

BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE

**Funktionale und molekulare Charakterisierung des ArsRS
Zweikomponenten-Systems sowie der Response-Regulatoren
HP1021 und HP1043 von *Helicobacter pylori***

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

vorgelegt von

Stefanie Müller

geboren in Werneck

Würzburg, 2009

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 von Februar 2005 bis Februar 2009 unter Betreuung von PD Dr. Dagmar Beier angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig 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.

Ottobrunn,

.....

Vielen Dank.....

Zu allererst möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Frau PD Dr. Dagmar Beier für die Überlassung des spannenden Themas, für die sehr gute fachliche Anleitung und für die wirklich hervorragende Betreuung bedanken. Ich habe in diesen vier Jahren sehr viel von ihr gelernt. Sie entfachte meine Begeisterung für die Forschung und ich (zusammen mit Tatjana) die Ihre fürs Reiten.

Herrn Prof. Dr. Roland Benz danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur und Herrn Prof. Dr. Werner Göbel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar für die bioinformatische Identifizierung des putativen Bindemotivs des Response-Regulators ArsR~P.

Besonders bedanken möchte ich mich bei ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe. Der meiste Dank geht hier an „meine“ Jenni, die mir gerade in der Anfangszeit als „personal Coach“ immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Monika Götz und Sarah Schlosser danke ich für die Mitarbeit in meinen Projekten und Frederike Fritsch dafür, dass sie die perfekte Laborkollegin war, mit der man auf der Arbeit viel Spaß haben konnte. Einen guten Start in den Arbeitstag verdanke ich Tatjana, „Geschichten übers Pferd“ sind eine wirklich gute Möglichkeit, den Tag entspannt zu beginnen.

Ein besonderer Dank geht hier noch an Regina für viele tolle Gespräche, schön, dass wir beide direkt sind, alles ansprechen können und uns trotzdem/deshalb gut verstehen. Allen nicht namentlich genannten Mitgliedern unserer Essensgruppe herzlichen Dank für kurzweilige Mittagspausen. Besonders erwähnen möchte ich hier noch zwei ehemalige Mitarbeiterinnen, Melli und Jenni, es hat richtig viel Spaß gemacht, mit Euch am selben Lehrstuhl zu arbeiten.

Bei allen MitarbeiterInnen des Instituts bedanke ich mich für das sehr nette Arbeitsklima, viele schöne Gespräche und hilfreiche Auskünfte.

Am meisten danke ich meinen Eltern. Ihr habt mich immer unterstützt, ohne Euch wäre diese Arbeit gar nicht möglich gewesen. Und schließlich danke ich natürlich noch Börni, der mir immer zur Seite stand, auch wenn das in den letzten Monaten vermutlich nicht immer einfach war.

Inhaltsverzeichnis

A. Summary	1
A. Zusammenfassung	4
B. Einleitung	7
1. <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.1 Pathogenität, Epidemiologie und Transmission von <i>H. pylori</i>	7
1.2 Genetische Eigenschaften von <i>H. pylori</i>	9
1.3 Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	11
1.4 Säureresistenz in <i>H. pylori</i>	17
1.5 Genregulation in <i>H. pylori</i>	21
2. Zweikomponenten-Systeme	32
2.1 Allgemeine Charakterisierung	32
2.2 Zweikomponenten-Systeme in <i>H. pylori</i>	37
3. Zielsetzung	43
C. Material	45
1. Bakterienstämme	45
2. Vektoren und rekombinante Plasmide	47
3. Oligonukleotide	50
4. Proteine	54
5. Antikörper	55
6. Verbrauchsmaterialien	55
6.1 Chemikalien	55
6.2 Enzyme	55
6.3 Sonstiges	55
7. Wachstumsmedien und Zusätze	55
7.1 Medien und Agarplatten für <i>E. coli</i>	55
7.2 Medien und Agarplatten für <i>H. pylori</i>	56
7.3 sonstige Medien	56
8. Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gelelektrophorese	57
9. Geräte	58
D. Methoden	59
1. Arbeiten mit Bakterien	59
1.1 Anzucht von <i>H. pylori</i> auf Columbia-Blutagarplatten	59
1.2 Anzucht von <i>H. pylori</i> in Flüssigkultur	59
1.3 Säureinduktion in <i>H. pylori</i>	59
1.4 Eisenüberschuss- bzw. Eisenmangelinduktion in <i>H. pylori</i>	60
2. Molekulargenetische Methoden	60
2.1 Isolierung von DNA	60
2.1.1 Herstellung von Zellysat von <i>E. coli</i>	60
2.1.2 Herstellung von Zellysat von <i>H. pylori</i>	60
2.1.3 Minipräparation chromosomaler <i>H. pylori</i> -DNA	60
2.1.4 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (Myakishev et al., 1995) ...	61
2.1.5 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab	61
2.1.6 EtOH-Fällung von DNA	62
2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA	62

2.2	Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge	62
2.2.1	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	62
2.2.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gelextraktionskit von Qiagen	63
2.3	Amplifikation von DNA	64
2.3.1	Die Polymerase-Kettenreaktion	64
2.3.2	Aufreinigung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN	65
2.4	Enzymatische Modifikation von DNA	65
2.4.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	65
2.4.2	Dephosphorylierung des Vektors	66
2.4.3	Ligation	66
2.5	Transformation	66
2.5.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	66
2.5.2	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α bzw. <i>E. coli</i> M15 mit Plasmid-DNA ...	67
2.5.3	Transformation von natürlich kompetenten <i>H. pylori</i> -Stämmen	67
2.5.4	Transformation von <i>H. pylori</i> mittels Elektroporation	67
2.6	Sequenzierung	68
2.6.1	Automatische DNA-Sequenzierung nach der Fluoreszenzmethode	68
2.6.2	DNA-Sequenzierung mit $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP	69
2.7	Southern Blot	69
2.8	DNaseI-Footprint	70
3.	Arbeiten mit RNA	72
3.1	RNA-Isolierung aus <i>H. pylori</i>	72
3.1.1	RNA-Präparation mit TRIzol	72
3.1.2	DNase-Verdau	73
3.1.3	Reinigung und Fällung der RNA	73
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von RNA	73
3.2	Analyse von RNA	73
3.2.1	Microarray-Analysen	73
3.2.2	Primer Extension Analyse	75
4.	Proteinbiochemische Methoden	76
4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	76
4.2	Präparation von Gesamtzellprotein	77
4.3	Überexpression von Proteinen	78
4.3.1	Überexpression mit Hilfe des pQE30 Plasmids	78
4.3.2	Überexpression mit Hilfe des pGEX-3X Plasmids	78
4.4	Reinigung von Proteinen	78
4.4.1	Zellaufschluss	78
4.4.2	Proteinreinigung über die HisTrap TM HP Säule über die ÄKTA-Prime ...	79
4.4.3	Proteinreinigung über die Glutathion-Sepharose 4B Säule	81
4.4.4	Vorbereitung der Säule	81
4.4.5	Proteinreinigung	81
4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	81
4.6	Western-Blot	81
4.7	<i>in vitro</i> Phosphorylierung von Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren mit radioaktiv markiertem ATP	82
E.	Ergebnisse	84
1.	Funktionelle Charakterisierung des Säuresensors ArsS von <i>H. pylori</i>	84

1.1	Konstruktion und Analyse verschiedener <i>H. pylori</i> 26695/arsS-X Mutanten, die unterschiedliche Allele des Gens <i>arsS</i> exprimieren	85
1.1.1	Konstruktion und Charakterisierung der Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/arsS-HXQ (X = 35, 44, 90, 93, 94, 118, 126)	85
1.1.2	Analyse der pH-abhängigen Transkription der ArsRS Target-Gene <i>hp0119</i> , <i>hp1432</i> und <i>ureA</i> in den Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/arsS-HXQ	89
1.1.3	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94A	91
1.1.4	Funktionelle Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94Q mittels RNA-Microarray-Analysen.....	93
1.1.5	Konstruktion und Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94R	95
1.1.6	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,XAA	96
1.1.7	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H(35-126)Q.....	99
1.1.8	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94ADXA und <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AEXA	101
1.1.9	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> 26695/arsS- Δ ID	109
1.2	Vergleichende Analyse der ArsS Orthologen von <i>Helicobacter hepaticus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> und <i>Wolinella succinogenes</i>	113
1.2.1	Kreuzphosphorylierungen zwischen den orthologen Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren.....	116
1.2.2	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutanten <i>H. pylori</i> G27/HH1607, <i>H. pylori</i> G27/CJ1262 und <i>H. pylori</i> G27/WS1818.....	120
1.2.3	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> G27/WS1818-H92Q.....	127
2.	Identifizierung einer Konsensussequenz für die DNA-Bindung durch ArsR~P 130	
3.	Identifikation von essentiellen Target-Genen des Response-Regulators ArsR-D52N	135
3.1	Konstruktion der Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52N- Δ und <i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52N- Δ	135
3.1.1	Konstruktion und Charakterisierung des merodiploiden Stammes <i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52N	135
3.1.2	Konstruktion des merodiploiden Stammes <i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52N	137
3.1.3	Konstruktion und Charakterisierung der Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52N Δ und <i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52N Δ	138
3.2	Analyse der Expression des modifizierten Response-Regulators ArsR-D52 in den Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52N Δ und <i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52N Δ	143
3.3	Transkriptomvergleich der Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52N Δ und <i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52N Δ mittels RNA-Microarray-Analysen.....	143
3.4	Versuche zur Deletion on ArsRS Target-Genen mit potentiell essentieller Funktion	146
4.	Stammspezifische Unterschiede in der säureabhängigen Genregulation durch das CrdRS Zweikomponenten-System in <i>H. pylori</i>.....	150
5.	Untersuchungen zur Expressionsregulation der atypischen „orphan“-Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 in <i>H. pylori</i>	153
5.1	Expressionsanalysen des Response-Regulators HP1021	153
5.1.1	Konstruktion und Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> G27/P _{pfr} 1021.....	153

5.1.2	Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> G27/P _{fecA} 1021Δ.....	157
5.2	Expressionsanalysen des Response-Regulators HP1043	159
5.2.1	Konstruktion und Charakterisierung der Mutante <i>H. pylori</i> G27/P _{pfv} 1043Δ	159
5.2.2	Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante <i>H. pylori</i> G27/P _{fecA} 1043Δ.....	160
5.2.3	Expressionsanalysen des zu HP1043 orthologen Response-Regulators CJ0355 aus <i>C. jejuni</i> im genetischen Hintergrund von <i>H. pylori</i> G27.....	165
F. Diskussion.....		170
G. Literaturverzeichnis		192
H. Anhang.....		220
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	220
2.	Curriculum vitae	223
3.	Publikationsliste	224
3.1	Originalarbeiten.....	224
3.2	Posterpräsentation	224
3.3	Vorträge.....	224

A. Summary

Bacteria are able to adapt rapidly to alternating environmental conditions. Two component systems play a predominant role in sensing environmental stimuli and triggering a proper cellular response. The genome of *Helicobacter pylori* harbours only a few genes encoding for two component system proteins (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999). Besides the chemotaxis system only three complete two component systems, HP0703/HP0244, CrdRS and ArsRS as well as two atypical “orphan” response regulators HP1021 and HP1043 which lack a corresponding histidine kinase were identified. This relatively small number of two component regulatory systems is probably reduced due to the adaptation of *H. pylori* to its unique habitat, the human stomach.

The ArsRS two component system of *H. pylori* which controls the acid response and therefore is required for colonization of the mucus is well characterized (Pflock et al., 2004; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006; Wen et al., 2006; Wen et al., 2007). The kinase ArsS is activated under acidic conditions and phosphorylates the response regulator ArsR resulting in activation or repression of transcription of ArsRS-dependent target genes. Many proteins, amongst them the urea channel UreI, have been shown to be acid activated via protonation of amino acids located in periplasmic regions of the protein. The acid response of *H. pylori* is triggered when the pH drops from 7 to 5. Therefore, due to their side chain pK_a -value of 6 seven histidine residues in the periplasmic sensor domain of the kinase ArsS were hypothesized to be involved in acid sensing. By construction of *H. pylori* mutants expressing ArsS proteins in which the histidine residues are substituted by the neutral amino acid glutamine and transcriptional analysis of the ArsRS target genes *hp0119*, *hp1432* and *ureA* it was shown that the histidine residue H94 is involved in the acid sensing by the histidine kinase ArsS. Substitution of H94 by the positively charged amino acid arginine did not result in a constitutively active ArsS protein. Therefore it remains unclear whether H94 contributes to the acid-sensing via protonation. From the analysis of ArsS double mutants carrying in addition to a H94A mutation a substitution of one of the other histidine residues by alanine it was concluded that no other histidine residues besides H94 are involved in acid sensing. A *H. pylori* mutant expressing an ArsS protein in which all seven histidine residues were replaced by alanine still showed pH-responsive induction of the ArsRS target-genes *hp0119* and *hp1432*. This result suggests a contribution of other amino acids which can get protonated in acid sensing. Analysis of ArsS-mutants in which in addition to histidine residue H94 one of the negatively charged glutamic or aspartic acid residues were exchanged to glutamine indicated that these negatively charged amino acids may participate in the acid sensing. Amongst them the aspartic acid residue D126 seems to play predominant role.

