen Seitenketten des LPS besitzen oft Strukturen, die den Blutgruppenantigenen Lewis-x und Lewis-y gleichen. Diese Blutgruppenantigene kommen auf der Oberfläche von Magenepithelzellen vor und *H. pylori* entkommt möglicherweise durch dieses molekulare Mimikry der humoralen Immunantwort des Wirtes (Appelmelk *et al.*, 1997; Aspinall *et al.*, 1996).

Dem Virulenzfaktor Katalase KatA kommt ebenfalls eine wichtige Rolle während der Kolonisierung des Wirtes zu. Das Enzym ist in der Lage toxische Sauerstoffradikale, die von polymorphkernigen Leukozyten produziert werden, zu entgiften (Hazell *et al.*, 1991; Odenbreit *et al.*, 1996). Zusätzlich besitzt *H. pylori* auch eine Superoxiddismutase SodB, welche toxische Superoxide, die von Neutrophilen und Makrophagen produziert werden, abbaut (Spiegelhalder *et al.*, 1993).

Das vakuolisierende Zytotoxin VacA ist maßgeblich an der Schädigung des infizierten Magengewebes beteiligt. Schon 1988 wurde beschrieben, dass der Überstand von *H. pylori*-Isolaten die Bildung von großen zytoplasmatischen Vakuolen in eukaryotischen Zellen induziert (Leunk *et al.*, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auf das vakuolisierende Zytotoxin VacA zurückzuführen ist (Cover & Blaser, 1992). Das Gen *vacA*



kommt in allen bislang bekannten *H. pylori* Stämmen vor, allerdings exprimieren und sezernieren nur etwa 50 % der Stämme das 140 kDa große Toxin (Schmitt & Haas, 1994). Das VacA-Toxin gelangt über einen Sec-abhängigen Transport in das Periplasma. Der anschließende Transport über die äußere Membran erfolgt mit Hilfe der C-terminalen Autotransporter-Domäne. Sowohl die Signalsequenz als auch die Autotransporter-Domäne werden während der VacA-Sekretion proteolytisch abgespalten, was in der Bildung eines ~90 kDa großen reifen Effektorproteins resultiert (Cover & Blaser, 1992; Schmitt & Haas, 1994). Im Jahr 1995 konnte die genetische Diversität der *vacA*-Gene festgestellt werden. Es wurden zwei Allele, m1 und m2, der Mittelregion des Gens und vier Allele, s1a, s1b, s1c und s2 für die Region der Signalsequenz gefunden. Die Regionen liegen in variablen Kombinationen vor, was unterschiedliche Toxizitäten des Proteins bewirkt (Atherton *et al.*, 1995). Die VacA-Monomere bestehen aus zwei Domänen, p33 und p55, die durch einen Protease-sensitiven „loop“ verbunden sind. Gereinigtes VacA bildet hexa-, hepta- oder dodecamere blütenartige Strukturen, die unter sauren oder alkalischen Bedingungen aktiviert werden und wieder zu Monomeren dissoziieren (Cover *et al.*, 1997; Lupetti *et al.*, 1996; Yahiro *et al.*, 1999). *H. pylori*-Stämme mit mutierten VacA-Proteinen, die nicht in der Lage sind oligomere Strukturen zu bilden, zeigen keine vakuolisierende Fähigkeit mehr (Vinion-Dubiel *et al.*, 1999). Das reife VacA bindet an verschiedene Rezeptoren auf der Wirtszelle, wie beispielsweise den EGF-Rezeptor oder RPTP- $\alpha$  und - $\beta$  (receptor protein tyrosine phosphatase) (Padilla *et al.*, 2000; Seto *et al.*, 1998; Yahiro *et al.*, 1999; Yahiro *et al.*, 2003). Das gebundene VacA wird endozytotisch in die Wirtszelle aufgenommen (Garner & Cover, 1996). In der Zelle greift es in den Vesikeltransport ein und induziert intrazelluläre Vakuolen (Papini *et al.*, 1994). VacA kann sowohl in künstliche Lipiddoppelschichten als auch in die epitheliale Zellmembran inserieren und dort hexamere Anionen-selektive, Spannungs-abhängige Kanäle formen. Durch diese Kanäle können Bikarbonat und organische Anionen aus der Zelle gelangen, wo sie von *H. pylori* als Nährstoffe genutzt werden könnten (Szabo *et al.*, 1999). Zudem wurde gezeigt, dass auch Harnstoff aus den Zellen austreten und dem Bakterium als Urease-Substrat dienen kann (Iwamoto *et al.*, 1999; Tombola *et al.*, 2001). *In vitro* wurden weitere VacA-Funktionen nachgewiesen, deren Rolle *in vivo* bislang nicht geklärt ist. VacA (vermutlich auch CagA) induziert die Auflösung der „tight junctions“ zwischen den Epithelzellen, so dass nun Mineralstoffe wie Fe<sup>3+</sup> und Ni<sup>2+</sup> zum Bakterium gelangen könnten (Papini *et al.*, 1998). In letzter Zeit wurde mehrfach beschrieben, dass VacA einen starken immunmodulatorischen Effekt zeigt. VacA supprimiert die Immunantwort indem es die Phagosomenreifung in Makrophagen blockiert (Zheng & Jones, 2003), die Antigenpräsentation durch B-Zellen inhibiert (Molinari *et al.*, 1998) und die Proliferation von T-Zellen blockiert (Gebert *et al.*, 2003).

Man differenziert *H. pylori*-Stämme in TypI und TypII-Stämme, wobei TypI-Stämme im Genom eine ca. 40 kb große *cag*-PAI besitzen. Sie unterscheidet sich in ihrem G+C-Gehalt

(35 %) vom restlichen Genom, und spielt eine große Rolle bei der Pathogenität von *H. pylori* (Censini *et al.*, 1996). Die *cag*-PAI wird von identischen 31 bp langen Sequenz-Wiederholungen flankiert und kodiert für 31 Gene, darunter auch Gene, die für die strukturellen Komponenten eines TypIV-Sekretionssystem kodieren (Akopyants *et al.*, 1998; Odenbreit *et al.*, 2000). Namens gebend war das Gen *cagA* (cytotoxin-associated gene A), welches oft als Hauptvirulenzfaktor von *H. pylori* bezeichnet wird (Parsonnet *et al.*, 1997). Seine Anwesenheit im Genom korreliert meist mit einem schweren Krankheitsverlauf (Covacci *et al.*, 1993). Mehr als 90 % der Stämme, die aus Patienten mit Magen- oder Duodenalgeschwüren isoliert wurden, besitzen das *cagA*-Gen (Tummuru *et al.*, 1993). Bei Kontakt eines *cag*-positiven *H. pylori*-Stammes mit Epithelzellen kommt es zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 (Maeda *et al.*, 2001; Naumann *et al.*, 1999), die aufgrund einer vermehrten IL-8 Sekretion zu einer stärkeren Inflammation führt. Die Induktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 ist dabei unabhängig von der CagA-Expression (Censini *et al.*, 1996), aber abhängig vom Vorhandensein eines intakten TypIV-Translokationsapparates (Fischer *et al.*, 2001). Die Koinkubation von Epithelzellen mit *cag*-positiven *H. pylori*-Stämmen kann die Proto-Onkogene *c-fos* und *c-jun* aktivieren, was zu *H. pylori* assoziierten Neoplasien führen kann (Meyer ter Vehn *et al.*, 2000).

Das 128 kDa große CagA wird über das TypIV-Sekretionssystem der *cag*-PAI direkt in die Magenepithelzellen transloziert (Odenbreit *et al.*, 2000) und anschließend von einer *src*-ähnlichen wirtseigenen Tyrosinkinase phosphoryliert (Stein *et al.*, 2002). Im phosphorylierten Zustand kann CagA die SHP-2 Tyrosinphosphatase binden, aktivieren (Higashi *et al.*, 2002) und somit in die unterschiedlichsten Signaltransduktionswege eingreifen. Die aktivierte SHP-2 Tyrosin-phosphatase ist in der Lage den MEK (MAP Kinase Kinase)/ERK (extracellular signal regulated protein kinase) Signalweg über einen Ras unabhängigen Mechanismus zu induzieren. Die Deregulation dieses Signalweges durch CagA kann zu einer abnormalen Proliferation führen. Diese Mechanismen resultieren in einer ungeordneten Ausbreitung der Zellen („cell scattering“) oder in dem so genannten „hummingbird“ Phänotyp, bei dem die Morphologie der Zellen ungewöhnlich verändert ist. Der „hummingbird“ Phänotyp ist durch eine Verlängerung der Zellen durch die Ausbildung von Lammelipodien und Filopodien gekennzeichnet (Backert *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002; Segal *et al.*, 1999; Segal *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 2003). Diese Phänotypen entsprechen dem durch den wirtseigenen Faktor HGF (hepatocyte growth factor) oder SF (scatter factor) hervorgerufenen Phänotyp. Diese Auswirkungen werden als eine Vorstufe der Tumorentwicklung angesehen (Thiery, 2002). CagA kann auch mit anderen Signalmolekülen, wie mit Grb2 (growth factor receptor binding protein), interagieren. Durch diese Bindung wird ebenfalls der MEK/ERK Signalweg, diesmal allerdings über einen Ras abhängigen Mechanismus, induziert (Mimuro *et al.*, 2002). Es konnte zusätzlich eine Bindung von CagA an den c-Met Rezeptor gezeigt werden, wodurch ebenfalls eine mitogene Antwort induziert wird (Churin *et al.*, 2003). Des weiteren ist CagA in der Lage die

Rho-GTPasen Rac1/Cdc42 zu aktivieren (Churin *et al.*, 2001). In Abb. 5 sind schematisch einige mögliche Vorgänge in der Wirtszelle aufgezeigt. Interessanterweise wird die Phosphorylierung von CagA von einer Tyrosin-Dephosphorylierung von Wirtszell eigenen Proteinen begleitet, darunter die Proteine Cortactin und Ezrin (Selbach *et al.*, 2004; Selbach *et al.*, 2003).

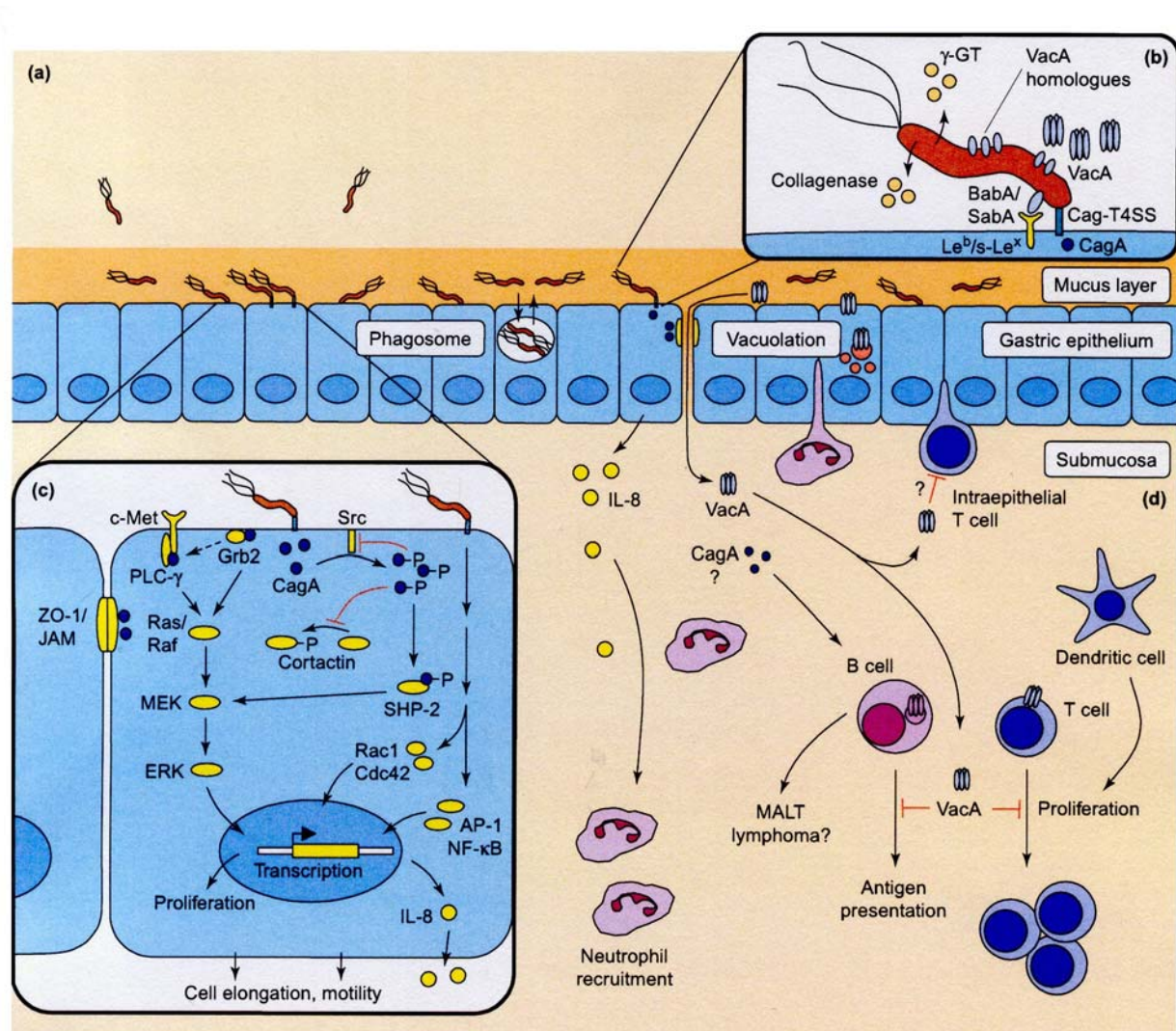


Abb. 5: Schematische Darstellung wichtiger Vorgänge während der Interaktion von *H. pylori* mit der Wirtsmukosa. (a) Die Mukusschicht über dem Magenepithel ist der Kolonisierungsort von *H. pylori* (b) Das Repertoire von Oberflächen- oder sekretierten Proteinen von *H. pylori* (c) Epitheliale Zellsignaltransduktions-Kaskaden, die durch CagA oder die *cag*-PAI von *H. pylori* moduliert werden (d) Mögliche Effekte von VacA auf das zelluläre Immunsystem, wie z.B. die Inhibition der T-Zell Proliferation und der Antigenpräsentation von B-Zellen (modifiziert, Rieder *et al.*, 2005).

### 1.5 Transkriptionsregulation in *H. pylori*

*H. pylori* besitzt im Gegensatz zu anderen Bakterien nur ein sehr eingeschränktes Repertoire an regulatorischen Genen (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Vermutlich hat *H. pylori* aufgrund der Anpassung an den menschlichen Magen als einzige ökologische Nische sein Genom reduziert. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass die Magenmukosa als relativ stabiles Habitat betrachtet werden kann, in dem einerseits sehr wenige kurzfristige Anpassungen des Bakteriums an seine Umgebung stattfinden müssen (Cases *et al.*, 2003;

Marshall *et al.*, 1998) und andererseits keine Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen herrscht (Berg *et al.*, 1997). Basierend auf der Annotation der Genomsequenz wurden 32 für putative regulatorische Proteine kodierende Gene gefunden, von denen allerdings bisher nur etwa 20 (aufgelistet in Tab. 1), das entspricht 1,1 % aller vorhandenen Proteine, eine direkte genregulatorische Funktion zugeschrieben wird. *Haemophilus influenzae* welches eine vergleichbare Genomgröße hat, besitzt etwa doppelt so viele Proteine mit regulatorischer Funktion wie *H. pylori* (Fleischmann *et al.*, 1995). Weiterhin fehlen *H. pylori* viele typische Hauptregulatoren, wie z.B. OxyR, Crp und FNR, die mit der Stressantwort, der Kohlenstoffspeicherung und der Anpassung an anaerobe Bedingungen assoziiert sind (Berg *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997).

Tab. 1: Proteine mit regulatorischen Funktionen von *H. pylori*:

| Locus (26695)                                    | Funktion  | Referenz   |
|--|---|--|
| <b>Sigma Faktoren</b>                            |   |  |
| HP0088   | RNA-Polymerase $\sigma^{80}$ -Faktor, RpoD      | Beier <i>et al.</i> , 1998                                     |
| HP0714   | RNA-Polymerase $\sigma^{54}$ -Faktor, RpoN      | Spohn & Scarlato, 1999b  |
| HP1032   | RNA-Polymerase $\sigma^{28}$ -Faktor, FliA      | Suerbaum <i>et al.</i> , 1993                                  |
| <b>Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren</b> |   |  |
| HP0165   | Histidin-Kinase, ArsS                           | Beier & Frank, 2000  |
| HP0244   | Histidin-Kinase                                 | Beier & Frank, 2000  |
| HP1364   | Histidin-Kinase, CrdS                           | Beier & Frank, 2000  |
| HP0166   | Response-Regulator, ArsR                        | Beier & Frank, 2000  |
| HP0703   | Response-Regulator, FlgR                        | Spohn & Scarlato, 1999b  |
| HP1365   | Response-Regulator, CrdR                        | Beier & Frank, 2000  |
| HP1021   | "orphan" Response-Regulator                     | Beier & Frank, 2000  |
| HP1043   | "orphan" Response-Regulator                     | Beier & Frank, 2000  |
| <b>weitere regulatorische Proteine</b>           |   |  |
| HP1025   | Chaperon-Repressor, HspR                        | Spohn & Scarlato, 1999a  |
| HP1027   | Eisenaufnahmeregulator, Fur Repressor           | Bereswill <i>et al.</i> , 1998                                 |
| HP1338   | Nickel-abhängiger Transkriptionsregulator, NikR | van Vliet <i>et al.</i> , 2002<br>de Pina <i>et al.</i> , 1999 |
| HP0111   | Transkriptionsrepressor, HrcA                   | Spohn & Scarlato, 1999a  |
| HP1139   | Transkriptionsrepressor, Soj                    |  |
| HP1140   | Biotin-Operon Repressor, BirA                   |  |
| HP1287   | Transkriptionsaktivator, TenA                   |  |
| HP1122   | $\sigma^{28}$ -Antagonist, FlgM                 | Josenhans <i>et al.</i> , 2002                                 |
| HP1442   | Kohlenstoff-Speicherung Regulator, CsrA         | Barnard <i>et al.</i> , 2003                                   |
| HP1041   | FliA-Homolog                                    | Schmitz <i>et al.</i> , 1998                                   |

Nachfolgend wird auf einige der Transkriptionsfaktoren näher eingegangen, wobei die Zweikomponentensysteme von *H. pylori* erst in Abschnitt B 2.2 behandelt werden.

In Bakterien besteht das RNA-Polymerase Holoenzym aus einem „Core“-Enzym ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) und einem Sigmafaktor ( $\sigma$ -Faktor), wobei der  $\sigma$ -Faktor für die spezifische Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor der von ihm regulierten Gene verantwortlich ist (Helmann & Chamberlin, 1988). In *H. pylori* sind Homologe zu den  $\sigma$ -Faktoren RpoD ( $\sigma^{70}$ ), RpoN ( $\sigma^{54}$ ) und FliA ( $\sigma^{28}$ ) vorhanden, jedoch fehlen Homologe zu  $\sigma$ -Faktoren wie RpoH ( $\sigma^{32}$ ;

Hitzeschock) und RpoS ( $\sigma^{38}$ ; stationäre Phase), die mit Stressbedingungen assoziiert sind (Beier *et al.*, 1998; Tomb *et al.*, 1997; Vanet *et al.*, 2000). RpoD stellt den vegetativen  $\sigma$ -Faktor von *H. pylori* dar, allerdings wurde er wegen seines signifikant größeren Molekulargewichts  $\sigma^{80}$  anstatt  $\sigma^{70}$  bezeichnet (Beier *et al.*, 1998). Betrachtet man die Promotorstrukturen der  $\sigma^{80}$ -abhängigen Gene, fällt auf, dass Abweichungen von der Konsensus-Sequenz in *E. coli* auftreten. Die -10 Box weist eine hohe Homologie zum Konsensus (TATAAT) auf, allerdings findet man an der Position -35 keine Homologien zum entsprechenden Promotorelement aus *E. coli* (Beier *et al.*, 1998; Forsyth & Cover, 1999). Auf der Basis von Computeranalysen verschiedener *H. pylori*-Promotoren konnte eine neue Promotorkonsensus-Sequenz postuliert werden. Man findet in den *H. pylori*-Promotoren 21 bp stromaufwärts der TATAAT-Box ein Motiv mit der Sequenz TTAAGC und seltener zusätzlich dazu ein TTTTAA-Motiv in einem Abstand von 12 bp stromaufwärts der -10 Box (Vanet *et al.*, 2000).

Interessanterweise sind sowohl  $\sigma^{54}$  als auch  $\sigma^{28}$  an der Transkriptionsregulation der flagellaren Gene beteiligt:  $\sigma^{54}$  reguliert im Zusammenspiel mit dem NtrC-artigen Transkriptionsfaktor FlgR die Transkription von Genen des basalen Flagellenkörpers und des Hakens (Spohn & Scarlato, 1999b), während  $\sigma^{28}$  an der Transkription von Genen, die für Filamentproteine (FlaA, FlhD) kodieren, beteiligt ist (Kim *et al.*, 1999; Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993). Inzwischen wurden allerdings weitere Gene, deren Genprodukte nicht an der Flagellensynthese beteiligt sind, identifiziert, deren Expression von  $\sigma^{28}$ , bzw. von seinem Antagonisten FlgM beeinflusst werden. Darunter befinden sich die Gene für Outer membrane protein OMP), EnvA (Lipoproteinsynthese), sowie HP1051 (hypothetisches Protein) (Josenhans *et al.*, 2002).

Die Transkription der Hitzeschockgene wird in *H. pylori* durch HspR und HrcA reguliert (Spohn *et al.*, 2004). Das Homologe HspR Protein aus *Streptomyces* stellt einen Repressor aus der GlnR Familie dar. Dieser Repressor bindet an so genannte HAIR-Motive (HspR-associated inverted repeat) in den Promotorregionen des *dnaK*-Operons und des *clpB* Gens (Bucca *et al.*, 1995; Grandvalet *et al.*, 1999; Grandvalet *et al.*, 1997). Das *hspR*-Gen von *H. pylori* ist das zweite Gen eines Operons (*cbpA-hspR*-Operon), indem sich auch das Gen *cbpA* (kodiert für ein DnaJ Homolog) und ein Gen, das für ein putatives Helikase-ähnliches Protein kodiert, befinden (Scarlato *et al.*, 2001; Tomb *et al.*, 1997). Es wurde demonstriert, dass HspR bei physiologischen Temperaturen das *cbpA-hspR*-Operon, sowie das *groESL*- und das *hrcA-grpE-dnaK*-Operon reprimiert. HspR bindet dabei an 75 bp große Promotor-Regionen, die alle HAIR-ähnliche Sequenzen beinhalten (Spohn & Scarlato, 1999a). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass HrcA aus *H. pylori* als Korepressor von HspR dient (Spohn *et al.*, 2004). HrcA aus *Bacillus subtilis* ist der Repressor des *groESL*-Operons und bindet an sogenannte CIRCE-(controlled inverted repeats of chaperone expression) Sequenzen (Schulz & Schumann, 1996). Die Promotorregionen des *hrcA-grpE-dnaK*-

Operons sowie des *groESL*-Operons aus *H. pylori* enthalten beide CIRCE-ähnliche Sequenzen, und werden durch HrcA reprimiert. Somit agieren HrcA und HspR als Koregulatoren der Hitzeschockgene (Spohn *et al.*, 2004).

Extrazelluläres Eisen ist im Wirtsgewebe normalerweise begrenzt, was einen unspezifischen Abwehrmechanismus des Wirtes gegen Pathogene darstellt. Eisen ist allerdings ein essentieller Nährstoff für die meisten Mikroorganismen, z.B. als Komponente der Zytochrome oder als Kofaktor vieler Enzyme (Bullen *et al.*, 1978), weshalb Bakterien hochaffine Eisenaufnahmesysteme für  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  entwickelt haben. Die Genomsequenz von *H. pylori* zeigt, dass das Bakterium Gene für mehrere putative Eisenaufnahmesysteme besitzt (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Der experimentelle Beweis für die Funktion der entsprechenden Genprodukte bei der Eisenaufnahme ist bislang nicht erbracht, mit Ausnahme des Eisentransporters FeoB (Velayudhan *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde gezeigt, dass *H. pylori* in der Lage ist, Eisen von humanem Laktoferrin und Hämoglobin aufzunehmen (Dhaenens *et al.*, 1999; Husson *et al.*, 1993; Worst *et al.*, 1999). Zu hohe Eisenkonzentrationen sind wiederum toxisch für das Bakterium, da Eisen in Anwesenheit von Sauerstoff die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen katalysiert (Harrison & Arosio, 1996), somit sollte der Eisen-metabolismus einer strikten Expressionskontrolle unterliegen. In den meisten pathogenen und kommensalen Bakterien wird die Eisen-abhängige Genregulation durch das Fur- (ferric uptake regulator) Protein vermittelt. Fur ist ein Transkriptionsregulator, der bei ansteigenden zytoplasmatischen Eisen-Konzentrationen die Transkription von Genen reprimiert, deren Produkte in die Eisenaufnahme involviert sind (Hantke, 1987; Stojiljkovic *et al.*, 1994; Stojiljkovic & Hantke, 1995). Fur reprimiert seine Zielgene, indem es mit Eisen als Kofaktor an konservierte DNA-Sequenzen (Fur-Boxen) bindet, die sich im Promotor-bereich des jeweiligen Gens befinden (Escolar *et al.*, 1999). *H. pylori* besitzt ein Fur-Protein das Homologien zu den Fur-Proteinen anderer Bakterien aufweist (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Fur ist autoregulatorisch und kontrolliert seine eigene Transkription in Abhängigkeit von Eisen (Delany *et al.*, 2002a). Als Zielgene des Fur-Repressors in *H. pylori* sind *fecA2* (Eisencitratrezeptor) und *ribBA* (Riboflavinbiosynthese) identifiziert worden (Fassbinder *et al.*, 2000). Beide Gene werden durch das Vorhandensein von Eisen reprimiert. Ein Homolog des FrpB-Proteins aus *Neisseria meningitidis*, das unter Eisenmangelbedingungen induziert wird, unterliegt ebenfalls der Kontrolle durch den Fur-Repressor (Delany *et al.*, 2001a). Interessanterweise wird die Transkription von *pfr* unter niedrigen anstatt bei hohen Eisenkonzentrationen reprimiert (Bereswill *et al.*, 2000; Bereswill *et al.*, 1998; Delany *et al.*, 2001b). Bei einer durch zunehmende Eisenkonzentrationen möglichen Komplexierung von Fur mit  $\text{Fe}^{2+}$  und der daraus resultierenden Konformationsänderung kommt es zur Ablösung des Repressors und zur Transkription von *pfr* (Delany *et al.*, 2001b). Das *pfr*-Gen kodiert für ein Ferritin-ähnliches Protein, das für die intrazelluläre Eisenspeicherung zuständig ist (Bereswill *et al.*,

1998). *In vitro* bindet Fur Eisen-unabhängig in der intergenischen Region zwischen *katA* und *frbB*, deren Genprodukte bei der Eisenaufnahme beteiligt sind, sowie zwischen *ceuE* und *tsaA*, deren Genprodukte bei der Zelldetoxifikation eine Rolle spielen (Delany *et al.*, 2001a; van Vliet *et al.*, 2002b).

Der Fur-Repressor von *H. pylori* ist zusätzlich bei der Regulation der Säureresistenz (Bijlsma *et al.*, 2002; Bury-Mone *et al.*, 2004), an der Regulation von Amidasen (van Vliet *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2001) und an Resistenzmechanismen gegenüber oxidativen Stress beteiligt (Barnard *et al.*, 2004; Cooksley *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2005a; Harris *et al.*, 2002).

Mit einem Ortholog zu NikR aus *E. coli* (De Pina *et al.*, 1999) besitzt *H. pylori* ein globales Regulatorprotein, das an der metallabhängigen Regulation beteiligt ist (Tomb *et al.*, 1997). Bei NikR handelt es sich um einen pleiotropen Regulator, der sowohl die Expression von Nickel-aktivierten, als auch von Nickel-reprimierten Genen kontrolliert (Contreras *et al.*, 2003). NikR induziert  $\text{Ni}^{2+}$ -abhängig die Gene *ureA*, *ureB*, *copA2*, *hpn* sowie die *hpn*-ähnlichen Gene, deren Produkte alle am Nickelmetabolismus beteiligt sind. Des Weiteren reprimiert der Regulator die Expression von Genen die an der Eisenaufnahme und -speicherung und an der Motilität beteiligt sind und ist verantwortlich für die Repression von Genen, die für Proteine der äußeren Membran kodieren (Contreras *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2002a). Zusätzlich reprimiert NikR die Transkription des Fur-Repressors (Contreras *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2004) und des *nixA*-Gens (Ernst *et al.*, 2005b; Wolfram *et al.*, 2006). Bindungsstellen für NikR konnten in beiden Promotoren,  $P_{fur}$  und  $P_{ureAr}$  identifiziert werden (Delany *et al.*, 2005).

Weitere potentielle Repressorproteine, die im Genom von *H. pylori* kodiert werden, sind ein Homolog des BirA-Proteins aus *E. coli* (HP1140). BirA reprimiert in *E. coli* die Transkription des Biotin-Operons (Cronan, 1989). Des Weiteren findet man das Protein HP1139, welches Homologien zum Soj-Protein aus *B. subtilis* aufweist. Soj ist in *B. subtilis* einerseits für die Verteilung der Chromosomen zuständig, und agiert zusätzlich als Repressor verschiedener Sporulationsgene (Quisel & Grossman, 2000; Quisel *et al.*, 1999). Erst kürzlich wurde ein zusätzliches Protein (HP0222) von *H. pylori* identifiziert, das möglicherweise an der Transkriptionsregulation beteiligt ist. Dieses Protein weist signifikante Homologien zu den Transkriptionsfaktoren der Arc/MetJ Familie auf (Popescu *et al.*, 2005).

Es konnte ein weiteres potentielles Transkriptionsaktivatorprotein (HP1287) gefunden werden, welches Homologien zu TenA (beteiligt an der Produktion der alkalischen Phosphatase) aus *B. subtilis* aufweist (Pang *et al.*, 1991). Die Rolle des TenA-Proteins bei der Transkriptionsregulation von *H. pylori* ist allerdings bislang nicht geklärt.

## 1.6 Weitere Expressions-Regulationsmechanismen von *H. pylori*

Der Einsatz alternativer Regulationsmechanismen könnte eine Erklärung für die geringe Zahl regulatorischer Proteine in *H. pylori* sein. Die *H. pylori* Stämme J99 und 26695 weisen eine extrem große Zahl an Restriktions-Modifikationssystemen auf (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). So identifizierte man jeweils über 20 ORFs mit Ähnlichkeiten zu DNA Restriktions-Modifikationsenzymen, was weit über der üblichen Anzahl liegt (Kong *et al.*, 2000). Auffälligerweise liegen in beiden Stämmen jeweils neun Typ-II-Methyltransferasen hoch konserviert vor, wobei ihnen die dazugehörige Restriktionsuntereinheit fehlt. Aufgrund dieser Entdeckung wurde postuliert, dass die Methyltransferasen eventuell eine Bedeutung für die Genregulation haben könnten (Alm *et al.*, 1999). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sich die Inaktivierung des *hpyIM*-Gens reprimierend auf die Expression des *hrcA-dnak-grpE*-Operon auswirkt (Donahue *et al.*, 2002). In anderen Bakterien, z.B. in *Salmonella typhimurium*, wurde ebenfalls gezeigt, dass die DNA-Methylierung eine regulatorische Funktion haben kann (Heithoff *et al.*, 1999; Low *et al.*, 2001).

Weiterhin kann ein Einfluss auf die Genexpression über den „Quorum-sensing“ Mechanismus erreicht werden. Dieser Mechanismus basiert auf der interzellulären Kommunikation zwischen Bakterien über sekretierte Signalmoleküle (Autoinduktoren, AI). Bei steigender Populationsdichte akkumulieren die AI und induzieren ab einem bestimmten Schwellenwert in der Bakterienzelle eine Signaltransduktionskaskade, was eine strikte Genexpressionskontrolle zur Folge hat. Für die Synthese des AI-2 aus *Vibrio harveyi* wird das Genprodukt von *luxS* benötigt (Surette *et al.*, 1999). Im Genom von *H. pylori* konnte ein homologes *luxS*-Gen identifiziert werden (Forsyth & Cover, 2000; Joyce *et al.*, 2000). *H. pylori* ist in der Lage ein funktionelles AI-2 zu produzieren, über welches die entsprechende „Quorum-sensing“ Antwort in *V. harveyi* ausgelöst werden kann (Forsyth & Cover, 2000). Allerdings ist die Rolle dieses AI bei der Transkriptionsregulation von *H. pylori* nicht geklärt. Die Analyse *luxS*-negativer *H. pylori* Mutanten ergab, dass „Quorum-sensing“-Mechanismen die Expression der bekannten Virulenzfaktoren nicht beeinflusst (Joyce *et al.*, 2000).

Zur Expressionskontrolle zählt zudem die post-transkriptionelle Regulation (mRNA Stabilität, „antisense“ RNA-Transkripte oder Inhibierung der Translation), welcher immer öfter eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Genexpression zugeschrieben wird (Delilhas, 1995; Regnier & Arraiano, 2000; Takayama & Kjelleberg, 2000). Im Genom von *H. pylori* wurden drei Gene, *papS* (Poly(A)polymerase), *rnc* (RNaseIII), *rnpA* (RNaseP-Untereinheit A) identifiziert, die in die RNA-Prozessierung involviert sind. Zusätzlich wurde ein Gen *pnp* (Polynukleotid-Phosphorylase) entdeckt, welches bei der RNA-Degradation beteiligt ist (Tomb *et al.*, 1997). Die Genprodukte bilden möglicherweise einen Teil des Degradasoms von *H. pylori*. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass die Genexpression post-transkriptionell als Antwort auf Umweltstimuli reguliert wird. Hierzu zählen unter anderen



Studien das Urease-Operon betreffend. Unter sauren Bedingungen konnte z. B. eine erhöhte Stabilität für verschiedene Transkripte des Ureaseoperons *ureABIEFGH* beobachtet werden. Dieser Prozess ermöglicht eventuell das „fine-tuning“ der Urease Expression (Akada *et al.*, 2000).

*H. pylori* besitzt ein Homolog des post-transkriptionellen Regulators CsrA (Tomb *et al.*, 1997). CsrA (carbon storage regulator) wurde ursprünglich als Repressor vieler Gene der stationären Phase in *E. coli* beschrieben (Romeo *et al.*, 1993). Seitdem wurde aber gezeigt, dass CsrA als ein globaler Regulator fungieren kann. Er wirkt einerseits als Repressor (Glykogen-Synthese, Glykogen-Katabolismus, Gluconeogenese, Biofilm-Bildung), und andererseits als Aktivator (Glykolyse, Motilität, Flagellen-Biosynthese) unterschiedlichster Gene (Baker *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2002; Romeo, 1998; Romeo *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 2001). Es wurde beschrieben, dass CsrA den Zugang zur Ribosomen Bindungsstelle (RBS) und die mRNA Stabilität kontrolliert (Baker *et al.*, 2002; Blumer *et al.*, 1999; Liu & Romeo, 1997; Liu *et al.*, 1995; Romeo, 1998; Wei *et al.*, 2001). Die zweite gut charakterisierte Komponente dieses Regulationssystems von *E. coli* ist CsrB, eine sRNA (small untranslated RNA), die einen großen Komplex mit etwa 18 CsrA-Einheiten bildet. CsrB ist eine Schlüssel-Determinante für die Aktivität von CsrA. Kürzlich wurde in *E. coli* eine dritte Komponente CsrC, ebenfalls eine sRNA mit ähnlicher Funktion wie CsrB, beschrieben (Weilbacher *et al.*, 2003). Im Genom von *H. pylori* konnte bislang keine der beiden sRNAs identifiziert werden. (Barnard *et al.*, 2004; Romeo, 1998). *In vivo* Experimente mit einer CsrA Deletionsmutante von *H. pylori* zeigten, dass diese Stämme in ihrer Virulenz signifikant attenuiert sind, und dass die Inaktivierung des Regulators die Expression von wichtigen Regulatoren wie Fur und HspR beeinflussen (Barnard *et al.*, 2004).

## 2. Zwei-Komponentensysteme

### 2.1 Allgemeine Charakterisierung

Um unter sich schnell verändernden Umweltbedingungen überleben zu können, haben Zellen effiziente regulatorische Systeme entwickelt, durch die sie in der Lage sind, spezifische Signale aus ihrer Umwelt wahrzunehmen und ihre Genexpression dementsprechend zu adaptieren. Die reversible Proteinphosphorylierung nach Aufnahme eines Umweltreizes ist eine der fundamentalen Strategien. In Eukaryonten übernehmen diese Funktion überwiegend Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen (Ser/Thr/Tyr-Kinasen) während in Prokaryonten vor allem Histidin-Kinasen als Bestandteile von Zwei-Komponentensystemen vorkommen. Zwei-Komponentensysteme findet man hauptsächlich in Eubakterien aber inzwischen wurden auch einige wenige im Reich der Archaea, z.B. in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith *et al.*, 1997), und in eukaryontischen Organismen wie Hefen, z.B. *Saccharomyces cerevisiae* (Loomis *et al.*, 1998), oder Pflanzen,

z.B. *Arabidopsis thaliana* (Hwang *et al.*, 2002; Stock *et al.*, 2000) identifiziert. Die Anzahl der Zwei-Komponentensysteme variiert in den unterschiedlichen Spezies. In dem parasitären Bakterium *Mycoplasma genitalium* findet man keine Zwei-Komponentensysteme (Mizuno, 1998), in *B. subtilis* 30 Systeme (Kobayashi *et al.*, 2001), in *E. coli* wurden 31 Systeme beschrieben (Zhou *et al.*, 2003) und in *Nostoc punctiformis* konnten bisher über hundert solcher Systeme identifiziert werden (Hoch & Varughese, 2001). Im Allgemeinen besitzen besonders die Mikroorganismen, die häufig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt sind und somit über eine hohe Anpassungsfähigkeit verfügen müssen, eine große Zahl an Zwei-Komponentensystemen (Hoch & Silhavy, 1995; Akerly & Miller, 1996; Parkinson & Kofoid, 1992).

Die Umweltsignale, auf die Zwei-Komponentensysteme reagieren, sind extrem unterschiedlicher Natur, darunter Temperatur, Osmolarität, pH-Wert, Licht, Sauerstoff, Nährstoffe aber auch Quorum-Sensing Moleküle, die von Bakterien ausgeschieden werden (Hellingwerf *et al.*, 1998). Die Zwei-Komponentensysteme regulieren verschiedenste Vorgänge in der Zelle, wie Sporulation (Kunst *et al.*, 1974), Chemotaxis (Armstrong *et al.*, 1967), Stickstoff-Assimilation (Gussin *et al.*, 1986), Produktion von Exoproteinen (Giraud *et al.*, 1999) und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Evers & Courvalin, 1996).

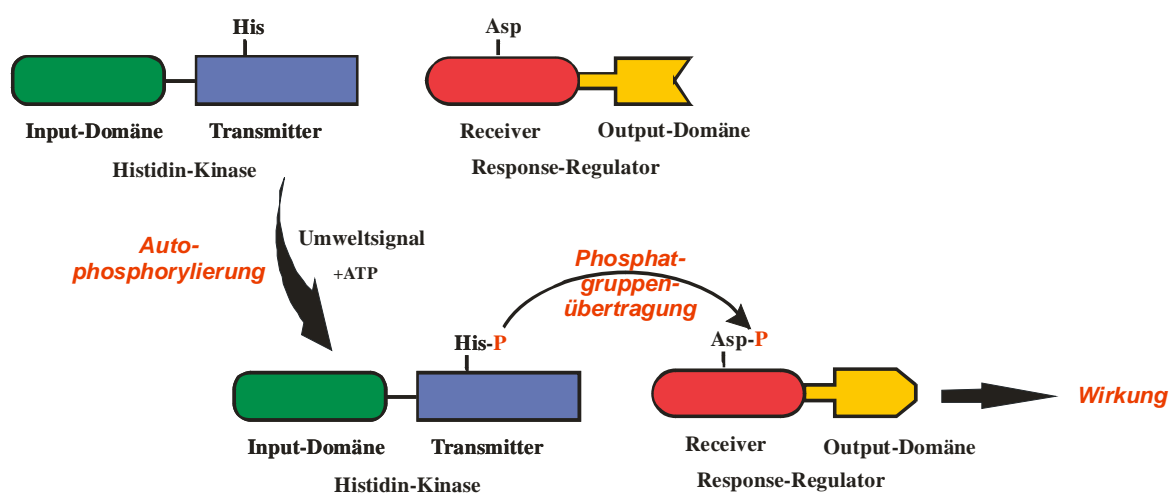


Abb. 6: Schematische Darstellung eines klassischen Zwei-Komponentensystems. Nähere Erläuterungen im Text.

Ein klassisches Zweikomponentensystem (siehe Abb. 6) besteht im einfachsten Fall aus einer sensorischen Histidin-Kinase (HK) und einem Response-Regulator (RR). In den meisten Fällen ist die Histidin-Kinase ein Transmembranprotein mit einer N-terminalen periplasmatischen Input-Domäne und einer C-terminalen zytoplasmatischen Transmitter-Domäne, die über eine Transmembranhelix und eine zytoplasmatische Linker-Region verbunden sind. Der zytoplasmatische Response-Regulator setzt sich zusammen aus einer

N-terminalen Receiver-Domäne, einem flexibler Linker und einer C-terminalen Output-Domäne (Ronson *et al.*, 1987).

Nach Wahrnehmung des entsprechenden Umweltstimulus über die Input-Domäne der Histidin-Kinase kommt es zu einer ATP-(Adenosin-tri-phosphat)-abhängigen Auto-phosphorylierung an einem hoch konservierten Histidinrest (His) in der Transmitter-Domäne (Parkinson & Kofoid, 1992). Für EnvZ, NtrB und CheA aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der Autophosphorylierung eine Dimerisierung vorausgeht, worauf es zu einer *trans*-Phosphorylierung der beiden Monomere kommt (Ninfa *et al.*, 1993; Surette *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 1993; Yang & Inouye, 1991).

### 1. Autophosphorylierung: $\text{HK-His} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$

Anschließend wird durch eine Phosphotransfer-Reaktion die hochenergetisch gebundene Phosphatgruppe der Transmitter-Domäne der Histidin-Kinase auf einen hochkonservierten Aspartatrest (Asp) der N-terminalen Receiver-Domäne des Response-Regulators übertragen (Sanders *et al.*, 1989). Der Phosphatgruppentransfer wird durch den Response-Regulator selbst katalysiert, da auch kleine Moleküle wie Acetylphosphat, Carbamoylphosphat, Phosphoramidat oder Imidazolphosphat als Phosphatdonatoren dienen können (Lukat *et al.*, 1992).

### 2. Phosphotransfer: $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \leftrightarrow \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$

Aufgrund der Phosphorylierung der Receiver-Domäne des Response-Regulators kommt es zu Konformationsänderungen und somit zur Aktivierung der flexiblen Output-Domäne (Effektor-Domäne). Durch die Aktivierung kann der phosphorylierte Response-Regulator eine Wirkung, meist Transkriptionsregulation an der DNA, ausüben. Die Dephosphorylierung wird entweder durch die Histidin-Kinase, die eine Phosphataseaktivität aufweist, durch den Response-Regulator, der eine Autophosphataseaktivität zeigt, oder durch eine zusätzliche Komponente z.B. eine spezifische Aspartatphosphatase, katalysiert (wie beim Sporulations-system von *B. subtilis*). Über eine Hydrolyse-Reaktion wird der Phosphatrest vom phosphorylierten Aspartatrest auf Wasser übertragen.

### 3. Dephosphorylierung: $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RR-Asp} + \text{P}_i$

Voraussetzung für alle drei Reaktionen ist die Anwesenheit von divalenten Metallionen, wobei *in vivo*  $\text{Mg}^{2+}$  das relevante Kation ist (Stock *et al.*, 2000).

Die Histidin-Kinasen sind den eukaryontischen Ser/Thr/Tyr-Kinasen im katalytischen Mechanismus sehr ähnlich, unterscheiden sich aber vor allem in Bezug auf die chemischen Reaktionen, die sie katalysieren. Ser/Thr/Tyr-Kinasen produzieren Phosphoester, während

Histidin-Kinasen Phosphoramidate produzieren (Stock *et al.*, 1990). Da die Stickstoff-Phosphat Bindung (N~P-Bindung) sehr energiereich ist, eignet sie sich als Donor in Phosphortransfer-Reaktionen. Wie bereits beschrieben sind die meisten Histidin-Kinasen Transmembranproteine. Mit wenigen Ausnahmen, z.B. FixL aus *Rhizobium meliloti* (Lois *et al.*, 1993) und UhpB aus *E. coli* (Island *et al.*, 1992), die vier bzw. acht Transmembrandomänen besitzen, weisen sie zwei Transmembrandomänen auf. Diese membranständigen Histidin-Kinasen werden zu einer ersten Familie zusammengefasst, der unter anderen BvgS (Gross *et al.*, 1989), VirA (Leroux *et al.*, 1987), EnvZ (Forst *et al.*, 1987) und PhoR (Makino *et al.*, 1986) angegliedert wurden. Die zweite Familie, der erheblich weniger Mitglieder angehören, besteht aus löslichen zytoplasmatischen Proteinen. Dazu gehören die Histidin-Kinasen CheA (Mutoh & Simon, 1986; Stock *et al.*, 1988), DegS (Henner *et al.*, 1988) und NtrB (MacFarlane & Merrick, 1985; Miranda-Rios *et al.*, 1987; Nixon *et al.*, 1986). Das gemeinsame Kennzeichen der unterschiedlichen Histidin-Kinasen ist die Kinase-Domäne. Diese Region hat eine Länge von ungefähr 350 Aminosäuren (AS) und besteht aus zwei funktionalen Abschnitten, der Dimerisierungs-Domäne (Phosphorylierungs-Domäne) und der ATP-bindenden katalytischen Domäne (Stock, 1999). Als Bestandteil der Kinase-Domäne findet man sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Histidin-Kinasen fünf konservierte Aminosäure-Motive. Die Phosphorylierungs-Domäne besitzt eine stark konservierte Region mit dem phosphorylierbaren Histidin-Rest (H-Box), während die ATP-Bindedomäne weitere vier hochkonservierte Sequenzmotive aufweist, die als N-, F-, G1 und als G2-Box bezeichnet werden (Parkinson & Kofoid, 1992; Swanson *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1998; Tomomori *et al.*, 1999).

Unorthodoxe oder hybride Histidin-Kinasen findet man in wenigen (ca. 20 %) prokaryontischen (z.B. BvgS, ArcB), sowie in fast allen eukaryontischen Zwei-Komponentensystemen (Grebe & Stock, 1999; Ishige *et al.*, 1994; Stock *et al.*, 2000). Diese unorthodoxen Systeme sind gekennzeichnet durch einen mehrstufigen Phosphorelay, der zwischen verschiedenen Histidin- und Aspartatresten (His-Asp-His-Asp) wechselt, die sich in zusätzlichen Receiver- und Hpt-(Histidine-containing phosphotransfer) Domänen befinden. Die Hpt-Domänen sind am Phosphotransfer beteiligt, besitzen jedoch keine Kinase- oder Phosphataseaktivität. Sie sind entweder in die Histidin-Kinase integriert, oder liegen als separates Protein vor (Appleby *et al.*, 1996). Ein Beispiel eines unorthodoxen Zwei-Komponentensystems ist das Sporulationskontroll-System von *B. subtilis*: man findet hier einen zusätzlichen Receiver und eine Hpt-Domäne, die beide als eigenständige Proteine vorliegen (Hoch, 1995; Perego, 1998).

Die Receiver-Domänen der Response-Regulatoren sind etwa 120 AS lang und bestehen aus einem zentralen Bündel von fünf parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblattstrukturen, das von fünf  $\alpha$ -Helices umgeben ist (Ronson *et al.*, 1987; Stock *et al.*, 1989; Volz & Matsumura, 1991).

Das hochkonservierte aktive Zentrum der Receiver-Domäne wird saure Tasche genannt, welche neben dem phosphorylierbaren Aspartatrest (D57 in CheY aus *E. coli*) (Sanders *et al.*, 1989) noch zusätzliche hochkonservierte Aminosäurereste enthält. Zwei weitere saure Aminosäurereste (D12 und D13) sind an der Koordination eines  $Mg^{2+}$ -Atoms beteiligt, das sowohl für die Phosphorylierungs- als auch für die Dephosphorylierungsreaktion benötigt wird (Lukat *et al.*, 1991; Lukat *et al.*, 1990; Needham *et al.*, 1993). Weitere konservierte Aminosäurereste im Umfeld der sauren Tasche sind ein Threoninrest (T87) und ein Lysinrest (K109) (Stock *et al.*, 1990). Der Lysinrest interagiert mit der Phosphatgruppe, während der Threoninrest an der Aktivierung des Regulators beteiligt ist (Robinson *et al.*, 2000). Aufgrund von Sequenzvergleichen der C-terminalen DNA-Bindedomäne werden die Response-Regulatoren in drei Familien eingeteilt, welche durch OmpR, FixJ und NtrC repräsentiert werden.

Meist haben Response-Regulatoren DNA-bindende Eigenschaften und können so direkt als Aktivatoren oder Repressoren die Transkription kontrollieren. Neben der DNA-Bindung können die Effektor-Domänen auch andere Funktionen übernehmen, und als Enzyme wirken, wie z.B. die cAMP-(cyclisches AMP-) Phosphodiesterase RegA von *Dictyostelium* (Maeda *et al.*, 1995) oder die an der Chemotaxis beteiligte Methylesterase CheB (Simms *et al.*, 1985). Meist ist die phosphorylierte Form die biologisch aktive Konformation eines Response-Regulators, aber auch hierbei gibt es Ausnahmen: das DegU Protein aus *B. subtilis* weist zwei aktive Konformationen auf: phosphoryliert aktiviert es die Expression der Gene die für die degradativen Enzyme kodieren, während es im unphosphorylierten Zustand die Expression der Gene für die Kompetenz aktiviert (Dahl *et al.*, 1992).

## 2.2 Zwei-Komponentensysteme in *H. pylori*

Das Genom von *H. pylori* enthält nur wenige Gene, die Bestandteile von potentiellen Zwei-Komponentensystemen kodieren. Insgesamt konnten vier offene Leserahmen (*hp0165*, *hp0244*, *hp0392*, *hp1364*) mit Homologien zu Genen von Zwei-Komponenten Histidin-Kinasen sowie sechs offene Leserahmen (*hp0166*, *hp0703*, *hp1021*, *hp1067*, *hp1365*) mit Homologien zu Genen von Response-Regulatoren annotiert werden, die in Tab. 2 aufgeführt sind (Tomb *et al.*, 1997).

Basierend auf strukturellen und funktionellen Homologien konnte ein Paar von Zwei-Komponenten Proteinen (HP0329/HP1067) als das CheA/CheY Chemotaxis Zwei-Komponentensystem identifiziert werden (Beier *et al.*, 1997; Jimenez-Pearson *et al.*, 2005; Tomb *et al.*, 1997). Die übrigen Zwei-Komponenten Proteine scheinen an der Transkriptionsregulation beteiligt zu sein.

Tab. 2: Proteine der Zwei-Komponentensysteme von *H. pylori*:

HK: Histidin-Kinase  
RR: Response Regulator

| Locus (26695) | vorhergesagte Funktion | Charakteristika  |
|---------------|------------------------|--|
| HP0392        | Histidin-Kinase        | CheA Homolog; Chemotaxis; zugehöriger RR HP1067  |
| HP0165        | Histidin-Kinase        | ArsS; Säureregulation; zugehöriger RR: HP0166  |
| HP0244        | Histidin-Kinase        | NtrB-ähnliche HK; zugehöriger RR: HP0703; zytoplasmatische Protein                                     |
| HP1364        | Histidin-Kinase        | CrdS; Kupfer-Resistenz; zugehöriger RR: HP1364   |
| HP1067        | Response-Regulator     | CheY Homolog; Chemotaxis; zugehörige HK HP0229   |
| HP0166        | Response-Regulator     | ArsR; Säureregulation; essentieller OmpR-artiger RR; zugehörige HK: HP0165                             |
| HP0703        | Response-Regulator     | FlgR; NtrC-artiger RR; zugehörige HK: HP0244;  |
| HP1365        | Response-Regulator     | CrdR; Kupfer-Resistenz; OmpR-artiger RR; zugehörige HK: HP1365   |
| HP1021        | Response-Regulator     | „orphan“; Deletion beeinflusst Zellwachstum negativ; atypische AS-Abweichungen in der Receiver-Sequenz |
| HP1043        | Response-Regulator     | „orphan“; essentiell; OmpR-artiger RR; atypische AS-Abweichungen in der Receiver-Sequenz               |

### Die vollständigen Zwei-Komponentensysteme HP1364/HP1365, HP0244/HP0703 und HP0165/HP0166

HP1364 ist eine 397 AS lange orthodoxe, membranständige Histidin-Kinase mit zwei Transmembrandomänen und gehört zur Klasse IIIA der Histidin-Kinasen. Das Gen für den korrespondierenden Response-Regulator HP1365 befindet sich „upstream“ des Histidin-Kinase-Gens *hp1364* und wird mit diesem kotranskribiert (siehe Abb. 7). Der Response-Regulator HP1365 wird aufgrund von Homologien in der Output-Domäne der OmpR-Familie zugeordnet (Beier & Frank, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass dieses Zwei-Komponentensystem für die Kupfer-abhängige Induktion von CrdA (copper resistance determinant) benötigt wird. CrdA bildet zusammen mit anderen Komponenten ein Kupfer-Exportsystem und ist somit an den Kupfer-Resistenzmechanismen von *H. pylori* beteiligt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde das Zwei-Komponentensystem CrdS/CrdR genannt. Der Response-Regulator CrdR bindet *in vitro* an eine AACACC-ATTT-CCACAA-Sequenz „upstream“ des Promotors von *crdA*. Diese Konsensus-Sequenz konnte mit bioinformatischen Mitteln in keinem anderen *H. pylori* Promotor detektiert werden. Daher geht man davon aus, dass sich die Funktion des CrdS/CrdR Zwei-Komponentensystems auf die *crdA*-Regulation beschränkt (Waidner *et al.*, 2005). Neueste Daten beschreiben im Widerspruch dazu eine zusätzliche Beteiligung dieses Zwei-Komponentensystems an der Säureresistenz von *H. pylori* (Loh & Cover, 2006).

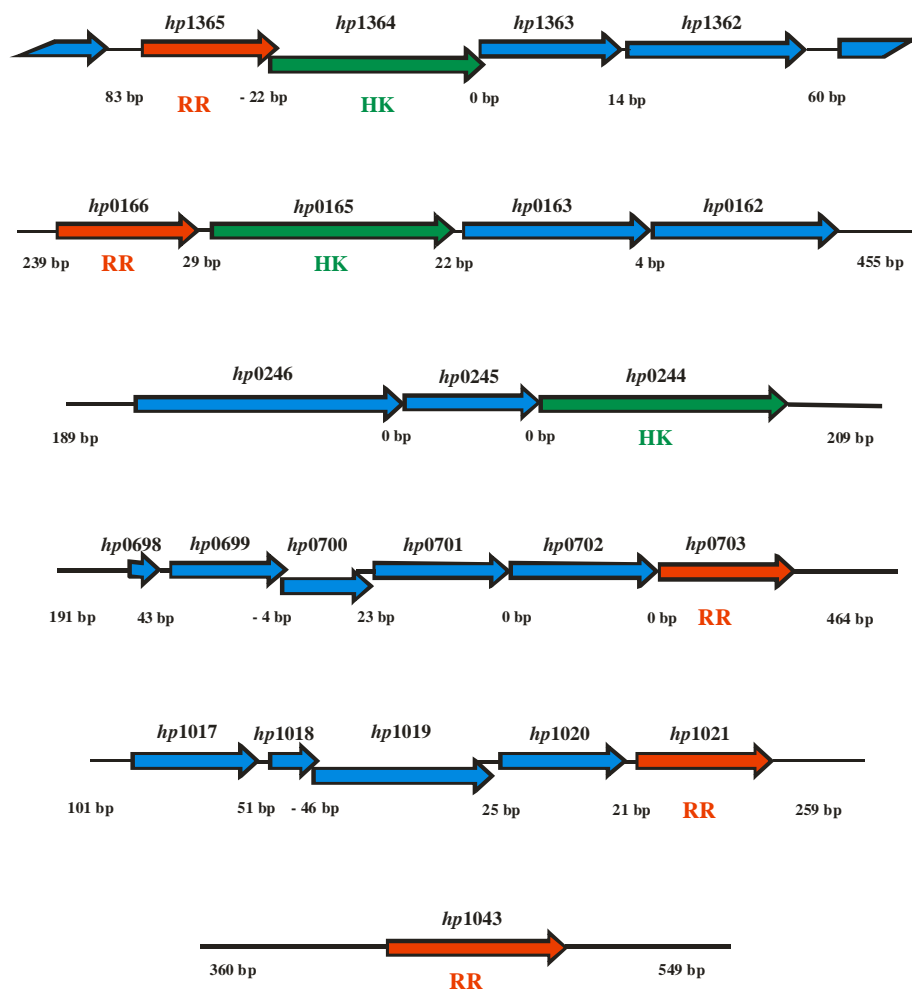


Abb. 7: genomische Anordnung der ORF's mit Homologien zu Zwei-Komponenten Proteinen in *H. pylori*. Die Gene der Histidin-Kinasen (HK) sind in grün, die Gene der Response-Regulatoren (RR) in rot gezeichnet.

Anhand von *in vitro*-Phosphorylierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass die NtrB-ähnliche Histidin-Kinase HP0244 (381 AS) und der NtrC-ähnliche Response-Regulator HP0703 ein Zwei-Komponentensystem bilden. Die Gene der beiden Proteine sind allerdings in unterschiedlichen Operons lokalisiert, wie in Abb. 7 zu sehen ist (Beier & Frank, 2000). Das Protein HP0244 ist der Klasse IIIB der NtrB-artigen Histidin-Kinasen zuzuordnen. In der Proteinsequenz von HP0244 konnten keine Hinweise auf Transmembrandomänen gefunden werden, weshalb diese Kinase vermutlich, wie auch NtrB aus *E. coli*, ein zytoplasmatisches Protein darstellt. Der Response-Regulator HP0703 ist zusammen mit dem Sigma-Faktor  $\sigma^{54}$  (RpoN) an der Regulation von Genen beteiligt, die Komponenten des flagellaren Basalkörpers und des Hakens (z.B. *flgE*, *flgDE'*, *flgB*, *flgK*), sowie das Flagellin FlaB kodieren (Spohn & Scarlato, 1999b). Daher wird HP0703 auch als FlgR (flagellum regulator) bezeichnet. Durch eine genomische Transkriptomanalyse der FlgR, FlgS und RpoN-

Deletionsmutanten konnten noch zusätzliche Zielgene von FlgR identifiziert werden, *hp1028-hp1035* und *hp0367*, deren Regulation anscheinend unabhängig von RpoN ist (Niehus *et al.*, 2004).

Die 414 AS große Histidin-Kinase HP0165 besitzt zwei Transmembrandomänen (AS 8-22; AS 134-153), die sich im N-terminalen Bereich des Sensors befinden, und HP0165 in der Zytoplasmamembran verankern. Stromaufwärts von *hp0165* befindet sich das Response-Regulatorgen *hp0166* (siehe Abb. 7), dessen Genprodukt HP0166 spezifisch von der Histidin-Kinase HP0165 phosphoryliert wird (Beier & Frank, 2000). Bei dem Response-Regulator HP0166 handelt es sich um ein OmpR-artiges Protein.

Erstaunlicherweise erwies sich der Response-Regulator HP0166 als essentiell für *H. pylori*, da erst nach Integration einer zweiten stabilen Genkopie in den *cag*-Lokus das wildtypische Gen deletiert werden konnte (Beier & Frank, 2000; Schär *et al.*, 2005). Interessanterweise zeigte die Deletion des Gens der korrespondierenden Histidin-Kinase HP0165 unter Standard-Kulturbedingungen keine Auswirkung auf das Zellwachstum (Beier & Frank, 2000).

In den letzten Jahren konnten viele Targetgene des phosphorylierten Regulators (HP0166~P) identifiziert werden. In der phosphorylierten Form bindet der Regulator HP0166 stromabwärts seines eigenen Promotors, womit er sowohl seine Expression als auch die Expression der stromabwärts im gleichen Operon gelegenen Gene reprimiert. Dabei handelt es sich um das Gen *hp0165*, das Gen für eine  $\delta$ -Aminolävulinsäure Dehydratase (*hp0163*) und das Gen eines konservierten hypothetischen Proteins (*hp0162*) (Dietz *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Histidin-Kinase ArsS (HP0165) vermutlich über die periplasmatische Input-Domäne im Periplasma Säure als Umweltreiz wahrnimmt (Pflock *et al.*, 2004). Somit befinden sich unter den Targetgenen vor allem Gene für Proteine, die an der Säureresistenz von *H. pylori* beteiligt sind, wie z.B. UreA oder Amidasen. Zusätzlich findet man unter den regulierten Proteinen einige OMPs (Dietz *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2004; Pflock *et al.*, 2005). Aufgrund der Tatsache dass der externe Stimulus Säure ist, erhielt das HP0165/HP0166 Zwei-Komponentensystem den Namen ArsRS (acid responsive signalling) (Pflock *et al.*, 2004).

In den Promotorregionen einiger Zielgene wurde 9 bp stromaufwärts der -10 Region ein 26 bp langes konserviertes Motiv mit einer zentralen ATCATT-Sequenz identifiziert, welches essentiell für die Bindung von ArsR (HP0166) an diese Promotoren ist (Dietz *et al.*, 2002). An die Promotorregionen P<sub>ureI</sub> und P<sub>ureA</sub> kommt es zu einer ausgedehnteren Bindung des phosphorylierten Response-Regulators ArsR (HP0166). Der Response-Regulator bindet hochaffin stromaufwärts von *ureA* an eine 54 bp lange DNA-Sequenz, die mit der -35-Region überlappt. Zusätzlich wurde eine Bindung mit niedrigerer Affinität an eine 34 bp lange DNA-Sequenz identifiziert, die 31 bp stromaufwärts von der primären Bindestelle entfernt ist. Stromaufwärts von *ureI* bindet ArsR~P (HP0166~P) an eine 48 bp lange DNA-Sequenz, die mit der -10-Region überlappt (Pflock *et al.*, 2005).



Bislang konnten allerdings keine Gene identifiziert werden, die von ArsR (HP0166) reguliert werden, welche der Grund für die Essentialität des Regulators sein könnten. Momentan wird davon ausgegangen, dass ArsR~P (HP0166~P) nicht-essentielle Zielgene reguliert, während er in nicht-phosphorylierter Form essentielle Zielgene kontrolliert.

### Die „orphan“ Response-Regulatoren HP1043 und HP1021

Das Genom von *H. pylori* beinhaltet zwei weitere Response-Regulatorgene, *hp1043* und *hp1021*. In der direkten Nachbarschaft dieser Gene befindet sich kein Gen einer Histidin-Kinase wie man in Abb. 7 erkennen kann. Den Genprodukten HP1043 und HP1021 konnten auch anhand von *in vitro*-Phosphorylierungsversuchen mit den gereinigten Proteinen keine zugehörige Histidin-Kinase zugeordnet werden, weshalb die beiden Response-Regulatoren als „orphan“ Response-Regulator bezeichnet werden (Beier & Frank, 2000; McDaniel *et al.*, 2001).

Interessanterweise erwies sich auch der Response-Regulator HP1043 als essentiell für *H. pylori*. In diesem Fall konnte das Gen *hp1043*, wie auch *hp0166*, nur in Anwesenheit einer weiteren Kopie des entsprechenden Gens im *cag*-Lokus von *H. pylori* inaktiviert werden (Beier & Frank, 2000; Schär *et al.*, 2005).

Das essentielle Gen *hp1043* wird monocistronisch transkribiert und der kodierte Response-Regulator HP1043 ist aufgrund von Sequenzhomologien in der Output-Domäne der Familie der OmpR-Proteine zuzuordnen. Der Response-Regulator HP1043 bildet über die N-terminale regulatorische Domäne ein 45 kDa großes Dimer. *In vitro* bindet HP1043 an seine eigene Promotor-Region. Zusätzlich konnte eine *in vitro*-Bindung des Response-Regulators an den Promotor des *tlpB*-Gens für ein MCP (methyl-accepting chemotaxis protein) detektiert werden (Delany *et al.*, 2002b). Die Promotoren  $P_{hp1043}$  und  $P_{tlpB}$  sind  $\sigma^{80}$ -abhängig und besitzen eine perfekte -10-Box (TATAAT), sie weisen allerdings im Vergleich mit den Promotorregionen in *E. coli* eine nur schwach konservierte -35-Region auf. Mittels „footprint“-Analysen mit dem gereinigten HP1043-Protein wurde ein Bindemotiv in den Promotorregionen beider Gene identifiziert. Der Regulator HP1043 bindet in beiden Promotoren spezifisch an einen Bereich, der die -35-Box überlappt. Das Bindemotiv bildet einen „inverted repeat“, der in Abb. 8 dargestellt ist (Delany *et al.*, 2002b).



Abb. 8: Alignment der bereits identifizierten Bindestellen des RR HP1043 in den Promotoren  $P_{hp1043}$  und  $P_{tlpB}$

Die Nukleotide, welche die putativen -35-Boxen überlappen sind unterstrichen

In rot: konservierte Nukleotide

In blau: Basensequenz des „inverted repeat“

Länge und Orientierung des „inverted repeat“ sind als Pfeile dargestellt. Die Nummerierungen geben den Abstand vom Transkriptionsstartpunkt +1 an. (modifiziert, Delany *et al.*, 2002)

Da eine Transposoninsertion im *tlpB*-Gen das Wachstum von *H. pylori* nicht beeinträchtigt (Salama *et al.*, 2004), kann die mögliche Regulation dieses Gens durch HP1043 nicht der Grund für die Essentialität von HP1043 sein. Im Genom von *H. pylori* wurden noch weitere Gene mit einem potentiellen HP1043-Bindemotiv im „upstream“ Bereich identifiziert (Scarlato, persönliche Mitteilung). Bislang wurde allerdings die Regulation dieser Gene durch HP1043 nicht experimentell nachgewiesen.

Bei einem Vergleich der Aminosäure-Sequenz der Receiver-Domäne von HP1043 mit der Konsensus-Sequenz fällt auf, dass in HP1043 an üblicherweise stark konservierten Bereichen ungewöhnliche Abweichungen auftreten. In Abb. 9 ist ein Aminosäuresequenz-Alignment dargestellt, welches die Aminosäure-Substitutionen von HP1043 im Vergleich zur Konsensus-Sequenz aufzeigt. Der sonst hochkonservierte Aspartatrest D8 (D13 in CheY von *E. coli*) ist durch einen Lysinrest substituiert. Der nachfolgende Aminosäurerest, im Konsensus ein saurer Aminosäurerest oder ein Histidinrest, ist hier ein Asparaginrest. Zusätzlich weist die Sequenz von HP1043 im Vergleich mit seinen Orthologen aus den nah verwandten Organismen *Wolinella succinogenes*, *H. hepaticus* und *C. jejuni* eine Deletion von vier Aminosäuren in der Receiver-Domäne auf (Baar *et al.*, 2003; Martinez-Hackert & Stock, 1997; Parkhill *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2003; Tomb *et al.*, 1997). Die Deletion betrifft die putative Phosphorylierungsstelle (D57 in CheY von *E. coli*), allerdings befindet sich dadurch ein nachfolgender Aspartatrest benachbart zur Konsensus-Position der Phosphorylierungsstelle und könnte als alternativer Phosphat-Akzeptor dienen.

|           |                      |            |            |            |            |                 |    |
|-----------|----------------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|----|
| WS0306    | MRILII <b>EE</b> DEI | TLNKTLAEG  | NEFNYQTDVA | ENLKDGEYYI | SIRNYDLVLT | D <b>W</b> MLPD | 56 |
| HH1697    | MRILVIE <b>DD</b> P  | TLCKNIAEML | NERSYQTDIA | ENLKDGEYFI | SIRNYDLVLA | D <b>W</b> DLSD | 56 |
| CJ0355    | MRILVIEDEI           | SLNKTIIDNL | NEFGYQTDSS | ENFKDGEYFI | GIRHYDLVLA | N <b>W</b> TLPD | 56 |
| HP1043    | MRVLLIE <b>KNS</b>   | VLGGEIEKGL | NVKGFMADVT | ESLEDGEYLM | DIRNYDLVM  | <b>..</b> ..VSD | 56 |
| Konsensus | -KVLVVD <b>DD</b> -  | --R--L---L | ---G-----  | -----      | ----PDLVLL | <b>D</b> LRMP-  |    |
|           | RI IIE E             | L I I      |            |            | Y VIIT     | INL             |    |
|           | TL LA H              | V          |            |            | V ILVM     | VM              |    |

Abb. 9: Alignment eines Ausschnittes der AS-Sequenz der Receiver-Domäne von HP1043 und seinen Orthologen aus *W. succinogenes* (WS0306), *H. hepaticus* (HH1697) und *C. jejuni* (CJ0355) und der Konsensus-Sequenz.

In **blau**: hochkonservierte AS

In **rot**: AS-Abweichungen in HP1043 oder seinen Orthologen

Der Response-Regulator HP1021 ist bislang nur wenig charakterisiert. In der Output-Domäne von HP1021 konnte ein putatives „helix-turn-helix“ (HTH)-DNA-Bindemotiv in der Nähe des C-Terminus identifiziert werden (Beier & Frank, 2000).

Die Inaktivierung von HP1021 resultierte in einem Wachstumsdefekt, der sich in der Ausbildung sehr kleiner Kolonien („small colony“-Phänotyp) äußert, wobei in der Kultivierbarkeit dieser Deletionsmutanten stammspezifische Unterschiede zu erkennen waren. Transformanten, die aus der Deletion von *hp1021* im Stamm *H. pylori* G27 resultierten, erwiesen sich als nicht weiter kultivierbar, während Deletionsmutanten von

*hp1021* in den Stämmen 26695 und P76 angezogen werden konnten (Beier & Frank, 2000; McDaniel *et al.*, 2001; Pflock *et al.*, 2004; Pflock, persönliche Mitteilung).

Aufgrund von Microarray-Studien wurde postuliert, dass die Transkription von *hp1021* durch Säure reguliert wird, wobei in unterschiedlichen Studien kontroverse Ergebnisse beschrieben werden: laut Merrell *et al.* wird die Transkription von *hp1021* durch Erniedrigung des pH-Wertes um ein dreifaches verstärkt, während Wen *et al.* eine Repression der Transkription beschreibt (Merrell *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2003).

Die Receiver-Sequenz von HP1021 weist ebenfalls an einer hochkonservierten Position eine deutliche Abweichung zur Konsensus-Sequenz auf. In Abb. 10 ist ein Aminosäuresequenz-Alignment dargestellt, welches die auffällige Aminosäure-Substitution von HP1021 im Vergleich zum Konsensus aufzeigt. Wie bei seinen Orthologen aus *C. jejuni*, *W. succinogenes* und *H. hepaticus* ist der Phosphat-akzeptierende Aspartatrest der Position 47 durch einen Serinrest substituiert (Baar *et al.*, 2003; Martinez-Hackert & Stock, 1997; Parkhill *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2003; Tomb *et al.*, 1997). Dieser Serinrest könnte eventuell als alternativer Phosphat-Akzeptor dienen, da in einer D57N-Mutante von CheY aus *E. coli* ein benachbarter Serinrest von der Histidin-Kinase CheA phosphoryliert wird, wenn auch mit geringerer Effizienz (Appleby & Bourret, 1999).

|           |            |             |            |            |            |           |    |
|-----------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----------|----|
| WS1939    | MRVLIVENEI | YLAQSIAAKL  | SDFGFECEIV | SLVNEALREQ | EYDVVLLS   | TN VSGQNY | 56 |
| HH1583    | MKVLIIENEI | YLAQSIANKI  | SDSHLECVIA | HSLKD.VQKD | HYDVILAS   | FG TIGEGY | 56 |
| CJ1608    | MKVLIIENEI | YLAQSIISIKL | SDAGYSCEII | NSFDEYNGEK | YYDIILLSTN | T...NN    | 56 |
| HP1021    | MKILIIEDDL | ALARSISHNL  | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV    | SK VCTQGR | 56 |
| Konsensus | -KVLVDDDD- | --R--L---L  | ---G-----  | -----      | PDLVLL     | DLRMP-    |    |
|           | RI IIE E   | L I I       |            |            | Y VIIT     | INL       |    |
|           | TL LA H    | V           |            |            | V ILVM     | VM        |    |

Abb. 10: Alignment eines Ausschnittes der AS-Sequenz der Receiver-Domäne von HP1021 und seinen Orthologen aus *W. succinogenes* (WS1939), *H. hepaticus* (HH1583) und *C. jejuni* (CJ1608) und der Konsensus-Sequenz.

In blau: normalerweise hochkonservierte AS

In rot: AS-Abweichungen in HP1021 oder seinen Orthologen

### 3. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die ungewöhnlichen Response-Regulatoren ArsR (HP0166), HP1043 und HP1021 von *H. pylori* näher zu charakterisieren.

Das ArsR/S Zwei-Komponentensystem ist an der Säureregulation von *H. pylori* beteiligt. Im Fall eines Säurereizes wird ArsR (HP0166) durch die Histidin-Kinase ArsS (HP0165) phosphoryliert und kontrolliert im phosphorylierten Zustand die Expression nicht-essentieller Gene, die vor allem an der Säureadaptation beteiligt sind. Da ArsR (HP0166) essentiell für das Zellwachstum von *H. pylori* ist, die Histidin-Kinase ArsS (HP0165) hingegen nicht (Beier & Frank, 2000; Schär, 2001), kann gefolgert werden, dass ArsR (HP0166) in seiner unphosphorylierten Form eine weitere Gruppe von Zielgenen reguliert, von denen zumindest ein Gen essentiell für *H. pylori* ist. Daher sollte die Fragestellung untersucht werden, ob eine Phosphorylierung von ArsR (HP0166) eine Voraussetzung für die essentiellen Funktionen des Regulators ist. Hierzu sollte die Lebensfähigkeit eines *H. pylori*-Stammes getestet werden, in dem ausschließlich ein Derivat von ArsR (HP0166) exprimiert wird, dessen Aspartatrest der putativen Phosphorylierungsstelle durch einen nicht phosphorylierbaren Aminosäurerest substituiert wird.

Für den essentiellen Response-Regulator HP1043 und den Response-Regulator HP1021 konnten bislang keine zugehörigen Histidin-Kinasen identifiziert werden und *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente demonstrierten, dass sie durch Acetylphosphat nicht phosphoryliert werden. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass beide Response-Regulatoren im Vergleich zur Konsensus-Sequenz an sonst hoch konservierten Positionen der Receiver-Sequenz atypische Aminosäuren aufweisen. Es sollte daher untersucht werden, ob die ungewöhnlichen Primär-Sequenzen der Receiver-Domänen von HP1021 und HP1043 von Bedeutung für die Wachstums-assoziierten Funktionen der Response-Regulatoren sind. Hierzu sollten Derivate der Response-Regulatoren HP1043 und HP1021, deren Aminosäuresequenzen der Receiver-Domänen an den üblichen Receiver-Konsensus angeglichen wurden, auf ihre Funktionalität untersucht werden.

Die Abwesenheit zugehöriger Histidin-Kinasen für HP1043 und HP1021 warf die Frage auf, ob eine Phosphorylierung der Response-Regulatoren entscheidend für ihre Funktionen ist. Es sollte getestet werden, ob Derivate von HP1021 und HP1043 mit Mutationen der putativen Phosphorylierungsstellen in der Lage sind, die Funktionen von HP1021 bzw. HP1043 zu übernehmen.

Es ist bislang nicht gelungen, potentielle Zielgene von HP1021 und HP1043 zu identifizieren. Die übliche Vorgehensweise, Deletionsmutanten herzustellen um anschließend die Unterschiede im Transkriptionsprofil im Vergleich mit dem wildtypischen *H. pylori*-Stamm zu

identifizieren, war im Fall von HP1043 aufgrund der Tatsache, dass HP1043 essentiell ist nicht durchführbar war, und wurde im Fall von HP1021 erschwert, da HP1021 einen großen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Aus diesem Grund sollte ein alternativer Ansatz gewählt werden, Zielgene zu finden. Hierzu sollten rekombinante *H. pylori*-Stämme erzeugt werden, in denen eine Überexpression der beiden Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 erfolgt. Die konstruierten *H. pylori*-Stämme sollten sich in ihrem Transkriptionsprofil von einem wildtypischen *H. pylori*-Stamm unterscheiden, da die Überexpression eine veränderte Transkription ihrer Zielgene nach sich ziehen sollte. Potentielle Zielgene der Response-Regulatoren wären bei einer Überexpression der Response-Regulatoren induziert oder reprimiert. Durch globale Transkriptomanalysen oder durch Proteomanalysen könnten differentiell exprimierte Gene identifiziert werden.