The closely related ϵ -proteobacteria *Helicobacter hepaticus*, *Wolinella succinogenes* and *Campylobacter jejuni* express ArsRS orthologs (Suerbaum et al., 2003; Baar et al., 2003; Parkhill et al., 2000). *In vitro* phosphorylation assays with the recombinant ArsRS-orthologous proteins demonstrated that the kinases ArsS, CJ1262 from *C. jejuni* and HH1607 from *H. hepaticus* have the ability to efficiently phosphorylate the orthologous response regulators ArsR, CJ1261, WS1817 and HH1608. A recombinant histidine kinase WS1818 exhibiting autophosphorylation activity could not be purified. Mutants of *H. pylori* G27 expressing the orthologous histidine kinases WS1818, HH1607, and CJ1262 instead of the ArsS protein were constructed to investigate whether acidic pH is a common stimulus sensed by ArsS orthologs. Transcriptional analysis of the mutants revealed that the kinase WS1818 is activated under acidic conditions. The histidine kinase HH1607 also responds to acid as an environmental signal though less efficient than ArsS and WS1818. Since nothing is known about the function of the kinases HH1607 and WS1818 it remains unclear whether these

proteins contribute to acid sensing and mounting an acid response *in vivo* in *W. succinogenes* and *H. hepaticus*. The kinase CJ1262 is not activated under acidic conditions.

The phosphotransfer reaction from the histidine kinase ArsS to the response regulator ArsR is followed by binding of the phosphorylated regulator protein ArsR~P to promoter sequences of ArsRS target-genes thus regulating their transcription (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006). Binding of ArsR~P to the promoter region of the ArsRS target-genes *hp1022* and *hp1104* was demonstrated via DNaseI footprint analysis. The detected binding region overlaps with a consensus motif which was identified using bioinformatics tools. The bioinformatic approach was based on the comparison of experimentally determined binding regions of ArsR~P in the promoter region of the ArsRS target-genes *ureA*, *ureI*, *amiE*, *amiF*, and *hp1408*.

The essential response regulator ArsR probably controls in its non phosphorylated form the expression of at least one essential gene. To identify such target-genes two mutants were constructed in which transcription of the allele *arsR-D52N* is under the control of the strong constitutively active promoter P_{cagA} or the promoter of the *arsRS* locus P_{hp0166} , respectively. Whole genome transcriptional profiling of the mutant overexpressing ArsR-D52N and the mutant expressing the response regulator at a wild type level allowed the identification of 65 putative target-genes of the non phosphorylated RR ArsR-D52N. The identified regulon overlaps in part with the regulon of the phosphorylated RR ArsR~P (Pflock et al., 2006) and with the regulon of the response regulator HP1021 (Pflock et al., 2007a). Interesting target genes were checked for an essential function by the attempt to construct knock out mutants. A deletion of the genes *hp1224* and *hp1582/1583* was not possible, neither in the genetic background of *H. pylori* G27 nor in the genetic background of *H. pylori* 26695. Therefore this genes might be essential target-genes of the non phosphorylated response regulator ArsR-D52N.

A function of the CrdRS two component system in acid sensing and in the transcriptional regulation of acid resistance genes was postulated in the literature (Loh and Cover, 2006). In contrast to the results of Loh and Cover obtained with strain *H. pylori* J99 no involvement of CrdRS in acid-dependent transcriptional regulation of the genes *ureA*, *amiE*, and *amiF* could be demonstrated in strains *H. pylori* G27 and *H. pylori* 26695. Hence, it is tempting to speculate, that gene regulation via the CrdRS two component system exhibits strain specific differences.

The response regulators HP1021 and HP1043 presumably play a role in the regulation of genes whose protein products have a fundamental function in vegetative cell growth. In contrast to the well established two component system paradigm their activity is not modulated via phosphorylation (Schär et al., 2005). In this work it was analyzed whether a strict control of their expression is required for the growth associated function of the respective response regulators. For this purpose several mutants were constructed in which the transcription of the genes *hp1021* and *hp1043* was placed under the control of different promoters. It was demonstrated that the expression of the gene *hp1043* is controlled both on the transcriptional and posttranscriptional and/or posttranslational level and that this expression control is important for response regulator function. In contrast, strict expression control is not a prerequisite for the function of response regulator HP1021.

A. Zusammenfassung

Bakterien sind in der Lage, sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von verschiedensten Umweltreizen und der zellulären Antwort spielt die Genregulation durch Zweikomponenten-Systeme. Im Genom von *Helicobacter pylori* sind nur wenige Gene vorhanden, die für Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen codieren (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999). Dazu zählen neben dem Chemotaxis-System lediglich drei vollständige Zweikomponenten-Systeme, HP0703/HP0244, CrdRS und ArsRS, sowie die beiden so genannten „orphan“ Response-Regulatoren HP1021 und HP1043, denen bisher keine korrespondierende Histidin-Kinase zugeordnet werden konnte. Diese geringe Anzahl an Zweikomponenten-System-Proteinen ist vermutlich auf die Anpassung des Keims an sein einziges Habitat, den menschlichen Magen, zurückzuführen.

Gut charakterisiert ist das ArsRS Zweikomponenten-System in *H. pylori*, welches an der Ausbildung der Säureresistenz beteiligt ist und dem Bakterium so die Kolonisierung der Magenschleimhaut ermöglicht (Pflock et al., 2004; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006; Wen et al., 2006; Wen et al., 2007). Die Histidin-Kinase ArsS wird in Gegenwart von Säure aktiviert und phosphoryliert den Response-Regulator ArsR, der die Transkription von Target-Genen reguliert. Von mehreren Proteinen wie z. B. dem Harnstoffkanal UreI aus *H. pylori* ist bekannt, dass eine Zunahme der Aktivität unter sauren pH-Bedingungen durch die Protonierung von verschiedenen Aminosäuren in periplasmatischen Bereichen des Proteins vermittelt wird. In der periplasmatischen Sensordomäne der Histidin-Kinase ArsS sind sieben Histidinreste vorhanden, die aufgrund ihres pK_a -Wertes von 6,0 bei Absenken des pH Wertes von pH 7 auf pH 5, was eine Aktivierung der Histidin-Kinase zur Folge hat, protoniert werden könnten. Durch die Konstruktion von *H. pylori*-Mutanten, die ArsS Proteine exprimieren, in welchen die einzelnen Histidinreste der periplasmatischen Sensordomäne durch die nicht protonierbare Aminosäure Glutamin substituiert wurden und anschließende Transkriptionsanalysen ausgewählter ArsRS-Target-Gene bei pH 5 konnte gezeigt werden, dass der Histidinrest H94 der periplasmatischen Sensordomäne eine wesentliche Rolle bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS spielt. Die Einführung einer positiv geladenen AS an dieser Position allein reicht jedoch nicht aus, um die Kinase zu aktivieren, weshalb unklar bleibt, ob eine Protonierung des Histidinrestes H94 *in vivo* die Säurewahrnehmung vermittelt. Durch die Konstruktion von Doppelmutanten, in denen neben H94 jeweils ein weiterer Histidinrest durch Alanin ersetzt wurde, konnte kein Indiz für die Beteiligung dieser Histidinreste an der Säurewahrnehmung erhalten werden. In einer Mutante, in welcher alle sieben Histidinreste der periplasmatischen Sensordomäne durch die nicht protonierbare Aminosäure Glutamin substituiert wurden, konnte eine säureabhängige Transkriptionsinduktion der ArsRS Target-Gene *hp0119* und *hp1432* beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass neben den Histidinresten noch weitere Aminosäuren an der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase beteiligt sind. ArsS-Mutanten, in welchen zusätzlich zu dem Histidinrest H94 noch ein negativ geladener Glutamat- oder Aspartatrest der periplasmatischen Sensordomäne durch die nicht protonierbare AS Alanin substituiert wurde, lieferten Hinweise darauf, dass diese Aminosäuren an der Säurewahrnehmung durch die Kinase beteiligt sein könnten. Der Aspartatrest D124 leistet unter den negativ geladenen AS vermutlich den größten Beitrag zur Säurewahrnehmung.

In den mit *H. pylori* nahe verwandten Arten *Helicobacter hepaticus*, *Wolinella succinogenes* und *Campylobacter jejuni* (Suerbaum et al., 2003; Baar et al., 2003; Parkhill et al., 2000) sind Orthologe zu dem ArsRS Zweikomponenten-System vorhanden. Durch *in vitro* Phosphorylierungsstudien mit den aufgereinigten rekombinanten ArsRS-Orthologen konnte

gezeigt werden, dass durch die Histidin-Kinasen ArsS, CJ1262 aus *C. jejuni* und HH1607 aus *H. hepaticus* eine effiziente Phosphorylierung der vier Response-Regulatoren ArsR, CJ1261, HH1607 und WS1817 erfolgt. Die Aufreinigung einer rekombinanten HK WS1818, die Autokinase-Aktivität zeigt, gelang nicht. Um zu untersuchen, ob es sich bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS um eine spezifische Anpassung von *H. pylori* an sein Habitat handelt oder ob Säure einen allgemeinen Stimulus der ArsS-orthologen Kinasen darstellt, wurden Mutanten im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27 konstruiert, in welchen die Histidin-Kinase ArsS durch die orthologen Kinasen HH1608, CJ1262 und WS1818 substituiert wurde. Durch Transkriptionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Kinase WS1818 eine gesteigerte Aktivität bei saurem pH-Wert aufweist. Auch die Kinase HH1607 kann Säure als einen Umweltreiz wahrnehmen, jedoch deutlich weniger effektiv als die Kinasen ArsS und WS1818. Ob die Zweikomponenten-Systeme HH1608/HH1607 und WS1817/WS1818 *in vivo* in *H. hepaticus* und *W. succinogenes* an der Wahrnehmung von Säure und evtl. an der Ausbildung einer Säureresistenz beteiligt sind, ist unklar, da über die Funktion dieser Zweikomponenten-Systeme bisher nichts bekannt ist. Die Kinase CJ1262 ist nicht in der Lage, Säure als einen Umweltreiz wahrzunehmen.

Nach der Phosphorylierung durch die Histidin-Kinase ArsS bindet der phosphorylierte RR ArsR~P an die Promotorsequenz von Target-Genen und reguliert auf diese Weise deren Transkription (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006). Über Footprint-Experimente konnte eine Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P in der Promotorregion der ArsRS-Target-Gene *hp1022* und *hp1104* nachgewiesen werden. Die ermittelten Binderegionen überlappen mit einem Konsensusmotiv, welches durch bioinformatische Analyse bereits bekannter Bindestellen von ArsR~P im Promotorbereich der Gene *ureA*, *ureI*, *amiE*, *amiF* und *hp1408* bestimmt wurde.

Der essentielle Response-Regulator ArsR kontrolliert in seiner nicht phosphorylierten Form vermutlich die Expression von mindestens einem für *H. pylori* essentiellen Gen. Zur Identifikation solcher Target-Gene wurden zwei Mutanten konstruiert, in welchen die Transkription des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{cagA} bzw. des natürlichen Promotors P_{hp0166} stattfindet. Durch Transkriptomvergleich der Mutante, die *ArsR*-D52N stark überexprimiert und der Mutante, in welcher eine dem Wildtyp entsprechende Menge an Response-Regulator exprimiert wurde, wurden in dieser Arbeit 65 potentielle Target-Gene des nicht phosphorylierten RR *ArsR*-D52N identifiziert. Das Regulon des nicht phosphorylierten RR *ArsR*-D52N überlappt zum Teil mit dem Regulon des phosphorylierten RR *ArsR*~P (Pflock et al., 2006) und teilweise auch mit dem Regulon des „orphan“ RR HP1021 (Pflock et al., 2007a). Unter den identifizierten Target-Genen befinden sich die Gene *hp1224* und *hp1582/hp1583*, deren Deletion weder in *H. pylori* 26695 noch in *H. pylori* G27 möglich war. Bei diesen Genen könnte es sich somit um essentielle Target-Gene des nicht phosphorylierten RR *ArsR*-D52N handeln.

Auch für das CrdRS Zweikomponenten-System wurde in der Literatur eine Funktion bei der Säurewahrnehmung und der Regulation der Säureresistenzgene postuliert (Loh und Cover, 2006). Es konnte jedoch im Gegensatz zu den von Loh und Cover mit dem Stamm *H. pylori* J99 erzielten Daten in *H. pylori* G27 und *H. pylori* 26695 keine Beteiligung des CrdRS Zweikomponenten-Systems an der säureabhängigen Transkriptionsregulation der Gene *ureA*, *amiE* und *amiF* bestätigt werden. Es wird daher vermutet, dass die Genregulation durch das CrdRS Zweikomponenten-System stammesspezifische Unterschiede aufweist.

Die beiden Response-Regulatoren HP1043 und HP1021 spielen vermutlich eine Rolle bei der Regulation von Genen, deren Produkte eine wichtige Funktion für das vegetative

Zellwachstum haben. Die Aktivität der beiden RR wird entgegen dem gängigen Zweikomponenten-System-Paradigma nicht über eine Phosphorylierung moduliert (Schär et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob eine strikte Expressionskontrolle für die wachstumsassoziierten Funktion dieser Response-Regulatoren von Bedeutung ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mutanten konstruiert, in welchen die Transkription der Gene *hp1021* und *hp1043* unter der Kontrolle von unterschiedlich regulierten Promotoren stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens *hp1043* sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell und/oder posttranslational strikt reguliert wird. Es kann deshalb postuliert werden, dass die Aktivität des RR HP1043 über die vorhandene Konzentration an Regulator in der Bakterienzelle beeinflusst wird. Die Expression des Gens *hp1021* wird nicht strikt reguliert. Auf welche Weise die Aktivität des RR HP1021 moduliert wird, bleibt unklar.

B. Einleitung

1. *Helicobacter pylori*

Im Jahr 1982 beobachteten die beiden australischen Wissenschaftler Robin Warren und Barry Marshall das Vorhandensein von spiralförmigen, flagellierten Bakterien in Biopsie-Proben, die aus Patienten entnommen wurden, die an einer Gastritis (Magenschleimhautentzündung) litten. Durch Nachweis der Koch'schen Postulate waren sie die Ersten, die diesen Keim mit gastrointestinalen Erkrankungen in Verbindung brachten. Es gelang Ihnen, den Keim aus Biopsie-Proben zu isolieren und zu kultivieren. Den Pathogenitätsnachweis erbrachte Barry Marshall, indem er sich in Ermangelung eines Tiermodells selbst mit einer Reinkultur dieser spiralförmigen Bakterien infizierte und daraufhin eine Gastritis entwickelte. Aus entnommenen Biopsie-Proben konnte der Mikroorganismus reisoliert und erneut in Kultur angezogen werden (Marshall und Warren, 1984). Für Ihre Pionierarbeiten auf diesem Gebiet erhielten Robin Warren und Barry Marshall im Jahr 2005 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für die Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori* und die Assoziation dieses Keims mit der Entwicklung von Gastritis und von Magengeschwüren.

Das beschriebene Magenbakterium wurde dem Genus *Campylobacter* zugeordnet und zunächst als *C. pyloridis* bezeichnet, jedoch wurde kurze Zeit später aufgrund von 16S-rRNA Analysen der Genus *Helicobacter* definiert und das Magenbakterium in *Helicobacter pylori* umbenannt (Goodwin et al., 1989). *H. pylori* ist ein gram negatives, spiralförmiges, neutralophiles Bakterium. Taxonomisch ist es in die ϵ -Untergruppe der Proteobakterien, in die Ordnung der *Campylobacterales* und in die Familie der *Helicobacteraceae* eingeordnet. Die Familie der *Helicobacteraceae* besteht aus sechs Gattungen, darunter auch die Gattung *Wolinella*. Die Gattung *Helicobacter*, der mittlerweile über hundert Arten zugeordnet werden (Taxonomy Browser, NCBI) die den Gastro-Intestinaltrakt von Vertebraten besiedeln, wird entsprechend dem Kolonisierungsort der Bakterien weiter unterteilt in die gastrischen und die enterohepatischen Arten. Die mit *H. pylori* am nächsten verwandte Art ist *H. acinonychis*, dieser Keim kolonisiert den Magen von Raubkatzen (Eaton et al., 1993; Schröder et al., 1998). Das Genom von *H. acinonychis* ist vollständig sequenziert und durch Vergleich mit dem Genom von *H. pylori* lässt sich schließen, dass vor ca. 50.000-200.000 Jahren eine Übertragung des Keims vom frühen Menschen auf Großkatzen stattgefunden hat (Eppinger et al., 2006).

1.1 Pathogenität, Epidemiologie und Transmission von *H. pylori*

Neben dem menschlichen Magen war der Magen von Primaten lange Zeit die einzig weitere beschreibende ökologische Nische von *H. pylori* (Solnick et al., 2003). Studien, die darauf hinweisen, dass *H. pylori* auch in Wasser vorhanden sein könnte und auf diesem Weg eine Übertragung des Keims durch kontaminiertes Trinkwasser stattfinden könnte, beruhten lange nur auf dem Nachweis von *H. pylori*-DNA (Enroth und Engstrand, 1995; Hegarty et al., 1999; Park et al., 2001; Queralt et al., 2005). Jedoch konnte unter Laborbedingungen beobachtet werden, dass *H. pylori* nach fünftägiger Inkubation in Mineralwasser erneut kultiviert werden kann (Queralt und Araujo, 2007). Vor kurzer Zeit wurde erstmalig ein kultivierbares *H. pylori*-Umweltisolat beschrieben (Cellini et al., 2008), so dass eine Übertragung von *H. pylori* durch kontaminiertes Trinkwasser nicht mehr länger ausgeschlossen werden kann. Der in der Literatur am häufigsten beschriebene Verbreitungsweg ist eine Übertragung von Mensch zu Mensch (oral/oral oder fäkal/oral), die vor allem intrafamiliär stattfindet (Goodman und Correa, 2000; Rothenbacher et al., 2000).

Eine Infektion mit *H. pylori* erfolgt meist in der Kindheit und ohne medizinische Behandlung persistiert der Keim lebenslang (Rowland und Drumm, 1998; Rowland et al., 2006, Mitchell et al., 1998). Ca. 50 % der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori* infiziert (Suerbaum und Michetti, 2002), wobei die Prävalenz stark zwischen Industrie- und Entwicklungsländern schwankt. In den letzten Jahren konnte jedoch ein Rückgang der *H. pylori* Durchseuchungsrate sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern festgestellt werden. In China konnte ein Rückgang der *H. pylori* Prävalenz von 62,5 % im Jahr 1993 auf nur 49,3 % im Jahr 2003 (Chen et al., 2007) beobachtet werden, eine in Japan durchgeführte Studie konnte zeigen, dass die Durchseuchungsrate von 68,4 % im Jahr 1993 auf 52,5 % im Jahr 2002 zurückging (Fujimoto et al., 2007) und in Russland konnte eine Verminderung der Infektionsrate von Schulkindern von 44 % im Jahr 1995 gegenüber 13 % im Jahr 2005 beobachtet werden (Tkachenko et al., 2007). Dieser Rückgang ist vermutlich auf verbesserte hygienische Bedingungen zurückzuführen.

Die meisten der mit *H. pylori* infizierten Personen entwickeln eine akute, oberflächliche Gastritis, sind jedoch asymptomatisch. Nur bei 10 - 15 % der Infektionsfälle kommt es zur Entstehung von schwerwiegenden gastrointestinalen Erkrankungen (Blaser und Atherton, 2004). Im Laufe einer persistierenden Infektion kann es zur Entwicklung einer chronischen Gastritis kommen. In Patienten, die eine normale Säuresekretion im Magen aufweisen, findet die Kolonisierung der Bakterien bevorzugt im Antrum statt, es kommt daraufhin vor allem zur Entwicklung einer Gastritis im Antrum. In Patienten, in denen eine verminderte Säuresekretion stattfindet, beobachtet man häufig eine Kolonisierung des Corpus, es kommt daraufhin meist zur Ausbildung einer Corpus prädominanten Pangastritis (Kuipers et al., 1995a). Bei 10 - 15 % der mit *H. pylori* infizierten Personen folgt der Gastritis die Entwicklung eines Geschwürs. Da die Geschwüre meist dort auftreten, wo die Mukosaentzündung am stärksten ausgeprägt ist (Veldhuyzen van Zanten und Lee, 1999), kommt es in Patienten mit niedriger Säuresekretion vor allem zur Ausbildung von Magengeschwüren und in Personen mit normaler oder hoher Säuresekretion zur Ausbildung von Zwölffingerdarmgeschwüren. Zwölffingerdarmgeschwüre treten bei ca. 10 % der mit *H. pylori* infizierten Individuen auf (Peterson, 1991). Einer Korpus-Dominanten Gastritis kann im weiteren Verlauf eine Atrophie oder intestinale Metaplasie folgen, eine Vorstufe von Magenkrebs (Kuipers, 1998). Die Wahrscheinlichkeit an Magenkrebs zu erkranken, ist in mit *H. pylori* infizierten Personen deutlich höher als in nicht infizierten Individuen (The EUROGAST Study Group, 1993; Uemura et al., 2001), weshalb *H. pylori* im Jahr 1993 von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) als Carcinogen der Klasse I eingestuft wurde (Eurogast Study, 1993).

Sowohl der jeweilige Genotyp des kolonisierenden *H. pylori*-Stammes als auch die genetische Prädisposition der infizierten Person beeinflusst die Ausbildung des Krankheitsbildes. So ist z. B. bekannt, dass eine Infektion mit einem *cag*⁺-Stamm (Stamm, der die Gene der Cag-Pathogenitätsinsel codiert, CagA: Cytotoxin assoziiertes Protein A, vgl. Pkt. B.1.3) häufiger zur Entwicklung von Magenkrebs führt, als die Infektion mit einem *cag*⁻-Stamm (Huang et al., 2003; Parsonnet et al., 1997). Auch bestimmte Polymorphismen des *vacA*-Gens (VacA: Vakuolisierendes Cytotoxin A, vgl. Pkt. B.1.3) begünstigen die Entwicklung von Adenokarzinomen (Figueiredo et al., 2001, Rhead et al., 2007). Personen, die aufgrund einer genetischen Prädisposition während einer *H. pylori*-Infektion vermehrt Interleukin-1 (IL-1) sekretieren, sind stärker gefährdet, an Magenkrebs zu erkranken (El-Omar et al., 2000).

Neben einer erhöhten Wahrscheinlichkeit ein Adenokarzinom zu entwickeln, haben mit *H. pylori* infizierte Patienten auch ein erhöhtes Risiko, gastrische MALT-Lymphome (MALT = mucosa associated lymphoid tissue) zu bilden (Parsonnet et al., 1994; Eidt et al., 1994; Parsonnet und Isaacson, 2004). Normalerweise enthält die Magenschleimhaut kein lymphoides Gewebe, jedoch bildet sich MALT in der Magenmukosa fast immer als Reaktion

auf eine Kolonisierung mit *H. pylori*. In seltenen Fällen (1 % der infizierten Personen, Parsonnet und Isaacson, 2004) kommt es dann durch Proliferation von monoklonalen B-Zellen zur Entwicklung eines MALT-Lymphoms.

Eine Infektion mit *H. pylori* kann sich jedoch hinsichtlich bestimmter Krankheiten auch positiv auf den Gesundheitszustand der infizierten Person auswirken. Es wird postuliert, dass ein *H. pylori*-Infektion Schutz vor Krankheiten wie GERD (gastroesophageal reflux disease = Refluxösophagitis, eine entzündliche Erkrankung der Speiseröhre) (Fallone et al., 2000) und davon hervorgerufenen Krankheiten wie Barret-Syndrom (Corley et al., 2008; Anderson et al., 2008) und Speiseröhren-Krebs bietet (Blaser, 1999; Ye et al., 2004, Corley et al., 2008; Anderson et al., 2008). Des Weiteren wird postuliert, dass mit *H. pylori* infizierte Personen ein vermindertes Risiko tragen, an einer Atemwegserkrankung wie Asthma oder Allergien zu erkranken (Chen und Blaser, 2007).

Die Diagnose einer *H. pylori* Infektion erfolgt über invasive Tests wie Endoskopie, Kultivierung der Bakterien, Nachweis durch molekulare Methoden wie PCR, Real-Time-PCR und FISH, Urease Test und Histologie und nicht invasive Tests wie Harnstoff-Atem-Test oder Nachweis von *H. pylori*-spezifischer DNA (desoxy-ribonuclein-acid) oder Antigenen in Stuhl oder Serum (reviewed in Granstrom et al., 2008). Über Jahre hinweg war eine Standard Triple Therapie das Mittel der Wahl, um gegen eine *H. pylori* Infektion vorzugehen. Diese bestand aus der Einnahme eines Protonenpumpeninhibitors (zweimal täglich), Amoxicillin (zweimal täglich 1g) und Chlarythromycin (500 mg zweimal täglich) bzw. Metronidazol (500 mg zweimal täglich) über sieben Tage hinweg. Dieses Vorgehen wurde auch bei der dritten Maastricht Konsensuskonferenz 2005 empfohlen (Malfertheiner et al., 2007). Im Gegensatz zur Standard Triple Therapie, bei der die verschiedenen Antibiotika (AB) zeitgleich eingenommen werden, erfolgt heute häufig auch eine sequentielle Therapie, bei der die AB einzeln eingenommen werden, nach mehreren Tagen erfolgt ein Wechsel des Antibiotikums. Erste Studien deuten darauf in, dass diese sequentielle Therapie eine höhere Eradikationsrate aufweist, als die Standard Triple Therapie (Jafri et al., 2008). Das größte Problem bei der Therapie einer *H. pylori* Infektion ist die hohe Rate an Bakterien, die Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika entwickelt haben. Viele Stämme sind resistent gegen die früher häufig eingesetzten Antibiotika Chlarythromycin und Metronidazol, weshalb heute neue Antibiotika wie Fluoroquinolone eingesetzt werden, gegen die jedoch auch die ersten Stämme bereits Resistenzen entwickelt haben (Zullo et al., 2007; Cattoir et al., 2007)

1.2 Genetische Eigenschaften von *H. pylori*

Mittlerweile sind die Genome von vier *H. pylori* Stämmen komplett sequenziert, von *H. pylori* 26695, welcher aus einem Patienten isoliert wurde, der an oberflächlicher Gastritis litt (Tomb et al., 1997), *H. pylori* J99, isoliert aus einem Patienten, der an Zwölffingerdarmgeschwür erkrankt war (Alm et al., 1999), *H. pylori* HPAG1, isoliert aus einem Patienten, der an einer chronischen atrophischen Gastritis litt (Oh et al., 2006) und *H. pylori* G27, ebenfalls ein klinisches Isolat (Baltrus et al., 2009). Die wichtigsten Eigenschaften der Genome wie Genomgröße, Anzahl der offenen Leserahmen (ORF = open reading frame), GC-Gehalt (G: Guanosin, C: Cytidin), das Vorhandensein der Cag-Pathogenitätsinsel (PAI) oder eines zusätzlichen Plasmids sind in der Tabelle 1 (Tab.1) zusammengefasst.