## C. Material

### 1. Bakterienstämme

Tab. 3: Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

| Stamm                                    | Beschreibung / Genotyp   | Referenz/<br>Herkunft  |
|--|--|--|
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$              | <i>E. coli</i> -Stamm für effiziente Transformation;<br>F-, $\Phi$ 80 / <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> ,<br><i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>supE44</i> , $\lambda$ -, <i>tfi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> ; | Bethesda Research<br>Laboratories (BRL)  |
| Epicurian Coli® XL1-Blue                 | <i>RecA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F`<br><i>proAB lac/qZ</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]  | Bullock <i>et al.</i> , 1987   |
| <i>E. coli</i> M15                       | <i>E. coli</i> -Stamm zur Klonierung in pQE-Vektoren und<br>Überproduktion von His <sub>6</sub> -tag Proteinen; trägt pREP4  | Qiagen   |
| <i>H. pylori</i> G27                     | Klinisches Isolat (Typ I)  | Xiang <i>et al.</i> , 1995   |
| <i>H. pylori</i> 26695                   | Klinisches Isolat (Typ I)  | Tomb <i>et al.</i> , 1995  |
| <i>W. succinogenes</i> 1740              | Klinisches Isolat  | Stephan Schuster   |
| <i>C. jejuni</i> 4344                    | Klinisches Isolat  | German <i>Campylo-</i><br><i>bacter</i> and <i>Helico-</i><br><i>bacter</i> references<br>laboratory, Freiburg |
| G27/0166-D52N                            | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp0166-D52N</i> integriert<br>in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/0166-D52N $\Delta$                   | wie <i>H. pylori</i> G27/0166-D52N, das wildtypische Gen <i>arsR</i><br>( <i>hp0166</i> ) ist deletiert  | diese Arbeit   |
| G27/P <sub>hp0166</sub> -0166-O          | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>hp0166</sub> -Promotors mit der<br>Output-Domäne von <i>ArsR</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/P <sub>hp0166</sub> -ws1817          | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>hp0166</sub> -Promotors mit<br>ORF <i>ws1817</i> , integriert in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/1043-K8D                             | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp1043-K8D</i> integriert in<br>den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit   |
| G27/1043-K8N9DD                          | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp1043-K8N9DD</i><br>integriert in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/1043-K8D $\Delta$                    | wie <i>H. pylori</i> G27/1043-K8D, das wildtypische Gen <i>hp1043</i> ist<br>deletiert   | diese Arbeit   |
| G27/1043-K8N9DD $\Delta$                 | wie <i>H. pylori</i> G27/1043-K8N9DD, das wildtypische Gen<br><i>hp1043</i> ist deletiert  | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51N                            | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp1043-S51N</i> integriert<br>in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/1043-D52N                            | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp1043-D52N</i> integriert<br>in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51A                            | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp1043-S51A</i> integriert in<br>den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51D52AN                        | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp1043-S51D52AN</i><br>integriert in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51D52MN                        | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich <i>hp1043-S51D52MN</i><br>integriert in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51N $\Delta$                   | wie <i>H. pylori</i> G27/1043-S51N, das wildtypische Gen <i>hp1043</i><br>ist deletiert  | diese Arbeit   |
| G27/1043-D52N $\Delta$                   | wie <i>H. pylori</i> G27/1043-D52N, das wildtypische Gen <i>hp1043</i><br>ist deletiert  | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51A $\Delta$                   | wie <i>H. pylori</i> G27/1043-S51A, das wildtypische Gen <i>hp1043</i><br>Lokus ist deletiert  | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51D52AN $\Delta$               | wie <i>H. pylori</i> G27/1043-S51D52AN, das wildtypische Gen<br><i>hp1043</i> Lokus ist deletiert  | diese Arbeit   |
| G27/1043-S51D52MN $\Delta$               | wie <i>H. pylori</i> G27/1043-S51D52MN, das wildtypische Gen<br><i>hp1043</i> am wildtypischen Lokus ist deletiert   | diese Arbeit   |
| G27/P <sub>hp1043</sub> -1043-O          | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>hp1043</sub> -Promotors mit der<br>Output-Domäne von <i>HP1043</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Kan          | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>cagA</sub> -Promotors mit ORF<br><i>hp1043</i> , integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Kan <sup>r</sup>   | diese Arbeit   |
| G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Cm           | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>cagA</sub> -Promotors mit ORF<br><i>hp1043</i> , integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm <sup>r</sup>  | diese Arbeit   |
| G27/P <sub>np1043</sub> -cj0355          | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>np1043</sub> -Promotors mit<br>ORF <i>cj0355</i> , integriert in den <i>cag</i> -Lokus   | diese Arbeit   |
| G27/P <sub>np1043</sub> -cj0355 $\Delta$ | wie <i>H. pylori</i> G27/P <sub>np1043</sub> -cj0355, das wildtypische Gen<br><i>hp1043</i> ist deletiert  | diese Arbeit   |

| Stamm                           | Beschreibung / Genotyp   | Referenz/ Herkunft          |
|---------------------------------|--|-----------------------------|
| G27/P <sub>cagA2</sub> -cj0355  | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>cagA2</sub> -Promotors mit ORF cj0355, integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm <sup>r</sup>  | diese Arbeit                |
| G27/P <sub>hp</sub> 1043-ws0306 | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>hp1043</sub> -Promotors mit ORF ws0306, integriert in den <i>cag</i> -Lokus                  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47D                   | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47D, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S48D                   | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S48D, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48DD               | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47S48DD, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G271021-S47DΔ                   | wie <i>H. pylori</i> G27/1021-S47D, das wildtypische Gen hp1021 ist deletiert  | diese Arbeit                |
| G271021-S48DΔ                   | wie <i>H. pylori</i> G27/1021-S48D, das wildtypische Gen hp1021 ist deletiert  | diese Arbeit                |
| G271021-S47S48DDΔ               | wie <i>H. pylori</i> G27/1021-S47S48DD, das wildtypische Gen hp1021 ist deletiert  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47N                   | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47N, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S48N                   | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S48N, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48NN               | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47S48NN, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48AA               | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47S48AA, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48NA               | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47S48NA, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48NL               | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47S48NL, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48MN               | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich hp1021-S47S48MN, integriert in den <i>cag</i> -Lokus  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47NΔ                  | wie <i>H. pylori</i> G27/1021-S47N, das wildtypische Gen hp1021 ist deletiert  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S48NΔ                  | wie <i>H. pylori</i> G27/1021-S48N, das wildtypische Gen hp1021 ist deletiert  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48AAΔ              | wie <i>H. pylori</i> G27/1021-S47S48AA, das wildtypische Gen hp1021 ist deletiert  | diese Arbeit                |
| G27/1021-S47S48NAΔ              | wie <i>H. pylori</i> G27/1021-S47S48NA, das wildtypische Gen hp1021 ist deletiert  | diese Arbeit                |
| G27/P <sub>hp1018</sub> -1021-O | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>hp1018</sub> -Promotors mit der Output-Domäne von HP1021 integriert in den <i>cag</i> -Lokus | diese Arbeit                |
| G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Kan | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>cagA</sub> -Promotors mit ORF hp1021, integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Kan <sup>r</sup>  | diese Arbeit                |
| G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Cm  | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>cagA</sub> -Promotors mit ORF hp1021, integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm <sup>r</sup>   | diese Arbeit                |
| G27/P <sub>cagA</sub> -1021-CmΔ | wie <i>H. pylori</i> G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Cm; das Gen hp1021 am wildtypischen Locus ist deletiert   | diese Arbeit                |
| 26695 1021::kan                 | Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, bei dem hp1021 durch eine Kan <sup>r</sup> -Kassette substituiert ist  | Pflock <i>et al.</i> , 2004 |
| G27/P <sub>hp</sub> 1018-cj1608 | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>hp1018</sub> -Promotors mit ORF cj1608, integriert in den <i>cag</i> -Lokus                  | diese Arbeit                |
| G27/P <sub>hp</sub> 1018-ws1939 | wie <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des P <sub>hp1018</sub> -Promotors mit ORF ws1939, integriert in den <i>cag</i> -Lokus                  | diese Arbeit                |
| G27pta/ackAΔ                    | wie <i>H. pylori</i> G27, die Gene <i>pta</i> und <i>ackA</i> sind deletiert   | diese Arbeit                |

## 2. Vektoren und rekombinante Plasmide

Tab. 4: Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und rekombinante Plasmide.

| Plasmid/Vektor | Beschreibung  | Referenz/ Herkunft   |
|----------------|---|----------------------|
| pVac:kan       | Enthält Kanamycin-Kassette  | B. Aricó             |
| pDT2548        | Enthält das Chloramphenicol-Resistenz-Gen von <i>C. coli</i>  | Wang & Taylor, 1990  |
| pSL1180        | „high copy number“ Klonierungsvektor, Derivat von pUC118, Amp <sup>r</sup> .                                | Amersham Biosciences |
| pQE-30         | Expressionsvektor zur Überproduktion von Proteinen mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag; Amp <sup>r</sup> | Qiagen               |

| Plasmid/Vektor                            | Beschreibung   | Referenz/<br>Herkunft       |
|---|--|-----------------------------|
| pSL-cagACD                                | Derivat von pSL1180, enthält Sequenzen die sich von den Genen der <i>cag</i> -Region ( <i>cagA</i> , <i>cagC</i> und <i>cagD</i> ) ableiten  | Dagmar Beier                |
| pSL-1021::km                              | Derivat von pSL1180; „knock out“-Plasmid für <i>hp1021</i> ; enthält ein Fragment, das einen Teil des Gens <i>hp1020</i> beinhaltet und ein Fragment mit einem Teil der intergenischen region stromabwärts von <i>hp1021</i> ; Kan <sup>r</sup>  | Beier & Frank, 2000         |
| pSL-1043::km2                             | Derivat von pSL1180-Derivat; „knock out“-Plasmid für <i>hp1043</i> ; enthält ein Fragment, das einen Teil des Gens <i>hp1044</i> kodiert und ein Fragment, das einen Teil der intergenische Region zwischen ORF <i>hp1043</i> und <i>hp1042</i> umfasst; Kan <sup>r</sup>  | Diplomarbeit Jennifer Schär |
| pSL-0166::km2                             | Derivat von pSL1180; „knock out“-Plasmid für <i>arsR</i> ; enthält ein Fragment, das einen Teil des Gens für die Kinase HP0165 kodiert und ein Fragment, das Teile der Gene <i>hp0168</i> und <i>hp0169</i> und den intergenischen Bereich zwischen <i>hp0168</i> und <i>hp0169</i> beinhaltet; Kan <sup>r</sup> | Diplomarbeit Jennifer Schär |
| pQE-0166                                  | Derivat von pQE-30 zur Überexpression des Fusionsproteins His <sub>6</sub> -0166   | Beier & Frank, 2000         |
| pSL-0166                                  | Derivat von pSL1180; enthält <i>arsR</i> ( <i>hp0166</i> ) und die zugehörige Promotorregion   | Diplomarbeit Jennifer Schär |
| pSL-0166-D52N                             | Derivat von pSL1180; enthält <i>arsR</i> ( <i>hp0166</i> ) mit der Mutation D52N   | diese Arbeit                |
| pQE-0166-D52N                             | Derivat von pQE-30 zur Überexpression des Fusionsproteins His <sub>6</sub> -0166-D52N  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-0166-D52N                      | wie pSL-cagACD, enthält <i>hp0166</i> -D52N  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-0166-D52N-Cm                   | wie pSL-cagACD, enthält <i>hp0166</i> -D52N und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>hp0166</sub>                   | pSL1180-Derivat; enthält den Promotor P <sub>hp0166</sub>  | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>hp0166</sub> -0166-O           | wie pSL-P <sub>hp0166</sub> , enthält Fragment welche die Output-Domäne von <i>ArsR</i> (0166-O) kodiert   | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-P <sub>hp0166</sub> -0166-O-Cm | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp0166</sub> und 0166-O sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>hp0166</sub> -ws1817           | wie pSL-P <sub>hp0166</sub> , enthält zusätzlich <i>ws1817</i>   | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-P <sub>hp0166</sub> -ws1817-Cm | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp0166</sub> und <i>ws1817</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-1043                                  | Derivat von pSL1180; enthält das Gen für den RR HP1043   | Diplomarbeit Jennifer Schär |
| pSL-1043-K8D                              | Derivat von pSL1180; enthält <i>hp1043</i> mit der Mutation K8D  | diese Arbeit                |
| pSL-1043-K8N9DD                           | Derivat von pSL1180; enthält <i>hp1043</i> mit der Mutation K8N9DD   | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-1043-K8D-Cm                    | wie pSL-cagACD, enthält <i>hp1043</i> -K8D und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-1043-K8N9DD-Cm                 | wie pSL-cagACD, enthält <i>hp1043</i> -K8N9DD und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                |
| pSL-1043-S51N                             | Derivat von pSL1180, enthält <i>hp1043</i> mit der Mutation S51N   | diese Arbeit                |
| pSL-1043-D52N                             | Derivat von pSL1180, enthält <i>hp1043</i> mit der Mutation D52N   | diese Arbeit                |
| pSL-1043-S51A                             | Derivat von pSL1180, enthält <i>hp1043</i> mit der Mutation S51A   | diese Arbeit                |
| pSL-1043-S51D52AN                         | Derivat von pSL1180, enthält <i>hp1043</i> mit der Mutation S51D52AN   | diese Arbeit                |
| pSL-1043-S51D52MN                         | Derivat von pSL1180, enthält <i>hp1043</i> mit der Mutation S51D52MN   | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-1043-S51N-Cm                   | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich <i>hp1043</i> -S51N und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-1043-D52N-Cm                   | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich <i>hp1043</i> -D52N und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-1043-S51A-Cm                   | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich <i>hp1043</i> -S51A und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-1043-S51D52AN-Cm               | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich <i>hp1043</i> -S51D52AN und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-1043-S51D52MN-Cm               | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich <i>hp1043</i> -S51D52MN und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>hp1043</sub>                   | Derivat von pSL1180, enthält den Promotor P <sub>hp1043</sub>  | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>hp1043</sub> -1043-O           | wie pSL-P <sub>hp1043</sub> , enthält Fragment welche die Output-Domäne von HP1043 (1043-O) kodiert  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1043</sub> -1043-O-Cm | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp1043</sub> und 1043-O sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>hp1043</sub> -cj0355           | wie pSL-P <sub>hp1043</sub> , enthält zusätzlich <i>cj0355</i>   | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>hp1043</sub> -ws0306           | wie pSL-P <sub>hp1043</sub> , enthält zusätzlich <i>ws0306</i>   | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1043</sub> -cj0355-Cm | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp1043</sub> und <i>cj0355</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1043</sub> -ws0306-Cm | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp1043</sub> und <i>ws0306</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                |
| pSL-P <sub>cagA</sub> 1043                | Derivat von pSL1180, enthält Fusion aus P <sub>cagA</sub> und <i>hp1043</i>  | diese Arbeit                |



| Plasmid/Vektor                                    | Beschreibung  | Referenz/<br>Herkunft          |
|---|---|--------------------------------|
| pSL-cagACD-P <sub>cagA</sub> -1043-Cm             | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>cagA</sub> und <i>hp1043</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>cagA</sub> -1043-Kan            | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>cagA</sub> und <i>hp1043</i> sowie eine Kan <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>cagA2</sub>                            | Derivat von pSL1180, enthält einen verkürzten <i>cagA</i> -Promotor (P <sub>cagA2</sub> )   | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>cagA2</sub> -cj0355                    | wie pSL-P <sub>cagA2</sub> , enthält <i>cj0355</i>  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>cagA2</sub> -cj0355-Cm          | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>cagA2</sub> und <i>cj0355</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-1021  | Derivat von pSL1180, enthält das Gen für den RR HP1021  | Diplomarbeit<br>Jennifer Schär |
| pSL-cagA-P <sub>hp1018</sub>                      | Derivat von pSL1180, enthält den Promotor P <sub>hp1018</sub> und ein Fragment, das sich von <i>cagA</i> ableitet   | Dagmar Beier                   |
| pSL-cag-ACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47D-Cm     | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47D und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cag-ACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S48D-Cm     | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S48D und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cag-ACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48DD-Cm | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48DD und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47N-Cm      | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47N und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S48N-Cm      | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S48N und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48NN-Cm  | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48NN und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48AA-Cm  | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48AA und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48NL-Cm  | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48NL und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48MN-Cm  | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48MN und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48NA-Cm  | wie pSL-cagACD, enthält zusätzlich P <sub>hp1018</sub> -1021-S47S48NA und eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>hp1018</sub>                           | Derivat von pSL1180; enthält Promotorregion P <sub>hp1018</sub>   | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>hp1018</sub> Kpn                       | wie pSL-P <sub>hp1018</sub> ; am 3'-Ende von P <sub>hp1018</sub> wurde eine <i>KpnI</i> -Schnittstelle anstatt einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle eingeführt  | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>hp1018</sub> -1021-O                   | wie pSL-P <sub>hp1018</sub> , enthält Fragment welches die Output-Domäne von HP1021 (1021-O) kodiert  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -1021-O-Cm         | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp1018</sub> und 1021-O sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>hp1018</sub> -cj1608                   | wie pSL-P <sub>hp1018</sub> , enthält zusätzlich <i>cj1608</i>  | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>hp1018</sub> -ws1939                   | wie pSL-P <sub>hp1018</sub> , enthält zusätzlich <i>ws1939</i>  | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -cj1608-Cm         | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp1018</sub> und <i>cj1608</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>hp1018</sub> -ws1939-Cm         | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>hp1018</sub> und <i>ws1939</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                   |
| pSL-P <sub>cagA</sub> -R2                         | Derivat von pSL1180, enthält P <sub>cagA</sub> fusioniert mit <i>hp1021</i>   | Dagmar Beier                   |
| pSL-cagACD-P <sub>cagA</sub> -1021-Cm             | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>cagA</sub> und <i>hp1021</i> sowie eine Cm <sup>r</sup> -Kassette   | diese Arbeit                   |
| pSL-cagACD-P <sub>cagA</sub> -1021-Kan            | wie pSL-cagACD, enthält Fusion aus P <sub>cagA</sub> und <i>hp1021</i> sowie eine Kan <sup>r</sup> -Kassette  | diese Arbeit                   |
| pSL-pta/ackA::kan                                 | Derivat von pSL1180; „knock out“-Plasmid für <i>pta</i> und <i>ackA</i> ; enthält ein Fragment, das die ORF's <i>hp0900</i> und <i>hp0901</i> umfasst und ein Fragment das den ORF <i>hp0906</i> umfasst, die beiden Fragmente flankieren eine Kan <sup>r</sup> -Kassette | diese Arbeit                   |
| pSL-cj0355::kan                                   | Derivat von pSL1180; „knock out“-Plasmid für <i>cj0355</i> ; enthält zwei Fragmente, die jeweils einen Teil des Gens <i>cj1608</i> kodieren und eine Kan <sup>r</sup> -Kassette flankieren  | diese Arbeit                   |
| pSL-cj1608::kan                                   | Derivat von pSL1180; „knock out“-Plasmid für <i>cj1608</i> ; enthält zwei Fragmente, die jeweils einen Teil des Gens <i>cj0355</i> kodieren und eine Kan <sup>r</sup> -Kassette flankieren  | diese Arbeit                   |

### 3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (siehe Tab. 5) wurden von den Firmen Sigma ARK oder MWG Biotech synthetisiert.

Tab. 5: Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

<sup>a</sup> Großbuchstaben: *H. pylori*, *C. jejuni* bzw. *W. succinogenes*-Sequenzen

<sup>a</sup> Kleinbuchstaben: Sequenzen, die entweder für Klonierungszwecke angefügt wurden (Restriktionschnittstellen sind unterstrichen) oder zu Mutationszwecken geändert wurden

<sup>b</sup> bezogen auf die Genomsequenz von *H. pylori*, *C. jejuni* bzw. *W. succinogenes* (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997)

| Bezeichnung    | Sequenz (5´-3´) <sup>a</sup>  | Schnittstelle | Strang | Position <sup>b</sup> |
|----------------|---|---------------|--------|-----------------------|
| M13-universal  | CGACGGCCAGTGAATTGTAATACG  |               |        |                       |
| M13-reverse    | GGAAACAGCTATGACCATGATTACG   |               |        |                       |
| pQE-5          | CCC <span style="text-decoration: underline;">G</span> AAAAGTGCCACCTGAC |               |        |                       |
| pQE-3          | TCCAGTAATGACCCTAGATAG   |               |        |                       |
| kan2           | CCAGCTTATATACCTTAGCAG   |               |        |                       |
| HPkan3         | CTGGATGAATTGTTTTAGTACC  |               |        |                       |
| 5´-Cm-Kas-PstI | AGCTAGCTGCAGACGCACTACTCTCGACAG  | <i>PstI</i>   |        |                       |
| 3´-Cm-Kas-PstI | AGCTAGCTGCAGATTGCGTGATATAGATTG  | <i>PstI</i>   |        |                       |
| 3´cagA         | tctgctgagctcCCATAATCTTTGAGAGTGTAGCTC                                    | <i>SacI</i>   | -      | 581333-581356         |
| 5´cagA         | atgggcctgcaqGATGAATCCTTGAAGAAAGGC                                       | <i>PstI</i>   | +      | 580494-580515         |
| 5´cagD         | aaaattgaattcTAGATATACCGCTTCACATGTAAT                                    | <i>EcoRI</i>  | +      | 578188-578144         |
| 3´cagC         | tggttaggatccTCATTCTGTTCTAGCGATCGTAGG                                    | <i>BamHI</i>  | -      | 578924-578948         |
| cagCDseq       | GCTAACATAGCTATGGGTTGC   |               | +      | 578813-578832         |
| cagAseq2       | CTATATCTGGTTGGACATGG  |               | -      | 580637-580656         |
| Pcag3-1        | ttgaaaggtaccGTTAGTGTCAAAGACTGCTAAAAA                                    | <i>KpnI</i>   | -      | 579853-579878         |
| Pcag5´         | ataaagggatccCATTTTAGCAAATTTTTGTTAATT                                    | <i>BamHI</i>  | +      | 579674-579702         |
| Pcag3-2        | ttgaaaggtaccTCGCTACACACTTGAGTAATCAAT                                    | <i>KpnI</i>   | -      | 579834-579858         |
| Pcag3´         | ttgaaatctagaGTTAGTGTCAAAGACTGCTAAAAA                                    | <i>XbaI</i>   | -      | 579853-579878         |
| HP0166-32      | agaatactgcaqTCAGTATTCTAATTTATAACCAATCC                                  | <i>PstI</i>   | +      | 173778-173803         |
| HP0166-52      | agaaaggatccCCATGAAGCGTTTGGATTTGG  | <i>BamHI</i>  | -      | 174768-174788         |
| HP0166-D52N-1  | GATTTGTTGTTGTTGaATTGACTTTGCCTA  |               | -      | 174277-174308         |
| HP0166-D52N-2  | TAGGCAAAGTCAAATtCAACAACAACAATC  |               | +      | 174277-174308         |
| HP0166-seq2    | AAGATATTCGTATCGCCTGG  |               | +      | 174160-174180         |
| ER45           | tgaagtggatccGAAGTTTTAATGATAGAAGATGATATAG                                | <i>BamHI</i>  | -      | 174461-174489         |
| ER43           | cttattctgcaqTCAGTATTCTAATTTATAACCAATCC                                  | <i>PstI</i>   | +      | 173778-173803         |
| 0166ext        | AAAGCATTTTTTCAATCTTGCTA   |               | +      | 172901-172924         |
| HP0169         | GAAGGGCGCACCAAGTCCAGTTAC  |               | -      | 175939-175962         |
| P0166-5        | agtctaggatccTATTCCATGAAAACAAAGCC  | <i>BamHI</i>  | -      | 174616-174635         |
| P0166-3        | atgctatctagaCTGCAACTTTAAAAACGATTAAC                                     | <i>XbaI</i>   | +      | 174482-174504         |
| HP0166-O5      | aaaaatctagaaggaagagaataatggtgagtGAGCCAGGCGATACG                         | <i>XbaI</i>   | -      | 174063-174078         |
| WS1817-52      | aaaaatctagaaggaagagaataATGCTAGAGATTCTGATGATTGAG                         | <i>XbaI</i>   | +      | 1711876-1711899       |
| WS1817-32      | aaaaactgcaqGTGCCACAGCAAAGAGAATCG  | <i>PstI</i>   | -      | 1712592-1712612       |
| PE-WS1817      | CCTTGAGGTATTCGCTCAGGATGG  |               | -      | 1711919-              |

| Bezeichnung       | Sequenz (5´-3´) <sup>a</sup>                      | Schnittstelle | Strang | Position <sup>b</sup>   |
|-------------------|---|---------------|--------|-------------------------|
| PE2-WS1817        | CACTCATACCCGTGTAGGGTTTCG                          |               | -      | 1711942-1711971-1711993 |
| HP1043-K8D-1      | CCCAAAACAGAATTaTcTTCAATCAGTAGAACG                 |               | +      | 1105048-1105081         |
| HP1043-K8D-2      | CGTTCTACTGATTGAAgAtAATTCTGTTTTGGG                 |               | -      | 1105048-1105081         |
| HP1043-K8N9DD-1   | ACCCAAAACAGAATcaTcTTCAATCAGTAGAACG                |               | +      | 1105047-1105081         |
| HP1043-K8N9DD-2   | CGTTCTACTGATTGAAgAtgATTCTGTTTTGGGT                |               | -      | 1105047-1105081         |
| HP1043-seq5       | TTTACAACCAATAACCAAGGGC                            |               | -      | 1105520-1105542         |
| 5´ HP1043         | agccccgatccGATCGCATACCTTAGGCTTTTACC               | <i>BamHI</i>  | -      | 1105789-1105812         |
| 3´ HP1043         | aaaccactgcagTTACTCTTCACACGCCGTTTGGG               | <i>PstI</i>   | +      | 1104745-1104769         |
| HP1042            | GATTGCAGCGTTTATTACCAGGATA                         |               | +      | 1103899-1103924         |
| HP1044            | GCTTGGCAAACGCTCTGTTAGG                            |               | -      | 1107148-1107169         |
| HP1043-D52N-1     | CTTAGTTATGGTTAGTaATAAAAACGCTTTAAG                 |               | -      | 1104246-1104282         |
| HP1043-D52N-2     | CTTAAAGCGTTTTTATtACTAACCATAACTAAG                 |               | +      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51N-1     | CTTAGTTATGGTTAaTGATAAAAACGCTTTAAG                 |               | -      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51N-2     | CTTAAAGCGTTTTTATCAtTAACCATAACTAAG                 |               | +      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51A-1     | CTTAGTTATGGTTgcTGATAAAAACGCTTTAAG                 |               | -      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51A-2     | CTTAAAGCGTTTTTATCAgcAACCATAACTAAG                 |               | +      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51D52AN-1 | CTTAGTTATGGTTgcTaATAAAAACGCTTTAAG                 |               | -      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51D52AN-2 | CTTAAAGCGTTTTTATtAgcAACCATAACTAAG                 |               | +      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51D52MN-1 | CGACTTAGTTATGGTTATGAATAAAAACGC                    |               | -      | 1104246-1104282         |
| HP1043-S51D52MN-2 | CTTAAAGCGTTTTTATtcatTAACCATAAC                    |               | +      | 1104246-1104282         |
| P1043-3           | tatgacggtaccATTTAAGAGTAATTCAGGCAC                 | <i>KpnI</i>   | +      | 1105433-1105453         |
| HP1043-FO5´       | aaaaagggtaccaggaagtacaccatgtctaatgTGATTGAAATTGGG  | <i>KpnI</i>   | -      | 1105044-1105057         |
| 1043-PE           | AAAGCCTTTAACATTTAAGCC                             |               | -      | 1104803-1104823         |
| 1043cag52         | gtgcctggtaccCTCTTAAATGCAGGAGTCATACACC             | <i>KpnI</i>   | -      | 1105417-1105441         |
| WS0306-5          | aaaaagggtaccaggaagagaataATGCGAATCCTCATCATTGAAGATG | <i>KpnI</i>   | -      | 303873-303898           |
| WS0306-3          | aaaaactgcagTTATACTCCTTTGGGATAGC                   | <i>PstI</i>   | +      | 303227-303248           |
| PE-WS0306         | GCGACATCGTTTTGGTAGTTAAAT                          |               | +      | 303809-303832           |
| Cj0355-5          | aattttggtaccTAAGGATAGAACAAATGAGAATTT              | <i>KpnI</i>   | +      | 324149-324175           |
| Cj0355-3          | gaaggctgcagTTGTTAAGATTTTTAGGGAAGCA                | <i>PstI</i>   | -      | 324816-324838           |
| PE-Cj0355         | TCAGAAGAATCGGTTTGATAACCA                          |               | -      | 324231-324254           |
| Cj0355-12         | atgagagaattcGTTATAGAAGATGAGATTAGCC                | <i>EcoRI</i>  | +      | 324800-324821           |
| Cj0355-22         | taactaggatccCAATTTTAATAACATTGG                    | <i>BamHI</i>  | -      | 324455-324472           |
| Cj0355-32         | tataaaggatccGTCAAGATATAGAACTTA                    | <i>BamHI</i>  | +      | 324392-324409           |
| Cj0355-E5         | atagaaggatccAGAATTTTAGTTATAGAAGATGAG              | <i>BamHI</i>  | +      | 324807-324830           |
| HP1021-seq2       | CATTGAAGACGATTTAGCGC                              |               | +      | 1084147-1084167         |

| Bezeichnung       | Sequenz (5´-3´) <sup>a</sup>                                     | Schnittstelle | Strang | Position <sup>b</sup> |
|-------------------|--|---------------|--------|-----------------------|
| HP1020            | GGAATCTAGGCGTTTTCTCAAACCATCAA                                    |               | +      | 1083021-1083051       |
| HP1022            | ACGCATGTTTAAAAGAGCCTTTCTTTA                                      |               | -      | 1085977-1086003       |
| P1018-5           | ccttat <u>ggatcc</u> CCCTTTCTACCCTTTTGC                          | <i>BamHI</i>  | +      | 1081210-1081228       |
| P1018-3           | ctttgg <u>tctaga</u> TTAGCTCTGGATTTGGATATTGCC                    | <i>XbaI</i>   | -      | 1081210-1081228       |
| P1018-3´Kpn       | ctttggg <u>gtacc</u> TTAGCTCTGGATTTGGATATTGCC                    | <i>KpnI</i>   | -      | 1081210-1081228       |
| 5´HP1021          | ttagt <u>ctctaga</u> CATGTGAGCATGCGTTATAAA                       | <i>XbaI</i>   | +      | 1084077-1084098       |
| 3´HP1021          | caaaaa <u>ctgcag</u> AACAGGGCTTAAGGATTTTCTG                      | <i>PstI</i>   | -      | 1085030-1085050       |
| HP1021-S47D-1     | GATGTGATTTTAGTTgaTTCTAAAGTTTGCAC                                 |               | +      | 1084256-1084288       |
| HP1021-S47D-2     | GAGTGCAAACCTTTAGAAAtcAACTAAAATCACATC                             |               | -      | 1084256-1084289       |
| HP1021-S48D-1     | GATGTGATTTTAGTTTCTgaTAAAGTTTGCACCTC                              |               | +      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S48D-2     | GAGTGCAAACCTTTAtcAGAAACTAAAATCACATC                              |               | -      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48DD-1 | GATGTGATTTTAGTTgaTgaTAAAGTTTGCACCTC                              |               | +      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48DD-2 | GAGGTGCAAACCTTTAtcAtcAACTAAAATCACATC                             |               | -      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47N-1     | GATGTGATTTTAGTTaaTTCTAAAGTTTGCAC                                 |               | +      | 1084256-1084288       |
| HP1021-S47N-2     | GTGCAAACCTTTAGAAAttAACTAAAATCACATC                               |               | -      | 1084256-1084290       |
| HP1021-S48N-1     | GATGTGATTTTAGTTaaTTCTAAAGTTTGCAC                                 |               | +      | 1084256-1084288       |
| HP1021-S48N-2     | GTGCAAACCTTTAGAAAttAACTAAAATCACATC                               |               | -      | 1084256-1084290       |
| HP1021-S47S48NN-1 | GATGTGATTTTAGTTaaTaaTAAAGTTTGCACCT                               |               | +      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48NN-2 | CTTGAGTGCAAACCTTTAttAttAACTAAAATCACATC                           |               | -      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48AA-1 | GATGTGATTTTAGTTgcTgcTAAAGTTTGCACCTCAAG                           |               | +      | 1084256-1084295       |
| HP1021-S47S48AA-2 | CTTGAGTGCAAACCTTTAgcAgcAACTAAAATCACATC                           |               | -      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48NA-1 | GATGTGATTTTAGTTaaTgcTAAAGTTTGCACCTCAA                            |               | +      | 1084256-1084294       |
| HP1021-S47S48NA-2 | GAGTGCAAACCTTTAgcAttAACTAAAATCACATC                              |               | -      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48NL-1 | GATGTGATTTTAGTTaaTctTAAAGTTTGCACCTC                              |               | +      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48NL-2 | GAGTGCAAACCTTTAagAttAACTAAAATCACATC                              |               | -      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48MN-1 | GATGTGATTTTAGTTatgaaTAAAGTTTGCACCTC                              |               | +      | 1084256-1084291       |
| HP1021-S47S48MN-2 | GAGTGCAAACCTTTAttcatAACTAAAATCACATC                              |               | -      | 1084256-1084291       |
| HP1021-FO5´       | aaaaaa <u>ctaga</u> aggaagagaataatgGCCTACCAAGAAATGACCGC          | <i>XbaI</i>   | +      | 1084460-1084480       |
| 1021-PE           | ATTATGCGAAATACTCCTGGC  |               | -      | 1084169-1084189       |
| Cj1608-5          | accaatt <u>ctagag</u> attggacaagattATGAAAGTTTTAATTATTGAAAA<br>TG | <i>XbaI</i>   | +      | 1535886-1535911       |
| Cj1608-3          | tgcc <u>ctgcag</u> CCTTCTTAATAAGTGATAAGATGCC                     | <i>PstI</i>   | -      | 1536805-1536829       |
| Cj1608-22         | tttaat <u>ggatcc</u> CCTGTTGGATTTAATATCAATGG                     | <i>BamHI</i>  | -      | 1536378-1536402       |
| Cj1608RT          | ATGAATACAATGGTGAAA   |               | +      | 1535966-1535984       |
| Cj1608-RT3        | TGTATAAAATCTAGGAGTTTTTCC   |               | -      | 1536438-1536473       |
| PE-Cj1608         | TCAAACGAGTTAATAATTTACAG  |               | -      | 1535965-1535987       |
| PE2-Cj1608        | TCACCATTGTATTCATCAAACGAG   |               | -      | 1535958-              |

| Bezeichnung | Sequenz (5´-3´) <sup>a</sup>                         | Schnittstelle | Strang | Position <sup>b</sup>   |
|-------------|--|---------------|--------|-------------------------|
| Cj1608-12   | ttagatgaattcAATTTAGAATCAATGTTA                       | <i>EcoRI</i>  | +      | 1535984-1535772-1535790 |
| Cj1608-32   | tattttggatccAATTTTCAAGCATTAATA                       | <i>BamHI</i>  | +      | 1535951-1535970         |
| Cj1608-42   | tcggcagaqctcTTGGTGCAAAGCTTAAGG                       | <i>SacI</i>   | -      | 1536922-1536940         |
| WS1939-5    | tctctcggatccaggaagagaataATGCGTGTTTAATCGTTGAAAAT<br>G | <i>KpnI</i>   | -      | 1835610-1835635         |
| WS1939-32   | ctcttactgcagAACCTCTTGCATCTCTTTAGC                    | <i>BamHI</i>  | +      | 1834634-1834655         |
| PE-WS1939   | CTTCATTCACCAAAGAGACGATCT                             |               | +      | 1835529-1835552         |
| PE2-WS1939  | TATGAGCTGCTCCCTCAAAG                                 |               | +      | 1835509-1835529         |
| HP0900-12   | gttattggatccAGATTCTTGTCGTTGTTTCGC                    |               | +      | 952796-952816           |
| HP0900-22   | aaaattctgcagATCCAAATTTTACGCATCCC                     |               | -      | 953522-953542           |
| HP0906-13   | gggcgactgcagGCGACTTTTTGATAGCGTGCC                    |               | +      | 956128-956149           |
| HP0906-22   | tgatctgagctcGGATTTTGAGCATGTTGGTGG                    |               | -      | 956743-956764           |

#### 4. Proteine

Tab. 6: Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine

| Bezeichnung  | Herkunft         |
|--|------------------|
| BvgA <sub>petrii</sub>                               | Simone Janzen    |
| HP0165 (mit N-terminalem GST-tag)                    | Dagmar Beier     |
| HP0166 (mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag)      | Dagmar Beier     |
| HP1365 (mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag)      | Dagmar Beier     |
| HP1043 (mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag)      | Dagmar Beier     |
| HP1021-R (Receiver Domäne von HP1021)                | Dagmar Beier     |
| AS 3-118 mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag)     |                  |
| HP1021-O (Output-Domäne von HP1021)                  | Gabriele Gerlach |
| AS 104-298 mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag)   |                  |
| HP0166-D52N (mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag) | diese Arbeit     |
| HP1021 (mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag)      | diese Arbeit     |
| CJ0355 (mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag)      | diese Arbeit     |

#### 5. Antikörper

Tab. 7: Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

| Bezeichnung      | Herkunft                        |
|------------------|---------------------------------|
| anti-HP1021      | diese Arbeit                    |
| anti-HP1043      | Isabel Delany und Enzo Scarlato |
| anti-HP0166      | diese Arbeit                    |
| goat anti-rabbit | Dianova                         |
| goat anti-mouse  | Dianova                         |

#### 6. Verbrauchsmaterialien

##### 6.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth, Bioproducts, Boehringer Mannheim, Serva, Aldrich, Fluka, Oxoid, Riedel de Haen und Sigma bezogen. Nährstoffe und Agar wurden von Difco und Gibco geliefert. Die Radiochemikalien wurden von Amersham Biosciences und ICN bezogen.

## 6.2 Enzyme

DNA-Ligasen, Polymerasen, Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden mit den dazugehörigen Puffern von den Firmen Amersham Biosciences, Q-Biogene, Boehringer Mannheim, New England Biolabs, Promega, Stratagene, Roche, Genaxxon und MBI Fermentas geliefert.

## 6.3 Sonstiges

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden die Kits von Qiagen bzw. Macherey & Nagel, zur Aufreinigung von PCR-Produkten das „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen verwendet. Für die Einführung von Mutationen wurde der QuikChange™ Site-Directed Mutagenese Kit von Stratagene verwendet. Beim Zellaufschluss zum Zwecke der Proteinreinigung wurde das BugBuster-Reagenz der Firma Novagen eingesetzt.

## 7. Wachstumsmedien und Zusätze

Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurden für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden sterilfiltrierte, hitzelabile Substanzen zugegeben. Glasgeräte wurden 3 h bei 180 °C trocken sterilisiert.

### 7.1 Medien und Agarplatten für *E. coli*

|                            |                   |        |
|----------------------------|-------------------|--------|
| LB-Medium (Luria-Bertani): | Bactotrypton      | 10 g   |
|                            | Hefe-Extrakt      | 5 g    |
|                            | NaCl              | 10 g   |
|                            | dH <sub>2</sub> O | ad 1 l |
| LB-Agarplatten:            | LB-Medium         |        |
|                            | Agar              | 15 g/l |

### 7.2 Medien und Agarplatten für *H. pylori*

|                       |                       |        |
|-----------------------|-----------------------|--------|
| Columbia-Agarplatten: | Columbia-Agar (Gibco) | 44 g   |
|                       | dH <sub>2</sub> O     | 970 ml |

Die Agarlösung wird autoklaviert, auf ca. 50 °C abgekühlt, 5 % defibriniertes Pferdeblut, 2,9 ml Antibiotika-Mix und 1 ml Cycloheximid-Lösung (100 mg/ml in Aceton) steril zugegeben. Die Agarlösung wird gemischt und es werden Platten gegossen.

|                  |        |  |
|------------------|--------|--|
| Antibiotika-Mix: | 0,5 ml | Vancomycin (Stocklösung 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O, bei 4 °C gelagert)       |
|                  | 1 ml   | Trimethoprim (Stocklösung 10 mg/ml in N,N Dimethylformamid, bei 4 °C gelagert) |
|                  | 0,6 ml | Cefsulodin (Stocklösung 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O, bei 4 °C gelagert)       |
|                  | 0,8 ml | Amphotericin B (Stocklösung 10 mg/ml in Dimethylsulfoxid, bei -20 °C gelagert) |

|                              |   |        |
|------------------------------|---|--------|
| Brucella-Medium:             | Brucella Broth (Difco)                    | 28 g   |
|                              | dH <sub>2</sub> O                         | ad 1 l |
| Medium für Glycerinkulturen: | Brucella Medium                           | 80 ml  |
|                              | 20 % Glycerin                             | 20 ml  |
| Medium für Flüssigkulturen:  | BHI-Medium                                | 450 ml |
|                              | Nach dem Autoklavieren steril hinzugeben: |        |
|                              | FCS                                       | 50 ml  |
|                              | Antibiotika-Mix (s.o.)                    | 1,4 ml |

### 7.3 sonstige Medien

|                                    |                         |         |
|------------------------------------|-------------------------|---------|
| SOB-Medium:                        | Bactotrypton            | 20 g    |
|                                    | Hefeextract             | 5 g     |
|                                    | NaCl                    | 0,5 g   |
| Nach dem Autoklavieren hinzugeben: | 10 mM MgCl <sub>2</sub> | 5 ml    |
|                                    | 10 mM MgSO <sub>4</sub> | 5 ml    |
|                                    | 2 mM KCl                | 1,25 ml |

|             |                                     |                 |
|-------------|-------------------------------------|-----------------|
| SOC-Medium: | SOB-Medium<br>20 %ige Glucoselösung | 10 ml<br>200 µl |
|-------------|-------------------------------------|-----------------|

#### 7.4 Medienzusätze

| Antibiotikum         | Stammlösung                   | Endkonzentration   |
|----------------------|-------------------------------|--|
| Ampicillin (Amp)     | 50 mg/ml in dH <sub>2</sub> O | 100 µg/ml in LB-Agar<br>100 µg/ml in LB-Medium   |
| Kanamycin (Kan)      | 50 mg/ml in dH <sub>2</sub> O | 50 µg/ml in LB-Agar<br>50 µg/ml in LB-Medium<br>20 µg/ml in Columbia-Agar<br>20 µg/ml in mod. BHI-Medium |
| Chloramphenicol (Cm) | 30 mg/ml in Ethanol           | 30 µg/ml in LB-Agar<br>20 µg/ml in Columbia-Agar<br>20 µg/ml in mod. BHI-Medium                          |

### 8. Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gelelektrophorese

#### DNA-Marker von Gibco:

1 kb-Leiter:

Hergestellt aus einem Plasmid, das Wiederholungen eines 1018 bp Fragments enthält und zusätzlich aus Vektorfragmenten von 75 bp bis 1636 bp Länge.

|                 |         |         |         |         |         |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fragmentlängen: | 9162 bp | 8144 bp | 7126 bp | 6108 bp | 5090 bp |
|                 | 4072 bp | 3054 bp | 2036 bp | 1636 bp | 1018 bp |
|                 | 506 bp  | 396 bp  | 344 bp  | 298 bp  | 220 bp  |
|                 | 201 bp  | 145 bp  | 134 bp  | 75 bp   |         |

#### DNA-Marker von MBI:

1 kb-Leiter

Hergestellt aus sechs verschiedenen Plasmiden, die pUC, λ-Phagen und Sequenzen aus dem Hefe-Genom enthalten die individuell mit angemessenen Restriktionsendonucleasen geschnitten wurden.

|                 |          |         |         |         |         |
|-----------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Fragmentlängen: | 10000 bp | 8000 bp | 6000 bp | 5000 bp | 4000 bp |
|                 | 3000 bp  | 2500 bp | 2000 bp | 1500 bp | 1000 bp |
|                 | 750 bp   | 500 bp  | 250 bp  |         |         |

### 9. Geräte

|                        |   |
|------------------------|---|
| Anaerobiertopf:        | Oxoid   |
| Autoklaven:            | Webeco  |
| Begasungsschrank       | Nunc Cellstar   |
| Brutschränke:          | Heraeus   |
| Bunsenbrenner:         | Hartenstein   |
| Clean-Benches:         | NuAire™; GelAire  |
| Elektrophoresekammern: | BioRad; institutseigene Werkstatt   |
| Elektroporationsgerät: | Micro Pulser, BioRad  |
| Filme:                 | Fuji RX Röntgenfilme; X-Ray Retina  |
| French Press:          | SLN-Aminco  |
| Geigerzähler:          | Berthold; Herfurth  |
| Geltrockner:           | BioRad; Biometra  |
| Heizblöcke:            | Eppendorf-Thermostat 5320; Liebisch 2099 DA   |
| Impfösen:              | LP Italiana Spa; Nunc   |
| Kamera:                | Nikon F2  |
| Kühlschrank:           |   |
| Magnetrührer:          | Gerhardt; M32 von GLW   |
| Mikrowellengerät:      | AEG; AFK  |
| Netzgeräte:            | Biorad Modell 1000/500; Consort E452; Pharmacia   |
| PCR-Thermocycler:      | Biomed, Thermocycler 60; Progene Techne; T3 Thermocycler Biometra   |
| pH-Meter               | Wiss.-Tech.-Werkstätten (WTW Weilheim) pH 523, Hartenstein  |
| PhosphorImager:        | Molecular Dynamics  |
| Photometer:            | Pharmacia, Gene Quant II, Ultrospec III; Klett Summerson; Zeiss, Spektralphotometer PM6, Spektralphotometer DM4 |
| Pipetten:              | Gilson; Eppendorf   |
| Röntgenfilmentwickler: | Kodak M35 X-Omat Processor  |
| Röntgenfilmkassette:   | Dr. Goos Suprema  |
| Schüttelinkubator:     | Infors AG, Edmund Bühler  |
| Speedvac:              | Eppendorf, Concentrator 5301; Uni Equip, Univapo  |

|                      |  |
|----------------------|--|
| Taumler:             | Heidolph; Edmund Bühler                        |
| UV-Transilluminator: | Vilber Lourmat                                 |
| Vakuumpumpe:         | Neuberger                                      |
| Videoprinter:        | Sony UP 860 CE                                 |
| Vortexer:            | Heidolph Reax 2000                             |
| Waagen:              |  |
| Feinwaage:           | KERN & Sohn GmbH                               |
| Grobwaage:           | KERN & Sohn GmbH                               |
| Wasserbad-Inkubator: | WTE var 3185 Assistent                         |
| Westernblot Kammer:  | Biotec Fischer                                 |
| Zentrifugen:         |  |
| Kühlzentrifuge:      | Beckmann J2-21 mit JA10, JA14, JA20 und JA25,5 |
| Festwinkelrotoren:   | Heraeus Minifuge RF<br>Eppendorf 5417R         |
| Tischzentrifugen:    | Heraeus Biofuge 13 und 15<br>Eppendorf 5415 C  |



## D. Methoden

### 1. Arbeiten mit Bakterien

#### 1.1 Anzucht von *H. pylori* (bzw. *C. jejuni*)

##### 1.1.1 Anzucht von *H. pylori* (bzw. *C. jejuni*) auf Columbia Blutagarplatten

Bakterien einer bei -80 °C tiefgefrorenen Glycerinkultur werden auf eine Columbia Blutagarplatte aufgetragen und zunächst für zwei bis drei Tage in einer mikroaerophilen Atmosphäre (Oxid-Gasgenerations-Kit) in einem Anaerobiertopf bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien, die zum Auftauen auf ca. 1/4 - 1/3 der Platte aufgetragen wurden, auf die Gesamtfläche einer neuen Columbia Blutagarplatte überstrichen und wiederum für zwei Tage unter mikroaerophilen Bedingungen im Anaerobiertopf bei 37 °C inkubiert.

##### 1.1.2 Anzucht von *H. pylori* in Flüssigkultur

Bakterien einer konfluent bewachsenen Platte werden in 1 ml modifiziertem BHI-Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wird nun in ein Greinerröhrchen, das 50 ml vorgewärmtes modifiziertes BHI-Medium enthält, soviel Zellmaterial gegeben, dass die OD<sub>550</sub> der Kultur zwischen 0,05 und 0,1 liegt. Diese Zellsuspension wird nun in eine 200 ml Filterdeckel-Zellkulturflasche (Corning Incorporated) überführt und diese in den Anaerobiertopf gegeben, in dem mikroaerophile Bedingungen generiert werden. Der Topf wird auf einem Schüttler bei ca. 115 rpm über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,8-1,0 wird die Bakterienkultur in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt. Sollen die Bakterien anschließend für eine RNA-Isolierung verwendet werden, sollte das Greinerröhrchen zusätzlich 2 ml EtOH und 125 µl Phenol (vorgekühlt auf -20 °C) enthalten. Die Bakteriensuspension wird abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min), der Überstand wird abgenommen und das verbliebene Pellet wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Pellet kann bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert werden.

Bevor das Pellet für die weitere Verarbeitung verwendet werden kann, muss die Kultur auf eine mögliche Kontamination überprüft werden. Dafür werden der LB- und der Urease-Test durchgeführt.

Beim LB-Test werden ca. 5 µl der Flüssigkultur entnommen und auf eine LB-Platte ausgestrichen. Die Platte wird ca. 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Bei einer Kontamination sollten evtl. vorhandene Bakterien oder Pilze auf dem Vollmedium wachsen. *H. pylori*, ein mikroaerophiles Bakterium, kann unter diesen Bedingungen nicht wachsen.

Beim Urease-Test wird ca. 1 ml Flüssigkultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap pipettiert. Die Zellen werden für 3 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wird abgenommen. Zu dem verbliebenem Pellet werden 1 ml Phosphatpuffer (3 mM), 15,6 µl Harnstoff (7 M) und 1,75 µl Phenolrot (4 mg/ml) gegeben und das Pellet durch Vortexen in dem Gemisch resuspendiert. Mit diesem Test wird die Aktivität des Enzyms Urease, das von *H. pylori* gebildet wird nachgewiesen. Das Enzym ist in der Lage ist, die Hydrolyse von Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid zu katalysieren. Der entstandene Ammoniak diffundiert in das Periplasma und wird dort zu Ammonium protoniert. Dieser pH-Wert Umschlag in Richtung basisch wird durch einen Farbumschlag der Lösung von blass-rot nach pink indiziert. Allerdings kann mit diesem Test nur eine starke Kontamination erkannt werden, da der Farbumschlag nur dann nicht stattfindet, wenn *H. pylori* vollständig von anderen Mikroorganismen überwachsen ist.

### 1.2 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier, gelöster DNA durch eine kompetente Empfängerzelle. Man unterscheidet natürlich kompetente Bakterien von solchen, die erst durch eine bestimmte Behandlung kompetent gemacht werden müssen.

#### 1.2.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* Zellen

*E. coli* ist ein Bakterium, das nicht natürlich kompetent ist. Um diese Bakterien kompetent zu machen unterzieht man sie einer CaCl<sub>2</sub>-Behandlung. Man impft zunächst eine Übernacht-Kultur von *E. coli* DH5α (oder *E. coli* M15) in 10 ml LB-Medium an. Am nächsten Tag werden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der *E. coli*-Übernachtkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,3-0,6 bei 37 °C inkubiert. Bei dieser OD befindet sich *E. coli* in der Phase des exponentiellen Wachstums. Die Zellen werden anschließend 15 min auf Eis inkubiert und durch einen 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 6000 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Bakterienpellet wird in 1/5 Volumen eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und die Suspension wird für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut abzentrifugiert, in 1/10 Volumen eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 20 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 100-300 µl bei -80 °C gelagert.

#### 1.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zu 50-200 µl auf Eis aufgetauter CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen werden 20-200 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes zupipettiert. Der Ansatz wird zunächst 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wird die Suspension 90 sec auf 42 °C erhitzt, 2 min auf Eis stehengelassen und schließlich in 1 ml LB-Medium überführt. Die Ansätze werden nun mindestens 60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Während dieser Phase werden die Plasmid-

kodierten Resistenzgene exprimiert. Ein sofortiges Ausplattieren auf Antibiotika-haltigen Platten würde zu einem Abtöten der Transformanten führen. Die Ansätze werden anschließend abzentrifugiert und das Medium bis auf ca. 100 µl verworfen. Die Zellen werden dann resuspendiert und vollständig oder in unterschiedlichen Verdünnungen auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

### 1.2.3 Transformation von natürlich kompetenten *H. pylori* (bzw. *C. jejuni*)-Stämmen

Manche Stämme von *H. pylori*, wie z. B. *H. pylori* G27, sind natürlich kompetent und können Fremd-DNA ohne Vorbehandlung aufnehmen. Dazu werden Bakterien einer logarithmischen Plattenkultur punktförmig auf eine frische Columbia Blutagarplatte ausgestrichen und für 5 h in einer 5 %igen Kohlendioxid-Atmosphäre im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Währenddessen werden 5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA präzipitiert (vgl. D 2.1.4), in 10 µl Brucella-Medium aufgenommen und schließlich auf die Bakterien gegeben. Der Ansatz wird mit einer sterilen Plastikimpföse gemischt und über Nacht bei 37 °C weiter im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien geerntet und auf Blutagarplatten mit den entsprechenden Antibiotika überstrichen. Nach 4-5 Tagen Inkubation im Anaerobiertopf unter mikroaerophilen Bedingungen können Einzelkolonien für weitere Analysen auf frische Agarplatten überimpft werden. Die Einzelkolonien werden Dreieck-förmig auf eine frische Blutagarplatte überstrichen (etwa 10 pro Platte) und für weitere 2 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien-„Bäumchen“ auf jeweils eine halbe Blutagarplatte überstrichen. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C können die Bakterien in Brucella-Medium mit 20 % Glycerin resuspendiert und bei -80 °C eingefroren werden.

### 1.2.4 Transformation von *H. pylori* (bzw. *C. jejuni*) mittels Elektroporation

Nicht alle *H. pylori* Stämme sind natürlich kompetent, bzw. bei manchen Stämmen ist es von Vorteil die Transformation mittels Elektroporation durchzuführen, um eine höhere Transformationsrate zu erhalten, z.B. bei dem Stamm *H. pylori* 26695.

Bei der Elektroporation wird mit Hilfe des Micro-Pulsers (BIO-RAD) ein elektrisches Feld angelegt (25 F; 2,5 kV; 200 Ω; 4-5 ms). Innerhalb solch eines Feldes verhält sich die Zellmembran wie ein Kondensator, der bis zu einer bestimmten Spannung aufgeladen werden kann. Wird diese kritische Spannung überschritten, so reißt die Zellmembran reversibel auf. Über diese entstandenen „Löcher“ kann nun die Fremd-DNA in die Zelle gelangen.

Es werden *H. pylori* Zellen einer konfluent bewachsenen Columbia-Blutagarplatte in 200 µl 15 %iger Glycerin- und 9 %iger Sucrose-Lösung resuspendiert. Von diesen 200 µl wird nun ein Aliquot von 50-100 µl für die Elektroporation eingesetzt, je nach Menge an vorhandenen Bakterien. Dazu werden 0,5 µg Plasmid-DNA gegeben (in weiteren Ansätzen kann die Menge an eingesetzter Plasmid-DNA gegebenenfalls variiert werden). Die Zellen mit der zugegebenen Fremd-DNA werden für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine auf -20 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wird in der Elektroporations-Apparatur auf ihre Position zwischen die beiden Elektroden gebracht und das elektrische Feld wird angelegt. Nach dem elektrischen Puls werden die Bakterien möglichst zügig in 100 µl SOC-Medium überführt und auf Columbia Blutagarplatten ohne Antibiotika ausplattiert. Die Platten werden für 48 h unter mikroaerophilen Bedingungen im Anaerobiertopf bei 37 °C inkubiert. Während dieser 48 h können die Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, dieses mittels Rekombination in ihr Genom einbauen. Die verwendeten Plasmide tragen zwischen den Bereichen, über die eine homologe Rekombination stattfinden kann, noch andere DNA-Fragmente, unter anderem auch Gene für die Antibiotika-resistenz, die als Selektionsmarker wirken. Nach Einbau in das bakterielle Chromosom werden die Resistenzgene exprimiert und das Bakterium ist resistent gegen das Selektionsantibiotikum. Nach 48 h werden die Bakterien, die mittlerweile einen Zellrasen ausgebildet haben, von der Platte abgenommen und in 500 µl Brucella-Medium resuspendiert. Davon werden je 3 x 100 µl und 1 x 200 µl auf 4 Columbia Blutagarplatten ausplattiert, die das entsprechende Selektionsantibiotikum beinhalten, und diese Platten werden für 5 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen im Anaerobiertopf bei 37 °C inkubiert. Falls die Transformation erfolgreich war, erhält man Einzelkolonien, mit denen im weiteren Verlauf verfahren wird, wie bei der natürlichen Transformation von *H. pylori* (vgl. D 1.2.3).

## 2. Molekulargenetische Methoden

### 2.1 Isolierung von DNA

#### 2.1.1 Minipräparation chromosomaler *H. pylori*-DNA (bzw. *C. jejuni*-DNA)

|             |                       |
|-------------|-----------------------|
| STE-Puffer: | 100 mM NaCl           |
|             | 10 mM Tris-HCl pH 8,0 |
|             | 1 mM EDTA             |

Die Bakterienmasse einer konfluent mit *H. pylori* bewachsenen Columbia Blutagarplatte (siehe D 1.1.1) wird abgenommen und in 1,5 ml STE-Puffer resuspendiert, die Zellen sedimentiert (10000 rpm, 5 min) und der Überstand entfernt. Das Pellet wird in 350 µl STE-Puffer aufgenommen und gut gemischt.

Es werden 4 µl Lysozym-Lösung (100 mg/ml) sowie 4 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 17,5 µl 10 % SDS dazugegeben, der Ansatz wird gut gemischt und 15 min bei 65 °C inkubiert. Nachdem man 5 µl ProteinaseK-Lösung (100 mg/ml) zugegeben hat, wird der Ansatz 2 h bei 50 °C inkubiert. Um Protein und Zelltrümmer zu entfernen wird zweimal mit 400 µl Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) extrahiert. Mit 2,5 Vol. 100 %igem EtOH wird die DNA gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert und

anschließend mit 70 %igem EtOH gewaschen. Das Pellet wird im Vakuum getrocknet und in einer geeigneten Menge dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wird die DNA bei -20 °C gelagert.

### 2.1.2 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (Myakishev et al., 1995)

- Lösung 1: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
50 mM Glucose  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA
- Lösung 2: 0,2 M NaOH  
1 % SDS
- Lösung 3: 3 M Kaliumacetat (pH 4,8)
- Bindemix: 5 M Guanidiniumchlorid  
4 % (w/v) Triton-X-100  
25 mg/ml Silica

Von einer *E. coli*-Übernachtskultur werden 3 ml bei 14000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert, das Sediment anschließend in 100 µl Lösung 1 resuspendiert, und mit dem gleichem Volumen Lösung 2 versetzt. Um die RNA-Degradation während der Zell-Lyse zu erhöhen, kann dem Resuspensionspuffer RNase A in einer Konzentration von 100 µg/ml zugefügt werden. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 100 µl Lösung 3 zugesetzt und nach gutem Durchmischen wird der Ansatz wiederum 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Chromosomale DNA und Zelltrümmer werden durch 3-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm abgetrennt. Der Plasmid-haltige Überstand wird in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 800 µl Bindemix versetzt und gut gemischt. Glasmilch besitzt eine große Affinität zu DNA bei hohen Salzkonzentrationen und setzt sie bei niedrigen wieder frei. Im darauf folgenden 3-minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur bindet die Plasmid-DNA an die Silica-Matrix. Die folgenden Zentrifugationsschritte sind 30 sec lang und werden bei 5000 rpm durchgeführt. Die DNA wird zweimal mit je 1 ml 50 %igem Ethanol gewaschen. Bei dieser Ethanol-Konzentration entfernt man zusätzlich noch RNA aus dem Sediment. Nach Trocknung des Sediments unter Vakuum wird die DNA in 30 µl dH<sub>2</sub>O durch Resuspendieren und anschließendes 3-minütiges Erhitzen auf 65 °C von der Silica-Matrix gelöst. Die Glasmilch wird durch Zentrifugation pelletiert und die gelöste Plasmid-DNA für nachfolgende Schritte in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit der so gewonnenen Plasmid-DNA können nun analytische Untersuchungen, wie z.B. ein Restriktionsverdau, PCR oder Sequenzierung durchgeführt werden.

### 2.1.3 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab

Die Plasmidpräparation im präparativen Maßstab wurde mit Hilfe des NucleoBond AX Plasmid DNA Purification-Kits von MACHERY-NAGEL durchgeführt. Um die Zellen für die Plasmid-Aufreinigung vorzubereiten, wird eine modifizierte-alkalische-SDS-Lyse-Prozedur angewandt. Die Isolierung der Plasmid-DNA beruht auf einer Anionen-Austausch-Chromatographie. Dabei sind funktionelle Methyl-Ethylamin-Gruppen an Silica-Beads gekoppelt. An diese positiv geladenen funktionellen Gruppen können beim Durchfluss durch das Säulchen die negativ geladenen Plasmid-Moleküle binden. Durch einen Waschschrift wird dann erreicht, dass sich nur noch Plasmid-DNA an der Matrix befindet, und diese Plasmid-DNA wird während des darauf folgenden Elutionsschritts von der Matrix gelöst.

|             |                             |   |
|-------------|-----------------------------|---|
| S1-Puffer:  | 10 mM<br>50 mM<br>100 µg/ml | Na <sub>2</sub> -EDTA<br>Tris-HCl, pH 8,0<br>Ribonuklease A         |
| S2-Puffer:  | 200 mM<br>1 %               | NaOH<br>SDS   |
| S3-Puffer:  | 2,60 M                      | Kaliumacetat, pH 5,2  |
| N2-Puffer:  | 0,90 M<br>100 mM<br>15 %    | KCl<br>Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,3<br>Ethanol p.a. |
| N3-Puffer : | 1,15 M<br>100 mM<br>15 %    | KCl<br>Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,3<br>Ethanol p.a. |
| N5-Puffer:  | 1,00 M<br>100 mM<br>15 %    | KCl<br>Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,5<br>Ethanol p.a. |

50 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur werden in einem Greinerröhrchen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4 °C) und das Sediment wird in 4 ml S1-Puffer aufgenommen. Zur alkalischen Lyse wird die Suspension mit 4 ml S2-Puffer vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasen, vermischt und der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 5-6 maliges Invertieren wird die Suspension mit 4 ml eiskaltem S3-Puffer vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA werden über einen Papierfilter abgetrennt, wobei der klare, Plasmid-haltige

Überstand auf die zuvor mit 2,5 ml N2-Puffer äquilibrierte AX-100-Säule geladen wird. Nach einem Waschschrift mit 10 ml N3-Puffer wird die Plasmid-DNA mit 2 ml N5-Puffer von der Säule eluiert. Um die DNA aus dem Elutionspuffer aufzureinigen, wird sie mit 0,7 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und 30 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen dH<sub>2</sub>O gelöst. Konzentration und Reinheit werden wie unter D 2.1.5 beschrieben, bestimmt.

#### 2.1.4 EtOH-Fällung von Plasmid-DNA

Bei der EtOH-Fällung wird die DNA gefällt, indem man 2,5 Volumen eiskaltes EtOH (100 %) und 1/10 Volumen NaAc pH 4,2 zu der DNA enthaltenden Lösung gibt. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 30 min, 4 °C) erhält man ein Pellet, indem sich die DNA befindet. Dieses Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen (14000 rpm, 10 min, 4 °C) und anschließend in der Speed-vac getrocknet. Das Pellet wird dann in einem geeigneten Volumen dH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Probe wird 1:100 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und ihre Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration wird anhand folgender Formel berechnet:

DNA-Konzentration (µg/ml):  $OD_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$

Der Quotient  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  gibt dabei den Reinheitsgrad der Probe an und sollte zwischen um 1,85 liegen.

### 2.2 Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

#### 2.2.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

|                   |  |
|-------------------|--|
| 10 x TBE-Puffer:  | 890 mM Tris-HCl<br>890 mM Borsäure<br>2 mM EDTA                        |
| 2,5 x HSE-Puffer: | 4 M Harnstoff<br>50 mM EDTA<br>50 % Saccharose<br>0,1 % Bromphenolblau |

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern entsprechend ihrer Ladung in einem Gel, an das Spannung gelegt wird, zur positiv geladenen Kathode. Dabei wandern kleine Moleküle schneller als große Moleküle, da das Agarose-Gel ein Netzwerk bildet, durch dessen Poren die kleinen Moleküle besser hindurchgelangen können. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl ihrer Basenpaare, wenn bei der Elektrophorese ein Spannungsgradient von 5 V/cm nicht überschritten wird. Mit einem 1 %igen Agarose-Gel erreicht man eine optimale Auftrennung für Fragmente einer Länge von 1-10 kb. Möchte man kürzere Fragmente auftrennen, muss man die Agarose-Konzentration erhöhen. Die Maschen im Agarose-Gel werden dadurch enger, auch kleine Fragmente werden durch das dichtere Netz besser zurückgehalten und zeigen nun ein unterschiedliches Laufverhalten. Die gewünschte Menge an Agarose wird in 1 x TBE-Puffer gegeben, die Flasche kurz geschwenkt und die Suspension anschließend aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Agarose-Lösung wird in einen Gelschlitten, in dem sich die Kämme für die Taschen befinden, gegossen. Anschließend lässt man das Gel bei RT auspolymerisieren. Nun werden die Kämme vorsichtig entfernt, das Gel mitsamt dem Schlitten in die Gelkammer gegeben, in der ausreichend 1 x TBE-Puffer vorhanden ist, so dass es vollständig bedeckt ist. Die DNA-Lösung wird mit 2/3 Volumen 2,5 x HSE versetzt und das Gemisch in die Taschen pipettiert. Nun wird eine Spannung von ca. 150 V für 20-40 min angelegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Lauffront, also die des Farbstoffs Bromphenolblau, entspricht der Wanderungsgeschwindigkeit eines DNA-Fragments von 100-200 bp Länge. Gleichzeitig mit der DNA wird noch ein Längenmarker neben der Probe aufgetragen, so dass die Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden kann. Die DNA-Fragmente werden durch den Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht, der in die DNA interkaliert und unter UV-Licht orange leuchtet, und können mit Hilfe eines Videoprinters photographiert werden. Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wird hauptsächlich angewendet, um bei PCR-Reaktionen und Kontroll-verdaus zu überprüfen, ob die erhaltenen Fragmente die richtige Größe besitzen. Manchmal ist es jedoch auch nötig aus einem Gemisch von zwei oder mehr DNA-Fragmenten ein spezifisches Fragment zu isolieren, und die Elektrophorese trennt zunächst die einzelnen Fragmente entsprechend ihrer Länge auf. Auch RNA kann mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid und UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gelextraktionskit von QIAGEN

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge in einem Agarosegel (D 2.2.1), wird das gewünschte Fragment unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines scharfen, sauberen

Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten, wobei darauf zu achten ist, dass die DNA dem schädigenden UV-Licht möglichst kurz ausgesetzt wird. Weiterhin ist darauf zu achten, den nicht DNA-haltigen Agarosegel-Bestandteil zu minimieren. Das isolierte Fragment wird in ein 2 ml Eppendorf-Cap überführt, abgewogen und mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer bedeckt. Dabei entspricht die Masse eines Gelstücks von 100 mg mit einer Dichte von 1 g/ml einem Volumen von 100 µl. Um die DNA aus dem Agarosegel zu lösen, wird das Gel für 10 min auf 50 °C erhitzt, wobei das Cap gelegentlich gevortext wird. Wenn das Gel vollständig gelöst ist, wird ein Gelvolumen Isopropanol zupipettiert und der Ansatz auf ein Qiaquick-Säulchen gegeben, das in einem 2 ml Auffangröhrchen steckt. Das Säulchen wird nun zentrifugiert (1 min, 14000 rpm, RT), wobei die negativ geladene DNA an die positiv geladene Matrix im Säulchen bindet und der QG-Puffer in das Auffangröhrchen gelangt. Im nächsten Schritt wird das Säulchen mit 750 µl Waschpuffer gewaschen. Dieser entfernt noch vorhandene Agarose- und QG-Pufferreste aus dem Säulchen. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (1 min, 14000 rpm, RT), der für die Trocknung des Säulchens und das vollständige Entfernen aller EtOH-Reste des Waschpuffers nötig ist, wird die DNA mit 30-50 µl Elutionspuffer bzw. dH<sub>2</sub>O eluiert. Durch eine zweimalige Elution kann die absolute Ausbeute an DNA erhöht werden, die Konzentration nimmt jedoch ab. Mit dem QIAquick-Geleextraktionskit können Fragmente von 70 bp bis 10 kb aus einem Agarosegel aufgereinigt werden.

## 2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.3.1 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Beim Restriktionsverdau macht man sich die Eigenschaften prokaryotischer Enzyme, der Restriktionsendonukleasen zunutze, die Teil des Restriktions-Modifikationssystems von Bakterien sind. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen, die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, oft Palindromen, durch Lösen von je einer Phosphodiesterbindung in jedem Strang spalten, kann Fremd-DNA abgebaut werden. Die eigene DNA ist an diesen Erkennungsmotiven durch Modifikationen geschützt. Im Labor werden diese Restriktionsendonucleasen eingesetzt, um DNA an definierten Stellen zu spalten.

Ein typischer Restriktionsansatz enthält DNA in einer Konzentration von 0,1-1 µg/µl und weist ein Gesamtvolumen von 10-200 µl auf. Als Richtgröße für die effiziente Spaltung von Plasmid-DNA gilt der Wert von 1 bis 4 Einheiten (1-4 U) des gewünschten Enzyms pro µg DNA. Das Enzymvolumen sollte ein Zehntel des Gesamtvolumens nicht übersteigen, da sich das im Lagerpuffer der Restriktionsendonukleasen enthaltene Glycerin negativ auf die Effizienz und Spezifität der Spaltungsreaktion auswirken kann. Die Zusammensetzung des Restriktionspuffers und die optimalen Inkubationsbedingungen (Temperatur, Überschichtung mit Mineralöl) werden wie vom Enzym-Hersteller empfohlen gewählt.

Bei Spaltungen mit zwei Enzymen sind gelegentlich die Puffer- und Inkubationsbedingungen nicht vereinbar, so dass sukzessiv gespalten werden muss (z.B. wenn Endonukleasen von zwei verschiedenen Firmen mit ihrem jeweiligen optimierten Puffersystem verwendet werden müssen). Am effizientesten ist die Aufreinigung und Umpufferung der DNA zwischen zwei Spaltungen über die QIAquick-spin-Säulen von Qiagen (D 2.4.2)

Die Spaltungsreaktion kann durch Hitzeinaktivierung, Phenolextraktion oder Zugabe von 2,5 x HSE-Probenpuffer (D 2.2.1) gestoppt und das Restriktionsmuster durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (D 2.2.1) analysiert werden.

### 2.3.2 Vektorpräparation

Falls ein Vektor für die anschließende Klonierung mit nur einem Restriktionsenzym gespalten wurde, schließt sich nach erfolgter enzymatischer Hydrolyse eine Phosphatase-Behandlung an, um die Anzahl der Religanden bei nachfolgender Ligation möglichst gering zu halten. Um den linearisierten Vektor von ungespaltenem, zirkulärem Plasmid zu trennen, führt man eine Gelelution (D 2.2.2) durch um ihn anschleißend zu präparieren. Ein typischer Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

|           |  |
|-----------|--|
| 50 µl     | aufgereinigter, restriktionsverdauter Vektor |
| 3 µl      | Alkalische Phosphatase                       |
| 10 µl     | 10 x Puffer                                  |
| ad 100 µl | dH <sub>2</sub> O                            |

Dieser Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Enzyminaktivierung und Trennung der DNA von der alkalischen Phosphatase erfolgt mit Hilfe des QIAquick-PCR-Purification-Kits, der die schnelle Aufreinigung von DNA-Molekülen zwischen 100 bp und 10 kb über Affinitätssäulchen ermöglicht (D 2.4.2).

### 2.3.3 Ligation

Die T4-Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA. Im Gegensatz zur *E. coli*-Ligase kann sie nicht nur kohäsive (sticky), sondern auch glatte (blunt) Enden verbinden. Ein typischer Ligationsansatz (Reaktionsvolumen 10 µl) enthält bei einer sticky-end Klonierung ein Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3, bei einer blunt-end Klonierung ein Verhältnis von 1:10. Bei der Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden ist eine etwa zweistündige Inkubation bei 23-26 °C ausreichend. Eine Inkubationszeit von etwa 20 Stunden (16 °C) ist bei der Ligation glatter Enden aufgrund der geringeren Effizienz der Ligasereaktion erforderlich.

Folgende Ansätze dienen als Ligationskontrollen:

- Linearisierte Vektor-DNA wird in Abwesenheit von Ligase inkubiert. Hierdurch wird die Vollständigkeit der Restriktionsspaltung kontrolliert.
- Linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA wird zur Beurteilung des Dephosphoryierungsgrades des Vektors in Anwesenheit der T4-Ligase inkubiert.

## 2.4 DNA-Amplifikation

### 2.4.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; „polymerase chain reaction“) ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988). Die Spezifität der Amplifikationsreaktion wird durch die Sequenz der 15-40 bp langen Oligonukleotide gewährleistet, die komplementär zu den flankierenden DNA-Bereichen der zu amplifizierenden Region sind. Es ist jedoch möglich, einzelne Basen innerhalb der Oligonukleotide zu variieren, z.B. zur Einführung einer Schnittstelle für eine geplante Klonierung. Die Oligonukleotide (Primer) sollten möglichst keine Sekundärstrukturen aufweisen und nicht zueinander komplementär sein. Außerdem sollte ihr GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % liegen.

Im ersten Schritt der Reaktion wird die DNA durch Hitzebehandlung in Einzelstränge zerlegt (meist bei 94 °C). Im folgenden Schritt wird die Temperatur abgekühlt, um ein Binden der Primer zu ermöglichen. Die Annealingtemperatur errechnet sich nach der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primers. Es gilt folgende Näherungsformel für Primer von ca. 20 Nukleotiden Länge:

$$T_m: 2\text{ °C} \times (A+T) + 4\text{ °C} \times (G+C)$$

Hierbei entsprechen A, T, G, und C der Anzahl der im Oligonukleotid vorhandenen jeweiligen Basen. Die optimale Annealingtemperatur liegt etwa 2–5 °C darunter. (Die Annealingtemperatur liegt hierbei meist bei um die 50 °C) Der letzte Schritt des Reaktionszyklus, die sogenannte Elongation umfasst die Synthese des komplementären Stranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, Pfu-Polymerase, Deep-Vent-Polymerase).

Ein typischer Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| 10 x PCR-Puffer                 | 10 µl     |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)        | 2-4 µl    |
| dNTPs (je 20 mM)                | 1 µl      |
| Oligonukleotide (je 100pmol/µl) | je 1 µl   |
| DNA-Template (20 ng/µl)         | 1 µl      |
| Polymerase (5 U/µl)             | 1 µl      |
| dH <sub>2</sub> O               | ad 100 µl |

Die Mengenangaben können im Einzelfall stark variieren und müssen gegebenenfalls optimiert werden. Vor allem durch die Variation der eingesetzten MgCl<sub>2</sub>-Menge kann die PCR in einigen Fällen optimiert werden.

Der Reaktionsansatz bei einer Standard-PCR durchläuft 30 Zyklen mit folgender Schrittabfolge:

|                |       |       |
|----------------|-------|-------|
| first delay:   | 3 min | 94 °C |
| Denaturierung: | 1 min | 94 °C |
| Annealing:     | 1 min | 55 °C |
| Elongation:    | 1 min | 72 °C |
| last delay     | 5 min | 72 °C |

Während der Elongation findet die eigentliche Amplifikation mit Hilfe der Polymerase statt. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Für die Taq-Polymerase wählt man für ca. 1000 bp eine Elongationszeit von 1 min. Ist das Fragment länger, muss die Elongationszeit angepasst werden. Bei den Polymerasen mit „proof-reading“-Aktivität wählt man die Elongationszeit doppelt so lang wie für die Elongation mit der Taq-Polymerase, da für das „proof-reading“ zusätzliche Zeit benötigt wird. Der letzte Schritt (last delay) dient dazu, evtl. noch nicht fertig synthetisierte PCR-Produkte fertig zu stellen. Die PCR ist sehr effektiv, da in jedem Zyklus die vorhandene Menge an DNA-Fragment verdoppelt wird. Somit ist nach 30 Zyklen die gewünschte DNA um das 2<sup>30</sup>-fache, d.h. 10<sup>7</sup>-fache erhöht.

Um die PCR zu überprüfen wird nun ein bestimmtes Volumen des PCR-Ansatzes (meist 10 µl) mit 2/3 Volumen 2,5 x HSE auf ein Agarosegel aufgetragen und somit die Länge des erhaltenen PCR-Produktes bestimmt (D 2.2.1).

### 2.4.2 Reinigung von PCR-Produkten mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification-Kit von QIAGEN

Zur Entfernung von Verunreinigungen wie Puffer und Enzyme aus dem PCR-Ansatz (oder auch zum Umpuffern anderer Reaktionen, wie der Dephosphorylierung, nach Restriktionsspaltungen usw.) wird der „QIAquick PCR Purification Kit“ von QIAGEN verwendet. Alle verwendeten Puffer werden von der Firma im Kit mitgeliefert.

Man gibt 5 Vol PB-Puffer zum PCR-Ansatz und pipettiert diese Suspension auf ein Minisäulchen, das in ein 2 ml Reaktionsgefäß passt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (30 s, 14000 rpm, RT) wird mit 750 µl PE-Puffer gewaschen (30 s, 14000 rpm, RT). Um noch vorhandene Waschpufferreste aus der Säule zu entfernen, zentrifugiert man nochmals 30 s bei 14000 rpm. Die Elution erfolgt mit 30-50 µl dH<sub>2</sub>O, wobei man wiederum 30 s

(14000 rpm, RT) zentrifugiert. Das Eluat enthält die gereinigte DNA und kann sofort für weitere Experimente eingesetzt werden.

### 2.4.3 PCR mit Zell-Lysaten als Template

Für PCRs kann man verschiedene Formen von DNA als Template benutzen, z.B. aufgereinigte chromosomale DNA, Plasmide, cDNA usw. Manchmal ist es jedoch nicht erforderlich und zu aufwendig, das gewünschte Template in reiner Form einzusetzen, z. B. beim „Screening“ auf positive Klone bei Klonierungen in *E. coli*. Deshalb werden hier zunächst von den Klonen Zell-Lysate hergestellt, indem man von den Kolonien mit einer gelben, sterilen Pipettenspitze Zellmaterial von den Einzelkolonien abnimmt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Klone, von denen das Zell-Lysat hergestellt wird, werden gleichzeitig auf eine LB-Platte in einer nummerierten Reihenfolge übertragen. Das im Wasser suspendierte Zellmaterial wird nun für 5 min auf 110 °C erhitzt, was bewirkt, dass die Zellen zerstört werden und der Zellinhalt, unter anderem die DNA (chromosomale DNA und Plasmid DNA) freigesetzt wird. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 15000 rpm befinden sich die Zelltrümmer am Boden des Eppendorf-Caps und die DNA im Überstand. Von dem Überstand werden nun 5 µl entnommen und als Template für eine PCR eingesetzt. Dabei wird zunächst eine PCR mit einem Pool von 10 Klonen durchgeführt, das heißt, dass in einem PCR-Ansatz der Überstand von 10 verschiedenen Klonen als Template vorhanden ist. Ist diese PCR positiv, wird erneut eine PCR durchgeführt, dieses mal jedoch mit den Überständen der einzelnen im positiven Pool vorhandenen Klone. Von einem positiv getesteten Klon kann man nun das Plasmid isolieren. Es ist dabei notwendig, das Plasmid nochmals zu überprüfen, da es bei PCR-Reaktionen mit Zell-Lysaten mitunter zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

## 2.5 Sequenzierung

### 2.5.1 Automatische DNA-Sequenzierung nach der Fluoreszenzmethode

Bei der Methode des „Terminator Cycle Sequencing“ wird das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger kombiniert. Die von Sanger et al. (1977) beschriebene Methode beruht auf der Hybridisierung eines komplementären Oligonukleotides an die zu analysierende, einzelsträngige DNA und dessen enzymatischer, matrisenabhängiger Verlängerung in Gegenwart der zur Synthese benötigten Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), von denen eines in radioaktiv markierter Form eingesetzt wird (Sanger *et al.*, 1977).

An diese anfängliche Markierungsreaktion schließt sich eine Terminationsreaktion an, in deren Verlauf es zum statistischen Einbau von Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs) in die komplementäre Kopie der zu analysierenden DNA-Matrize und damit zum Kettenabbruch kommt, da diesen Nukleotiden die 3'-OH-Gruppe fehlt. Die Sequenzierungsreaktion wird in vier unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt, von denen jeder die vier dNTPs sowie eines der vier Didesoxy-Analoga enthält. Es kommt zur Synthese eines Gemisches von DNA-Fragmenten mit einer Länge von ca. 25 bp (Zahl der Basenpaare des Oligonukleotides plus 5 bis 10 Basenpaare) bis über 500 bp, die anschließend elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Die Fluoreszenzmethode stellt nun eine Weiterentwicklung der Didesoxy-Kettenabbruchmethode da, bei der keine radioaktiv markierten Nukleotide verwendet werden, sondern fluoreszenzmarkierte ddNTPs (vgl. Tab. 8).

Tab. 8: Fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs)

| dd-Nukleotid | Bezeichnung  | Farbe | A <sub>max</sub> | E <sub>max</sub> |
|--------------|--|-------|------------------|------------------|
| <b>A</b>     | RG6<br>(N,N'-diethyl-2,7-dimethyl-6-carboxyrhodamin) | grün  | 520 nm           | 545 nm           |
| <b>C</b>     | ROX<br>(6-Carboxy-X-rhodamin)                        | rot   | 585 nm           | 605 nm           |
| <b>G</b>     | R110<br>(6-Carboxyrhodamin 110)                      | blau  | 500 nm           | 530 nm           |
| <b>T</b>     | TAMARA<br>(N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin)  | gelb  | 555 nm           | 580 nm           |

Die zu sequenzierende DNA wird denaturiert, so dass ein spezifischer Primer hybridisiert und die Einzelstrangsynthese durch eine DNA-Polymerase ablaufen kann. Da sich im Reaktionsgemisch dNTPs und ddNTPs in einem bestimmten Verhältnis befinden, wird die Synthese an den Stellen abgebrochen, an denen ein ddNTP eingebaut wurde.

Dies erfolgt, statistisch gesehen, an jedem Nukleotid mit gleicher Wahrscheinlichkeit, wodurch Fragmente entstehen, die jeweils immer um ein Nukleotid länger sind als die Vorherigen. Die markierten DNA-Fragmente werden durch eine polymergefüllte Kapillare elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Die an die Fragmente gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden dann durch einen Laser angeregt und emittieren Licht mit jeweils einer spezifischen Wellenlänge, das von einem Spektrographen aufgenommen und nach Wellenlänge getrennt wird. Eine spezielle Kamera, die alle vier Fluoreszenzsignale gleichzeitig detektieren kann, gibt die Lichtintensität an einen angeschlossenen Computer weiter. Diese Information wird von der entsprechenden Software ausgewertet und als Sequenzdiagramm ausgedruckt.

## Die Sequenzierungs-PCR

Plasmide und hochmolekulare DNA (Cosmide, YACs, BACs, PACs) müssen vor dem Thermocycling hitzebehandelt werden (96 °C, 3 min), PCR-Produkte und andere lineare DNA hingegen nicht. Ein Sequenzierungs-PCR-Ansatz hat folgende Zusammensetzung:

|                     |          |
|---------------------|----------|
| DNA-Template        | 2-4 µl   |
| Primer (10 pmol/µl) | 1 µl     |
| Quick-Start-Mix     | 5 µl     |
| dH <sub>2</sub> O   | ad 20 µl |

Die Sequenzierungs-PCR durchläuft 30 Zyklen mit folgender Schrittabfolge:

|                 |               |             |
|-----------------|---------------|-------------|
| Denaturierung:  | 96 °C, 20 sec | } 30 Zyklen |
| Hybridisierung: | 50 °C, 20 sec |             |
| Elongation:     | 60 °C, 4 min  |             |
| Last Delay:     | 60 °C, 3 min  |             |

Nach Ablauf der PCR-Reaktion muss die DNA zunächst ausgefällt werden (vgl. D 6.1.2) und kann dann mit dem Sequenzer der Firma Beckman Coulter analysiert werden.