Tab. 1: Genomeigenschaften von *H. pylori* 26695, *H. pylori* J99, *H. pylori* HPAG1 und *H. pylori* G27. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Daten auf die Veröffentlichungen der kompletten Genomsequenzen (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999; Oh et al., 2006; Baltrus et al., 2009). ¹⁾Alm et al., 1999: ursprünglich wurden 1.590 ORFs in der Sequenz von *H. pylori* 26695 annotiert, durch Vergleich mit einem zweiten kompletten Genom wurde die Anzahl der postulierten ORFs auf 1.552 verringert.

	<i>H. pylori</i> 26695	<i>H. pylori</i> J99	<i>H. pylori</i> HPAG1	<i>H. pylori</i> G27
Genomgröße	1.667.867	1.643.831	1.596.366 bp	1.652.983 bp
ORFs	1.552 ¹⁾	1.495	1.536	1.515
GC-Gehalt	39 %	39 %	39 %	39 %
Cag-PAI	+	+	+	+
Plasmid	-	-	9.369 bp	10.032 bp

Das Genom von *H. pylori* besteht aus ca. 1,6 Mbp, die für ungefähr 1500 ORFs codieren. Das Genom von *H. pylori* ist sehr AT-reich (A: Adenosin, T: Thymidin), der GC-Gehalt beträgt 39 %. In allen komplett sequenzierten Genomen konnte das Vorhandensein einer Cag-PAI bestätigt werden, die sequenzierten Stämme zählen somit zu den TypI-Stämmen, den TypII-Stämmen fehlt eine Cag-PAI (Xiang et al., 1995). Die Stämme *H. pylori* HPAG1 und *H. pylori* G27 besitzen neben dem bakteriellen Chromosom noch ein 9.269 bp bzw. 10.032 bp Plasmid, die Plasmide der beiden Stämme ähneln sich (Baltrus et al., 2008). Bereits nach dem Vorliegen von zwei komplett sequenzierten Genomen war klar, dass das Genom von *H. pylori* sehr variabel ist. Jedes Isolat besitzt stammspezifische Gene. Durch Vergleich von 56 verschiedenen *H. pylori*-Isolaten wurde das *H. pylori* Core-Genom mit 1111 ORFs definiert (Gressmann et al., 2005). Bei den variablen Genen, die in mindestens einem der untersuchten Isolate fehlen, handelt sich in 27 % der Fälle um Gene, die auf der Cag-PAI oder einer der beiden Plastizitätszonen 1 und 2 lokalisiert sind, in 73 % der Fälle um Gene, die nicht geclustert auf dem Genom verteilt sind. Der GC-Gehalt der Cag-PAI sowie der Plastizitätszonen ist niedriger als der des restlichen Genoms (Israel et al., 2001; Alm et al., 1999), was darauf hindeutet, dass diese Bereiche über horizontalen Gen-Transfer aufgenommen wurden. Auch viele der variablen Gene, die auf dem Genom verteilt vorliegen, besitzen einen niedrigen GC-Gehalt, so dass auch hier die Aufnahme über horizontalen Gentransfer wahrscheinlich ist. Bei vielen dieser variablen Gene handelt es sich um „kleine“ ORFs, die vor allem für Proteine mit unbekannter Funktion sowie für Bestandteile von Restriktions-Modifikationssystemen codieren. Es wird spekuliert, dass die Funktion dieser Proteine nicht wichtig für das Überleben von *H. pylori* ist und die entsprechenden Gene deshalb im Laufe einer konvergenten Evolution in unterschiedlichen Isolaten verloren gingen. Verschiedene Isolate von *H. pylori* weisen unter allen sequenzierten Bakterienspezies bisher die höchste Diversität auf (Akopyantz et al., 1992; Suerbaum, 2000). Es ist kaum möglich, zwei identische *H. pylori*-Isolate aus unterschiedlichen Patienten zu gewinnen, es sei denn, es handelt sich um Mitglieder derselben Familie (Gibson et al., 1998; Fujimoto et al., 1994; Miehle et al., 1999). Die Diversität ist nicht allein auf das Vorhandensein von stammspezifischen Genen zurückzuführen, auch die Anordnung orthologer Gene auf dem Genom verschiedener Stämme sowie die Sequenzen der orthologen Gene (Achtman et al., 1999) sind variabel. Bei nur 85 % der homologen Gene konnten die flankierenden Gene

ebenfalls als homologe ORFs identifiziert werden (Alm et al., 1999; Tomb et al., 1997; Jiang et al., 1996; Taylor et al., 1992; Béji et al., 1988). Die durchschnittliche Nukleotid-Identität homologer Gene von *H. pylori* 26695 und *H. pylori* J99 beträgt 92,6 % (Doig et al., 1999). Bei den Sequenz-Abweichungen handelt es sich häufig um „stille“ Mutationen, die die dritte Base eines Codons, die sogenannte „Wobble“-Position, betreffen.

Die Entstehung der genetischen Diversität in *H. pylori* wird begünstigt durch eine erhöhte Mutationsrate, das Fehlen von vollständigen DNA-Reparatursystemen und eine extreme Rekombinationshäufigkeit (Marshall et al., 1998; Suerbaum et al., 1998, Kersulyte et al., 1999). Die intragenomische Rekombination könnte durch das gehäufte Auftreten von repetitiven Sequenzen (Tomb et al., 1997, Alm et al., 1999) im bakteriellen Genom positiv beeinflusst werden (Chédin et al., 1994). Zusätzlich wird die genetische Diversität durch die Aufnahme und Integration von Fremd-DNA in das bakterielle Chromosom (horizontaler Gentransfer) erhöht. Der horizontale Gentransfer wird durch die natürliche Kompetenz von *H. pylori* ermöglicht und ist *in vivo* hauptsächlich dann von Bedeutung, wenn ein Patient mit unterschiedlichen *H. pylori*-Isolaten infiziert ist (Marshall et al., 1998; Nedenskov-Sørensen et al., 1990). Auch das Vorhandensein von Insertionselementen (IS-Elementen, IS605 und IS606) im Genom von *H. pylori* 26695 und J99 kann zur genetischen Variabilität beitragen, diese IS-Elemente fehlen jedoch in *H. pylori* HPAG1. IS-Elemente sind für Rekombinationsereignisse und für die damit verbundenen chromosomalen Rearrangements mitverantwortlich.

Anhand von Sequenzunterschieden wird *H. pylori* in 6 Populationen eingeteilt (hpEurope, hpEastAsia, hpAfrica1, hpAfrica2, hpAsia2 und hpNEAfrika). Den verschiedenen Populationen können bestimmte geographische Verbreitungsgebiete zugewiesen werden (Linz et al., 2007; Falush et al., 2003). Anhand dieser Daten kann man davon ausgehen, dass es sich bei *H. pylori* um ein sehr „altes“ Bakterium handelt, welches schon seit mehr als 58.000 Jahren den Menschen kolonisiert. Die Migrationsbewegungen des Menschen, ausgehend von Ostafrika vor 56.000 Jahren (Liu et al., 2006), spiegeln sich wider in der phylogeographischen Verteilung der verschiedenen *H. pylori*-Populationen.

1.3 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 der Virulenzfaktoren führt zu einer signifikanten Herabsetzung der Pathogenität des Bakteriums (Salyers und Whitt, 1994). Die wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori* sind in der Abbildung 1 (Abb. 1) dargestellt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Kolonisierung eines Wirtes durch *H. pylori* ist die Motilität des Bakteriums (Eaton et al., 1989; 1992; 1996; Josenhans und Suerbaum, 2001). Nach der Passage durch das Magenlumen erreicht *H. pylori* die Magenschleimhaut und nistet sich dort ein. Den Magenepithelzellen ist zum Lumen hin eine ca. 100 µm dicke Schleimschicht (Muzinschicht) aufgelagert. Dank seiner spiralförmigen Form und der Rotation der polaren Flagellen, kann sich *H. pylori* durch den viskosen Magenschleim winden und sich in dieser Muzinschicht einnisten. Ca. 2/3 der bei einer Kolonisierung vorhandenen *H. pylori* Zellen sind in einem Abstand von bis zu 10 µm von den Epithelzellen in die Schleimschicht eingebettet oder an die Epithelzellen adhärirt (Schreiber et al., 2004). *H. pylori* besitzt 2 - 8 unipolare Flagellen, die aus dem Basalkörper, dem Haken sowie dem Filament bestehen. Mindestens 40 Proteine sind an der Regulation, der Sekretion und am Zusammenbau der Flagellen während der Flagellenbiosynthese beteiligt (Tomb et al., 1997). Die Flagellenfilamente sind aus den Flagellinproteinen FlaA (53 kDa) und FlaB (54 kDa)

aufgebaut, die durch die Gene *flaA* und *flaB* codiert werden, welche an unterschiedlichen Stellen des bakteriellen Chromosoms liegen (Haas et al., 1993; Kostrzynska et al., 1991; Leying et al., 1992; Suerbaum et al., 1993).

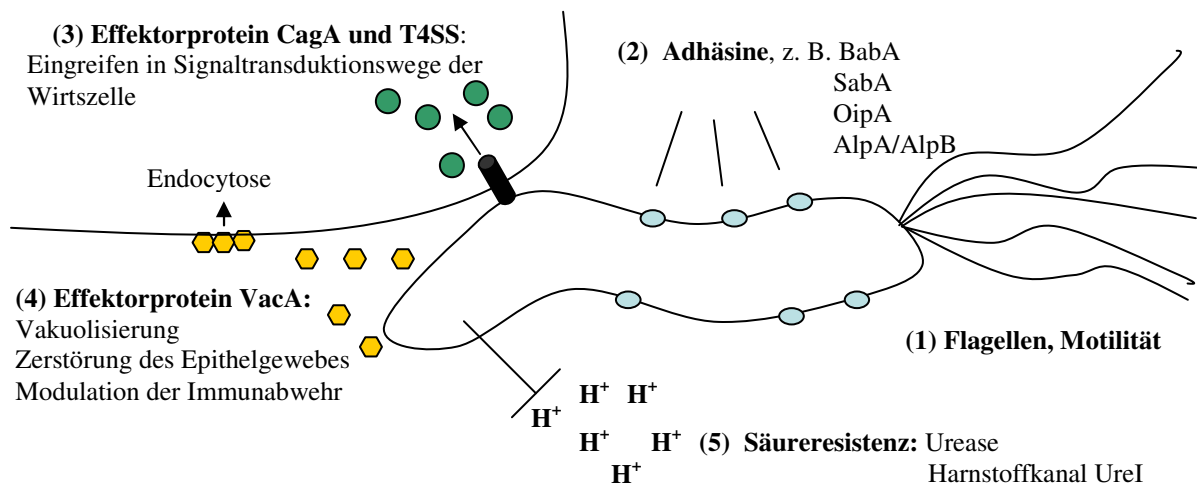


Abb. 1: Schematische Darstellung der Virulenzfaktoren aus *H. pylori*. Zu sehen sind schematisch die Hauptvirulenzfaktoren von *H. pylori*. Diese umfassen die für die Motilität benötigten Flagellen (1), verschiedene Adhäsine (2), die für eine direkte Interaktion von *H. pylori* mit den Mageneithelzellen benötigt werden, die Effektorproteine CagA (3) und VacA (4), welche u. a. in Wirtszellsignaltransduktionswege eingreifen und die an der Säureresistenz (5) beteiligten Proteine wie Urease und den Harnstoffkanal UreI. Weitere Informationen zu den Virulenzfaktoren sind im folgenden Text aufgeführt.

Im Gegensatz zu den Flagellen von anderen Bakterien lösen die Flagellen von *H. pylori* keine Immunantwort im Wirtsorganismus aus, was von großer Bedeutung für eine persistente Kolonisierung des Keims ist. Die Flagelline einiger Bakterien, z. B. FliC von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium sind starke Aktivatoren der angeborenen Immunantwort, da sie an den Toll-like Rezeptor 5 (TLR-5) auf Wirtszellen binden und somit die Sekretion von IL-8 aktivieren. Für die Flagelline von *H. pylori* kann keine solche immunmodulatorische Funktion beobachtet werden (Lee et al., 2003), da sie kein Aminosäure(AS)-Motiv aufweisen, welches eine Interaktion zwischen TLR-5 und den Flagellinen ermöglicht (Andersen-Nissen et al., 2005). Weiterhin sind die Flagellen von *H. pylori* von einer membranartigen Flagellenhülle ummantelt, welche die Flagellen von der Magensäure abschirmt und eine Oponierung durch Antikörper verhindert (Geis et al., 1993; Suerbaum, 1995; Suerbaum und Josenhans, 1999). Die Bedeutung der Motilität für eine erfolgreiche Kolonisierung durch *H. pylori* wurde durch die Versuche von Kavermann und Kollegen hervorgehoben, die zeigen konnten, dass 17 Gene, die für Flagellenproteine und für Proteine codieren, die an der Biosynthese der Flagellen beteiligt sind oder die eine Rolle bei der Chemotaxis spielen, absolut essentiell für die Kolonisierung im Tiermodell sind (Kavermann et al., 2003).

Ein Teil der vorhandenen *H. pylori* Zellen adhärirt an die Epithelzellen des Magens. Diese Adhärenz leistet einen Beitrag zur persistenten Kolonisierung, da die Bakterien so vor der Peristaltik des Magens sowie dem „turn over“ der Schleimschicht geschützt sind und bietet den Bakterien direkten Zugang zu freigesetzten Nährstoffen aus geschädigtem Gewebe. Weiterhin ermöglicht eine enge Assoziation zwischen *H. pylori* und den Wirtszellen die Translokation von Effektorproteinen wie CagA und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Virulenz. Es konnte gezeigt werden, dass unter sauren pH-Bedingungen eine unspezifische Adhärenz von *H. pylori* an geladene, bevorzugt sialysierte, gastrische Muzine stattfindet (Lindén et al., 2004). Eine spezifische Bindung zwischen den Bakterienzellen und den Wirtszellen findet durch die Interaktion von bakteriellen Oberflächenproteinen und

Rezeptoren auf den Wirtszellen statt. In *H. pylori* wurden 32 OMPs (outer membrane protein) identifiziert, die eine putative Funktion bei der Adhärenz der Bakterienzellen an die Epithelzellen haben (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999). Die am besten charakterisierten Adhäsine sind die OMPs BabA und SabA.

Das 78 kDa große Protein **BabA** (HopS) wird durch das Gen *babA* (*hp1243*) codiert. Im Genom von *H. pylori* liegen zwei Gene vor, die für BabA homologe Proteine, BabB und BabC codieren, die Funktion dieser Proteine ist bisher nicht bekannt. BabA erkennt und bindet an fukosylierte Kohlenhydrate, die unter anderem Bestandteil des Lewis^b (Le^b)-Antigens sind. Le^b-Antigene werden auf der Oberfläche von Magenepithelzellen exprimiert (Borén et al., 1993; Ilver et al., 1998; Lindén et al., 2002). Le^b ist auch ein Bestandteil des Muzins MUC5AC und die Kolo-kalisierung von *H. pylori* mit diesem Muzin legt nahe, dass BabA in der Lage ist, an MUC5AC zu binden (Ilver et al., 1998; Lindén et al., 2002; Van den Brink et al., 2000; Van de Bovenkamp et al., 2003). Auch das membrangebundene Muzin Muc1 und das im Mundschleim vorhanden Muzin MUC5B können als Rezeptor für BabA fungieren (Lindén et al., 2004; Walz et al., 2005). Eine Infektion mit einem BabA positiven *H. pylori* Stamm ist mit einer stärkeren Entzündung des Magengewebes korreliert und birgt für den Patienten ein erhöhtes Risiko, Geschwüre oder Magenkrebs zu entwickeln (Gerhard et al., 1999; Prinz et al., 2001; Yamaoka et al., 2002).

Die Transkription des Gens *hp0725*, welches für das Adhäsिन **SabA** (HopP) codiert, wird durch „slipped strand misspairing“ durch Phasenvariation reguliert. Je nach Anzahl der vorhandenen CT-Dinukleotid Wiederholungen im 5'-Bereich des Gens, wird ein „on“ bzw. „off“ Status erreicht, das Gen wird somit exprimiert bzw. nicht exprimiert (Goodwin et al., 2008). Weiterhin wird die Transkription des Gens *sabA* durch das ArsRS Zwei-Komponenten System (vgl. Punkt B.2.2) reguliert, die Transkription wird unter sauren pH-Bedingungen durch den phosphorylierten Response-Regulator ArsR reprimiert (Pflock et al., 2006; Goodwin et al., 2008). SabA, das „sialic acid binding protein A“, erkennt und bindet an Sialinsäure-tragende Glykokonjugate (Mahdavi et al., 2002; Roche et al., 2004). Es wird vermutet, dass SabA eine Rolle im Krankheitsverlauf während den Stadien der chronischen Gastritis und der Atrophie spielt, da in entzündeten Geweben eine Substitution der nichtsialysierten Le-Antigene, die Bestandteil von komplexen Gangliosiden sind, durch die sialysierten Lewis Antigene sLe^a und sLe^x zu beobachten ist (Mahdavi et al., 2002; Ota et al., 1998). Auch Laminin, ein extrazelluläres Matrixprotein, trägt sialysierte Zuckerreste, mit denen SabA interagieren kann (Walz et al., 2005). Neben der Bindung an Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass SabA auch Sialinsäure-haltige Glykokonjugate auf der Oberfläche von Neutrophilen (Unemo et al., 2005) und Erythrocyten (Aspholm et al., 2006) binden kann, die genauen Rezeptoren sind hier jedoch noch nicht bekannt.

Das 34 kDa große OMP **OipA** (HopH) ist an der Bindung von *H. pylori* an Epithelzellen beteiligt (Dossumbekova et al., 2006), der eukaryotische Rezeptor ist jedoch nicht identifiziert. Im 5'-Bereich des Gens sind CT-Dinukleotid Wiederholungssequenzen vorhanden, über Phasenvariation wird die Expression des OipA Proteins reguliert, der „on“ Status des Gens *oipA* korreliert mit dem Auftreten von weiteren Virulenzfaktoren wie der virulenten Allelform *vacAs1/m1* und dem Vorhandensein der *cag*-PAI (Yamaoka et al., 2000; Dossumbekova et al., 2006). Ursprünglich wurde OipA als ein proinflammatorisches Protein beschrieben, welches eine erhöhte IL-8 Sekretion der Wirtszellen auslösen kann (Yamaoka et al., 2002), heute wird diese erhöhte IL-8 Sekretion jedoch auf den mit dem OipA „on“ Status verknüpften positiven *cag*-PAI Status zurückgeführt (Ando et al., 2002; Yamaoko et al., 2002; Dossumbekova et al., 2006). Ein OipA „on“ Status ist mit einer hohen *H. pylori* Dichte, einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen in das Magengewebe sowie dem Auftreten von schweren Erkrankungen wie Zwölffingerdarmgeschwür und Magenkrebs assoziiert (Yamaoka et al., 2006). Weiterhin wird postuliert, dass OipA einen Einfluss auf die

Cytoskelettorganisation der Wirtszelle hat, indem es die FAK (fokal adhesion kinase) und somit den Erk-Signalweg aktiviert (Tabassam et al., 2008).

Die Gene *alpA* und *alpB* sind als Operon organisiert und codieren für die homologen, 518 AS großen OMPs **AlpA** und **AlpB** (adherence associated lipoprotein A und B), welche an der Adhäsion von *H. pylori* an gastrische Epithelzellen *in vitro* beteiligt sind (Odenbreit et al., 1999; 2002), für die jedoch noch kein eukaryotischer Rezeptor identifiziert ist. *In vivo* konnte AlpA und AlpB eine Funktion bei der Kolonisierung des Magens von Meerschweinchen und Mäusen zugeordnet werden (de Jonge et al., 2004; Lu et al., 2007). Weiterhin wird postuliert, dass AlpA und AlpB an der Modulation der proinflammatorischen Signalkaskade und somit an einer erhöhten Sekretion von IL-6 und, abhängig vom jeweils untersuchten *H. pylori* Stamm, auch von IL-8, beteiligt sind (Lu et al., 2007).

Weitere Proteine, für die eine Funktion als Adhäsine postuliert wurde, deren Rezeptoren aber nicht bekannt sind, sind u. a. HorB (HP0127) (Snelling et al., 2007), HP1188 und HP1430 (Rubinsztein-Dunlop et al., 2005), HopZ (Peck et al., 1999) und Hsp-70 (Huesca et al., 1998). Auch den Le^x und Le^y Antigenen, die von *H. pylori* als Teil der terminalen Lipopolysaccharid (LPS)-Seitenketten exprimiert werden, kommt evtl. eine Rolle bei der Bindung an die Epithelzellen zu (Edwards et al., 2000).

Einer der bekanntesten Virulenzfaktoren von *H. pylori* ist das ca. 120-140 kDa Protein CagA (cytotoxin associated protein A), welches von dem Gen *cagA* codiert wird (Covacci et al., 1993). Das Vorhandensein des *cagA*-Gens ist ein Marker für das Vorhandensein der ca. 40 kb *cag*-PAI, die, je nach untersuchtem Stamm, für 27 bis 31 Proteine codiert. Die *cag*-PAI wird von identischen, 31 bp langen Sequenzwiederholungen flankiert und ihr GC-Gehalt weicht mit 35 % deutlich von dem des restlichen Genoms ab, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese PAI ursprünglich über horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde (Akopyants et al., 1998b). Stämme, die eine *cag*-PAI besitzen, werden als *cagA*⁺ oder TypI-Stämme bezeichnet, Stämme die keine *cag*-PAI besitzen, als *cagA*⁻ oder TypII-Stämme (Censini et al., 1996). Patienten, die mit einem TypI-Stamm infiziert sind, weisen meist eine deutlich höhere Inflammation auf und zeigen in westlichen Populationen ein erhöhtes Risiko, an Krankheiten wie Magengeschwür oder Magenkrebs zu erkranken, als Patienten, die mit TypII Stämmen infiziert sind (Blaser und Crabtree, 1996; Kuipers et al., 1995b). Ein direkter Zusammenhang zwischen CagA und Karzinogenese *in vivo* konnte durch die Generierung von transgenen Mäusen, die CagA exprimieren, erbracht werden (Ohnishi et al., 2008).

Neben *cagA* sind auf der *cag*-PAI unter anderem Gene lokalisiert, die für Komponenten eines funktionellen Typ IV Sekretionssystems (T4SS) codieren (homologe Proteine zu fast allen VirB und VirD4 Protein aus *Agrobacterium tumefaciens*) (Fischer et al., 2001), über welches CagA in die Wirtszelle injiziert wird (Odenbreit et al., 2000). Damit CagA über das T4SS transportiert werden kann, ist eine Bindung des Chaperon-ähnlichen Proteins CagF, welches ebenfalls auf der *cag*-PAI codiert wird, in der Nähe des C-terminalen Sekretionssignals von CagA essentiell (Couturier et al., 2006; Pattis et al., 2007). Eine Interaktion des T4SS mit der Wirtszelle findet *in vitro* durch die Bindung des Arg-Gly-Asp (RGD)-Motivs des CagL Proteins, welches den Pilus des T4SS bedeckt, an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine statt. Diese Interaktion aktiviert die Translokation von CagA in die Wirtszelle (Kwok et al., 2007).

Nachdem CagA durch das T4SS in die Wirtszelle injiziert wurde, kommt es zur Phosphorylierung von CagA durch Wirts-Kinasen (Covacci und Rappuoli, 2000) der Src-Familie (Selbach et al., 2002, Stein et al., 2002) und durch Abl-Kinasen (Poppe et al., 2007, Tammer et al., 2007). Durch die Interaktion von CagL mit dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin kommt es zur Aktivierung der Kinase FAK, die wiederum Src phosphoryliert, so dass CagA sofort nach Eintritt in die Wirtszelle durch Src phosphoryliert werden kann (Kwok et al., 2007). Die Src-Kinase weist die höchste Aktivität 0,5 - 2 h nach Infektion mit *H. pylori* auf, die Abl-Kinase 2

- 8 h nach der Infektion, so dass man davon ausgehen kann, dass die Phosphorylierung von CagA sukzessive zunächst von Src und anschließend von Abl vermittelt wird (Tammer et al., 2007). Phosphoryliertes CagA, CagA^{PY}, ist in der Lage, die Src-Kinase wieder zu inaktivieren (Selbach et al., 2003; Tsutsumi et al., 2003). Somit entsteht ein negativer Feedback-Loop und die Menge an CagA^{PY} in der Wirtszelle wird reguliert.

Die Tyrosinphosphorylierung von CagA findet in den Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) Motiven, die in der C-terminalen Hälfte des CagA-Proteins lokalisiert sind (Backert et al., 2001; Stein et al., 2002), statt. Vier verschiedene EPIYA Motive (A, B, C und D) sind identifiziert (Ren et al., 2006) und die Art und Anzahl der Motive hat einen Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung von CagA, die Ausprägung der morphologischen Veränderung der Wirtszelle (Argent et al., 2004; Higashi et al., 2002a) sowie die Entwicklung der Karzinogenese (Azuma et al., 2002).