## Fällung mit Ethanol

|               |                        |
|---------------|------------------------|
| Stopp-Lösung: | 10 µl Glycogen         |
|               | 20 µl 100 mM EDTA      |
|               | 20 µl 3 M NaAc, pH 5,2 |

Die PCR-Reaktionen werden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 5 µl frisch angesetzter Stopp-Lösung versetzt und sorgfältig gemischt. Nach Zugabe von 60 µl eiskaltem abs. EtOH wird die DNA in einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen (14000rpm, 4 °C). Nach dem sorgfältigen Entfernen des Ethanols wird die DNA für 5 min in der SpeedVac getrocknet. Abschließend wird das Pellet in 40 µl SLS-Lösung resuspendiert. Ab diesem Zeitpunkt können die Proben nahezu unbegrenzt bei 4 °C im Kühlschrank bis zur Sequenzierung gelagert werden.

### 2.5.2 DNA-Sequenzierung mit radioaktivem $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP

Diese Art der Sequenzierung wird vor allem bei der Methode der Primerextension durchgeführt.

Die Sequenzierungsreaktion wird mit dem „T7 Sequencing TM-Kit“ der Firma Pharmacia durchgeführt. Zur alkalischen Denaturierung der doppelsträngigen Plasmid-DNA werden 2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 32 µl mit 8 µl 2 M NaOH versetzt und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 4 µl dH<sub>2</sub>O, 7 µl 3 M NaAc (pH 4,5) und 120 µl EtOH abs. wird die DNA über Nacht bei -20 °C präzipitiert.

Am folgenden Tag wird die DNA durch Zentrifugation (14000 rpm, 20 min, RT) sedimentiert, mit 70 %igem EtOH gewaschen (14000 rpm, 10 min, RT), in der SpeedVac getrocknet und in 10 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Hybridisierung des Sequenzierungsprimers wird die denaturierte DNA mit 2 µl „Annealing Buffer“ und 2 µl Oligonukleotid-Lösung (5 pmol/µl) versetzt; der Ansatz wird zunächst 5 min bei 65 °C inkubiert, dann 10 min bei 37 °C und abschließend erneut 5 min bei RT. Der „Annealing“-Ansatz wird mit 3 µl „Labelling-Mix“, 1,5 µl  $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP (10 µCi/µl; 3000 Ci/mmol) und 2 µl T7-DNA-Polymerase versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT werden Aliquots von jeweils 4,5 µl in Reaktionsgefäße überführt, die bereits 2,5 µl der entsprechenden Didesoxyribonukleosidtriphosphatpuffer (A-, C-, G-, T-Mix) enthalten. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Stop-Puffer beendet. Die Sequenzierungsansätze werden 2 min bei 80 °C inkubiert, bevor jeweils 4 µl Aliquots der jeweiligen Ansätze auf ein 6 %iges Polyacrylamid/Harnstoffgel aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 1500 V, 30 mA und 40 W. Sie ist beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau aus dem Gel austritt. Das Gel wird auf ein Whatman-Filterpapier aufgezogen, mit Klarsichtfolie bedeckt und in eine Röntgenfilmkassette überführt. Für die Autoradiographie wird ein geeigneter Röntgenfilm aufgelegt.

## 2.6 Southern-Blot

### Gelelektrophorese und Vorbereitung des Gels

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Depurinierungslösung:   | 0,25 N HCl                           |
| Denaturierungslösung:   | 1,5 M NaCl<br>0,5 M NaOH             |
| Neutralisierungslösung: | 1,5 M NaCl<br>0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 |
| 20 x SSC:               | 3 M NaCl<br>0,3 M Na-Citrat          |



Etwa 5-10 µg chromosomale *H. pylori* DNA werden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (5 U/µg) über Nacht bei 37 °C gespalten. Am nächsten Tag wird zu den jeweiligen Ansätzen erneut die gleiche Menge an Enzym gegeben und wiederum über Nacht gespalten. Die Proben werden anschließend auf einem 1,5 %igen TBE-Agarosegel bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Bromphenolblaufront ca. 2/3 der Laufstrecke gewandert ist. Die Spaltung und Auftrennung der chromosomalen DNA wird unter UV-Licht kontrolliert, und das Gel mit einem fluoreszierenden Lineal als Maßstab fotografiert.

Anschließend wird das Gel für 2 x 15 min in Depurinierungslösung geschwenkt, bis die Farbe von blau (Bromphenolblau) nach gelb umschlägt. Das Gel wird nun kurz mit dH<sub>2</sub>O abgespült und für 20 min in Denaturierungslösung und nach erneutem Abspülen mit dH<sub>2</sub>O für weitere 20 min in Neutralisierungslösung inkubiert und wiederum mit dH<sub>2</sub>O kurz gespült. Abschließend wird das Gel 20 min in 20 x SSC geschwenkt.

### Transfer der DNA auf Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham)

In ein geeignetes Gefäß wird 20 x SSC gefüllt. In das Gefäß wird ein kleineres Gefäß umgekehrt hineingestellt. Über diesen Unterbau wird eine „Brücke“ aus dünnem Whatman-Papier gelegt, die beidseitig in den Puffer hängt. Auf diese Brücke wird das behandelte Gel gelegt, und anschließend wird das Gel mit einer auf Gelmaße zugeschnittenen Nylonmembran (5-10 min mit 20 x SSC befeuchtet) bedeckt. Darauf werden 10 Schichten dünnes, mit 20 x SSC angefeuchtetes Whatman-Papier, 15-20 Schichten trockenes dünnes Whatman-Papier und anschließend ein Stapel saugfähiges Papier geschichtet. Diese Anordnung wird mit einem schweren Gegenstand beschwert und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird die Nylonmembran dann 2 x 1 min in 6 x SSC gewaschen, auf Whatman-Papier getrocknet und die DNA wird durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert. Die Membran kann in Plastikfolie eingewickelt im Kühlschrank aufgehoben werden.

### Markierung der Sonde

Die Sonde wird gemäß der Anleitung des „ECL direct nucleic acid labelling and detection Kits“ (Amersham) wie folgt markiert. 100 ng DNA werden mit dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10 µl verdünnt (10 ng/µl) und 5 min bei 100 °C denaturiert. Nach weiteren 5 min bei 4 °C wird die Probe kurz abzentrifugiert und mit 10 µl DNA-Labeling-Reagenz versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 µl Glutaraldehyd und nach erneutem kurzen Abzentrifugieren wird der Ansatz 10 min bei 37 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

### Vorhybridisierung und Hybridisierung

Hybridisierungspuffer: 22 ml „Gold Hybridization Buffer“ (Amersham)  
0,5 M NaCl  
5 % Blockreagenz (Amersham)

In einer dicht verschließbaren Plastikbox wird der Hybridisierungspuffer (0,25 ml/cm<sup>2</sup>) auf 42 °C vorgewärmt. Die Nylonmembran wird anschließend darin für 1 h in einem Wasserbad unter leichtem Schütteln bei 42 °C vorhybridisiert. Nach einer Stunde wird die markierte Sonde hinzupipettiert (nicht direkt auf die Membran) und die Hybridisierung erfolgt über Nacht im Wasserbad unter leichtem Schütteln bei 42 °C.

### Waschen der Nylonmembran

Primärwaschpuffer: 6 M Harnstoff  
0,4 % SDS  
0,5 x SSC

Sekundärwaschpuffer: 2 x SSC

Die Membran wird nach Beendigung der Hybridisierung entnommen und der restliche Hybridisierungspuffer durch kurzes Schwenken der Membran in vorgewärmten Primärwaschpuffer (42° C) entfernt. Anschließend wird die Membran mit einem Überschuss an Primär-Waschpuffer (2-5 ml/cm<sup>2</sup> Membran) für 2 x 20 min bei 42 °C gewaschen und danach für 2 x 5 min bei RT mit Sekundär-Waschpuffer gewaschen.

### Detektion der Sonde

Die Entwicklungsreagenzien 1 und 2 werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (0,125 ml/cm<sup>2</sup> Membran) und die fertige Lösung für 1 min auf die Membran gegeben. Das Entwicklungsreagenz wird von der Membran abgegossen und die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt. Das entstehende Lichtsignal kann mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden. Da das ECL-Signal innerhalb weniger Stunden abklingt, kann der Blot, falls gewünscht, am nächsten Tag mit einer weiteren Sonde behandelt werden.

## 2.7 Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese mit dem QuickChange™ Site-directed Mutagenesis Kit

Mit dem Mutagenese-Kit „QuickChange“ von Stratagene ist es möglich, Punktmutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA einzufügen. Außerdem kann die Insertion oder Deletion eines DNA-Bereiches erfolgen.

Die Oligonukleotidprimer enthalten die gewünschte Sequenzänderung, sind zueinander komplementär und hybridisieren an beide Stränge des Plasmids. Ihre Größe sollte zwischen 25 und 45 Basen und ihre Schmelztemperatur ca. 10 °C über der Elongationstemperatur der PCR-Reaktion von 68 °C liegen. Die Mutationsstelle befindet sich ungefähr in der Mitte der Primer und besitzt auf beiden Seiten etwa 10-15 Basen mit der zur Ausgangs-DNA identischen Sequenz. Der GC-Gehalt sollte mindestens 40 % betragen.

In einem für das PCR-Gerät geeigneten Reaktionsgefäß werden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

5 µl 10x Reaktionspuffer  
 X µl (5-50 ng) dsDNA Template  
 X µl (125 ng) Primer 1  
 X µl (125 ng) Primer 2  
 1 µl dNTP mix  
 ddH<sub>2</sub>O bis zu einem Endvolumen von 50 µl  
 1 µl *PfuTurbo* DNA Polymerase

Alle benötigten Enzyme und Puffer sind im Kit mitgeliefert.

Für die PCR-Reaktion werden folgende Zyklus-Parameter gewählt:

|               |                        |                       |       |
|---------------|------------------------|-----------------------|-------|
| 1 Zyklus:     | First delay:           | 30 s                  | 95 °C |
| 12-18 Zyklen: | Denaturierung          | 30 s                  | 95 °C |
|               | Primer-Hybridisierung: | 1 min                 | 55 °C |
|               | Elongation:            | 2 min/kb Plasmidlänge | 68 °C |

Die Anzahl der Zyklen hängt davon ab, was für eine Mutation man einführen will:

| Art der Mutation                     | Anzahl der Zyklen |
|--------------------------------------|-------------------|
| Punktmutation                        | 12                |
| Austausch einer einzelnen Aminosäure | 16                |
| Austausch mehrere Aminosäuren        | 18                |

Nach Beendigung der PCR werden die Ansätze für 2 min auf Eis gestellt. Anschließend gibt man 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/µl), welches die methylierte, nicht mutierte Ausgangs-DNA abbaut, hinzu und inkubiert die Ansätze 1 h bei 37 °C. DNA von *E. coli*-Stämmen ist meist *dam*-methyliert und kann damit von *DpnI* abgebaut werden. Die *in vitro* neu synthetisierte DNA, die die Mutationen enthält, ist demgegenüber nicht methyliert und damit unempfindlich gegen *DpnI*. Für die Transformation der Plasmid-DNA wird je 1 µl des Reaktionsgemisches zu je 50 µl auf Eis aufgetauter, kompetenter Epicurian Coli® XL1-Blue-Zellen pipettiert. Nach kurzem Mischen werden die Zellsuspensionen 30 min auf Eis gestellt. Die Ansätze werden daraufhin 45 s auf 42 °C erhitzt und danach 2 min auf Eis stehengelassen. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium wird das Gemisch 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden 100-200 µl des Transformationsansatzes auf Selektions-Agarplatten ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanten wird isoliert und anschließend sequenziert.

### 3. Analyse von RNA

#### 3.1 RNA-Isolierung aus *H. pylori*

Für die Isolierung von RNA und das weitere Arbeiten mit der RNA ist es besonders wichtig, unter RNase-freien Bedingungen zu arbeiten. RNasen befinden sich überall auf der Haut des Menschen, im Speichel und auf den abgesonderten Sekreten der Schleimhäute und dienen dort der körpereigenen Abwehr. Es ist jedoch verheerend, wenn diese RNasen in die Proben gelangen und dort eine Degradation der RNA bewirken. Deshalb müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Für Arbeiten mit RNA werden immer Handschuhe getragen, es wird während der Arbeit nicht gesprochen, der Arbeitsplatz und die verwendeten Pipetten werden zuvor mit EtOH gründlich gereinigt, und da der Verdacht besteht, dass während des Autoklavierens RNasen in die Pipettenspitzenkästen gelangen, werden die RNA-Spitzen unter der Clean-Bench mit Handschuhen und Pinzette in die Kästen gesteckt und zuvor evtl. noch kurz abgeflammt. Weiterhin werden alle Lösungen und auch das Wasser mit dem RNase-Inhibitor DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. DEPC wird im Verhältnis 1/1000 zugegeben, die Lösung über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert.

##### 3.1.1 RNA-Präparation mit TRIzol (Invitrogen)

Ein aus Flüssigkultur gewonnenes und tiefgefrorenes Bakterien-Pellet (vgl. D 1.1.2) wird in 1 ml TRIzol gründlich resuspendiert. Die Suspension wird in ein 2 ml Cap überführt und 5 min bei RT inkubiert. Nun werden 0,2 ml Chloroform zugegeben, das Cap 15 s mit der Hand invertiert, so dass sich das Chloroform gleichmäßig verteilt. Der Ansatz wird wiederum bei RT für 3 min inkubiert. Als nächstes wird die Suspension abzentrifugiert (nicht mehr als 12000 rcf, 15 min, 4 °C). Die wässrige farblose Phase wird nun in ein neues 1,5 ml Cap überführt und zum Fällen der Nukleinsäuren werden 0,5 ml Isopropanol zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT erfolgt wiederum ein Zentrifugationsschritt (nicht mehr als 12000 rcf, 10 min, 4 °C). Es bildet sich ein gelförmiges Pellet, das die Nukleinsäuren enthält. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen, erneut abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird luftgetrocknet und dann in 100 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O gelöst. Da das Pellet schwer zu lösen ist, wird dieser Vorgang erleichtert, indem die Nukleinsäurelösung für 10 min auf 55-60 °C erhitzt wird.

### 3.1.2 DNase-Verdau

Bis jetzt hat man ein Gemisch aus RNA und DNA gewonnen. Um RNA in DNA-freier Form zu erhalten, schließt sich ein DNase Verdau an, bei dem die DNA abgebaut wird. Dazu wird die Nukleinsäurelösung mit 10 µl DNase, 6 µl 0,5 M MgCl<sub>2</sub> und 20 µl 1M Tris-HCl, pH 7,5 versetzt und das Ganze für 45 min bei 25 °C inkubiert.

### 3.1.3 Reinigung und Fällung der RNA

Um die RNA zu reinigen, führt man zweimalig eine Phenol-Extraktion durch. Es wird 1 Volumen Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) zugegeben und das Gemisch abzentrifugiert. Die RNA befindet sich in der wässrigen oberen Phase. Diese wird abgenommen und mit 1/10 Volumen LiCl (10 M) und 2,5 Volumen abs. EtOH versetzt um die DNA zu fällen. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 14000 rpm, 4 °C) erhält man die RNA in Form eines Pellet. Dieses wird nun mit 70 %igem EtOH gewaschen, um Salzreste zu entfernen, und dann in einem geeigneten Volumen DEPC-dH<sub>2</sub>O (meist 50-100 µl) resuspendiert. Die RNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Um zu überprüfen, ob die RNA wirklich DNA-frei ist, wird immer noch eine Kontroll-PCR mit der RNA als Template durchgeführt. Befinden sich keine DNA-Reste in der RNA, sollte bei dieser PCR-Reaktion kein Fragment amplifiziert werden.

## 3.2 Arbeiten mit RNA

Um die Menge eines bestimmten Transkripts zu bestimmen werden mehrere halbquantitative bzw. quantitative Methoden durchgeführt.

### 3.2.1 Herstellung von cDNA

Die Herstellung von cDNA mit RNA als Template erfolgt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, das ursprünglich aus Retroviren stammt. Dieses Enzym, bei dem es sich um eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase handelt, synthetisiert in diesem Fall von einem spezifischen Primer aus einen zur RNA komplementären DNA-Strang. Durch anschließenden Abbau der RNA enthält man einzelsträngige cDNA, die als Template für die Real-time-PCR oder RT-PCR eingesetzt werden kann.

Für die cDNA Synthese werden 5 µg RNA und je 3 µl Primer (20 pmol/µl) eingesetzt. Man kann in einem Cap mehrere cDNAs gleichzeitig synthetisieren, wenn man verschiedene Oligonukleotide zugibt. Das Volumen wird dann mit DEPC-dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 18 µl aufgefüllt. Es erfolgt nun eine fünfminütige Inkubation bei 70 °C um die Sekundärstrukturen in der RNA zu lösen. Nach kurzem Abzentrifugieren wird der Reaktionsansatz für 5-10 min auf Eis gelagert. Während dieser Zeit wird der Mastermix zubereitet, der sich folgendermaßen zusammensetzt:

10,6 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O  
 1 µl dNTPs (20 mM)  
 0,4 µl DTT (Invitrogen)  
 8 µl First Strand Buffer (Invitrogen)  
 1 µl Reverse Transkriptase (Invitrogen)  
 1 µl RNase out (Invitrogen)

Dieser Mastermix wird nun dem Reaktionsansatz zugegeben und der Ansatz für 2 h bei 42 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur ist die reverse Transkriptase aktiv. Das Enzym synthetisiert nun den zur RNA komplementären DNA-Strang ausgehend vom eingesetzten Oligonukleotid bis hin zum Transkriptionsstart. Es folgt eine 15 minütige Inkubation bei 70 °C, bei welcher die Reverse Transkriptase und der RNase-Inhibitor (RNase out) inaktiviert werden. Es werden 2 µl RNase (Roche) zugegeben, um die vorhandene RNA abzubauen. Dafür wird der Ansatz für 45 min auf 37 °C erhitzt. Die Reinigung der so erhaltenen cDNA erfolgt mit dem PCR Purification-Kit von QIAGEN, die Elution erfolgt mit DEPC-dH<sub>2</sub>O, das Elutionsvolumen beträgt 30 µl. Um zu überprüfen, ob cDNA synthetisiert wurde, wird eine Kontroll-PCR, mit der erhaltenen cDNA als Template, durchgeführt.

### 3.2.2 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine modifizierte PCR-Reaktion, die als Template cDNA verwendet. Als Primer werden Oligonucleotide verwendet, die jeweils in einem von zwei vermutlich zusammen transkribierten nebeneinander liegenden Genen binden. Befinden sich die zwei untersuchten Gene tatsächlich in einem Operon, bilden sie ein zusammenhängendes RNA-Transkript aus und somit bei der cDNA-Herstellung ein zusammenhängendes cDNA-Molekül, so dass es möglich ist, mit der cDNA als Template ein PCR-Produkt zu erhalten. Ein typischer Reaktionsansatz ist mit dem einer PCR-Reaktion (D 2.4.1) vergleichbar.

### 3.2.3 Primer Extension

Die Primer Extension ist eine Methode, mit deren Hilfe man das 5'-Ende einer RNA, also den Transkriptionsstart eines Gens detektieren kann und gleichzeitig eine semiquantitative Methode zur Bestimmung der Transkriptmenge eines definierten Gens. Der verwendete Primer wird am 5'-Ende radioaktiv markiert, ist komplementär zu der zu untersuchenden RNA und wird durch die AMV Reverse Transkriptase (Enzym des Avian Myoblastosis Virus)

verlängert, so dass ssDNA (single-strand DNA) entsteht. Diese ssDNA wird nun in einem 6 %igem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Will man den Transkriptionsstart eines Gens bestimmen, so ist es erforderlich, dass man eine radioaktive Sequenzierungsreaktion (vgl. D 2.5.2) als Längenstandard mitlaufen lässt. Die Länge der radioaktiv markierten ssDNA entspricht in der Sequenzierungsreaktion dem 5`-Ende der RNA.

Das 6 %ige Polyacrylamid-Harnstoffgel setzt sich zusammen aus:

24 g Harnstoff  
10 ml 30 %ige Polyacrylamidlösung  
5 ml 10 x TBE  
dH<sub>2</sub>O ad 50 ml

Diese Lösung wird nun vorsichtig erwärmt, bis der Harnstoff vollständig gelöst ist. Für die Polymerisierungsreaktion werden dann noch 200 µl 10 % APS und 45 µl TEMED zugegeben.

**Sequenzierungsreaktion** (vgl. D 2.5.2)

**Markieren des Oligonukleotides**

1 µl Primer (5 pmol/µl)  
3 µl [<sup>32</sup>P]ATP  
1 µl 10 x Kinase Puffer (MBI, Puffer A PNK)  
4 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O  
1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (MBI, PNK)

Dieser Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wird durch die T4-PNK (Polynukleotid-Kinase) das γ-Phosphat des ATPs auf das 5`-Hydroxylende des Oligonukleotides übertragen, so dass der Primer radioaktiv markiert wird.

Das nicht eingebaute [<sup>32</sup>P]ATP wird mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal-Kit von QIAGEN entsprechend den Vorgaben des Herstellers entfernt. Der Primer wird mit 60 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O eluiert und die Effizienz der radioaktiven Markierung im Szintillationszähler bestimmt.

**Primer Extension**

Zunächst werden 30 µg RNA mit ca. 2000000 cpm des Primers durch Zugabe von 2,5 Volumen EtOH und 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 4,8) kopräzipitiert und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wird die RNA mit dem Primer abzentrifugiert (15 min, 15000 rpm, 4 °C). Das Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen, in der SpeedVac getrocknet und dann aufgenommen in:

5 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O  
2 µl 5 x Reverse Transkriptase Puffer  
2 µl 2 mM dNTPs

Um die Sekundärstruktur der RNA zu lösen, wird der Ansatz 2 min auf 100 °C erhitzt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt, der dazu dient, die kondensierte Flüssigkeit wieder am Boden des Caps zu vereinigen, wird 1 µl AMV Reverse Transkriptase (Roche) zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 45 °C inkubiert. In dieser Zeit verlängert die Reverse Transkriptase den Primer und es entsteht ein RNA:DNA-Hybrid. Durch Zugabe von 1 µl RNase A (10 mg/ml) und Inkubation für 10 min bei RT wird die vorhandene RNA abgebaut. Die Reaktion wird beendet, indem man 4 µl Stop-Lösung zugeibt und den Ansatz für 2 min bei 75-80 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wird nun neben einer Sequenzierungsreaktion auf das 6 %ige Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen, das bereits eine halbe Stunde Vorlauf hatte. Die Elektrophorese erfolgt bei 1500 V, 30 mA und 40 W für ca. 2 h.

**Detektion des Signals mittels eines Röntgenfilms**

Will man nur den Transkriptionsstart eines Gens bestimmen, so ist eine Detektion mittels Röntgenfilm ausreichend. Der Röntgenfilm wird auf das Gel aufgelegt und in der Röntgenfilmkassette über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgt dann die Entwicklung des Röntgenfilms mit dem Röntgenfilmentwickler.

**Detektion des Signals mittels Phosphorimager**

Will man die Menge einer bestimmten mRNA quantifizieren, so muss die Detektion des Signals mit Hilfe des Phosphorimagers geschehen, so dass die Stärke des erhaltenen Signals mit dem Computerprogramm ImageMaster TotalLab ausgewertet werden kann. Hierfür muss das Gel allerdings vor der Exposition getrocknet werden.

## 4. Proteinbiochemische Methoden

### 4.1 Auftrennung und Analyse von Proteinen

#### 4.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen ihrer Größe entsprechend geschieht in diskontinuierlichen Gelen nach der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese findet in Gegenwart von SDS und damit

unter denaturierenden Bedingungen statt. SDS ist ein starkes Detergenz, dessen Anionen an die Hauptketten der Polypeptide binden, was zur Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen führt, deren negative Ladungen dem Molekulargewicht des Proteins etwa proportional sind. So können die Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation ihrer Größe nach im Spannungsfeld zwischen Kathode und Anode aufgetrennt werden. Der Auftrennungsbereich ist von der Porengröße des verwendeten Polyacrylamidgels abhängig und kann somit variiert werden. Der optimale Trennungsbereich eines 15 %igen Gels liegt z.B. bei 12-43 kDa. Die Zusammensetzung der Gele (8x11 cm, 1 bis 1,5 mm Dicke; siehe Tab. 9) sowie die Versuchsdurchführung sind im Folgenden beschrieben.

Tab. 9: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels

| Reagenzien                                     | Trenngel<br>(12 %, 10 ml) | Trenngel<br>(15 %, 10 ml) | Sammelgel<br>(5 %, 3ml) |
|--|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| dH <sub>2</sub> O                              | 3,3 ml                    | 2,3 ml                    | 2,1 ml                  |
| 30 %ige Acrylamid-Bis<br>Fertiglösung (37,5:1) | 4,0 ml                    | 5,0 ml                    | 0,5 ml                  |
| 1 M Tris-HCl (pH 6,8)                          | --                        | --                        | 0,38 ml                 |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)                        | 2,5 ml                    | 2,5 ml                    | --                      |
| 10 % (w/v) SDS                                 | 0,1 ml                    | 0,1 ml                    | 0,03 ml                 |
| 10 % (w/v) APS                                 | 0,1 ml                    | 0,1 ml                    | 0,03 ml                 |
| TEMED  | 0,004 ml                  | 0,004 ml                  | 0,003 ml                |

5 x Laufpuffer: 125 mM Tris  
1,25 M Glycin  
50 ml 10 % (w/v) SDS  
ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

Laemmli-Probenpuffer: 62,5 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
10 % Glycerin  
2 % SDS  
5 % 2-Mercaptoethanol  
0,05 % Bromphenolblau

Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel werden zunächst bis auf APS und den Radikalbildner TEMED zusammenpipettiert und die Trenngellösung nach Zugabe der beiden Substanzen rasch zwischen zwei, durch „Spacer“ getrennte Glasplatten (8 x 11 cm) bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen. Zur Ausbildung einer geraden Front wird die Lösung mit wenig dH<sub>2</sub>O überschichtet. Ist das Trenngel auspolymerisiert, kann nach Zugabe von APS und TEMED auch das Sammelgel gegossen und ein Teflonkamm zur Ausbildung von Geltaschen eingesetzt werden. Das fertige Gel wird in die mit 1 x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingeklemmt. Pelletierte Bakterienzellen werden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100 °C erhitzt und dann zur Scherung chromosomaler DNA kräftig gevortext und sofort auf Eis stark abgekühlt. Diese Behandlung wird bei Bedarf wiederholt. Ist die chromosomale DNA nicht ausreichend degradiert, bleibt die Lösung sehr zähflüssig, was beim Beladen des Gels zu Problemen führen kann. Gereinigtes Protein wird ebenfalls mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, die Hitzebehandlung kann aber normalerweise wegfallen. Die Proben werden anschließend mit Hilfe einer Pipette in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese wird bei 150-200 V durchgeführt und in der Regel beendet, sobald die Bromphenolblau-Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist.

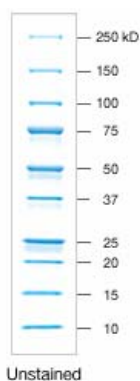


Abb. 11: Proteinmarker der Firma Bio-Rad auf einem 12 %igem SDS-Polyacrylamid-Gel

Als Molekulargewichtsstandard werden entweder 10 µl vom „Broad-Range-Marker“ der Firma Biorad (1:20 in Auftragspuffer verdünnt und 5 min bei 100 °C erhitzt), oder 10 µl des vorgefärbten Gibco-Proteinstandards mit aufgetragen (siehe Abb. 11). Letzterer wird vor allem dann benutzt, wenn die Proteine anschließend auf eine Membran übertragen werden sollen oder zur besseren Kontrolle während des Laufes, falls das zu analysierende

Protein ein niedriges Molekulargewicht aufweist, und leicht aus dem Gel zu laufen droht. Für die Auftrennung kleiner Proteine oder Peptide, deren Molekulargewichte 5 kDa nicht unterschreiten, werden 20% ige Polyacrylamidgels benutzt und die Pufferbedingungen modifiziert (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Zusammensetzung eines 20%igen Polyacrylamidgels

| Reagenzien                                  | Trenngel<br>(20 %, 15 ml) | Sammelgel<br>(5 %, 3ml) |
|---|---------------------------|-------------------------|
| dH <sub>2</sub> O                           | 1,04 ml                   | 3 ml                    |
| 30 %ige Acrylamid-Bis Fertiglösung (37,5:1) | 10 ml                     | 667 µl                  |
| 1 M Tris-HCl (pH 6,8)                       | --                        | 0,38 ml                 |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)                     | 3,75 ml                   | --                      |
| 10 % (w/v) SDS                              | 150 µl                    | 50 µl                   |
| 10 % (w/v) APS                              | 50 µl                     | 25 µl                   |
| TEMED                                       | 10 µl                     | 5 µl                    |

Das Gießen und Beladen des Gels sowie die Elektrophorese erfolgt bereits unter D 4.1.1 beschrieben.

Nach Beendigung des Laufes können die Proteine im Polyacrylamidgel durch den Farbstoff Coomassie-Blau unspezifisch angefärbt werden. Folgende Lösungen werden benötigt:

|              |   |
|--------------|---|
| Färbelösung: | 45 % Ethanol<br>10 % Essigsäure<br>0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250 |
| Entfärber:   | 45 % Ethanol<br>10 % Eisessig   |

Zur Färbung der Proteine wird das Gel 15 bis 45 min in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wird die Färbelösung durch Entfärberlösung ersetzt und diese zwei- bis dreimal erneuert, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund absetzen. Zum Schluss lässt man das Gel in 10 %iger Essigsäure wieder aufquellen. An Stelle der Entfärberlösung kann auch sofort 10 %ige Essigsäure verwendet werden. Alternativ können die gefärbten Gele auch durch zweimal zehnmütiges Kochen in dH<sub>2</sub>O entfärbt werden. Sollen die Gele über eine längere Zeit aufbewahrt werden, trocknet man sie. Hierzu legt man das Gel auf ein Stück nasses Whatman-Papier und dieses wiederum auf ein Stück trockenes. Man bedeckt das Gel oben luftblasenfrei mit Einmachfolie und einer weiteren Lage Whatman-Papier und trocknet den Stapel dann 90 min bei 80 °C auf dem Geltdrockner.

#### 4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden mit Hilfe des Protein-Assays von Biorad bestimmt, der nach dem von Bradford entwickelten Prinzip funktioniert. Dieses Messverfahren macht sich die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250, mit Proteinen in saurer Lösung Komplexe zu bilden, zunutze. Das Absorptionsmaximum dieser Komplexe liegt bei 595 nm.

Zur Erstellung einer Eichgerade werden verschiedene Mengen des bovinen Serumalbumins (BSA; 1-12 µl eines Konzentrats von 1,0 mg/ml) mit Wasser auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und dann mit 200 µl Farbstofflösung versetzt. In der gleichen Weise wird mit 5-20 µl der Proteinlösung verfahren. Nach Zugabe des Farbstoffes werden die Ansätze gevortext und die Absorption der Proben bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe der BSA-Eichgerade wird dann die Konzentration der Proteinlösung berechnet.

## 4.2 Gesamtproteinisolierung

### 4.2.1 Isolierung von Gesamtzellproteinen von *H. pylori*

|              |                                  |        |
|--------------|----------------------------------|--------|
| 1 x PBS:     | NaCl                             | 8 g    |
|              | KCl                              | 0,2 g  |
|              | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,44 g |
|              | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,24 g |
|              | dH <sub>2</sub> O                | ad 1l  |
| Lysispuffer: | 65 mM DTE oder DTT               |        |
|              | 4 % CHAPS                        |        |
|              | 9 M Harnstoff                    |        |
|              | 35 mM Tris-HCl pH 7,4            |        |
|              | Spur von 0,5 % Bromphenolblau    |        |

Die Bakterien werden auf Columbia Blutagarplatten angezchtet, bis die Platten konfluent bewachsen sind. Die Zellen werden geerntet, in 1,5 ml 1 x PBS pro Platte gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 200-400 µl Lysispuffer resuspendiert. Für den Zellaufschluss werden die Ansätze 10 min bei RT inkubiert und anschließend zum Abtrennen der Zelltrümmer zentrifugiert (3-5 min, RT, 14000 rpm). Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Cap überführt, die Proteinkonzentration nach Bradford (vgl. D 4.1.2) bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.2.2 Isolierung von Gesamtzellproteinen gram-negativer Bakterien (für die 2D-Gelelektrophorese)

Um gute Ergebnisse bei der zweidimensionalen-Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese; vgl. D 4.7) zu erhalten, ist es absolut notwendig, die richtige Probenaufbereitung zu finden. Das optimale Verfahren muss stets auf die jeweiligen Proteinproben angepasst werden. Im Idealfall liegen die Proteine am Ende disaggregiert, denaturiert, reduziert und komplett gelöst vor. Grundsätzlich sollte die Proben-Vorbereitung so einfach wie möglich gehalten werden, um Proteinverlusten bzw. Proteinmodifikationen vorzubeugen. Die Homogenisierung der Zellen sollte stets auf Eis stattfinden, die Lösungen müssen eisgekühlt sein.

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Tris-Puffer :             | 10 mM Tris-HCl pH 7,2<br>5 mM MgCl <sub>2</sub>                                    |
| Protease-Inhibitoren-Mix: | 2 mg/ml Pefabloc (Serva)<br>2 mg/ml Pepstatin (Sigma)<br>2 mg/ml Leupeptin (Sigma) |
| DNase/RNase-Mix:          | 1 VT Benzonase (10000 U/ml, Merck)<br>1 VT Rnase-it (10000 U/ml, Stratagene)       |
| Harnstoffpuffer:          | 7 M Harnstoff<br>2 M Thioharnstoff<br>70 mM DTT                                    |
| CHAPS-Stammlösung:        | 400 mg/ml  |

Ein aus Flüssigkultur gewonnenes Bakterien-Pellet (vgl. D 1.1.2), wird zweimal mit 5 ml 1 x PBS, das 20 µg/ml Chloramphenicol enthält, gewaschen. Das Pellet wird anschließend in 980 µl Tris-Puffer resuspendiert und 20 µl Protease-Inhibitoren-Mix hinzu gegeben, um die Proteasen, die durch die Zell-Lyse freigesetzt werden zu zerstören. Die Suspension wird in Shredder-Tubes (enthalten Glasperlen) überführt. Diese können bis zur weiteren Behandlung bei -20 °C eingefroren werden. Das Shreddern erfolgt 6 x 30 sec bei Stufe 6,5, wobei die Shredder-Tubes zwischen jedem Shreddern 1 min auf Eis gestellt werden, um eine Überhitzung zu vermeiden. Nach dem Shreddern werden 5 µl DNase/RNase-Mix hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Die Zelltrümmer und die Glasperlen werden anschließend abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 14000 rpm). Der Überstand wird in ein Eppendorf-Cap, in das 420,42 mg Harnstoff (7 M bei Endvolumen von 1 ml) und 152,20 mg Thioharnstoff (2 M bei Endvolumen von 1 ml) vorgelegt wurden, überführt. Harnstoff und Thioharnstoff dienen dazu, auch Membranproteine zu lösen. Der Ansatz wird 30 min bei RT inkubiert, bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hat (um das Lösen zu erleichtern, zwischendurch mehrmals kräftig vortexen). Die Proteine werden mit 15 % TCA auf Eis 2 h gefällt. Die Proteine werden 20 min bei 4 °C und 14000 rpm abzentrifugiert und anschließend das Pellet 3 x mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Um das Pellet zu trocken wird das Eppendorf-Cap 5 min bei geöffnetem Deckel in den Heizblock gestellt. Die Proteine werden in 100 µl Harnstoffpuffer gelöst und anschließend 10 µl CHAPS hinzu gegeben. Das DTT im Harnstoffpuffer zerstört Disulfidbrücken und hält die Proteine in ihrem voll reduzierten Zustand, CHAPS dient zum Schutz vor erneuter Aggregation der denaturierten Proteine. Um die Proteine komplett zu lösen wird das Eppendorf-Cap über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wird die Proteinkonzentration nach Bradford (vgl. D 4.1.2) bestimmt und die Proteine werden bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.3 Proteinreinigung über eine Ni-NTA-Agarose-Säule

Das Prinzip dieses Proteinreinigungsverfahrens von der Firma Qiagen beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Imidazolringen an zweiwertige Nickel-Ionen. Proteine, die einen N- oder C-terminalen Anhang von sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten aufweisen, können daher in einem Schritt über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1987). Dabei interagiert der vierzählige Ligand NTA (Nitrilotriessigsäure) mit vier der sechs Koordinationsstellen eines Nickel-Ions, welches über die zwei verbleibenden Stellen die Imidazolringe der Histidinreste binden kann (siehe Abb. 12).

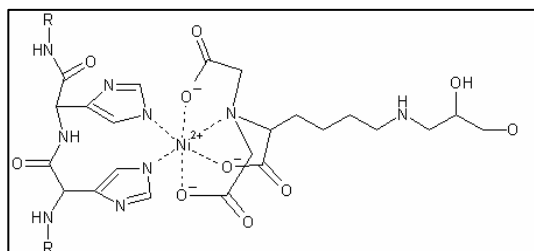


Abb. 12: Interaktion zwischen Ni-NTA und zwei Histidinresten

### 4.3.1 Proteinexpression mit Hilfe der pQE-Plasmide

Mit Hilfe der Vektoren pQE30 und pQE31 von Qiagen kann sehr einfach ein Fusionsprotein exprimiert werden, das aus dem zu reinigenden Protein und einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag besteht. Über diesen Anhang ist dann eine Reinigung über eine Ni-NTA-Agarose-Säule möglich. Das Gen, welches das gewünschte Protein kodiert, steht in beiden „low-copy“ Plasmiden unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors, der aus dem Promotor des T5-Phagen und zwei Sequenzabschnitten des *lac*-Operators zusammengesetzt ist. Eine synthetische Ribosomenbindestelle (RBS) sorgt für hohe Translationsraten und zwei starke Transkriptions-Terminatoren verhindern „read-through“ und stabilisieren das Expressionskonstrukt. Die extrem hohe Transkriptionsrate des T5-Promotors kann dadurch erreicht werden, dass der *lac*-Repressor, der die Aktivität des Promotors reprimiert durch IPTG-Zugabe inaktiviert wird. Des Weiteren vermitteln pQE-Vektoren eine Ampicillinresistenz.

Die pQE-Derivate werden zur Proteinexpression in den *E. coli*-Stamm M15 (pREP4) transformiert (D 1.2.2). Im *E. coli*-Stamm M15 liegt das „high-copy“ Plasmid pREP4 vor, welches das Gen für den *lac*-Repressor trägt, und somit die unkontrollierte Expression des zu reinigenden Proteins verhindert. Außerdem trägt das Plasmid ein Kanamycinresistenzgen.

### 4.3.2 Überexpression des rekombinanten Proteins

Zur Expression des rekombinanten Proteins wird 1 l LB-Medium (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) mit 20 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes inoculiert und die Kultur bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 bis 0,9 angezogen. Ist die erforderliche Zelldichte erreicht, wird ein Aliquot von 1 ml entnommen, das als Negativkontrolle dient und bis zur abschließenden Ernte der Bakterien weiterinkubiert wird. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt dann durch Zugabe des Laktoseanalogons IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM, was zur Inaktivierung des *lac*-Repressors und damit zur Expression des Proteins führt. Die Kultur wird weitere drei bis fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Vor der Ernte der Bakterien wird ein weiteres Aliquot als Positivkontrolle entnommen. Die Kontrollpellets werden in 100 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, 5 min bei 100 °C gekocht und anschließend gevortext und auf Eis schnell abgekühlt. Zur Kontrolle der Proteinproduktion werden je 20 µl in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe D 4.1.1). Sollten toxische Effekte aufgrund der hohen Expression des rekombinanten Proteins auftreten, so kann die Überproduktion durch eine Varyierung der eingesetzten IPTG-Konzentration (0,1 bis 1 mM) optimiert werden.

Die Bakterienkultur wird nach der Induktion für 15 min in einem JA-10 Rotor bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Bakterienpellet mit 20 ml French-Press Puffer (siehe D 4.3.3.1) gewaschen, die Suspension in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt, bei 5000 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das erhaltene Pellet wird bei -20 °C eingefroren.

### 4.3.3 Zellaufschluss

#### 4.3.3.1 Zellaufschluss durch die French-Press

|                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| French-Press (FP)-Puffer: | 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) |
|                           | 50 mM KCl               |
|                           | 5 mM MgCl <sub>2</sub>  |
|                           | 1 mM DTT                |
|                           | 1 mM PMSF               |

Mit Hilfe der French-Press (FP) werden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Diese Methode ist sehr effizient und für die Proteine schonend. Das nach der Induktion eingefrorene Bakterienpellet (D 4.3.2) wird in 10 ml kaltem FP-Puffer (ca. 1/100 des ursprünglichen Kulturvolumens) aufgetaut. Die Bakteriensuspension wird in die kalte French-Press-Zelle eingezogen und mit einem Druck von etwa 1000 bar aus der FP-Zelle durch eine schmale Öffnung in einen auf Eis stehenden JA-25,5-Zentrifugationsbecher gequetscht. Dadurch werden die Bakterienzellen mechanisch aufgebrochen. Aufgrund der Proteaselabilität zahlreicher Proteine sollten alle Geräte, Lösungen und die Probe selbst immer kalt gehalten und zügig gearbeitet werden. Auch sollte der Proteaseinhibitor PMSF immer zugegeben werden. Bei einem Bakterienpellet, das nicht eingefroren wurde, sollte für einen effizienten Zellaufschluß die Prozedur ein- bis zweimal wiederholt werden. Die Zugabe von MgCl<sub>2</sub> in die Reinigungspuffer ist bei Response Regulatoren für die Faltung des aktiven Zentrums wichtig.

Zur Trennung der löslichen von der unlöslichen Proteinfraction wird die mit der French Press behandelte Probe 30 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand sollte gelb bis braun gefärbt sein, ohne jedoch eine Trübung aufzuweisen. Wird trüber Überstand auf die Säule aufgetragen, kann das zu deren Verstopfung führen. Durch Auftragung eines Aliquots des Überstandes sowie des Pellets auf ein Polyacrylamidgel (D 4.1.1) wird dann untersucht, ob das zu reinigende Protein aggregiert und in Einschlußkörperchen, so genannten „inclusion bodies“, akkumuliert ist oder sich in der löslichen Fraktion befindet. Die Bildung von Einschlußkörperchen ist meist eine Konsequenz hoher Proteinproduktion und unabhängig von Eigenschaften des akkumulierten Proteins. Außerdem fördern hohe Temperaturen, wie z.B. 42 °C, den Aggregationsprozess. Die „inclusion bodies“ können bis zu 50 % des Gesamtzellproteins beinhalten und bestehen zumeist fast ausschließlich aus dem überexprimierten Protein (Lilie *et al.*, 1998).

#### 4.3.3.2 Zellaufschluss mittels BugBuster-Reagenz

Das BugBuster Protein Extraktions-Reagenz (Novagen) ermöglicht eine vorsichtige Zerstörung der Zellwand von *E. coli* Bakterienzellen, wodurch die löslichen Proteine freigesetzt. Es ist eine einfache und schnelle Alternative zu



mechanischen Methoden, wie z.B. der French Press. Das Reagenz beinhaltet eine Mischung aus nicht-ionischen Detergenzien, die in der Lage sind die Zellwand zu perforieren, ohne die löslichen Proteine zu denaturieren. Das nach der Induktion eingefrorene Bakterienpellet (D 4.3.2) wird gewogen und mit 5 ml BugBuster pro Gramm Bakterienpellet versetzt. Dazu werden 1  $\mu$ l pro Milliliter Bakterienpellet Benzonase hinzu gegeben. Anschließend wird die Zellsuspension 20 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Zur Trennung der löslichen von der unlöslichen Proteinfraction wird die mit BugBuster behandelte Probe 30 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Durch Auftragung eines Aliquots des Überstandes sowie des Pellets auf ein Polyacrylamidgel (D 4.1.1) wird dann untersucht, ob das zu reinigende Protein aggregiert und in Einschlußkörperchen, den so genannten „inclusion bodies“, akkumuliert ist oder sich in der löslichen Fraktion befindet.

#### 4.3.4 Vorbereitung der Säule

Basispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
50 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 % Glycerin  
1 mM DTT  
1 mM PMSF

Die Ni-NTA-Agarose hat eine Bindekapazität von 5 bis 10 mg Protein pro Milliliter Säulenmaterial. Daher genügen zur Proteinreinigung aus einem Liter Bakterienkultur 5 ml Ni-NTA-Agarose. Das Säulenmaterial wird auf die Säule gegeben und gründlich mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, da es vom Hersteller als Suspension in 30 %igem Ethanol geliefert wird. Anschließend wird der Stempel luftblasenfrei aufgesetzt, die Matrix ein weiteres Mal mit 10 Volumen dH<sub>2</sub>O gewaschen und dann mit 50 ml Basispuffer äquilibriert.

#### 4.3.5 Reinigung von löslichen Proteinen

Imidazol-Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
50 mM KCl  
250 mM Imidazol  
10 % Glycerin  
1 mM PMSF  
1 mM DTT

Dialysepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
50 mM KCl  
250 mM Imidazol  
20 % Glycerin  
1 mM PMSF  
1 mM DTT

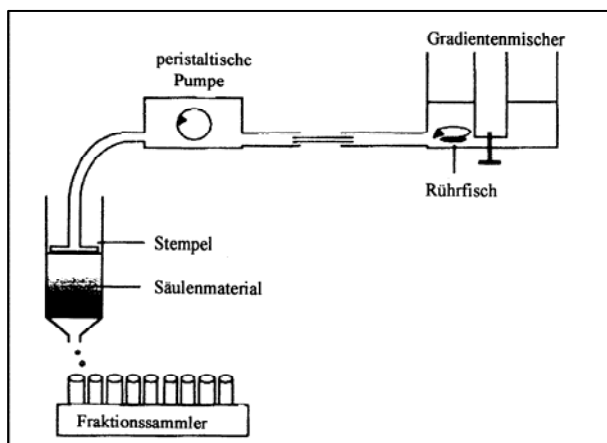


Abb. 13: Schematischer Aufbau der Apparatur zur Proteinreinigung.

Die Proteinreinigung kann bei Raumtemperatur erfolgen, wenn alle Lösungen auf Eis gekühlt werden und die Stabilität des zu reinigenden Proteins dies zulässt. Liegt das Protein nach Zellaufschluss mit der French Press löslich im Überstand vor, so kann dieser direkt über den Stempel auf die äquilibrierte Säule gegeben werden. Anschließend wird die Säule mit 100 ml Basispuffer gewaschen, um Verunreinigungen in Form von Proteinen, die schwach oder gar nicht mit der Ni-NTA-Agarose interagieren, zu entfernen.

Zur Elution der gebundenen Proteine wird ein Imidazolgradient angelegt. Das Imidazol kompetitiert um die Koordinationsstellen der Nickel-Ionen und verdrängt ab einer bestimmten Konzentration die Histidinreste komplett. Die Imidazol-Konzentration wird mit Hilfe eines Gradientenmischers linear von ursprünglich 0 mM auf 250 mM erhöht. Der Basispuffer befindet sich dabei in der Hälfte des Mischers, die mit der Säule verbunden ist, während in die andere Hälfte Imidazol-Elutionspuffer gegeben wird. Das Eluat wird in 1,2 ml-Fractionen aufgefangen (siehe Abb. 13). Es ist ratsam nach Anlegen des Gradienten nochmals einige Fraktionen zu sammeln, bei denen Imidazol-Elutionspuffer mit einer Imidazolkonzentration von 1 M verwendet wurde, um sicherzustellen, dass auch wirklich die ganze Proteinmenge eluiert wird. 30  $\mu$ l-Aliquots jeder zweiten Elutionsfraktion, vom Durchfluss und von den Waschfraktionen werden mit 10  $\mu$ l Laemmli-Puffer versetzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen

(vgl. D 4.1.1). Die Fraktionen, die das Protein in möglichst reiner Form enthalten, werden vereinigt und 3 bis 5 Stunden im Kühlraum gegen Dialysepuffer dialysiert. Dadurch wird das Imidazol aus der Proteinlösung entfernt und die Glycerinkonzentration für die Lagerung des Proteins bei -80 °C auf 20 % erhöht.

#### 4.3.6 Reinigung von unlöslichen Proteinen

Die Reinigung von Proteinen über eine Ni-NTA-Agarose-Säule erfordert keine nativen Strukturen. Eine reversible Denaturierung kann sogar im Gegenteil förderlich sein, wenn die Histidinreste im nativen Zustand sterisch schlecht zugänglich sind. Denaturierte Proteine werden auf der Säule langsam zurückgefaltet und anschließend eluiert. Durch diese Vorgehensweise wird die Gefahr der Aggregatbildung bei der Rückfaltung vermindert. Liegt das zu reinigende Protein nach Zellaufschluss und Zentrifugation in aggregierter Form im Pellet in Einschlusskörperchen vor, wird es vor der Reinigung über die Säule unter Einsatz hoher Konzentrationen von Harnstoff oder Guanidiniumchlorid denaturiert und die „inclusion bodies“ somit aufgelöst.

|                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| Denaturierungspuffer: | 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) |
|                       | 50 mM KCl               |
|                       | 5 mM MgCl <sub>2</sub>  |
|                       | 6 M GuCl                |
|                       | 10 % Glycerin           |
|                       | 1 mM DTT                |
|                       | 1 mM PMSF               |

Zunächst werden hydrophobe Anteile, wie z.B. Membranproteine, mit Hilfe geringer Konzentrationen eines Detergenz aus dem Pellet gelöst. Hierzu wird das Pellet 30 min auf Eis in 20 ml Triton-Puffer (Basispuffer mit 1 % Triton X-100) gerührt, der Ansatz 15 min bei 15000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet ein zweites Mal mit Triton-Puffer behandelt. Zur Denaturierung des aggregierten Proteins wird das Pellet dann in 30 ml Denaturierungspuffer auf Eis für weitere 30 min langsam gerührt, so dass kaum Luftblasen entstehen. Für all diese Schritte sollten Kunststoffgefäße verwendet werden, um ein Binden des Proteins an Glas zu vermeiden. Die Lösung wird dann abzentrifugiert (30 min, 15000 rpm, 4 °C) und der klare Überstand mit den nun denaturierten und somit löslichen Proteinen in ein frisches Gefäß überführt. Nun folgt der Rückfaltung der Proteine. Dies ist der kritische Schritt des Verfahrens, da hierbei ein großer Anteil des denaturierten Proteins durch Aggregation ausfällt, bevor die Renaturierung abgeschlossen ist. Dabei gilt, dass die Wahrscheinlichkeit, dass sich entfaltete hydrophobe Proteinregionen finden und sich zum Schutz vor der hydrophilen Umgebung zusammenlagern und somit Aggregate bilden, mit der Proteinkonzentration ansteigt.

Die Säule wird mit 50 ml Denaturierungspuffer äquilibriert. Anschließend wird der Überstand langsam auf die Säule aufgetropft. Der Renaturierungsschritt ersetzt dann den sonst üblichen Waschschrift und sollte sich über einen Zeitraum von mindestens zwei Stunden erstrecken. Die Renaturierung erfolgt mit einem Gradientenmischer, mit dessen Hilfe ein Guanidiniumchloridgradient „rückwärts“ angelegt wird. Der Denaturierungspuffer befindet sich dabei in der Hälfte des Mischers, die mit der Säule verbunden ist, während der Basispuffer in die andere Hälfte gegeben wird. Dadurch wird die Guanidiniumkonzentration auf der Säule stetig verringert. Danach werden weitere 3 bis 5 Volumen Basispuffer auf die Säule gebracht und die Elution wie oben beschrieben (D 4.3.5) durchgeführt.

### 4.4 Proteinreinigung über die Glutathion-Sepharose Säule

#### 4.4.1 Proteinexpression mit Hilfe der pGEX-Plasmide

Der pGEX-3X Vektor ist ein weiteres IPTG-induzierbares Plasmid, welches die Überexpression von GST-Fusionsproteinen ermöglicht. Der entsprechende DNA-Abschnitt, der dem zu reinigenden Protein entspricht wird dabei im Leserahmen hinter das für die Glutathion-S-Transferase kodierenden Sequenz kloniert. Das daraus resultierende Fusionsprotein trägt nun N-terminal das GST-Protein, welches mit Hilfe der Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose gereinigt werden kann. Die Überexpression erfolgt im *E. coli*-Stamm DH5α.

#### 4.4.2 Überexpression des rekombinanten Proteins

Die Überexpression erfolgt ähnlich wie unter D 4.3.2 beschrieben. Allerdings wird das LB-Medium nur mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG wird die Kultur bei 30 °C anstatt bei 37 °C weiter inkubiert.

#### 4.4.3 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgt wie unter D 4.3.3 beschrieben

#### 4.4.4 Vorbereitung der Säule

5 ml der Glutathion Sepharose werden auf die Säule gegeben und gründlich mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, da es vom Hersteller als Suspension in 20 %igem Ethanol geliefert wird. Die Matrix wird nochmals gründlich mit kaltem 1 x PBS gespült. Die Schlauchklemme wird nun geschlossen und es kommen 15 ml 1 x PBS auf die Säule. Nachdem sich die Matrix sedimentiert hat, wird der Stempel luftblasenfrei aufgesetzt und die Säule nochmals mit 50 ml 1 x PBS äquilibriert.

|          |  |
|----------|--|
| 1 x PBS: | 140 mM NaCl                            |
|          | 2,7 mM KCl                             |
|          | 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|          | 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |

#### 4.4.5 Proteinreinigung

|                 |                         |
|-----------------|-------------------------|
| Elutionspuffer: | 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) |
|                 | 10 mM Glutathion        |

Der nach dem Zellaufschluss erhaltenen Überstand wird 1:1 mit 1 x PBS/1 % Triton X-100 gemischt und anschließend auf die Säule geladen. Der Ladevorgang sollte mindestens 1 h oder länger dauern. Anschließend wird die Säule mit 75 ml 1 x PBS gewaschen.

Zur Elution der gebundenen Proteine wird ein Glutathion-Gradient angelegt. Die Glutathion-Konzentration wird mit Hilfe eines Gradientenmischers linear erhöht. Das 1 x PBS befindet sich dabei in der Hälfte des Mischers, die mit der Säule verbunden ist, während in die andere Hälfte Glutathion-Elutionspuffer gegeben wird. Das Eluat wird in 1,2 ml-Fractionen aufgefangen. Es ist ratsam nach Anlegen des Gradienten nochmals einige Fractionen zu sammeln, bei denen reiner Glutathion-Elutionspuffer eingesetzt wird, um sicherzustellen, dass auch wirklich die ganze Proteinmenge eluiert wird. 30 µl-Aliquots jeder zweiten Elutionsfraction, vom Durchfluss und von den Waschfractionen werden mit 10 µl Laemmli-Puffer versetzt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Fractionen, die das Protein in möglichst reiner Form enthalten, werden vereinigt und 3 bis 5 Stunden im Kühlraum gegen Dialysepuffer dialysiert. Dadurch wird das Imidazol aus der Proteinlösung entfernt und die Glycerinkonzentration für die Lagerung des Proteins bei -80 °C auf 20 % erhöht.

### 4.5 Western-Blot

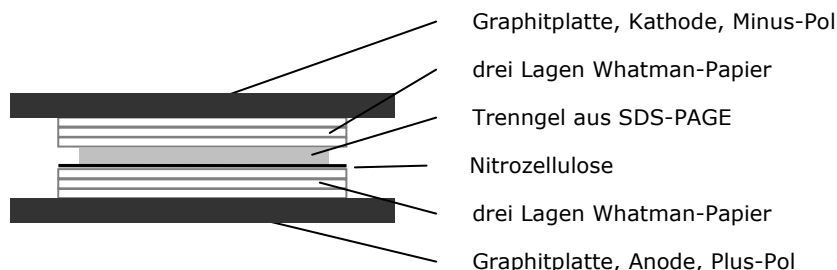
#### 4.5.1 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| „all-in-one“ Blotpuffer: | 48 mM Tris   |
|                          | 39 mM Glycin |
|                          | 1,28 mM SDS  |
|                          | 20 % EtOH    |

|                   |                        |
|-------------------|------------------------|
| Ponceau S Lösung: | 2 % Ponceau S          |
|                   | 5 % Trichloressigsäure |

Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel (D 4.1.1) können die Proteine nach der Methode von Towbin *et al.* auf eine geeignete Träger-Membran, die z.B. aus Nitrocellulose bestehen kann, übertragen werden (Towbin *et al.*, 1979). Hierbei werden zunächst die Graphit-Platten der Apparatur mit Wasser befeuchtet und folgende Lagen auf die als Anode dienende Platte luftblasenfrei geschichtet (Vgl. Abb. 14): auf drei Lagen mit „all-in-one“ Blotpuffer getränktem Whatman-Papier (für Minigele 10 x 8 cm) folgt die Membran, auf die die Proteine geblottet werden sollen. Eine Nitrozellulose-Membran muss dabei zuerst in dH<sub>2</sub>O angefeuchtet werden. Auf die Membran (für Minigele 7 x 9 cm) folgen dann das nicht gefärbte Trenngel und weitere drei Lagen von in „all-in-one“ Blotpuffer getränktem Whatman-Papier.

Abb. 14: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western Blots. (Mit freundlicher Genehmigung, Norman Mauder)



Die als Kathode dienende Graphit-Platte wird anschließend aufgesetzt, bevor dann der Proteintransfer erfolgen kann. Hierzu wird etwa eine Stunde lang eine Stromstärke von 0,89 mA/cm<sup>2</sup> Membran angelegt. Die Effizienz der Übertragung kann durch Färbung der geblotteten Proteine mit PonceauS-Lösung und anschließende Entfärbung in dH<sub>2</sub>O kontrolliert werden.

#### 4.5.2 Immunoblot

|                     |  |
|---------------------|--|
| 1 x TBS:            | 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)<br>137 mM NaCl         |
| Blockierungspuffer: | 1 x TBS<br>6 % Magermilchpulver<br>0,1 % Tween |
| Waschpuffer:        | 1 x TBS<br>0,1% Tween                          |

Der Immunoblot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Die Proteine werden zuerst elektrophoretisch aufgetrennt (D 4.1.1) und dann auf eine Trägermembran geblottet (D 4.5.1). Freie Proteinbindestellen auf der Membran werden durch Blockierungspuffer (mind. 1 Stunde, auch über Nacht) abgesättigt. Der erste Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, wird in Blockierungspuffer verdünnt (meist 1:1000) und die Membran darin mindestens eine Stunde (oder über Nacht) im Kühlraum geschwenkt. Die im Blockierungspuffer vorhandene Magermilch stabilisiert den Antikörper und blockt unspezifische Bindungen. Dann wird die Membran mit Waschpuffer gewaschen (einmal 15 min, zweimal je 5 min). Hierauf kann der zweite Antikörper, ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper der spezifisch gegen die F<sub>c</sub>-Region des ersten Antikörper gerichtet ist, aufgebracht werden, der ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt wird (1:1000). Nach einer einstündigen Inkubation im Kühlraum wird die Membran abermals mit Waschpuffer gewaschen (s.o.) bevor der Immunoblot dann entwickelt werden kann.

Die Entwicklungsreagenzien 1 und 2 (Amersham) werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (0,125 ml/cm<sup>2</sup> Membran) und die fertige Lösung für 1 min auf die Membran gegeben. Das Entwicklungsreagenz wird von der Membran abgossen und die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt. Das entstehende Lichtsignal kann mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden.

#### 4.6 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen *H. pylori* Proteine

Für die Detektion von Proteinen in Immunoblotanalysen (D 4.5) wird ein polyklonaler Antikörper gegen das entsprechende Protein benötigt. Um einen polyklonalen Antikörper herzustellen wird zunächst das Protein gegen den der Antikörper gerichtet sein soll aufgereinigt. Dies kann nach D 4.3 oder D 4.4 erfolgen. Allerdings sollte versucht werden, die Proteine im renaturierten Zustand zu eluieren, da die Kaninchen, denen die Proteine zur Antikörperbildung injiziert werden, Guanidinium-Chlorid-freie Injektionen bekommen müssen. Ist dies nicht möglich, da z.B. die renaturierten Proteine auf dem Säulenmaterial präzipitieren und nicht in löslicher Form eluiert werden können, können die Proteine im denaturierten Zustand in Anwesenheit von Guanidinium-Chlorid von der Säule gelöst und anschließend gegen PBS dialysiert werden.

Bevor die Kaninchen mit den gereinigten Proteinen immunisiert werden, muss ein bereits vorhandener Antikörper-Titer der Mäuse gegen das Protein, sowie mögliche Kreuzreaktionen mit *H. pylori*-Proteinen ausgeschlossen werden können. Hierfür werden Lysate von *H. pylori* und ein Aliquot des Proteins auf ein PAA-Gel aufgetragen und geblottet (siehe D 4.5). Als erster Antikörper wird hier das zu untersuchende verdünnte Präimmunserum (1:500) von dem zu testenden Kaninchen eingesetzt. Anschließend erfolgt die Detektion über einen Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen. Anhand dieses Tests kann entschieden werden, welches Tier für eine Immunisierung geeignet ist.

Für die Antikörper-Produktion muss die Konzentration der entsprechenden Proteinsuspension nach Bradford bestimmt werden (D 4.1.2). Eine entsprechende Menge an Proteinsuspension wird eine Firma geschickt, welche die Immunisierung der Kaninchen durchführt (hier: Charles River Labor Service Systems, Kißlegg). Der erhaltene Antikörper wird nach Erhalt hinsichtlich seiner Reaktion mit dem gereinigten Protein in einem Immunoblot (D 4.5) überprüft.

Für die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper anti-HP1021 und anti-HP0166 wurden zur Überexpression der jeweiligen Proteine die *E. coli*-Stämme M15[pQE-R2-3] bzw. M15[pQE-0166] verwendet.

#### 4.7 Zweidimensionale Proteingelelektrophorese

Die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese, die erstmals von O'Farrell und Klose 1975 beschrieben wurde, ist eine Kombination aus zwei unabhängigen Elektrophoreseschritten, die der Auftrennung von komplexen Proteingemischen dient (Klose, 1975; Klose & Kobalz, 1995; O'Farrell, 1975). Durch die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgt zunächst eine Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die sich anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewährleistet eine Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem relativen Molekulargewicht. Nach Visualisierung der Proteine im Gel entspricht jeder Spot auf dem 2D-Gel einem einzelnen Protein aus der Gesamtproteinprobe. Auf diese Weise können über 10.000 Proteine pro Gel aufgetrennt werden.

##### 4.7.1 Auftrennung von Proteinen in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der IEF werden Proteine, die amphotere Moleküle darstellen, im elektrischen Feld anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) voneinander getrennt. Ein Protein wandert hierbei in einem pH-Gradientengel bis zu dem spezifischen pH-Wert, an dem seine Nettoladung, die durch die positiven und negativen Ladungen der Aminosäureseitenketten bestimmt wird, gleich Null ist. Liegt der umgebende pH-Wert eines Proteins unter dem pI-Wert, so ist es positiv

geladen und wandert im elektrischen Feld in Richtung Kathode. Liegt der pH-Wert über dem pI-Wert, ist es negativ geladen und wandert in Richtung Anode, bis es seinen pI-Wert erreicht.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten pH-Gradientengelen handelt es sich um so genannte immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Strips, die von Amersham Biosciences bezogen wurden. Die zur Herstellung der pH-Gradienten verwendeten Immobiline bestehen aus definierten sauren bzw. basischen Gruppen, die jeweils mit Acrylamidmonomeren verknüpft sind. Der pH-Gradient wird durch kontinuierliche Mischung zweier unterschiedlicher Immobiline-Lösungen erreicht, die mit dem Acrylamid kopolymerisieren. Auf diese Weise ist das individuelle Mischen eines Gradienten möglich, der an die Gelmatrix gebunden ist und daher sehr stabil und gut reproduzierbar ist.

Die „Immobiline DryStrip gels“ von Amersham Biosciences sind in unterschiedlichen Längen und mit unterschiedlichen pH-Gradienten erhältlich.

#### 4.7.1.1 Rehydrierung der IPG-Strips im Reswelling-Tray

Da das Gel auf den immobilisierten Strips getrocknet ist, muss es vor der IEF rehydriert werden.

Rehydrierungslösung:                    7 M Harnstoff  
     2 M Thioharnstoff  
     4 % CHAPS  
     etwas Bromphenolblau (BPB)

Die Rehydrierung erfolgt im so genannten „Reswelling-Tray“ (Amersham Biosciences). Pro Strip werden 340 µl Rehydrierungslösung mit 0,5 % IPG-Puffer (entsprechend dem pH-Bereich des IPG-Strips) versetzt. Des Weiteren gibt man entweder 18 mM DTT oder, im Falle von IPG-Strips mit basischen (> pH 7) pH-Gradienten, 4 µl „DeStreak“-Lösung (Amersham Biosciences) hinzu. Die supplementierte Rehydrierungslösung wird in einen „Channel“ des Reswelling-Trays pipettiert und der Strip vorsichtig mit der Gelseite nach unten auf die Rehydrierungslösung gelegt, so dass sich die Rehydrierungslösung möglichst gleichmäßig unter dem Strip verteilt. Der IPG-Strip wird noch mit 2 ml Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgt für 10-20 h bei RT.

#### 4.7.1.2 IEF im Manifold

Die IEF erfolgt in der „Ettan™IPGphor“ von Amersham Biosciences. Die IPGphor wird mit einem mit dH<sub>2</sub>O befeuchteten Tuch gereinigt und anschließend getrocknet. Die so genannte „Manifold“ ist eine Keramikplatte, auf der bis zu 12 IPG-Strips in einzelne Channels parallel platziert werden können. Sie wird auf der IPGphor platziert und mit einer Libelle austariert. Anschließend werden 108 ml Mineralöl gleichmäßig in die 12 Channels verteilt. Die rehydrierten IPG-Strips (D 4.7.1.1) werden nun mit der Gelseite nach oben in den Channels platziert, so dass der saure Bereich des IPG-Strips über der Anode und der basische Bereich über der Kathode liegt. Die „Sample-Cups“, die dem Aufbringen der Proteinprobe auf das Gel dienen, werden positioniert und mit Hilfe des „Insertion-Tools“ auf der Manifold fixiert. Etwa 2,5 cm lange und 0,5 cm breite Whatman-Papierstreifen werden mit 150 µl dH<sub>2</sub>O befeuchtet und jeweils an den Enden der IPG-Strips positioniert, so dass sie zu etwa 0,5 cm auf den Gelen liegen. Dann werden die Elektroden auf den Whatman-Papieren positioniert.

Die Proteinproben (D 4.2.2) werden mindestens 5 min abzentrifugiert und die aufzutrennende Menge in die Sample-Cups pipettiert (max. 150 µl). Werden die Proteine nach der 2D-Gelelektrophorese mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht, reichen schon 50 µg Gesamtzellprotein, da diese Färbemethode so sensitiv ist, dass 1 ng Protein sichtbar wird. Werden die Proteine allerdings anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt, um die differentiell exprimierten Proteine massenspektrometrisch analysieren zu können, sollte man etwa die 100fache Menge an Gesamtzellprotein einsetzen, da diese Färbemethode deutlich weniger sensitiv im Vergleich zur Silbernitratfärbung ist. Geeignete Mengen liegen zwischen 500 und 1000 µg Proteinprobe.

Der Deckel der Apparatur wird geschlossen und die IEF unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt, wobei die ersten 3 Schritte verlängert werden können:

|     |        |               |
|-----|--------|---------------|
| 3 h | 300 V  | Step and Hold |
| 6 h | 1000 V | Gradient      |
| 3 h | 8000 V | Gradient      |
|     | 8000 V | Step and Hold |

Bei einer Auftrennung von 50-100 µg Protein erfolgt die IEF der Proteine, bis etwa 60.000 Vhs erreicht sind. Hat man allerdings sehr große Mengen an Proteinprobe aufgetragen (z.B. für Coomassie-Gele) sollte man die Elektrophorese bis mindestens 100.000 Vhs oder länger durchführen.

Während der Elektrophorese werden etwa alle 20.000 bis 30.000 Vhs die Whatman-Papierstreifen ausgewechselt. Diese dienen der Aufnahme von Salzen und Puffer-Ionen sowie von Proteinen, deren pI außerhalb des pH-Bereiches der verwendeten IPG-Strips liegt. Des Weiteren wird hierdurch das System mit dH<sub>2</sub>O versorgt, welches das Gel während langer Elektrophoresen vor Austrocknung schützt.

Nach Beendigung der IEF werden die IPG-Strips aus der Manifold genommen, nach dem Abtropfen von überschüssigem Mineralöl mit der Gelseite nach unten in Alufolie eingewickelt und anschließend auf Trockeneis eingefroren. Die IPG-Strips können so bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.7.2 Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) voneinander getrennt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, durch das die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Es

entstehen anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masse-Einheit. Da durch SDS die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen aufgespalten werden, werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst. Durch den Zusatz von reduzierenden Thiolverbindungen wie z.B. Dithiothreitol (DTT) werden außerdem vorhandene Disulfidbrücken der Proteine gelöst. Bei der Elektrophorese ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und den relativen Wanderungstrecken des SDS-Polypeptid-Komplexes. Markerproteine ermöglichen die Ermittlung der Molekulargewichte unbekannter Proteine.

#### 4.7.2.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

|                      |                      |        |
|----------------------|----------------------|--------|
| Displacing-Solution: | 1,5 M Tris-HCl pH8,8 | 50 ml  |
|                      | Glycerin             | 100 ml |
|                      | Bromphenolblau       | 2 mg   |
|                      | dH <sub>2</sub> O    | 50 ml  |

Das Giessen der SDS-Polyacrylamidgele erfolgt im „DALT Gel Caster“ des „Hoefer DALT“-Systems von Amersham Biosciences. Der Caster wird auf die Rückseite in eine Plastikwanne gelegt und die Frontplatte abgeschraubt. Zwei Dreieckschwämme werden in die dafür vorgesehene Öffnung eingesetzt. Der Aufbau der Platten wird nach folgendem Schema durchgeführt: Zunächst wird ein „Seperator-Sheet“ im Caster platziert. Dann folgen immer abwechselnd eine Gelkassette und ein Seperator-Sheet, wobei die flexiblen Silikon-Gelenke der Gelkassetten immer abwechselnd nach links bzw. nach rechts ausgerichtet werden. Bei dem gesamten Aufbau ist darauf zu achten, dass alle Teile (Seperator-Sheets bzw. Gelkassetten) immer an der den Schwämmen abgewandten Seite des Casters angelegt und in Richtung des Caster-Bodens geschoben werden. Der restliche Freiraum im Caster, der nicht von Gelkassetten eingenommen wird, wird mit entsprechend dicken „Filler-Blocks“ oder zusätzlich mit Seperator-Sheets aufgefüllt, bis der Stapel eine Ebene mit der Caster-Kante erreicht. Zwischen den Caster und die Frontplatte wird eine mit Silikon eingefettete Gummi-Dichtung in die dafür vorgesehene Rille eingebracht. Die Frontplatte wird aufgesetzt und vorsichtig zugeschraubt. Der Caster wird anschließend aufgestellt, so dass die Öffnung nach oben ausgerichtet ist. Ein Plastikröhrchen wird in den Gummiring der „Balance-Kammer“ eingeführt und ein Trichter aufgesteckt.

Die SDS-Polyacrylamid-Lösung wird bis auf APS und den Radikalbildner TEMED zusammenpipettiert.

Abb. 15: Zusammensetzung für 22 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele

|  |               |
|--|---------------|
| <b>Reagenzien</b>                        | 22 Gele, 12 % |
| dH <sub>2</sub> O                        | 512,9 ml      |
| 30 % Acrylamid-                          | 624 ml        |
| 0,8 % Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5:1) | 390 ml        |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)                  | 15,6 ml       |
| 10 % (w/v) SDS                           | 15,6 ml       |
| 10 % (w/v) APS                           | 156 µl        |
| TEMED                                    |               |

Anschließend wird die Balance-Kammer mit 150 ml Displacing-Solution gefüllt. Die SDS-Polyacrylamid-Lösung wird mit APS und TEMED versetzt, auf einem Rührer gut gemischt und langsam, luftblasenfrei in den Trichter gefüllt. Anschließend wird das Plastikröhrchen entfernt, so dass die Displacing-Solution nachlaufen und die unterhalb der Gelkassetten befindliche SDS-Polyacrylamid-Lösung von unten in die Gelkassetten drücken kann (evtl. kann zusätzliche Displacing-Solution in die Balance-Kammer nachpipettiert werden). Die obere Gelfront sollte anschließend etwa 1 cm unterhalb der Glaskante der Gelkassetten sein. Jedes Gel wird sofort mit 2 ml dH<sub>2</sub>O überschichtet. Der Caster wird mit Klarsichtfolie abgedeckt und zur Auspolymerisierung der Gele 2 h stehen gelassen.

Nach 2 h wird die Frontplatte vorsichtig abgeschraubt, so dass die Displacing-Solution ablaufen kann. Die einzelnen Gelkassetten sowie die Oberfläche der Gele werden mit warmem Wasser abgewaschen, um Gelreste zu entfernen, und anschließend mit dH<sub>2</sub>O nachgespült. Die Gelkassetten werden in Klarsichtfolie eingepackt und in dH<sub>2</sub>O bei 4 °C gelagert.

#### 4.7.2.2 Herstellung von Molekulargewichts-Standards für die zweite Dimension

1,5 µl Broad Range Molecular Weight Proteinstandard (BioRad) werden mit 28,5 µl Laemmli-Puffer verdünnt und 3 min bei 100 °C erhitzt. Hierzu werden 230 µl 0,5 % M-Agarose in 1x SDS-Laufpuffer pipettiert und gut vermischt. Das Gemisch wird sofort mit Hilfe eines Spritzen-Aufsatzes luftblasenfrei in ein Glasröhrchen aufgezogen. Nach dem Erstarren des Gemisches wird es vorsichtig mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten Spritze auf einen Parafilm herausgedrückt und mit einem sauberen Skalpell in 0,5 cm große Stücke geschnitten. Die Marker-Stückchen werden in einem Eppendorf-Cap bei -20 °C gelagert.

#### 4.7.2.3 Vorbereitung der IEF-Gele und Starten der 2. Dimension

|                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| Äquibrierungslösung: | 50 mM 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 |
|                      | 6 M Harnstoff               |
|                      | 30 % Glycerin               |
|                      | 2 % SDS                     |
|                      | etwas BPB                   |

Die IPG-Strips werden ca. 5 min bei RT aufgetaut, anschließend in jeweils 10 ml Äquilibrierungslösung, die mit 100 mg DTT versetzt wurde, überführt und 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das DTT reduziert vorhandene Disulfidbrücken in den Proteinen. Anschließend werden die Strips in jeweils 10 ml Äquilibrierungslösung, die mit 250 mg Iodoacetamid (IAA) versetzt wurde, überführt und nochmals für 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das IAA alkylt die zuvor durch DTT reduzierten Schwefelgruppen in den Proteinen, um ihre Reoxidation während der Elektrophorese zu verhindern.

Die SDS-Gele werden mit 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet und der Strip nach Abstreifen überschüssiger Äquilibrierungslösung auf einem mit dH<sub>2</sub>O getränkten Whatman-Papier in den Zwischenraum der Gelkassette positioniert. Nach dem Absinken des IPG-Strips im 1 x SDS-Laufpuffer auf die Geloberfläche wird der 1 x SDS-Laufpuffer vorsichtig abgeschüttet, der IPG-Strip so in der Mitte der Gelkassette ausgerichtet, daß die Plastikseite des IPG-Strips Kontakt zur hinteren Glasplatte der Gelkassette aufweist, und neben dem Strip noch ein Marker-Stückchen positioniert (D 4.7.2.2). Um den IPG-Strip zu fixieren und den Kontakt zwischen IPG-Strip und Geloberfläche zu gewährleisten, wird dieser mit 0,5 % M-Agarose in 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet.

Die Gelkassetten werden anschließend mit den flexiblen Silikon-Gelenken nach oben in den mit etwa 20 l 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Tank des „Hoefer DALT“-Systems von Amersham Biosciences positioniert. Die Menge des Laufpuffers richtet sich nach der Anzahl der Gele und sollte mindestens bis zu den oberen Spacern der Gelkassetten, jedoch nicht über die Silikonrücken hinaus reichen. Nach Inbetriebnahme der Zirkulationspumpe und Kühlung des Systems auf 15 °C erfolgt die Elektrophorese bei 90-110 V für etwa 18-20 h (über Nacht), bis die BPB-Lauffront das untere Ende der Gele erreicht.

#### 4.7.3 Proteinfärbung mit Silbernitrat

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Fixierer (ca. 250 ml pro Gel): | 50 % Ethanol<br>12 % Essigsäure<br>38 % dH <sub>2</sub> O  |
| Oxidierer (pro Gel):           | 125 ml dH <sub>2</sub> O<br>83 µl 37 % Formaldehyd<br>63 µl 43 % Na-Thiosulfat   |
| Silbernitratlösung (pro Gel):  | 125 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,25 g AgNO <sub>3</sub><br>83 µl 37 % Formaldehyd   |
| Entwickler (pro Gel):          | 125 ml dH <sub>2</sub> O<br>7,5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub><br>63 µl 37 % Formaldehyd<br>2,3 µl 43 % Na-Thiosulfat |

EDTA-Lösung (ca. 250 ml pro Gel): 40 mM EDTA

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten der Gelkassetten aufgehebelt, die Strips von den Gelen entfernt und die Gele für mindestens eine Stunde oder über Nacht unter leichtem Schwenken fixiert. Für die anschließende Färbung werden Oxidierer, Silbernitratlösung und Entwickler immer frisch angesetzt, wobei jeweils 125 ml pro Gel benötigt werden.

Nach dem Fixieren werden die Gele 2 x 30 min mit 30 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend werden die Gele genau 1 min unter starkem Schwenken oxidiert und nach einem weiteren Waschschrift (3 x 1 min mit dH<sub>2</sub>O) für 1 h mit der Silbernitratlösung gefärbt. Vor der Entwicklung werden die Gele zuerst 2 x 30 sec mit dH<sub>2</sub>O gespült und solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Proteine gut sichtbar sind (ca. 3-5 min). Die Entwicklung wird durch EDTA-Lösung abgestoppt. Alle Gele sollten gleich lang entwickelt werden, um die Proteinexpressionsmuster anschließend miteinander vergleichen zu können. Die Gele werden eingescannt und anschließend in Plastikfolie eingeschweißt.

#### 4.7.4 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie

|                   |  |
|-------------------|--|
| Stocklösung A:    | 1 %ige Coomassie Blau (G250)-Lösung in dH <sub>2</sub> O   |
| Stocklösung B:    | 10 ml Stocklösung A<br>10 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>2 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>ad 100 ml dH <sub>2</sub> O |
| Gebrauchslösung : | 160 ml Stocklösung B<br>40 ml MeOH   |

Die SDS-Polyacrylamidgele werden vor der Färbung 2 h mit ca. 250 ml 12 % TCA fixiert. Anschließend werden sie 2-3 Tage mit 200 ml kolloidalem Coomassie (Gebrauchslösung) unter vorsichtigem Schwenken gefärbt. Für die Prozedur sollte man nur extra dafür vorgesehene Behälter verwenden und die Gele nur vorsichtig am Rand mit sauberen Handschuhen anfassen, da Kontaminationen die anschließende MALDI-ToF (siehe D 4.7.5.2) stören könnten. Die Gele werden mindestens 7 h mit dH<sub>2</sub>O entfärbt, wobei das dH<sub>2</sub>O mehrmals gewechselt wird. Die gefärbten Gele werden eingescannt und können bis zu drei Tage in dH<sub>2</sub>O aufbewahrt werden.

#### 4.7.5 Analyse der 2D-Gele

##### 4.7.5.1 Western-Blot

Mit den ungefärbten 2D-Gelele kann wie unter D 4.5 beschrieben ein Westernblot durchgeführt werden.

##### 4.7.5.2 MALDI-ToF-MS

Der Name MALDI-ToF-MS steht für "Matrix-assisted-Laser-Desorptions-Ionisations-Time-of-Flight-Mass-Spektrometrie". Die Massenspektrometrie ist die analytische Auftrennung von einzelnen geladenen Molekülen durch elektrische und magnetische Felder im Vakuum. Aus dem Verhalten der Ionen bestimmt eine MS den Quotienten aus Masse ( $m$ ) und Ladung ( $z$ ) eines Ions und kann bei Kenntnis der Ladung die Masse selbst ermitteln. Anschließend kann anhand einer vergleichenden Suche in Datenbanken nach der Identität des Proteins gesucht werden.

##### 4.7.5.3 Auswertung mit der Delta 2D Software von DECODON

Diese Software ermöglicht den Vergleich von zwei eingescannten 2D-Gelele. Die tif-Files der beiden Gele werden übereinander gelagert und den Spots des jeweiligen Gels eine Falschfarbe zugeordnet. So kann man unterschiedlich starke Expressionen der einzelnen Proteine miteinander vergleichen.

#### 4.8 Phosphorylierungsassays

##### 4.8.1 Analyse der Autophosphorylierung von Histidin-Kinasen und des Phosphotransfers auf Response Regulatoren

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 5 x Phosphorylierungspuffer: | 250 mM Tris-HCl (pH 7,5)<br>250 mM KCl<br>50 mM MgCl <sub>2</sub> |
|------------------------------|---|

Die Fähigkeit der Histidin-Kinasen zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung und der Transfer dieser Phosphorylgruppe auf die Response Regulatoren kann *in vitro* durch Zugabe von ATP zu den gereinigten Proteinen untersucht werden. Diese werden danach in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (D 4.1.1) und anschließend autoradiographisch dargestellt. Unter Standardbedingungen werden folgende Ansätze zusammenpipettiert:

|          |  |               |
|----------|--|---------------|
| ATP-Mix: | ATP (10 mM, AmershamPharmacia):                          | 10 $\mu$ l    |
|          | $\gamma$ - <sup>33</sup> P-ATP bzw. <sup>32</sup> P-ATP  |               |
|          | (AmershamPharmacia: 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l; 3000Ci /mmol): | 25 $\mu$ l    |
|          | dH <sub>2</sub> O  | ad 40 $\mu$ l |

Phosphorylierungsansatz (halber Ansatz):

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| 5x Phosphorylierungspuffer: | 5 $\mu$ l     |
| ATP-Mix:                    | 5 $\mu$ l     |
| Response Regulatoren:       | 5 $\mu$ M     |
| Histidin-Kinasen:           | 1 $\mu$ M     |
| dH <sub>2</sub> O:          | ad 25 $\mu$ l |

Nach Zugabe der Kinase (wird zuletzt dazugegeben, denn dann starten die Phosphorylierungsreaktionen) wird der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 7,5  $\mu$ l Laemmli-Puffer gestoppt und 15-20  $\mu$ l der Ansätze über ein denaturierendes 15 %iges Polyacrylamid-Minigel aufgetrennt (D 4.1.1). Die Elektrophorese erfolgt bei 150 V und wird, kurz bevor die Bromphenolblaufront das Gel verlässt, beendet, da sonst radioaktiv markiertes ATP aus dem Gel in den Puffer läuft. Dies ist nach etwa 50 min der Fall. Am unteren Gelrand wird mit einem scharfen Skalpell ein ca. 1,5 cm breiter Streifen vorsichtig entfernt, um sicherzustellen, dass markierte Proteine nicht durch die freien, nicht eingebauten Nukleotide bei der Autoradiographie überstrahlt werden. Das Trenngel wird anschließend in Folie eingeschweißt und in eine zuvor gelöschte PhosphorImager-Kassette (Molecular Dynamics) gelegt. In Abhängigkeit von der Strahlungsintensität können die radioaktiv markierten Proteinbanden am PhosphorImager nach 2 bis 16 Stunden dargestellt, wenn erwünscht densitometrisch ausgewertet und mit Hilfe eines Thermodruckers dokumentiert werden. Anschließend kann ein Röntgenfilm in Abhängigkeit von der Strahlungsintensität für zwei Stunden und bis zu 14 Tage bei -20 oder -80 °C exponiert werden.

Sollte die Phosphorylierungsintensität eines Proteins bei maximaler Gelbelastung sehr gering sein, so kann eventuell eine Vervielfachung der Ansätze und damit eine Vervielfachung der Proteinmenge Abhilfe schaffen. Da aber keine beliebigen Volumina auf ein Gel geladen werden können, muss dann nach der Phosphorylierungsreaktion eine TCA-Fällung erfolgen. Um annähernd quantitativ zu fällen, gibt man dazu vor der TCA-Zugabe nach etwa 5  $\mu$ g BSA in den Ansatz und nimmt das Pellet nach der Fällung in 20 bis 30  $\mu$ l Laemmli-Puffer wieder auf.



**4.8.2 *In vitro*-Phosphorylierung von Response-Regulatoren mit radioaktiv markiertem Acetylphosphat**

|                              |                   |        |
|------------------------------|-------------------|--------|
| 5 x Phosphorylierungspuffer: | Tris HCl pH7,5    | 500 mM |
|                              | KCl               | 500 mM |
|                              | MgCl <sub>2</sub> | 100 mM |

Viele Response-Regulatoren sind in Gegenwart niedermolekularer Phosphodonoren in der Lage, sich zu autophosphorylieren. Um die Fähigkeit von Proteinen zu untersuchen, Acetylphosphat *in vitro* als Phosphodonor zu verwenden, werden Phosphorylierungs-Reaktionen mit <sup>32</sup>P-markiertem Acetylphosphat (Firma NEN Biosciences, 6000 Ci/mmol) durchgeführt. Da die Autophosphorylierung von Response-Regulatoren nicht so effizient abläuft wie der Phosphotransfer von der Kinase zum Regulator, müssen für diese Versuche größere Proteinmengen eingesetzt werden (3 bis 23 µM).

200 pMol der gereinigten Response-Regulator Proteine wurden in 5 x Phosphorylierungs-Puffer in Anwesenheit von 5 µCi radioaktiv markiertem Acetylphosphat in einem Volumen von 20 µl für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Phosphorylierungs-Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli Puffer gestoppt und die Proben anschließend auf ein 20 % SDS Polyacrylamid-Gel geladen (D 4.1.1).

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel in eine Röntgenkassette gelegt und auf das Gel wird ein Röntgenfilm gelegt. Nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden mit Verstärkerfolie bei -80 °C sollten die Banden der phosphorylierten Proteine auf dem Autoradiogramm gut sichtbar sein.

## E. Ergebnisse

### 1. Ein genetisches Komplementationssystem für *H. pylori*

Der eindeutige Nachweis der essentiellen Funktionen der Response-Regulatoren HP1043 und ArsR bzw. der Zellwachstum-assoziierten Funktion von HP1021 wurde im Zuge einer Diplomarbeit erbracht, in der mittels eines genetischen Komplementationssystems gezeigt wurde, dass sich das wildtypische Gen des jeweiligen Response-Regulators in Anwesenheit einer zweiten, in das Chromosom integrierten Genkopie inaktivieren lässt (Schär, 2001; Schär *et al.*, 2005). Die Integration der zweiten, stabilen Genkopie erfolgte mittels Alleltausch.

Dieses System bietet die Möglichkeit, mutierte Derivate von essentiellen Genen aus *H. pylori* zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollten auf diese Weise mutierte Derivate von HP1043 und HP1021 untersucht werden, die Mutationen der untypischen Aminosäurereste der Receiver-Domänen haben. Des Weiteren sollten Derivate von HP1021, HP1043 und ArsR (HP0166), die Mutationen der potentiellen Phosphorylierungsstelle tragen, konstruiert werden und anschließend getestet werden, ob diese Derivate die wildtypischen Response-Regulatoren in ihrer Funktion ersetzen können.

Im Folgenden wird die Strategie dieses genetische Komplementationssystems erläutert. In Abb. 16 ist die angewandte Strategie am Beispiel des Response-Regulators ArsR (HP0166) schematisch dargestellt.

Als Integrationsort für eine mutierte Kopie eines zu untersuchenden Gens in das Chromosom von *H. pylori* wurde der *cag*-Lokus gewählt. Dieser Lokus ist für diesen Zweck geeignet, da die Präsenz der *cag*-PAI für die Virulenz von *H. pylori* zwar von Bedeutung ist, für das *in vitro*-Wachstum von *H. pylori* hingegen keine Rolle spielt. Auch *in vivo* kommt der *cag*-PAI für die Kolonisierungsfähigkeit nur eine untergeordnete Bedeutung zu, was daraus geschlossen werden kann, dass in TypII-Stämmen dieser Lokus nicht vorhanden ist. Nach Integration der zweiten Genkopie in den *cag*-Lokus über homologe Rekombination kann die am wildtypischen Lokus befindliche Kopie des jeweiligen Gens durch Transformation mit einem geeigneten „knock-out“-Plasmid inaktiviert werden, falls die mutierten Derivate den jeweiligen Response-Regulatoren funktionell ersetzen kann.

Als Ausgangskonstrukt für die Klonierungen wird das Plasmid pSL-cagACD verwendet, das Fragmente enthält, die eine homologe Rekombination mit dem *cag*-Lokus ermöglichen. Diese 830 bp bzw. 862 bp langen *EcoRI/BamHI* bzw. *PstI/SacI* DNA-Fragmente umfassen Sequenzen, die das vollständige Protein CagD und AS 48 bis 115 von CagC, bzw. AS 192 bis 478 von CagA kodieren. Das Gen, das zwischen diese Fragmente inseriert werden soll, substituiert somit ein 1545 bp großes DNA-Fragment, das den P<sub>cagAB</sub> Promotor (Spohn *et al.*, 1997) und einen Teil der kodierenden Regionen der Gene *cagA* und *cagBC* enthält. Dadurch

wird sichergestellt, dass die Transkription des klonierten Gens nur unter der Kontrolle seines eigenen Promotors steht.

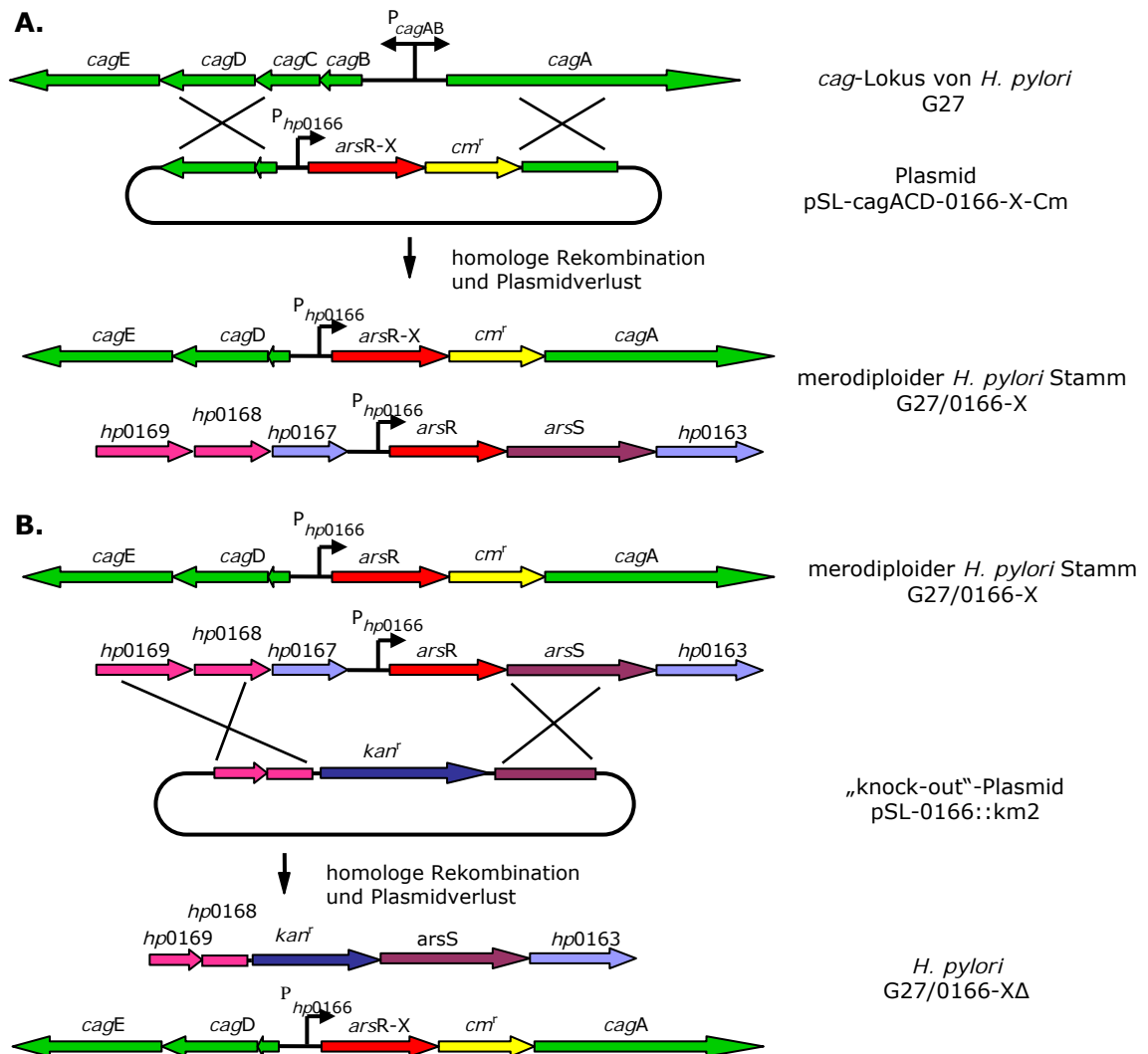


Abb. 16: Darstellung der Strategie der genetischen Komplementation zur funktionellen Analyse mutierter Response-Regulator-Derivate von *H. pylori* am Beispiel von ArsR (HP0166). Die Rekombinationsorte sind durch überkreuzte Striche gekennzeichnet. Das X steht symbolisch für die entsprechende Mutation im Response-Regulatorgen. **A.** Über homologe Rekombination der klonierten Fragmente des Plasmids pSL-cagACD-0166-X-Cm mit den homologen Bereichen des *H. pylori*-Chromosoms wird das mutierte Response-Regulatorgen *arsR*-X (*hp0166*-X) unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors zusammen mit dem Selektionsmarker (*Cm<sup>r</sup>*-Kassette) in den *cag*-Lokus integriert. Der erhaltene Stamm G27/0166-X ist merodiploid und enthält das wildtypische Gen *arsR* (*hp0166*) sowie eine mutierte Genkopie von *arsR* (*hp0166*) im *cag*-Lokus. **B.** Der merodiploide Stamm G27/0166-X wurde mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-0166::km2 transformiert, wodurch nach homologer Rekombination das wildtypische Gen *arsR* (*hp0166*) durch eine Kanamycin- (*Kan<sup>r</sup>*)-Kassette substituiert wird.

Das jeweilige Gen mit der Mutation X (RR-X) wird zusammen mit seinem natürlichen Promotor über die *Bam*HI/*Pst*I-Schnittstellen in den Vektor pSL-cagACD kloniert. In das erhaltene Plasmid pSL-cagACD-RR-X wird anschließend über die *Pst*I-Schnittstelle eine Chloramphenicol-Kassette (*Cm<sup>r</sup>*-Kassette) aus *Campylobacter coli* als Selektionsmarker ligiert, so dass man das Plasmid pSL-cagACD-RR-X-Cm erhält. Mit Hilfe von Sequenzierungen mit den Oligonukleotiden M13-reverse und M13-universal wurden sämtliche Plasmide, die als Zwischenschritte in den zuvor beschriebenen Klonierungen

entstanden sind, auf eventuell in der PCR-Reaktion eingeführte, unerwünschte Mutationen untersucht.

Nach Transformation des *H. pylori*-Stammes G27 mit dem Plasmid pSL-cagACD-RR-X-Cm erhält man einen als G27/RR bezeichneten merodiploiden *H. pylori*-Stamm. Dieser *H. pylori*-Stamm enthält eine wildtypische Kopie des zu untersuchenden Gens sowie eine zweite mutierte Genkopie im *cag*-Lokus, was über eine PCR-Analyse mit entsprechenden Primerkombinationen überprüft wird.

Der *H. pylori*-Stamm G27/RR-X wird nun mit dem entsprechenden „knock-out“-Plasmid (pSL-RR::km) transformiert, das eine Kanamycin-Resistenz Kasette (Kan<sup>r</sup>-Kasette) zwischen flankierenden Sequenzen des zu untersuchenden Gens trägt. Durch homologe Rekombination über die flankierenden Sequenzen wird das wildtypische Gen durch die Kan<sup>r</sup>-Kasette ersetzt und man erhält gegebenenfalls den *H. pylori*-Stamm G27/RR-XΔ, der nur noch eine Genkopie im *cag*-Lokus enthält. Die Charakterisierung des erhaltenen Stammes erfolgt in einer PCR-Analyse mit unterschiedlichen Primerkombinationen. Überprüft werden sowohl die Substitution des wildtypischen Gens RR durch die Kan<sup>r</sup>-Kasette, als auch die korrekte Organisation der *cag*-Region. Zur Kontrolle der korrekten Substitution des entsprechenden Gens wurden Primer benutzt, die jeweils außerhalb der für die homologe Rekombination gewählten Bereiche hybridisieren. Da *H. pylori* zudem eine extrem hohe Rekombinationshäufigkeit aufweist, besteht die Möglichkeit, dass das mutierte in den *cag*-Lokus integrierte Gen mit dem wildtypischen Gen rekombiniert, und somit wieder zur wildtypischen Sequenz revertiert. Nach Amplifikation eines geeigneten Fragmentes konnte mit Hilfe eines entsprechenden Primers das in der *cag*-Region lokalisierte Gen sequenziert werden, um die jeweilige Mutation nachzuweisen.

Nachfolgend werden die „knock-out“-Plasmide beschrieben, mit denen jeweils die wildtypischen Genkopien der Response-Regulatoren HP1021, HP1043 und ArsR (HP0166) deletiert wurden (Beier & Frank, 2000; Schär, 2001). Alle Plasmide sind Derivate des Klonierungsvektors pSL1180.

### **1.1 Das „knock-out“-Plasmid pSL-1021::km**

Die Abb. 17 zeigt schematisch den Aufbau des Konstruktes pSL-1021::km (Beier & Frank, 2000) zur Deletion von *hp1021*. Die Gensequenzen, welche die Kan<sup>r</sup>-Kasette flankieren (kan<sup>r</sup>), stammen einerseits von *hp1020* (758 bp, welche die AS 192 bis 406 kodieren), zum anderen aus der intergenischen Region (632 bp) stromabwärts von *hp1021*.

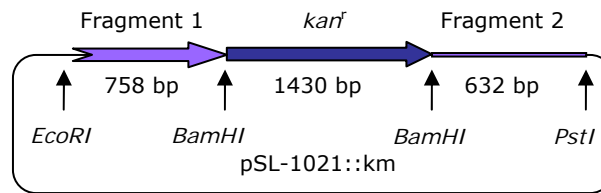


Abb. 17: Schematische Darstellung von pSL-1021::km. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Fragment 1: Genabschnitt von *hp1020*

Fragment 2: Abschnitt der intergenischen Region stromabwärts von *hp1021*

## 1.2 Das „knock-out“-Plasmid pSL-1043::km2

Das Konstrukt für die Deletion von *hp1043*, pSL-1043::km2 (Schär, 2001), besteht aus einem 629 bp Fragment, das einen Teil der intergenischen Region zwischen ORF *hp1043* und ORF *hp1042*, sowie die Sequenz, welche die AS 330 bis 348 des Proteins HP1042 kodiert, beinhaltet und aus einem 716 bp Fragment, das einen Genabschnitt von *hp1044* kodiert. Die beiden Fragmente flankieren eine *Kan<sup>r</sup>*-Kassette (siehe Abb. 18).

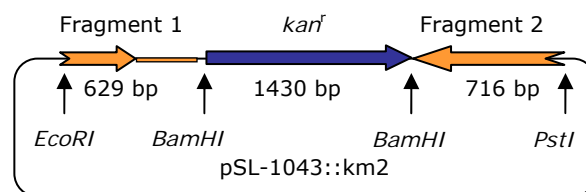


Abb. 18: Schematische Darstellung von pSL-1043::km2. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Fragment 1: Abschnitt der intergenischen Region zwischen ORF *hp1043* und ORF *hp1042* sowie ein Genabschnitt von *hp1042*

Fragment 2: Genabschnitt von *hp1044*.

## 1.3 Das „knock-out“-Plasmid pSL-0166::km2

Das Konstrukt zur Inaktivierung von *arsR* (*hp0166*), pSL-0166::km2 (Schär, 2001), setzt sich aus einem 539 bp Fragment zusammen, das einen Abschnitt des Gens *hp0169* sowie das Gen *hp0168* enthält und aus einem 501 bp Fragment, das einen Genabschnitt des Gens der Histidin-Kinase *ArsS* (HP0165) umfasst. Die beiden Fragmente flankieren eine *Kan<sup>r</sup>*-Kassette (siehe Abb. 19).

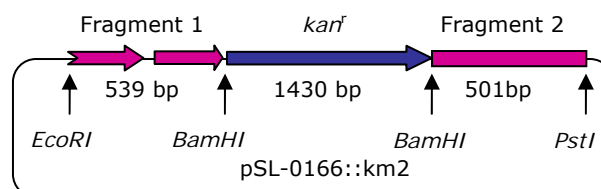


Abb. 19: Schematische Darstellung von pSL-0166::km2. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Fragment 1: *hp0168* und ein Abschnitt von *hp0169*

Fragment 2: Teil des ORF *arsS* (*hp0165*)

## 2. Funktionelle Analyse des Response-Regulators ArsR (HP0166) *in vivo*

Wie einleitend beschrieben, ist das Gen des Response-Regulators ArsR (HP0166) essentiell, während die Inaktivierung des Gens der korrespondierenden Histidin-Kinase ArsS (HP0165) keinerlei Auswirkung auf das Zellwachstum von *H. pylori* zeigte (Beier & Frank, 2000; Schär *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen sprechen für die Hypothese, dass der Response-Regulator ArsR (HP0166) die Transkription zweier unterschiedlicher Gruppen von Zielgenen kontrolliert. In Abb. 20 ist schematisch das putative Modell der Genregulation durch ArsR (HP0166) aufgezeigt. Es postuliert, dass ArsR (HP0166) nach Phosphorylierung durch ArsS (HP0165) die Transkription von nicht essentiellen Zielgenen reguliert, während ArsR (HP0166) im nicht-phosphorylierten Zustand die Transkription von Zielgenen kontrolliert, von denen mindestens eines essentiell sein sollte. Es konnten bislang schon viele nicht essentielle Targetgene (siehe B 2.2 und Abb. 20) des phosphorylierten Regulators ArsR (HP0166) identifiziert werden (Dietz, 2002; Forsyth *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2004; Pflock *et al.*, 2006; Pflock *et al.*, 2005), allerdings fehlen bisher Hinweise auf essentielle Zielgene.

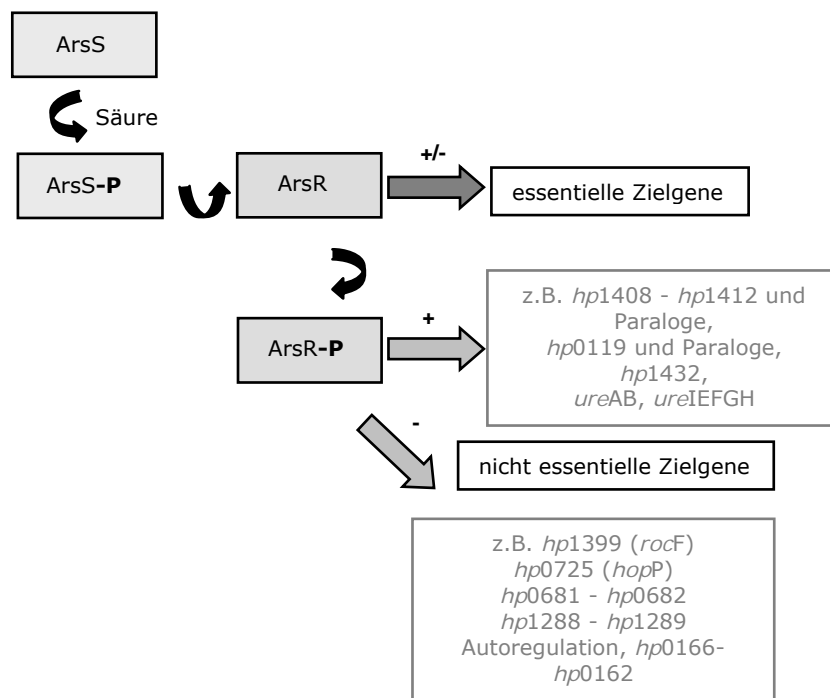


Abb. 20: Schematische Darstellung eines möglichen Modells der Genregulation durch das ArsRS Zwei-Komponentensystem. Phosphorylierte Proteine sind durch ein -P gekennzeichnet. Als Antwort auf einen sauren pH-Wert wird die Histidin-Kinase ArsS (HP0165) autophosphoryliert und kann die Phosphatgruppe auf den Response-Regulator ArsR (HP0166) übertragen. Der phosphorylierte Response-Regulator ArsR~P (HP0166~P) reguliert die Transkription der nicht-essentiellen Zielgene. Im nicht-phosphorylierten Zustand hingegen reguliert ArsR (HP0166) essentielle Zielgene, die jedoch bislang nicht identifiziert sind.

Diese Hypothese sollte durch die nachfolgenden Experimente bestätigt werden. Es sollte ein mutiertes Derivat ArsR-D52N (HP0166-D52N) mit einer Substitution der potentiellen Phosphorylierungsstelle konstruiert werden. In Analogie zur Receiver-Konsensussequenz befindet sich die potentielle Phosphorylierungsstelle von ArsR an Position 52 der Aminosäuresequenz und besteht aus einem Aspartatrest (siehe Abb. 21). Anschließend sollte überprüft werden, ob das ArsR-D52N-(HP0166-D52N)-Derivat das wildtypische

Protein ArsR (HP0166) hinsichtlich der Regulation essentieller Zielgene funktionell ersetzen kann. Hierfür sollte das Allel *hp0166-D52N* in den *cag*-Lokus von *H. pylori* integriert und anschließend das wildtypische Gen *arsR* (*hp0166*) durch eine Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert werden. Erhielte man nach der Inaktivierung des wildtypischen Gens lebensfähige Klone, so wäre gezeigt, dass eine Phosphorylierung für die Kontrolle essentieller Targetgene durch ArsR (HP0166) nicht erforderlich ist. Eine Voraussetzung für diese Vorgehensweise ist, dass durch die Mutation D52N von ArsR (HP0166) die einzige Phosphorylierungsstelle dieses Response-Regulators eliminiert wird. Daher sollte zunächst getestet werden, ob das mutierte Protein His<sub>6</sub>-HP0166-D52N durch die Histidin-Kinase GST-0165 phosphoryliert werden kann.

## 2.1 Analyse des Phosphotransfers von der Histidin-Kinase ArsS (HP0165) auf den mutierten Response-Regulator ArsR-D52N (HP0166-D52N)

Die Phosphorylierung eines Response-Regulators durch die korrespondierende Histidin-Kinase führt *in vivo* zu einer Aktivierung der C-terminalen Output-Domäne, wodurch der Response-Regulator letztlich als Transkriptionsregulator wirken kann. Mit Hilfe eines *in vitro*-Phosphorylierungsexperiments mit gereinigten Proteinen sollte untersucht werden, ob ein mutiertes Derivat von ArsR (HP0166), ArsR-D52N (ArsR-D52N), dessen potentielle Phosphorylierungsstelle eliminiert wurde, weiterhin durch die Histidin-Kinase ArsS (HP0165) phosphoryliert wird bzw. ob kein Phosphotransfer mehr stattfinden kann.

### 2.1.1 Konstruktion des mutierten Allels *hp0166-D52N* (*arsR-D52N*)

Die potentielle Phosphorylierungsstelle von ArsR (HP0166) sollte durch Substitution des Aspartatrestes (D) an Position 52 durch einen Asparaginrest (N) eliminiert werden (siehe Abb. 21).

```
ArsR      1 MIEVLMIEDD IELAEFLSEF LLQHGIHVTN YDEPYTGISA ANTQNYDLLL LDLTLP 55
ArsR-D52N 1 MIEVLMIEDD IELAEFLSEF LLQHGIHVTN YDEPYTGISA ANTQNYDLLL LNLTLP 55
```

Abb. 21: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 1 bis AS 55 in ArsR und seinem mutierten Derivat ArsR-D52N.

In **rot**: potentielle Phosphorylierungsstelle von ArsR

In **gelb**: veränderte AS in ArsR-D52N

Dieser Aminosäureaustausch wurde durch die Änderung der entsprechenden Basensequenz von *arsR* (*hp0166*) von GAT (Aspartat) zu AAT (Asparagin) herbeigeführt. Die Basensubstitution erfolgte mit Hilfe des „Quick change“ Mutagenese Kits von Stratagene. Für die Mutagenese-PCR mit den Primern HP0166-D52N-1 und HP0166-D52N-2 diente das Plasmid pSL-0166, welches das Gen *arsR* (*hp0166*) sowie die dazugehörige Promotorregion enthält, als Template. Nach der PCR-Reaktion wurde die erhaltene DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI* behandelt. Dieses Restriktionsenzym erkennt nur methylierte oder hemimethylierte DNA, und verdaut so nur die parentale nicht mutierte DNA. Anschließend wurde diese DNA

in superkompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Nach Selektion einzelner Klone wurden diese durch Sequenzierung der Plasmid-DNA mit dem Oligonukleotid HP0166-seq2 als Primer auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation untersucht. Aus einem Klon, der ein Plasmid mit der gewünschten Mutation trug, wurde schließlich die als pSL-0166-D52N bezeichnete Plasmid-DNA isoliert.

### 2.1.2 Konstruktion des Überexpressionsplasmids pQE-0166-D52N und Aufreinigung des Fusionsproteins His<sub>6</sub>-0166-D52N

Ein 671 bp DNA-Fragment, welches dem kompletten *hp0166-D52N*-Allel entspricht, wurde mit den Oligonukleotiden ER43 und ER45 und dem Plasmid pSL-0166-D52N als Template-DNA amplifiziert, wodurch über die Oligonukleotide am 5'-Ende des PCR-Fragments eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Pst*I-Schnittstelle angefügt wurde. Das DNA-Fragment wurde nach Restriktion über die *Bam*HI/*Pst*I-Schnittstellen in den Vektor pQE30 ligiert und der Ligationsansatz in *E. coli* M15 transformiert. Bei einem positiven Klon wurde durch eine Sequenzierung mit den Primern pQE-5 und pQE-3 sichergestellt, dass die Gensequenz keine durch die PCR-Reaktion verursachten Mutationen aufweist. Der entsprechende Stamm *E. coli* M15[pQE-0166-D52N] wurde anschließend hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Überexpression des His<sub>6</sub>-0166-D52N-Fusionsproteins getestet. In Abb. 22 erkennt man deutlich die IPTG-induzierte Überexpression des Fusionsproteins His<sub>6</sub>-0166-D52N (Spur 1/2), dessen Laufverhalten einer theoretischen Größe von 25,2 kDa entspricht.

Die Reinigung des Fusionsproteins His<sub>6</sub>-0166-D52N erfolgte über eine Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen. In der Abb. 22 kann man in Spur 3-5 das gereinigte Protein erkennen.

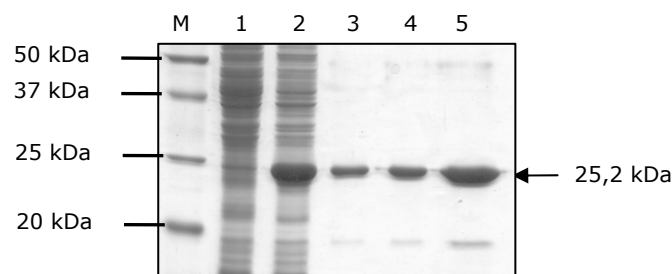


Abb. 22: Darstellung des gereinigten Fusionsproteins His<sub>6</sub>-0166-D52N. Auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden unterschiedliche Proteinmengen des gereinigten Fusionsproteins aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung dargestellt. Zusätzlich wurden Lysate des nicht induzierten und des induzierten *E. coli*-Stammes M15[pQE-0166-D52N] aufgetrennt.

M: BroadRange Proteinmarker von Biorad

Spur 1: *E. coli* M15[pQE-0166-D52N], nicht induziert

Spur 2: *E. coli* M15[pQE-0166-D52N], induziert (1 mM IPTG)

Der Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 25,2 kDa großen Fusionsprotein entspricht.

Spur 3: His<sub>6</sub>-0166-D52N, 2,5 µg

Spur 4: His<sub>6</sub>-0166-D52N, 5 µg

Spur 5: His<sub>6</sub>-0166-D52N, 10 µg



### 2.1.3 Autophosphorylierung der Histidin-Kinase ArsS (HP0165) und Phosphotransfer auf die Response-Regulatoren ArsR (HP0166) und ArsR-D52N (HP0166-D52N)

In dem *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment wurden die gereinigte Histidin-Kinase ArsS (GST-0165) und das gereinigte Protein His<sub>6</sub>-0166-D52N eingesetzt. Als Kontrollen wurden der Phosphotransfer von GST-0165 auf das Protein His<sub>6</sub>-0166 sowie die Autophosphorylierung von GST-0165 gezeigt. In Abb. 23 kann erkennen, dass kein Phosphotransfer von GST-0165 auf das mutierte Derivat His<sub>6</sub>-0166-D52N stattfindet, da nur eine Bande auf Höhe des Proteins GST-0165-P zu erkennen ist (Spur 3), wohingegen der Phosphotransfer von GST-0165 auf His<sub>6</sub>-0166 (Spur 2) eindeutig nachzuweisen ist.

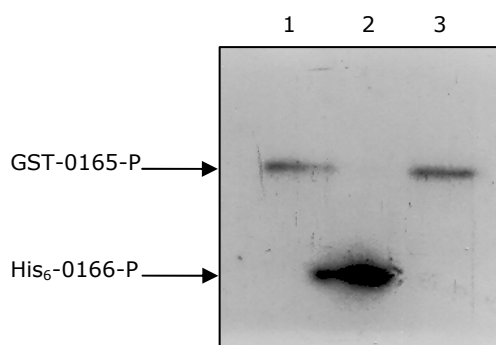


Abb. 23: *In vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit den gereinigten Fusionsproteinen GST-0165, His<sub>6</sub>-0166 und His<sub>6</sub>-0166-D52N. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese.

Spur 1: GST-0165

Spur 2: GST-0165 + His<sub>6</sub>-0166

Spur 3: GST-0165 + His<sub>6</sub>-0166-D52N

Die Pfeile markieren die jeweiligen Banden, die dem 25,2 kDa großen, phosphorylierten Fusionsprotein His<sub>6</sub>-0166 und dem 53 kDa großen, phosphorylierten Fusionsprotein GST-0165 entsprechen.

Dieses Ergebnis zeigte, dass durch die Mutation von D52 zu N52 die einzige Phosphorylierungsstelle des Response-Regulators ArsR (HP0166) eliminiert wurde.

## 2.2 *In vivo*-Komplementationsexperiment mit dem mutierten Allel *hp0166-D52N*

### 2.2.1 Konstruktion des merodiploiden Stammes *H. pylori* G27/0166-D52N

Aus dem Plasmid pSL-0166-D52N (siehe E 2.1) wurde über die *Bam*HI/*Pst*I-Schnittstellen ein Fragment der Länge 1010 bp ausgeschnitten. Dieses Fragment umfasst sowohl das mutierte Allel *hp0166-D52N* als auch 391 bp der „upstream“-Region von *arsR* (*hp0166*), die den Promotor von *arsR* (*hp0166*) enthält. Anschließend wurde das Fragment in den *Bam*HI/*Pst*I geschnittenen Vektor pSL-cagACD ligiert. Das Plasmid pSL-cagACD-0166-D52N-Cm (siehe Abb. 24) wurde anschließend durch die Insertion einer Cm<sup>r</sup>-Kassette über die *Pst*I-Schnittstelle in den zuvor mit *Pst*I linearisierten Vektor pSL-cagACD-0166-D52N konstruiert. Die 805 bp große Cm<sup>r</sup>-Kassette mit *Pst*I-Schnittstellen am 5'- und 3'-Terminus war zuvor in einer PCR-Reaktion mit dem Primerpaar 5'-Cm/3'-Cm und dem Plasmid pDT2548 als Template amplifiziert worden.

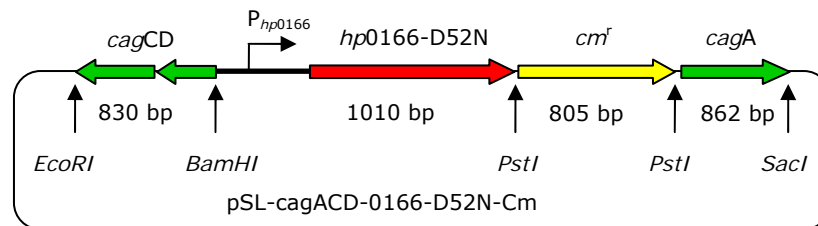


Abb. 24: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-0166D52N-Cm zur Integration von *hp0166-D52N* in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Nach Transformation von *H. pylori* G27 mit dem Plasmid pSL-cagACD-0166-D52N-Cm wurden Transformanten auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten selektioniert. Die chromosomale DNA der Transformanten wurde über eine PCR-Analyse mit unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe Tab. 11) charakterisiert, um zu überprüfen, ob die Insertion des mutierten Allels von *arsR* (*hp0166*) in den *cag*-Lokus korrekt erfolgt war.

Tab. 11: Primerkombinationen zur Charakterisierung des Stammes *H. pylori* G27/0166D52N durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 26 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

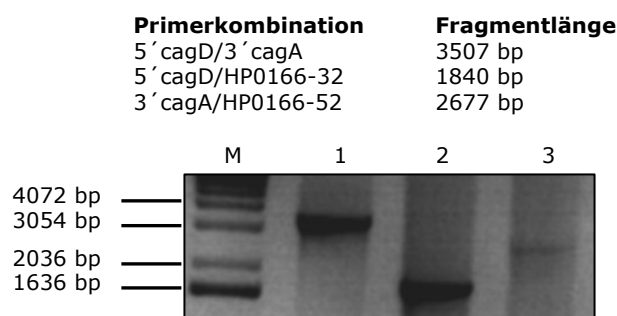


Abb. 25: PCR-Analyse des *H. pylori*-Stammes G27/0166-D52N. Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von Gibco  
 Spur 1: Primerpaar 5' *cagD*/3' *cagA*  
 Spur 2: Primerpaar 5' *cagD*/HP0166-32  
 Spur 3: Primerpaar 3' *cagA*/HP0166-52

Die Abb. 25 zeigt, dass alle amplifizierten Fragmente die erwarteten Längen aufwiesen, was bedeutet, dass die Insertion des Fragmentes *hp0166-D52N-Cm* an der korrekten Stelle im *cag*-Lokus erfolgte. Die Sequenzierung des 3507 bp Fragmentes aus der PCR-Reaktion mit der Primerkombination 5' *cagD*/3' *cagA* mit Hilfe des Primers HP0166-seq2 zeigte, dass die Mutation D52N vorhanden ist. Der konstruierte Stamm erhielt die Bezeichnung G27/-0166D52N.

### 2.2.3 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens *arsR* (*hp0166*) in *H. pylori* G27/0166-D52N

Zur Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens *arsR* (*hp0166*) in Anwesenheit von *hp0166-D52N* im *cag*-Lokus, wurde der Stamm *H. pylori* G27/0166-D52N mit dem zugehörigen „knock-out“-Plasmid pSL-0166::km2 (siehe E 1.3) transformiert. Die

Transformanten wurden auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten selektioniert und durch PCR-Analysen charakterisiert (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Primerkombinationen zur Charakterisierung des Stammes *H. pylori* G27/-0166D52NΔ durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 26 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

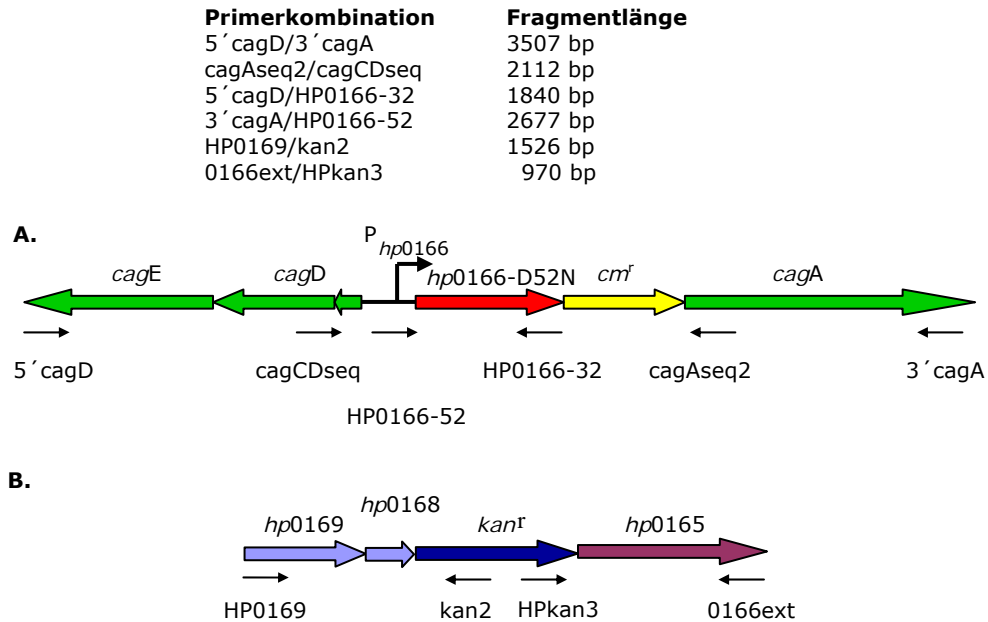


Abb. 26: Schematische Darstellung der Positionen der zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/0166-D52N und G27/0166-D52NΔ verwendeten PCR-Primer (schwarze Pfeile). Die Primer HP0169 sowie HP0166ext sind externe Primer, die an dem „knock-out“-Plasmid pSL-0166::km2 nicht binden **A.** Der *cag*-Lokus nach Insertion des mutierten Allels *hp0166*-D52N. **B.** Darstellung des chromosomalen Lokus, an dem *arsR* durch eine Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert wurde.

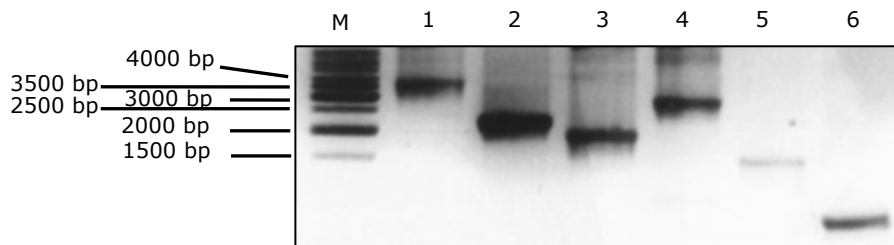


Abb. 27: PCR-Analyse von *H. pylori* G27/0166-D52NΔ. Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI  
 Spur 1: Primerpaar 5' *cagD*/3' *cagA*  
 Spur 2: Primerpaar *cagA*seq2/*cagCD*seq  
 Spur 3: Primerpaar 5' *cagD*/HP0166-32  
 Spur 4: Primerpaar 3' *cagA*/HP0166-52  
 Spur 5: Primerpaar HP0169/*kan2*  
 Spur 6: Primerpaar 0166ext/HPkan3

Es konnte gezeigt werden, dass die Organisation am *cag*-Lokus wie gewünscht vorlag und das wildtypische Gen *arsR* (*hp0166*) durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert worden war. Die Sequenzierung des Fragments der PCR-Reaktion mit dem Primerpaar *cagA*seq2/*cagCD*seq ergab, dass das Allel *hp0166* mit der gewünschte Mutation D52N im *cag*-Lokus nach wie vor vorhanden war, woraufhin diese *H. pylori*-Mutante G27/0166-D52NΔ genannt wurde.

Die Lebensfähigkeit der *H. pylori*-Mutante G27/0166-D52NΔ zeigt, dass eine Phosphorylierung von ArsR (HP0166) für die Kontrolle der essentiellen Zielgene keine Voraussetzung ist. Dies bestätigt die Hypothese (vgl. E 2), dass ArsR (HP0166) im nicht-phosphorylierten Zustand mindestens ein essentielles Gen reguliert und die Phosphorylierung durch die Histidin-Kinase ArsS (HP0165) nur bei der Säure-abhängigen Regulation nicht-essentieller Zielgene eine Rolle spielt.

### **3. Komplementationsexperimente mit Derivaten von HP1043 und HP1021, die Mutationen der untypischen Aminosäuren der Receiver-Domäne aufweisen**

Die Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 weisen in ihren Receiver-Domänen einige ungewöhnliche Abweichungen von der üblichen Konsensus-Sequenz auf (siehe Abb. 28 bzw. Abb. 34). Aufgrund dieser Tatsache und der Beobachtung, dass die Deletion der in *H. pylori* vorkommenden Histidin-Kinasen keinen Effekt auf das Wachstum von *H. pylori* haben (Beier & Frank, 2000), stellt sich die Frage ob die Aktivierung dieser Response-Regulatoren dem Zwei-Komponenten-Paradigma entspricht oder ob eine Phosphorylierung für die Funktion der Response-Regulatoren keine Rolle spielt. Ein Indiz für die letztere Hypothese könnte die Beobachtung darstellen, dass sich die beiden Response-Regulatoren *in vitro* weder durch eine der Histidin-Kinasen noch durch Acetylphosphat phosphorylieren ließen (Beier & Frank, 2000; Schär, 2001; Schär *et al.*, 2005).

Möglicherweise befinden sich die Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 aufgrund der atypischen Sequenz der Receiver-Domänen bereits in einer aktiven Konformation, die es den Response-Regulatoren erlaubt, ohne eine Phosphorylierung ihre Zellwachstums-assoziierten Funktionen auszuführen. Es wurde z.B. gezeigt, dass eine Asp13/Lys Mutation des Response-Regulators CheY von *E. coli*, unabhängig von der Phosphorylierung durch die Histidin-Kinase CheA, zu einem konstitutiv aktiven Protein führte (Bourret *et al.*, 1993). Durch gezielte Mutationen wurde die Aminosäuresequenz der Receiver-Domänen von HP1043 und HP1021 so verändert, dass sie der Konsensus-Sequenz angeglichen wurden. Mit Hilfe des Komplementationssystems sollte untersucht werden, ob die entsprechend mutierten Derivate von HP1043 und HP1021 die wildtypischen Response-Regulatoren funktionell ersetzen können, oder ob die Abweichungen der Receiver-Sequenzen von HP1043 bzw. HP1021 essentiell für die Zellwachstums-assoziierten Funktionen der Response-Regulatoren sind.

#### **3.1 Konstruktion der *H. pylori*-Stämme G27/1043-K8DA und G27/1043-K8N9DDA**

In dem Response-Regulator HP1043 ist das hochkonservierte Aspartat (D) der Position 8 (entspricht dem Aspartat an Position 13 in CheY von *E. coli*) durch ein Lysin (K) substituiert. Die nachfolgende Aminosäure, üblicherweise ein Aspartat, Glutamat oder Histidin, ist zudem durch ein Asparagin (N) ersetzt (siehe Abb. 28).

```

HP1043  1  MRVLLIEKNS VLGGEIEKGL NVKGFMDVDT ESLEDGEYLM DIRNYDLVM. ...VSD  56
Konsensus -KVLVVDDD- --R--L---L ---G----- -----PDLVLL DLRMP-
          RI IIE E   L  I   I           Y VIIT  INL
          TL LA  H           V           V ILVM  VM

```

Abb. 28: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 1 bis AS 56 in HP1043 sowie der Konsensus-Sequenz für typische Receiver-Domänen.

In <sup>rot</sup>: AS-Abweichungen in HP1043

In <sup>blau</sup>: hochkonservierte AS

### 3.1.1 Konstruktion der merodiploiden *H. pylori*-Stämme G27/1043-K8D und G27/1043-K8N9DD

In der *H. pylori* Mutante K8D ist die Gensequenz von *hp1043* so verändert, dass das für einen Lysinrest kodierende Kodon AAA in das einen Aspartatrest kodierende Basentriplett GAT umgewandelt wurde (siehe Abb. 29). Für die Mutante K8N9DD wurde ebenfalls das oben genannte Kodon AAA in GAT umgewandelt, zusätzlich wurde das nachfolgende Kodon AAT (Asparagin) durch das Kodon GAT (Aspartat) ersetzt (siehe Abb. 29).

```

HP1043      1  MRVLLIEKNS VLGGEIEKGL      20
HP1043-K8D  1  MRVLLIEDNS VLGGEIEKGL      20
HP1043-K8N9DD 1  MRVLLIEDDS VLGGEIEKGL      20

```

Abb. 29: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 1 bis AS 20 in HP1043, HP1043-K8D und HP1043-K8N9DD.

In <sup>rot</sup>: AS-Sequenz in HP1043

In <sup>gelb</sup>: AS-Sustitutionen in HP1043-K8D und HP1043-K8N9DD

Die Mutagenese erfolgte mit dem „Quick change“ Mutagenese Kit von Stratagene. Als Template wurde das Plasmid pSL-1043 verwendet. Dieses Plasmid trägt das für den Response-Regulator HP1043 kodierende Gen und 336 bp der zugehörigen „upstream“-Region, welche den Promotor von *hp1043* beinhaltet. Die Mutagenese-PCR wurde mit den in der Tab. 13 aufgeführten Oligonukleotiden durchgeführt.

Tab. 13: Oligonukleotide, die zur Konstruktion der mutierten Allele *hp1043*-K8D und *hp1043*-K8N9DD verwendet wurden.

| Mutation | Oligonukleotide                 |
|----------|---------------------------------|
| K8D      | HP1043-K8D-1/HP1043-K8D-2       |
| K8N9DD   | HP1043-K8N9DD-1/HP1043-K8N9DD-2 |

Aus jeweils einem Klon, in dem durch Sequenzierung der Plasmid-DNA mit dem Primer HP1043-seq5 die gewünschte Mutation nachgewiesen wurde, wurden die Plasmide pSL-1043-K8D bzw. pSL-1043-K8N9DD isoliert. Aus diesen Plasmiden wurden mit den Enzymen *Bam*HI und *Pst*I jeweils das 1069 bp Fragment, welches das mutierte Response-Regulatorgen sowie die dazugehörige Promotorregion enthält, ausgeschnitten und in den *Bam*HI/*Pst*I gespaltenen Vektor pSL-cagACD ligiert. In die erhaltenen Plasmide pSL-cagACD-1043-K8D und pSL-cagACD-1043-K8N9DD wurde über die *Pst*I-Schnittstelle jeweils eine Cm<sup>r</sup>-Kassette inseriert, so dass die Plasmide pSL-cagACD-1043-K8D-Cm und pSL-cagACD-1043-K8N9DD-Cm (siehe Abb. 30) generiert wurden.

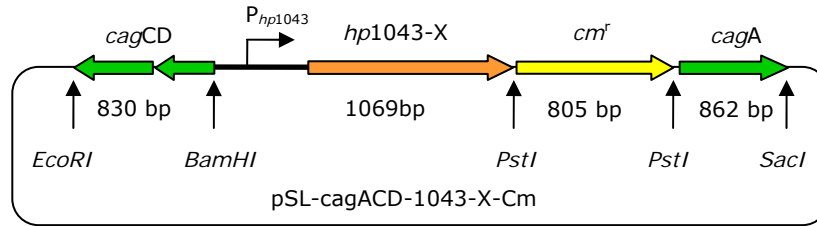


Abb. 30: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-1043-X-Cm. *hp1043-X* steht stellvertretend für die mutierten Allele *hp1043-K8D* und *hp1043-K8N9DD*. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die beiden Plasmide pSL-cagACD-1043-K8D-Cm und pSL-cagACD-1043-K8N9DD-Cm wurden jeweils in den *H. pylori*-Stamm G27 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Mit der chromosomalen DNA der erhaltenen Transformanten wurden PCR-Analysen mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt (siehe Tab. 14 und Abb. 31).

Tab. 14: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1043-K8D und G27/1043-K8N9DD durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 32 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

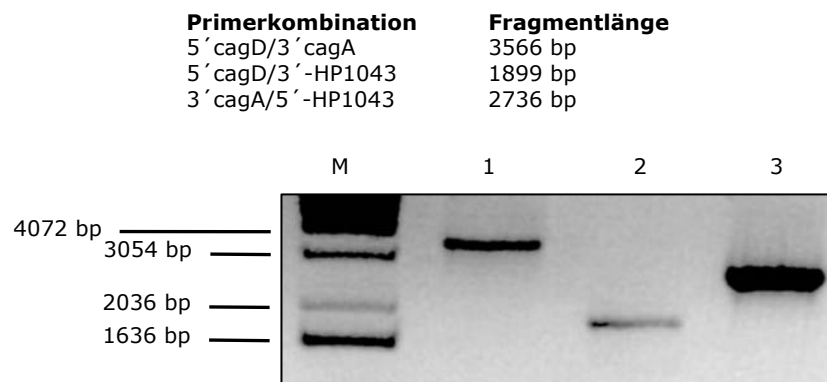


Abb. 31: PCR-Analyse von *H. pylori* G27/1043-K8N9DD. Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von Gibco.  
 Spur 1: Primerpaar 5' cagD/3' cagA  
 Spur 2: Primerpaar 5' cagD/3'-HP1043  
 Spur 3: Primerpaar 3' cagA/5'-HP1043

Anhand der PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass die amplifizierten Fragmente aller Transformanten die Längen aufwiesen, die bei einer korrekten Integration des klonierten Fragments in den *cag*-Lokus zu erwarten waren. Eine Sequenzierung mit dem Primer 1043seq5, zeigte, dass die gewünschten Mutationen in den jeweiligen Transformanten vorhanden waren. Die konstruierten *H. pylori*-Stämme wurden daher mit G27/1043-K8D und G27/1043-K8N9DD benannt wurden. In Abb. 31 ist repräsentativ die PCR-Analyse des *H. pylori*-Stammes G27/1043-K8N9DD aufgezeigt.

### 3.1.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens *hp1043* in den *H. pylori*-Stämmen G27/1043-K8D und G27/1043-K8N9DD

Für die Deletion des wildtypischen Gens *hp1043* der *H. pylori*-Stämme G27/1043-K8D und G27/1043-K8N9DD wurde das unter E 1.2 beschriebene Plasmid pSL-1043::km2 eingesetzt. Nach der Transformation des jeweiligen Stammes mit diesem Plasmid wurde die chromosomale DNA der nach der Selektion auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten resultierenden Transformanten über PCR-Analysen charakterisiert. Sowohl die Substitution des wildtypischen *hp1043* durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette als auch die korrekte Organisation der *cag*-Region konnten mittels unterschiedlicher Primerkombinationen (siehe Tab. 15; Abb. 32) nachgewiesen werden.

Tab. 15: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1043-K8D $\Delta$  und G27/1043-K8N9DD $\Delta$  durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 32 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

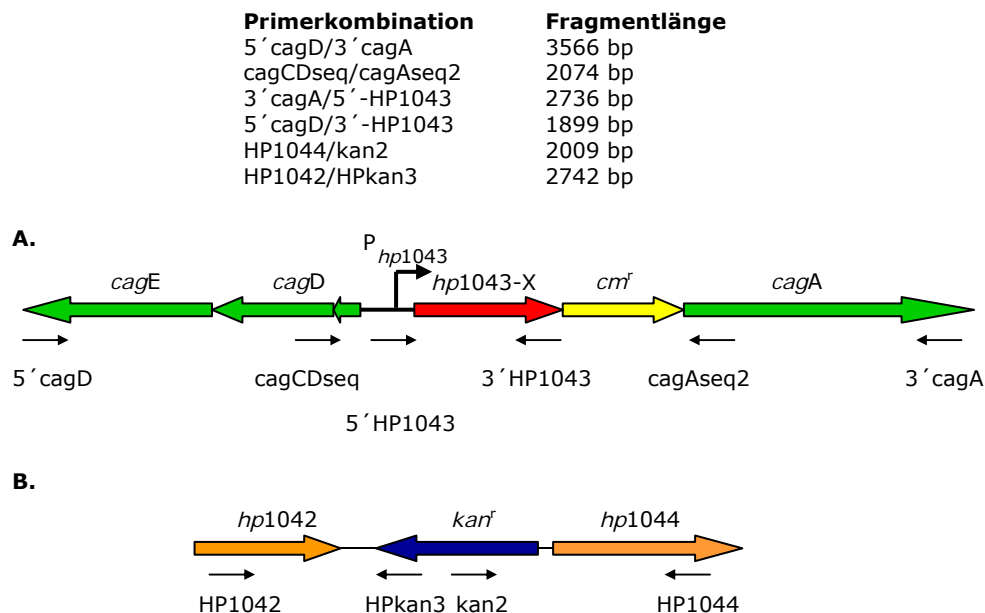


Abb. 32: Schematische Darstellung der Positionen der zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1043-K8D, G27/1043-K8N9DD, G27/1043-K8D $\Delta$  und G27/1043-K8N9DD $\Delta$  verwendeten PCR-Primer (schwarze Pfeile). **A.** Der *cag*-Lokus nach Insertion eines mutierten Allels von *hp1043*. Das X steht stellvertretend für die verschiedenen eingeführten Mutationen. **B.** Darstellung des chromosomalen Lokus, an dem *hp1043* durch eine Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert wurde.

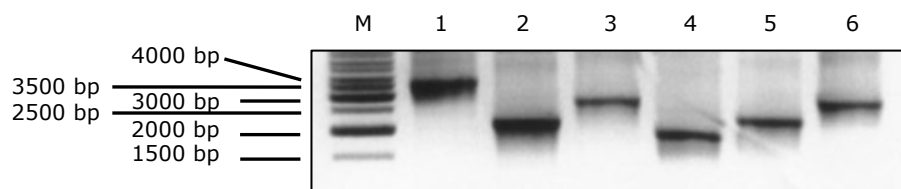


Abb. 33: PCR-Analyse von *H. pylori* G27/1043-K8N9DD $\Delta$ . Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI.  
 Spur 1: Primerpaar 5' *cagD*/3' *cagA*  
 Spur 2: Primerpaar *cagAseq2*/*cagCDseq*  
 Spur 3: Primerpaar 3' *cagA*/5' -HP1043  
 Spur 4: Primerpaar 5' *cagD*/3' -HP1043  
 Spur 5: Primerpaar HP1044/*kan2*  
 Spur 6: Primerpaar HP1042/HP*kan3*

Die Fragmente, welche aus den PCR-Ansätzen mit dem Primerpaar *cagAseq2/cagCDseq* resultierten, wurden mit dem Primer *1043seq5* sequenziert. Hierbei konnten die gewünschten Mutationen der *hp1043*-Allele im *cag*-Lokus der jeweiligen Transformanten nachgewiesen werden. Die resultierenden *H. pylori*-Stämme wurden G27/1043-K8D $\Delta$  und G27/1043-K8N9DDA genannt. In der Abb. 33 ist repräsentativ die Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27/1043-K8N9DDA durch PCR-Analyse aufgezeigt.

Da die mutierten Derivate HP1043-K8D und HP1043-K8N9DDA das Protein HP1043 funktionell ersetzen können, lässt sich folgern, dass die atypischen Abweichungen in der Aminosäuresequenz der Receiver-Domäne von HP1043 für die essentielle Funktion von HP1043 nicht erforderlich sind. Die Aminosäurereste K8N9 bewirken somit vermutlich nicht die Ausbildung einer konstitutiv aktiven Konformation von HP1043.

### 3.2 Konstruktion der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47D $\Delta$ , G27/1021-S48D $\Delta$ und G27/1021-S47S48DDA

In der Aminosäuresequenz der Receiver-Domäne von HP1021 ist das normalerweise hochkonservierte Phosphat-akzeptierende Aspartat (D) an Position 47 (entspricht der Aminosäure D57 in CheY von *E. coli*) im Vergleich zur Konsensus-Sequenz durch ein Serin (S) substituiert (siehe Abb. 34).

```

HP1021  1 MKILIIEDDL ALARSISHNL HDLGHFCEII SSISEE.NKE PYDVILVSK VCTQGR  56
Konsensus -KVLVVDDD- --R--L---L ---G----- ----- PDLVLL DLRMP-
          RI IIE E   L  I   I           Y VIIT  INL
          TL LA  H           V           V ILVM  VM
  
```

Abb. 34: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 1 bis AS 56 in HP1021 und der Konsensus-Sequenz.

In **rot**: AS-Abweichungen in HP1021

In **blau**: normalerweise hochkonservierte AS

#### 3.2.1 Konstruktion der merodiploiden *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47D $\Delta$ , G27/1021-S48D $\Delta$ und G27/1021-S47S48DD

Analog zu HP1043 sollten von HP1021 mutierte Derivate hergestellt werden, deren Aminosäuresequenz in der Receiver-Domäne der Konsensussequenz entspricht. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die Aminosäure-Abweichungen eine wichtige Voraussetzung für die Wachstums-assoziierte Funktion des Response-Regulators sind. Da die Aminosäure an Position 48 ebenfalls ein Serin ist und möglicherweise die Funktion von S47 übernehmen kann, wurden beide Serinreste in unterschiedlichen Kombinationen mutiert.

Bei der Mutation S47D wurde ein Aminosäureaustausch eingeführt, indem die entsprechende Gensequenz so verändert wurde, dass das Serin kodierende Basentriplett TCT in das Aspartat kodierende Basentriplett GAT umgewandelt wurde. Für die Mutagenese S48D wurde ebenfalls das Kodon TCT (Serin) in das Kodon GAT (Aspartat) umgewandelt. Bei der Mutation S47S48DD wurden die beiden aufeinander folgenden Kodons TCT (Serin) durch zwei GAT-(Aspartat-)Kodons ersetzt. In Abb. 35 ist ein Ausschnitt der



Aminosäuresequenz von HP1021 sowie der Aminosäuresequenzen der entsprechenden mutierten Proteine dargestellt.

|                 |    |            |            |         |     |        |    |
|-----------------|----|------------|------------|---------|-----|--------|----|
| HP1021          | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | SSK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47D     | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | DSK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S48D     | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | SDK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47S48DD | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | DDK | VCTQGR | 56 |

Abb. 35: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 21 bis AS 56 in HP1021, HP1021-S47D, HP1021-S48D und HP1021-S47S48DD.

In rot: AS-Sequenz in HP1021

In gelb: AS-Substitutionen in HP1021-S47D, HP1021-S48D und HP1021-S47S48DD

Die Aminosäuresubstitutionen wurden mit Hilfe des „Quick change“ Mutagenese Kits von Stratagene eingeführt. Zur Amplifikation der mutierten Allele wurden in der Mutagenese-PCR das Plasmid pSL-1021, welches das Gen *hp1021* beinhaltet, als Template und die in Tab. 16 aufgelisteten Oligonukleotide eingesetzt.

Tab. 16: Oligonukleotide, die jeweils zur Konstruktion der mutierten Allele *hp1021-S47D*, *hp1021-S48D* und *hp1021-S47S48DD* verwendet wurden.

| Mutation | Oligonukleotide                     |
|----------|-------------------------------------|
| S47D     | HP1021-S47D-1/HP1021-S47D-2         |
| S48D     | HP1021-S48D-1/HP1021-S48D-2         |
| S47S48DD | HP1021-S47S48DD-1/HP1021-S47S48DD-2 |

Aus jeweils einem positiven Klon, dessen Plasmid-DNA nach der Sequenzierung mit dem Primer 1021seq die gewünschte Mutation aufwies, wurden die Plasmide pSL-1021-S47D, pSL-1021-S48D bzw. pSL-1021-S47S48DD isoliert. Aus diesen Plasmiden wurde jeweils ein 973 bp Fragment, welches das Gen *hp1021* mit der entsprechenden eingeführten Mutation trägt, über die *XbaI* und *PstI* Schnittstellen ausgeschnitten und in den *XbaI/PstI* geschnittenen Vektor pSL-cagA-P<sub>1018</sub> ligiert. In diesem Vektor ist das Fragment *cagA* sowie der Promotor P<sub>hp1018</sub> enthalten, der das Operon, dem *hp1021* angehört, kontrolliert. In die resultierende Plasmide pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-1021-S47D, pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-1021-S48D und pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-1021-S47S48DD wurde zunächst über die *EcoRI* und *BamHI* Schnittstellen das 830 bp lange Fragment *cagCD* ligiert, welches mit den Primern 5' *cagD* und 3' *cagC* von chromosomaler DNA des *H. pylori*-Stammes G27 amplifiziert wurde. Zuletzt wurde über eine *PstI*-Schnittstelle jeweils eine Cm<sup>r</sup>-Kassette inseriert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden als pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-S47D-Cm, pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-S48D-Cm und pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-S47S48DD-Cm bezeichnet (siehe Abb. 36).

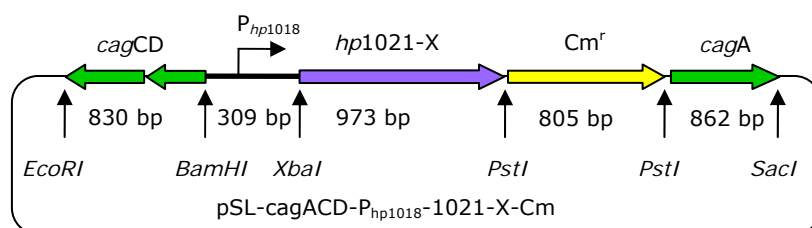


Abb. 36: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-X-Cm. *hp1021-X* steht stellvertretend für die mutierten Allele *hp1021-S47D*, *hp1021-S48D* und *hp1021-S47S48DD*. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die Plasmide pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-S47D-Cm, pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-S48D-Cm und pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-S47S48DD-Cm wurden jeweils in den *H. pylori*-Stamm G27 transformiert. Die Selektion derjenigen Bakterien, bei denen durch die homologe Rekombination eine Integration der mutierten *hp1021*-Allele in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 stattgefunden hat, erfolgte auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Die chromosomale DNA der resultierenden Transformanten wurde isoliert und mit Hilfe von Kontroll-PCRs charakterisiert. Die verwendeten Primerkombinationen und die erwarteten Fragmentlängen sind in Tab. 17 zusammengefasst.

Tab. 17: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47D, G27/1021-S48D und G27/1021-S47S48DD durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 38 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

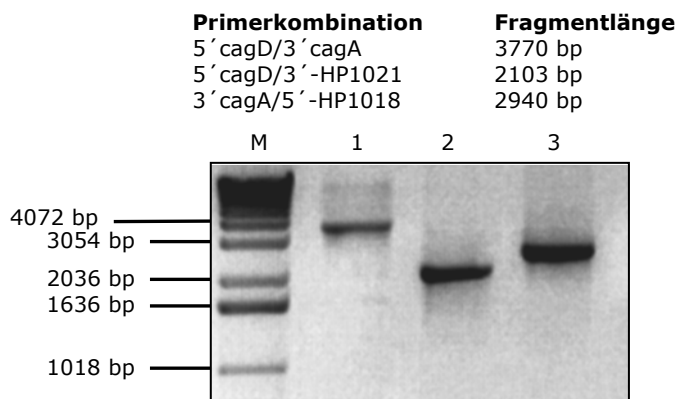


Abb. 37: PCR-Analyse von *H. pylori* G27/1021-S47D. Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von Gibco.  
 Spur 1: Primerpaar 5' cagD/3' cagA  
 Spur 2: Primerpaar 5' cagD/3'-HP1021  
 Spur 3: Primerpaar 3' cagA/5'-HP1018

Die PCR-Analysen bestätigten in allen Transformanten die korrekte Integration des jeweiligen mutierten *hp1021*-Allels in den *cag*-Lokus. Die gewünschten Mutationen der *hp1021*-Allele konnten außerdem mit Hilfe einer Sequenzierung eines entsprechenden PCR-Fragments mit dem Primer 1021seq2 nachgewiesen werden. Die resultierenden *H. pylori*-Stämmen wurden als G27/1021-S47D, G27/1021-S48D und G27/1021-S47S48DD bezeichnet. In Abb. 37 sind die Ergebnisse der PCR-Analyse am Beispiel des *H. pylori*-Stammes G27/1021-S47D dargestellt.

### 3.2.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens *hp1021* in den *H. pylori*-Stämmen G27/1021-S47D, G27/1021-S48D und G27/1021-S47S48DD

In die *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47D, G27/1021-S48D und G27/1021-S47S48DD wurde jeweils das Plasmid pSL-1021::km (siehe E 1.2) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Die Charakterisierung der resultierenden Transformanten der verschiedenen Transformations-Ansätze mittels unterschiedlicher Primerkombinationen (siehe Tab. 18 und Abb. 38) zeigte, dass die Substitution des

wildtypischen *hp1021*-Gens durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette korrekt stattgefunden hatte und die *cag*-Region wie gewünscht vorlag.

Tab. 18: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47DΔ, G27/1021-S48DΔ und G27/1021-S47S48DDΔ durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 38 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

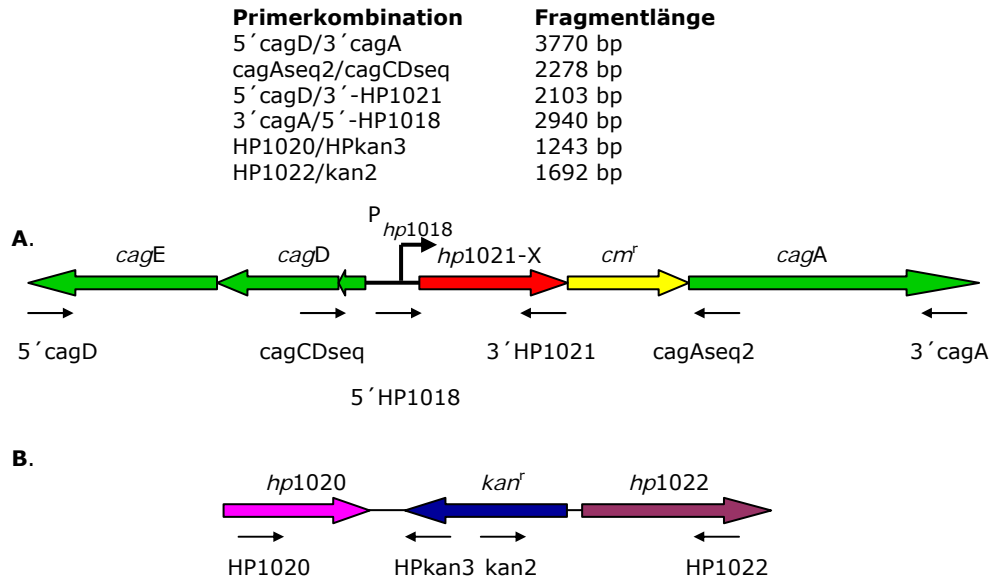


Abb. 38: Schematische Darstellung der Positionen der zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47D, G27/1021-S48D, G27/1021-S47S48DD, G27/1021-S47DΔ, G27/1021-S48DΔ und G27/1021-S47S48DDΔ verwendeten PCR-Primer (schwarze Pfeile). **A.** Der *cag*-Lokus nach Insertion eines mutierten Allels von *hp1021*. Das X steht stellvertretend für die verschiedenen eingeführten Mutationen. **B.** Darstellung des chromosomalen Lokus, an dem *hp1021* durch eine Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert wurde.

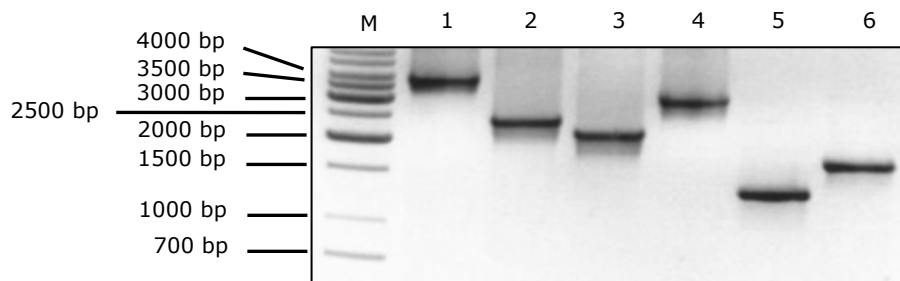


Abb. 39: PCR-Analyse von *H. pylori* G27/1021-S47DΔ. Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI  
 Spur 1: Primerpaar 5' *cagD*/3' *cagA*  
 Spur 2: Primerpaar *cagA*seq2/*cagC*Dseq  
 Spur 3: Primerpaar 5' *cagD*/3' -HP1021  
 Spur 4: Primerpaar 3' *cagA*/5' -HP1018  
 Spur 5: Primerpaar HP1020/HPkan3  
 Spur 6: Primerpaar HP1022/kan2

Die verschiedenen im *cag*-Lokus befindlichen mutierten *hp1021*-Allele wurden nach Amplifikation eines geeigneten PCR-Fragmentes mit dem Primer 1021seq2 sequenziert, wobei die gewünschten Mutationen nachgewiesen werden konnten. Die erhaltenen *H. pylori*-Stämme wurden G27/1021-S47DΔ, G27/1021-S48DΔ und G27/1021-S47S48DDΔ genannt. In Abb. 39 ist repräsentativ die PCR-Analyse des *H. pylori*-Stammes G27/1021-S47DΔ aufgezeigt.

Da alle mutierten Derivate den wildtypischen Response-Regulator HP1021 funktionell ersetzen können, ist somit gezeigt, dass die atypischen Abweichungen in der Aminosäuresequenz der Receiver-Domäne von HP1021 keine notwendige Voraussetzung für seine Zellwachstums-assoziierte Funktion sind.

#### **4. Untersuchungen zur Phosphorylierung von HP1021 und HP1043 durch Acetylphosphat**

Im Fall der Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 ist bislang keine zugehörige Histidin-Kinase bekannt (Beier & Frank, 2000). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass eine Phosphorylierung der beiden Response-Regulatoren für die Funktionen nicht erforderlich ist.

Kleine Moleküle wie Acetylphosphat, Carbamoylphosphat oder Phosphoramidat können neben Histidin-Kinasen ebenfalls als Phosphatdonatoren für Response-Regulatoren dienen, was zeigt, dass der Response-Regulator den Phosphatgruppentransfer selbst katalysieren kann (Lukat *et al.*, 1992). Die genannten Moleküle können somit verwendet werden, um *in vitro*-Phosphorylierungs-Experimente mit gereinigten Response-Regulatoren durchzuführen.

##### **4.1 Versuche zur *in vitro*-Phosphorylierung von HP1021 und HP1043 mit radioaktiv markiertem Acetylphosphat**

Bereits im Zuge früherer Untersuchungen zur *in vitro*-Phosphorylierung der gereinigten Response-Regulatoren von *H. pylori* wurden Experimente mit radioaktiv markiertem Acetylphosphat durchgeführt (Schär, 2001). Hierbei wurden die gereinigten His<sub>6</sub>-Tag-Proteine CrdR (HP1365), ArsR (HP0166), und HP1043 eingesetzt. Im Fall von HP1021 wurde nur die gereinigte Receiver-Domäne (HP1021-R) verwendet, da es nicht gelungen war, das vollständige Protein in löslicher Form aufzureinigen. Diese Versuche zeigten, dass bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten die Proteine CrdR und ArsR durch Acetylphosphat phosphoryliert werden konnten, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz. Die Proteine HP1021 und HP1043 hingegen konnten durch Acetylphosphat nicht phosphoryliert werden (Schär, 2001). Zur Verifizierung der Daten wurden in der vorliegenden Arbeit in Form von „time-course“-Experimenten weitere *in vitro*-Phosphorylierungs-Studien durchgeführt.

Hierzu wurden die gereinigten Response-Regulator Proteine HP1043 und HP1021-R in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Acetylphosphat für 15, 30 und 45 Minuten bei 30 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich die Proteine ArsR (HP0166) und BvgA<sub>petrii</sub> (Response-Regulator von *Bordetella petrii*) eingesetzt. Diese beiden Proteine wurden nach dem Standardprotokoll 30 Minuten mit radioaktiv markiertem Acetylphosphat inkubiert. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Proteinbanden am PhosphoImager dargestellt.

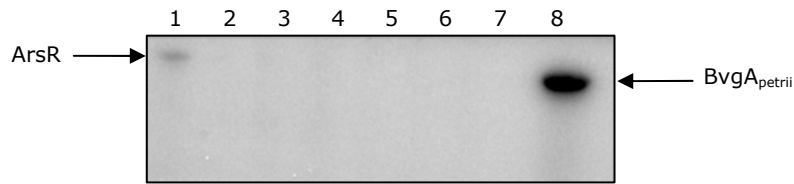


Abb. 40: Autoradiogramm der *in vitro*-Phosphorylierung mit radioaktiv markiertem Acetylphosphat. Jeweils 200 pmol der gereinigten Response-Regulatoren wurden mit 5  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -markiertem Acetylphosphat für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert. Die Auftrennung der Ansätze erfolgte auf einem 20 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels des PhosphorImagers sichtbar gemacht.

Spur 1: ArsR; 30 min  
 Spur 2: HP1021-R; 15 min  
 Spur 3: HP1021-R; 30 min  
 Spur 4: HP1021-R; 45 min  
 Spur 5: HP1043; 15 min  
 Spur 6: HP1043; 30 min  
 Spur 7: HP1043; 45 min  
 Spur 8: BvgA<sub>petrii</sub>; 30 min

Die Abb. 40 zeigt das Autoradiogramm der mit verschiedenen Response-Regulatoren durchgeführten Phosphorylierungsreaktionen. Wie man erkennen kann, konnten die Proteine ArsR (HP0166) und BvgA<sub>petrii</sub> *in vitro* durch Acetylphosphat phosphoryliert werden. Allerdings konnte, sowohl bei kürzerer Inkubationszeit (15 Minuten), als auch bei längerer Inkubationszeit (45 Minuten), *in vitro* kein Phosphotransfer von Acetylphosphat auf HP1043 oder HP1021-R detektiert werden. Diese Daten bestätigen die schon in früheren Experimenten erhaltenen Ergebnisse (Schär, 2001; Schär *et al.*, 2005).

Allerdings lassen sich *in vitro* erzielte Ergebnisse nicht notwendigerweise auf *in vivo* Verhältnisse übertragen. Es wäre denkbar, dass sich HP1021 und HP1043 nicht durch Acetylphosphat, aber durch eine entsprechende Kinase oder andere niedermolekulare Phosphatgruppen-Donatoren phosphorylieren lassen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass das Protein His<sub>6</sub>-HP1021-R, welches unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurde, nicht zu seiner nativen Konformation zurückgefaltet wurde.

#### 4.2 Untersuchungen zur *in vivo*-Phosphorylierung der Response-Regulatoren von *H. pylori* durch zelluläres Acetylphosphat

Der niedermolekulare Phosphat-Donor Acetylphosphat bildet ein natürliches Intermediat im bakteriellen Stoffwechsel. Bei *E. coli* z.B. kommt Acetylphosphat in der Zelle als ein Zwischenprodukt der Reaktion zur Synthese von Acetat aus Acetyl-CoA und der reversen Reaktion (siehe Abb. 41) vor (McCleary *et al.*, 1993).

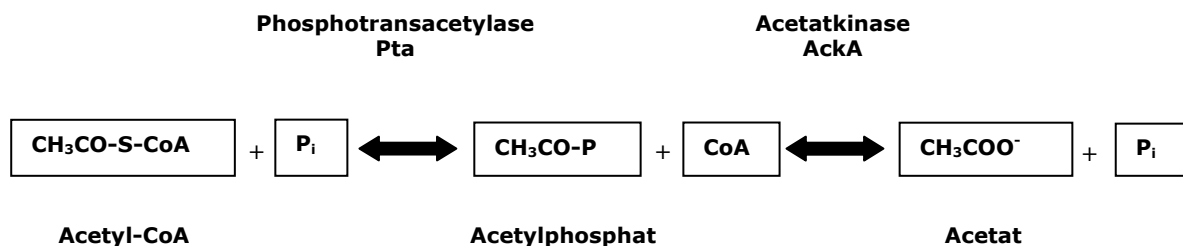


Abb. 41: Darstellung der Synthese von Acetat aus Acetyl-CoA und der reversen Reaktion (Schlegel, 1992)

Die metabolischen Enzyme Phosphotransacetylase (Pta) und Acetatkinase (AckA), die beide in diese Reaktionen involviert sind, werden im Genom von *H. pylori* J99 codiert. Im Genom

von *H. pylori* 26695 findet man ebenfalls die Gene für diese Enzyme, allerdings weisen beide Gene eine Frameshift-Mutation auf (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). Im Chromosom des in dieser Arbeit verwendeten *H. pylori*-Stammes G27 sind die Gene beider Enzyme via PCR nachweisbar, es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um funktionelle Gene oder Pseudogene handelt. Trotzdem sollten die Gene *pta* (*hp0903*) und *ackA* (*hp0905*) in *H. pylori* G27 durch eine Kan<sup>r</sup>-Kassette deletiert werden, um einen möglichen Einfluss der Acetylphosphat-vermittelten Phosphorylierung von HP1043 und HP1021 auf das Zellwachstum zu untersuchen.