Phosphoryliertes CagA kann in verschiedene Wirtszellsignalwege eingreifen, indem CagA^{PY} Interaktionen mit Phosphotyrosin-bindenden Domänen verschiedener Proteine eingeht. Die Tyrosinphosphatase SHP-2, die Tyrosin-Kinase Csk und das Adaptor Protein CrkII besitzen solche Domänen in Form von SH2(Src homology 2)-Domänen, an die CagA^{PY} binden kann (Higashi et al., 2002b; Tsutsumi et al., 2003; Suzuki et al., 2005). SHP-2, Csk und CrkII sind beteiligt an verschiedenen Signaltransduktionswegen, die bei der Organisation des Cytoskeletts der Wirtszelle beteiligt sind. Interaktion von CagA^{PY} mit diesen Proteinen bewirkt eine Störung dieser Signaltransduktionswege (reviewed in Backert und Selbach, 2008), es kommt zu morphologischen Veränderungen der Epithelzellen, die durch eine erhöhte Motilität (Scattering) sowie einer Elongation der Wirtszellen gekennzeichnet sind (Moese et al., 2004). Die Elongation der Zellen ist als so genannter „hummingbird“ Phänotyp (Segal et al., 1996; 1999) beschrieben.

Auch im nicht phosphorylierten Zustand übt CagA einen Einfluss auf die Wirtszelle aus. Es ist bekannt, dass CagA das Epithelmonolayer zerstören kann, indem es an der Zerstörung von Zell-Zell-Verbindungen (tight junctions/adherence junctions) (Amieva et al., 2003; Murata-Kamiya et al., 2007) und Aufhebung der Polarität in den Epithelzellen (Saadat et al., 2007; Zeaiter et al., 2008) beteiligt ist. CagA hat auch einen Einfluss auf die Transkription der Wirtszelle. So aktiviert eine Interaktion von CagA mit Grb-2 die GTPase Ras (Mimuro et al., 2002), über den Ras-Raf-Mek-Erk-Signalweg wird der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert (Brandt et al., 2005), es kommt zur Sekretion von IL 8. Ebenfalls durch diesen Signalweg kommt es auch über Transkriptionsinduktion zur verstärkten Expression des Proteins MCL1 (myeloid cell leukaemia 1), welches an der Inhibition der Apoptose beteiligt ist (Mimuro et al., 2007). Die Interaktion von CagA mit E-Cadherin bewirkt die Zerstörung von Zell-Zell-Verbindungen. Diese Interaktion bewirkt auch die Freisetzung von β-Catenin aus dem E-Cadherin/β-Catenin-Komplex. β-Catenin reichert sich im Zellkern an und es kommt zur Transkriptionsinduktion von mitogenen Genen, die an der Karzinogenese beteiligt sind (Murata-Kamiya et al., 2007).

Neben CagA gelangt vermutlich auch Peptidoglycan über das T4SS in die Wirtszelle, welches von Nod1 (intrazelluläres Pathogen Erkennungsmolekül) erkannt wird. Nod1 aktiviert NF-κB, es kommt zur proinflammatorischen Antwort durch Sekretion von IL-8 (Viala et al., 2004) und beta-Defensin (Boughan et al., 2006).

Bereits kurz nach der Entdeckung von *H. pylori* wurde beschrieben, dass ein von diesem Keim sekretiertes Überstandsprotein in der Lage ist, die Bildung von großen Vakuolen in Säugetierzellkulturen hervorzurufen (Leunk et al., 1988). Das Vakuolisierende Cytotoxin VacA, welches diesen Effekt hervorruft, wird durch das *vacA* Gen codiert (Cover und Blaser, 1992; Telford et al., 1994; Schmitt und Haas, 1994). VacA wird zunächst als ca. 140 kDa Protoxin exprimiert und im Verlauf der proteolytischen Sekretion entsteht das ca. 90 kDa reife Protein. Das reife VacA Protein kann als lösliches Protein in den extrazellulären Raum

sekretiert werden (Cover und Blaser, 1992), kann jedoch auch auf der bakteriellen Oberfläche lokalisiert bleiben (Ilver et al., 2004). Diese Oberflächen-assoziierte Lokalisierung legt nahe, dass VacA auch eine Funktion als Adhäsion bei der Zell-/Zell-Interaktion zwischen Bakterien- und Wirtszelle hat (Ilver et al., 2004). Das sekretierte VacA kann wasserlösliche, oligomere Strukturen von größer als 900 kDa bilden (Lupetti et al., 1996), die jedoch nach Exposition in saurem pH-Wert wieder in Monomere mit einer höheren Toxizität dissoziieren (Cover et al., 1997). Das sekretierte VacA kann weiter proteolytisch gespalten werden in ein ca. 33 kDa N-terminales Fragment (p33) und ein 55 kDa C-terminales Fragment (p55), die jedoch miteinander verbunden bleiben (Telford et al., 1994). Die p33 Domäne ist wichtig für die durch VacA hervorgerufene Porenformation in der Wirtszellmembran. Die N-terminale Region der p33-Domäne ist hydrophob und enthält drei GXXXG Motive, die die Membran durchspannen und essentiell für die Kanalaktivität sind (McClain et al., 2003). Der p55 Domäne, deren Kristallstruktur bekannt ist (Gangwer et al., 2007), wird eine Funktion bei der Rezeptorbindung auf der Wirtszelle zugeordnet (Reyrat et al., 1999). Mittlerweile sind viele Wirtszell-Rezeptormoleküle von VacA identifiziert, wie RPTP β (receptor-like protein tyrosine phosphatase) (Yahiro et al., 1999; Fujikawa et al., 2003; Yahiro et al., 2004) und RPTP α (Yahiro et al., 2003) auf der Oberfläche von Epithelzellen, verschiedene Lipide (Molinari et al., 1998a; Moll et al., 1995), der Epidermale Wachstumsfaktor EGF (Seto et al., 1998), Heperan Sulfat (Utt et al., 2001) sowie CD18, welches in T-Zellen exprimiert wird (Sewald et al., 2008). Weiterhin ist bekannt, dass VacA auch an detergentenresistente Fraktionen der Wirtsplasmamembran, die sogenannten „Lipid Rafts“, bindet (Schraw et al., 2002; Kuo und Wang, 2003; Geisse et al., 2004; Gauthier et al., 2004). Die Expression eines aktiven VacA Toxins korreliert mit der Entstehung von schwerwiegenderen Krankheitsbildern als Folge einer Infektion mit *H. pylori* (Atherton et al., 1995; van Doorn et al., 1998). Das *vacA*-Gen kann aufgrund von Polymorphismen in der Signalregion (s1 oder s2), der intermediären Region (i1 oder i2) und der mittleren Region (m1 oder m2) in Form von verschiedenen Allelen vorliegen. Eine Infektion mit Stämmen, die ein s1/m1*vacA*- oder ein s1/m2*vacA*-Allel tragen, birgt ein deutlich erhöhtes Risiko, an Magenkrebs zu erkranken (Rhead et al., 2007).

In vitro induziert VacA die Vakuolenbildung verschiedenster Zelllinien (Leunk et al., 1988, Pagliaccia et al., 1998; Smoot et al., 1996), indem es zunächst an die Cytoplasmamembran bindet, über Endocytose aufgenommen wird und in den späten Endosomen Anionen-selektive VacA-Poren formt. Über diese Poren gelangt Cl⁻ in das Endosom und in Anwesenheit der schwachen Base NH₄⁺ (Ammonium) kommt es zum osmotischen Einstrom von Wasser in das Endosom, welches zu großen Vakuolen anschwillt (Czajkowsky et al., 1999; Tombola et al., 1999; Szabo et al., 1999; Morbiato et al., 2001; Genisset et al., 2007). Weiterhin ist VacA an der Auslösung der Apoptose beteiligt (Kimura et al., 1999; Galmiche et al., 2000; Willhite et al., 2003, 2004) und greift in weitere Signalwege der Wirtszelle ein (Fujikawa et al., 2003, Nakayama et al., 2004). VacA zerstört durch Porenbildung Epithelzellen, was zur Freisetzung von Harnstoff und Bicarbonat führt, Substrate, die *H. pylori* bei der Ausbildung der Säureresistenz benötigt (vgl. Punkt B.1.4), und erhöht die Permeabilität des Epithelzellmonolayers (Papini et al., 1998), so dass auch ein erleichterter Einstrom von Fe³⁺, Ni²⁺, Zuckern und Aminosäuren in die Schleimschicht ermöglicht wird. Auch die Interaktion von VacA mit Immunzellen ist beschrieben, es wird postuliert, dass VacA die Phagosomenreifung in Makrophagen (Zheng und Jones, 2003), die Antigenpräsentation durch B-Zellen (Molinari et al., 1998b) sowie die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen (Boncristiano et al., 2003; Gebert et al., 2003; Sundrud et al., 2004) verhindert.

Auch das LPS von *H. pylori* ist aufgrund seiner Struktur ein Faktor, der die Evasion der Immunantwort begünstigt. Es besitzt eine ca. 1000-fach niedrigere immunogene und pyrogene Wirkung im Vergleich zum LPS anderer gram-negativer Bakterien, welches im

Allgemeines ein starker Aktivator der Immunmodulation ist (Muotiala et al., 1992). Eine Besonderheit des *H. pylori* LPS ist, dass dessen O-spezifische Seitenketten Strukturen aufweisen können, die den Blutgruppenantigenen Lewis-x und Lewis-y ähneln. Diese Blutgruppenantigene kommen auf der Oberfläche von Magenepithelzellen vor und *H. pylori* ist durch diese molekulare Mimikry vielleicht vor der humoralen Immunantwort des Wirtes geschützt (Aspinall et al., 1996; Appelmelk et al., 1997).

Die Enzyme Katalase KatA und Superoxiddismutase SodB sind am Abbau von toxischen Sauerstoffradikalen und toxischen Superoxiden beteiligt, die von polymorphkernigen Lymphozyten, Neutrophilen und Makrophagen produziert werden, und stellen somit zwei weitere Faktoren dar, die einen Schutz vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus gewährleisten (Hazell et al., 1991; Odenbreit et al., 1996; Spiegelhalder et al., 1993).

1.4 Säureresistenz in *H. pylori*

Die Übertragung von *H. pylori* von Mensch zu Mensch erfolgt oral/oral oder fäkal/oral. In beiden Fällen muss das neutralophile Bakterium *H. pylori* zunächst den sehr sauren pH-Wert des Magenlumens überleben, der je nach Verdauungsphase des Wirtes zwischen pH 1 und pH 5 liegen kann und im Tagesdurchschnitt einen pH-Wert von 1,4 aufweist (Baumgartner und Montrose, 2004; Chu und Montrose, 1997; Sachs et al., 2003; Schade et al., 1994), bevor der Keim sich in seiner ökologischen Nische, der Schleimschicht über den Epithelzellen, ansiedeln kann. Der genaue pH-Wert der Muzinschicht ist nicht bekannt, ob innerhalb dieser Schicht ein pH-Gradient existiert und der pH-Wert direkt an den Magenepithelzellen annähernd neutral ist, war lange Zeit umstritten (Engel et al., 1984; Schade et al., 1994; Chu et al., 1999). Neuere Daten deuten jedoch darauf hin, dass in der Muzinschicht tatsächlich ein pH-Gradient existiert und *H. pylori* sich innerhalb dieses Gradienten hauptsächlich in einem Bereich mit moderat sauren pH-Bedingungen (pH 4,5 bis pH 6,0) ansiedelt (Schreiber et al., 2003; 2004). Viele neutralophile pathogene Bakterien wie *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, pathogene *E. coli* Stämme und *Yersinia enterocolitica* (Foster et al., 1991; Ma et al., 2003; Merrell und Camilli, 1999; 2000, Young et al., 1996, Cheville et al., 1996) haben Säureresistenzmechanismen entwickelt, die ihnen den Durchtritt durch das Magenlumen erlauben, jedoch kein Wachstum unter den feindlichen pH-Bedingungen zulassen. Diese Bakterien überstehen ein Absinken ihres cytoplasmatischen pH-Wertes auf pH 5, bei dem keine Proteinbiosynthese mehr stattfinden kann. Die Säureresistenzmechanismen dieser Bakterien umfassen vor allem Prozesse, die den Export von Protonen betreffen, wie die Aktivierung der F₀F₁-ATPase, die unter ATP-Verbrauch aktiv Protonen aus der Zelle pumpen kann (Suzuki et al., 2003) oder die Aktivierung von Na⁺/H⁺-Antiportern (Booth, 1985; Padan et al., 1981), oder Prozesse, die dazu dienen, den pH-Wert des Cytoplasmas abzuf puffern, wie die Aktivierung von Aminosäure-Decarboxylasen oder Urease (Young et al., 1996).

In den letzten 10 Jahren wurden viele globale Transkriptom- und Proteomanalysen durchgeführt, um die Anpassungen von *H. pylori* an saure pH-Bedingungen zu erforschen (Ang et al., 2001; Bijlsma et al., 2000; Dong et al., 2001; Allan et al., 2001, Wen et al., 2003; Merrell et al., 2003a; Bury-Moné et al., 2004). Die Expression von vielen Genen wird säureabhängig reguliert, darunter vor allem auch Gene, deren Produkte einen Beitrag zur Säureresistenz in *H. pylori* leisten.