#### 4.2.1 Konstruktion des „knock-out“-Plasmids zur Deletion der Gene *pta* und *ackA* in *H. pylori* G27

Mit dem Oligonukleotidpaar HP0900-12/HP0900-22 wurde zunächst ein 752 bp Fragment (*hp0900/hp0901*) von chromosomaler DNA des *H. pylori*-Stammes G27 amplifiziert. Dieses DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I geschnitten und in den entsprechend gespaltenen Vektor pSL1180 ligiert. Anschließend wurde ein 640 bp Fragment (*hp0906*), welches mit den Oligonukleotiden HP0906-13/HP0906-22 ausgehend von chromosomaler DNA des *H. pylori*-Stammes G27 amplifiziert wurde, über die *Pst*I und *Sac*I Schnittstellen in dieses Plasmid kloniert. Beide Fragmente sind ursprünglich im *H. pylori*-Chromosom benachbart zu *pta* und *ackA* lokalisiert und flankieren den zu deletierenden Bereich. Zum Abschluss wurde eine 1430 bp Kan<sup>r</sup>-Kassette, die zuvor mit dem Restriktionsenzym *Pst*I aus dem Plasmid pVac:kan ausgeschnitten wurde, über die *Pst*I-Schnittstelle in den Vektor inseriert, um das Plasmid pSL-*pta/ackA*::kan (siehe Abb. 42) zu generieren.

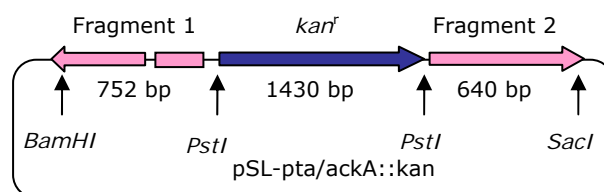


Abb. 42: Schematische Darstellung des Plasmides pSL-*pta/ackA*::kan. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Fragment 1: ORFs HP0900 und HP0901

Fragment 2: ORF HP0906

#### 4.2.2 Deletion der Gene *pta* und *ackA* in *H. pylori* G27

Das Plasmid pSL-*pta/ackA*::kan wurde in den *H. pylori*-Stamm G27 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Kan-haltigen Columbia Blutagarplatten. Durch homologe Rekombination über die flankierenden Fragmente sollte ein 2575 bp großes Fragment, welches die Gene *pta* und *ackA* sowie das Gen des hypothetischen Proteins HP0902, das mit den Genen *hp0901* und *pta* partiell überlappt, umfasst, durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert werden. In Abb. 43 ist das Rekombinationsereignis schematisch aufgezeigt.

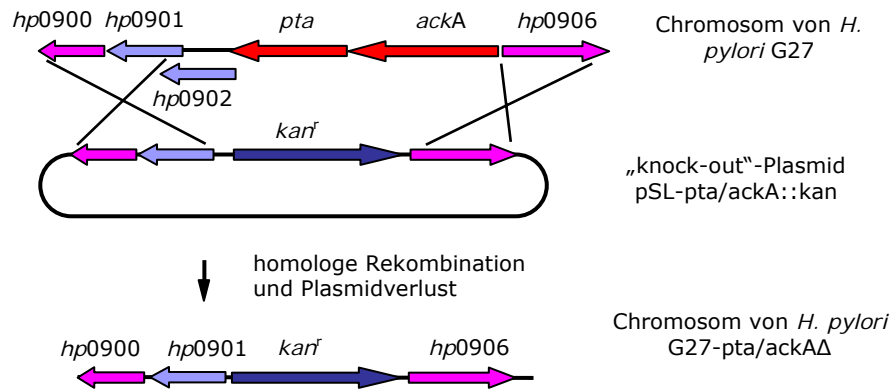


Abb. 43: Schematische Darstellung der Rekombination zwischen klonierten Fragmenten des Plasmids pSL-pta/ackA::kan und den homologen Sequenzen des Chromosoms von *H. pylori* G27. Bei diesem Vorgang wurde eine 2575 bp Region, welche die ORFs *hp0902*, *pta* und *ackA* umfasst, durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette ersetzt. Die Rekombinationsorte sind durch überkreuzte Striche gekennzeichnet.

Die Charakterisierung der Transformanten, die normales Wachstum zeigten, erfolgte mittels PCR-Analysen. Die verwendeten Primer sowie die erwarteten Fragmentlängen sind in Tab. 19 aufgeführt.

Tab. 19: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27pta/ackAΔ durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 44 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination   | Fragmentlänge |
|---------------------|---------------|
| HP0900-12/HP0906-22 | 2822 bp       |
| HP0900-12/kan2      | 1459 bp       |
| HP0906-22/HPkan3    | 690 bp        |

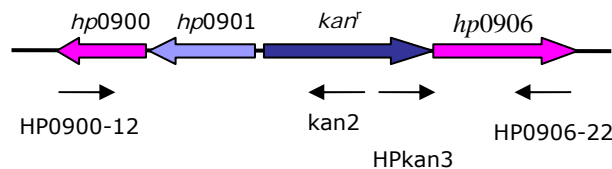


Abb. 44: Schematische Darstellung der Primerpositionen (schwarze Pfeile) zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27pta/ackAΔ.

Die Fragmente, welche in den PCR-Ansätzen amplifiziert wurden, wiesen alle die erwarteten Längen auf (nicht gezeigt). Demzufolge wurden die beiden Gene *pta* und *ackA* korrekt durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert.

Da sich die Gene für die Phosphotransacetylase (*pta*) und die Acetatkinase (*ackA*) unter diesen Bedingungen anscheinend ohne Auswirkung auf das Zellwachstum von *H. pylori* G27 inaktivieren ließen, ist die *in vivo*-Phosphorylierung durch Acetylphosphat vermutlich keine Voraussetzung für die Zellwachstums-assoziierte Funktionen von HP1021 und HP1043. Gestützt wird dieses Resultat durch die Tatsache, dass beide Gene im *H. pylori*-Stamm 26695 eine Frameshift-Mutation aufweisen (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997).

## 5. *In vivo*-Komplementationsexperimente mit Derivaten von HP1043 und HP1021, die Mutationen an der potentiellen Phosphorylierungsstelle aufweisen

Nachdem *in vitro* kein Phosphotransfer durch die vorhandenen Histidin-Kinasen (Beier & Frank, 2000) oder durch Acetylphosphat nachgewiesen werden konnte (siehe E 4; Schär, 2001; Schär *et al.*, 2005), sollte nun getestet werden, ob die Phosphorylierung der beiden Regulatoren essentiell für ihre Funktion ist. Um dies *in vivo* zu überprüfen, wurden Derivate der beiden Response-Regulatoren konstruiert, die Mutationen an potentiell möglichen Phosphorylierungsstellen aufweisen, und es wurde getestet, ob *H. pylori*-Stämme, die diese mutierten Derivate im *cag*-Lokus tragen, nach Deletion des entsprechenden wildtypischen Response-Regulatorgens lebensfähig sind.

### 5.1 Konstruktion von mutierten Derivaten von HP1043

Wie in Abb. 45 zu sehen ist, weist die Sequenz des Response-Regulators HP1043 im Vergleich zu seinen Orthologen aus den nah verwandten Organismen *W. succinogenes*, *H. hepaticus* und *C. jejuni* eine Deletion von vier Aminosäuren in der Receiver-Domäne auf (Baar *et al.*, 2003; Martinez-Hackert & Stock, 1997; Parkhill *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2003; Tomb *et al.*, 1997). Die Deletion betrifft die putative Konsensus-Phosphorylierungsstelle (entspricht D57 in CheY von *E. coli*). Als Folge dieser Deletion könnten ein nachfolgender Aspartatrest oder der benachbarte Serinrest (siehe Abb. 45) die Position einer putativen Phosphorylierungsstelle einnehmen.

|           |   |            |            |            |            |            |         |    |
|-----------|---|------------|------------|------------|------------|------------|---------|----|
| WS0306    | 1 | MRILIIEDEI | TLNKTLAEG  | NEFNYQTDVA | ENLKDGEYFI | SIRNYDLVLT | DWMLPD  | 56 |
| HH1697    | 1 | MRILVIEDDP | TLCKNIAEML | NERSYQTDIA | ENLKDGEYFI | SIRNYDLVLA | DWDLSD  | 56 |
| CJ0355    | 1 | MRILVIEDEI | SLNKTIIDNL | NEFGYQTDSS | ENFKDGEYFI | GIRHYDLVLA | NWTLPD  | 56 |
| HP1043    | 1 | MRVLLIEKNS | VLGGEIEKGL | NVKGFMADVT | ESLEDGEYLM | DIRNYDLVM. | . . VSD | 56 |
| Konsensus |   | -KVLVDDDD- | --R--L---L | ---G-----  | -----      | ----PDLVLL | DLRMP-  |    |
|           |   | RI IIE E   | L I I      |            |            | Y VIIT     | INL     |    |
|           |   | TL LA H    | V          |            |            | V ILVM     | VM      |    |

Abb. 45: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 1 bis AS 56 in HP1043 und seinen Orthologen aus *W. succinogenes* (WS0306), *H. hepaticus* (HH1697) und *C. jejuni* (CJ0355) und der Konsensus-Sequenz.

In **rot**: Position der putativen Phosphorylierungsstelle in HP1043 oder seinen Orthologen

In **blau**: AS von HP1043, die als alternative Phosphorylierungsstelle dienen könnten

So wurde beispielsweise für CheY aus *E. coli* bereits nachgewiesen, dass in einer D57N-Mutante ein benachbarter Serinrest von der zugehörigen Histidin-Kinase CheA *in vitro* phosphoryliert wird, wenn auch mit geringerer Effizienz (Appleby & Bourret, 1999). Aus diesem Grund wurden mutierte Derivate von HP1043 konstruiert, bei denen entweder einer der beiden Aminosäurereste oder beide Aminosäurereste gleichzeitig jeweils durch nicht phosphorylierbare Aminosäurereste substituiert wurden. Unter nicht phosphorylierbaren Aminosäureresten versteht man solche, die keine freie OH-Gruppe aufweisen, auf die eine Phosphatgruppe übertragen werden kann, wie z.B. ein Asparagin- oder Alaninrest.



### 5.1.1 Konstruktion der merodiploiden *H. pylori*-Stämme G27/1043-S51N, G27/1043-D52N, G27/1043-S51A, G27/1043-S51D52AN und G27/1043-S51D52MN

In Tab. 20 ist dargestellt, wie die Gensequenz von *hp1043* in *H. pylori* G27 verändert wurde, um die gewünschten Aminosäuresubstitutionen der einzelnen in Abb. 46 aufgelisteten Mutanten einzuführen.

Tab. 20: Änderung/en der Basentriplets der Gensequenz von *H. pylori* G27.

| Mutation | veränderte Basentriplets | Aminosäuresubstitution/en            |
|----------|--------------------------|--------------------------------------|
| S51N     | AGC → AAT                | Serin → Asparagin                    |
| D52N     | GAT → AAT                | Aspartat → Asparagin                 |
| S51A     | AGC → GCT                | Serin → Alanin                       |
| S51D52AN | AGC GAT → GCT AAT        | Serin/Aspartat → Alanin/Asparagin    |
| S51D52MN | AGC GAT → ATG AAT        | Serin/Aspartat → Methionin/Asparagin |

|                 |    |   |    |
|-----------------|----|---|----|
| HP1043          | 21 | NVKGFMADVT ESLEDGEYLM DIRNYDLVM. . .VSDKNAL | 56 |
| HP1043-S51N     | 21 | NVKGFMADVT ESLEDGEYLM DIRNYDLVM. . .VNDKNAL | 56 |
| HP1043-D52N     | 21 | NVKGFMADVT ESLEDGEYLM DIRNYDLVM. . .VSNKNAL | 56 |
| HP1043-S51A     | 21 | NVKGFMADVT ESLEDGEYLM DIRNYDLVM. . .VADKNAL | 56 |
| HP1043-S51D52AN | 21 | NVKGFMADVT ESLEDGEYLM DIRNYDLVM. . .VANKNAL | 56 |
| HP1043-S51D52MN | 21 | NVKGFMADVT ESLEDGEYLM DIRNYDLVM. . .VMNKNAL | 56 |

Abb. 46: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 21 bis AS 56 in HP1043, HP1043-S51N, HP1043-D52N, HP1043-S51A, HP1043-S51D52AN und HP1043-S51D52MN

In **rot**: AS-Sequenz an der potentiellen Phosphorylierungsstelle in HP1043

In **gelb**: AS-Substitutionen in HP1043-S51N, HP1043-D52N, HP1043-S51A, HP1043-S51D52AN und HP1043-S51D52MN

Nach der Mutagenese mit dem „Quick change“ Mutagenese Kit von Stratagene, wobei zur Amplifikation der mutierten Allele die in Tab. 21 aufgeführten Oligonukleotide sowie als Template-DNA das Plasmid pSL-1043 verwendet wurden, wurden aus jeweils einem Klon, dessen Plasmid-DNA nach der Sequenzierung mit dem Primer HP1043-seq5 die gewünschte Mutation aufwies, die Plasmide pSL-1043-S51N, pSL-1043-D52N pSL-1043-S51A pSL-1043-S51D52AN und pSL-1043-S51D52MN isoliert.

Tab. 21: Oligonukleotide die zur Konstruktion der mutierten Allele *hp1043-S51N*, *hp1043-D52N*, *hp1043-S51A*, *hp1043-S51D52AN* und *hp1043-S51D52MN* verwendet wurden.

| Mutation | Oligonukleotide                     |
|----------|-------------------------------------|
| S51N     | HP1043-S51N-1/HP1043-S51N-2         |
| D52N     | HP1043-D52N-1/HP1043-D52N-2         |
| S51A     | HP1043-D52A-1/HP1043-D52A-2         |
| S51D52AN | HP1043-S51D52AN-1/HP1043-S51D52AN-2 |
| S51D52MN | HP1043-S51D52MN-1/HP1043-S51D52AN-2 |

Diese Plasmide wurden mit den Enzymen *BamHI* und *PstI* verdaut, um die 1069 bp Fragmente, welche die Allele *hp1043-S51N*, *hp1043-D52N*, *hp1043S51A*, *hp1043-S51D52AN* und *hp1043-S51D52MN* enthalten, zu isolieren. Diese Fragmente wurden jeweils in den zuvor mit *BamHI* und *PstI* verdauten Vektor pSL-cagACD inseriert. Anschließend wurde über die *PstI*-Schnittstelle eine Cm<sup>r</sup>-Kassette in die resultierenden Plasmide inseriert. Die Plasmide (siehe Abb. 47) wurden pSL-cagACD-1043-S51N-Cm, pSL-cagACD-1043-D52N-Cm, pSL-cagACD-1043-S51A-Cm, pSL-cagACD-1043-S51D52AN-Cm und pSL-cagACD-1043-S51D52MN-Cm genannt.

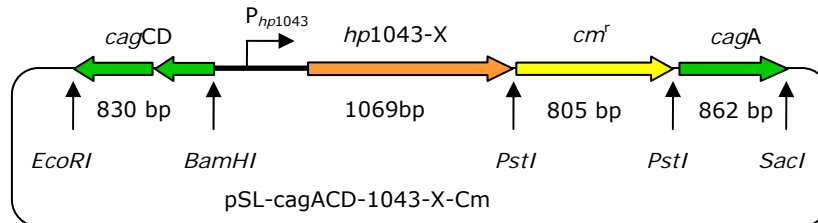


Abb. 47: Schematische Darstellung der Plasmide pSL-cagACD-1043-X-Cm. *hp1043-X* steht stellvertretend für die mutierten Allele *hp1043-S51N*, *hp1043-D52N*, *hp1043-S51A*, *hp1043-S51D52AN* und *hp1043-S51S52MN*. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die zuvor genannten Plasmide wurden jeweils in den *H. pylori*-Stamm G27 transformiert. Die Selektion erfolgte auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Anhand von PCR-Analysen mit unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe Tab. 22) wurde die chromosomale DNA der erhaltenen Transformanten analysiert, wobei in Abb. 48 repräsentativ die Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27/1043-S51D52AN gezeigt ist.

Tab. 22: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1043-S51N, G27/1043-D52N, G27/1043-S51A, G27/1043-S51D52AN und G27/1043-S51D52MN durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 32 unter E 3.1.2 schematisch dargestellt).. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

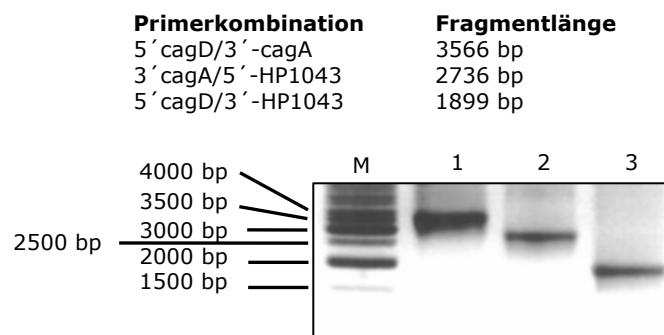


Abb. 48: PCR-Analyse des *H. pylori*-Stammes G27/1043-S51D52AN. Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI  
 Spur 1: Primerpaar 5' cagD/3' cagA  
 Spur 2: Primerpaar 3' cagA/5' -HP1043  
 Spur 3: Primerpaar 5' cagD/3' -HP1043

Sämtliche Ergebnisse ergaben, dass die jeweilige Integration der mutierten *hp1043*-Allele in den *cag*-Lokus korrekt stattgefunden hat. Die Sequenzierung der mutierten *hp1043*-Allele mit dem Primer 1043seq5 ergab, dass die gewünschten Mutationen S51N, D52N, S51A, S51D52AN und S51D52MN vorhanden waren, worauf hin die konstruierten Stämme als G27/1043-S51N, G27/1043-D52N, G27/1043-S51A, G27/1043-S51D52AN und G27/1043-S51D52MN benannt wurden.

### 5.1.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens *hp1043* in den *H. pylori*-Stämmen G27/1043-S51N, G27/1043-D52N, G27/1043-S51A, G27/1043-S51D52AN und G27/1043-S51D52MN

Zur Deletion des wildtypische *hp1043*-Gens wurde das „knock-out“-Plasmid pSL-1043::km2 (siehe E 1.2) in die merodiploiden *H. pylori*-Stämme G27/1043-S51N, G27/1043-D52N, G27/1043-S51A, G27/1043-S51D52AN und G27/1043-S51D52MN transformiert. Die Transformationsansätze wurden zur Selektion auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten ausplattiert. Von den erhaltenen Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert, die über PCR-Analysen (siehe Tab. 23) charakterisiert wurde.

Tab. 23: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1043-S51N $\Delta$ , G27/1043-D52N $\Delta$ , G27/1043-S51A $\Delta$ , G27/1043-S51D52AN $\Delta$  und G27/1043-S51D52MN $\Delta$  durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 32 unter E 3.1.2 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

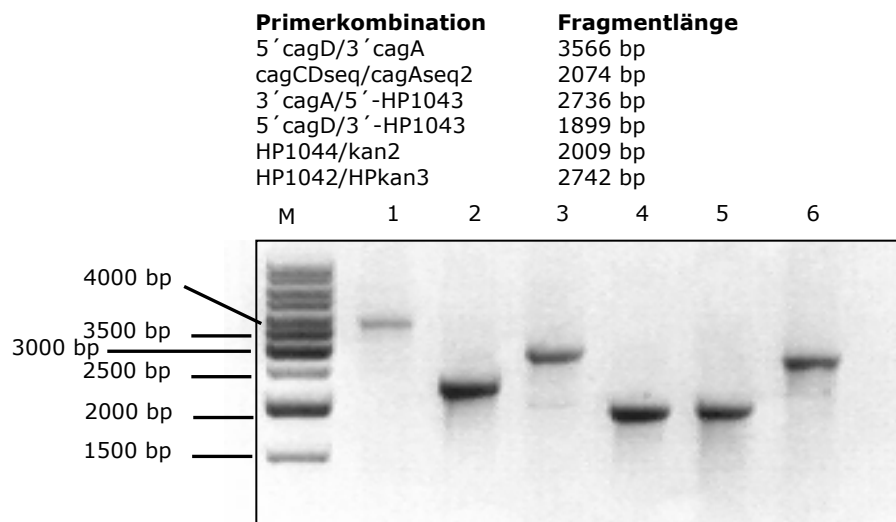


Abb. 49: PCR-Analyse des *H. pylori*-Stammes G27/1043-S51D52AN $\Delta$ . Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI  
 Spur 1: Primerpaar 5' cagD/3' cagA  
 Spur 2: Primerpaar cagAseq2/cagCDseq  
 Spur 3: Primerpaar 3' -cagA/5' -HP1043  
 Spur 4: Primerpaar 5' -cagD/3' -HP1043  
 Spur 5: Primerpaar HP1044/kan2  
 Spur 6: Primerpaar HP1042/HPkan3

Die Charakterisierung der Transformanten aus den fünf verschiedenen Transformationsansätzen ergab, dass in allen Fällen die amplifizierten Fragmente die zu erwartenden Längen aufwiesen, was bedeutet, dass sowohl *hp1043* korrekt deletiert wurde, als auch, dass die Organisation des modifizierten *cag*-Lokus unverändert vorlag. Die Fragmente, welche aus den PCR-Ansätzen mit dem Primerpaar cagAseq2/cagCDseq resultierten, wurden mit dem Primer 1043seq5 sequenziert. Hierdurch konnten die gewünschten Mutationen der *hp1043*-Allele im *cag*-Lokus nachgewiesen werden. Die resultierenden *H. pylori*-Mutanten wurden demzufolge als G27/1043-S51N $\Delta$ , G27/1043-D52N $\Delta$ , G27/1043-S51A $\Delta$ , G27/1043-

S51D52ANA und G27/1043-S51D52MNA bezeichnet. In Abb. 49 ist repräsentativ die PCR-Analyse des *H. pylori*-Stammes G27/1043-S51D52ANA aufgezeigt.

Da die mutierten HP1043-Derivate den wildtypischen Response-Regulator HP1043 funktionell ersetzen können, ist anzunehmen, dass eine Phosphorylierung der Receiver-Domäne von HP1043 an den Positionen S51 bzw. D52 keine Voraussetzung für seine essentielle Funktion ist.

## 5.2 Konstruktion von mutierten Derivaten von HP1021

In HP1021 befindet sich die potentielle Phosphorylierungsstelle an Position 47 und besteht wie in den HP1021-Orthologen aus *W. succinogenes* (WS1919), *H. hepaticus* (HH1583) und *C. jejuni* (CJ1608) aus einem Serinrest (siehe Abb. 50), anstatt wie üblicherweise aus einem Aspartatrest. Wie zuvor schon erwähnt (vgl. E 5.1), konnte gezeigt werden, dass in einer D57N Mutante von CheY aus *E. coli* ein benachbarter Serinrest von der Histidin-Kinase CheA phosphoryliert werden kann, wenn auch die Effizienz des Phosphotransfers reduziert ist (Appleby & Bourret, 1999). Serinreste kommen somit als potentielle Phosphat-Akzeptoren in Response-Regulatoren durchaus in Frage.

|           |   |            |            |            |            |            |        |        |    |
|-----------|---|------------|------------|------------|------------|------------|--------|--------|----|
| WS1939    | 1 | MRVLIVENEI | YLAQSIAAKL | SDFGFECEIV | SLVNEALREQ | EYDVVLLS   | STN    | VSGQNY | 56 |
| HH1583    | 1 | MKVLIIENEI | YLAQSIANKI | SDSHLECVIA | HSLKD.VQKD | HYDVILAS   | FG     | TIGEGY | 56 |
| CJ1608    | 1 | MKVLIIENEI | YLAQSIKIKL | SDAGYSCEII | NSFDEYNGEK | YYDIILLSTN | T..NN  |        | 56 |
| HP1021    | 1 | MKILIIEDDL | ALARSISHNL | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILVS   | SK     | VCTQGR | 56 |
| Konsensus |   | -KVLVVDDD- | --R--L---L | ---G-----  | -----      | PDLVLL     | DLRMP- |        |    |
|           |   | RI IIE E   | L I I      |            |            | Y VIIT     | INL    |        |    |
|           |   | TL LA H    | V          |            |            | V ILVM     | VM     |        |    |

Abb. 50: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 1 bis AS 56 in HP1021 und seinen Orthologen aus *W. succinogenes* (WS1939), *H. hepaticus* (HH1583) und *C. jejuni* (CJ1608) und der Konsensus-Sequenz.

In **rot**: Position der potentiellen Phosphorylierungsstelle in HP1021 oder seinen Orthologen

In **blau**: AS-Rest von HP1021, der als alternative Phosphorylierungsstelle dienen könnte

Um die Bedeutung einer möglichen Phosphorylierung der Serinreste S47 und S48 zu untersuchen wurden mutierte Derivate von *hp1021* konstruiert, bei denen entweder einer der beiden Aminosäurereste S47 oder S48 durch einen nicht phosphorylierbaren Aminosäurerest substituiert wurde oder beide Positionen gleichzeitig verändert wurden.

### 5.2.1 Konstruktion der merodiploiden *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47N, G27/1021-S48N und G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48AA, G27/1021-S47S48NA, G27/1021-S47S48NL und G27/1021-S47S48MN

In Tab. 24 ist dargestellt, wie die Gensequenz von *hp1021* in *H. pylori* G27 verändert wurde, um die gewünschten Aminosäuresubstitutionen der einzelnen Mutanten (siehe Abb. 51) zu erhalten.

Tab. 24: Änderung/en der Basentriplets der Gensequenz von *H. pylori* G27.

| Mutation  | veränderte Basentriplets | Aminosäuresubstitution/en         |
|-----------|--------------------------|-----------------------------------|
| S47N/S48N | AGC → AAT                | Serin → Asparagin                 |
| S47S48NN  | AGC → AAT AAT            | Serin/Serin → Asparagin/Asparagin |
| S47S48AA  | AGC AGC → GCT GCT        | Serin/Serin → Alanin/Alanin       |
| S47S48NA  | AGC AGC → ATG GCT        | Serin/Serin → Asparagin/Alanin    |
| S47S48NL  | AGC AGC → AAT CTT        | Serin/Serin → Asparagin/Leucin    |
| S47S48MN  | AGC AGC → ATG AAT        | Serin/Serin → Methionin/Asparagin |

|                 |    |            |            |         |     |        |    |
|-----------------|----|------------|------------|---------|-----|--------|----|
| HP1021          | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | SSK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47N     | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | NSK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S48N     | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | SNK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47S48NN | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | NNK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47S48AA | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | AAK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47S48NA | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | NAK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47S48NL | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | NLK | VCTQGR | 56 |
| HP1021-S47S48MN | 21 | HDLGHFCEII | SSISEE.NKE | PYDVILV | MNK | VCTQGR | 56 |

Abb. 51: Alignment der Sequenz der Receiver-Domäne von AS 21 bis AS 56 in HP1021, HP1021-S47N, HP1021-S48N, HP1021-S47S48NN, HP1021-S47S48AA, HP1021-S47S48NA, HP1021-S47S48NL und HP1021-S47S48MN.

In rot: AS-Sequenz in HP1021

In gelb: AS-Änderungen in HP1021-S47N, HP1021-S48N, HP1021-S47S48NN, HP1021-S47S48AA, HP1021-S47S48NA, HP1021-S47S48NL und HP1021-S47S48MN

Die gewünschten Mutationen wurden mit Hilfe des "Quick change" Mutagenese Kits von Stratagene erreicht. In der Mutagenese-PCR zur Konstruktion der mutierten Allele wurden die in Tab. 25 aufgeführten Oligonukleotide eingesetzt, wobei das Plasmid pSL-1021 als Template-DNA diente.

Tab. 25: Oligonukleotide die zur Konstruktion der mutierten Allele *hp1021-S47N*, *hp1021-S48N*, *hp1021-S47S48NN*, *hp1021-S47S48AA*, *hp1021-S47S48NA*, *hp1021-S47S48NL* und *hp1021-S47S48MN* verwendet wurden.

| Mutation | Oligonukleotide                     |
|----------|-------------------------------------|
| S47N     | HP1021-S47N-1/HP1021-S47N-2         |
| S48N     | HP1021-S48N-1/HP1021-S48N-2         |
| S47S48NN | HP1021-S47S48NN-1/HP1021-S47S48NN-2 |
| S47S48AA | HP1021-S47S48AA-1/HP1021-S47S48AA-2 |
| S47S48NA | HP1021-S47S48NA-1/HP1021-S47S48NA-2 |
| S47S48NL | HP1021-S47S48NL-1/HP1021-S47S48NL-2 |
| S47S48MN | HP1021-S47S48MN-1/HP1021-S47S48MN-2 |

Aus den erhaltenen Transformanten wurde Plasmid-DNA isoliert und mit dem Primer 1021seq2 sequenziert. Aus jeweils einem Klon, der ein Plasmid mit der gewünschten Mutation trug, wurden die als pSL-1021-S47N, pSL-1021-S48N, pSL-1021-S47S48NN, pSL-1021-S47S48AA, pSL-1021-S47S48NA, pSL-1021-S47S48NL bzw. pSL-1021-S47S48MN bezeichneten Plasmide isoliert. Aus diesen Plasmiden wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *PstI* jeweils ein 970 bp Fragment, welches das entsprechend mutierte *hp1021*-Allel enthält, ausgeschnitten. Die erhaltenen Fragmente wurden in den *XbaI/PstI* gespaltenen Vektor pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub> integriert. In die so entstandenen Plasmide pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-S47N, pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-S48N, pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-S47S48NN, pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-S47S48AA, pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-S47S48NA, pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-S47S48NL und pSL-cagA-P<sub>hp1018</sub>-S47S48MN wurde zunächst mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* das 830 bp Fragment *cagCD* ligiert und anschließend über die *PstI*-Schnittstelle eine

Cm<sup>r</sup>-Kassette inseriert. Die resultierenden Plasmide wurden als pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-S47N-Cm, pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-S48N-Cm, pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-S47S48NN-Cm, pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-S47S48AA-Cm, pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-S47S48NA-Cm, pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-S47S48NL-Cm und pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-S47S48MN-Cm (siehe Abb. 52) bezeichnet.

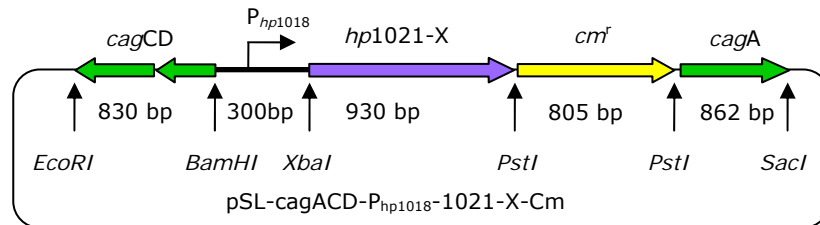


Abb. 52: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-X-Cm. *hp1021-X* steht stellvertretend für die mutierten Allele *hp1021-S47N*, *hp1021-S48N*, *hp1021-S47S48NN*, *hp1021-S47S48AA*, *hp1021-S47S48AN*, *hp1021-S47S48NL* und *hp1021-S47S48MN*. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

In den *H. pylori*-Stamm G27 wurden jeweils die zuvor konstruierten Plasmide transformiert. Über homologe Rekombination mit den *cag*-Sequenzen der Plasmide sollte das jeweilige mutierte Allel von *hp1021* in den *cag*-Lokus integriert werden. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Die chromosomale DNA der erhaltenen Transformanten wurden durch PCR-Analysen mit unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe Tab. 26) charakterisiert, wobei die Analysen die korrekte Integration der mutierten *hp1021*-Allele in den *cag*-Lokus zeigten und eine Sequenzierung der mutierten Allele mit dem Primer 1021seq2 das Vorhandensein der gewünschten Mutationen bestätigte.

Tab. 26: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47N, G27/1021-S48N, G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48AA, G27/1021-S47S48NA, G27/1021-S47S48NL und G27/1021-S47S48MN durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 38 unter E 3.2.2 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

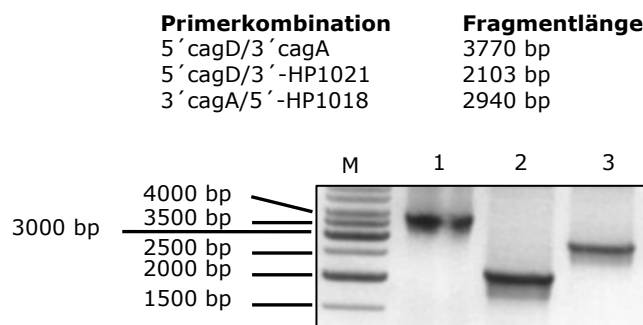


Abb. 53: PCR-Analyse von *H. pylori* G27/1021-S47S48NA. Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI  
 Spur 1: Primerpaar 5' cagD/3' cagA  
 Spur 2: Primerpaar 5' cagD/3' -HP1021  
 Spur 3: Primerpaar 3' cagA/5' -HP1018

Die entstandenen *H. pylori*-Stämme wurden daraufhin G27/1021-S47N, G27/1021-S48N, G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48AA, G27/1021-S47S48NA, G27/1021-S47S48NL

und G27/1021-S47S48MN genannt. In Abb. 53 sind die Ergebnisse der PCR-Analysen am Beispiel des *H. pylori*-Stammes G27/1021-S47S48NA gezeigt.

### 5.2.2 Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens *hp1021* in den merodiploiden *H. pylori*-Stämmen G27/1021-S47N, G27/1021-S48N, G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48AA, G27/1021-S47S48NA, G27/1021-S47S48NL und G27/1021-S47S48MN

Das „knock-out“-Plasmid pSL-1021::km (siehe E 1.1) wurde in die *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47N, G27/1021-S48N, G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48NA, G27/1021-S47S48NL und G27/1021-S47S48MN transformiert. Die Selektion der Transformanten, die normales Wachstum zeigten, erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Die chromosomale DNA der erhaltenen Stämme wurde durch PCR-Analysen (siehe Tab. 27) charakterisiert. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass das Gen *hp1021* in allen Stämmen korrekt substituiert worden war und die Organisation am *cag*-Lokus unverändert vorlag. In der Abb. 54 sind repräsentativ die Ergebnisse der PCR-Analyse des *H. pylori*-Stammes G27/1021-S47S48NA $\Delta$  aufgezeigt.

Tab. 27: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47N $\Delta$ , G27/1021-S48N $\Delta$ , G27/1021-S47S48NN $\Delta$ , G27/1021-S47S48AA $\Delta$ , G27/1021-S47S48NA $\Delta$ , G27/1021-S47S48NL $\Delta$  und G27/1021-S47S48MN $\Delta$  durch PCR-Analyse (die Positionen der Primer sind in Abb. 38 unter E 3.2.2 schematisch dargestellt). Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

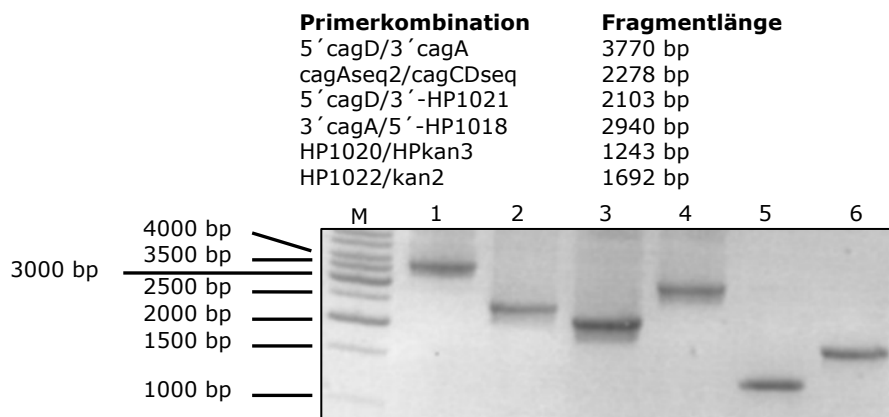


Abb. 54: PCR-Analyse von *H. pylori* G27/1021-S47S48NA $\Delta$ . Die Auftrennung von Aliquots der PCR-Ansätze erfolgte auf einem 1 %igen Agarose-Gel.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI  
 Spur 1: Primerpaar 5' *cagD*/3' *cagA*  
 Spur 2: Primerpaar *cagA*seq2/*cagCD*seq  
 Spur 3: Primerpaar 5' *cagD*/3' -HP1021  
 Spur 4: Primerpaar 3' *cagA*/5' -HP1018  
 Spur 5: Primerpaar HP1020/HPkan3  
 Spur 6: Primerpaar HP1022/kan2

Die Sequenzierungen der im *cag*-Lokus integrierten mutierten *hp1021*-Allele mit dem Primer 1021seq2 ergaben, dass nicht in allen Transformanten die gewünschte Mutation des Gens *hp1021* vorhanden war, sondern dass in einem Teil der Stämme das Gen *hp1021* im *cag*-Lokus wieder in seiner wildtypischen Form vorlag. Von den betroffenen Transformationsansätzen wurde jeweils von mindestens 10 Transformanten das mutierte *hp1021*-Allel sequenziert. Die Sequenzierung des *hp1021*-Allels der Transformanten die aus

den Transformationen der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47S48NN, G27/1021-S47S48NL und G27/1021-S47S48MN mit dem entsprechenden „knock-out“-Plasmid ergab, dass in allen Fällen das in den *cag*-Lokus integrierte *hp1021*-Allel die wildtypische Sequenz aufwies. Im Gegensatz dazu konnte durch die Sequenzierung der Transformanten aus den Transformationsexperimenten der *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47N, G27/1021-S48N, G27/1021-S47S48AA und G27/1021-S47S48NA gezeigt werden, dass jeweils in wenigstens einem Transformanten das *hp1021*-Allel die gewünschte Mutation trug. Aus den Ergebnissen der Sequenzierungen geht hervor, dass nur die mutierten Derivate HP1021-S47N, HP1021-S48N, HP1021-S47S48AA und HP1021-S47S48NA den Response-Regulator in seiner Funktion ersetzen können, woraufhin diese *H. pylori*-Mutanten G27/1021-S47N $\Delta$ , G27/1021-S48N $\Delta$ , G27/1021-S47S48AA $\Delta$  und G27/1021-S47S48NA $\Delta$  bezeichnet wurden. Die Derivate HP1021-S47S48-NN, HP1021-S47S48-NL und HP1021-S47S48-MN waren dazu nicht in der Lage.

Aufgrund der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine Phosphorylierung von HP1021 für die Zellwachstums-assoziierte Funktion des Response-Regulators keine Rolle spielt, da eine Inaktivierung von *hp1021* in Gegenwart mutierter *hp1021*-Allele, die keine potentiellen Phosphorylierungsstellen mehr aufweisen, prinzipiell möglich war. Erstaunlicherweise waren jedoch nicht alle mutierten Derivate für diesen Zweck geeignet.

Um weitere Hinweise bezüglich einer möglichen Phosphorylierbarkeit der Serinreste in HP1021 zu erhalten, wurde das Protein massenspektrometrisch analysiert. In einem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan (siehe E 9.2.1), in dem der Response-Regulator HP1021 unter Kontrolle des P<sub>cagA</sub>-Promotors überexprimiert wird, wurde analysiert, ob an dem Protein HP1021 eine Serinphosphorylierung zu erkennen ist. Hierzu wurde zunächst das Protein HP1021 aus den Gesamtzellproteinen des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan auf einem 2D-Gel identifiziert. Zur Kontrolle wurden die Gesamtzellproteinlysate der *H. pylori*-Stämme G27, 26695 und 26695 1021 $\Delta$  untersucht. Je 50  $\mu$ g bzw. 100  $\mu$ g Gesamtzellproteinlysate der genannten *H. pylori*-Stämme wurden einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) im pH-Bereich 6-9 unterzogen und anschließend auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel gemäß des Molekulargewichtes aufgetrennt. Der pH-Bereich 6-9 wurde gewählt, da das Protein HP1021 einen isoelektrischen Punkt von 8,3 hat. Die Gele, auf denen 50  $\mu$ g Proteinlysate aufgetrennt wurden, wurden einer Silberfärbung unterzogen, während mit den Gelen, die mit 100  $\mu$ g Proteinlysate beladen waren, ein Immunoblot gegen HP1021 durchgeführt wurde.



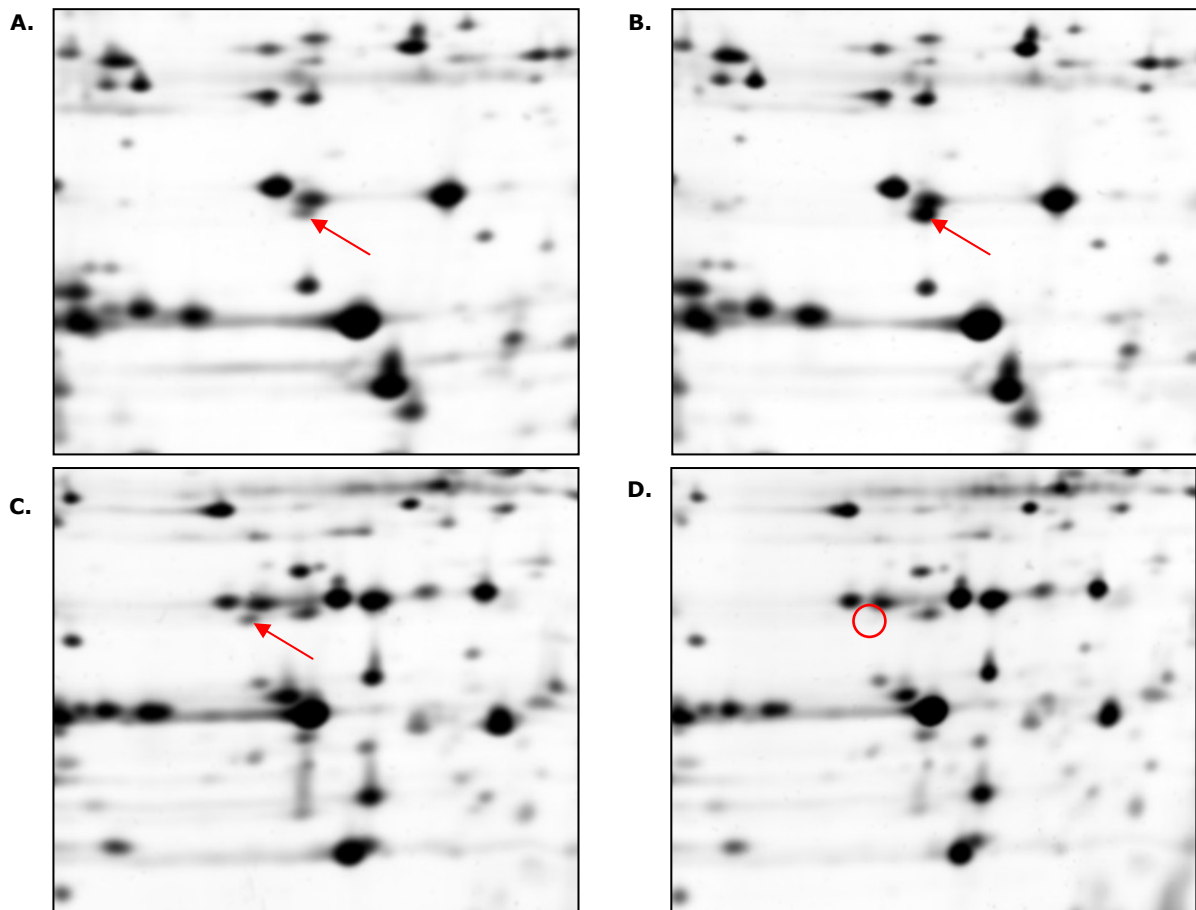


Abb. 55: Ausschnitte aus Silbernitrat-gefärbten 2D-Gelen von Gesamtzellproteinen verschiedener *H. pylori*-Stämme. Dargestellt sind die Proteinexpressionsmuster der *H. pylori*-Stämme G27 (**A.**), G27/ $P_{cagA}^{-}$ 1021-Kan (**B.**), 26695 (**C.**) und 26695 1021 $\Delta$  (**D.**). Auf den Gelen wurden jeweils 50  $\mu$ g Gesamtzellprotein in einem Bereich von pH 6-9 aufgetrennt. Die roten Pfeile markieren den Proteinspot von HP1021, während der rote Kreis denselben Bereich in Gel D markiert, auf welchem der Proteinspot von HP1021 fehlt.

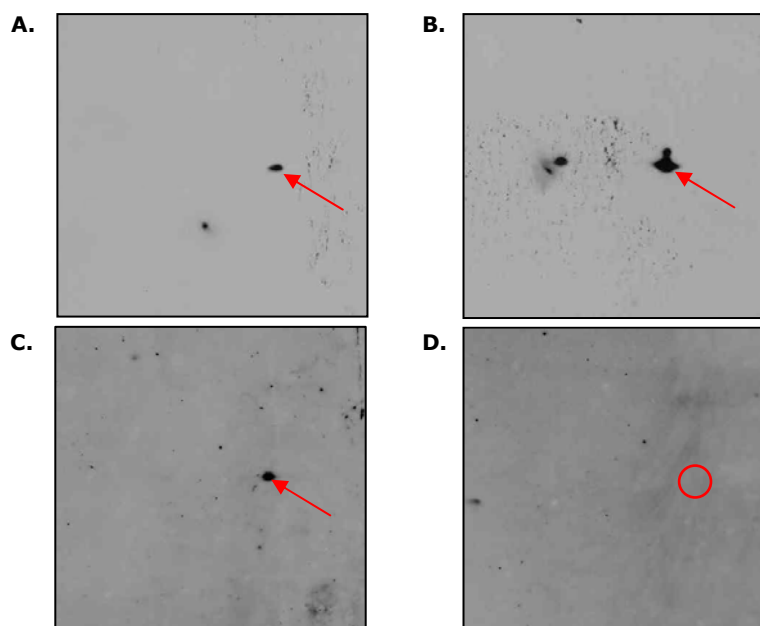


Abb. 56: Ausschnitte aus Western-Blot-Analysen mit 2D-Gelen, auf welchen jeweils 150  $\mu$ g Gesamtzellprotein aus den *H. pylori*-Stämmen G27 (**A.**), G27/ $P_{cagA}^{-}$ 1021-Kan (**B.**), 26695 (**C.**) und 26695 1021 $\Delta$  (**D.**) aufgetrennt wurden. Die Proteine wurden während der IEF in einem Bereich von pH 6-9 fokussiert. Nach der Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit einem polyklonalen Antikörper gegen HP1021 inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelten Ziege-„anti-rabbit“-Antikörper eingesetzt. Die roten Pfeile weisen auf den Proteinspot von HP1021 hin, während der rote Kreis den Bereich des fehlenden Proteinspots HP1021 in Gel D markiert.

Das Protein HP1021 konnte sowohl auf den silbergefärbten Gelen als auch auf den Autoradiogrammen der Western-Blot-Analysen identifiziert werden, wie man in Abb. 55 und Abb. 56 erkennen kann. In beiden Fällen kann man sehen, dass das Protein HP1021 in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan im Vergleich zu *H. pylori* G27 überexprimiert wird, bzw., dass das Protein im Stamm *H. pylori* 26695 1021Δ im Gegensatz zu *H. pylori* 26695 nicht exprimiert wird. Anschließend wurde über MALDI-ToF-MS überprüft, ob eine Serinphosphorylierung dieses Proteins detektierbar ist. Da eine MALDI-ToF-MS Analyse mit Silbernitrat-gefärbten Proteinen sehr schwierig ist, wurden 2D-Gele angefertigt, die mit kolloidalem Coomassie gefärbt wurden, das mit der massenspektrometrischen Analyse kompatibel ist. Die anschließenden MALDI-ToF-MS Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation mit A. Sickmann am Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse der Proteinspots von HP1021 zeigte keine Hinweise auf eine Serinphosphorylierung. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass eine Phosphorylierung von HP1021 keine Voraussetzung für die Funktion des Proteins ist.

## **6. In vivo-Komplementationsexperimente mit den Output-Domänen der Response-Regulatoren HP1043, HP1021 und ArsR (HP0166)**

Wie zuvor gezeigt (vgl. E 2.2 und E 5), ist eine Phosphorylierung der Receiver-Domäne der Response-Regulatoren HP1043, HP1021 und ArsR (HP0166) keine Voraussetzung für die Zellwachstums-assoziierte Funktionen der Response-Regulatoren. Daraus resultierte die Fragestellung, ob die isolierten Output-Domänen in Abwesenheit der regulatorischen Receiver-Domäne die Transkriptionskontrolle der jeweiligen Zielgene erlauben. Aus diesem Grund wurden die Gensequenzen der Output-Domänen von HP1043, HP1021 und ArsR (HP0166) mit den entsprechenden Promotoren P<sub>hp1043</sub>, P<sub>hp1018</sub> und P<sub>hp0166</sub> fusioniert und in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert. Durch den Versuch der anschließenden Deletion des wildtypischen Response-Regulatorgens kann untersucht werden, ob die isolierten Output-Domänen die Funktion der einzelnen Response-Regulatoren übernehmen kann.

### **6.1 Komplementationsexperimente mit der Output-Domäne von HP1043**

#### **6.1.1 Konstruktion des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O**

Zunächst wurde ein Fragment, das die Gensequenz der Output-Domäne von HP1043 enthält, mit dem Promotor von *hp1043*, P<sub>hp1043</sub> (Delany *et al.*, 2002b), fusioniert. Hierzu wurde das 403 bp Fragment P<sub>hp1043</sub> mit den Oligonukleotiden 5´HP1043/P1043-3 von chromosomaler *H. pylori* G27 DNA amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Kpn*I geschnitten und in den entsprechend gespaltenen Vektor pSL1180 kloniert. Das entsprechende Plasmid wurde als pSL-P<sub>hp1043</sub> bezeichnet. Anschließend wurde die Gensequenz (337 bp), welche die Output-Domäne von HP1043 kodiert, mit den Oligonukleotidpaar 1043-FO5´/1043-3´ und dem Plasmid

pSL-1043 als Template-DNA amplifiziert. Über das Oligonukleotid 1043-FO5' wurde am 5'-Ende des Fragments eine *KpnI*-Schnittstelle, eine Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) und ein Translationsstartkodon eingeführt, um die Translation der isolierten Output-Domäne zu gewährleisten. Dieses Fragment 1043-O wurde *KpnI/PstI* gespalten und in das Plasmid pSL-P<sub>hp1043</sub>, welches zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten worden war, ligiert. Die Fusion P<sub>hp1043</sub>/1043-O wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *PstI* aus dem Plasmid pSL-P<sub>hp1043</sub>-1043-O isoliert und in den Vektor pSL-cagACD ligiert. Schließlich wurde eine *PstI*-gespaltene Cm<sup>r</sup>-Kassette in den linearisierten Vektor pSL-cagACD-P<sub>hp1043</sub>-1043-O inseriert, wodurch das Konstrukt pSL-cagACD-P<sub>hp1043</sub>-1043-O-Cm entstand (siehe Abb. 57).

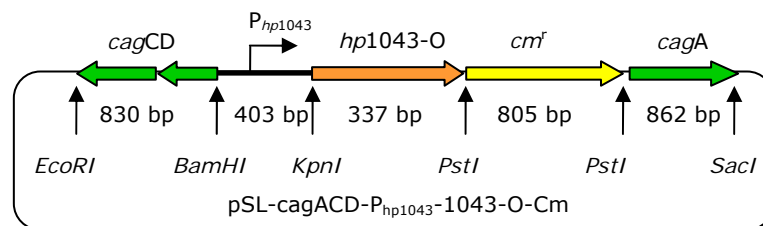


Abb. 57: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-P<sub>hp1043</sub>-1043-O-Cm zur Integration der Output-Domäne von HP1043 in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Der *H. pylori*-Stamm G27 wurde mit dem Plasmid pSL-cagACD-P<sub>hp1043</sub>-1043-O-Cm transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Die Charakterisierung der Transformanten durch PCR-Analyse (siehe Tab. 28) belegte die korrekte Integration der P<sub>hp1043</sub>/1043-O Fusion in den *cag*-Lokus (nicht gezeigt).

Tab. 28: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination | Fragmentlänge |
|-------------------|---------------|
| 5' cagD/3' cagA   | 3237 bp       |
| 5' cagD/3'-HP1043 | 1570 bp       |
| 3' cagA/5'-HP1043 | 2407 bp       |

### 6.1.2 Deletion des Gens *hp1043* in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O

Zur Deletion von *hp1043* wurde der *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-1043::km2 (siehe E 1.2) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Auch nach mehreren unabhängigen Transformationsexperimenten konnten keine Klone isoliert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass entweder die isolierte Output-Domäne von HP1043 den Response-Regulator HP1043 in der Funktion nicht ersetzen kann, oder dass das Protein HP1043-O nicht stabil exprimiert wird.

Daher sollte durch eine Western-Blot-Analyse überprüft werden, ob eine Expression der Output-Domäne von HP1043 in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O detektierbar ist.

### 6.1.3 Analyse der Expression von HP1043-O in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O mittels Western-Blot Analyse

Mit jeweils 20 µg Gesamtzellproteine der *H. pylori*-Stämme G27 und G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Als Kontrolle wurden zusätzlich 0,5 µg des gereinigten Proteins HP1043 auf dem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als erster Antikörper wurde ein polyklonaler Maus-Antikörper gegen HP1043 verwendet (siehe Abb. 58).

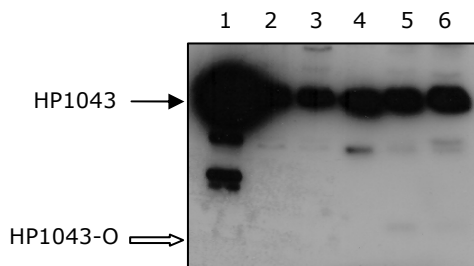


Abb. 58: Analyse der Expression der Output-Domäne von HP1043 in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O durch ein Western-Blot Experiment. Jeweils 20 µg Gesamtzellproteine aus den *H. pylori*-Stämmen sowie 0,5 µg des gereinigten HP1043-Proteins wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalen HP1043-Antikörper inkubiert, als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-„anti-mouse“-Antikörper eingesetzt. Der schwarze Pfeil markiert die Bande, die dem Protein HP1043 (26 kDa) entspricht, der offene Pfeil markiert die theoretische Position der Bande der Output-Domäne von HP1043 (12,4 kDa). Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für ca. 20 sec.

Spur 1: Protein HP1043

Spur 2/3: Proteinlysate von *H. pylori* G27 (Aufreinigung nach D 4.2.1)

Spur 4: Proteinlysate von *H. pylori* G27 (Aufreinigung nach D 4.2.2)

Spur 5/6: Proteinlysate von *H. pylori* G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O, verschiedene Klone

Durch die Western-Blot-Analysen konnte keine Expression der Output-Domäne in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O nachgewiesen werden, da keine Bande detektiert wurde, die dem theoretischen Laufverhalten von HP1043-O (12,4 kDa) entspricht. Da das Protein HP1043-O in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1043</sub>-1043-O offenbar nicht exprimiert wird, können keine Rückschlüsse gezogen werden, ob die Output-Domäne von HP1043 das Protein HP1043 funktionell ersetzen kann.

## 6.2 Komplementationsexperimente mit der Outputdomäne von HP1021

### 6.2.1 Konstruktion des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O

Der Promotor von *hp1021*, P<sub>hp1018</sub> (Pflock *et al.*, 2004), wurde zunächst mit dem Oligonukleotidpaar P1018-5/P1018-3 von chromosomaler DNA des *H. pylori*-Stammes G27 amplifiziert, das resultierende 309 bp lange Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI/*Xba*I gespalten und in den Vektor pSL1180 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pSL-P<sub>hp1018</sub> benannt.

Das 591 bp Fragment *hp1021*-O, welches die Output-Domäne von HP1021 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden 1021-FO5' und 1021-3' und dem Plasmid pSL-1021 als Template-DNA amplifiziert. Anhand des Oligonukleotids 1021-FO5' wurde am 5'-Ende des Fragments eine *Xba*I-Schnittstelle sowie eine RBS und ein Translationsstartkodon eingeführt. Das amplifizierte Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Pst*I verdaut und in den entsprechend gespaltenen Vektor pSL-P<sub>hp1018</sub> kloniert. Aus dem Plasmid pSL-P<sub>hp1018</sub>-1021-O wurde die P<sub>hp1018</sub>/1021-O-Fusion mit den Restriktionsendonukleasen

*Bam*HI und *Pst*I ausgeschnitten und in den Vektor pSL-cagACD ligiert. Durch anschließende Insertion einer Cm<sup>r</sup>-Kassette über die *Pst*I-Schnittstelle wurde das Plasmid pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-O-Cm generiert (siehe Abb. 59).

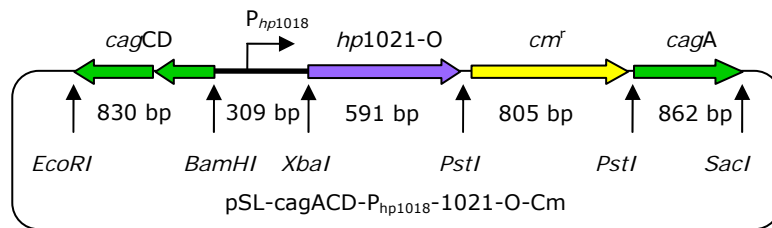


Abb. 59: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-O-Cm zur Integration der Output-Domäne von HP1021 in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Nach Transformation des *H. pylori* Stammes G27 mit dem Plasmid pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-1021-O-Cm, wobei die Selektion der Transformanten auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten erfolgte, konnten Transformanten isoliert werden, deren Charakterisierung durch PCR-Analyse (siehe Tab. 29) zeigte, dass die Integration der P<sub>hp1021</sub>/1021-O-Fusion am *cag*-Lokus korrekt stattgefunden hat (nicht dargestellt).

Tab. 29: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination  | Fragmentlänge |
|--------------------|---------------|
| 5' cagD/3' cagA    | 3397 bp       |
| 5' cagD/3' -HP1021 | 1730 bp       |
| 3' cagA/P1018-5    | 2567 bp       |

### 6.2.2 Deletion des Gens *hp1021* in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O

Zur Deletion des Gens *hp1021* in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O wurde der Stamm mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-1021::km (siehe E 1.1) transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Die Transformation lieferte Kolonien, die in Aussehen und Kultivierbarkeit dem bereits beobachteten „small colony“-Phänotyp entsprachen (Beier & Frank, 2000; McDaniel *et al.*, 2001). Auch weitere Transformationen führten zu „small colonys“ oder brachten keine Transformanten.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die isolierte Output-Domäne das Protein HP1021 funktionell nicht ersetzen kann. Eine Voraussetzung für diese Schlussfolgerung ist allerdings, dass das Protein HP1021-O stabil exprimiert wird. Aus diesem Grund sollte durch eine Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen HP1021-Antikörper in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O auf Proteinebene die Expression der Output-Domäne von HP1021 überprüft werden.

### 6.2.3 Analyse der Expression von HP1021-O in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O mittels Western-Blot-Analyse

Für die Western-Blot-Analyse (siehe Abb. 60) mit einem HP1021-spezifischen polyklonalen Antikörper wurden von den *H. pylori*-Stämmen G27 (Kontrolle) und G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O die

Gesamtzellproteine isoliert und jeweils 20 µg der Proteinlysate sowie jeweils 0,3 µg der Proteine HP1021 und HP1021-O auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O die Output-Domäne von HP1021 nicht exprimiert wird. Es konnte keine Bande detektiert werden, die dem theoretischen Laufverhalten von HP1021-O von 21,7 kDa entspricht (Spur 2/3). Die Hybridisierungen (schwarze Pfeile links), die man auf diesem Autoradiogramm oberhalb und unterhalb der Bande, welche dem Protein HP1021 entspricht, erkennen kann sind charakteristisch für unspezifische Banden.

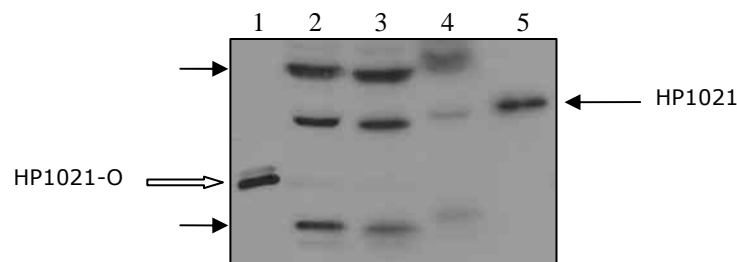


Abb. 60: Analyse der Expression der Output-Domäne von HP1021 in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O durch ein Western-Blot Experiment. Jeweils 20 µg Proteinlysate aus verschiedenen *H. pylori*-Stämmen sowie jeweils 0,3 µg der gereinigten Proteine HP1021-O und HP1021 wurden auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalen HP1021-Antikörper inkubiert, als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-,anti-rabbit<sup>®</sup>-Antikörper verwendet. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für ca. 20 sec. Der schwarze Pfeil auf der rechten Seite des Autoradiogramms markiert die Bande, die dem Protein HP1021 (35 kDa) entspricht, der offene Pfeil markiert die Bande der Output-Domäne von HP1021 (21,7 kDa). Die schwarzen Pfeile auf der rechten Seite des Autoradiogramms markieren unspezifische Hybridisierungen.

Spur 1: Protein HP1021-O

Spur 2/3: Proteinlysate von *H. pylori* G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O (verschiedene Klone)

Spur 4: Proteinlysate von *H. pylori* G27

Spur 5: Protein HP1021

Dieses Ergebnis erklärt, warum in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-1021-O eine Deletion von *hp1021* nicht möglich war. Allerdings kann weiterhin keine Aussage getroffen werden, ob die Output-Domäne von HP1021 die Funktion von HP1021 übernehmen kann.

### 6.3 Komplementationsexperimente mit der Outputdomäne von ArsR (HP0166)

#### 6.3.1 Konstruktion des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O

Der Promotor von *arsR*, P<sub>hp0166</sub> (Dietz *et al.*, 2002), wurde von chromosomaler *H. pylori* G27 DNA mit dem Oligonukleotidpaar P0166-5/P0166-3 amplifiziert, das erhaltene 159 bp Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xba*I geschnitten und in den entsprechend gespaltenen Vektor pSL1180 ligiert. Mit dem Oligonukleotidpaar HP0166-O5/HP0166-32 wurde das 325 bp Fragment, welches die Gensequenz der Output-Domäne von HP0166 umspannt, von chromosomaler *H. pylori* G27 DNA amplifiziert. Analog zu HP1021 und HP1043 wurde für die Amplifikation des Genabschnittes der Output-Domäne ein 5'-Oligonukleotid verwendet, über das neben der *Xba*I-Schnittstelle eine RBS und ein Translationsstartkodon eingeführt wurden. Das Fragment wurde mit den Restriktions-

endonukleasen *XbaI* und *PstI* gespalten und in den Vektor pSL-P<sub>hp0166</sub> ligiert. Anschließend wurde aus dem Plasmid pSL-P<sub>hp0166</sub>-0166-O mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *PstI* die P<sub>hp0166</sub>/0166-O-Fusion ausgeschnitten und in den Vektor pSL-cagACD kloniert. Um eine spätere Selektion zu ermöglichen, wurde über die *PstI*-Schnittstelle anschließend eine Cm<sup>r</sup>-Kassette inseriert, was das Plasmid pSL-cagACD-P<sub>hp0166</sub>-0166-O-Cm (siehe Abb. 61) lieferte.

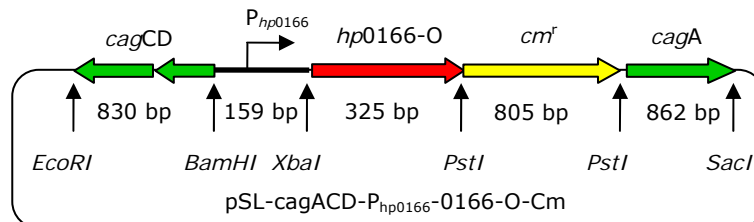


Abb. 61: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-P<sub>hp0166</sub>-0166-O-Cm zur Integration der Output-Domäne von HP0166 in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die Integration der Fusion P<sub>hp0166</sub>/hp0166-O in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 wurde durch Transformation dieses Stammes mit dem Plasmid pSL-cagACD-P<sub>hp0166</sub>-0166-O-Cm und Selektion der Transformanten auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten erreicht. Mittels PCR-Analysen mit verschiedenen Primerkombinationen (siehe Tab. 30) konnte gezeigt werden, dass die Integration der P<sub>hp0166</sub>/hp0166-O-Fusion in den *cag*-Lokus korrekt verlaufen war (nicht gezeigt). Der resultierende Stamm wurde mit G27-P<sub>hp0166</sub>-0166-O bezeichnet.

Tab. 30: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27-P<sub>hp0166</sub>-0166-O durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination | Fragmentlänge |
|-------------------|---------------|
| 5' cagD/3' cagA   | 2981 bp       |
| 5' cagD/HP0166-32 | 1314 bp       |
| 3' cagA/P0166-5   | 2151 bp       |

### 6.3.2 Inaktivierung des Gens *arsR* (*hp0166*) in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O

Der *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O wurde mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-0166::km2 (siehe E 1.3) transformiert. Hierdurch sollte das *arsR*-(*hp0166*-)Gen am wildtypischen Locus durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert werden. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten, wobei auch nach mehreren Transformationsrunden keine Klone isoliert werden konnten.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass entweder die im *cag*-Lokus kodierte Output-Domäne von ArsR (HP0166) das Protein ArsR (HP0166) funktionell nicht ersetzen kann, oder dass das Protein HP0166-O nicht stabil exprimiert wird. Um dies zu überprüfen wurde eine Western-Blot-Analyse zur Kontrolle der Expression von HP0166-O mit einem polyklonalen Antikörper gegen ArsR (HP0166) durchgeführt.

### 6.3.3 Analyse der Expression von ArsR-O (HP0166-O) in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O mittels Western-Blot-Analyse

In der Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen Antikörper gegen ArsR (HP0166) wurden jeweils 20 µg der Proteinlysate der *H. pylori*-Stämme G27 (Kontrolle) und G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O sowie 0,3 bzw. 0,6 µg des gereinigten Proteins ArsR (HP0166) auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet.

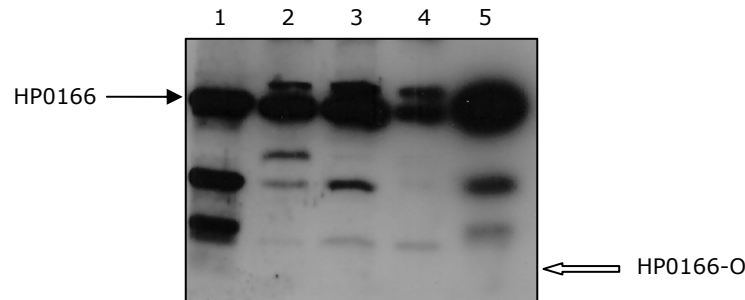


Abb. 62: Analyse der Expression der Output-Domäne von ArsR (HP0166) in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O durch ein Western-Blot Experiment. Jeweils 20 µg Proteinlysat aus verschiedenen *H. pylori*-Stämmen sowie verschiedene Proteinmengen von ArsR (His<sub>6</sub>-0166) wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen ArsR (HP0166) inkubiert; als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-„anti-rabbit“-Antikörper verwendet. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für ca. 20 sec. Der schwarze Pfeil markiert die Bande, die dem Protein ArsR (25,2 kDa) entspricht, der offene Pfeil markiert die theoretische Position der Bande der Output-Domäne von ArsR (11,9 kDa).

Spur 1: Protein HP0166; 0,3 µg

Spur 2: Proteinlysat von *H. pylori* G27

Spur 3: Proteinlysat von *H. pylori* G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O (Aufreinigung nach D 4.2.1)

Spur 4: Proteinlysat von *H. pylori* G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O (Aufreinigung nach D 4.2.2)

Spur 5: Protein HP0166; 0,6 µg

Durch Western-Blot Analyse konnte in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O die Output-Domäne von ArsR (HP0166) nicht nachgewiesen werden. Es konnte keine Bande detektiert werden, die dem theoretischen Laufverhalten von HP0166-O (11,9 kDa) entspricht. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Output-Domäne von ArsR (HP0166) in *H. pylori* G27/P<sub>hp0166</sub>-0166-O nicht stabil exprimiert wurde. Folglich kann anhand dieser Versuche keine Aussage darüber getroffen werden, ob die isolierte Output-Domäne HP0166-O den Response-Regulator ArsR (HP0166) funktionell ersetzen kann.

## 7. Versuche zur Komplementation von HP1043, HP1021 und ArsR durch die orthologen Response-Regulatoren aus *C. jejuni* und *W. succinogenes*

In den zu *H. pylori* nah verwandten Bakteriengattungen *C. jejuni* und *W. succinogenes* findet man Orthologe der Response-Regulatoren HP1043, HP1021 und ArsR (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die orthologen Proteine aus *C. jejuni* bzw. *W. succinogenes* die jeweiligen Response-Regulatoren in *H. pylori* funktionell ersetzen können. Hierzu wurde versucht *H. pylori*-Stämme zu konstruieren, die jeweils eines der orthologen Response-Regulatorgene im *cag*-Lokus tragen, um anschließend das *H. pylori*-spezifische orthologe Response-Regulatorgen in diesen *H. pylori*-Stämmen zu deletieren.



## 7.1 Komplementationsexperimente mit den zu HP1043 orthologen Response-Regulatoren CJ0355 und WS0306

Die Orthologe von HP1043 aus *C. jejuni*, CJ0355, und aus *W. succinogenes*, WS0306, (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997) zeigen besonders in der Sequenz der Output-Domäne ausgeprägte Homologien zu HP1043 (siehe Abb. 63).

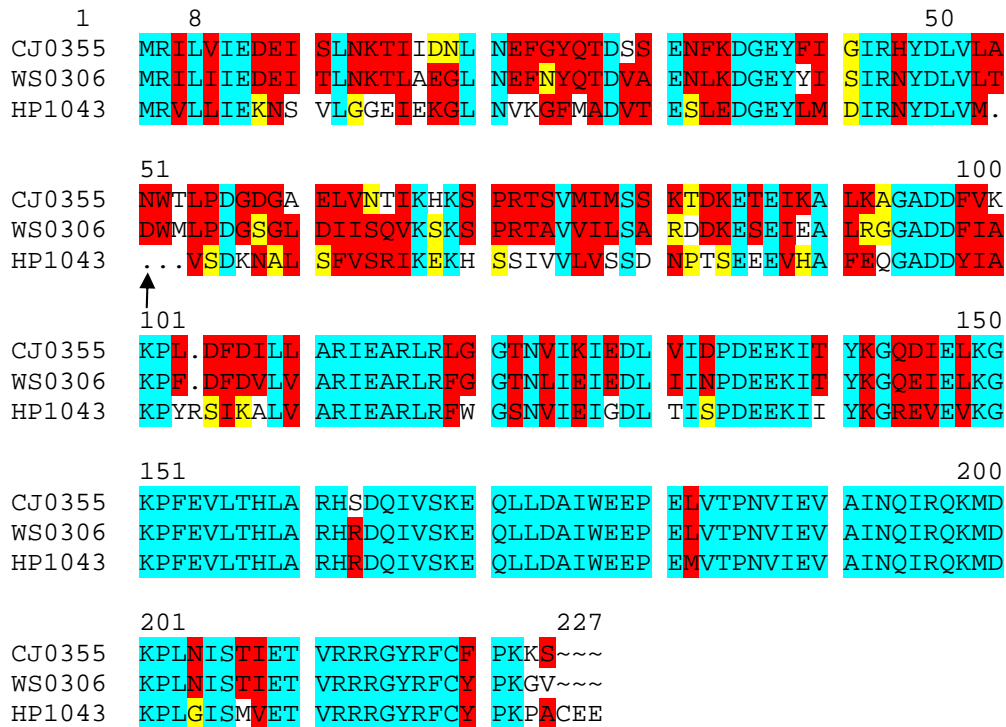


Abb. 63: Alignment der AS-Sequenzen des Response-Regulators HP1043 und der orthologen Proteine aus *C. jejuni*, CJ0355, und *W. succinogenes*, WS0306. Das Alignment wurde mit dem HUSAR-Programm (<http://www.genome.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/index.shtml>) des „Bicomputing Service“ von DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) erstellt. Zur Optimierung wurden Lücken in den AS-Sequenzen eingeführt, die durch Punkte dargestellt sind. Der Grad der Ähnlichkeit zwischen den drei Orthologen ist durch unterschiedliche Farbgebung hervorgehoben:

**Blau:** alle AS einer Spalte sind identisch.

**Rot:** mehr als die Hälfte der AS einer Spalte sind identisch oder weisen eine hohe Ähnlichkeit auf.

**Gelb:** mehr als die Hälfte der AS einer Spalte weisen eine schwache Ähnlichkeit auf.

Unter ähnlichen AS versteht man in dieser Analyse I, L, M und V; A, S, G, P und T; H, K und R; D, E, N und Q; F, W und Y. Der schwarze Pfeil markiert die Position der potentiellen Phosphorylierungsstelle.

In *silico*-Analysen mit dem BLAST-Programm von NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ergaben, dass die Sequenzen von HP1043 und CJ0355 zu 59 % identisch sind und eine 72 %ige Ähnlichkeit aufweisen, während die Sequenzen von HP1043 und WS0306 zu 64 % identisch sind und die Ähnlichkeit bei 76 % liegt.

Interessanterweise findet man in CJ0355 an der Position der potentiellen Phosphorylierungsstelle (Position 51) einen Asparaginrest, also einen nicht-phosphorylierbaren Aminosäurerest. In WS0306 hingegen entspricht die Aminosäuresequenz in diesem Bereich der Konsensus-Sequenz, d.h. an der Position der potentiellen Phosphorylierungsstelle von WS0306 befindet sich ein Aspartatrest. Die Receiver-Domänen der Proteine CJ0355 und WS0306 weisen nicht dieselben unüblichen Abweichungen von der

Konsensus-Sequenz auf, die in HP1043 auftreten (vgl. Abb. 63). In beiden Proteinen (CJ0355 und WS0306) befindet sich an der Position 8 ein Aspartatrest.

### 7.1.1 Konstruktion der *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 und G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306

Die Gene *cj0355* und *ws0306* sollten zunächst mit dem Promotor von *hp1043* fusioniert werden, um die Transkription der beiden Gene in *H. pylori* G27 sicherzustellen.

Hierzu wurde mit den Oligonukleotiden Cj0355-5/Cj0355-3 ein 698 bp Fragment, das den ORF *cj0355* umfasst, von chromosomaler DNA aus *C. jejuni* 4344 amplifiziert. Gleichermaßen wurde von chromosomaler DNA aus *W. succinogenes* 1740 mittels der Oligonukleotide WS0306-3/WS0306-5 ein 690 bp Fragment amplifiziert, welches den ORF *ws0306* enthält. Um das entsprechende Gen mit dem *H. pylori*-spezifischen Promotor  $P_{hp1043}$  zu fusionieren, wurden die resultierenden Fragmente mit *KpnI* und *PstI* geschnitten und anschließend in pSL- $P_{1043}$  (siehe E 6.1.1) kloniert. Aus den Plasmiden pSL- $P_{hp1043}$ -cj0355 und pSL- $P_{hp1043}$ -ws0306 wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *PstI* die Promotor/Gen-Fusionen  $P_{hp1043}/cj0355$  bzw.  $P_{hp1043}/ws0306$  ausgeschnitten und anschließend in den Vektor pSL-cagACD kloniert. Zudem wurde eine  $Cm^r$ -Kassette über die *PstI*-Schnittstellen in die Plasmide inseriert, um die Selektion nach der homologen Rekombination zu ermöglichen.

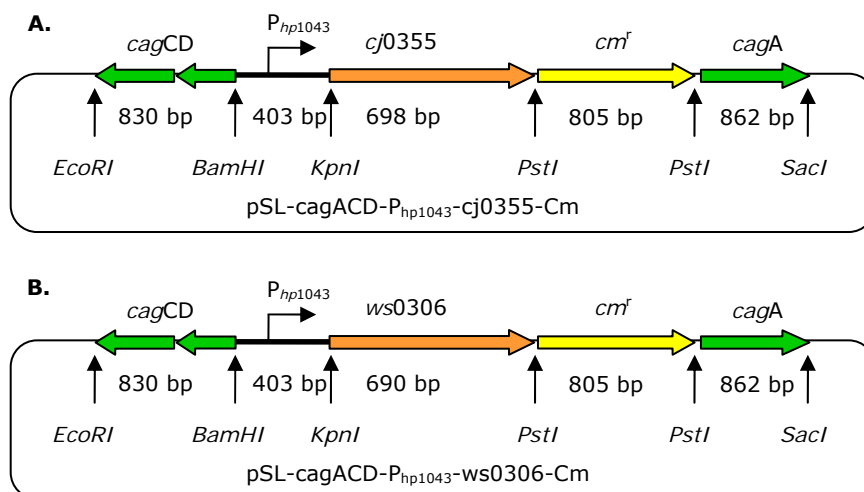


Abb. 64: Schematische Darstellung der Plasmide pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -cj0355-Cm (A.) bzw. pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -cj0355-Cm (B.) zur Integration von  $P_{hp1043}/cj0355$  bzw.  $P_{hp1043}/ws0306$  in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die resultierenden Plasmide pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -cj0355-Cm und pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -ws0306-Cm (siehe Abb. 64) wurden jeweils in den *H. pylori*-Stamm G27 transformiert. Die chromosomale DNA der jeweiligen Transformanten wurde durch PCR-Analysen mit unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe Tab. 31) charakterisiert und die Ergebnisse der PCR-Analysen (nicht gezeigt) bestätigten, dass die Fusionen  $P_{hp1043}/cj0355$  bzw.

$P_{hp1043}/ws0306$  in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert wurden, woraufhin die Stämme als G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 und G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 benannt wurden.

Tab. 31: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 und G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| <i>H. pylori</i> -Stamm   | Primerkombination | Fragmentlänge |
|---------------------------|-------------------|---------------|
| G27/ $P_{hp1043}$ -Cj0355 | 5' cagD/3' cagA   | 3598 bp       |
|                           | 5' cagD/Cj0355-3  | 1931 bp       |
|                           | 3' cagA/5'-HP1043 | 2768 bp       |
| G27/ $P_{hp1043}$ -WS0306 | 5' cagD/3' cagA   | 3590 bp       |
|                           | 5' cagD/WS0306-3  | 1923 bp       |
|                           | 3' cagA/5'-HP1043 | 2760 bp       |

### 7.1.2 Deletion des Gens *hp1043* in den *H. pylori*-Stämmen G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 und G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306

Die *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 und G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 wurden mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-1043::km2 (siehe E 1.2) transformiert, um das wildtypische Gen *hp1043* zu deletieren.

Im Fall des *H. pylori*-Stammes G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 konnte das Gen *hp1043* auch in mehrmaligen unabhängigen Transformationsexperimenten mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-1043::km2 nicht deletiert werden. Nach Transformation von *H. pylori* G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 mit pSL-1043::km2 konnten hingegen Klone isoliert werden. Diese wurden in einer PCR-Analyse charakterisiert (siehe Tab. 32), wobei gezeigt wurde, dass die Promotor/Gen-Fusion  $P_{hp1043}/cj0355$  im *cag*-Lokus vorlag und die Deletion von *hp1043* korrekt erfolgt war (nicht gezeigt). Dieser Stamm wurde daraufhin als G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 $\Delta$  bezeichnet.

Tab. 32: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355 $\Delta$  durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination | Fragmentlänge |
|-------------------|---------------|
| 5' cagD/3' cagA   | 3598 bp       |
| 5' cagD/Cj0355-3  | 1931 bp       |
| 3' cagA/5'-HP1043 | 2768 bp       |
| HP1044/kan2       | 2009 bp       |
| HP1042/HPkan3     | 2742 bp       |

Somit konnte gezeigt werden, dass der orthologe Response-Regulator CJ0355 den Response-Regulator HP1043 in *H. pylori* funktionell ersetzen kann.

Im Gegensatz dazu scheint das orthologe Protein WS0306 dazu nicht in der Lage zu sein, vorausgesetzt, das entsprechende Gen wird transkribiert und das Protein wird stabil in *H. pylori* exprimiert. Aus diesem Grund sollte anhand eines „Primer-Extension“-Experimentes überprüft werden, ob unter der Kontrolle von  $P_{hp1043}$  das Gen *ws0306* im *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 transkribiert wird. Zusätzlich wurde auch die Transkription von *cj0355* unter Kontrolle des Promotors  $P_{hp1043}$  im *H. pylori*-Stamm G27- $P_{hp1043}$ -cj0355 untersucht.

### 7.1.3 Analyse der Transkription von *ws0306* und *cj0355* ausgehend von $P_{hp1043}$ in den *H. pylori*-Stämmen G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 und G27/ $P_{hp1043}$ -cj0355

Mit jeweils 30  $\mu$ g RNA aus den *H. pylori*-Stämmen G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 bzw. G27- $P_{hp1043}$ -cj0355 sowie den Primern PE-WS0306 bzw. PE-Cj0355 zur cDNA-Synthese wurden

„Primer-Extension“-Experimente durchgeführt (siehe Abb. 65 bzw. Abb. 66). Für die Sequenzierungsreaktion wurden die Plasmide pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -ws0306-Cm bzw. pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -cj0355-Cm als Matrize verwendet.

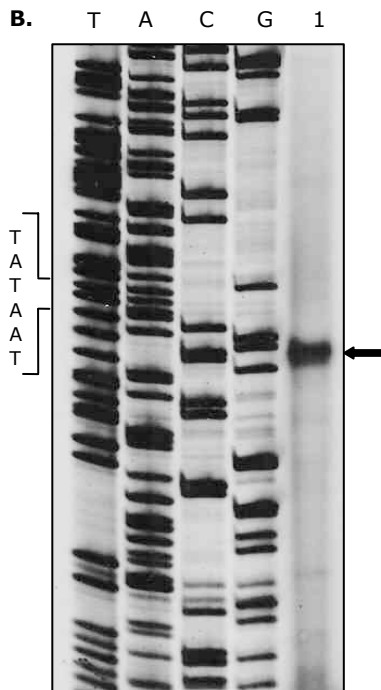
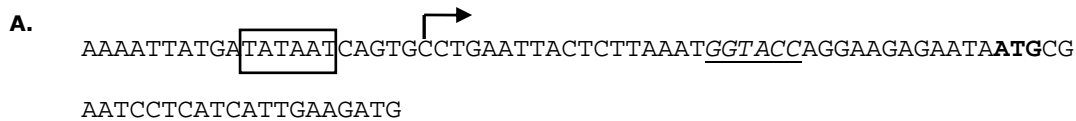


Abb. 65: **A.** Nukleotidsequenz der Promotorregion der Promotor/Gen-Fusion  $P_{hp1043}/ws0306$ . Die -10-Box ist durch einen Kasten gekennzeichnet, der Transkriptionsstart durch einen Pfeil und das Startkodon durch Fettdruck. Die zu Klonierungszwecken eingeführte *KpnI*-Restriktionsschnittstelle ist kursiv gedruckt und unterstrichen. **B.** „Primer-Extension“-Analyse der Transkription von *ws0306* unter Kontrolle des  $hp1043$ -Promotors. Der radioaktiv markierte Primer PE-WS0306 sowie 30  $\mu$ g RNA, die aus dem Stamm G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306 isoliert wurde, wurden in der „Primer-Extension“-Analyse eingesetzt. Die Sequenzierung (Spur T, A, C, G) wurde durch Hybridisierung des Primers PE-WS0306 mit dem Plasmid pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -ws0306-Cm durchgeführt. Der Transkriptionsstartpunkt ausgehend von  $P_{hp1043}$  ist durch einen schwarzen Pfeil dargestellt. Zusätzlich ist die Sequenz der -10-Box von  $P_{hp1043}$  neben dem Autoradiogramm aufgezeigt.

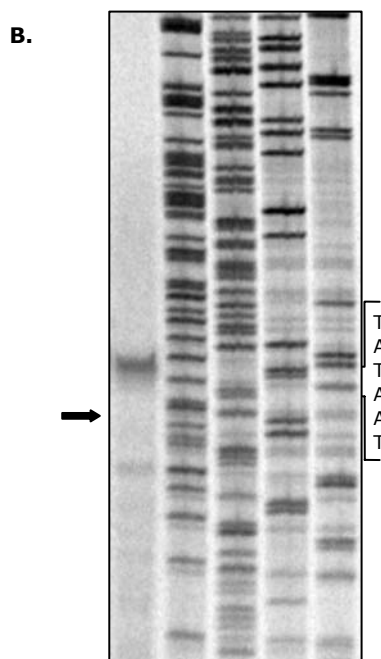
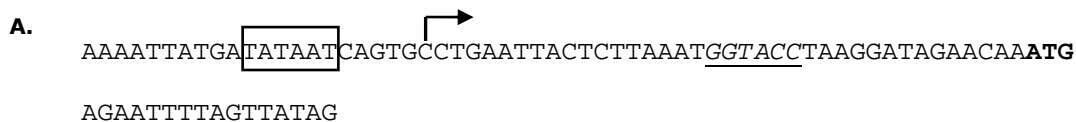


Abb. 66: **A.** Nukleotidsequenz der Promotorregion der Promotor/Gen-Fusion  $P_{hp1043}/cj0355$ . Die -10-Box ist durch einen Kasten gekennzeichnet, der Transkriptionsstart durch einen Pfeil und das Startkodon durch Fettdruck. Die zu Klonierungszwecken eingeführte *KpnI*-Restriktionsschnittstelle ist kursiv gedruckt und unterstrichen. **B.** Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes von *cj0355* unter Kontrolle des  $hp1043$ -Promotors durch „Primer-Extension“-Analyse. Der radioaktiv markierte Primer PE-Cj0355 sowie 30  $\mu$ g RNA, die aus dem Stamm G27- $P_{hp1043}$ -cj0355 isoliert wurde, wurden in der „Primer-Extension“-Analyse eingesetzt. Die Sequenzierung (Spur T, A, C, G) wurde durch Hybridisierung des Primers PE-CJ0355 mit dem Plasmid pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -cj0355-Cm durchgeführt. Der Transkriptionsstartpunkt ausgehend von  $P_{hp1043}$  ist durch einen schwarzen Pfeil dargestellt. Zusätzlich ist die Sequenz der -10-Box von  $P_{hp1043}$  neben dem Autoradiogramm aufgezeigt.

Wie man Abb. 65 und Abb. 66 entnehmen kann wird sowohl das Gen *ws0306* ausgehend vom Promotor  $P_{hp1043}$  in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{hp1043}$ -*ws0306*, als auch das Gen *cj0355* unter der Kontrolle von  $P_{hp1043}$  in dem *H. pylori*-Stamm G27- $P_{hp1043}$ -*cj0355* transkribiert.

Die detektierten Transkriptionsstartpunkte stimmen mit dem zuvor im Wildtypstamm G27 für *hp1043* beschriebenen Transkriptionsstartpunkt überein.

Da das Gen *ws0306* im *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{hp1043}$ -*ws0306* transkribiert wird, eine Deletion von *hp1043* in diesem Stamm aber nicht möglich ist, stellt sich nun die Frage, ob das Protein WS0306 nicht in der Lage ist, HP1043 funktionell zu ersetzen, oder ob das Protein in diesem Stamm nicht exprimiert wird. Um diese Frage zu klären, müsste in einer Western-Blot-Analyse mit dem Stamm G27/ $P_{hp1043}$ -*ws0306* überprüft werden, ob das Protein WS0306 detektiert werden kann. Dieses Experiment konnte trotz einem geeigneten vorhandenen Antikörper nicht durchgeführt werden, da die Proteine HP1043 und WS0306 sich auf einem SDS-Polyacrylamidgel anhand des etwa gleich großen Molekulargewichts (ca. 26 kDa) im Laufverhalten nicht unterscheiden.

## **7.2 Komplementationsexperimente mit den zu HP1021 orthologen Response-Regulatoren CJ1608 und WS1939**

In den *H. pylori* nah verwandten Organismen *C. jejuni* und *W. succinogenes* findet man die Orthologe CJ1608 und WS1939 des Response-Regulators HP1021 (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997). Man kann in der Aminosäuresequenz der Proteine HP1021, CJ1608 und WS1939 vor allem im Bereich des „Helix-Turn-Helix“-Motivs (HTH-Motiv) ausgeprägte Homologien erkennen (siehe Abb. 67).

Die Identität bzw. die Ähnlichkeit zwischen HP1021 und seinen orthologen Proteinen wurde anhand von *in silico*-Analysen mit dem BLAST-Programm von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) bestimmt. Die Analysen ergaben, dass die Proteine HP1021 und CJ1608 zu 33 % identisch sind und eine 57 %ige Ähnlichkeit zwischen ihnen besteht. Die Ähnlichkeit zwischen HP1021 und WS1939 beträgt 63 % und die Proteine sind zu 40 % identisch. Interessanterweise ist in allen drei Proteinen der in der Konsensus-Sequenz hochkonservierte Aspartatrest der potentiellen Phosphorylierungsstelle (Position 47) durch einen Serinrest substituiert.

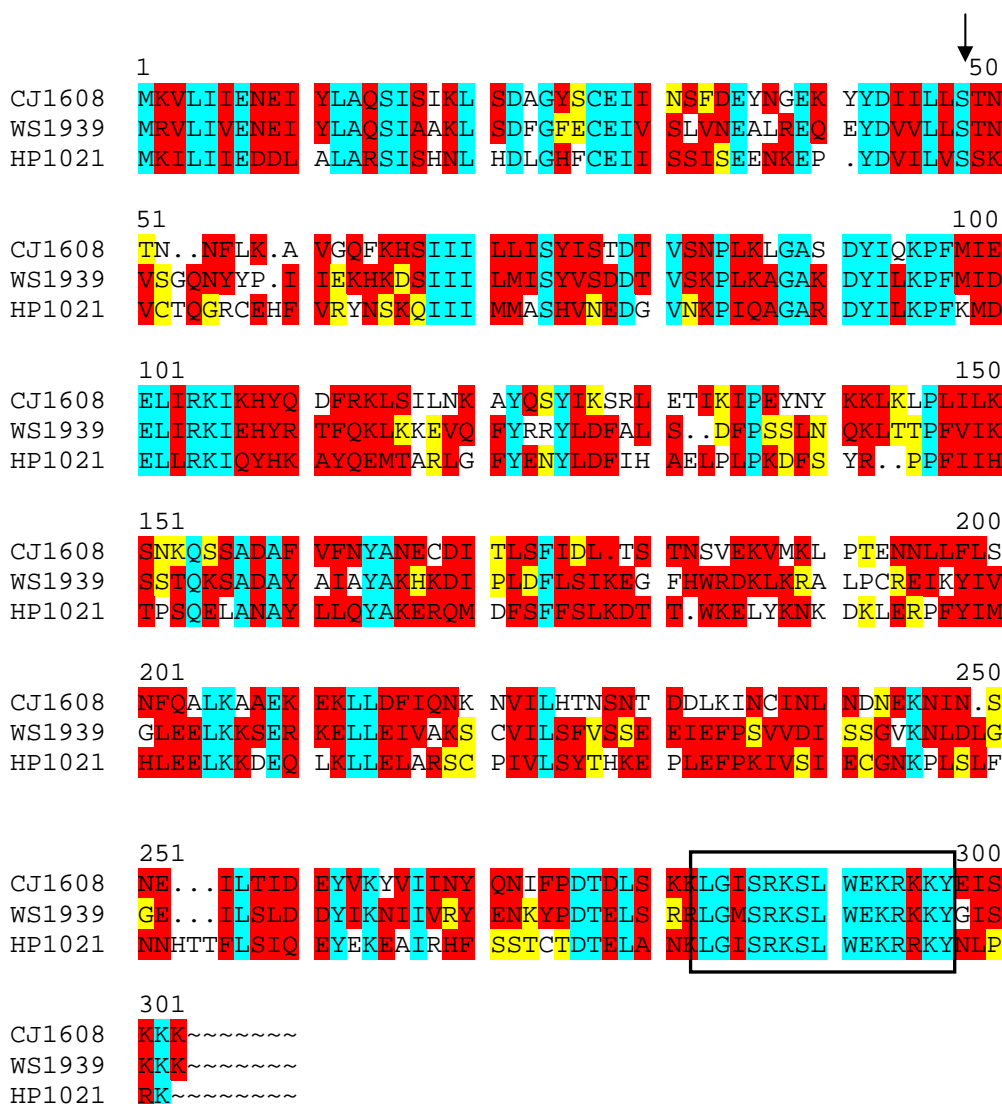


Abb. 67: Alignment der AS-Sequenzen des Response-Regulators HP1021 und der orthologen Proteine aus *C. jejuni*, Cj1608, und *W. succinogenes*, WS1939. Das Alignment wurde mit dem HUSAR-Programm (<http://www.genome.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/index.shtml>) des „Bicomputing Service“ von DKFZ erstellt. Zur Optimierung wurden Lücken in den AS-Sequenzen eingeführt, welche durch Punkte dargestellt sind. Der Grad der Ähnlichkeit zwischen den drei Orthologen ist durch unterschiedliche Farbgebung hervorgehoben:

**Blau:** alle AS einer Spalte sind identisch

**Rot:** mehr als die Hälfte der AS einer Spalte sind identisch oder weisen eine hohe Ähnlichkeit auf

**Gelb:** mehr als die Hälfte der AS einer Spalte weisen eine schwache Ähnlichkeit auf

Unter ähnlichen AS versteht man in dieser Analyse I, L, M und V; A, S, G, P und T; H, K und R; D, E, N und Q; F, W und Y. Der schwarze Pfeil markiert die Position der potentiellen Phosphorylierungsstelle; der schwarze Kasten markiert das HTH-Motiv.

### 7.2.1 Konstruktion der *H. pylori*-Stämme G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 und G27/P<sub>hp1018</sub>-ws1939

Die Gene *cj1608* und *ws1939* wurden mit dem Promotor von *hp1021*, P<sub>hp1018</sub> (siehe E 6.2.1), fusioniert, um die Transkription der beiden Gene in *H. pylori* G27 sicherzustellen.

Das Plasmid pSL-P<sub>hp1018</sub> (siehe E 6.2.1) konnte als Ausgangskonstrukt für die P<sub>hp1018</sub>/*cj1608*-Fusion verwendet werden.

Für die P<sub>hp1018</sub>/*ws1939*-Fusion wurde der Promotor P<sub>hp1018</sub>-Kpn zunächst mit dem Oligonukleotidpaar P1018-5/P1018-3Kpn mit chromosomaler DNA des *H. pylori*-Stammes G27 als Template amplifiziert, das 309 bp Fragment mit den Restriktionsendonukleasen

*Bam*HI/*Kpn*I gespalten und das gespaltene Fragment in den Vektor pSL1180 kloniert. Über das Oligonukleotid P1018-3Kpn wurde am 3'-Ende des Fragments  $P_{hp1018}$  eine *Kpn*I-Schnittstelle anstatt einer *Xba*I-Schnittstelle eingeführt, da das Gen *ws1939* natürlicherweise eine *Xba*I-Schnittstelle besitzt.

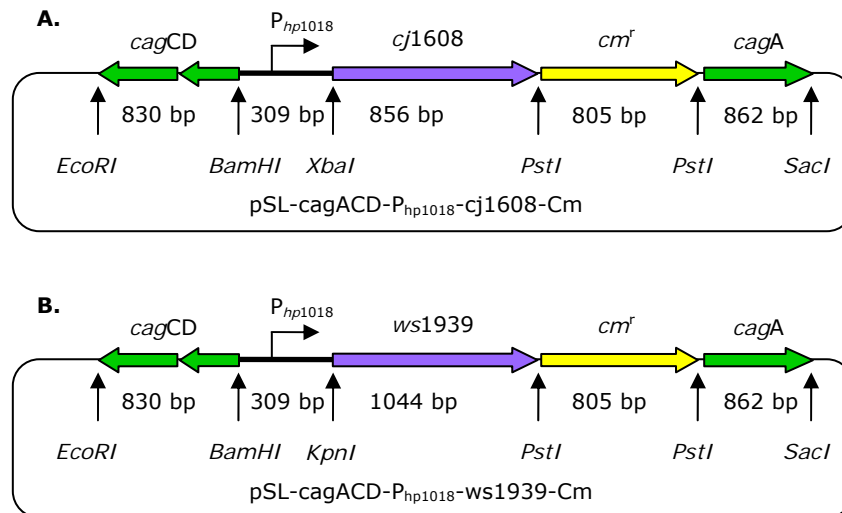


Abb. 68: Schematische Darstellung der Plasmide pSL-cagACD- $P_{hp1018}$ -*cj1608* (A.) bzw. pSL-cagACD- $P_{hp1018}$ -*ws0306* (B.) zur Integration der  $P_{hp1018}$ /*cj1608*- bzw.  $P_{hp1018}$ /*ws1939*-Fusion in das Chromosom von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Die Gene *cj1608* und *ws1939* wurden mit den Oligonukleotidpaaren Cj1608-5/Cj1608-3 bzw. WS1939-5/ WS1939-32 von der chromosomalen DNA des entsprechenden Stammes (*C. jejuni* 4344 bzw. *W. succinogenes* 1740) amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente mit einer Länge von 856 bp bzw. 1044 bp wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I/*Pst*I bzw. *Kpn*I/*Pst*I gespalten und jeweils in den entsprechend geschnittenen Vektor pSL- $P_{hp1018}$  bzw. pSL- $P_{hp1018}$ Kpn kloniert. Die  $P_{hp1018}$ /*cj1608*- bzw.  $P_{hp1018}$ /*ws1939*-Fusion wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Pst*I aus den Plasmiden pSL- $P_{hp1018}$ -*cj1608* bzw. pSL- $P_{hp1018}$ -*ws1939* gespalten und anschließend in den Vektor pSL-cagACD integriert. In die Plasmide pSL-cagACD- $P_{hp1018}$ -*cj1608* bzw. pSL-cagACD- $P_{hp1018}$ -*ws1939* wurde schließlich über die *Pst*I-Schnittstellen eine  $Cm^r$ -Kassette eingebracht, was die Plasmide pSL-cagACD- $P_{hp1018}$ -*cj1608*-Cm und pSL-cagACD- $P_{hp1018}$ -*ws1939*-Cm ergab (siehe Abb. 68).

Diese Plasmide wurden jeweils in *H. pylori* G27 transformiert. Die durch Allelaustausch erfolgte Integration der beiden Gene *cj1608* und *ws1939* in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 wurde über PCR-Kontrollen mit unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe Tab. 33) nachgewiesen (nicht gezeigt).

Tab. 33: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{hp1018}$ -*cj1608* und G27/ $P_{hp1018}$ -*ws1939* durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| <i>H. pylori</i> -Stamm           | Primerkombination              | Fragmentlänge |
|-----------------------------------|--------------------------------|---------------|
| G27/ $P_{hp1018}$ - <i>cj1608</i> | 5' <i>cagD</i> /3' <i>cagA</i> | 3662 bp       |
|                                   | 5' <i>cagD</i> /Cj1608-3       | 1995 bp       |
|                                   | 3' <i>cagA</i> /P1018-5        | 2832 bp       |
| G27/ $P_{hp1018}$ - <i>ws1939</i> | 5' <i>cagD</i> /3' <i>cagA</i> | 1830 bp       |
|                                   | 5' <i>cagD</i> /WS1939-32      | 2183 bp       |
|                                   | 3' <i>cagA</i> /P1018-5        | 3020 bp       |

### 7.2.2 Deletion des Gens *hp1021* in den *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 und G27/P<sub>hp1018</sub>-ws1939

Zur Deletion des Gens *hp1021* in den rekombinanten *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 und G27/P<sub>hp1018</sub>-ws1939 wurden diese jeweils mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-1021::km (siehe E 1.1) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Beide Transformationen führten zu Kolonien, die in Aussehen und Kultivierbarkeit dem bekannten „small colony“-Phänotyp entsprachen. Auch weitere Transformationsexperimente führten in beiden Fällen entweder zu „small colonies“ oder brachten keine Transformanten.

Dieses Ergebnis deutet unter der Prämisse, dass die Proteine CJ1608 und WS1939 in *H. pylori* exprimiert werden, darauf hin, dass die beiden Orthologe den Response-Regulator HP1021 funktionell nicht ersetzen können, da der Phänotyp der erhaltenen Transformanten dem der „knock-out“-Mutanten von *hp1021* entspricht (Beier & Frank, 2000).

Im Folgenden wird beschrieben, wie die Transkription der Gene *cj1608* bzw. *ws1939* unter Kontrolle des P<sub>hp1018</sub>-Promotors in den *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 und G27/P<sub>hp1018</sub>-ws1939 analysiert wurde.

### 7.2.3 Analyse der Transkription von *cj1608* und *ws1939* ausgehend von P<sub>hp1018</sub> in den *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 und G27/P<sub>hp1018</sub>-ws1939

Zunächst wurde eine RT-PCR-Analyse mit RNA aus *H. pylori* G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 durchgeführt, um das Transkript von *cj1608* in diesem Stamm nachzuweisen. Die gereinigte RNA wurde mit dem Oligonukleotid Cj1608-22 zunächst revers transkribiert. Die entstandene cDNA sowie chromosomale DNA (Kontrolle) aus *H. pylori* G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 wurden anschließend jeweils als Template für PCR-Analysen mit dem Oligonukleotidpaar Cj1608-22/Cj1608RT eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass ein DNA-Fragment, abgeleitet aus dem 5'-Bereich des Gens, mit einer Länge von 350 bp entstehen sollte.

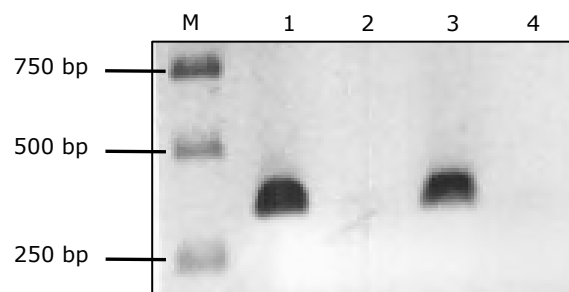


Abb. 69: RT-PCR Analyse zum Nachweis der *cj1608*-Transkription im *H. pylori*-Stamm G27-P<sub>hp1018</sub>-cj1608. Es wurde die cDNA von zwei unabhängigen Klonen des Stammes G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608 eingesetzt, die mit 1 bzw. 2 nummeriert sind. Als Oligonukleotid für die Reverse Transkription wurde Cj1608-22, für die RT-PCR-Ansätze das Oligonukleotidpaar Cj1608-22/Cj1608RT verwendet. Aliquots der PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen.

M: 1 kb DNA-Leiter von MBI

Spur 1: RT-PCR mit chromosomale DNA von G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608-1

Spur 2: RT-PCR mit cDNA von G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608-1

Spur 3: RT-PCR mit chromosomale DNA von G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608-2

Spur 4: RT-PCR mit cDNA von G27/P<sub>hp1018</sub>-cj1608-2



Wie aus Abb. 69 ersichtlich ist, wurde mit cDNA als Template (Spur 2 und 4) kein Fragment amplifiziert, während die Kontroll-PCR mit chromosomaler DNA (Spur 1 und 3) das gewünschte 350 bp lange Fragment zeigte.

Eine Variation der verwendeten Oligonukleotide (Cj1608-RT/Cj1608RT3 und Cj1608RT/Cj1608-22) sowie die wiederholte Präparation von RNA führten ebenfalls nicht zum Nachweis eines *cj1608*-spezifischen Transkripts (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp1018</sub>-*cj1608* das Gen *cj1608* nicht transkribiert wird. Um diese Annahme zu erhärten wurde zusätzlich eine „Primer-Extension“-Analyse durchgeführt.

Da die Transkription von *ws1939* unter Kontrolle des P<sub>hp1018</sub>-Promotors ebenfalls untersucht werden sollte, wurden „Primer-Extension“-Analysen mit 30 µg RNA der *H. pylori*-Stämme G27/P<sub>hp1018</sub>-*cj1608* und G27/P<sub>hp1018</sub>-*ws1939* durchgeführt, wobei die Oligonukleotide PE-Cj1608 bzw. PE-WS1939 als Primer zur cDNA-Synthese von *cj1608* und *ws1939* dienten. In den Sequenzierungsreaktionen wurden die Plasmide pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-*cj1608*-Cm bzw. pSL-cagACD-P<sub>hp1018</sub>-*ws1939*-Cm eingesetzt.

In den „Primer-Extension“-Analysen mit den Stämmen G27/P<sub>hp1018</sub>-*cj1608* und G27/P<sub>hp1018</sub>-*ws1939* konnte, auch nach erneuter Präparation von RNA sowie nach Variation der Primer (PE2-Cj1608 und PE2-WS1939) zur cDNA-Synthese, kein *cj1608*- bzw. *ws1939*-spezifisches Transkript nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in den *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>hp1018</sub>-*cj1608* und G27/P<sub>hp1018</sub>-*ws1939* die Gene *cj1608* bzw. *ws1939* nicht transkribiert werden. Es sind daher keine eindeutigen Rückschlüsse möglich, inwieweit CJ1608 bzw. WS1939 die Funktion des Response-Regulators HP1021 in *H. pylori* übernehmen können.

### **7.3 Komplementationsexperimente mit dem zu ArsR (HP0166) orthologen Response-Regulator WS1817**

Die Orthologe von ArsR (HP0166) aus den *H. pylori* nah verwandten Organismen *C. jejuni* und *W. succinogenes* sind die Response-Regulatoren CJ1261 und WS1817 (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997). In Abb. 70 kann man die ausgeprägten Homologien zwischen ArsR (HP0166), CJ1261 und WS1817 erkennen.

Eine *in silico*-Analyse von ArsR (HP0166) und seinen orthologen Proteinen mit dem BLAST-Programm von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ergab eine 82 %ige Ähnlichkeit zwischen ArsS (HP0166) und WS1817 und zeigte, dass die beiden Proteine zu 66 % identisch sind. Die Proteine ArsS (HP0166) und CJ1261 sind zu 51 % identisch und ihre Ähnlichkeit beträgt 71 %.



Abb. 70: Alignment der AS-Sequenzen des Response-Regulators ArsR (HP0166) und der orthologen Proteine aus *W. succinogenes* (WS1817) und *C. jejuni* (CJ1261). Das Alignment wurde mit dem Husar-Programm (<http://www.genome.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/index.shtml>) des „Bicomputing Service“ von DKFZ erstellt. Zur Optimierung wurden Lücken in den AS-Sequenzen eingeführt, welche durch Punkte dargestellt sind. Der Grad der Ähnlichkeit zwischen den Orthologen ist durch unterschiedliche Farbgebung hervorgehoben:

**Blau:** alle AS einer Spalte sind identisch

**Rot:** mehr als die Hälfte der AS einer Spalte sind identisch oder weisen eine hohe Ähnlichkeit auf

**Gelb:** mehr als die Hälfte der AS einer Spalte weisen eine schwache Ähnlichkeit auf

Unter ähnlichen AS versteht man in dieser Analyse I, L, M und V; A, S, G, P und T; K und R; D, E, N und Q; W und Y.

Es wurde versucht einen *H. pylori*-Stamm zu konstruieren, welcher das Gen *ws1817* im *cag*-Lokus trägt, um durch anschließende Inaktivierung von *arsR* (*hp0166*) zu untersuchen, ob das orthologe Protein WS1817 den Response-Regulator ArsR (HP0166) funktionell ersetzen kann.

### 7.3.1 Konstruktion von *H. pylori* G27/ $P_{hp0166}$ -*ws1817*

Das Gen *ws1817* sollte mit dem Promotor von *arsR* (*hp0166*) fusioniert werden, um die Transkription des Gens in *H. pylori* G27 sicherzustellen. Das Gen *ws1817* wurde mit den Oligonukleotiden WS1817-52 und WS1817-32 von chromosomaler DNA des Stammes *W. succinogenes* 1740 amplifiziert und das 752 bp Fragment nach Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Pst*I in den Vektor pSL- $P_{hp0166}$  (siehe E 6.3.1) kloniert. Die  $P_{hp0166}$ /*ws1817*-Fusion wurde mit *Bam*HI und *Pst*I aus dem Plasmid pSL- $P_{hp0166}$ -*ws1817* ausgeschnitten und in den Vektor pSL-*cag*ACD ligiert. Nach Klonierung einer Cm<sup>r</sup>-Kassette über die *Pst*I-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pSL-*cag*ACD- $P_{hp0166}$ -*ws1817* wurde das Plasmid pSL-*cag*ACD- $P_{hp0166}$ -*ws1817*-Cm generiert (siehe Abb. 71).

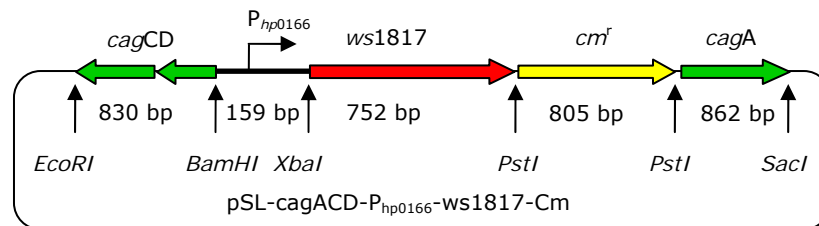


Abb. 71: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD-P<sub>hp0166</sub>-ws1817-Cm zur Integration der P<sub>hp0166</sub>/ws1817-Fusion in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Der *H. pylori* Stamm G27 wurde mit dem Plasmid pSL-cagACD-P<sub>hp0166</sub>-ws1817-Cm transformiert, wobei die Selektion auf Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten stattfand, und die erhaltenen Transformanten wurden mit Hilfe von PCR-Analysen charakterisiert (siehe Tab. 34). Die Charakterisierung ergab, dass die Integration von *ws1817* in den *cag*-Lokus korrekt stattgefunden hatte. Der konstruierte Stamm wurde daher als G27/P<sub>hp0166</sub>-ws1817 bezeichnet.

Tab. 34: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>hp0166</sub>-ws1817 durch PCR-Analyse sowie der erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination              | Fragmentlänge |
|--------------------------------|---------------|
| 5' <i>cagD</i> /3' <i>cagA</i> | 3408 bp       |
| 5' <i>cagD</i> /WS1817-32      | 1741 bp       |
| 3' <i>cagA</i> /P0166-5        | 2578 bp       |

### 7.3.2 Inaktivierung des Gens *arsR* (*hp0166*) in *H. pylori* G27/P<sub>hp0166</sub>-ws1817

Zur Inaktivierung des Gens *arsR* (*hp0166*) in *H. pylori* G27/P<sub>hp0166</sub>-ws1817 wurde dieser Stamm mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-0166::km2 (siehe E 1.3) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. In mehreren unabhängigen Transformations-Experimenten konnten keine Transformanten isoliert werden.

Aufgrund dieses Ergebnisses stellte sich die Frage, ob der Response-Regulator WS1817 das orthologe Protein ArsR (HP0166) in *H. pylori* funktionell nicht ersetzen kann, oder ob dieses Protein in dem Stamm G27/P<sub>hp0166</sub>-ws1817 nicht exprimiert wird. Um diese Fragestellung zu klären, sollte in einem „Primer-Extension“-Experiment zunächst die Transkription von *ws1817* unter Kontrolle von P<sub>hp0166</sub> in diesem Stamm überprüft werden.

### 7.3.3 Analyse der Transkription von *ws1817* ausgehend von P<sub>hp0166</sub> in dem *H. pylori*-Stamm G27-P<sub>hp0166</sub>-ws1817

Mit 30 µg RNA aus dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>hp0166</sub>-ws1817 wurde ein „Primer-Extension“-Experiment durchgeführt. Als Primer zur Synthese der cDNA von *ws0306* wurde das Oligonukleotid PE-WS1817 verwendet und für die Sequenzierungsreaktion wurde das Plasmid pSL-cagACD-P<sub>hp0166</sub>-ws1817-Cm als Matrize eingesetzt. Auf dem erhaltenen Autoradiogramm konnte kein Transkript von *ws1817* unter Kontrolle von P<sub>hp0166</sub> detektiert werden (nicht gezeigt). Die Variation des zur cDNA-Synthese eingesetzten Primers (PE2-WS1817) führte ebenfalls zu keinem detektierbaren Transkript.

Diese Ergebnis deutet darauf hin, dass das Unvermögen, *arsR* (*hp0166*) in dem Stamm G27/*P<sub>hp0166</sub>*-ws1817 zu deletieren, sich nicht darauf zurückführen lässt, dass WS1817 die Funktion von ArsR (HP0166) nicht übernehmen kann, sondern dass WS1817 in dem Stamm G27/*P<sub>hp0166</sub>*-ws1817 vermutlich nicht oder zumindest nicht stabil exprimiert wird. Ein eindeutiger Hinweis darauf, ob WS1817 den Response-Regulator ArsR (HP0166) funktionell ersetzen kann, konnte anhand dieser Experimente nicht bekommen werden.

## 8. Inaktivierung der Response-Regulorgene *cj0355* und *cj1608* von *C. jejuni* 4344

Aufgrund der Tatsache, dass der Response-Regulator HP1043 essentiell ist und der Response-Regulator HP1021 eine bedeutende Rolle für das Zellwachstum von *H. pylori* spielt (Beier & Frank, 2000; Schär, 2001), stellte sich die Frage, ob die orthologen Proteine CJ0355 und CJ1608 in *C. jejuni* 4344 ebenfalls entsprechende Funktionen erfüllen. Zur Inaktivierung der zu untersuchenden Gene wurden „knock-out“-Plasmide konstruiert, um über homologe Rekombination eine Kan<sup>r</sup>-Kassette in den jeweiligen ORF von *C. jejuni* 4344 zu inserieren. Sollten diese Insertions-Mutanten lebensfähig sein, kann man durch Transkriptom- oder Proteomanalysen der mutierten *C. jejuni*-Stämme Zielgene der Response-Regulatoren CJ0355 und CJ1608 in *C. jejuni* identifizieren. Durch eine nachfolgende *in silico*-Analyse wäre es dann möglich, orthologe Gene dieser Zielgene in *H. pylori* zu ermitteln, die ihrerseits Zielgene der entsprechenden Response-Regulatoren, HP1021 und HP1043, aus *H. pylori* sein könnten.

### 8.1 Konstruktion der „knock-out“-Plasmide pSL-*cj0355*::kan und pSL-*cj1608*::kan

Die Fragmente *cj0355*-I (390 bp) und *cj0355*-II (274 bp) wurden mit den Oligonukleotidpaaren Cj0355-12/Cj0355-22 bzw. Cj0355-32/Cj0355-3 von chromosomaler DNA des *C. jejuni* Stammes 4344 amplifiziert und schrittweise in den Vektor pSL1180 kloniert.

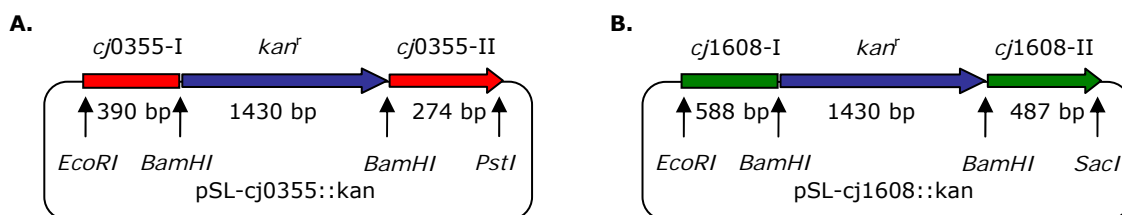


Abb. 72: Schematische Darstellung der „knock-out“ Plasmide zur Inaktivierung von *cj0355* und *cj1608* in *C. jejuni* 4344. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. **A.** Das Plasmid pSL-*cj0355*::kan. Das Fragment *cj0355*-I umfasst die AS 5-127 von CJ0355, das Fragment *cj0355*-II die AS 142-223. **B.** Das Plasmid pSL-*cj1608*::kan. Das Fragment *cj1608*-I umfasst eine kurze Sequenz von *cj1607* und AS 1-142 von CJ1608 während das Fragment *cj1608*-II die AS 189-287 von CJ1608 und eine kurze Sequenz von *cj1609* umfasst.

Auf die gleiche Art und Weise wurden die Fragmente *cj1608*-I (588 bp) und *cj1608*-II (487 bp) mit den Oligonukleotidpaaren Cj1608-12/Cj1608-22 bzw. Cj1608-32/Cj1608-42 amplifiziert und ebenfalls in den Vektor pSL-1180 kloniert. Über die *BamHI*-Schnittstelle

wurde schließlich in die beiden resultierenden Plasmide eine Kan<sup>r</sup>-Kassette inseriert, um die „knock-out“-Plasmide pSL-cj0355::kan und pSL-cj1608::kan (siehe Abb. 72) zu generieren.

## 8.2 Inaktivierung der Gene *cj0355* und *cj1608* in *C. jejuni* 4344

Die Plasmide pSL-cj0355::kan und pSL-cj1608::kan wurden jeweils in den *C. jejuni* Stamm 4344 transformiert und die erhaltenen Kolonien auf Kan-haltigen Columbia-Blutagarplatten selektioniert. Durch die homologe Rekombination der flankierenden Fragmente sollte eine Kan<sup>r</sup>-Kassette in den jeweiligen ORF inseriert werden. In Abb. 73 sind die Rekombinationsereignisse schematisch aufgezeigt.

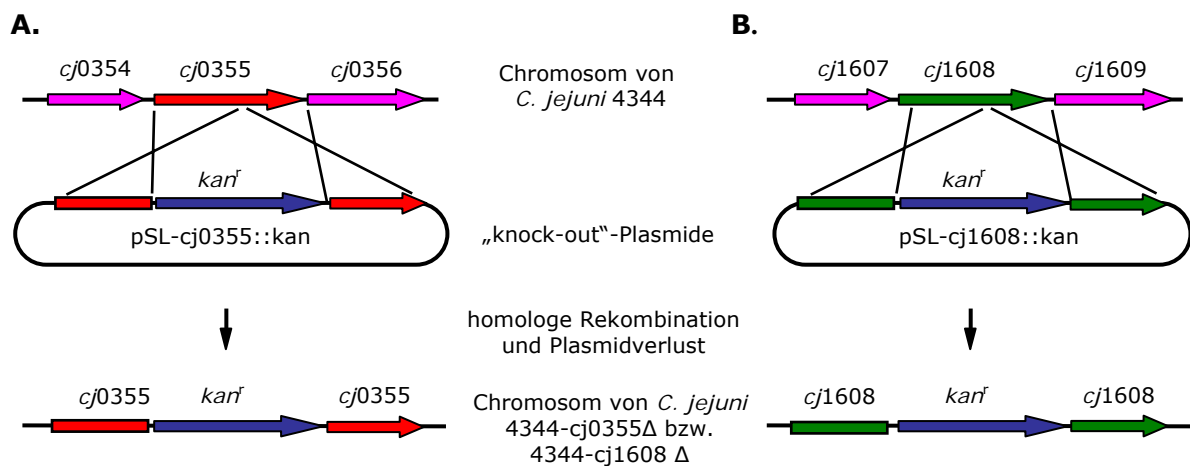


Abb. 73: Schematische Darstellung der homologen Rekombination der Plasmide pSL-cj0355::kan (**A.**) und pSL-cj1608::kan (**B.**) mit dem Chromosom von *C. jejuni* 4344. Die Plasmide wurden in den *C. jejuni* Stamm 4344 transformiert. Nach homologer Rekombination wurde eine Kan<sup>r</sup>-Kassette in den jeweiligen ORF inseriert. Die Rekombinationsorte sind durch überkreuzte Striche gekennzeichnet.

Die Charakterisierung einer repräsentativen Anzahl (10 bzw. 12) der resultierenden Transformanten erfolgte mittels PCR-Analysen. Als Oligonukleotide wurden die Primerpaare Cj1608-12/Cj1608-42 bzw. Cj0355-12/Cj0355-3 eingesetzt (siehe Tab. 35), als Kontrollen wurden zusätzlich PCR-Analysen mit chromosomaler DNA des wildtypischen *C. jejuni* 4344 Stammes und den entsprechenden Oligonukleotidpaaren durchgeführt.

Tab. 35: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *C. jejuni* Stämme 4344-cj1608Δ und 4344-cj0355Δ durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Stamm                         | Primerkombination   | Fragmentlänge |
|-------------------------------|---------------------|---------------|
| <i>C. jejuni</i> 4344         | Cj1608-12/Cj1608-42 | 1180 bp       |
|                               | Cj0355-12/Cj0355-3  | 686 bp        |
| <i>C. jejuni</i> 4344-cj1608Δ | Cj1608-12/Cj1608-42 | 2487 bp       |
| <i>C. jejuni</i> 4344-cj0355Δ | Cj0355-12/Cj0355-3  | 2076 bp       |

Wie man in der Abb. 74 erkennen kann, entsprachen die Längen der von chromosomaler DNA der Transformanten amplifizierten Fragmente denen, die in den PCR-Analysen mit wildtypischer DNA von *C. jejuni* 4344 amplifiziert wurden (1180 bp im Fall von *cj1608* bzw. 686 bp bei *cj0355*). Nach Allelaustauschreaktion und Insertion der Kan<sup>r</sup>-Kassette wären Fragmente mit einer Länge von 2487 bp (*cj1608*) bzw. 2076 bp (*cj0355*) zu erwarten gewesen.

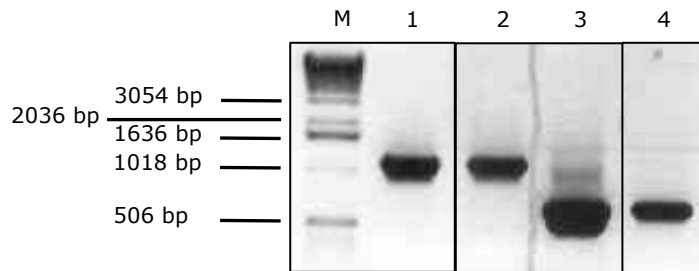


Abb. 74: Charakterisierung der Stämme *C. jejuni* 4344-cj1608 $\Delta$  und 4344-cj0355 $\Delta$  durch PCR-Analyse. Als Template wurde chromosomale DNA eingesetzt. Aliquots der PCR-Analysen wurden auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen.

M: 1 kb DNA-Leiter von Gibco

Spur 1: *C. jejuni* 4344-cj1608 $\Delta$  mit dem Primerpaar Cj1608-12/Cj1608-42

Spur 2: *C. jejuni* 4344 WT mit dem Primerpaar Cj1608-12/Cj1608-42

Spur 3: *C. jejuni* 4344-cj0355 $\Delta$  mit dem Primerpaar Cj0355-12/Cj0355-3

Spur 4: *C. jejuni* 4344 WT mit dem Primerpaar Cj0355-12/Cj0355-3

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Insertion der Kan<sup>r</sup>-Kassette in das jeweilige Gen nicht oder zumindest nicht korrekt stattgefunden hat. Auch nach einer weiteren Transformationsrunde mit beiden Plasmiden konnten keine Transformanten mit einer korrekten Insertion der Kan<sup>r</sup>-Kassette in die Gene *cj0355* bzw. *cj1608* konstruiert werden. Diese Ergebnisse sind möglicherweise Hinweise darauf, dass sich die Gene *cj0355* und *cj1608* in *C. jejuni* 4344 nicht deletieren lassen und somit vermutlich essentiell für das Zellwachstum von *C. jejuni* 4344 sind.

Da die Transformanten auf Kan-haltigen Columbia Blutagarplatten wachsen muss allerdings die Kan<sup>r</sup>-Kassette in das Chromosom von *C. jejuni* 4344 inseriert haben. Es besteht die Möglichkeit, dass durch eine einfache homologe Rekombination jeweils eine intakte und eine durch Insertion der Kan<sup>r</sup>-Kassette inaktivierte Kopie des Response-Regulatorgens im Chromosom vorliegt. Dadurch könnten die Transformanten auf Kan-haltigen Columbia Blutagarplatten wachsen und in einer PCR-Analyse würden man mit den gewählten Primern Fragmente amplifizieren, die in ihrer Länge denen entsprechen, die mit *C. jejuni* WT DNA amplifiziert worden sind, da diese Fragmente aufgrund ihrer kurzen Länge vermutlich bevorzugt amplifiziert werden. Diese Gegebenheit müsste noch genauer untersucht werden.

## 9. Konstruktion von *H. pylori*-Stämme zur Identifizierung möglicher Targetgene der Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 durch Transkriptom- und Proteomanalysen

Zur Identifizierung von Targetgenen der Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 sollten rekombinante *H. pylori*-Stämme erzeugt werden, die eine Überexpression der beiden Response-Regulatoren ermöglichen. Durch globale Transkriptomanalysen mittels „Microarray“-Experimenten oder durch Untersuchungen des Proteoms mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese könnten Veränderungen in der Genexpression der rekombinanten Stämme im Vergleich zum WT-Stamm analysiert werden. Diese

Unterschiede werden durch eine Veränderung der relativen Menge an vorhandenem Response-Regulatorprotein im Vergleich zum WT bewirkt.

Zur Überexpression der Response-Regulatoren wurde das korrespondierende Gen mit dem starken, konstitutiv aktiven Promotor des Gens *cagA*,  $P_{cagA}$ , fusioniert und diese Promotor/Gen-Fusion in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert.

Zusätzlich konnte im Zuge dieser Experimente untersucht werden, ob eine strikte Expressionskontrolle dazu beiträgt, die Aktivität der beiden atypischen Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 zu kontrollieren, da zuvor gezeigt wurde, dass sowohl die Regulation der Aktivität von HP1021 als auch von HP1043 nicht durch die im Fall eines Zwei-Komponentensystems übliche Phosphorylierung der Receiver-Domäne erfolgt (vgl. E 3 und E 5).

## 9.1 Überexpression des Response-Regulatorgens *hp1043*

### 9.1.1 Konstruktion der *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{cagA}$ -1043-Kan und G27/ $P_{cagA}$ -1043-Cm

Mit Hilfe der Plasmide pSL-cagACD- $P_{cagA}$ -1043-Cm und pSL-cagACD- $P_{cagA}$ -1043-Kan (Abb. 75) wurde die Promotor/Gen-Fusion  $P_{cagA}/1043$  in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert.

Zur Konstruktion dieser Plasmide wurde zunächst das 217 bp Fragment  $P_{cagA}$ , welches die Promotorregion von *cagA* umfasst, mit den Primern  $P_{cag3-1}/P_{cag-5'}$  sowie das 696 bp Fragment *hp1043* (ohne Promotorregion) mit den Primern  $1043cag52/3'HP1043$  von chromosomaler DNA des *H. pylori* G27 WT-Stammes amplifiziert. Das Promotorfragment wurde über die mit Hilfe der Oligonukleotide angefügten *Bam*HI- und *Kpn*I-Schnittstellen in den entsprechend gespaltenen Vektor pSL1180 kloniert. Anschließend wurde das *hp1043*-Genfragment mittels der *Kpn*I- und *Pst*I-Schnittstellen in den Vektor pSL- $P_{cagA}$  inseriert und somit mit dem Promotor  $P_{cagA}$  fusioniert. Nach der Isolierung der Promotor/Gen-Fusion  $P_{cagA}/hp1043$  unter Ausnutzung der Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*I aus dem Plasmid pSL- $P_{cagA}$ -1043 erfolgte die Klonierung der Fusion in den entsprechend gespaltenen Vektor pSL-cagACD. Abschließend wurde über die *Pst*I-Schnittstelle noch eine  $Cm^r$ -Kassette bzw. eine  $Kan^r$ -Kassette, die zuvor mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Pst*I aus dem Plasmid pVac:kan ausgeschnitten wurde, inseriert, um die Plasmide pSL-cagACD- $P_{cagA}$ -1043-Cm und pSL-cagACD- $P_{cagA}$ -1043-Kan zu generieren (siehe Abb. 75).

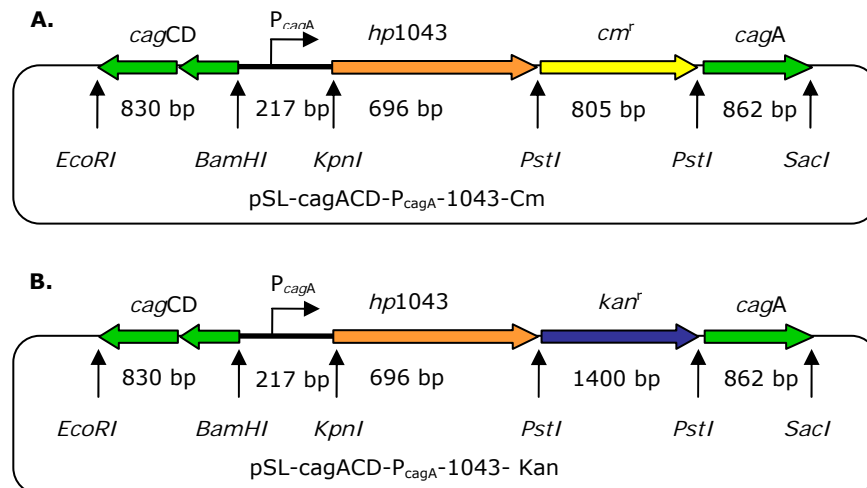


Abb. 75: Schematische Darstellung der Plasmide pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1043-Cm (**A.**) und pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1043-Kan (**B.**) zur Integration der P<sub>cagA</sub>/hp1043-Fusion in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Der *H. pylori*-Stamm G27 wurde jeweils mit den Plasmiden pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1043-Cm und pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1043-Kan transformiert. Die Selektion erfolgte auf Cm- bzw. Kan-haltigen Columbia Blutagarplatten. Durch PCR-Analysen (siehe Tab. 36) wurde die korrekte Integration der P<sub>cagA</sub>/hp1043-Fusionen in den *cag*-Lokus nachgewiesen (nicht gezeigt), woraufhin die resultierenden *H. pylori*-Stämme die Bezeichnung G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Cm und G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Kan erhielten.

Tab. 36: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27-P<sub>cagA</sub>-1043-Kan und G27-P<sub>cagA</sub>-1043-Cm durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| <i>H. pylori</i> -Stamm         | Primerkombination | Fragmentlänge |
|---------------------------------|-------------------|---------------|
| G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Cm  | 5' cagD/3' cagA   | 3410 bp       |
|                                 | 5' cagD/3'-HP1043 | 1743 bp       |
|                                 | 3' cagA/Pcag5'    | 2363 bp       |
| G27/P <sub>cagA</sub> -1043-Kan | 5' cagD/3' cagA   | 4005 bp       |
|                                 | 5' cagD/3'-HP1043 | 1743 bp       |
|                                 | 3' cagA/Pcag5'    | 2958 bp       |

In diesen *H. pylori*-Stämmen sollte durch die nachfolgend beschriebenen Experimente untersucht werden, ob eine erhöhte Expression von HP1043 detektierbar ist und ob eine strikte Expressionskontrolle über den P<sub>hp1043</sub>-Promotor stattfindet.

### 9.1.2 Analyse der Transkription des Response-Regulatorgens *hp1043* unter der Kontrolle des P<sub>cagA</sub>-Promotors in *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Kan

Die Transkription des Response-Regulatorgens *hp1043* unter der Kontrolle des starken, konstitutiven Promotors P<sub>cagA</sub> in *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Kan wurde mit Hilfe eines „Primer-Extension“-Experimentes analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Transkription von *hp1043* in *H. pylori* G27 ausgehend von P<sub>hp1043</sub> untersucht. In dem „Primer-Extension“-Experiment wurden jeweils 30 µg der entsprechenden RNA eingesetzt. Als Sonde zur Detektion des Transkripts von *hp1043* diente der Primer 1043-PE. Für die



Sequenzierungsreaktion wurde das Plasmid pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1043-Kan als Matrize verwendet.

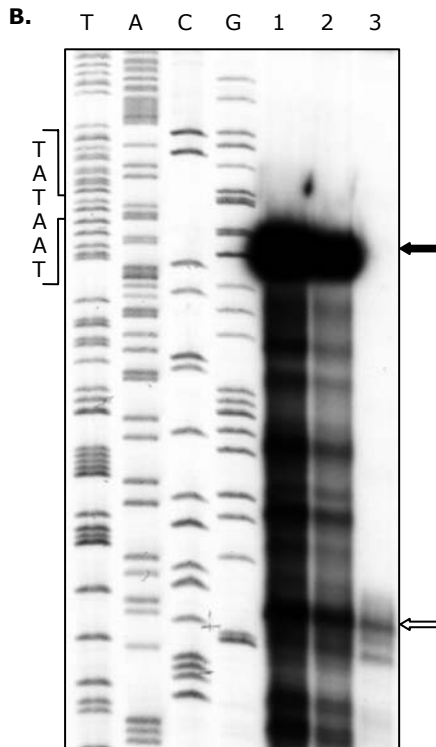
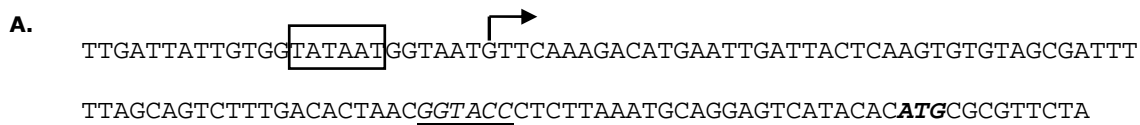


Abb. 76: **A.** Nukleotidsequenz der Promotorregion der Promotor/Gen-Fusion *P<sub>cagA</sub>/1043*. Die -10-Box ist durch einen Kasten gekennzeichnet, der Transkriptionsstart durch einen Pfeil und das Startkodon durch Fettdruck. Die zu Klonierungszwecken eingeführte *KpnI*-Restriktionsschnittstelle ist kursiv gedruckt und unterstrichen. **B.** „Primer-Extension“-Analyse der Transkription von *hp1043*. Der radioaktiv markierte Primer 1043-PE sowie 30 µg RNA, die aus dem Stamm G27/*P<sub>cagA</sub>*-1043-Kan (Spur 1 und 2) isoliert wurde, wurden eingesetzt um das Transkript von *hp1043* ausgehend vom *P<sub>cagA</sub>*-Promotor zu detektieren (schwarzer Pfeil). Die Sequenzierung (Spur T, A, C, G) wurde durch Hybridisierung des Primers 1043-PE mit dem Plasmid pSL-cagACD-*P<sub>cagA</sub>*-1043-Kan durchgeführt. Zum Vergleich wurde eine „Primer-Extension“-Analyse mit dem Primer 1043-PE und RNA, die aus dem Stamm *H. pylori* G27 isoliert wurde, durchgeführt (Spur 3). Der hier identifizierte Transkriptionsstartpunkt ist durch den offenen Pfeil gekennzeichnet. Zusätzlich ist die Sequenz der -10-Box von *P<sub>cagA</sub>* neben dem Autoradiogramm aufgezeigt.

Wie in Abb. 76 gezeigt ist, konnte im Stamm *H. pylori* G27/*P<sub>cagA</sub>*-1043-Kan zusätzlich zum Transkript, das unter Kontrolle des *P<sub>1043</sub>*-Promotors (offener Pfeil) steht, eine große Menge *hp1043*-spezifischen Transkripts, das vom Promotor *P<sub>cagA</sub>* aus transkribiert wurde (schwarzer Pfeil), detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass im *H. pylori*-Stamm G27/*P<sub>cagA</sub>*-1043-Kan eine verstärkte Transkription von *hp1043* ausgehend vom *P<sub>cagA</sub>*-Promotor stattfindet.

### 9.1.3 Analyse der Translation von HP1043 in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/*P<sub>cagA</sub>*-1043-Kan

In dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/*P<sub>cagA</sub>*-1043-Kan sollte anhand einer Western-Blot-Analyse untersucht werden, ob durch die auf Transkriptionsebene beobachtete verstärkte Transkription von *hp1043* ausgehend von *P<sub>cagA</sub>* eine erhöhte Expression des Proteins erfolgt.

Für die Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen HP1043-spezifischen Antikörper wurden jeweils 20 µg von Gesamtzellproteinlysaten der *H. pylori*-Stämme G27 und

G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Kan auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Abb. 77 zeigt deutlich, dass in den *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Kan und G27 das Protein HP1043 gleich stark exprimiert wird. Dies bedeutet, dass trotz stark erhöhter Transkription von *hp1043* unter Kontrolle des P<sub>cagA</sub>-Promotors keine Steigerung der Expression auf Proteinebene stattfindet, was auf eine post-transkriptionelle Expressionskontrolle von HP1043 hinweist.

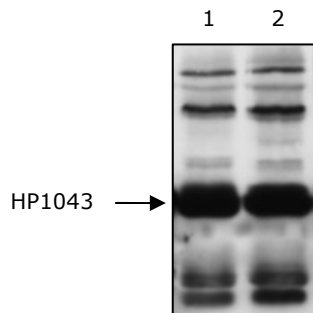


Abb. 77: Western-Blot-Experiment zur Analyse der HP1043-Expression in den *H. pylori*-Stämmen G27 und G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Kan. Jeweils 20 µg Proteinlysate der *H. pylori*-Stämme wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen HP1043 inkubiert sowie mit einem zweiten Peroxidase gekoppelten Ziegen-„anti-mouse“-Antikörper. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für ca. 20 sec. In Spur 1 ist das Proteinlysate von *H. pylori* G27 aufgetragen, in Spur 2 das Proteinlysate von *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Kan. Der Pfeil markiert die Bande, die dem Protein HP1043 (26 kDa) entspricht.

#### 9.1.4 Inaktivierung des wildtypischen Response-Regulatorgens *hp1043* in *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Cm

Zusätzlich sollte nun überprüft werden, ob es möglich ist, das *hp1043*-Gen am wildtypischen Locus des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Cm zu deletieren.

Der *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Cm wurde mit dem Plasmid pSL-1043::km2 (siehe E 1.2) transformiert und auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten selektioniert. Nach dieser Transformation sowie nach drei weiteren unabhängigen Transformationsexperimenten konnten keine Transformanten isoliert werden. Das erhaltene Ergebnis weist darauf hin, dass ein normales Zellwachstum nicht möglich ist, wenn die Transkription von *hp1043* unter der alleinigen Kontrolle von P<sub>cagA</sub> steht, obwohl zuvor gezeigt wurde, dass HP1043 auf Proteinlevel nicht überexprimiert wurde.

#### 9.2 Überexpression von *cj0355* im *H. pylori*-Stamm G27

Eine Überproduktion von HP1043 in *H. pylori* G27 war unter den gewählten Bedingungen nicht möglich (siehe E 9.1) und auch der Versuch den Promotor P<sub>cagA</sub> durch einen eiseninduzierbaren Promotor, P<sub>pfr</sub>, zu ersetzen scheiterte (Müller *et al.*, Epub ahead of print). Daher wurde eine weitere Möglichkeit gesucht Zielgene von HP1043 zu identifizieren.

Die nicht-translatierte „leader-sequence“ der *hp1043*-mRNA beinhaltet eine nicht perfekte „inverted-repeat“-Sequenz, die der mRNA eventuell eine Sekundärstruktur mit einem „stem loop“ verleiht, durch welche die Ribosomenbindestelle unzugänglich ist, was erklären würde, warum in dem Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1043-Cm zwar eine erhöhte Transkription von *hp1043* stattfindet, aber keine Steigerung der Expression detektiert werden kann. Dieser „inverted-repeat“ wäre in einem Konstrukt, bei dem der Promotor P<sub>hp1043</sub> und das Gen *cj0355* fusioniert sind, nicht vorhanden, wodurch der „stem loop“ nicht ausgebildet und dieses Protein eventuell überexprimiert werden kann. Möglicherweise sind die Mechanismen zur

post-transkriptionellen und post-translationellen Regulation von HP1043 in *H. pylori* nicht auf CJ0355 übertragbar. Daher sollte das Gen *cj0355* aus *C. jejuni*, welches wie zuvor gezeigt das Protein HP1043 in *H. pylori* G27 funktionell ersetzen kann (siehe E 7.1), in einem *H. pylori* G27 Stamm überexprimiert werden. Anhand des möglicherweise veränderten Transkriptoms oder Proteoms eines Stammes, welcher CJ0355 überexprimiert, könnte man dann möglicherweise Rückschlüsse auf die Zielgene von HP1043 erzielen. Das Gen *cj0355* wurde unter der Kontrolle von  $P_{cagA2}$  in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert.

### 9.2.1 Konstruktion des Plasmids pSL-cagACD- $P_{cagA2}$ -*cj0355*-Cm und Integration der $P_{cagA2}$ /*cj0355*-Fusion in das Chromosom von *H. pylori* G27

Das 193 bp Fragment  $P_{cagA2}$  wurde mit den Oligonukleotiden pcag3-2/pcag5-5' von chromosomaler DNA des *H. pylori*-Stamms G27 amplifiziert und nach Spaltung mit *Bam*HI/*Kpn*I in den Vektor pSL1180 kloniert. Anschließend wurde das 698 bp Fragment, welches das Gen *cj0355* beinhaltet, aus dem Plasmid pSL- $P_{hp1043}$ -*cj0355* mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn*I und *Pst*I ausgeschnitten und in den *Kpn*I/*Pst*I gespaltenen Vektor pSL- $P_{cagA2}$  integriert. Die  $P_{cagA2}$ /*cj0355*-Fusion wurde über die *Bam*HI/*Pst*I-Schnittstellen aus dem Plasmid pSL- $P_{cagA2}$ -*cj0355* gespalten und in den Vektor pSL-cagACD ligiert. Durch Insertion einer  $Cm^r$ -Kassette über die *Pst*I-Schnittstelle konnte das Plasmid pSL-cagACD- $P_{cagA2}$ -*cj0355*-Cm (siehe Abb. 78) generiert werden.

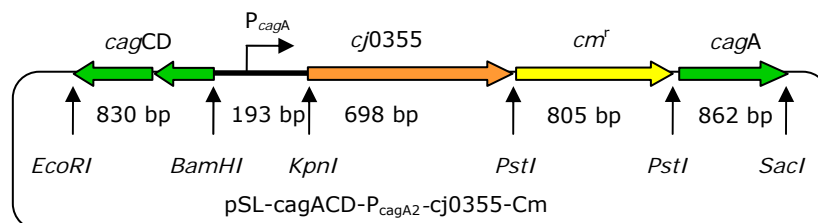


Abb. 78: Schematische Darstellung des Plasmids pSL-cagACD- $P_{cagA2}$ -*cj0355*-Cm zur Integration der  $P_{cagA2}$ /*cj0355*-Fusion in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen des Plasmids sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Um den rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{cagA2}$ -*cj0355* zu erhalten, wurde der *H. pylori*-Stamm G27 mit dem Plasmid pSL-cagACD- $P_{cagA2}$ -*cj0355*-Cm transformiert. Die resultierenden Transformanten wurden auf  $Cm$ -haltigen Columbia Blutagarplatten selektioniert. Anhand von PCR-Analysen (siehe Tab. 37) wurden die Transformanten charakterisiert, wobei die korrekte Integration der  $P_{cagA2}$ /*cj0355*-Fusion in den *cag*-Lokus nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Der resultierende Stamm bekam demzufolge die Bezeichnung *H. pylori* G27- $P_{cagA2}$ -*cj0355*.

Tab. 37: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27- $P_{cagA2}$ -*cj0355* durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination | Fragmentlänge |
|-------------------|---------------|
| 5' cagD/3' cagA   | 3388 bp       |
| 5' cagD/Cj0355-3  | 1721 bp       |
| 3' cagA/Pcag5'    | 2558 bp       |

Anschließend sollte überprüft werden, ob durch die Fusion von *cj0355* mit dem Promotor  $P_{cagA2}$  in dem konstruierten *H. pylori*-Stamm eine verstärkte Expression von CJ0355 stattfindet.

### 9.2.2 Analyse der Transkription des Response-Regulatorgens *cj0355* unter der Kontrolle des $P_{cagA2}$ -Promotors in *H. pylori* G27- $P_{cagA2}$ -*cj0355*

Die Transkription des Response-Regulatorgens *cj0355* unter Kontrolle des starken, konstitutiven Promotors  $P_{cagA2}$  in *H. pylori* G27- $P_{cagA2}$ -*cj0355* wurde mit Hilfe eines „Primer-Extension“-Experiments analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Transkription von *cj0355* ausgehend von  $P_{hp1043}$  in *H. pylori* G27- $P_{hp1043}$ -*cj0355* untersucht (vgl. E 7.1.3). Im „Primer-Extension“-Experiment wurden jeweils 30  $\mu$ g der entsprechenden RNA eingesetzt und als Primer zur cDNA-Synthese diente das Oligonukleotid PE-Cj0355. Für die Sequenzierungsreaktion wurden das Plasmid pSL-cagACD- $P_{cagA2}$ -*cj0355*-Cm bzw. das Plasmid pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -*cj0355*-Cm als Matrize verwendet.

Aus Abb. 79 ist ersichtlich, dass *cj0355* unter Kontrolle des Promotors  $P_{cagA2}$  (Spur 1 und 2) deutlich stärker transkribiert wird als unter Kontrolle des Promotors  $P_{hp1043}$  (Spur 3 und 4).



Abb. 79: **A.** Nukleotidsequenz der Promotorregion der Promotor/Gen-Fusion  $P_{cagA2}$ /*cj0355*. Die -10-Box ist durch einen Kasten gekennzeichnet, der Transkriptionsstart durch einen Pfeil und das Startkodon durch Fettdruck. Die zu Klonierungszwecken eingeführte *KpnI*-Restriktionsschnittstelle ist kursiv gedruckt und unterstrichen. **B.** „Primer-Extension“-Experiment zur Analyse der Transkription von *cj0355*. Die Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte von *cj0355* unter Kontrolle von  $P_{cagA2}$  (Spur 1 und 2) bzw.  $P_{hp1043}$  (Spur 3 und 4) in den *H. pylori*-Stämmen G27/ $P_{cagA2}$ -*cj0355* bzw. G27/ $P_{hp1043}$ -*cj0355* erfolgte mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid PE-Cj0355. Der Transkriptionsstartpunkt ausgehend von  $P_{cagA2}$  ist durch einen schwarzen Pfeil, jener ausgehend von  $P_{hp1043}$  durch einen offenen Pfeil dargestellt. Die Sequenzierungen (Spur T, A, C, G) wurden durch Hybridisierung des Primers PE-Cj0355 mit dem Plasmid pSL-cagACD- $P_{cagA2}$ -*cj0355*-Cm bzw. pSL-cagACD- $P_{hp1043}$ -*cj0355*-Cm durchgeführt. Zusätzlich sind die Sequenzen der -10-Boxen von  $P_{cagA2}$  und  $P_{hp1043}$  neben dem Autoradiogramm aufgezeigt (mit freundlicher Genehmigung, Stefanie Müller).

### 9.2.3 Analyse der Translation des Response-Regulatorgens *cj0355* in dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/*P*<sub>cagA2</sub>-*cj0355*

In dem rekombinanten *H. pylori*-Stamm G27/*P*<sub>cagA2</sub>-*cj0355* sollte durch Western-Blot-Analyse untersucht werden, ob die Überexpression von *cj0355*, die auf Transkriptionsebene zu erkennen war, auch auf Translationsebene zu sehen ist.

Zunächst wurde in einem Vorversuch überprüft, ob der HP1043-spezifische Antikörper mit dem Protein CJ0355 kreuzreagiert, um mit diesem Antikörper das Protein CJ0355 in einem Immunoblot identifizieren zu können. Hierfür wurde ein Überexpressionsplasmid konstruiert, um das Protein CJ0355 in *E. coli* zu exprimieren und anschließend aufzureinigen zu können. Ein 695 bp DNA-Fragment wurde mit den Oligonukleotiden *Cj0355*-E5 und *Cj0355*-3 von chromosomaler DNA des *C. jejuni*-Stammes 4344 amplifiziert. Dieses DNA-Fragment wurde *Bam*HI/*Pst*I gespalten, in den Vektor pQE30 ligiert und der Ligationsansatz in *E. coli* M15 Zellen transformiert. Bei einem Klon wurde durch Sequenzierung mit den Primern pQE-5 und pQE-3 sichergestellt, dass die Gensequenz keine durch die PCR-Reaktion verursachten Mutationen aufweist. Der daraus resultierende Stamm *E. coli* M15[pQE-*cj0355*] wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Überexpression des His<sub>6</sub>-CJ0355-Fusionsproteins getestet (siehe Abb. 80, Spur 1/2). Die anschließende Reinigung des Fusionsproteins His<sub>6</sub>-CJ0355 erfolgte über eine Ni-NTA-Säule. In Abb. 80 kann man in Spur 3-5 das gereinigte Protein erkennen.

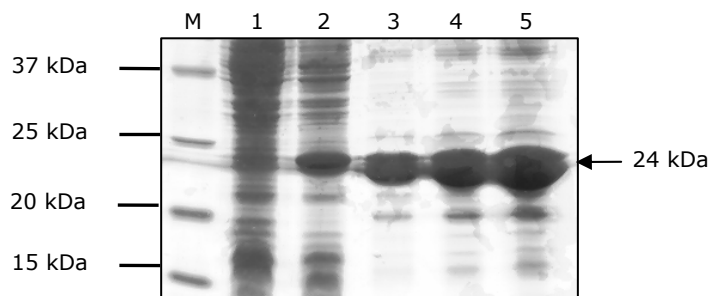


Abb. 80: Darstellung des gereinigten Fusionsproteins His<sub>6</sub>-CJ0355. Auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden unterschiedliche Proteinmengen des gereinigten und dialysierten Fusionsproteins aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung dargestellt. Zusätzlich wurden Lysate des nicht induzierten und des induzierten *E. coli* Stammes M15[pQE-*cj0355*] aufgetrennt.

M: BroadRange Proteinmarker von Biorad

Spur 1: *E. coli* M15[pQE-*cj0355*], nicht induziert

Spur 2: *E. coli* M15[pQE-*cj0355*], induziert (1mM IPTG)

Der Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 24 kDa großen Fusionsprotein entspricht.

Spur 3: gereinigtes His<sub>6</sub>-*cj0355*; 2,5 µg

Spur 4: gereinigtes His<sub>6</sub>-*cj0355*; 5 µg

Spur 5: gereinigtes His<sub>6</sub>-*cj0355*; 10 µg

Die Proteine His<sub>6</sub>-CJ0355 und His<sub>6</sub>-1043 wurden für eine Western-Blot Analyse auf einem 15 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (jeweils 0,5 µg). Als erster Antikörper wurde ein polyklonaler Maus-Antikörper verwendet, der gegen das Protein HP1043 gerichtet war (siehe Abb. 81).

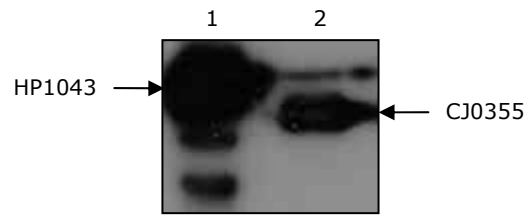


Abb. 81: Western-Blot-Experiment zur Überprüfung der Kreuzreaktion zwischen einem spezifischen HP1043 Antikörper und dem Protein CJ0355. Jeweils 0,5 µg von His<sub>6</sub>-1043 und His<sub>6</sub>-CJ0355 wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen HP1043 inkubiert. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für ca. 15 sec. In Spur 1 ist das Protein His<sub>6</sub>-1043 aufgetragen, in Spur 2 das Protein His<sub>6</sub>-CJ0355. Die Pfeile markieren die Banden, die dem Protein HP1043 (26 kDa) bzw. dem Protein CJ0355 (24 kDa) entsprechen.

In Abb. 81 kann man erkennen, dass der polyklonale HP1043-Antikörper auch das orthologe Protein CJ0355 erkennt. Somit konnte dieser Antikörper für die weiteren Experimente zur Detektion der Überexpression von *cj0355* in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA2</sub>-*cj0355* eingesetzt werden. Interessanterweise zeigen beide Proteine trotz eines etwa gleichen Molekulargewichts eine gewisse Abweichung im Laufverhalten.

Jeweils 20 µg der Gesamtzellproteine der *H. pylori*-Stämme G27, G27/P<sub>1043</sub>-*cj0355* und G27/P<sub>cagA2</sub>-*cj0355* sowie von *C. jejuni* 4344 wurden für eine Western-Blot-Analyse auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als erster Antikörper wurde der zuvor getestete polyklonale HP1043-Antikörper eingesetzt (siehe Abb. 82).

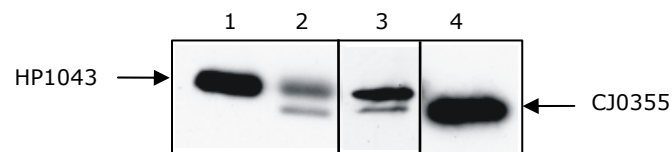


Abb. 82: Western-Blot-Experiment zur Überprüfung der Überexpression von CJ0355 in den *H. pylori*-Stämmen G27, G27/P<sub>1043</sub>-*cj0355*, G27/P<sub>cagA2</sub>-*cj0355* und *C. jejuni* 4344. Jeweils 20 µg Proteinlysate aus den *H. pylori*-Stämmen G27 (Spur 1), G27/P<sub>1043</sub>-*cj0355* (Spur 2) und G27/P<sub>cagA2</sub>-*cj0355* (Spur 3) sowie aus *C. jejuni* 4344 (Spur 4) wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen HP1043 inkubiert sowie mit einem zweiten Peroxidase-gekoppelten Ziege-„anti-mouse“-Antikörper. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für ca. 20 sec. Die Pfeile markieren die Banden, die dem Protein HP1043 (26 kDa) bzw. dem Protein CJ0355 (24 kD) entsprechen. (mit freundlicher Genehmigung, Stefanie Müller).

In Abb. 82 ist zu erkennen, dass, obwohl in der „Primer-Extension“-Analyse große Mengen an *cj0355*-spezifischem Transkript im *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA2</sub>-*cj0355* detektiert wurden, keine vergleichbar erhöhten Mengen des Proteins CJ0355 in diesem Stamm nachweisbar sind.

#### 9.2.4 Inaktivierung des wildtypischen Response-Regulatorgens *hp1043* in *H. pylori* G27/P<sub>cagA2</sub>-*cj0355*

Der *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA2</sub>-*cj0355* wurde mit dem „knock-out“-Plasmid pSL-1043::km2 (siehe E 1.2) transformiert, um das Gen *hp1043* über homologe Rekombination der flankierenden Sequenzen durch eine Kan<sup>r</sup>-Kassette zu ersetzen. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten. Allerdings lieferte die Transformation auch nach mehrmaliger Wiederholung keine Transformanten.

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Mechanismen, welche die Expression von *hp1043* auf post-transkriptionellen oder post-translationellen Level regulieren, ebenso die Expression des Orthologen CJ0355 kontrollieren.

### 9.3 Überexpression des Response-Regulatorgens *hp1021*

#### 9.3.1 Konstruktion der Plasmide pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Cm und pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und Integration der P<sub>cagA</sub>/*hp1021*-Fusion in das Chromosom von *H. pylori* G27

Zur Integration der Promotor/Gen-Fusion P<sub>cagA</sub>/*hp1021* in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27, wurde zunächst die Promotorfusion P<sub>cagA</sub>/*hp1021* aus dem Plasmid pSL-P<sub>cagA</sub>-R2, welches den Promotor P<sub>cagA</sub> sowie das Gen *hp1021* beinhaltet, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Pst*I ausgeschnitten und das 1190 bp lange Fragment anschließend in den ebenfalls *Bam*HI/*Pst*I-gespaltenen Vektor pSL-cagACD kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pSL-cagAD-P<sub>cagA</sub>-1021 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Pst*I linearisiert und anschließend über die *Pst*I-Schnittstelle eine Cm<sup>r</sup>-Kassette bzw. eine Kan<sup>r</sup>-Kassette inseriert. Die konstruierten Plasmide pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Cm bzw. pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan sind in Abb. 83 schematisch dargestellt.

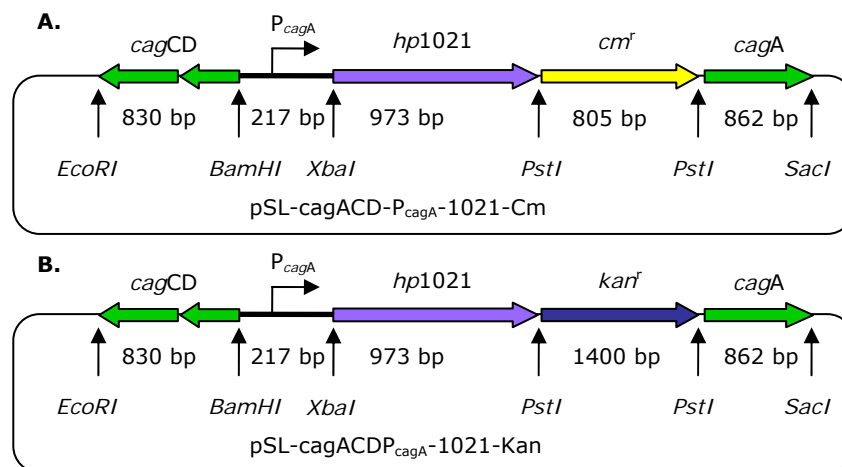


Abb. 83: Schematische Darstellung der Plasmide pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Cm (**A.**) und pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan (**B.**) zur Integration der P<sub>cagA</sub>/*hp1021*-Fusion in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27. Die zur Klonierung genutzten Restriktionsschnittstellen der Plasmide sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Durch die Integration der P<sub>cagA</sub>/*hp1021*-Fusion in das Chromosom von *H. pylori* G27 wurden die merodiploiden *H. pylori*-Stämme G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm generiert. Für die Erzeugung der Stämme wurde *H. pylori* G27 mit den Plasmiden pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Cm bzw. pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan transformiert und die erhaltenen Transformanten, entsprechend des verwendeten Plasmids, entweder auf Kan- oder Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten selektiert. Durch PCR-Analysen der jeweiligen Transformanten mit unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe Tab. 38) konnte gezeigt werden, dass die Integration der Promotor/Gen-Fusion P<sub>cagA</sub>/*hp1021* durch homologe Rekombination in das Chromosom von *H. pylori* G27 an der gewünschten Position, dem *cag*-

Lokus, stattgefunden hatte. Somit wurden die Stämme G27-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und G27-P<sub>cagA</sub>-1021-Cm benannt.

Tab. 38: Primerkombinationen zur Charakterisierung der *H. pylori*-Stämme G27-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und G27-P<sub>cagA</sub>-1021-Cm durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| <i>H. pylori</i> -Stamm         | Primerkombination | Fragmentlänge |
|---------------------------------|-------------------|---------------|
| G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Cm  | 5' cagD/3' cagA   | 3687 bp       |
|                                 | 5' cagD/3'-HP1021 | 2020 bp       |
|                                 | 3' cagA/Pcag5'    | 2847 bp       |
| G27/P <sub>cagA</sub> -1021-Kan | 5' cagD/3' cagA   | 4282 bp       |
|                                 | 5' cagD/3'-HP1021 | 2020 bp       |
|                                 | 3' cagA/Pcag5'    | 3452 bp       |

### 9.3.2 Analyse der Transkription des Response-Regulatorgens *hp1021* unter der Kontrolle des P<sub>cagA</sub>-Promotors in *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan

In einem „Primer-Extension“-Experiment mit 30 µg RNA des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan wurde die Transkription des Response-Regulatorgens *hp1021* unter Kontrolle des starken, konstitutiven Promotors P<sub>cagA</sub> analysiert. Hierbei wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid 1021-PE zur cDNA-Synthese verwendet, die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Plasmid pSL-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan als Matrize durchgeführt.

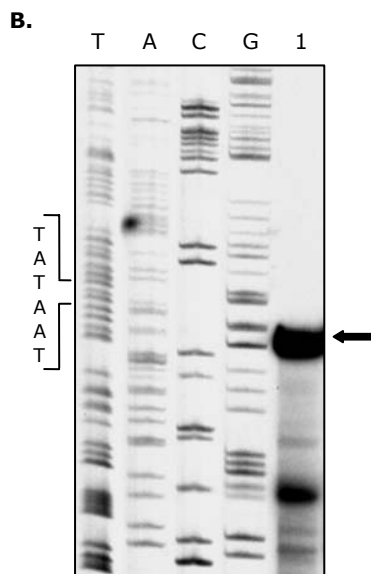


Abb. 84: **A.** Nukleotidsequenz der Promotorregion der Promotor/Genfusion P<sub>cagA</sub>/1021. Die -10-Box ist durch einen Kasten gekennzeichnet, der Transkriptionsstart durch einen Pfeil und das Startkodon durch Fettdruck. Die zu Klonierungszwecken eingeführte *Xba*I-Restriktionsschnittstelle ist kursiv gedruckt und unterstrichen. **B.** Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes von *hp1021* (schwarzer Pfeil) unter Kontrolle des *cag*-Promotors durch eine „Primer-Extension“-Analyse mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid 1021-PE. Die Sequenzierung (Spur T, A, C, G) wurde durch Hybridisierung des Primers 1021-PE mit dem Plasmid pSL-cagACD-P<sub>cagA</sub>-1021-Kan durchgeführt. Zusätzlich ist die Sequenz der -10-Box von P<sub>cagA</sub> neben dem Autoradiogramm aufgezeigt.

Wie in Abb. 84 gezeigt ist, konnte eine große Menge an *hp1021*-spezifischem Transkript, das vom Promotor P<sub>cagA</sub> aus transkribiert wurde, in *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan detektiert werden. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob diese erhöhte Transkriptmenge auch zu einer erhöhten Expression des Proteins HP1021 führt.



### 9.3.3 Analyse der Translation des Response-Regulators HP1021 in den rekombinanten *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm, G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und G27/P<sub>cagA</sub>-1021-CmΔ

Durch Western-Blot Analysen wurden in den rekombinanten *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm, G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und G27/P<sub>cagA</sub>-1021-CmΔ auf Translationsebene die Überexpression des Gens *hp1021* analysiert. Nur eine erhöhte Translation des Response-Regulatorgens würde die gewünschten Veränderungen im Transkriptom bzw. Proteom von *H. pylori* bewirken.