Unter sauren pH-Bedingungen verändert der Keim die Komposition seiner Zellhülle. Zum einen ist eine Veränderung der LPS-Struktur durch Modifikation von Lewis-Motiven zu beobachten (McGowan et al., 1998; Moran et al., 2002; Tanneas et al., 2001), zum anderen werden auch viele OMPs differentiell exprimiert. Allgemein weisen die OMPs von *H. pylori* einen deutlich höheren isoelektrischen Punkt (IEP) auf (größer 8; Baik et al., 2004), als die

OMPs anderer Bakterien wie *E. coli* (Molloy et al., 2000), *Salmonella enterica* serovar Typimurium, *Klebsiella pneumoniae*, *Caulobacter crescentus* (Molloy et al., 2001) und *Leptospira interrogans* (Cullen et al., 2002), deren isoelektrischer Punkt zwischen 4 und 7 liegt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in *H. pylori* als Anpassung an seine saure ökologische Nische eine positive Selektion auf das Codon, welches für die positiv geladene AS Lysin codiert, stattgefunden hat (Xia und Palidwor, 2005). OMPs mit einer positiven Netto-Ladung erschweren den Einstrom von Protonen durch Abstoßung der gleichgerichteten Ladung. Auch Membranproteine der Cytoplasmamembran weisen in *H. pylori* einen höheren IEP auf als die homologen Proteine aus anderen Organismen. So besitzt die c UE der F₀ Komponente der F₀F₁-ATPase, die am Transport von Protonen in das Cytoplasma beteiligt ist, in *H. pylori* einen IEP von 8,9 und in *E. coli* einen IEP von 6,3 (Sachs et al., 2003).

Im Gegensatz zu anderen säureresistenten Bakterien ist *H. pylori* jedoch nicht nur in der Lage, unter sauren pH-Bedingungen zu überleben, sondern kann in einem sauren Milieu auch wachsen und sich vermehren. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist, dass *H. pylori* auch unter sauren pH-Bedingungen zwischen pH 3 und pH 7 in Anwesenheit von Harnstoff in der Lage ist, seine protonenmotorische Kraft konstant bei -220 mV zu halten (Scott et al., 1998), was dem Bakterium die ATP-Synthese ermöglicht (Padan et al., 1981). Die Aufrechterhaltung der protonenmotorischen Kraft gelingt dem Bakterium, indem es nicht nur den pH-Wert des Cytoplasmas annähernd neutral hält, sondern auch, im Gegensatz zu anderen säureresistenten Bakterien, den pH-Wert des Periplasmas auf ca. 6,1 abpuffert. Eine Zusammenstellung der Reaktionen, die an der Pufferung des periplasmatischen Raums beteiligt sind, ist in der Abb. 2 zu sehen. Die Transkription der Gene *ureAB*, *ureIEFGH*, *amiE*, *amiF* und *hp1186*, deren Produkte an diesem Vorgang beteiligt sind, wird unter sauren pH-Bedingungen aktiviert.

Der Hauptfaktor der Säureresistenz in *H. pylori* ist das Enzym Urease. Die Gene, die für die Urease codieren liegen im Urease-Gencluster vor, welches aus den beiden Operonen *ureAB* und *ureIEFGH* besteht, die ausgehend von den Promotoren P_{ureA} und P_{ureI} transkribiert werden (Tomb et al., 1997; Akada et al., 2000). *ureA* und *ureB* codieren für die beiden strukturellen Untereinheiten (UE) der Urease, UreA und UreB (Clayton et al., 1990; Labigne et al., 1991), *ureI* codiert für einen Harnstoffkanal (Weeks et al., 2000), und die Gene *ureEFGH* codieren für akzessorische Proteine, die als Komplexe UreE/G und UreF/H oder UreF/G/H den Einbau von Nickel in das Apoenzym vermitteln (Volland et al., 2003; Rain et al., 2001, Park et al., 2005). Das Urease Apoenzym bildet eine ringförmige Struktur mit einer Größe von 1,1 MDa und einem Durchmesser von ca. 160 Å, welches eine dodecamere Struktur (($\alpha\beta$)₃)₄ aus 12 UreA und 12 UreB UE aufweist (Ha et al., 2001). Das Vorhandensein einer funktionsfähigen Urease ist essentiell für das Überleben unter sauren pH-Bedingungen *in vitro* (Clyne et al., 1995) und für die Kolonisierung im Tiermodell (Eaton et al., 1991; Eaton und Krakowka, 1994; Tsuda et al., 1994). Die Urease ist an der Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak (NH₃) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) (Owen, 1995) über folgende Reaktionen beteiligt:

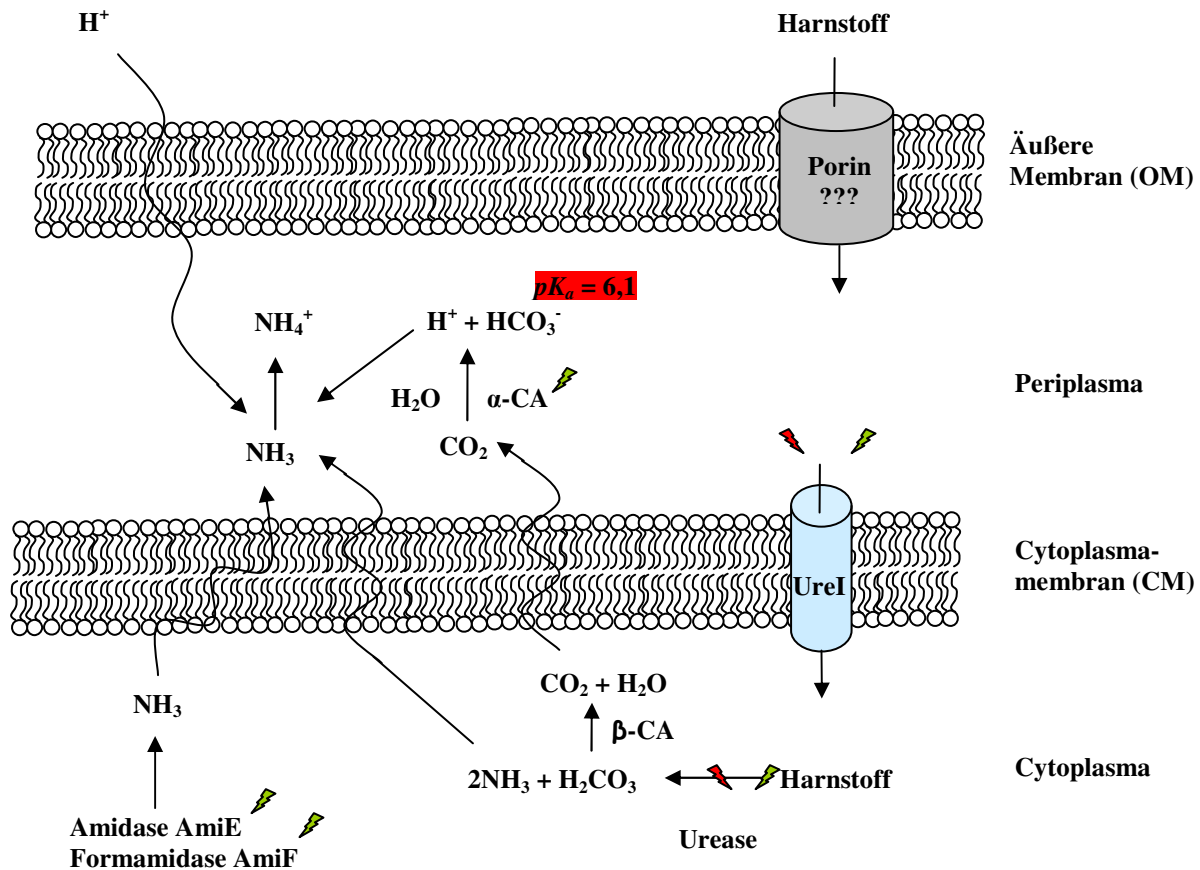
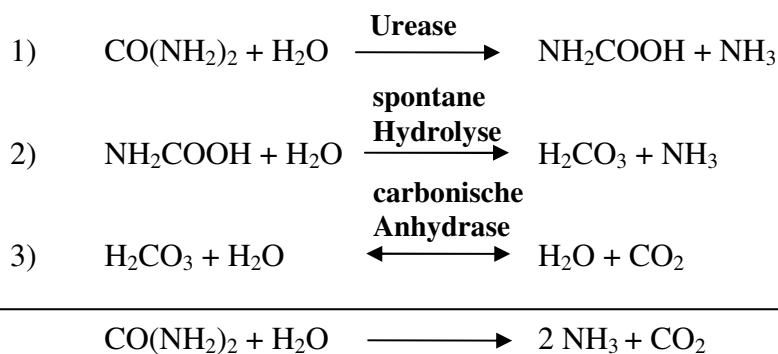


Abb. 2: Schematische Darstellung der Säureresistenz in *H. pylori* (modifiziert nach Marcus et al., 2005). Dargestellt sind Enzyme und Reaktionen, mit deren Hilfe *H. pylori* in Anwesenheit von Säure und Harnstoff den periplasmatischen pH-Wert auf 6,1 puffern kann. Genaue Informationen im Text.

🔴 : Aktivität wird durch sauren pH-Wert reguliert.

🟢 : Transkription des entsprechenden Gens wird säureabhängig durch den phosphorylierten RR ArsR-P induziert



Das Enzym Urease wird in *H. pylori* in sehr großen Mengen exprimiert, unter neutralen Wachstumsbedingungen beträgt der Anteil dieses Proteins an den bakteriellen Gesamtzellproteinen ca. 15 % (Mobley et al., 1995a), die Transkription des *ureAB*-Operons erfolgt ausgehend von dem σ^{80} (vegetativer Sigmafaktor) abhängig regulierten Promotor P_{ureA} (Davies et al., 2002). Die Expression der Gene des Urease-Genclusters wird durch mehrere Faktoren reguliert. So konnte eine NikR-abhängige Transkriptionsinduktion der Gene des Urease-Genclusters nach Zugabe von Nickel in das Wachstumsmedium beobachtet werden

(van Vliet et al., 2001; van Vliet et al., 2002; Contreras et al., 2002). Ebenfalls aktiviert wird die Transkription ausgehend von den Promotoren P_{ureA} und P_{ureI} durch den phosphorylierten RR ArsR (s. unten) in Abhängigkeit von einem sauren pH-Wert (Pflock et al., 2005). Die mRNA Transkripte weisen unter sauren pH-Bedingungen eine erhöhte Stabilität auf (Akada et al., 2000).

Die Aktivität der Urease wird durch den externen pH-Wert reguliert, ab einem extrazellulären pH-Wert von 6,5 nimmt die Aktivität der Urease zu bis zu einem Aktivitätsmaximum von pH 5,5 und ist dann konstant bei weiterem Absenken des extrazellulären pH-Wertes bis zu pH 2,0 (Scott et al., 1998; Rektorschek et al., 1998, Scott et al., 2002). Das pH-Optimum der Urease liegt bei einem pH-Wert von ca. 7,5 (Scott et al., 1998), irreversibel inaktiviert wird die Urease bei einem pH-Wert von kleiner als 4,5 (Mobley et al., 1995a), weshalb postuliert werden kann, dass der Wirkungsort der Urease das Cytoplasma ist und nicht, wie ursprünglich angenommen wurde, auch außerhalb der Bakterienzelle enzymatisch aktive Urease vorhanden ist. Das im Cytoplasma produzierte Ammoniak und das Kohlenstoffdioxid diffundieren über die Cytoplasmamembran in das Periplasma. NH_3 wird im Periplasma protoniert zu Ammonium (NH_4^+) und kann so den sauren pH-Wert abpuffern (Vgl. Abb. 2). Die Aktivierung in Abhängigkeit von einem sauren extrazellulären pH-Wert verhindert unter neutralen pH-Bedingungen eine Alkalisierung des Mediums, die lethal für *H. pylori* wäre. Weiterhin wird die Aktivität der Urease durch die Zugabe von Nickel induziert, vermutlich durch verstärkten Einbau von Nickel-Ionen durch die akzessorischen Proteine UreEFGH in das Apoenzym. Auch die eigentlich an der Insertion von Nickel in das Enzym Hydrogenase beteiligten Proteine HypA und HypB könnten am Einbau von Nickel in das Apoenzym Urease eine Rolle spielen, da diese beiden Proteine ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität der Urease haben (Olson et al., 2001).