Für die Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen HP1021-Antikörper (siehe Abb. 85) wurden jeweils 20 µg Gesamtzellproteine der *H. pylori*-Stämme G27 (Kontrolle), G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm, G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und G27/P<sub>cagA</sub>-1021-CmΔ auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Als zusätzliche Kontrolle sollte der *H. pylori*-Stamm 26695 1021Δ untersucht werden. In diesem Stamm wurde das Response-Regulatorgen *hp1021* durch eine Kan<sup>r</sup>-Kassette substituiert.

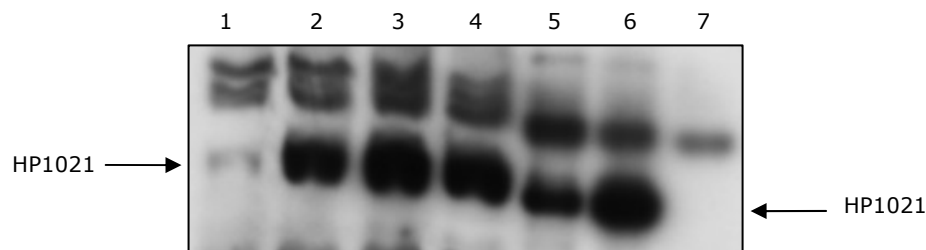


Abb. 85: Western-Blot Experiment zur Überprüfung der HP1021-Expression in den *H. pylori*-Stämmen G27 (Spur 1 und Spur 5), G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan (Spur 2 und Spur 6), G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm (Spur 3), G27/P<sub>cagA</sub>-1021-CmΔ (Spur 4) und 26695 1021Δ (Spur 7). Jeweils 20 µg Proteinlysate aus den *H. pylori*-Stämmen wurden auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen HP1021 inkubiert, als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidasegekoppelter Ziege-,anti-rabbit"-Antikörper verwendet. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte für ca. 30 sec. Die Proteinlysate in Spur 1-4 wurden wie unter D 4.2.1 beschrieben präpariert, während die Lysate in Spur 5-7 nach D 4.2.2 präpariert wurden. Der Pfeil markiert die Bande, die dem Protein HP1021 (35 kDa) entspricht.

Das Autoradiogramm (Abb. 85) zeigt eindeutig eine erhöhte Expression von HP1021 in den *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan (Spur 2/6), G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm (Spur 3) und G27/P<sub>cagA</sub>-1021-CmΔ (Spur 4; vgl. E 9.3.4) im Vergleich zum WT (Spur 1/4). In der Negativkontrolle (Spur 7) ist auf Höhe der relativen Größe von HP1021 (35 kDa) keine Bande zu erkennen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es möglich ist den Response-Regulator HP1021 in *H. pylori* über zu exprimieren, was darauf hindeutet, dass die Expression von großen Mengen des Response-Regulators HP1021 keine Auswirkung auf das Wachstum von *H. pylori* hat.

### 9.3.4 Inaktivierung des wildtypischen Response-Regulatorgens *hp1021* in *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm

Es wurde zusätzlich ein rekombinanter *H. pylori*-Stamm erzeugt, in welchem nach Integration einer zweiten Genkopie die wildtypische Genkopie von *hp1021* deletiert ist.

Für die Deletion von *hp1021* am wildtypischen Genloкус wurde der *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm mit dem Plasmid pSL-1021::km (siehe E 1.1) transformiert und die Transformanten auf Kan/Cm-haltigen Columbia Blutagarplatten selektioniert. Die anschließende Charakterisierung der Transformanten mittels PCR-Analyse (siehe Tab. 39) zeigte die korrekte Substitution des Gens *hp1021* am wildtypischen Lokus durch die Kan<sup>r</sup>-Kassette sowie die gewünschte Organisation des *cag*-Lokus (nicht gezeigt). Der entstandene Stamm wurde dementsprechend als *H. pylori* G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm $\Delta$  bezeichnet.

Tab. 39: Primerkombinationen zur Charakterisierung des *H. pylori*-Stammes G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Cm $\Delta$  durch PCR-Analyse. Angegeben sind außerdem die erwarteten Längen der amplifizierten Fragmente.

| Primerkombination | Fragmentlänge |
|-------------------|---------------|
| 5' cagD/3' cagA   | 3687 bp       |
| cagAseq2/cagCDseq | 2292 bp       |
| 5' cagD/3'-HP1021 | 2020 bp       |
| 3' cagA/Pcag5'    | 2847 bp       |
| HP1020/HPkan3     | 1243 bp       |
| HP1022/kan2       | 1692 bp       |

Die Beobachtung, dass es möglich ist, das Gen *hp1021* unter Kontrolle des „fremden“ Promotors P<sub>cagA</sub> zu exprimieren, ohne dass dies Auswirkungen auf das Zellwachstum von *H. pylori* hat, zeigt dass eine strikte Transkriptionsregulation von *hp1021* nicht entscheidend für das normale Zellwachstum von *H. pylori* ist.

### 9.3.5 Vergleichende Proteomanalyse mit den *H. pylori*-Stämmen G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und 26695 1021 $\Delta$ und den entsprechenden WT-Stämmen G27 und 26695

Um mögliche Zielgene von HP1021 zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Proteom-Analysen der beiden mutierten *H. pylori*-Stämme G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und 26695 1021 $\Delta$  sowie der Wildtyp-Stämme *H. pylori* G27 und 26695 durchgeführt. Durch den Vergleich der Proteinexpressionsprofile zwischen den Mutanten und dem jeweiligen Wildtyp-Stamm können Gene identifiziert werden, deren Expression in Abhängigkeit des Response-Regulators HP1021 reguliert werden.

Für die vergleichenden Proteom-Analysen wurden Gesamtzellproteine aus drei unabhängig voneinander angezogenen Kulturen der *H. pylori*-Stämme G27 WT, G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan, 26695 WT und 26695 1021 $\Delta$  isoliert. Für die analytischen 2D-Gele wurden je 50  $\mu$ g Gesamtzellproteinlysate der genannten *H. pylori*-Stämme einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) im pH-Bereich 6-9 unterzogen, auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel gemäß des Molekulargewichtes aufgetrennt und die Gele anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Nach der Computer-gestützten Auswertung des Spotmusters, das nach der Silberfärbung erhalten wurde, wurden nur die Proteine, die in allen drei Präparationen einen reproduzierbaren, signifikanten Unterschied in ihrer Expression bei dem Vergleich der Mutante mit dem jeweiligen Wildtyp-Stamm aufwiesen, für die weitere Analyse herangezogen. Für die präparativen 2D-Gele, die für die MALDI-ToF zur Identifikation der differentiell exprimierten Proteine eingesetzt wurden, wurden in der 1. Dimension jeweils 800  $\mu$ g Proteinlysate aufgetrennt. Nach der 2. Dimension in einem 12 %igen SDS-

Polyacrylamidgelen wurden die 2D-Gele mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Ein Teil dieser Proteine konnte mit Hilfe der MALDI-ToF, die von Herrn Armin Bosserhoff (ZMBH, Universität Heidelberg) durchgeführt wurde, identifiziert werden.

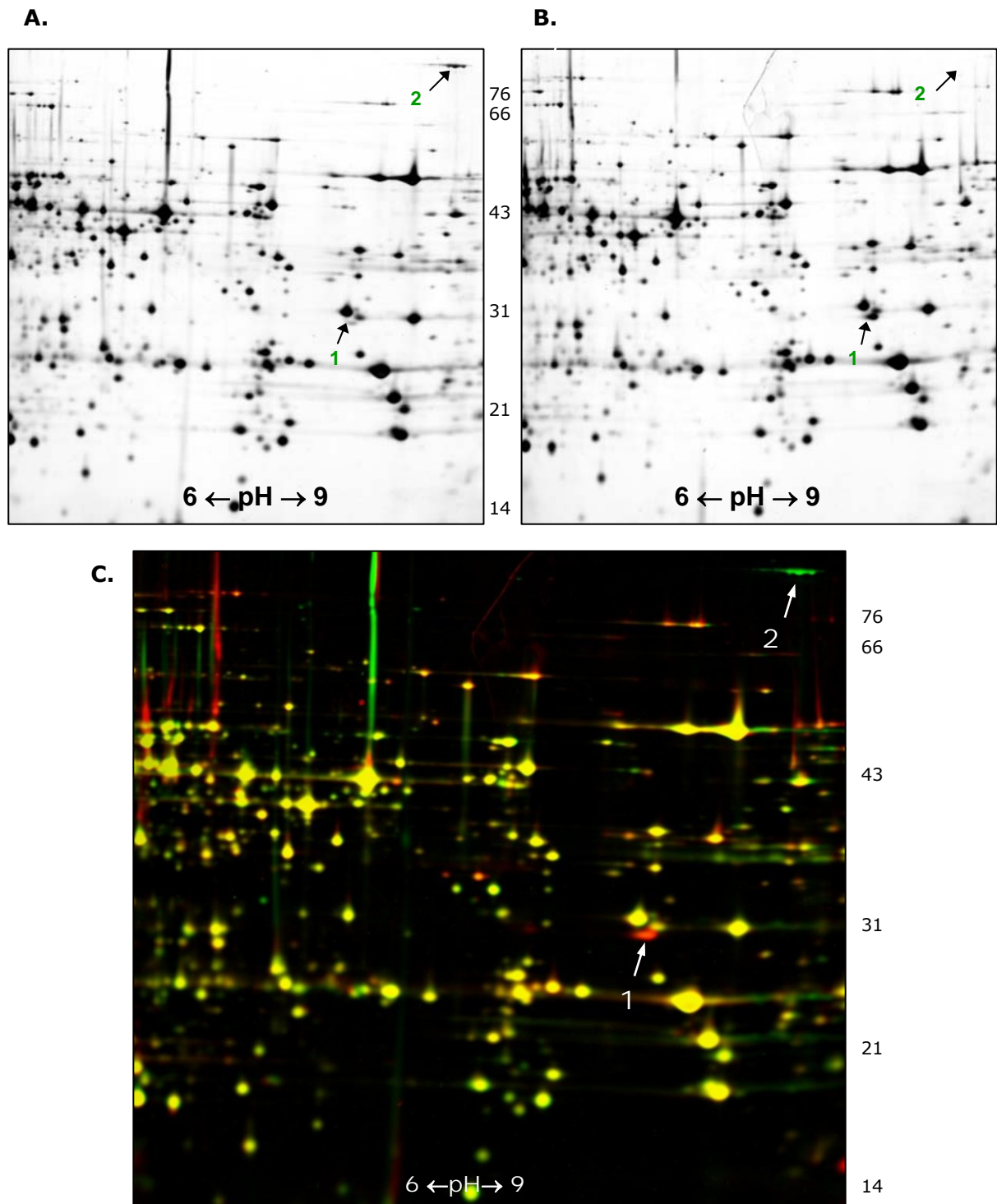


Abb. 86: **A.** und **B.** Representative Silber-gefärbte Gele der über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Gesamtzellproteine der *H. pylori*-Stämme G27 (**A.**) und G27/*P<sub>cagA</sub>*-1021-Kan (**B.**). **C.** Representatives Zwei-Kanal-Bild (Delta 2D Decodon) der silbergefärbten Gele **A.** (grüner Kanal) und **B.** (roter Kanal). Die Pfeile markieren Proteinspots, die auf den 2D-Gelen differenziell exprimiert werden. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Wie man in Abb. 86 erkennen kann, konnte beim Vergleich der Gele, auf denen Gesamtzellproteine der *H. pylori*-Stämme G27 und G27/*P<sub>cagA</sub>*-1021-Kan aufgetrennt wurden, im Proteinmuster nur zwei Proteine (Pfeile, Spot 1, 2) detektiert werden, die eindeutig und

reproduzierbar differentiell exprimiert waren. Der Spot 1 wurde als das Protein HP1021 (35 kDa; pI 8,09) identifiziert, dass wie erwartet in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1021- Kan stärker exprimiert wird, als im wildtypischen Stamm. Spot 2 entspricht dem Protein CagA (133 kDa; pI 8,49), das in G27 exprimiert wird, wohingegen in dem *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan durch die Insertion der Promotor/Gen-Fusion P<sub>cagA</sub>/hp1021 in den *cag*-Lokus das Gen *cagA* deletiert ist und das Protein CagA somit in diesem Stamm nicht exprimiert wird. Mit dieser Methode konnten somit ebenfalls keine Zielgene von HP1021 identifiziert werden, wohingegen beim Vergleich der Proteinmuster der *H. pylori*-Stämme 26695 und 26695 1021Δ differentiell exprimierte Proteine zeigte. Es konnten in den Proteinmustern der *H. pylori*-Stämme 26695 und 26695 1021Δ reproduzierbar 12 Proteinspots detektiert werden, die in der Deletionsmutante 26695 1021Δ im Vergleich zum Wildtyp 26695 schwächer oder nicht exprimiert erschienen (siehe Abb. 87). Auf den Coomassie gefärbten 2D-Gelen, die angefertigt wurden, um die auf den silbergefärbten Gelen detektierten differentiell exprimierten Proteine massenspektrometrisch zu bestimmen, waren einige der auf den analytischen Silber-gefärbten Gelen identifizierten differentiell exprimierten Proteinspots zu schwach ausgeprägt, so dass eine MALDI-ToF-Analyse nur von den Spots 1, 4, 8, 10 und 11 möglich war (siehe Tab. 40).

Tab. 40: Differentiell exprimierte Proteine der 2D-Gele von *H. pylori* 26695 und 26695 1021Δ. Die theoretischen Molekulargewichte (MW) und isoelektrischen Punkte (pI) wurden anhand der ORFs errechnet, die in der Genomsequenz von *H. pylori* 26695 (Tomb *et al.*, 1997) angegeben sind.

| Spot | Protein   | MW     | pI   |
|------|---|--------|------|
| 1    | HP0695 (Hydantoin-Verwertungs-Protein A, HyuA)      | 79 kDa | 6,5  |
| 4    | Katalase (HP0875)                                   | 59 kDa | 8,7  |
| 8    | Acetyl-CoA Acetyltransferase, FadA (HP0690)         | 41 kDa | 6,71 |
| 10   | HP1021 (RR)   | 35 kDa | 8,49 |
| 11   | 7-alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, HdhA (HP1014) | 29 kDa | 7,71 |

Es stellte sich heraus, dass es sich bei dem Proteinspot 1 um das Protein HP0695, welches als ein Hydantoin-Verwertungs-Protein HyuA annotiert wurde, handelt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein immunogenes Protein handelt (Kimmel, 2000; Krah *et al.*, 2004). In *Pseudomonas sp.* strain NS671 ist HyuA an der Aminosäurebiosynthese beteiligt ist (Watabe *et al.*, 1992). Spot 8 wurde als Acetyl-CoA Acetyltransferase (FadA) identifiziert werden. Dieses Protein ist in *E. coli* am Fettsäureabbau beteiligt (Weeks *et al.*, 1969). Spot 11 konnte als 7-alpha-hydroxysteroid-Dehydrogenase, die von primären Gallensäuren den Hydroxyl-Rest der Position 7 abspaltet, wodurch diese Säuren zu sekundären Gallensäuren werden, identifiziert werden (Yoshimoto *et al.*, 1991). Proteinspot 4 stellt die Katalase dar. Dieses Enzym von *H. pylori* ist in der Lage toxische Sauerstoffradikale, die von polymorphkernigen Leukozyten produziert werden, zu entgiften (Hazell *et al.*, 1991; Odenbreit *et al.*, 1996). Der Proteinspot 10 repräsentiert den Response-Regulator HP1021, der wie erwartet in der Deletionsmutante *H. pylori* 26695 1021Δ nicht exprimiert wird.

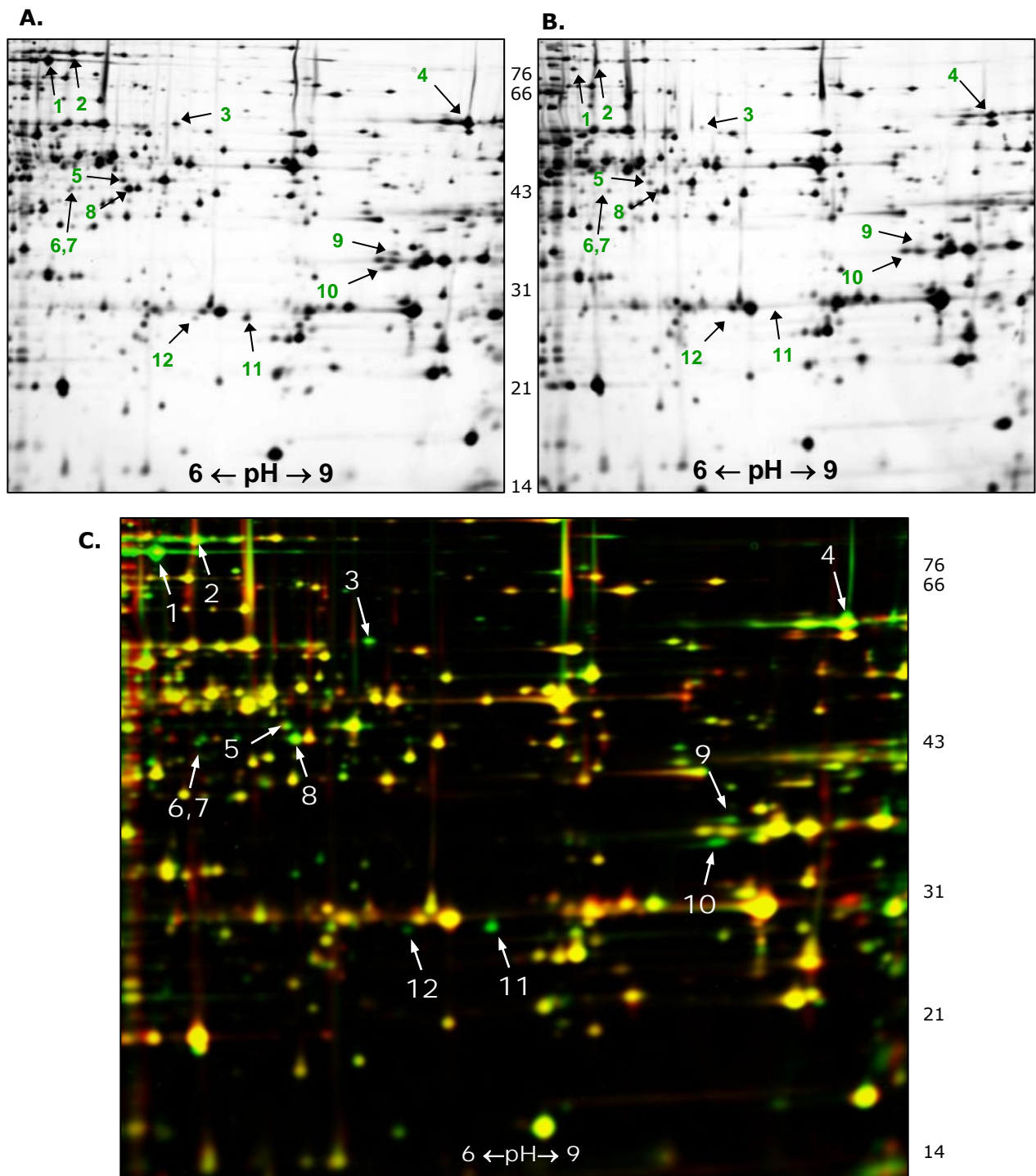


Abb. 87: **A.** und **B.** Representative Silber-gefärbte Gele der über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Gesamtzellproteine der *H. pylori*-Stämme 26695 (**A.**) und 26695 1021Δ (**B.**). **C.** Representatives Zwei-Kanal-Bild (Delta 2D Decodon) der silbergefärbten Gele **A.** (grüner Kanal) und **B.** (roter Kanal). Die Pfeile markieren Proteinspots, die auf den 2D-Gelen differenziell exprimiert werden. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Diese Daten sind bislang noch sehr vorläufig da es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war, die Proteomdaten auf Transkriptionsebene zu bestätigen.

## F. Diskussion

Bakterien haben die bemerkenswerte Fähigkeit ihre zellulären Vorgänge infolge der Wahrnehmung von unterschiedlichsten Signalen aus der Umgebung optimal an vorherrschende Umweltbedingungen zu adaptieren. Diese Signaltransduktionsvorgänge werden meist durch so genannte Zwei-Komponentensysteme vermittelt.

Das klassische Zwei-Komponenten-Paradigma beschreibt die Wahrnehmung eines Reizes über die Input-Domäne der Histidin-Kinase, was die Autophosphorylierung an einem hochkonservierten Histidinrest in der Transmitter-Domäne bewirkt. Durch den Transfer der Phosphorylgruppe von der Histidin-Kinase auf einen hochkonservierten Aspartatrest der Receiver-Domäne des zugeordneten Response-Regulators kommt es zur Konformationsänderung und somit zur Aktivierung der Output-Domäne des Regulators. Die Aktivierung des Response-Regulators resultiert in der Regel in einer Transkriptionsregulation von Targetgenen (reviewed in Hoch, 2000). Der hohe Konservierungsgrad unter den Zwei-Komponentensystemen und das ubiquitäre Vorkommen bei Bakterien macht die Zwei-Komponentensysteme zu einem attraktiven Target für neue Klassen von antimikrobiellen Substanzen (Barrett & Hoch, 1998). Geeignete Ziele wären insbesondere essentielle Bestandteile von Zwei-Komponentensystemen.

Im Genom von *H. pylori* findet man nur eine äußerst begrenzte Anzahl an Genen, die für Bestandteile von Zwei-Komponentensystemen kodieren. Darunter befinden sich neben einem Zwei-Komponentensystem, welches Sequenzhomologien zu den Chemotaxisproteinen CheA/CheY aufweist, lediglich drei Histidin-Kinasen und fünf Response-Regulatoren, die an Transkriptions-regulatorischen Prozessen beteiligt sind. Erstaunlicherweise erwiesen sich zwei der Response-Regulatoren, ArsR (HP0166) und HP1043, als essentiell für das Zellwachstum von *H. pylori*, während ein weiterer, HP1021, vermutlich an der Regulation grundlegender zellphysiologisch bedeutender Gene beteiligt ist, da die Inaktivierung des ORF *hp1021* zu einem ausgeprägten Wachstumsdefekt führt (Beier & Frank, 2000; Schär, 2001; Schär *et al.*, 2005). Bisher konnten in Prokaryonten nur wenige essentielle Zwei-Komponentensysteme identifiziert werden (siehe Tab. 41), die weitaus größere Anzahl von Zwei-Komponentensystemen wird für ein Wachstum unter Stress-freien *in vitro*-Kulturbedingungen meist nicht benötigt (Kobayashi *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 2002). Das gehäufte Auftreten von essentiellen Zwei-Komponentensystemen in *H. pylori* ist in Anbetracht seiner geringen Anzahl an regulatorischen Proteinen, vor allem an Zwei-Komponentensystemen, besonders bemerkenswert.

Tab. 41: Bestandteile essentieller Zwei-Komponentensysteme

| Name          | Typ   | Organismus                        | Funktion  |
|---------------|-------|-----------------------------------|---|
| CtrA-CckA     | RR/HK | <i>Caulobacter crescentus</i>     | Zellzyklus-Kontrolle (DNA-Replikation, DNA-Methylierung, Flagellen-Biogenese) |
| CtrA          | RR    | <i>Sinorhizobium meliloti</i>     | ?   |
| DivK          | RR    | <i>Caulobacter crescentus</i>     | Zellzyklus-Kontrolle (DNA-Replikation, DNA-Methylierung, Flagellen-Biogenese) |
| CenR/CenK     | RR/HK | <i>Caulobacter crescentus</i>     | Biogenese und Erhaltung der Zellhülle   |
| CC2931/CC2932 | RR/HK | <i>Caulobacter crescentus</i>     | involviert in aerobe Atmung?  |
| PetR          | RR    | <i>Rhodobacter capsulatus</i>     | involviert in aerobe Atmung   |
| MtrA          | RR    | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Regulation von DnaA?  |
| YycF-YycG     | RR/HK | <i>Bacillus subtilis</i>          | Zellzyklus-Kontrolle?   |
| YycF-YycG     | RR/HK | <i>Listeria monocytogenes</i>     | ?   |
| YycF-YycG     | RR/HK | <i>Staphylococcus aureus</i>      | ?   |
| YycF-YycG     | RR/HK | <i>Streptococcus pyogenes</i>     | ?   |
| YycF-YycG     | RR/HK | <i>Enterococcus faecalis</i>      | ?   |
| VicR (YycF)   | RR    | <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | Regulation von <i>pcsB</i> (Murein-Biosynthese)                               |
| YhcS/YhcR     | RR/HK | <i>Staphylococcus aureus</i>      | ?   |

In *C. crescentus* wurden mehrere essentielle Bestandteile von Zwei-Komponentensystemen, nämlich CtrA-CckA (Jacobs *et al.*, 1999; Quon *et al.*, 1996) und DivK (Hecht *et al.*, 1995), die für die Zellzyklus-Kontrolle in diesem Organismus notwendig sind, beschrieben (Skerker *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass das CtrA-CckA Zwei-Komponentensystem Gene reguliert, welche an wenigstens fünf verschiedenen Zellzyklus-Vorgängen, einschließlich Flagellenbiosynthese, DNA-Methylierung und DNA-Replikation, beteiligt sind (Quon *et al.*, 1996). Interessanterweise scheint das zweite essentielle Zweikomponenten-System aus *C. crescentus* die Zellzyklus-Regulation über die Regulation von CtrA zu vermitteln (Jacobs *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1998). Auch in *S. meliloti* konnte ein essentielles Homolog von CtrA identifiziert werden (Barnett *et al.*, 2001). Erst kürzlich zeigte eine systematische Analyse sämtlicher Gene von *C. crescentus*, die potentielle Zwei-Komponentenproteine kodieren, dass es neben den bisher bekannten essentiellen Genen nicht möglich war vier weitere Gene (*cenK*, *cenR*, *cc2931* und *cc2932*) zu deletieren, d.h. dass diese vermutlich ebenfalls essentiell sind (Skerker *et al.*, 2005). Das Zwei-Komponentensystem CenR/CenK ist an der Biosynthese und der Erhaltung der Zellhülle beteiligt. Die Proteine CC2931 und CC2932 sind vermutlich Phosphorylierungspartner, wobei CC2931 Homologien zu dem essentiellen Response-Regulator PetR von *R. capsulatus*, welcher für die aerobe Atmung benötigt wird, aufweist (Skerker *et al.*, 2005; Tokito & Daldal, 1992).

In *M. tuberculosis* wurde ebenfalls ein essentieller Response-Regulator, MtrA, identifiziert, dessen korrespondierende Histidin-Kinase MtrB nicht essentiell ist (Zahrt & Deretic, 2000). In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde vermutet, dass MtrA an der Regulation von DnaA, einem Initiationsfaktor der *oriC*-Replikation, beteiligt ist (Fol *et al.*, 2006).

Weitere Beispiele für essentielle Bestandteile von Zwei-Komponentensystemen sind die Gene *yycF* (Response-Regulator) und *yycG* (Histidin-Kinase) aus *B. subtilis* und deren Orthologe aus anderen Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt wie z.B. *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* und *L. monocytogenes* (Fabret & Hoch, 1998; Fukuchi *et al.*, 2000; Kallipolitis & Ingmer, 2001; Le Breton *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1999; Throup *et*

*al.*, 2000). In *S. pneumoniae* konnte ebenfalls ein *yycF*-Ortholog, *vicR*, identifiziert werden. Allerdings ist in diesem Fall nur die Deletion des Response-Regulators VicR letal, während die Deletion der korrespondierenden Histidin-Kinase keine Auswirkung auf das Zellwachstum hat. Die Essentialität von VicR aus *S. pneumoniae* beruht vermutlich auf der Transkriptionskontrolle des essentiellen Gens *pcsB*, welches ein extrazelluläres, an der Murein-Biosynthese beteiligtes Protein kodiert (Ng *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2005).

Wie im Fall von MtrA und VicR beschrieben, ist auch der Response-Regulator ArsR (HP0166) aus *H. pylori* essentiell für das Wachstum, während die Deletion der korrespondierenden Histidin-Kinase ArsS (HP0165) keine negative Auswirkung auf das Wachstum zeigte (Beier & Frank, 2000; McDaniel *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ArsR (HP0166) in *H. pylori* zwei unterschiedliche Gruppen von Targetgenen reguliert. Nach Phosphorylierung von ArsR (HP0166) durch ArsS (HP0165) reguliert der phosphorylierte Response-Regulator die Transkription von nicht essentiellen Zielgenen, während ArsR (HP0166) im nicht-phosphorylierten Zustand die Transkription von mindestens einem essentiellen Zielgen kontrolliert (vgl. E 2; Abb. 20). In diesem Fall sollten die Promotoren der Zielgene unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu ArsR (HP0166) aufweisen. Die Promotoren der essentiellen Gene sollten Bindestellen mit einer höheren Affinität zu ArsR (HP0166) besitzen, als solche die von dem phosphorylierten Response-Regulator kontrolliert werden. Im Einklang zu dieser Hypothese steht, dass bereits Promotoren von nicht-essentiellen Zielgenen identifiziert wurden, die bevorzugt oder ausschließlich mit phosphoryliertem ArsR (HP0166) interagieren und hauptsächlich an der Säureregulation in *H. pylori* beteiligt sind (Dietz *et al.*, 2002; Forsyth *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2004; Pflock *et al.*, 2005). Es wurde zudem gezeigt, dass das ArsR/ArsS-Zweikomponentensystem negativ autoreguliert wird, wobei ArsR (HP0166) in der phosphorylierten Form stromabwärts seines eigenen Promotors bindet und sowohl seine eigene Expression als auch die der stromabwärts im gleichen Operon gelegenen Gene reprimiert (Dietz *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2006). Diese Autoregulation vermittelt vermutlich je nach vorherrschender Umweltsituation eine feine Ausbalancierung der in der Zelle vorhandenen Konzentration des Regulatorproteins und vermeidet so möglicherweise eine zu starke Stimulation der essentiellen Zielgene.

In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass ein mutierter *H. pylori*-Stamm, G27/0166D-52NΔ, der einzig ein Derivat von ArsR (HP0166) mit einer D52N Mutation der Receiver-Domäne exprimiert, lebensfähig ist. Durch die Mutation des Aspartatrestes der Position 52 zu Asparagin wurde in diesem ArsR (HP0166)-Derivat die einzige Phosphorylierungsstelle eliminiert, wie ein *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment mit den gereinigten Proteinen His<sub>6</sub>-0166D52N und GST-0165 demonstrierte. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese dass ArsR abhängig vom Phosphorylierungszustand



unterschiedliche Gruppen von Zielgenen kontrolliert, da die vorliegenden Ergebnisse darauf hinweisen, dass die Transkriptionskontrolle essentieller Gene durch den Response-Regulator ArsR (HP0166) Phosphorylierungs-unabhängig ist.

Ein ähnliches Phänomen wurde in Bezug auf die Response-Regulatoren AlgR und AlgB von *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben. Die beiden Response-Regulatoren sind an der Transkription von Genen beteiligt, welche für die Alginat-Synthese benötigt werden. Sowohl AlgR als auch AlgB regulieren die Alginat-Synthese im nicht-phosphorylierten Zustand, da gezeigt werden konnte, dass *P. aeruginosa*-Stämme, die Derivate von AlgR und AlgB mit Mutationen an den putativen Phosphorylierungsstellen exprimieren, in der Lage sind, Alginat zu synthetisieren (Ma *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Response-Regulator AlgR sowie die korrespondierende Histidin-Kinase FimS für die Regulation der Motilität in *P. aeruginosa* benötigt werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in diesem Fall der Response-Regulator AlgR im phosphorylierten Zustand die Motilität reguliert (Whitchurch *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel für das geschilderte Phänomen ist das DegU/S-Zweikomponentensystem aus *B. subtilis*. Der durch DegS phosphorylierte Response-Regulator DegU~P stimuliert unter anderem die Transkription von *aprE* und *nprE*, welche die wichtigsten extrazellulären Proteasen kodieren, und inhibiert die Expression oder die Aktivität des alternativen Sigmafaktors SigD. Im unphosphorylierten Zustand steigert DegU die Transkription von *comK*, einem Transkriptionsfaktor der an der Ausbildung von Kompetenzmechanismen beteiligt ist, indem der Response-Regulator an die Promotorregion dieses Gens bindet und außerdem den Transkriptionsfaktor ComK selbst an seinen eigenen Promotor rekrutiert (Dahl *et al.*, 1992; Hamoen *et al.*, 2000; Msadek *et al.*, 1990; Msadek *et al.*, 1995).

Die beiden Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 von *H. pylori*, die für ein normales Zellwachstum erforderlich bzw. essentiell sind, sind sehr ungewöhnlich. Zunächst findet man in der Aminosäuresequenz der Receiver-Domänen der beiden Response-Regulatoren an normalerweise hochkonservierten Positionen einige atypische Abweichungen von der sonst üblichen Konsensus-Sequenz (siehe E 3, Abb. 28 und Abb. 34). Ferner konnte für beide Response-Regulatoren benachbart im Genom keine zugehörige Histidin-Kinase identifiziert werden und zusätzlich wurde beschrieben, dass die Deletion der in *H. pylori* vorkommenden Histidin-Kinasegene *hp0244*, *arsS* (*hp0165*), *crdS* (*hp1364*) und *cheA* (*hp0392*) *in vitro* keinen Effekt auf das Wachstum von *H. pylori* haben (Beier & Frank, 2000; Foynes *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte *in vitro* kein Phosphotransfer von den Histidin-Kinasen HP0244, ArsS (HP0165) sowie von CheA (HP0392) auf die Response-Regulatoren beobachtet werden (Beier & Frank, 2000; Delany *et al.*, 2002b). Zwar konnte *in vitro* nicht untersucht werden, ob HP1043 oder HP1021 durch die Histidin-Kinase CrdS (HP1364) phosphoryliert werden, da die Aufreinigung des Proteins CrdS (HP1364) in löslicher Form nicht möglich war, man kann aber ausschließen, dass die Phosphorylierung

durch diese Kinase die Zellwachstums-assoziierten Funktionen von HP1021 und HP1043 vermittelt, da sich, wie zuvor erwähnt auch dieses Gen in *H. pylori* ohne Auswirkung auf das Zellwachstum deletieren lässt (Beier & Frank, 2000). Daher stellte sich die Frage, ob diese Response-Regulatoren gemäß dem Zwei-Komponenten-Paradigma mittels Phosphorylierung aktiviert werden oder ob eine Phosphorylierung für die Zellwachstums-assoziierten Funktionen der Response-Regulatoren keine Rolle spielt. Möglicherweise befinden sich die Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 in einer Konformation, die es den Response-Regulatoren erlaubt, ohne eine Phosphorylierung an ihre Zielpromotoren zu binden und ihre Wachstums-assoziierten Funktionen auszuführen.

In der Receiver-Domäne von HP1043 findet man an der Position des hochkonservierten Aspartatrestes D8 (entspricht D13 in CheY von *E. coli*) einen Lysinrest. Der nachfolgende Aminosäurerest, normalerweise ein Aspartatrest, ist durch einen Asparaginrest substituiert. In dem Protein FrzG aus *Myxococcus xanthus*, welches Homologien zu CheB aus *E. coli* aufweist, sowie in FlbD aus *C. crescentus*, einem NtrC ähnlichen Protein, das an der Expression der Flagellengene beteiligt ist, wurde ebenfalls diese atypische Abweichung von Aspartat nach Lysin beschrieben (McCleary *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1995). Allerdings wurden in beiden Proteinen, nicht aber in HP1043, noch zusätzliche Abweichungen an anderen hochkonservierten Positionen gefunden. Anstelle des Threonin- oder Serinrestes der Position 87 befindet sich in den genannten Response-Regulatoren ein Glycinrest, während der Lysinrest der Position 109 durch einen Leucinrest substituiert ist. Für den Response-Regulator FlbD konnte gezeigt werden, dass er *in vitro* in seiner unphosphorylierten Form als Transkriptionsaktivator wirken kann. Allerdings wurde eine Histidin-Kinase FlbE identifiziert, die in der Lage ist, den Response-Regulator FlbD zu phosphorylieren (Benson *et al.*, 1994; Wingrove & Gober, 1996; Wu *et al.*, 1995).

In diesem Zusammenhang interessant ist die Beobachtung, dass eine Asp13/Lys-Mutation den in die Chemotaxis involvierten Response-Regulator CheY von *E. coli*, unabhängig von der Phosphorylierung durch die zugehörige Histidin-Kinase CheA, in eine konstitutiv aktive Konformation bringt (Bourret *et al.*, 1993). Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob HP1043 als Folge der Asp8/Lys-Substitution in einer Konformation vorliegt, durch die das Protein bereits in der nicht phosphorylierten Form aktiv ist und die Expression seiner Zielgene kontrollieren kann. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings widerlegt werden, da mutierte Derivate von HP1043, die an den Positionen 8 und 9 der Receiver-Domäne der Konsensus-Sequenz entsprechen, den wildtypischen Response-Regulator funktionell ersetzen können. Das deutet darauf hin, dass die Abweichungen von der Konsensus-Sequenz nicht für die Ausbildung einer Phosphorylierungs-unabhängigen, aktiven Konformation erforderlich sind.

Im Response-Regulator HP1021 und den orthologen Proteinen aus *H. hepaticus* (HH1583), *C. jejuni* (CJ1608) und *W. succinogenes* (WS1939) findet man einen Serinrest S47 an der Position der potentiellen Phosphorylierungsstelle (Baar *et al.*, 2003; Martinez-Hackert & Stock, 1997; Parkhill *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2003; Tomb *et al.*, 1997), welche üblicherweise aus einem Aspartatrest besteht, vor. Bis dato konnten nur unter den  $\epsilon$ -Proteobakterien Response-Regulatoren identifiziert werden, die natürlicherweise eine entsprechende Sequenzabweichung tragen. Dazu zählen, neben den zuvor genannten Bakterien, *H. acinonychis* (Eppinger *et al.*, 2006) und *Thiomicrospira denitrificans* ([http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org\\_search=&org=nttd02](http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org_search=&org=nttd02)).

Es konnte allerdings ebenfalls gezeigt werden, dass die atypische Receiver-Sequenz keine Auswirkung auf die Wachstums-assoziierten Funktionen von HP1021 hat. Die in dieser Arbeit konstruierten *H. pylori*-Stämme G27/1021-S47 $\Delta$ , G27/1021-S48 $\Delta$  und G27/1021-S47S48DD $\Delta$ , in denen jeweils das wildtypische Gen *hp1021* deletiert ist, exprimieren mutierte Derivate von HP1021, die in der Sequenz ihrer Receiver-Domänen der Konsensussequenz angeglichen wurden. Diese *H. pylori*-Stämme zeigen ein normales Zellwachstum.

Aufgrund der ungewöhnlichen Charakteristika von HP1021 und HP1043 stellte sich die Frage, ob eine Phosphorylierung der beiden Response-Regulatoren *in vivo* essentiell für ihre Funktion ist.

In HP1043 findet man im Vergleich zu Orthologen aus *H. hepaticus* (HH1697), *C. jejuni* (CJ0355) und *W. succinogenes* (WS0306) an der Position der putativen Phosphorylierungsstelle ein Deletion von vier Aminosäuren (vgl. Abb. 86; Baar *et al.*, 2003; Martinez-Hackert & Stock, 1997; Parkhill *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2003; Tomb *et al.*, 1997). Allerdings befindet sich durch diese Deletion der Aspartatrest der Position 52, welcher der Position D62 in der Konsensus-Sequenz entspricht, in der Nähe der putativen Phosphorylierungsstelle und könnte dadurch als alternativer Phosphatgruppen-Akzeptor dienen. Zusätzlich findet man einen Serinrest S51 benachbart zu D52, der ebenfalls als Phosphatgruppen-Akzeptor fungieren könnte. Im Fall von HP1021, wie auch in den Orthologen aus *H. hepaticus* (HH1583), *C. jejuni* (CJ1608) und *W. succinogenes* (WS0306), ist der sonst übliche Phosphat-akzeptierende Aspartatrest der Position 47 durch einen Serinrest substituiert, der nachfolgende Aminosäurerest ist ebenfalls ein Serin (Baar *et al.*, 2003; Martinez-Hackert & Stock, 1997; Parkhill *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2003; Tomb *et al.*, 1997). Es wurde berichtet, dass in einem mutierten *E. coli*-Stamm, in dem das Chemotaxis-Protein CheY eine D57N Mutation aufweist, die zugehörige Histidin-Kinase CheA als Phosphatgruppen-Donor für CheY-D57N dienen kann, wobei die Phosphatgruppe auf einen der potentiellen Phosphorylierungsstelle benachbarten Serinrest S56 übertragen wird. Die Effizienz dieses Phosphotransfers ist allerdings stark reduziert (Appleby & Bourret, 1999). Serinreste kommen somit als potentielle Phosphatgruppen-Akzeptoren durchaus in Frage. Die *in vitro*-

Phosphorylierung von NtrC aus *E. coli* mit einer D54N Mutation an einem N-terminal zu Position 54 benachbarten Serinrest durch die Histidin-Kinase NtrB konnte ebenfalls beobachtet werden, während Derivate mit einer D54T bzw. D54Y Mutation *in vitro* nicht durch NtrB phosphoryliert werden (Moore *et al.*, 1993). Möglicherweise deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die Phosphorylierung eines Serinrestes nur in Gegenwart einer solchen benachbarten Aminosäure stattfinden kann, welche eine Carbonylgruppe enthält, die als Ligand für die Bindung von  $Mg^{2+}$  fungieren kann um die Phosphotransferreaktion zu katalysieren. Allerdings befindet sich weder in HP1021 noch in den Orthologen aus *H. hepaticus*, *C. jejuni* und *W. succinogenes* eine Aminosäure mit einer Carbonylgruppe in der direkten Nachbarschaft von S47 (siehe E 3, Abb. 34). Zusätzlich wurde beschrieben, dass der anti-sigma Faktor SpoIIAB aus *B. subtilis*, welcher Homologien zu Histidin-Kinasen zeigt, die Phosphorylierung eines Serinrestes des anti-anti-sigma Faktors SpoIIAA zu katalysieren vermag, wobei im Fall von SpoIIAA keinerlei Homologien zu einem Response-Regulator erkennbar sind (Min *et al.*, 1993). Wie dargelegt, könnte eine Phosphorylierung der Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 trotz ihrer abweichenden Struktur möglich sein.

Nachdem bislang keine Histidin-Kinasen für die Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 identifiziert werden konnten, stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung dieser Proteine durch kleine Moleküle wie Acetylphosphat, Carbamoylphosphat oder Phosphoramidat, die unter bestimmten Bedingungen in der Zelle akkumulieren, erfolgen könnte. Es ist seit langem bekannt, dass diese Moleküle als Phosphatgruppen-Donatoren für Response-Regulatoren fungieren können (Lukat *et al.*, 1992). Der niedermolekulare Phosphatgruppen-Donor Acetylphosphat ist *in vitro* eine Phosphatquelle für Response-Regulatoren und wird in der Bakterienzelle als ein Intermediat bei der Synthese von Acetat aus Acetyl-CoA und bei der reversen Reaktion (siehe E 4.2, Abb. 41) produziert (McCleary *et al.*, 1993). Im Genom von *H. pylori* J99 werden beide metabolischen Enzyme, Phosphotransacetylase (Pta) und Acetatkinase (AckA), die in diese Reaktionen involviert sind, kodiert. Die Gene für diese Enzyme findet man ebenfalls im Genom von *H. pylori* 26695, allerdings weisen beide Gene eine Frameshift-Mutation auf (Alm *et al.*, 1999; Tomb *et al.*, 1997). In einer früheren Arbeit wurde bereits beschrieben, dass unter den gewählten Bedingungen (Inkubationszeit von 30 Minuten) die gereinigten Proteine HP1043 und HP1021-R *in vitro* nicht durch radioaktiv markiertes Acetylphosphat phosphoryliert werden, während auf die gereinigten Proteine CrdR (HP1365) und ArsR (HP0166), wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz, ein Phosphotransfer beobachtet wurde (Schär, 2001; Schär *et al.*, 2005). In einem „time course“-Experiment konnte bei einer Variation der Inkubationszeit (15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten) ebenfalls kein Phosphotransfer auf die Proteine HP1043 und HP1021-R detektiert werden. Da die beiden Gene *pta* und *ackA* in *H. pylori* 26695 eine Frameshift-Mutation aufweisen und, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert, in *H. pylori* G27, ohne

das Zellwachstum zu beeinflussen, deletiert werden können, scheint es sehr unwahrscheinlich, dass eine Phosphorylierung durch Acetylphosphat eine Voraussetzung für die Zellwachstums-assoziierten Funktionen von HP1021 und HP1043 ist. Es wäre denkbar, dass sich HP1021 und HP1043 nicht durch Acetylphosphat, sondern durch eine entsprechende bislang unbekannte Kinase oder andere niedermolekulare Phosphatgruppen-Donatoren phosphorylieren lassen. So sind z.B. die Gene *pyrAa* (*hp1237*) und *pyrAb* (*hp0919*), deren Produkte die Biosynthese von Carbamoylphosphat, einem weiteren putativen Phosphatgruppen-Donor für Response-Regulatoren, katalysieren, beide sowohl in *H. pylori* 26695 als auch in J99 vorhanden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass Derivate von HP1043 mit unterschiedlichen Mutationen der Phosphorylierungsstelle, z.B. HP1043-S51N, HP1043-D52N oder HP1043-S51D52AN, den wildtypischen Response-Regulator HP1043 funktionell ersetzen können. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Phosphorylierung von S51 oder D52 nicht entscheidend für die essentielle Funktion des Proteins ist.

Gestützt wird dieses Ergebnis von einer weiteren Beobachtung. Das Genom von *C. jejuni* kodiert den Response-Regulator CJ0355, welcher vor allem im Bereich der Output-Domäne mit circa. 85 % eine sehr ausgeprägte Ähnlichkeit zu HP1043 aufweist (Parkhill *et al.*, 2000). Interessanterweise ist CJ0355 ebenfalls ein atypischer „orphan“ Response-Regulator, für den bislang keine zugehörige Histidin-Kinase identifiziert wurde. In der Receiver-Domäne ist der konservierte, Phosphatgruppen-akzeptierende Aspartatrest durch einen Asparaginrest ersetzt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Ortholog, welches natürlicherweise einen nicht-phosphorylierbaren Aminosäurerest an Position der potentiellen Phosphorylierungsstelle trägt, in der Lage ist HP1043 funktionell in *H. pylori* zu ersetzen. Hierzu wurde, um die Expression von CJ0355 in *H. pylori* zu garantieren, das Gen *cj0355* mit dem  $P_{hp1043}$ -Promotor fusioniert und diese Fusion in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert. Im resultierenden *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{hp1043}$ -*cj0355* wurde das Gen *hp1043* deletiert und lebensfähige Transformanten demonstrierten, dass der ORF *cj0355* die Deletion von *hp1043* komplementieren kann.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass eine Phosphorylierung der Serinreste S47 und S48 von HP1021 für die Wachstums-assoziierte Funktion des Response-Regulators keine Rolle spielt, da eine Inaktivierung von *hp1021* durch die Komplementation mittels mutierter *hp1021*-Allele, die keine potentiellen Phosphorylierungsstellen mehr aufweisen, prinzipiell möglich war. Erstaunlicherweise waren für diesen Zweck jedoch nicht alle Aminosäure-Substitutionen der beiden Serinreste geeignet. Nur die mutierten Derivate HP1021-S47N, HP1021-S48N, HP1021-S47S48AA und HP1021-S47S48NA konnten den wildtypischen Response-Regulator in seiner Funktion ersetzen, während die Derivate HP1021-S47S48-NN, HP1021-S47S48-NL und HP1021-

S47S48-MN dazu nicht in der Lage waren. Warum diese Derivate den wildtypischen Response-Regulator funktionell nicht ersetzen konnten ist unklar, möglicherweise könnten die genannten Aminosäure-Kombinationen durch sterische Hinderung eine stark veränderte Proteinkonformation bewirken.

Da in den beschriebenen *in vivo*-Komplementations-Experimenten ausschließlich der Wachstumsphänotyp als Indikator für die Funktionalität der Response-Regulatoren diente, kann anhand der durchgeführten Experimente allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 im phosphorylierten Zustand weitere Zielgene kontrollieren, die nicht für ein normales Zellwachstum von *H. pylori* entscheidend sind, wie dies für das ArsR/S-Zwei-Komponentensystem von *H. pylori* beschrieben wurde (Dietz *et al.*, 2002; Forsyth *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2004; Pflock *et al.*, 2006; Pflock *et al.*, 2005).

Im Fall von HP1021 konnten in einer massenspektrometrischen Analyse allerdings keine Hinweise auf eine Serinphosphorylierung des über 2D-Gelelektrophorese identifizierten Proteins HP1021 gefunden werden. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass eine Phosphorylierung von S47 und S48 nicht entscheidend für die regulatorischen Funktionen von HP1021 ist und steht somit im Einklang mit dem gegenwärtigen Verständnis des Phosphotransfers auf die Receiver-Domäne von Response-Regulatoren, da in der Receiver-Domäne von HP1021 benachbart zu den Serinresten S47 und S48 keine Aminosäure mit einer Carbonyl-Seitenkette vorzufinden ist.

Da gezeigt wurde, dass die Phosphorylierung der Receiver-Domäne der Response-Regulatoren HP1021, HP1043 und ArsR (HP0166) keine Voraussetzung für die Zellwachstums-assoziierten Funktionen dieser Response-Regulatoren ist, resultierte daraus die Fragestellung, ob die isolierten Output-Domänen der Response-Regulatoren HP1021, HP1043 und ArsR (HP0166) in Abwesenheit der entsprechenden regulatorischen Receiver-Domäne die Transkriptionskontrolle der jeweiligen Zielgene erlauben. Aus diesem Grund wurden die Gensequenzen der Output-Domänen von HP1021, HP1043 und ArsR (HP0166) mit den entsprechenden Promotoren  $P_{hp1018}$ ,  $P_{hp1043}$  bzw.  $P_{hp0166}$  fusioniert und die jeweilige Gen/Promotor-Fusion in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert. Durch die anschließende Deletion der wildtypischen Response-Regulatorgene sollte untersucht werden, ob die isolierten Output-Domänen die Funktion des jeweiligen Response-Regulators übernehmen können. Dieser Versuchsansatz erwies sich jedoch als problematisch, da die Transformation der *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{hp1018}$ -1021-O, G27/ $P_{hp1043}$ -1043-O und G27/ $P_{hp0166}$ -0166-O mit dem entsprechenden „knock-out“-Plasmid zur Deletion des jeweiligen wildtypischen Response-Regulatorgens keine Transformanten lieferte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die isolierte Output-Domäne den Response-Regulator funktionell nicht ersetzen kann. Dieser Vermutung widerspricht allerdings zunächst die

Tatsache, dass in Western-Blot-Analysen die Proteine HP1021-O, HP1043-O und HP0166-O in diesen *H. pylori*-Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist zwar denkbar, dass die polyklonalen HP1021-, HP1043- bzw. ArsR-spezifischen Antikörper ihre spezifischen Epitope in HP1021, HP1043 bzw. ArsR (HP0166) durch die Abspaltung der Receiver-Domäne in den Proteinen HP1021-O, HP1043-O bzw. HP0166-O nicht mehr erkennen und somit eine mögliche Expression der Proteine über Western-Blot-Analyse nicht mehr nachgewiesen werden kann, allerdings scheint diese Erklärung wenig wahrscheinlich. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass ein Nachweis ausbleibt, da die Proteine nicht stabil exprimiert werden, obwohl die entsprechende Gensequenz mit dem zugehörigen Promotor fusioniert wurde und somit transkribiert werden sollte. Anhand dieser Versuche konnte letztlich keine klare Aussage getroffen werden, ob die isolierten Output-Domänen die Response-Regulatoren HP1021, HP1043 und ArsR (HP0166) in ihren Funktionen ersetzen können.

In den zu *H. pylori* nah verwandten Bakteriengattungen *C. jejuni* und *W. succinogenes* findet man Orthologe der Response-Regulatoren HP1043, HP1021 und ArsR (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997). Da gezeigt wurde, dass das Ortholog CJ0355 die Deletion von *hp1043* in *H. pylori* komplementieren kann, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob weitere orthologe Proteine aus *C. jejuni* bzw. *W. succinogenes* die jeweiligen Response-Regulatoren in *H. pylori* funktionell ersetzen können. Hierzu wurden *H. pylori*-Stämme konstruiert, die jeweils eines der orthologen Response-Regulatorgene unter Kontrolle des entsprechenden Promotors aus *H. pylori* im *cag*-Lokus tragen, um anschließend das *H. pylori*-spezifische Response-Regulatorgen in diesen *H. pylori*-Stämmen deletieren zu können.

In *W. succinogenes* findet man das Ortholog WS0306 welches Ähnlichkeiten (ca. 64 %) zu HP1043 aufweist. Im Unterschied zu HP1043 und CJ0355 wird benachbart zu WS0306, welches in der kompletten Receiver-Domäne keine Abweichungen von der Konsensus-Sequenz aufweist, im Genom von *W. succinogenes* eine Histidin-Kinase WS0305 kodiert (siehe E 7.1, Abb. 63). Die Promotor/Gen-Fusion  $P_{hp1043}/ws0306$  wurde in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert um anschließend *hp1043* zu deletieren. In diesem Fall allerdings resultierten aus der Transformation von *H. pylori* G27/ $P_{hp1043}$ -ws0306-Cm mit dem entsprechenden „knock-out“-Plasmid keine lebensfähigen Transformanten. Die Transkription von *ws0306* in diesem Stamm wurde nachgewiesen, es konnte aber nicht überprüft werden, ob das Protein WS0306 tatsächlich exprimiert wird, da ein Western-Blot-Experiment nicht die gewünschte Aussage liefern würde. Der Grund hierfür ist, dass die Proteine HP1043 und WS0306 beide mit dem HP1043-spezifischen Antikörper reagieren und sich auf einem SDS-Polyacrylamidgel anhand des etwa gleich großen Molekulargewichts (ca. 26 kDa) im Laufverhalten nicht unterscheiden.

Die Orthologe CJ1608 (*C. jejuni*) und WS1939 (*W. succinogenes*) von HP1021 weisen vor allem in der Output-Domäne im Bereich des „Helix-Turn-Helix“-Motivs ausgeprägte

Homologien auf (vgl. E 7.2, Abb. 67), HP1021 und CJ1608 sind zu 57 % und HP1021 und WS1939 zu 63 % homolog (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Tomb *et al.*, 1997). In allen drei Proteinen ist der in der Konsensus-Sequenz hochkonservierte Aspartatrest der potentiellen Phosphorylierungsstelle (Position 47) durch einen Serinrest substituiert. Das Ortholog von ArsR (HP0166) aus *W. succinogenes* ist der Response-Regulator WS1817, wobei man eine Ähnlichkeit von 82 % zwischen diesen beiden Response-Regulatoren findet. Die Gene *cj1608* und *ws1939* sowie *ws1817* wurden mit dem entsprechenden Promotor  $P_{hp1018}$  bzw.  $P_{hp0166}$  fusioniert und die Fusionen in den *cag*-Lokus integriert um anschließend das Gen *hp1021* bzw. *arsR* (*hp0166*) zu deletieren. Die Transformation der *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{hp1018}$ -*cj1608*-Cm, G27/ $P_{hp1018}$ -*ws1939*-Cm und G27/ $P_{hp0166}$ -*ws1817*-Cm mit dem entsprechenden „knock-out“-Plasmid zur Deletion von *hp1021* bzw. *arsR* (*hp0166*) lieferte in mehreren Ansätzen keine Transformanten. Hieraus kann man zunächst schließen, dass die Proteine CJ1608, WS1939 das jeweilige Ortholog in *H. pylori* funktionell nicht ersetzen können. Es stellte sich allerdings heraus, dass in den *H. pylori*-Stämmen G27/ $P_{hp1018}$ -*cj1608*, G27/ $P_{hp1018}$ -*ws1939* und G27/ $P_{hp0166}$ -*ws1817* keine Transkription des jeweiligen Response-Regulatorgens *cj1608*, *ws1939* bzw. *ws1817* stattfand, obwohl die Gene mit den entsprechenden *H. pylori*-Promotoren fusioniert wurden und somit eine Transkription der Gene sichergestellt sein sollte. Aus welchem Grund die Transkription dieser Gene nicht detektiert werden konnte, ist bislang ungeklärt. Möglicherweise ist die mRNA sehr instabil und kann daher in einem „Primer-Extension“-Experiment nicht mehr nachgewiesen werden. Um eine Aussage darüber treffen zu können ob die Response-Regulatoren Cj1608, WS1939 und WS1817 das jeweilige Ortholog in *H. pylori* funktionell ersetzen können müssten weitere Experimente durchgeführt werden, da der gewählte Lösungsansatz ungeeignet war.

Aufgrund der Tatsache, dass der Response-Regulator HP1043 essentiell ist und der Response-Regulator HP1021 eine bedeutende Rolle für das Zellwachstum von *H. pylori* spielt (Beier & Frank, 2000; Schär, 2001), stellte sich die Frage, ob die orthologen Proteine CJ0355 und CJ1608 in *C. jejuni* 4344 ebenfalls entsprechende Funktionen erfüllen. Daher sollten diese beiden Gene in *C. jejuni* inaktiviert werden. Zur Inaktivierung der zu untersuchenden Gene wurden „knock-out“-Plasmide konstruiert, um über homologe Rekombination eine Kan<sup>r</sup>-Kassette in den jeweiligen ORF von *C. jejuni* 4344 zu inserieren. Nach Transformation des *C. jejuni*-Stammes 4344 mit den entsprechenden „knock-out“-Plasmiden konnten Transformanten erhalten werden, die auf den Kan-haltigen Selektions-Agarplatten wuchsen. Allerdings zeigte sich, dass in keiner der Transformanten eine korrekte Insertion der Kan<sup>r</sup>-Kassette in die Gene *cj0355* bzw. *cj1608* stattgefunden hatte, da in einer PCR-Analyse nur Produkte amplifiziert wurden, die dem Wildtyp entsprachen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass nur eine einfache homologe Rekombination stattgefunden hat und somit jeweils eine intakte und eine durch Insertion der Kan<sup>r</sup>-Kassette



inaktivierte Kopie des Response-Regulatorgens im Chromosom der Transformanten vorliegen. PCR-Fragmente, die sich von der intakten Genkopie ableiten werden aufgrund ihrer geringeren Länge bevorzugt amplifiziert. Diese Ergebnisse sind möglicherweise Hinweise darauf, dass sich die Gene *cj0355* und *cj1608* in *C. jejuni* 4344 nicht deletieren lassen und somit vermutlich essentiell für das Zellwachstum von *C. jejuni* 4344 sind.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung des Serinrestes der Position 47 von HP1021 sowie eine Phosphorylierung des Aspartatrestes D52 bzw. des Serinrestes S51 von HP1043 für die Zellwachstums-assoziierten bzw. essentiellen Funktionen der Response-Regulatoren HP1021 bzw. HP1043 nicht benötigt wird. Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, ob und wie die Aktivierung dieser Response-Regulatoren erreicht wird. Um die Rolle der Expressions-Kontrolle für die Funktionen der Response-Regulatoren zu untersuchen, wurden merodiploide *H. pylori*-Stämme konstruiert, in denen eine zusätzliche Kopie von *hp1021* bzw. *hp1043* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven starken Promotors  $P_{cagA}$  in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert ist und anschließend untersucht, ob es möglich ist das Gen *hp1021* bzw. *hp1043* am wildtypischen Genlokus ohne Auswirkung auf das normale Zellwachstum zu deletieren. Die merodiploiden *H. pylori*-Stämme G27/ $P_{cagA}$ -1043-kan und G27/ $P_{cagA}$ -1021-kan sollten zusätzlich in Transkriptom- bzw. Proteomanalysen eingesetzt werden, um potentielle Zielgene von HP1021 und HP1043 zu identifizieren. Die konstruierten *H. pylori*-Stämme sollten sich in ihrem Transkriptions- bzw. Expressionsprofil von einem wildtypischen *H. pylori*-Stamm unterscheiden, da die Überexpression eine veränderte Transkription ihrer Zielgene nach sich ziehen sollte. Potentielle Zielgene der Response-Regulatoren wären bei einer Überexpression der Response-Regulatoren induziert oder reprimiert.

Der *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{cagA}$ -1021-kan zeigte normales Zellwachstum und auf Proteinebene war eine eindeutige Überexpression von HP1021 detektierbar. Die wildtypische Genkopie von *hp1021* konnte anschließend ohne Auswirkung auf das Zellwachstum deletiert werden. Es wurden weitere Experimente beschrieben, in denen die Transkription von *hp1021* unter der Kontrolle der Eisen-abhängigen Promotoren  $P_{pfr}$  bzw.  $P_{fecA}$  analysiert wurde. Die Transkription ausgehend von den Promotoren  $P_{pfr}$  und  $P_{fecA}$  wird durch den Eisenaufnahme Regulator Fur reguliert (Bereswill *et al.*, 2000; van Vliet *et al.*, 2002b). Der Promotor  $P_{pfr}$  ist bei hohen Eisenkonzentrationen stark dereprimiert und kontrolliert die Transkription des Ferritin-Gens *pfr*, dessen Genprodukt an der intrazellulären Eisenspeicherung beteiligt ist (Delany *et al.*, 2001b).  $P_{fecA}$  ist bei hohen intrazellulären Eisenkonzentrationen reprimiert und reguliert die Transkription eines Orthologs des *fecA*-Gens (*fecA2*, *hp0807*), das einen Eisencitrat-Rezeptor kodiert, der bei der  $Fe^{3+}$ -Aufnahme beteiligt ist (van Vliet *et al.*, 2002b). Eine Fusion der Promotoren  $P_{pfr}$  bzw.  $P_{fecA}$  mit dem Gen *hp1021* konnte in den *cag*-Lokus von *H. pylori* G27 integriert werden. Die anschließende Deletion der wildtypischen Genkopie von *hp1021* hatte keine negative Beeinflussung des

Zellwachstums zur Folge (Müller *et al.*, in press). Die Beobachtung, dass drei verschiedene Promotoren,  $P_{cagA}$ ,  $P_{pfr}$  und  $P_{fecA}$  die Transkription von *hp1021* kontrollieren können, ohne den Wachstums-Phänotyp der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu verändern, weist darauf hin, dass eine strikte Transkriptionsregulation von *hp1021* nicht entscheidend normales Zellwachstum von *H. pylori* ist. Allerdings muss noch ermittelt werden, ob eine bislang unbekannte Modifikation des Response-Regulators HP1021 zur Modulation seiner Aktivität benötigt wird, um ein normales Zellwachstum zu ermöglichen.

Der *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{cagA}$ -1043-kan zeigte einen normalen Wachstums-Phänotyp, allerdings konnte trotz stark erhöhter Transkription von *hp1043* unter Kontrolle des  $P_{cagA}$ -Promotors keine Steigerung der Expression auf Proteinebene detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine post-transkriptionelle Expressionskontrolle von HP1043 hin. Dieselben Ergebnisse resultierten aus dem Versuch, den Promotor  $P_{cagA}$  durch die Promotoren  $P_{pfr}$  und  $P_{fecA}$  zu ersetzen (Müller *et al.*, in press). Delany *et al.* beschrieben die gleichen Beobachtungen mit einem *H. pylori*-Stamm, in welchem eine Fusion von  $P_{pfr}$  und *hp1043* das Gen *vacA* substituiert und postulierten ebenfalls einen post-transkriptionellen Mechanismus der die Expression von *hp1043* beeinflusst (Delany *et al.*, 2002b). Eine *in silico* Analyse zeigte, dass die nicht-translatierte „leader-sequence“ der *hp1043*-mRNA eine nicht perfekte „inverted-repeat“-Sequenz (AAUUACUCUUAAAUGCGGGAGUCAUA) beinhaltet, welche die mRNA eventuell in eine Sekundärstruktur mit einem „stem loop“ faltet. Eine solche Sekundärstruktur verhindert möglicherweise die Anlagerung des Ribosoms an die Ribosomenbindestelle. Ein bekannter Mechanismus um die Faltung einer RNA in inhibitorische Strukturen zu regulieren erfordert die Mitwirkung von kleinen regulatorischen RNAs. Bislang wurden in *H. pylori* keine kleinen regulatorischen RNAs identifiziert, obwohl ein Ortholog von CsrA aus *E. coli*, das in *E. coli* mit den regulatorischen RNAs *csrB* und *csrC* interagiert, entdeckt wurde. In der Literatur wurde beschrieben, dass in *H. pylori* das Protein CsrA die Antwort auf Umweltstress kontrolliert und die Expression von Virulenzfaktoren moduliert, indem es die Prozessierung und Translation von Target-Transkripten beeinflusst (Barnard *et al.*, 2004). Ein möglicher Einfluss von CsrA auf die post-transkriptionelle Kontrolle von *hp1043* muss allerdings noch untersucht werden.

Allerdings scheint es sehr unwahrscheinlich dass die Regulation von *hp1043* über die Ausbildung der beschriebenen „stem loops“-Struktur stattfindet, da in der von Delany *et al.* konstruierten Mutante mit der Promotor/Gen-Fusion die genannte „inverted repeat“-Sequenz nicht vorkommt und auch in diesem *H. pylori*-Stamm keine verstärkte Expression des Proteins HP1043 detektierbar war.

Es könnte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Regulation der Konzentration von HP1043 in der Zelle auf post-translationellem Level durch regulierte Proteolyse stattfinden könnte. In *H. pylori* wurden mehrere Gene für Proteasen annotiert,

darunter *clpA* (*hp0033*), *lon* (*hp1379*) und *sms* (*hp0223*), die möglicherweise an post-translationalen Regulations-Prozessen von Proteinen beteiligt sind (Tomb *et al.*, 1997).

Die Deletion des *hp1043*-Gens am wildtypischen Locus war in dem *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{cagA}$ -1043-Cm, welcher die zusätzliche Promotor/Gen-Fusion  $P_{cagA}/hp1043$  im *cag*-Locus enthält nicht möglich. Die Transformation des *H. pylori*-Stammes G27/ $P_{pfr}$ -1043 mit demselben „knock-out“-Plasmid zur Deletion der wildtypischen Genkopie von *hp1043* führte ebenfalls zu keinen Transformanten, wohingegen die Transformation von G27/ $P_{fecA}$ -1043 Transformanten ergab. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ein normales Zellwachstum nicht möglich ist, wenn die Transkription von *hp1043* unter der alleinigen Kontrolle von  $P_{cagA}$  bzw.  $P_{pfr}$  steht, obwohl in den entsprechenden merodiploiden *H. pylori*-Stämmen gezeigt wurde, dass HP1043 auf Proteinebene nicht überexprimiert wurde.

Anhand dieser Daten kann man davon ausgehen, dass zusätzlich zu einer post-transkriptionellen und/oder post-translationalen Regulation eine wohl definierte Regulation der *hp1043*-Transkription zur Expressionskontrolle von HP1043 beiträgt. Delany *et al.*, postulieren aufgrund der *in vitro* beobachteten Bindung von HP1043 an den eigenen Promotor eine Autoregulation von HP1043. Zusätzlich konnten sie beobachten, dass die Transkription von *hp1043* in der frühen logarithmischen Phase am stärksten ist und in der stationären Phase abfällt (Delany *et al.*, 2002b). Diese Wachstumsphasen-abhängige Regulation der *hp1043*-Transkription wurde jedoch in einer globalen Transkriptom-Analyse nicht detektiert (Thompson *et al.*, 2003). Interessanterweise zeigte das Transkriptionsprofil, dass die Transkription von *cagA* und *pfr* zu Beginn der stationären Phase induziert wurde, während die Transkription von zwei *fecA*-Orthologen, *fecA1* (*hp0686*) und *fecA3* (*hp1400*) zu diesem Zeitpunkt reprimiert war (Thompson *et al.*, 2003). Folglich könnte ein unterschiedliches Transkriptions-Profil der Promotoren  $P_{fecA}$ ,  $P_{cagA}$  und  $P_{pfr}$  der Grund dafür sein, dass der  $P_{hp1043}$ -Promotor durch  $P_{fecA}$  ersetzt werden kann, nicht aber durch die Promotoren  $P_{cagA}$  und  $P_{pfr}$ .

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mechanismen mit denen die Expression von *hp1043* auf post-translationalem bzw. post-transkriptionellem Level kontrolliert wird auch auf das Ortholog *cj0355* übertragbar sind. Das Gen *cj0355* wurde unter der Kontrolle von  $P_{cagA}$  in den *cag*-Locus von *H. pylori* G27 integriert und es wurde überprüft, ob das Gen überexprimiert wird. Obwohl in einem „Primer-Extension“-Experiment mit dem *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{cag2}$ -*cj0355* große Mengen an *cj0355*-spezifischem Transkript detektiert wurden, waren keine vergleichbar erhöhten Mengen des Proteins CJ0355 in diesem Stamm nachweisbar. Zudem war die Deletion von *hp1043* in diesem *H. pylori*-Stamm nicht möglich.

Zur Identifizierung von Zielgenen der Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 sollten die zuvor konstruierten *H. pylori*-Stämme eingesetzt werden, die das jeweilige Response-Regulatorgen überexprimieren. Wie sich herausstellte war der *H. pylori*-Stamm G27/ $P_{cagA}$ -1043-Kan für die weiteren Proteomanalysen uninteressant, da keine Überexpression des

Proteins HP1043 stattfand. Der *H. pylori*-Stamm G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan hingegen konnte eingesetzt werden, da wie zuvor geschildert eine eindeutige Überexpression von HP1021 detektierbar war. Parallel zu G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan wurde das Proteom des *H. pylori*-Stammes 26695 1021Δ analysiert, dessen Konstruktion mittlerweile gelungen war. In diesem *H. pylori*-Stamm ist der ORF *hp1021* deletiert (Pflock *et al.*, 2004). Die Gesamtzellproteine der *H. pylori*-Stämme G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan und 26695 1021Δ wurden mittels 2D-Gel-elektrophorese aufgetrennt und anschließend die erhaltenen Proteinmuster mit denen der entsprechenden Wildtyp-Stämme G27 bzw. 26695 verglichen.

Beim Vergleich der Expressionsmuster der *H. pylori*-Stämme G27 und G27/P<sub>cagA</sub>-1021-Kan konnten zwei Proteine detektiert werden, die eindeutig und reproduzierbar differentiell exprimiert waren. Bei den Proteinen handelt es sich um HP1021 und CagA, von denen eine differentielle Expression erwartet wurde.

In den 2D-Karten der *H. pylori*-Stämme 26695 und 26695 1021Δ konnten reproduzierbar 12 Proteinspots detektiert werden, die in der Deletionsmutante 26695 1021Δ im Vergleich zum Wildtyp 26695 schwächer oder nicht exprimiert erschienen. In einer MALDI-ToF-Analyse konnten 5 der detektierten Spots analysiert werden (siehe Tab. 40).

Die verwendete Methodik unterlag einigen Einschränkungen, wodurch dieses Ergebnis vermutlich nicht das komplette veränderte Proteom der verglichenen *H. pylori*-Stämme repräsentiert. Zum einen wurden für die vergleichende Proteomanalyse nur Proteine aufgetrennt, deren isoelektrischer Punkt innerhalb des pH-Bereiches 6-9 lag. Vermutlich reguliert HP1021 noch weitere Gene, deren Proteinprodukte nicht innerhalb dieses pH-Bereichs aufgetrennt werden. Um einen umfassenderen Überblick zu erhalten, welche Proteine durch den Response-Regulator HP1021 kontrolliert werden, sollten die Gesamtzellproteine in einem größeren pH-Bereich aufgetrennt werden (z.B. pH 3-10). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den durch HP1021 kontrollierten Proteinen nicht nur um zelluläre, sondern auch um sezernierte Proteine handelt. *H. pylori* ist in der Lage Proteine zu sezernieren, es wurden für *H. pylori* neben einem TypIV-Sekretionssystem auch Autotransporter beschrieben (reviewed in Ilver *et al.*, 2001). Eine Analyse der Proteinmuster der Überstandsproteine sollte zumindest mit den *H. pylori*-Stämmen 26695 und 26695 1021Δ durchgeführt werden.

Es handelt sich bei den in der Deletionsmutante reprimierten Proteinen neben dem Protein HP1021 um die Proteine FadA (Acetyl-CoA Acetyltransferase; 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase), HP0695 (HyuA, Hydantoin-Verwertungsprotein), HdhA (7-alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase) und KatA (Katalase). Bislang wurden in Zusammenhang mit diesen Proteinen in *H. pylori* keine Zellwachstums-assoziierten Funktionen beschrieben, wodurch man den „small-colony“-Wachstumsdefekt bei einer Deletion von *hp1021* erklären könnte. Eine vergleichende Transkriptomanalyse der *H. pylori*-Stämme 26695 und 26695 1021Δ bestätigte weitestgehend die in dieser Arbeit erhaltenen Proteomdaten. Die Gene *hp0695*,

*fadA* sowie *kata* werden in dem Deletions-Stamm 26695 1021Δ deutlich schwächer exprimiert. Zusätzlich konnte durch eine Northern-Slot-Blot-Analyse bestätigt werden, dass die Transkription von *kata* und *fadA* in dem Deletions-Stamm erniedrigt ist, ein „Primer-Extension“-Experiment verifizierte die reduzierte Transkription von *hp0695* in 26695 1021Δ (Pflock *et al.*, in preparation).

Das Gen *hdhA* wurde in der beschriebenen Transkriptomanalyse als nicht reguliert identifiziert, woraus man schlussfolgern kann, dass dieses Protein einer post-transkriptionellen Regulation unterliegt. Über das Genprodukt HdhA ist bislang nur bekannt, dass es primäre Gallensäuren in sekundäre Gallensäuren umwandelt, indem es den Hydroxyl-Rest der Position 7 abspaltet (Yoshimoto *et al.*, 1991). Die Katalase spielt in *H. pylori* eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von toxischen Sauerstoffradikalen (Hazell *et al.*, 1991; Odenbreit *et al.*, 1996).

Das Protein FadA ist in *E. coli* am Fettsäureabbau (Weeks *et al.*, 1969) beteiligt. Bei der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren sind in *E. coli* mehrere Enzyme beteiligt. Der erste Schritt bei der  $\beta$ -Oxidation ist die Aktivierung der freien Fettsäuren, wobei die Fettsäuren durch eine Acyl-CoA-Synthetase in einen Acyl-CoA-Thioester umgesetzt wird. Die nächsten Schritte involvieren vier weitere Enzyme, die Acetyl-CoA-Dehydrogenase, die Enoyl-CoA-Hydratase, die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase. Im Genom von *H. pylori* findet man nur die Gene für zwei dieser Enzyme. Zum einen *fadA* (*hp0690*), welches die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase kodiert und zum anderen das Gen *acoE* (*hp1045*), dessen Produkt die Acyl-CoA-Synthetase ist. Da nur diese beiden Gene vorhanden sind, ist es fraglich, ob eine  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in *H. pylori* stattfindet. Dem Protein FadA wurde in *H. pylori* aber eine mögliche Rolle in der Fettsäure-Biosynthese zugeschrieben, wo es die Funktion des in *H. pylori* fehlenden Enzyms Acetyl-CoA:ACP-Transacylase übernehmen könnte (reviewed in Marais *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde beschrieben, dass die Gene *lpsI* und *lpsJ* aus *Xanthomonas campestris*, deren Produkte Sequenz-Homologien zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von 3-Oxoacid CoA-Transferasen aufweisen, an der LPS-Biosynthese beteiligt sind (Steinmann *et al.*, 1997).

Das Protein HP0695 wurde zunächst als ein Hydantoin-Verwertungsprotein HyuA annotiert (<http://www.tigr.org>), welches in dem *Pseudomonas sp.*-Stamm NS671 an der Aminosäurebiosynthese beteiligt ist (Watabe *et al.*, 1992). Allerdings zeigten spätere BLAST-Analysen, dass es sich bei dem Protein mit großer Wahrscheinlichkeit um die  $\beta$ -Untereinheit einer Aceton-Carboxylase handelt (Pflock *et al.*, in preparation; Sluis *et al.*, 2002). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von Aceton-Carboxylasen weisen prinzipiell eine 15 bis 30 %ige Ähnlichkeit zu Hydantoinasen auf (Sluis *et al.*, 2002). Die Aceton-Carboxylasen aus den Bakterienstämmen *Xanthobacter autotrophicus* Py2 und *Rhodobacter capsulatus* B10 sind multimere Enzyme, bestehend aus drei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ). Beide Enzyme katalysieren die ATP-abhängige Carboxylierung von Aceton zu Acetoacetat (Ensign *et al.*, 1998). In beiden Bakterienstämmen konnte gezeigt werden, dass die Gene, welche die drei

Untereinheiten der Aceton-Carboxylase kodieren, in einem Operon, bestehend aus den Genen *acxABC* vorliegen. Die Gene der Untereinheiten liegen innerhalb des jeweiligen Operons in der Reihenfolge  $\beta, \alpha, \gamma$  vor. Direkt „upstream“ des *acx*-Operons wurde in *X. autotrophicus* das Gen eines  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkriptionsaktivators AcxR identifiziert. Durch BLAST-Analysen des *R. capsulatus*-Genoms konnte auch in diesem Bakterium ein ORF, 120 bp „upstream“ des Aceton-Carboxylase-Operons, detektiert werden, der einen putativen Transkriptionsaktivator RRC02655 kodiert. Dieser putative Transkriptionsaktivator ist zu 33,8 % identisch mit AcxR und weist das gleiche Molekulargewicht auf (Boyd *et al.*, 2004; Boyd & Ensign, 2005; Sluis & Ensign, 1997; Sluis *et al.*, 2002). Interessanterweise findet man im Genom von *H. pylori* benachbart zum Gen *hp0695* die Gene *hp0696* und *hp0697* (ursprünglich annotiert als N-Methylhydantoinase und als ein hypothetisches Protein), deren Genprodukte in einer BLAST-Analyse starke Homologien zu der  $\alpha$ - bzw. der  $\gamma$ -Untereinheit der Aceton-Carboxylase aufzeigen. In *H. pylori* findet man somit wie in *X. autotrophicus* und in *R. capsulatus* die entsprechenden Gene innerhalb des Operons in der Reihenfolge  $\beta, \alpha, \gamma$  angeordnet. Die Analyse des *H. pylori* Genoms ergab allerdings keinerlei Hinweise auf einen ORF, der einen zu AcxR homologen Transkriptionsaktivator kodiert (Sluis *et al.*, 2002; Tomb *et al.*, 1997), möglicherweise übernimmt HP1021 in *H. pylori* die Funktionen dieses Regulators.

Neben einer erniedrigten Transkription von *hp0695* und *fadA* konnte in einer Transkriptomanalyse zusätzlich eine erniedrigte Transkription der nachfolgenden Gene des jeweiligen putativen Operons (*hp0691-hp0693* bzw. *hp0696-hp0697*) detektiert werden. Somit scheinen die Gene der putativen Untereinheiten der Aceton-Carboxylase alle in dem HP1021-Deletionsstamm schwächer als im wildtypischen *H. pylori*-Stamm transkribiert zu sein. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass *H. pylori* in der Lage ist mit Hilfe der Aceton-Carboxylase Aceton in Acetoacetat umzuwandeln. Aceton wird anschließend möglicherweise durch die Produkte des Operons *hp0690-hp0693* weiter zu Acetyl-CoA metabolisiert, welches in weitere Stoffwechselwege von *H. pylori* eingeschleußt werden kann. Hierbei wandelt die Succinyl-CoA:Acetoacetat-CoA-Transferase (kodiert von den Genen *hp0691* und *hp0692*) Acetoacetat in Acetoacetyl-CoA um, Acetoacetyl-CoA kann anschließend durch die Thiolase (*fadA* bzw. *hp0690*) bei gleichzeitiger Anlagerung eines Molekül HS-CoA in zwei Moleküle Acetyl-CoA gespalten werden (siehe Abb. 88) und in dieser Form in nachfolgende Stoffwechselwege eingebracht werden.

Das Gen *hp0693*, welches sich in einem Operon mit *fadA* befindet, weist starke Homologien zu einem Transportprotein für kurze Fettsäuren auf. Über dieses Transportprotein könnte möglicherweise Aceton in die Bakterienzelle aufgenommen werden.

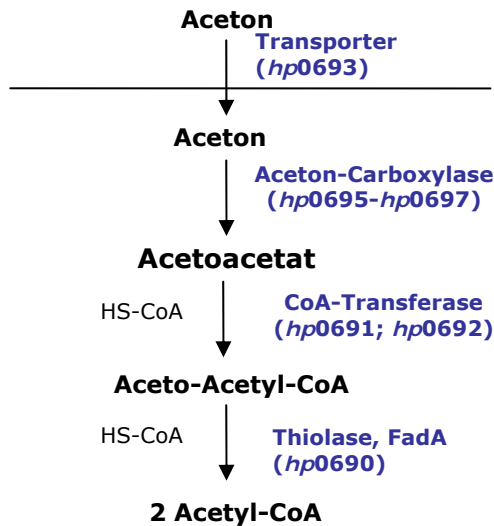


Abb. 88: Schematische Darstellung des hypothetischen Stoffwechselwegs in den die durch HP1021 regulierten Genprodukte (in blau) möglicherweise involviert sind.

Die beiden Operons *hp0690-hp0693* und *hp0695-hp0697* kommen interessanterweise nur in gastrischen *Helicobacter*-Spezies vor, nicht aber in den nah verwandten Bakterienstämmen *H. hepaticus*, *W. succinogenes* und *C. jejuni* (Baar *et al.*, 2003; Parkhill *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2003).

Aceton kommt für *H. pylori* als Substrat prinzipiell in Frage, da beschrieben wurde, dass Aceton unter bestimmten physiologischen Bedingungen im menschlichen Blutplasma akkumulieren kann, z.B. ist sie unter Hunger-Bedingungen oder bei einer Diabetes-Erkrankung stark erhöht (Kalapos, 1999). Konkrete Hinweise auf eine Korrelation zwischen *H. pylori*-Infektionen und Diabetes-Erkrankungen konnte bislang allerdings nicht gefunden werden.

Fraglich ist noch die physiologische Bedeutung des genannten Stoffwechselwegs für *H. pylori*. Möglicherweise sind die Mechanismen zum Abbau von Aceton ein Weg für *H. pylori* toxisches Aceton unschädlich zu machen und gleichzeitig eine zusätzliche Kohlenstoffquelle zu nutzen. Ein tatsächlicher Einfluss von Aceton auf das Wachstum von *H. pylori* könnte durch den Vergleich des Wachstums eines wildtypischen *H. pylori*-Stammes mit der HP1021-Deletionsmutante sowohl in Voll- als auch in einem definierten Minimalmedium in An- und Abwesenheit von Aceton getestet werden. Möglicherweise ist das Substrat der Aceton-Carboxylase aus *H. pylori* kein externes Aceton, das in die Bakterienzelle transportiert wurde, sondern zelluläres Aceton, das als Metabolit des Stoffwechsels auftritt. <sup>13</sup>C-Markierungsstudien könnten Aufschluss darüber geben, ob Teile des Kohlenstoffgerüsts von extern zugeführtem Aceton in die bakterielle Zelle aufgenommen und eingebaut werden.

Interessant ist, dass in der Literatur ein Einfluss von Säure auf die Transkription des Operons *htrA-hp1020-hp1021* beschrieben wird, was einen Hinweis darauf gibt, dass

HP1021 eine Rolle bei der Kontrolle der Säure-Antwort von *H. pylori* spielen könnte. Die Mechanismen welche die pH-Wert abhängige Transkription von HP1021 kontrollieren sind bis dato unbekannt. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass das ArsR/S-Zweikomponentensystem nicht regulierend auf die Transkription von *hp1021* wirkt. Allerdings wurden in unabhängigen Arbeiten kontroverse Beobachtungen in Bezug auf die Expression von HP1021 gemacht. Wen *et al.*, schildern eine Reprimierung der Expression von HP1021 wenn der *H. pylori*-Stamm 26695 unter sauren Bedingungen kultiviert wird (Wen *et al.*, 2003). Die Gruppen von Merrell *et al.*, und Pflock *et al.*, konnten eine Induktion der Expression von HP1021 bei einem Säurereiz erkennen, wobei in diesen Arbeiten der *H. pylori*-Stamm G27 verwendet wurde (Merrell *et al.*, 2003; Pflock *et al.*, 2004). In den Arbeiten wurden auch einige der Gene als Säure-reguliert identifiziert, deren Produkte in der Proteom-Analyse als HP1021-reguliert bestimmt wurden, wobei hier ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse geschildert wurden. Die Gene *fadA*, *katA* und *hyuA* werden laut Wen *et al.*, durch niedrigen induziert, während die Arbeitsgruppe von Merrell hingegen eine verminderte Transkription von *hyuA* beobachtet hat (Merrell *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2003). Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf stammspezifische Unterschiede zurückführen oder sind Methoden-abhängig, da in den genannten Arbeiten für die Analysen unterschiedliche *H. pylori*-Stämme verwendet wurden und Unterschiede in der Bakterienkultivierung und in der Durchführung und der Dauer der Säureinduktion vorlagen.

Abschließend kann man sagen, dass die Beobachtung, dass in einem Organismus wie *H. pylori*, dessen Repertoire an regulatorischen Genen sehr beschränkt ist, zwei Response-Regulatoren absolut essentiell sind und ein dritter entscheidend für ein normales Zellwachstum ist, sehr überraschend ist. Ein Teil der vorhandenen Response-Regulatoren weist zudem eine Aktivität unabhängig von ihrer Phosphorylierung auf, was von dem üblichen Zwei-Komponentenparadigma abweicht.

Bemerkenswert ist außerdem, dass zu dem Ortholog von HP1043 aus *W. succinogenes* WS0306, dessen Receiver-Domäne dem Konsensus entspricht, benachbart im Genom eine Histidin-Kinase WS0305 kodiert wird (Alm *et al.*, 1999; Baar *et al.*, 2003; Tomb *et al.*, 1997), die der Phosphorylierungspartner von WS0306 ist (Müller, unveröffentlichte Daten). Das Ortholog von HP1043 aus *H. hepaticus* HH1697 weist eine Receiver-Sequenz auf, die dem Konsensus entspricht (siehe Abb. 89). CJ0355 aus *C. jejuni* hingegen trägt natürlicherweise einen Asparaginrest anstelle des Phosphat-akzeptierenden Aspartatrestes während HP1043 eine Deletion aufweist, welche die potentielle Phosphorylierungsstelle betrifft.



|           |         |         |        |         |       |           |
|-----------|---------|---------|--------|---------|-------|-----------|
|           | 1       | 12      | 46     | 60      |       |           |
| RR WS0306 | MRILII  | EEDEITL | DLVLT  | DWMLPDG | SGL   | HK WS0305 |
| RR HH1697 | MRILVIE | DDPTL   | DLVLAD | WDLSDG  | CGI   | keine HK  |
| RR CJ0355 | MRILVIE | DEISL   | DLVLAN | WTLPDG  | DGA   | keine HK  |
| RR HP1043 | MRVLLIE | KNSVL   | DLVM   | ...VSD  | KNAL  | keine HK  |
| Konsensus | -KVLV   | VDDD--- | DLVLL  | DLRMP   | ----- |           |
|           | RI      | IIE E   | VIIT   | INL     |       |           |
|           | TL      | LA H    | ILVM   | VM      |       |           |

Abb. 89: Alignment der AS 1-12 bzw. 46-60 der Receiver-Domäne von HP1043, seinen Orthologen aus *W. succinogenes* (WS0306), *H. hepaticus* (HH1697) und *C. jejuni* (CJ0355) sowie der Konsensus-Sequenz.

In **blau**: atypische Abweichungen von der Konsensus-Sequenz bzw. Deletion in HP1043

In **rot**: atypische Abweichungen von der Konsensus-Sequenz in CJ0355

In **gelb**: potentielle Phosphorylierungsstelle entsprechend der Konsensus-Sequenz

Aufgrund dieser Beobachtungen könnte man vermuten, dass die Receiver-Domänen von HP1043 und seinen Orthologen (siehe Abb. 89) möglicherweise die Degeneration von einem typischen Zwei-Komponentenprotein zu einem regulatorischen Relikt aufzeigen. Diese Degeneration reflektiert vermutlich die Entwicklung von einem gemeinsamen ubiquitär vorkommendem Vorläuferbakterium hin zu einem hochspezialisierten Bakterium, welches an eine einzige Nische adaptiert ist, wie es das ausschließlich im menschlichen Magen vorkommende Bakterium *H. pylori* ist.

## G. Literaturverzeichnis

- Akada J. K., Shirai M., Takeuchi H., Tsuda M., Nakazawa T.** 2000. Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol*, 36(5), pp. 1071-84.
- Akamatsu T., Tabata K., Hironga M., Kawakami H., Uyeda M.** 1996. Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am J Infect Control*, 24(5), pp. 396-401.
- Akopyants N., Bukanov N. O., Westblom T. U., Kresovich S., Berg D. E.** 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 20(19), pp. 5137-42.
- Akopyants N. S., Clifton S. W., Kersulyte D., Crabtree J. E., Youree B. E., Reece C. A., Bukanov N. O., Drazek E. S., Roe B. A., Berg D. E.** 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 28(1), pp. 37-53.
- Alm R. A., Ling L. S., Moir D. T., King B. L., Brown E. D., Doig P. C., Smith D. R., Noonan B., Guild B. C., deJonge B. L., Carmel G., Tummino P. J., Caruso A., Uria-Nickelsen M., Mills D. M., Ives C., Gibson R., Merberg D., Mills S. D., Jiang Q., Taylor D. E., Vovis G. F., Trust T. J.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397(6715), pp. 176-80.
- Andrutis K., Fox J., Schauer D., Marini R., Murphy J., Yan L., Solnick J.** 1995. Inability of an isogenic urease-negative mutant strain of *Helicobacter mustelae* to colonize the ferret stomach. *Infect. Immun.*, 63(9), pp. 3722-25.
- Appelmek B. J., Negrini R., Moran A. P., Kuipers E. J.** 1997. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol*, 5(2), pp. 70-3.
- Appleby J. L., Bourret R. B.** 1999. Activation of CheY mutant D57N by phosphorylation at an alternative site, Ser-56. *Mol Microbiol*, 34(5), pp. 915-25.
- Appleby J. L., Parkinson J. S., Bourret R. B.** 1996. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell*, 86(6), pp. 845-8.
- Armstrong J. B., Adler J., Dahl M. M.** 1967. Nonchemotactic mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 93(1), pp. 390-8.
- Aspinall G. O., Monteiro M. A., Pang H., Walsh E. J., Moran A. P.** 1996. Lipopolysaccharide of the *Helicobacter pylori* type strain NCTC 11637 (ATCC 43504): structure of the O antigen chain and core oligosaccharide regions. *Biochemistry*, 35(7), pp. 2489-97.
- Atherton J. C., Cao P., Peek R. M., Jr., Tummuru M. K., Blaser M. J., Cover T. L.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, 270(30), pp. 17771-7.
- Baar C., Eppinger M., Raddatz G., Simon J., Lanz C., Klimmek O., Nandakumar R., Gross R., Rosinus A., Keller H., Jagtap P., Linke B., Meyer F., Lederer H., Schuster S. C.** 2003. Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), pp. 11690-5.
- Backert S., Moese S., Selbach M., Brinkmann V., Meyer T. F.** 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol*, 42(3), pp. 631-44.
- Baker C. S., Morozov I., Suzuki K., Romeo T., Babitzke P.** 2002. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 44(6), pp. 1599-610.
- Barnard F. M., Loughlin M. F., Fainberg H. P., Messenger M. P., Ussery D. W., Williams P., Jenks P. J.** 2004. Global regulation of virulence and the stress response by CsrA in the highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 51(1), pp. 15-32.
- Barnett M. J., Hung D. Y., Reisenauer A., Shapiro L., Long S. R.** 2001. A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 183(10), pp. 3204-10.
- Barrett J. F., Hoch J. A.** 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(7), pp. 1529-36.

- Bauerfeind P., Garner R., Dunn B. E., Mobley H. L.** 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*, 40(1), pp. 25-30.
- Beckwith C. S., McGee D. J., Mobley H. L., Riley L. K.** 2001. Cloning, expression, and catalytic activity of *Helicobacter hepaticus* urease. *Infect Immun*, 69(9), pp. 5914-20.
- Beier D., Frank R.** 2000. Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 182(8), pp. 2068-76.
- Beier D., Spohn G., Rappuoli R., Scarlato V.** 1997. Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J Bacteriol*, 179(15), pp. 4676-83.
- Beier D., Spohn G., Rappuoli R., Scarlato V.** 1998. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* principal sigma subunit of RNA polymerase reveals that the spacer region is important for efficient transcription. *Mol Microbiol*, 30(1), pp. 121-34.
- Beji A., Megraud F., Vincent P., Gavini F., Izard D., Leclerc H.** 1988. GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging or related to the genus *Campylobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 139(5), pp. 527-34.
- Bennett H. J., Roberts I. S.** 2005. Identification of a new sialic acid-binding protein in *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44(2), pp. 163-69.
- Benson A. K., Ramakrishnan G., Ohta N., Feng J., Ninfa A. J., Newton A.** 1994. The *Caulobacter crescentus* FliB protein acts at fli sequence elements both to activate and to repress transcription of cell cycle-regulated flagellar genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11), pp. 4989-93.
- Bereswill S., Greiner S., van Vliet A. H., Waidner B., Fassbinder F., Schiltz E., Kusters J. G., Kist M.** 2000. Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 182(21), pp. 5948-53.
- Bereswill S., Waidner U., Odenbreit S., Lichte F., Fassbinder F., Bode G., Kist M.** 1998. Structural, functional and mutational analysis of the *pfr* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 144 (Pt 9), pp. 2505-16.
- Berg D. E., Hoffman P. S., Appelmek B. J., Kusters J. G.** 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol*, 5(12), pp. 468-74.
- Berglindh T., Helander H., Sachs G.** 1979. Secretion at the parietal cell level--a look at rabbit gastric glands. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 55, pp. 7-20.
- Bijlsma J. J., Waidner B., Vliet A. H., Hughes N. J., Hag S., Bereswill S., Kelly D. J., Vandenbroucke-Grauls C. M., Kist M., Kusters J. G.** 2002. The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun*, 70(2), pp. 606-11.
- Bizzozero G.** 1893. Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch.Mikr Anat.*, 42, pp. 82-152.
- Blaser M. J., Berg D. E.** 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest*, 107(7), pp. 767-73.
- Blumer C., Heeb S., Pessi G., Haas D.** 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), pp. 14073-8.
- Bode G., Mauch F., Malfertheiner P.** 1993. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect*, 111(3), pp. 483-90.
- Bouret R. B., Drake S. K., Chervitz S. A., Simon M. I., Falke J. J.** 1993. Activation of the phosphosignaling protein CheY. II. Analysis of activated mutants by 19F NMR and protein engineering. *J Biol Chem*, 268(18), pp. 13089-96.
- Boyd J. M., Ellsworth H., Ensign S. A.** 2004. Bacterial acetone carboxylase is a manganese-dependent metalloenzyme. *J. Biol. Chem.*, 279(45), pp. 46644-51.
- Boyd J. M., Ensign S. A.** 2005. ATP-dependent enolization of acetone by acetone carboxylase from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*, 44(23), pp. 8543-53.

- Bucca G., Ferina G., Puglia A. M., Smith C. P.** 1995. The *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Mol Microbiol*, 17(4), pp. 663-74.
- Bullen J. J., Rogers H. J., Griffiths E.** 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 80, pp. 1-35.
- Burnham K. D., McIntire S. A., Knesek J. E.** 1998. GenBank Accession No AF077006.
- Bury-Mone S., Thiberge J. M., Contreras M., Maitournam A., Labigne A., De Reuse H.** 2004. Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 53(2), pp. 623-38.
- Cases I., de Lorenzo V., Ouzounis C. A.** 2003. Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends Microbiol*, 11(6), pp. 248-53.
- Cellini L.** 1996. Coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis*, 173(5), pp. 1288-9.
- Cellini L., Allocati N., Angelucci D., Iezzi T., Di Campli E., Marzio L., Dainelli B.** 1994. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice. *Microbiol Immunol*, 38(11), pp. 843-50.
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J. E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A.** 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25), pp. 14648-53.
- Chan W. Y., Hui P. K., Leung K. M., Chow J., Kwok F., Ng C. S.** 1994. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol*, 102(4), pp. 503-7.
- Chebrou H., Bigey F., Arnaud A., Galzy P.** 1996. Amide metabolism: a putative ABC transporter in *Rhodococcus* sp. R312. *Gene*, 182(1-2), pp. 215-8.
- Chen Y. Y., Weaver C. A., Mendelsohn D. R., Burne R. A.** 1998. Transcriptional regulation of the *Streptococcus salivarius* 57.I urease operon. *J Bacteriol*, 180(21), pp. 5769-75.
- Churin Y., Al-Ghoul L., Kepp O., Meyer T. F., Birchmeier W., Naumann M.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol*, 161(2), pp. 249-55.
- Churin Y., Kardalidou E., Meyer T. F., Naumann M.** 2001. Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection. *Mol Microbiol*, 40(4), pp. 815-23.
- Clyne M., Drumm B.** 1993. Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. *Infect Immun*, 61(10), pp. 4051-7.
- Contreras M., Thiberge J. M., Mandrand-Berthelot M. A., Labigne A.** 2003. Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 49(4), pp. 947-63.
- Cooksley C., Jenks P. J., Green A., Cockayne A., Logan R. P., Hardie K. R.** 2003. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J Med Microbiol*, 52(Pt 6), pp. 461-9.
- Covacci A., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burrone D., Macchia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N., 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(12), pp. 5791-5.
- Covacci A., Rappuoli R.** 2003. *Helicobacter pylori*: after the genomes, back to biology. *J Exp Med*, 197(7), pp. 807-11.
- Cover T. L., Blaser M. J.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 267, pp. 10570-75.
- Cover T. L., Hanson P. I., Heuser J. E.** 1997. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol*, 138(4), pp. 759-69.
- Cronan J. E., Jr.** 1989. The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell*, 58(3), pp. 427-9.
- Cullen D. J., Collins B. J., Christiansen K. J., Epis J., Warren J. R., Surveyor I., Cullen K. J.** 1993. When is *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut*, 34(12), pp. 1681-2.

- Cussac V., Ferrero R. L., Labigne A.** 1992. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol*, 174(8), pp. 2466-73.
- Dahl M. K., Msadek T., Kunst F., Rapoport G.** 1992. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 267(20), pp. 14509-14.
- De Pina K., Desjardin V., Mandrand-Berthelot M.-A., Giordano G., Wu L.-F.** 1999. Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 181(2), pp. 670-74.
- Delany I., Ieva R., Soragni A., Hilleringmann M., Rappuoli R., Scarlato V.** 2005. *In vitro* analysis of protein-operator interactions of the NikR and Fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.*, 187(22), pp. 7703-15.
- Delany I., Pacheco A. B., Spohn G., Rappuoli R., Scarlato V.** 2001a. Iron-dependent transcription of the *frpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J Bacteriol*, 183(16), pp. 4932-7.
- Delany I., Spohn G., Pacheco A. B., Ieva R., Alaimo C., Rappuoli R., Scarlato V.** 2002a. Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol Microbiol*, 46(4), pp. 1107-22.
- Delany I., Spohn G., Rappuoli R., Scarlato V.** 2001b. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 42(5), pp. 1297-309.
- Delany I., Spohn G., Rappuoli R., Scarlato V.** 2002b. Growth phase-dependent regulation of target gene promoters for binding of the essential orphan response regulator HP1043 of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 184(17), pp. 4800-10.
- Delihias N.** 1995. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Mol Microbiol*, 15(3), pp. 411-4.
- Dhaenens L., Szczebara F., Van Nieuwenhuysse S., Husson M. O.** 1999. Comparison of iron uptake in different *Helicobacter* species. *Res Microbiol*, 150(7), pp. 475-81.
- Dietz P.** 2002. Molekulare Charakterisierung der Zweikomponentensysteme HP0165/HP0166 und HP0244/FlgR von *Helicobacter pylori*. *Dissertation*.
- Dietz P., Gerlach G., Beier D.** 2002. Identification of target genes regulated by the two-component system HP166-HP165 of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 184(2), pp. 350-62.
- Dixon M. F., Ectors N. L.** 1995. The year in *Helicobacter pylori* 1995: Gastric Cancer. *Curr. opin. Gastroenterol.*, 11(Suppl. 1), pp. 38-41.
- Doig P., de Jonge B. L., Alm R. A., Brown E. D., Uria-Nickelsen M., Noonan B., Mills S. D., Tummino P., Carmel G., Guild B. C., Moir D. T., Vovis G. F., Trust T. J.** 1999. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(3), pp. 675-707.
- Donahue J. P., Israel D. A., Torres V. J., Necheva A. S., Miller G. G.** 2002. Inactivation of a *Helicobacter pylori* DNA methyltransferase alters *dnaK* operon expression following host-cell adherence. *FEMS Microbiology Letters*, 208(2), pp. 295-301.
- Dunn B. E., Cohen H., Blaser M. J.** 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*, 10(4), pp. 720-41.
- Dytoc M., Gold B., Louie M., Huesca M., Fedorko L., Crowe S., Lingwood C., Brunton J., Sherman P.** 1993. Comparison of *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infect Immun*, 61(2), pp. 448-56.
- Eaton K. A., Brooks C. L., Morgan D. R., Krakowka S.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, 59(7), pp. 2470-5.
- Eaton K. A., Catrenich C. E., Makin K. M., Krakowka S.** 1995. Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis*, 171(2), pp. 459-62.
- Eaton K. A., Morgan D. R., Krakowka S.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 37(2), pp. 123-7.
- Ensign S. A., Small F. J., Allen J. R., Sluis M. K.** 1998. New roles for CO<sub>2</sub> in the microbial metabolism of aliphatic epoxides and ketones. *Archives of Microbiology*, 169( 3), pp. 179-87.

- Eppinger M., Baar C., Linz B., Raddatz G., nter, Lanz C., Keller H., Morelli G., Gressmann H., Achtman M., Schuster S. C.** 2006. Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genetics, preprint*(2006), pp. e120.eor.
- Ernst F. D., Homuth G., Stoof J., Mader U., Waidner B., Kuipers E. J., Kist M., Kusters J. G., Bereswill S., van Vliet A. H. M.** 2005a. Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J. Bacteriol.*, 187(11), pp. 3687-92.
- Ernst F. D., Kuipers E. J., Heijens A., Sarwari R., Stoof J., Penn C. W., Kusters J. G., van Vliet A. H. M.** 2005b. The nickel-responsive regulator NikR controls activation and repression of gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 73(11), pp. 7252-58.
- Escolar L., Perez-Martin J., de Lorenzo V.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol*, 181(20), pp. 6223-9.
- Eslick G. D., Lim L. L., Byles J. E., Xia H. H., Talley N. J.** 1999. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*, 94(9), pp. 2373-9.
- Evans D. G., Karjalainen T. K., Evans D. J., Jr., Graham D. Y., Lee C. H.** 1993. Cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 175(3), pp. 674-83.
- Evans D. J., Jr., Evans D. G., Takemura T., Nakano H., Lampert H. C., Graham D. Y., Granger D. N., Kvietys P. R.** 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun*, 63(6), pp. 2213-20.
- Evers S., Courvalin P.** 1996. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol*, 178(5), pp. 1302-9.
- Fabret C., Hoch J. A.** 1998. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J Bacteriol*, 180(23), pp. 6375-83.
- Fassbinder F., van Vliet A. H., Gimmel V., Kusters J. G., Kist M., Bereswill S.** 2000. Identification of iron-regulated genes of *Helicobacter pylori* by a modified fur titration assay (FURTA-Hp). *FEMS Microbiol Lett*, 184(2), pp. 225-9.
- Fischer W., Puls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., Haas R.** 2001. 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(5), pp. 1337-48.
- Fleischmann R. D., Adams M. D., White O., Clayton R. A., Kirkness E. F., Kerlavage A. R., Bult C. J., Tomb J. F., Dougherty B. A., Merrick J. M., et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), pp. 496-512.
- Fol M., Chauhan A., Nair N. K., Maloney E., Moomey M., Jagannath C., Madiraju M. V. V. S., Rajagopalan M.** 2006. Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator. *Molecular Microbiology*, 60(3), pp. 643-57.
- Forst S., Comeau D., Norioka S., Inouye M.** 1987. Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 262(34), pp. 16433-8.
- Forsyth M. H., Cao P., Garcia P. P., Hall J. D., Cover T. L.** 2002. Genome-wide transcriptional profiling in a histidine kinase mutant of *Helicobacter pylori* identifies members of a regulon. *J Bacteriol*, 184(16), pp. 4630-5.
- Forsyth M. H., Cover T. L.** 1999. Mutational analysis of the *vacA* promoter provides insight into gene transcription in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.*, 181(7), pp. 2261-66.
- Forsyth M. H., Cover T. L.** 2000. Intercellular communication in *Helicobacter pylori*: *luxS* is essential for the production of an extracellular signaling molecule. *Infect. Immun.*, 68(6), pp. 3193-99.
- Fox J. G., Dewhirst F. E., Tully J. G., Paster B. J., Yan L., Taylor N. S., Collins M. J., Jr., Gorelick P. L., Ward J. M.** 1994. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol*, 32(5), pp. 1238-45.
- Foynes S., Dorrell N., Ward S. J., Stabler R. A., McColm A. A., Rycroft A. N., Wren B. W.** 2000. *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect Immun*, 68(4), pp. 2016-23.

- Foynes S., Dorrell N., Ward S. J., Zhang Z. W., McColm A. A., Farthing M. J., Wren B. W.** 1999. Functional analysis of the roles of FliQ and FlhB in flagellar expression in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*, 174(1), pp. 33-9.
- Fukuchi K., Kasahara Y., Asai K., Kobayashi K., Moriya S., Ogasawara N.** 2000. The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 146 (Pt 7), pp. 1573-83.
- Garner J. A., Cover T. L.** 1996. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun*, 64(10), pp. 4197-203.
- Gebert B., Fischer W., Weiss E., Hoffmann R., Haas R.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, 301(5636), pp. 1099-102.
- Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B., Leying H., Opferkuch W.** 1993. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 38(5), pp. 371-7.
- Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Boren T., Rad R., Schepp W., Miehle S., Classen M., Prinz C.** 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), pp. 12778-83.
- Giraud A. T., Calzolari A., Cataldi A. A., Bogni C., Nagel R.** 1999. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol Lett*, 177(1), pp. 15-22.
- Go M. F., Kapur V., Graham D. Y., Musser J. M.** 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol*, 178(13), pp. 3934-8.
- Goodwin C. S., Armstrong J. A., Chilvers T., Peters M., Collins M. D., Sly L., McConell W., Harper W. E. S.** 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen-nov as *Helicobacter pylori* comb-nov and *Helicobacter mustelae* comb-nov, respectively. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 39, pp. 397-405.
- Grandvalet C., de Crecy-Lagard V., Mazodier P.** 1999. The ClpB ATPase of *Streptomyces albus* G belongs to the HspR heat shock regulon. *Mol Microbiol*, 31(2), pp. 521-32.
- Grandvalet C., Servant P., Mazodier P.** 1997. Disruption of *hspR*, the repressor gene of the *dnaK* operon in *Streptomyces albus* G. *Mol Microbiol*, 23(1), pp. 77-84.
- Grebe T. W., Stock J. B.** 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol*, 41, pp. 139-227.
- Gross R., Arico B., Rappuoli R.** 1989. Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol Microbiol*, 3(11), pp. 1661-7.
- Gussin G. N., Ronson C. W., Ausubel F. M.** 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu Rev Genet*, 20, pp. 567-91.
- Haas R., Meyer T. F., van Putten J. P.** 1993. Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol*, 8(4), pp. 753-60.
- Hamoen L. W., Van Werkhoven A. F., Venema G., Dubnau D.** 2000. The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 97(16), pp. 9246-51.
- Hantke K.** 1987. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (Fur) in *Escherichia coli* K 12: Fur not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet*, 210(1), pp. 135-9.
- Harris A. G., Hinds F. E., Beckhouse A. G., Kolesnikow T., Hazell S. L.** 2002. Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874). *Microbiology*, 148(12), pp. 3813-25.
- Harrison P. M., Arosio P.** 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1275(3), pp. 161-203.
- Hazell S. L., Evans D. J., Jr., Graham D. Y.** 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol*, 137(1), pp. 57-61.
- Hecht G. B., Lane T., Ohta N., Sommer J. M., Newton A.** 1995. An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Embo J*, 14(16), pp. 3915-24.

- Heithoff D. M., Sinsheimer R. L., Low D. A., Mahan M. J.** 1999. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science*, 284(5416), pp. 967-70.
- Hellingwerf K. J., Crielaard W. C., Joost Teixeira de Mattos M., Hoff W. D., Kort R., Verhamme D. T., Avignone-Rossa C.** 1998. Current topics in signal transduction in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74(4), pp. 211-27.
- Helmann J. D., Chamberlin M. J.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem*, 57, pp. 839-72.
- Henner D. J., Yang M., Ferrari E.** 1988. Localization of *Bacillus subtilis* *sacU*(Hy) mutations to two linked genes with similarities to the conserved procaryotic family of two-component signalling systems. *J Bacteriol*, 170(11), pp. 5102-9.
- Hessey S. J., Spencer J., Wyatt J. I., Sobala G., Rathbone B. J., Axon A. T., Dixon M. F.** 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut*, 31(2), pp. 134-8.
- Higashi H., Tsutsumi R., Muto S., Sugiyama T., Azuma T., Asaka M., Hatakeyama M.** 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 295(5555), pp. 683-6.
- Hoch J. A.** 1995. Control of cellular development in sporulating bacteria by the phosphorelay two-component signal transduction system. J. A. Hoch and T. J. Silhavy, *Two-component signal transduction*. Washington, D.C.: ASM Press, 129-44.
- Hoch J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol*, 3(2), pp. 165-70.
- Hoch J. A., Varughese K. I.** 2001. Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol*, 183(17), pp. 4941-9.
- Hu L. T., Mobley H. L.** 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 58(4), pp. 992-8.
- Hulten K., Enroth H., Nystrom A., Engstrand L.** 1998. Presence of *Helicobacter species* DNA in Swedish water. *J Appl Microbiol*, 85(2), pp. 282-86.
- Hulten K., Han S., Enroth H., Klein P. D., Opekun A. R., Gilman R. H., Evans D. G., Engstrand L., Graham D. Y., El-Zaatari F.** 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*, 110(4), pp. 1031-35.
- Husson M. O., Legrand D., Spik G., Leclerc H.** 1993. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. *Infect Immun*, 61(6), pp. 2694-7.
- Hwang I., Chen H.-C., Sheen J.** 2002. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 129(2), pp. 500-15.
- Ilver D., Arnqvist A., Ogren J., Frick I. M., Kersulyte D., Incecik E. T., Berg D. E., Covacci A., Engstrand L., Boren T.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279(5349), pp. 373-7.
- Ilver D., Rappuoli R., Telford J. L.** 2001. Protein export. H. L. Mobley, G. L. Mendz and S. L. Hazell, *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Washington, D.C.: ASM press, 219-26.
- Ishige K., Nagasawa S., Tokishita S., Mizuno T.** 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *Embo J*, 13(21), pp. 5195-202.
- Island M. D., Wei B. Y., Kadner R. J.** 1992. Structure and function of the *uhp* genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 174(9), pp. 2754-62.
- Israel D. A., Salama N., Arnold C. N., Moss S. F., Ando T., Wirth H. P., Tham K. T., Camorlinga M., Blaser M. J., Falkow S., Peek R. M., Jr.** 2001. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest*, 107(5), pp. 611-20.
- Iwamoto H., Czajkowsky D. M., Cover T. L., Szabo G., Shao Z.** 1999. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett*, 450(1-2), pp. 101-4.
- Jackson D. W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J. W., Hart M. E., Romeo T.** 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184(1), pp. 290-301.



- Jacobs C., Domian I. J., Maddock J. R., Shapiro L.** 1999. Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell*, 97(1), pp. 111-20.
- Jiang Q., Hiratsuka K., Taylor D. E.** 1996. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*, 20(4), pp. 833-42.
- Jimenez-Pearson M.-A., Delany I., Scarlato V., Beier D.** 2005. Phosphate flow in the chemotactic response system of *Helicobacter pylori* 10.1099/mic.0.28217-0. *Microbiology*, 151(10), pp. 3299-311.
- Josenhans C., Labigne A., Suerbaum S.** 1995. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol*, 177(11), pp. 3010-20.
- Josenhans C., Niehus E., Amersbach S., Horster A., Betz C., Drescher B., Hughes K. T., Suerbaum S.** 2002. Functional characterization of the antagonistic flagellar late regulators FlhA and FlgM of *Helicobacter pylori* and their effects on the *H. pylori* transcriptome. *Mol Microbiol*, 43(2), pp. 307-22.
- Joyce E. A., Bassler B. L., Wright A.** 2000. Evidence for a signaling system in *Helicobacter pylori*: detection of a *luxS*-encoded autoinducer. *J. Bacteriol.*, 182(13), pp. 3638-43.
- Kalapos M. P.** 1999. Possible physiological roles of acetone metabolism in humans. *Medical Hypotheses*, 53(3), pp. 236-42.
- Kallipolitis B. H., Ingmer H.** 2001. *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*, 204(1), pp. 111-5.
- Karlsson K. A.** 1998. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol Microbiol*, 29(1), pp. 1-11.
- Kavermann H., Burns B. P., Angermuller K., Odenbreit S., Fischer W., Melchers K., Haas R.** 2003. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med*, 197(7), pp. 813-22.
- Kim J. S., Chang J. H., Chung S. I., Yum J. S.** 1999. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *flhD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J Bacteriol*, 181(22), pp. 6969-76.
- Kimmel B.** 2000. Identifizierung immunodominanter Antigene von *Helicobacter pylori*. *Dissertation*.
- Klein P. D., Graham D. Y., Gaillour A., Opekun A. R., Smith E. O.** 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet*, 337(8756), pp. 1503-6.
- Klose J.** 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26(3), pp. 231-43.
- Klose J., Kobalz U.** 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16(6), pp. 1034-59.
- Kobayashi K., Ogura M., Yamaguchi H., Yoshida K., Ogasawara N., Tanaka T., Fujita Y.** 2001. Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J Bacteriol*, 183(24), pp. 7365-70.
- Kong H., Lin L. F., Porter N., Stickel S., Byrd D., Posfai J., Roberts R. J.** 2000. Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Res*, 28(17), pp. 3216-23.
- Krah A., Miehke S., Pleissner K. P., Zimny-Arndt U., Kirsch C., Lehn N., Meyer T. F., Jungblut P. R., Aebischer T.** 2004. Identification of candidate antigens for serologic detection of *Helicobacter pylori* infected patients with gastric carcinoma. *International Journal of Cancer*, 108(3), pp. 456-63.
- Kunst F., Pascal M., Lepesant-Kejzlarova J., Lepesant J. A., Billault A., Dedonder R.** 1974. Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the syntheses of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie*, 56(11-12), pp. 1481-9.
- Kusters J. G., Gerrits M. M., Van Strijp J. A., Vandenbroucke-Grauls C. M.** 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*, 65(9), pp. 3672-9.

- Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Le Breton Y., Boel G., Benachour A., Prevost H., Auffray Y., Rince A.** 2003. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* two-component signal transduction pathways related to environmental stresses. *Environ Microbiol*, 5(5), pp. 329-37.
- Leroux B., Yanofsky M. F., Winans S. C., Ward J. E., Ziegler S. F., Nester E. W.** 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. *Embo J*, 6(4), pp. 849-56.
- Leunk R. D., Johnson P. T., David B. C., Kraft W. G., Morgan D. R.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 26(2), pp. 93-9.
- Leying H., Suerbaum S., Geis G., Haas R.** 1992. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol*, 6(19), pp. 2863-74.
- Lilie H., Schwarz E., Rudolph R.** 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol.*, 9(5), pp. 497-501.
- Liu M. Y., Romeo T.** 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J Bacteriol*, 179(14), pp. 4639-42.
- Liu M. Y., Yang H., Romeo T.** 1995. The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol*, 177(10), pp. 2663-72.
- Loh J. T., Cover T. L.** 2006. Requirement of histidine kinases HP0165 and HP1364 for acid resistance in *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 74(5), pp. 3052-59.
- Lois A. F., Ditta G. S., Helinski D. R.** 1993. The oxygen sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. *J Bacteriol*, 175(4), pp. 1103-9.
- Loomis W. F., Kuspa A., Shaulsky G.** 1998. Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol*, 1(6), pp. 643-8.
- Low D. A., Weyand N. J., Mahan M. J.** 2001. Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infect Immun*, 69(12), pp. 7197-204.
- Lukat G. S., Lee B. H., Mottonen J. M., Stock A. M., Stock J. B.** 1991. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*, 266(13), pp. 8348-54.
- Lukat G. S., McCleary W. R., Stock A. M., Stock J. B.** 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(2), pp. 718-22.
- Lukat G. S., Stock A. M., Stock J. B.** 1990. Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry*, 29(23), pp. 5436-42.
- Lupetti P., Heuser J. E., Manetti R., Massari P., Lanzavecchia S., Bellon P. L., Dallai R., Rappuoli R., Telford J. L.** 1996. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol*, 133(4), pp. 801-7.
- Ma S., Selvaraj U., Ohman D. E., Quarless R., Hassett D. J., Wozniak D. J.** 1998. Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 180(4), pp. 956-68.
- MacFarlane S. A., Merrick M.** 1985. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*, 13(21), pp. 7591-606.
- Madigan M. T., Martinko J., Parker J.** *Brock: Biology of microorganisms*. Prentice Hall International Editions, 1997.
- Maeda S., Akanuma M., Mitsuno Y., Hirata Y., Ogura K., Yoshida H., Shiratori Y., Omata M.** 2001. Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *J Biol Chem*, 276(48), pp. 44856-64.
- Maeda T., Takekawa M., Saito H.** 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269(5223), pp. 554-8.

- Mahdavi J., Sonden B., Hurtig M., Olfat F. O., Forsberg L., Roche N., Angstrom J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson K. A., Altraja S., Wadstrom T., Kersulyte D., Berg D. E., Dubois A., Petersson C., Magnusson K. E., Norberg T., Lindh F., Lundskog B. B., Arnqvist A., Hammarstrom L., Boren T.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 297(5581), pp. 573-8.
- Makino K., Shinagawa H., Amemura M., Nakata A.** 1986. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 192(3), pp. 549-56.
- Malaty H. M., El-Kasabany A., Graham D. Y., Miller C. C., Reddy S. G., Srinivasan S. R., Yamaoka Y., Berenson G. S.** 2002a. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*, 359(9310), pp. 931-5.
- Malaty H. M., Engstrand L., Pedersen N. L., Graham D. Y.** 1994. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med*, 120(12), pp. 982-6.
- Malaty H. M., Graham D. Y.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 35(6), pp. 742-5.
- Malaty H. M., Haveman T., Graham D. Y., Fraley J. K.** 2002b. *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children: impact of epidemiologic factors on accuracy of diagnostic tests. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 35(1), pp. 59-63.
- Marais A., Mendz G. L., Hazell S. L., Megraud F.** 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(3), pp. 642-74.
- Marcus E. A., Moshfegh A. P., Sachs G., Scott D. R.** 2005. The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J Bacteriol*, 187(2), pp. 729-38.
- Marshall B.** 2001. One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. H. L. Mobley, G. L. Mendz and S. L. Hazell, *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Washington, D. C.: ASM Press, 19-24.
- Marshall B.** 2003. *Helicobacter pylori: past, present and future*. *Keio J Med*, 52(2), pp. 80-5.
- Marshall B. J., Warren J. R.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390), pp. 1311-5.
- Marshall D. G., Dundon W. G., Beesley S. M., Smyth C. J.** 1998. *Helicobacter pylori*--a conundrum of genetic diversity. *Microbiology*, 144 ( Pt 11), pp. 2925-39.
- Martin P. K., Li T., Sun D., Biek D. P., Schmid M. B.** 1999. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 181(12), pp. 3666-73.
- Martinez-Hackert E., Stock A. M.** 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol*, 269(3), pp. 301-12.
- McCleary W. R., McBride M. J., Zusman D. R.** 1990. Developmental sensory transduction in *Myxococcus xanthus* involves methylation and demethylation of FrzCD. *J Bacteriol*, 172(9), pp. 4877-87.
- McCleary W. R., Stock J. B., Ninfa A. J.** 1993. Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol*, 175(10), pp. 2793-8.
- McDaniel T. K., Dewalt K. C., Salama N. R., Falkow S.** 2001. New approaches for validation of lethal phenotypes and genetic reversion in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 6(1), pp. 15-23.
- Megraud F.** 1995a. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection: where are we in 1995? *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 7(4), pp. 292-5.
- Megraud F.** 1995b. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther*, 9 Suppl 2, pp. 85-91.
- Megraud F.** 1998. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Br Med Bull*, 54(1), pp. 207-16.
- Megraud F.** 2003. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: prevalence, mechanism, detection. What's new? *Can J Gastroenterol*, 17 Suppl B, pp. 49B-52B.
- Merrell D. S., Goodrich M. L., Otto G., Tompkins L. S., Falkow S.** 2003. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 71(6), pp. 3529-39.

- Meyer-Rosberg K., Scott D. R., Rex D., Melchers K., Sachs G.** 1996. The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 111(4), pp. 886-900.
- Meyer ter Vehn T., Covacci A., Kist M., Pahl H. L.** 2000. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem*, 275(21), pp. 16064-72.
- Mimuro H., Suzuki T., Tanaka J., Asahi M., Haas R., Sasakawa C.** 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Molecular Cell*, 10(4), pp. 745-55.
- Min K. T., Hilditch C. M., Diederich B., Errington J., Yudkin M. D.** 1993. Sigma F, the first compartment-specific transcription factor of *B. subtilis*, is regulated by an anti-sigma factor that is also a protein kinase. *Cell*, 74(4), pp. 735-42.
- Miranda-Rios J., Sanchez-Pescador R., Urdea M., Covarrubias A. A.** 1987. The complete nucleotide sequence of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res*, 15(6), pp. 2757-70.
- Mizuno T.** 1998. His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem (Tokyo)*, 123(4), pp. 555-63.
- Mobley H. L., Island M. D., Hausinger R. P.** 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*, 59(3), pp. 451-80.
- Molinari M., Salio M., Galli C., Norais N., Rappuoli R., Lanzavecchia A., Montecucco C.** 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med*, 187(1), pp. 135-40.
- Mollenhauer-Rektorschek M., Hanauer G., Sachs G., Melchers K.** 2002. Expression of UreI is required for intragastric transit and colonization of gerbil gastric mucosa by *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol*, 153(10), pp. 659-66.
- Monstein H.-J., Jonasson J.** 2001. Differential Virulence-Gene mRNA Expression in Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), pp. 530-36.
- Moore J. B., Shiao S. P., Reitzer L. J.** 1993. Alterations of highly conserved residues in the regulatory domain of nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175(9), pp. 2692-701.
- Msadek T., Kunst F., Henner D., Klier A., Rapoport G., Dedonder R.** 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*. *J Bacteriol*, 172(2), pp. 824-34.
- Msadek T., Kunst F., Rapoport G.** 1995. A signal transduction network in *Bacillus subtilis* includes the DegS/DegU and ComP/ComA two-component systems. J. A. Hoch and T. J. Silhavy, *Two-component signal transduction*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 447-71.
- Müller S., Pflöck M., Schär J., Kennard S., Beier D.**  
. Regulation of expression of atypical orphan response regulators of *Helicobacter pylori*. *Microbiological Research*, In Press, Corrected Proof.
- Muotiala A., Helander I. M., Pyhala L., Kosunen T. U., Moran A. P.** 1992. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 60(4), pp. 1714-6.
- Mutoh N., Simon M. I.** 1986. Nucleotide sequence corresponding to five chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 165(1), pp. 161-6.
- Myakishev M. V., Kapaadze G. I., Shaikhayev G. O., Georgiev G. P., Beritashvili D. R.** 1995. Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. [www.ras/biogen/blood.html](http://www.ras/biogen/blood.html).
- Namavar F., Sparrius M., Veerman E. C., Appelmelk B. J., Vandenbroucke-Grauls C. M.** 1998. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. *Infect Immun*, 66(2), pp. 444-7.
- Naumann M., Wessler S., Bartsch C., Wieland B., Covacci A., Haas R., Meyer T. F.** 1999. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island. *J Biol Chem*, 274(44), pp. 31655-62.
- Nedenskov-Sorensen P., Bukholm G., Bovre K.** 1990. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis*, 161(2), pp. 365-6.

- Needham J. V., Chen T. Y., Falke J. J.** 1993. Novel ion specificity of a carboxylate cluster Mg(II) binding site: strong charge selectivity and weak size selectivity. *Biochemistry*, 32(13), pp. 3363-7.
- Ng W.-L., Robertson G. T., Kazmierczak K. M., Zhao J., Gilmour R., Winkler M. E.** 2003. Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Molecular Microbiology*, 50(5), pp. 1647-63.
- Ng W.-L., Tsui H.-C. T., Winkler M. E.** 2005. Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* Murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 187(21), pp. 7444-59.
- Niehus E., Gressmann H., Ye F., Schlapbach R., Dehio M., Dehio C., Stack A., Meyer T. F., Suerbaum S., Josenhans C.** 2004. Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 52(4), pp. 947-61.
- Ninfa E. G., Atkinson M. R., Kamberov E. S., Ninfa A. J.** 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J Bacteriol*, 175(21), pp. 7024-32.
- Nixon B. T., Ronson C. W., Ausubel F. M.** 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(20), pp. 7850-4.
- Noach L. A., Rolf T. M., Tytgat G. N.** 1994. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol*, 47(8), pp. 699-704.
- Nogueira C., Figueiredo C., Carneiro F., Taveira Gomes A., Barreira R., Figueira P., Salgado C., Belo L., Peixoto A., Bravo J. C., Bravo L. E., Realpe J. L., Plaisier A. P., Quint W. G. V., Ruiz B., Correa P., van Doorn L.-J.** 2001. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol*, 158(2), pp. 647-54.
- Nomura A., Stemmermann G. N., Chyou P.-H., Perez-Perez G. I., Blaser M. J.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med*, 120(12), pp. 977-81.
- Nurgalieva Z. Z., Malaty H. M., Graham D. Y., Almuchambetova R., Machmudova A., Kapsultanova D., Osato M. S., Hollinger F. B., Zhangabylov A.** 2002. *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg*, 67(2), pp. 201-6.
- O'Farrell P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250(10), pp. 4007-21.
- Odenbreit S., Puls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W., Haas R.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 287(5457), pp. 1497-500.
- Odenbreit S., Till M., Hofreuter D., Faller G., Haas R.** 1999. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol*, 31(5), pp. 1537-48.
- Odenbreit S., Wieland B., Haas R.** 1996. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol*, 178(23), pp. 6960-7.
- Osaki T., Yamaguchi H., Taguchi H., Fukuda M., Kawakami H., Hirano H., Watanabe S., Takagi A., Kamiya S.** 1998. Establishment and characterisation of a monoclonal antibody to inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J Med Microbiol*, 47(6), pp. 505-12.
- Oshima T., Aiba H., Masuda Y., Kanaya S., Sugiura M., Wanner B. L., Mori H., Mizuno T.** 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 46(1), pp. 281-91.
- Padilla P. I., Wada A., Yahiro K., Kimura M., Niidome T., Aoyagi H., Kumatori A., Anami M., Hayashi T., Fujisawa J., Saito H., Moss J., Hirayama T.** 2000. Morphologic differentiation of HL-60 cells is associated with appearance of RPTPbeta and induction of *Helicobacter pylori* VacA sensitivity. *J Biol Chem*, 275(20), pp. 15200-6.
- Pang A. S., Nathoo S., Wong S. L.** 1991. Cloning and characterization of a pair of novel genes that regulate production of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 173(1), pp. 46-54.
- Papini E., de Bernard M., Milia E., Bugnoli M., Zerial M., Rappuoli R., Montecucco C.** 1994. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(21), pp. 9720-4.

- Papini E., Satin B., Norais N., de Bernard M., Telford J. L., Rappuoli R., Montecucco C.** 1998. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Invest*, 102(4), pp. 813-20.
- Parkhill J., Wren B. W., Mungall K., Ketley J. M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R. M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A. V., Moule S., Pallen M. J., Penn C. W., Quail M. A., Rajandream M. A., Rutherford K. M., van Vliet A. H., Whitehead S., Barrell B. G.** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403(6770), pp. 665-8.
- Parkinson J. S., Kofoed E. C.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet*, 26, pp. 71-112.
- Parsonnet J., Friedman G. D., Orentreich N., Vogelman H.** 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40(3), pp. 297-301.
- Parsonnet J., Friedman G. D., Vandersteen D. P., Chang Y., Vogelman J. H., Orentreich N., Sibley R. K.** 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, 325(16), pp. 1127-31.
- Peck B., Ortkamp M., Diehl K. D., Hundt E., Knapp B.** 1999. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, 27(16), pp. 3325-33.
- Perego M.** 1998. Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol*, 6(9), pp. 366-70.
- Pflock M., Bathon M., Schär J., Müller S., Mollenkopf H., Meyer T. F., Beier D.** The orphan response regulator HP1021 of *Helicobacter pylori* regulates genes involved in acetone metabolism.
- Pflock M., Dietz P., Schär J., Beier D.** 2004. Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*, 234(1), pp. 51-61.
- Pflock M., Finsterer N., Joseph B., Mollenkopf H., Meyer T. F., Beier D.** 2006. Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J. Bacteriol.*, 188(10), pp. 3449-62.
- Pflock M., Kennard S., Delany I., Scarlato V., Beier D.** 2005. Acid-Induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 73(10), pp. 6437-45.
- Popescu A., Karpay A., Israel D. A., Peek R. M., Jr., Krezel A. M.** 2005. *Helicobacter pylori* protein HP0222 belongs to Arc/MetJ family of transcriptional regulators. *Proteins*, 59(2), pp. 303-11.
- Quisel J. D., Grossman A. D.** 2000. Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB). *J. Bacteriol.*, 182(12), pp. 3446-51.
- Quisel J. D., Lin D. C., Grossman A. D.** 1999. Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell*, 4(5), pp. 665-72.
- Quon K. C., Marczyński G. T., Shapiro L.** 1996. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell*, 84(1), pp. 83-93.
- Regnier P., Arraiano C. M.** 2000. Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays*, 22(3), pp. 235-44.
- Rieder G., Fischer W., Haas R.** 2005. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr Opin Microbiol*, 8(1), pp. 67-73.
- Robinson V. L., Buckler D. R., Stock A. M.** 2000. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol*, 7(8), pp. 626-33.
- Romeo T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol*, 29(6), pp. 1321-30.
- Romeo T., Gong M., Liu M. Y., Brun-Zinkernagel A. M.** 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol*, 175(15), pp. 4744-55.
- Ronson C. W., Nixon B. T., Ausubel F. M.** 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell*, 49(5), pp. 579-81.

- Rubinsztein-Dunlop S., Guy B., Lissolo L., Fischer H.** 2005. Identification of two new *Helicobacter pylori* surface proteins involved in attachment to epithelial cell lines. *J Med Microbiol*, 54(Pt 5), pp. 427-34.
- Sachs G., Weeks D. L., Melchers K., Scott D. R.** 2003. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol*, 65, pp. 349-69.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), pp. 487-91.
- Salama N., Guillemin K., McDaniel T. K., Sherlock G., Tompkins L., Falkow S.** 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), pp. 14668-73.
- Salama N. R., Shepherd B., Falkow S.** 2004. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 186(23), pp. 7926-35.
- Salyers A. A., Whitt D. D.** 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. *ASM Press*.
- Sanders D. A., Gillece-Castro B. L., Stock A. M., Burlingame A. L., Koshland D. E., Jr.** 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J Biol Chem*, 264(36), pp. 21770-8.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, pp. 5463-67.
- Sasaki K., Tajiri Y., Sata M., Fujii Y., Matsubara F., Zhao M., Shimizu S., Toyonaga A., Tanikawa K.** 1999. *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scand J Infect Dis*, 31(3), pp. 275-9.
- Satin B., Del Giudice G., Della Bianca V., Dusi S., Laudanna C., Tonello F., Kelleher D., Rappuoli R., Montecucco C., Rossi F.** 2000. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med*, 191(9), pp. 1467-76.
- Scarlato V., Delany I., Spohn G., Beier D.** 2001. Regulation of transcription in *Helicobacter pylori*: simple systems or complex circuits? *Int J Med Microbiol*, 291(2), pp. 107-17.
- Schär J.** 2001. Funktionelle Charakterisierung der Response-Regulatoren HP1043, HP1021 und HP0166 von *Helicobacter pylori* mit Hilfe eines genetischen Komplementationssystems. *Diplomarbeit*.
- Schär J., Sickmann A., Beier D.** 2005. Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.*, 187(9), pp. 3100-09.
- Schlegel H. G.** 1992. Allgemeine Mikrobiologie. *Thieme Verlag*, 287 ff.
- Schmitt W., Haas R.** 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol*, 12(2), pp. 307-19.
- Schulz A., Schumann W.** 1996. *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis* *dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J Bacteriol*, 178(4), pp. 1088-93.
- Scott D., Weeks D., Melchers K., Sachs G.** 2000. UreI-mediated urea transport in *Helicobacter pylori*: an open and shut case? *Trends Microbiol*, 8(8), pp. 348-9.
- Segal E. D., Cha J., Lo J., Falkow S., Tompkins L. S.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25), pp. 14559-64.
- Segal E. D., Lange C., Covacci A., Tompkins L. S., Falkow S.** 1997. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(14), pp. 7595-9.
- Selbach M., Moese S., Backert S., Jungblut P. R., Meyer T. F.** 2004. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics*, 4(10), pp. 2961-8.
- Selbach M., Moese S., Hurwitz R., Hauck C. R., Meyer T. F., Backert S.** 2003. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J*, 22(3), pp. 515-28.

- Seto K., Hayashi-Kuwabara Y., Yoneta T., Suda H., Tamaki H.** 1998. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Letters*, 431(3), pp. 347-50.
- Simms S. A., Keane M. G., Stock J.** 1985. Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem*, 260(18), pp. 10161-8.
- Skerker J. M., Prasol M. S., Perchuk B. S., Biondi E. G., Laub M. T.** 2005. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biology*, 3(10).
- Skouloubris S., Thiberge J. M., Labigne A., De Reuse H.** 1998. The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect Immun*, 66(9), pp. 4517-21.
- Sluis M. K., Ensign S. A.** 1997. Purification and characterization of acetone carboxylase from *Xanthobacter* strain Py2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), pp. 8456-61.
- Sluis M. K., Larsen R. A., Krum J. G., Anderson R., Metcalf W. W., Ensign S. A.** 2002. Biochemical, molecular, and genetic analyses of the acetone carboxylases from *Xanthobacter autotrophicus* Strain Py2 and *Rhodobacter capsulatus* Strain B10. *J. Bacteriol.*, 184(11), pp. 2969-77.
- Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Reeve J. N., et al.** 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol*, 179(22), pp. 7135-55.
- Solnick J. V., Schauer D. B.** 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(1), pp. 59-97.
- Spiegelhalder C., Gerstenecker B., Kersten A., Schiltz E., Kist M.** 1993. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun*, 61(12), pp. 5315-25.
- Spohn G., Beier D., Rappuoli R., Scarlato V.** 1997. Transcriptional analysis of the divergent *cagAB* genes encoded by the pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 26(2), pp. 361-72.
- Spohn G., Danielli A., Roncarati D., Delany I., Rappuoli R., Scarlato V.** 2004. Dual control of *Helicobacter pylori* heat shock gene transcription by HspR and HrcA. *J Bacteriol*, 186(10), pp. 2956-65.
- Spohn G., Scarlato V.** 1999a. The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 34(4), pp. 663-74.
- Spohn G., Scarlato V.** 1999b. Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J Bacteriol*, 181(2), pp. 593-9.
- Stähler F. N., Ganter L., Lederer K., Kist M., Bereswill S.** 2005. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* carbonic anhydrases. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44(2), pp. 183-89.
- Stein M., Bagnoli F., Halenbeck R., Rappuoli R., Fantl W. J., Covacci A.** 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol*, 43(4), pp. 971-80.
- Steinmann D., Köplin R., Pühler A., Niehaus K.** 1997. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *lpsI* and *lpsJ* genes encoding putative proteins with sequences similarity to the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of 3-oxoacid CoA-transferases are involved in LPS biosynthesis. *Arch Microbiol.*, 168, pp. 441-47.
- Stingl K., Altendorf K., Bakker E. P.** 2002a. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol*, 10(2), pp. 70-4.
- Stingl K., Uhlemann E. M., Schmid R., Altendorf K., Bakker E. P.** 2002b. Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. *J Bacteriol*, 184(11), pp. 3053-60.
- Stock A., Chen T., Welsh D., Stock J.** 1988. CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. *PNAS*, 85(5), pp. 1403-07.
- Stock A. M., Mottonen J. M., Stock J. B., Schutt C. E.** 1989. Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature*, 337(6209), pp. 745-9.



- Stock A. M., Robinson V. L., Goudreau P. N.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, pp. 183-215.
- Stock J.** 1999. Signal transduction: Gyrate protein kinases. *Curr Biol*, 9(10), pp. R364-7.
- Stock J. B., Stock A. M., Mottonen J. M.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature*, 344(6265), pp. 395-400.
- Stojiljkovic I., Baumber A. J., Hantke K.** 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a fur titration assay. *J Mol Biol*, 236(2), pp. 531-45.
- Stojiljkovic I., Hantke K.** 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet*, 247(2), pp. 199-205.
- Suerbaum S.** 1995. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends in Microbiology*, 3(5), pp. 168-70.
- Suerbaum S.** 2000. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*, 290(2), pp. 175-81.
- Suerbaum S., Josenhans C.** 1999. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Mol Med Today*, 5(1), pp. 32-9.
- Suerbaum S., Josenhans C., Labigne A.** 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol*, 175(11), pp. 3278-88.
- Suerbaum S., Josenhans C., Sterzenbach T., Drescher B., Brandt P., Bell M., Droge M., Fartmann B., Fischer H. P., Ge Z., Horster A., Holland R., Klein K., Konig J., Macko L., Mendz G. L., Nyakatura G., Schauer D. B., Shen Z., Weber J., Frosch M., Fox J. G.** 2003. The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), pp. 7901-6.
- Suerbaum S., Michetti P.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 347(15), pp. 1175-86.
- Suerbaum S., Smith J. M., Bapumia K., Morelli G., Smith N. H., Kunstmann E., Dyrek I., Achtman M.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *PNAS*, 95(21), pp. 12619-24.
- Surette M. G., Levit M., Liu Y., Lukat G., Ninfa E. G., Ninfa A., Stock J. B.** 1996. Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, 271(2), pp. 939-45.
- Surette M. G., Miller M. B., Bassler B. L.** 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(4), pp. 1639-44.
- Swanson R. V., Alex L. A., Simon M. I.** 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci*, 19(11), pp. 485-90.
- Swanson R. V., Bourret R. B., Simon M. I.** 1993. Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol*, 8(3), pp. 435-41.
- Szabo I., Brutsche S., Tombola F., Moschioni M., Satin B., Telford J. L., Rappuoli R., Montecucco C., Papini E., Zoratti M.** 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(20), pp. 5517-27.
- Takayama K., Kjelleberg S.** 2000. The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ Microbiol*, 2(4), pp. 355-65.
- Tanahashi T., Kita M., Kodama T., Yamaoka Y., Sawai N., Ohno T., Mitsufuji S., Wei Y.-P., Kashima K., Imanishi J.** 2000. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, 68(2), pp. 664-71.
- Tanaka T., Saha S. K., Tomomori C., Ishima R., Liu D., Tong K. I., Park H., Dutta R., Qin L., Swindells M. B., Yamazaki T., Ono A. M., Kainosho M., Inouye M., Ikura M.** 1998. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature*, 396(6706), pp. 88-92.
- Taylor D. E., Eaton M., Chang N., Salama S. M.** 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol*, 174(21), pp. 6800-6.

- Teneberg S., Miller-Podraza H., Lampert H. C., Evans D. J., Jr., Evans D. G., Danielsson D., Karlsson K. A.** 1997. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 272(30), pp. 19067-71.
- Thiery J. P.** 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Reviews Cancer Nat Rev Cancer*, 2(6), pp. 442-54.
- Thompson L. J., Merrell D. S., Neilan B. A., Mitchell H., Lee A., Falkow S.** 2003. Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect. Immun.*, 71(5), pp. 2643-55.
- Throup J. P., Koretke K. K., Bryant A. P., Ingraham K. A., Chalker A. F., Ge Y., Marra A., Wallis N. G., Brown J. R., Holmes D. J., Rosenberg M., Burnham M. K.** 2000. A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 35(3), pp. 566-76.
- Tokito M., Daldal F.** 1992. *petR*, located upstream of the *fbcFBC* operon encoding the cytochrome bc1 complex, is homologous to bacterial response regulators and necessary for photosynthetic and respiratory growth of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol*, 6(12), pp. 1645-54.
- Tomb J. F., White O., Kerlavage A. R., Clayton R. A., Sutton G. G., Fleischmann R. D., Ketchum K. A., Klenk H. P., Gill S., Dougherty B. A., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E. F., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalak H. G., Glodek A., McKenney K., Fitzgerald L. M., Lee N., Adams M. D., Venter J. C., et al.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), pp. 539-47.
- Tombola F., Morbiato L., Del Giudice G., Rappuoli R., Zoratti M., Papini E.** 2001. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest*, 108(6), pp. 929-37.
- Tomomori C., Tanaka T., Dutta R., Park H., Saha S. K., Zhu Y., Ishima R., Liu D., Tong K. I., Kurokawa H., Qian H., Inouye M., Ikura M.** 1999. Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol*, 6(8), pp. 729-34.
- Towbin H., Staehlin T., Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), pp. 4350-54.
- Tsuda M., Karita M., Mizote T., Morshed M. G., Okita K., Nakazawa T.** 1994a. Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 6 Suppl 1, pp. S49-52.
- Tsuda M., Karita M., Morshed M. G., Okita K., Nakazawa T.** 1994b. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun*, 62(8), pp. 3586-9.
- Tummuru M. K., Cover T. L., Blaser M. J.** 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*, 61(5), pp. 1799-809.
- Uemura N., Okamoto S., Yamamoto S., Matsumura N., Yamaguchi S., Yamakido M., Taniyama K., Sasaki N., Schlemper R. J.** 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, 345(11), pp. 784-9.
- Unemo M., Aspholm-Hurtig M., Ilver D., Bergstrom J., Boren T., Danielsson D., Teneberg S.** 2005. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem*.
- Valkonen K. H., Wadstrom T., Moran A. P.** 1994. Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin. *Infect Immun*, 62(9), pp. 3640-8.
- van Vliet A. H., Poppelaars S. W., Davies B. J., Stoof J., Bereswill S., Kist M., Penn C. W., Kuipers E. J., Kusters J. G.** 2002a. NikR mediates nickel-responsive transcriptional induction of urease expression in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 70(6), pp. 2846-52.
- van Vliet A. H., Stoof J., Poppelaars S. W., Bereswill S., Homuth G., Kist M., Kuipers E. J., Kusters J. G.** 2003. Differential regulation of amidase- and formamidase-mediated ammonia production by the *Helicobacter pylori* Fur repressor. *J Biol Chem*, 278(11), pp. 9052-7.
- van Vliet A. H. M., Kuipers E. J., Stoof J., Poppelaars S. W., Kusters J. G.** 2004. Acid-responsive gene induction of ammonia-producing enzymes in *Helicobacter pylori* is mediated via a metal-responsive repressor cascade. *Infect. Immun.*, 72(2), pp. 766-73.

- van Vliet A. H. M., Kuipers E. J., Waidner B., Davies B. J., de Vries N., Penn C. W., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E., Kist M., Bereswill S., Kusters J. G.** 2001. Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect. Immun.*, 69(8), pp. 4891-97.
- van Vliet A. H. M., Stoof J., Vlasblom R., Wainwright S. A., Hughes N. J., Kelly D. J., Bereswill S., Bijlsma J. J. E., Hoogenboezem T., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E., Kist M., Kuipers E. J., Kusters J. G.** 2002b. The role of the ferric uptake Regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *Helicobacter*, 7(4), pp. 237-44.
- Vanet A., Marsan L., Labigne A., Sagot M. F.** 2000. Inferring regulatory elements from a whole genome. An analysis of *Helicobacter pylori* sigma<sup>80</sup> family of promoter signals. *J Mol Biol*, 297(2), pp. 335-53.
- Velayudhan J., Hughes N. J., McColm A. A., Bagshaw J., Clayton C. L., Andrews S. C., Kelly D. J.** 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol*, 37(2), pp. 274-86.
- Vinion-Dubiel A. D., McClain M. S., Czajkowsky D. M., Iwamoto H., Ye D., Cao P., Schraw W., Szabo G., Blanke S. R., Shao Z., Cover T. L.** 1999. A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol Chem*, 274(53), pp. 37736-42.
- Voland P., Weeks D. L., Marcus E. A., Prinz C., Sachs G., Scott D.** 2003. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284(1), pp. G96-G106.
- Volz K., Matsumura P.** 1991. Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-Å resolution. *J Biol Chem*, 266(23), pp. 15511-9.
- Waidner B., Melchers K., Stahler F. N., Kist M., Bereswill S.** 2005. The *Helicobacter pylori* CrdRS two-component regulation system (HP1364/HP1365) is required for copper-mediated induction of the copper resistance determinant CrdA. *J. Bacteriol.*, 187(13), pp. 4683-88.
- Watabe K., Ishikawa T., Mukohara Y., Nakamura H.** 1992. Cloning and sequencing of the genes involved in the conversion of 5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids from the native plasmid of *Pseudomonas* sp. strain NS671. *J Bacteriol.*, 174(3), pp. 962-69.
- Weeks D. L., Eskandari S., Scott D. R., Sachs G.** 2000. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 287(5452), pp. 482-5.
- Weeks D. L., Sachs G.** 2001. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 40(6), pp. 1249-59.
- Weeks G., Shapiro M., Burns R. O., Wakil S. J.** 1969. Control of fatty acid metabolism I. Induction of the enzymes of fatty acid oxidation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 97(2), pp. 827-36.
- Wei B. L., Brun-Zinkernagel A. M., Simecka J. W., Pruss B. M., Babitzke P., Romeo T.** 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 40(1), pp. 245-56.
- Weilbacher T., Suzuki K., Dubey A. K., Wang X., Gudapaty S., Morozov I., Baker C. S., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T.** 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 48(3), pp. 657-70.
- Wen Y., Marcus E. A., Matrubutham U., Gleeson M. A., Scott D. R., Sachs G.** 2003. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 71(10), pp. 5921-39.
- Whitchurch C. B., Alm R. A., Mattick J. S.** 1996. The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), pp. 9839-43.
- Wilson S. A., Williams R. J., Pearl L. H., Drew R. E.** 1995. Identification of two new genes in the *Pseudomonas aeruginosa* amidase operon, encoding an ATPase (AmiB) and a putative integral membrane protein (AmiS). *J Biol Chem*, 270(32), pp. 18818-24.
- Wingrove J. A., Gober J. W.** 1996. Identification of an asymmetrically localized sensor histidine kinase responsible for temporally and spatially regulated transcription. *Science*, 274(5287), pp. 597-601.
- Wolfram L., Haas E., Bauerfeind P.** 2006. Nickel represses the synthesis of the nickel permease NixA of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.*, 188(4), pp. 1245-50.

- Worst D. J., Maaskant J., Vandenbroucke-Grauls C. M., Kusters J. G.** 1999. Multiple haem-utilization loci in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 145 ( Pt 3), pp. 681-8.
- Wu J., Benson A. K., Newton A.** 1995. Global regulation of a sigma 54-dependent flagellar gene family in *Caulobacter crescentus* by the transcriptional activator FlbD. *J Bacteriol*, 177(11), pp. 3241-50.
- Wu J., Ohta N., Newton A.** 1998. An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4), pp. 1443-8.
- Xiang Z., Censini S., Bayeli P. F., Telford J. L., Figura N., Rappuoli R., Covacci A.** 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun*, 63(1), pp. 94-8.
- Yahiro K., Niidome T., Kimura M., Hatakeyama T., Aoyagi H., Kurazono H., Imagawa K., Wada A., Moss J., Hirayama T.** 1999. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem*, 274(51), pp. 36693-9.
- Yahiro K., Wada A., Nakayama M., Kimura T., Ogushi K.-i., Niidome T., Aoyagi H., Yoshino K.-i., Yonezawa K., Moss J., Hirayama T.** 2003. Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J. Biol. Chem.*, 278(21), pp. 19183-89.
- Yamazaki S., Yamakawa A., Ito Y., Ohtani M., Higashi H., Hatakeyama M., Azuma T.** 2003. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *J Infect Dis*, 187(2), pp. 334-7.
- Yang Y., Inouye M.** 1991. Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24), pp. 11057-61.
- Yoshimoto T., Higashi H., Kanatani A., Lin X. S., Nagai H., Oyama H., Kurazono K., Tsuru D.** 1991. Cloning and sequencing of the 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *J Bacteriol.*, 173(7), pp. 2173-9.
- Zahrt T. C., Deretic V.** 2000. An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 182(13), pp. 3832-8.
- Zheng P. Y., Jones N. L.** 2003. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol*, 5(1), pp. 25-40.
- Zhou L., Lei X. H., Bochner B. R., Wanner B. L.** 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol*, 185(16), pp. 4956-72.

## H. Anhang

### 1. Abkürzungsverzeichnis

|                      |                                  |
|----------------------|----------------------------------|
| A                    | Adenosin                         |
| A                    | Ampere                           |
| α                    | alpha                            |
| Abb.                 | Abbildung                        |
| abs.                 | absolut                          |
| Acetyl-CoA           | Acetyl-CoenzymA                  |
| ADP                  | Adenosindiphosphat               |
| AI                   | Autoinducer                      |
| AK                   | Antikörper                       |
| AMP                  | Adenosinmonophosphat             |
| Amp                  | Ampicillin                       |
| APS                  | Ammoniumpersulfat                |
| AS                   | Aminosäure                       |
| Asp                  | Aspartat                         |
| ATP                  | Adenosintriphosphat              |
| B                    | beta                             |
| BHI                  | Brain-Heart-Infusion             |
| bp                   | Basenpaare                       |
| BSA                  | Rinderserumalbumin               |
| <i>B. subtilis</i>   | <i>Bacillus subtilis</i>         |
| bzw.                 | beziehungsweise                  |
| C                    | Kohlenstoff                      |
| C                    | Cytidin                          |
| °C                   | Grad Celsius                     |
| ca.                  | circa                            |
| cAMP                 | cyclisches AMP                   |
| <i>C. coli</i>       | <i>Campylobacter coli</i>        |
| <i>C. jejuni</i>     | <i>Campylobacter jejuni</i>      |
| Cm                   | Chloramphenicol                  |
| Cm <sup>r</sup>      | Chloramphenicolresistenz         |
| cm                   | Zentimeter                       |
| CO <sub>2</sub>      | Kohlenstoffdioxid                |
| cpm                  | counts per minute                |
| C-terminal           | carboxyterminal                  |
| D                    | Aspartat                         |
| d                    | 2'-desoxy                        |
| Da                   | Dalton                           |
| dd                   | 2'-3'.didesoxy                   |
| DEPC                 | Diethylpyrocarbonat              |
| d.h.                 | das heißt                        |
| dH <sub>2</sub> O    | destilliertes Wasser             |
| DKFZ                 | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DMSO                 | Dimethylsulfoxid                 |
| DNA                  | Desoxyribonukleinsäure           |
| DNase                | Desoxyribonuklease               |
| dNTP                 | Didesoxyribonukleosidtriphosphat |
| ds                   | doppelsträngig                   |
| DTT                  | Dithiothreitol                   |
| <i>E. coli</i>       | <i>Escherichia coli</i>          |
| EDTA                 | Ethylendiamintetraessigsäure     |
| <i>et al.</i>        | <i>et alteri</i>                 |
| EtOH                 | Ethanol                          |
| evtl.                | eventuell                        |
| Fe                   | Eisen                            |
| FP                   | French press                     |
| g                    | Gramm                            |
| G                    | Guanosin                         |
| gfp                  | green fluorescent protein        |
| H                    | Wasserstoff                      |
| h                    | Stunde                           |
| H <sub>2</sub> O     | Wasser                           |
| <i>H. hepaticus</i>  | <i>Helicobacter hepaticus</i>    |
| <i>H. influenzae</i> | <i>Hämophilus influenzae</i>     |
| His                  | Histidin                         |
| HK                   | Histidin Kinase                  |

|                        |   |
|------------------------|---|
| HP                     | <i>Helicobacter pylori</i>                    |
| <i>H. pylori</i>       | <i>Helicobacter pylori</i>                    |
| HTH                    | helix turn helix                              |
| IAA                    | Iodoacetamid                                  |
| IAA                    | Isoamylalkohol                                |
| IPTG                   | Isopropyl-Thio- $\beta$ -D-Galactopyranosid   |
| IS-                    | Insertions-                                   |
| K                      | Kalium  |
| K                      | Lysin   |
| k                      | Kilo-   |
| kb                     | Kilobasen                                     |
| Kan                    | Kanamycin                                     |
| Kan <sup>r</sup>       | Kanamycinresistenz                            |
| kDa                    | Kilodalton                                    |
| l                      | Liter   |
| LB                     | Luria-Bertani                                 |
| LPS                    | Lipopolysaccharid/e                           |
| Lsg.                   | Lösung  |
| m                      | Milli-  |
| M                      | Marker  |
| M                      | Molar   |
| mM                     | Millimolar                                    |
| $\mu$                  | Mikro-  |
| MALT                   | mucosa associated lymphoid tissue             |
| max.                   | Maximal                                       |
| Mb                     | Megabasen                                     |
| MCS                    | Multiple Cloning Site                         |
| Mg                     | Magnesium                                     |
| mg                     | Milligramm                                    |
| $\mu$ g                | Mikrogramm                                    |
| min                    | Minute  |
| mind.                  | mindestens                                    |
| $\mu$ l                | Mikroliter                                    |
| ml                     | Milliliter                                    |
| <i>M. tuberculosis</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>             |
| MW                     | Mittelwert                                    |
| N                      | Asparagin                                     |
| N                      | Stickstoff                                    |
| n                      | Nano-   |
| NAP                    | neutrophil activating protein                 |
| NCBI                   | National Center for Biotechnology Information |
| Ni                     | Nickel  |
| nm                     | Nanometer                                     |
| <i>N. meningitidis</i> | <i>Neisseria meningitidis</i>                 |
| NTA                    | Nitrilotriessigsäure                          |
| N-terminal             | aminoterminal                                 |
| $\Omega$               | Ohm   |
| OD                     | optische Dichte                               |
| OMPLA                  | Outer Membrane Phospholipase A                |
| ORF                    | Open reading frame                            |
| P                      | Phosphat                                      |
| P <sub>x</sub>         | Promotor des Gen x                            |
| PAA                    | Polyacrylamid                                 |
| PAGE                   | Polyacrylamidgelelektrophorese                |
| <i>P. aeruginosa</i>   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 |
| PAI                    | Pathogenitätsinsel                            |
| PBS                    | Phosphat-buffered saline                      |
| PCR                    | Polymerase-Chain-Reaktion                     |
| PE                     | Primer Extension                              |
| pH                     | pondus hydrogenii                             |
| PNK                    | Polynukleotid-Kinase                          |
| RBS                    | Ribosomenbindungs-Stelle                      |
| RNA                    | Ribonukleinsäure                              |
| RNase                  | Ribonuklease                                  |
| rpm                    | rounds per minute/Umdrehungen in der Minute   |
| RR                     | Response Regulator                            |
| RT                     | Raumtemperatur                                |
| s                      | Sekunde                                       |
| $\sigma$               | Sigma   |
| SDS                    | Sodiumdodecylsulfat                           |
| sec                    | Sekunde                                       |
| Ser                    | Serin   |
| STABW                  | Standardabweichung                            |

---

|                        |                                 |
|------------------------|---------------------------------|
| T                      | Thymidin                        |
| t                      | Zeit                            |
| Tab.                   | Tabelle                         |
| TBE                    | Tris-Borat-EDTA                 |
| TCA                    | Trichloressigsäure              |
| TEMED                  | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin     |
| Thr                    | Threonin                        |
| T <sub>m</sub>         | Schmelztemperatur               |
| Tris                   | Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| Tyr                    | Tyrosin                         |
| U                      | Unit(s)                         |
| u.a.                   | unter anderem                   |
| UE                     | Untereinheit/-en                |
| ÜN                     | über Nacht                      |
| ÜNK                    | Übernachtkultur                 |
| UV                     | Ultraviolett                    |
| V                      | Volt                            |
| vgl.                   | vergleiche                      |
| Vol.                   | Volumen                         |
| W                      | Watt                            |
| <i>W. succinogenes</i> | <i>Wolinella succinogenes</i>   |
| WT                     | Wildtyp                         |
| w/v                    | „weight per volume“             |
| www                    | world wide web                  |
| z.B.                   | zum Beispiel                    |

## 2. Curriculum vitae

### zur Person

|               |                                   |
|---------------|-----------------------------------|
| Name          | Jennifer Schär                    |
| Geboren am    | 20.06.1976                        |
| Geburtsort    | Würzburg                          |
| Wohnhaft in   | Ulrichstrasse 6<br>97074 Würzburg |
| Familienstand | ledig                             |
| Nationalität  | deutsch                           |

### aktuell

|                   |  |
|-------------------|--|
| 11/2005 – heute   | wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Mikrobiologie   |
| 07/2005 – 11/2005 | Teilnahme am Praxiskolleg „Betriebswirtschaft und Management“, der Firma ATV Ausbildung Training Vernetzung GmbH in Würzburg<br>Schwerpunkte: - Betriebswirtschaft<br>- Marketing<br>- Projektmanagement<br>- Vertrieb |

### Hochschulausbildung

|                   |   |
|-------------------|---|
| seit 06/2005      | Schriftliche Zusammenstellung der Doktorarbeit  |
| 02/2005 – 06/2005 | ehrenamtliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Mikrobiologie  |
| 10/2001 - 02/2005 | Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von PD Dr. Dagmar Beier mit dem Thema:<br>„Funktionelle Charakterisierung der Response-Regulatoren HP1021, HP1043 und ArsR (HP0166) von <i>Helicobacter pylori</i> “  |
| 10/1995 - 10/2001 | Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Zell- und Entwicklungsbiologie und Biochemie <i>Abschluss</i> : Diplom-Biologin<br>Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie unter Anleitung von PD Dr. Dagmar Beier mit dem Thema:<br>„Funktionelle Charakterisierung der Response-Regulatoren HP1043, HP1021 und HP0166 von <i>Helicobacter pylori</i> mit Hilfe eines genetischen Komplementationssystem“ |

### Schulbildung

|              |  |
|--------------|--|
| 1986 – 1995: | Johann-Schöner-Gymnasium in Karlstadt<br><i>Abschluss</i> : Abitur |
| 1982 – 1986: | Volksschule Zellingen  |



### 3. Publikationsliste

#### 3.1 Originalarbeiten

**Pflock M., Dietz P., Schär J., Beier D.** (2004): "Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori*" FEMS Microbiol Lett. 2004 May 1; 234(1):51-61

**Schär J., Sickmann A., Beier D.** (2005): "Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*" J Bacteriol. 2005 May; 187(9):3100-9

**Schmaußer B., Endrich S., Brändlein S., Schär J., Beier D., Müller-Hermelink H. K., Eck M.** (2005): "The chemokine receptor CCR7 is expressed on epithelium of non-inflamed gastric mucosa, *Helicobacter* gastritis, gastric carcinoma and its precursor lesions and up-regulated by *H. pylori*" Clin Exp Immunol. 2005 Feb; 139(2):323-7

**Müller<sup>1</sup> S., Pflock<sup>1</sup> M., Schär<sup>1</sup> J., Kennard S., Beier D.** (2006; Epub ahead of print): "Regulation of expression of atypical orphan response regulators of *Helicobacter pylori*" Microbiological Research

<sup>1</sup> these authors contributed equally to the present study

**Pflock M., Bathon M., Schär J., Müller S., Mollenkopf H., Meyer T.F., Beier D.:** „The orphan response regulator HP1021 of *Helicobacter pylori* regulates transcription of a gene cluster presumably involved in acetone metabolism" (Epub ahead of print)

#### 3.2 Posterpräsentationen

**Schär J., Beier D.:** "Phosphorylation is not required for the function of essential response regulators of *H. pylori*" Theodor-Boveri-Institut Universität, Würzburg, 2003

**Schär J., Pflock M., Gressmann H., Meyer T. F., Beier D.** "Two-component signal transduction in *H. pylori*" Evaluierung des Kompetenznetzwerks, Pathogenomics 2004

#### 3.3 Vorträge

"Activity of the atypical response regulators HP1043, HP1021 and HP0166 of *Helicobacter pylori* is phosphorylation-independent" 5. *Helicobacter pylori* -Workshop, Herrsching am Ammersee, März 2005

"Activity of the atypical response regulators HP1043, HP1021 and ArsR (HP0166) of *Helicobacter pylori* is phosphorylation-independent" Technische Universität München; Lehrstuhl für Biologische Chemie; auf Einladung von Prof. Dr. Arne Skerra, November 2005