Harnstoff als Substrat für die Urease liegt im Magensaft in einer Konzentration von 1-3 mM vor (Spenny et al., 1975) und gelangt über den Harnstoffkanal UreI in das Cytoplasma der Bakterienzelle (Weeks et al., 2000). Das 21,6 kDa große Membranproteine besitzt 6 Transmembrandomänen (TMD), die N- und C-Termini des Proteins ragen ins Periplasma, so dass drei cytoplasmatische und zwei periplasmatische Loops gebildet werden und weist Homologien zu dem UreI-Kanal aus *Streptococcus salivarius* (Chen et al., 1998) und *Helicobacter hepaticus* (Beckwith et al., 2001) auf. Strukturelle Ähnlichkeit besitzt UreI auch mit den *amiS*-Produkten des Amidase-Genclusters aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Rhodococcus sp.*, bei welchen es sich jedoch um Amidtransporter handelt (Chebrou et al., 1996; Wilson et al., 1995). Eine UreI Deletionsmutante ist nicht in der Lage, im Tiermodell zu kolonisieren (Skouloubris et al., 1998; Mollenhauer-Rektorschek et al., 2002, Bury-Moné et al., 2001), zeigt eine verminderte Überlebensfähigkeit bei Wachstum unter sauren pH-Bedingungen, auch in Anwesenheit von Harnstoff (Skouloubris et al., 1998), und weist unter sauren pH-Bedingungen eine verminderte Ureaseaktivität auf (Rektorschek et al., 2000). Unter sauren pH-Bedingungen wird der UreI-Kanal aktiviert, seine halbmaximale Aktivität liegt bei einem pH-Wert von 6,0 (Weeks und Sachs, 2001). Die Aktivierung erfolgt durch Protonierung von bestimmten AS (Histidin, Glutamat, Aspartat) im zweiten periplasmatischen Loop und im periplasmatischen C-Terminus des Kanals (Weeks und Sachs, 2001, Bury-Moné et al., 2001), es kommt aufgrund der Protonierung vermutlich zu Konformationsänderungen der TMD, der Kanal wird durchlässig für Harnstoff, so dass dieser in das Cytoplasma der Bakterienzelle einströmen kann (Weeks et al., 2004) (vgl. Abb. 2). Man kann davon ausgehen, dass die beobachtete Zunahme der Urease-Aktivität unter sauren pH-Bedingungen auf die Aktivierung des UreI-Kanals und die damit verbundene Bereitstellung des Substrates zurückzuführen ist. Ob eine Interaktion des Urease-Enzyms mit dem UreI-Kanal, die verstärkt unter sauren pH-Bedingungen beobachtet wird (Volland et al., 2003; Hong et al., 2003), direkt die Aktivität der Urease beeinflusst oder nur Substrat und Enzym optimal zusammenbringt, ist

unklar. Wie der Transport von Harnstoff über die äußere Membran stattfindet ist nicht bekannt, es wird postuliert, dass ein OMP an diesem Vorgang beteiligt ist.

Zwei weitere Enzyme, die für die Generierung eines annähernd neutralen periplasmatischen pH-Werts unter sauren pH-Bedingungen in der Anwesenheit von Harnstoff mitverantwortlich sind, sind die β - und α -Carbonatanhydrasen (Stähler et al., 2005; Marcus et al., 2005). Die 25,5 kDa β -Carbonatanhydrase wird durch das Gen *hp0004* codiert, die 28,2 kDa α -Carbonatanhydrase durch das Gen *hp1186* (Tomb et al., 1997; Chirica et al., 2001). Beide Enzyme katalysieren die reversible Umwandlung von H_2CO_3 (Kohlensäure) zu CO_2 und H_2O . Die im Cytoplasma lokalisierte β -Carbonatanhydrase (Chirica et al., 2002) wandelt die Kohlensäure, die bei der Spaltung von Harnstoff durch die Urease entsteht, in CO_2 und H_2O um (vgl. Schritt 2 und 3 der Ureasereaktion; s. Abb. 2). CO_2 diffundiert dann über die Cytoplasmamembran in das Periplasma und wird durch die α -Carbonatanhydrase, bei welcher es sich um ein Cytoplasmamembran-verankertes Protein handelt, dessen aktive, katalytische Domäne in das Periplasma ragt, erneut umgewandelt in Kohlensäure (Marcus et al., 2005). Die Kohlensäure dissoziiert zu HCO_3^- und H^+ , H^+ interagiert mit Ammoniak unter der Bildung von Ammonium. HCO_3^- mit einem pK_a -Wert von 6,1 kann den periplasmatischen pH-Wert gezielt auf diesen pH-Wert abpuffern (s. Abb. 2) (Markus et al., 2005; Sachs et al., 2005). Der periplasmatische pH-Wert von 6,1 liegt nahe an dem pH-Wert, bei welchem der UreI-Kanal seine halbmaximale Aktivität besitzt, so dass der Zustand eines gepufferten Periplasmas aufrecht erhalten werden kann. Es wird postuliert, dass die Transkription von *hp1186* unter sauren pH-Bedingungen durch den phosphorylierten RR ArsR induziert wird (Wen et al., 2003; Wen et al., 2006; Wen et al., 2007; Sachs et al., 2006), jedoch wurde eine säureabhängige Induktion der *hp1186* Transkription bisher nur von der Arbeitsgruppe um G. Sachs publiziert.

Weitere Gene aus *H. pylori*, deren Produkte an der Ammoniakproduktion beteiligt sind und somit eine Rolle bei der Säureresistenz in *H. pylori* spielen können, sind *hp0294* (*amiE*) und *hp1238* (*amiF*), welche für die aliphatische Amidase AmiE bzw. die Formamidase AmiF codieren (Tomb et al., 1997). Beide Proteine sind nicht essentiell für die Kolonisierung im Tiermodell, die Gene für diese Enzyme sind aber nur in gastrischen *Helicobacter*-Spezies vorhanden (Bury-Moné et al., 2003). Amidasen spalten kurzkettige Amide in Ammoniak und die entsprechende Carbonsäure, das *in vivo* Substrat der Amidase AmiE ist noch unbekannt (Skouloubris et al., 1997). Die Formamidase AmiF katalysiert die Hydrolyse von Formamid zu Ammoniak und Ameisensäure (Skouloubris et al., 1997). Der entstehende Ammoniak kann über die Cytoplasmamembran diffundieren und im Periplasma zu Ammonium protoniert werden (s. Abb. 2). Die Transkription der beiden Amidasegenen wird säureabhängig durch den phosphorylierten RR ArsR aktiviert (Pflock et al., 2006), auch eine (direkte oder indirekte) Regulation der Transkription durch NikR und Fur wurde postuliert (van Vliet et al., 2003; 2004a).

1.5 Genregulation 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). Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass *H. pylori* aufgrund der Anpassung an seine sehr beschränkte ökologische Nische, den menschlichen Magen, sein Genom reduziert hat. Die Magenmukosa kann als relativ stabiles Habitat betrachtet werden, in dem zum einen sehr wenige kurzfristige Anpassungen des Bakteriums an seine Umgebung stattfinden müssen (Cases et al., 2003;

Marshall et al., 1998) und zum anderen keine Kompetititon mit anderen Mikroorganismen stattfinden muss (Berg et al., 1997).

Tab. 2: Proteine mit regulatorischer Funktion in *H. pylori*

Lokus (26695)	Funktion	Referenz
Sigma Faktoren		
HP0088	RNA-Polymerase σ^{80} -Faktor, RpoD	Beier et al., 1998
HP0714	RNA-Polymerase σ^{54} -Faktor, RpoN	Spohn und Scarlato, 1999a
HP1032	RNA-Polymerase σ^{28} -Faktor, FliA	Suerbaum et al., 1993
Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren		
HP0165	Histidin-Kinase, ArsS	Beier und Frank, 2000
HP0244	Histidin-Kinase	Beier und Frank, 2000
HP1364	Histidin-Kinase, CrdS	Beier und Frank, 2000
HP0166	Response-Regulator, ArsR	Beier und Frank, 2000
HP0703	Response-Regulator, FlgR	Spohn und Scarlato, 1999a
HP1365	Response-Regulator, CrdR	Beier und Frank, 2000
HP1021	„orphan“ Response-Regulator	Beier und Frank, 2000
HP1043	„orphan“ Response-Regulator	Beier und Frank, 2000
weitere regulatorische Proteine		
HP0111	Transkriptionsrepressor, HrcA	Spohn und Scarlato, 1999b
HP1025	Chaperon-Repressor, HspR	Spohn und Scarlato, 1999b
HP1027	Eisenaufnahmeregulator, Fur	Bereswill et al., 1998a
HP1041	FlbA/FlhA-Homolog	Schmitz et al., 1997
HP1122	σ^{28} -Antagonist, FlgM	Colland et al., 2001 Josenhans et al., 2002
HP1139	Transkriptionsrepressor, Soj	
HP1140	Biotin-Operon Repressor, BirA	
HP1287	Transkriptionsaktivator, TenA	
HP1338	Nickel-abhängiger Transkriptionsregulator, NikR	van Vliet et al., 2002
HP1442	Kohlenstoff-Speicherung Regulator, CsrA	Barnard et al., 2004

Basierend auf der Annotoation der Genomsequenz wurden 32 für putativ regulatorische Proteine codierende Gene gefunden, von denen bisher jedoch nur ca. 20 (aufgelistet in der Tabelle 2), das entspricht 1,1 % aller vorhandenen Proteine, eine direkte genregulatorische Funktion zugeschrieben wird. In *Haemophilus influenzae*, einem Bakterium welches eine vergleichbare Genomgröße wie *H. pylori* aufweist, sind ca. doppelt so viele regulatorische Proteine vorhanden (Fleischmann et al., 1995).

In *H. pylori* sind viele globale Regulatoren, die in *E. coli* vorhanden sind, abwesend, wie z. B. OxyR (Sauerstoffstressantwort), Crp (Kohlenstoffverwertung), RpoH (Hitzeschock) und Fnr (Fumarat und Nitrat Regulation). Es sind nur 4 Proteine vorhanden, die in ihrer AS-Sequenz ein perfektes Helix-Turn-Helix(HTH)-Motiv aufweisen, nämlich der putative Hitzeschockregulator HspR, zwei Proteine mit unbekannter Funktion (HP1124, HP1349) und das an der Sekretion beteiligte SecA Protein. In *H. influenzae* sind 34 Proteine mit HTH-Motiv vorhanden und in *E. coli* 148.

Die bakterielle RNA(ribonuclein-acid)-Polymerase setzt sich zusammen aus dem „Core“-Enzym, welches aus einem Dimer der α -UE (codiert durch *rpoA*), einer β -UE (codiert durch

rpoB) und einer β' -UE (codiert durch *rpoC*) besteht, und dem Transkriptions-Initiationsfaktor (σ -Faktor), welcher für die Erkennung bestimmter Promotorsequenzen verantwortlich ist und am „Melting“ der Promotorsequenz beteiligt ist (Helmann und Chamberlin, 1988). Eine Besonderheit der RNA-Polymerase von *H. pylori* ist, dass die Gene *rpoB* und *rpoC*, die für die UE β und β' der RNA-Polymerase codieren, als fusioniertes Gen (HP1213) vorliegen (Tomb et al., 1997) und ein fusioniertes $\beta\beta'$ Fusionsprotein translatiert wird (Zakharova et al., 1998). Solch eine Genfusion ist neben dem Genus *Helicobacter* auch für die nahe verwandten ϵ -Proteobakterien der Art *Wolinella* (Zakharova et al., 1999) beschrieben. Das Genom von *H. pylori* enthält nur drei Gene, die für σ -Faktoren codieren, nämlich für σ^{80} , σ^{54} und σ^{28} . Die Sigmafaktoren, die an der Vermittlung der Stressantwort in anderen Bakterien beteiligt sind, wie RpoS (σ -Faktor der stationären Phase) oder RpoH (σ^{32} , σ -Faktor der Hitzeschockantwort) fehlen in *H. pylori*. Der vegetative σ -Faktor, der aufgrund seiner Homologie zu dem vegetativen σ -Faktoren anderer Bakterien als σ^{70} (Tomb et al., 1997; Solnick et al., 1997) oder aufgrund seines größeren Molekulargewichts von 78 kDa als σ^{80} bezeichnet wird (Beier et al., 1998), ist absolut essentiell für *H. pylori*. Der σ^{80} -Faktor ermöglicht die Bindung der RNA-Polymerase an die Promotorsequenzen der σ^{80} abhängig transkribierten Gene, indem er mit der UE 2.4 die -10-Box erkennt, welche die auch in anderen Bakterien konservierte Sequenz der TATA-Box (TATAAT) aufweist. Eine im Vergleich zu *E. coli* konservierte -35 Region konnte in *H. pylori* nicht identifiziert werden, aufgrund von computergestützten Analysen konnte jedoch ein *H. pylori* spezifisches -35 Element mit der Sequenz TTAAGC 21 bp stromaufwärts der TATA-Box postuliert werden. Manchmal findet sich 12 bp stromaufwärts der -10 Box eine weitere Wiederholung der -35 Region, häufiger jedoch die Sequenz TTAAA (Vanet et al., 2000). Die beiden σ -Faktoren σ^{54} und σ^{28} sind an der Transkriptionsregulation von Genen, die für Proteine codieren, die eine Funktion bei der Flagellenbiosynthese haben oder Bestandteile der Flagellen sind, beteiligt. σ^{54} (RpoN) reguliert zusammen mit dem NtrC-ähnlichen Response-Regulator FlgR (flagellum regulatory protein) die Transkription von Klasse 2 Flagellengenegen, die u. a. für das Flagellin FlaB als Bestandteil des Filaments codieren (Suerbaum et al., 1993) oder für Bestandteile des Basalkörpers und des Hakens (O'Toole et al., 1994; Spohn und Scarlato, 1999a). Die Aktivierung des σ^{54} -RNA-Holoenzym durch FlgR erfolgt vermutlich nicht durch einen typischen „Enhancer“-Mechanismus sondern unabhängig von einer Protein-DNA-Interaktion durch direkte Bindung des Regulators an die β -UE der RNA-Polymerase (Brahmachary et al., 2004). Erste Hinweise darauf, dass σ^{54} nicht nur an der Transkriptionsregulation von Flagellengenegen beteiligt ist, lieferten Fujinaga und Kollegen, indem sie zeigen konnten, dass in einer RpoN-Deletionsmutante morphologische Veränderungen in der stationären Phase beobachtet werden können (Fujinaga et al., 2001). Die Gene *hp0869* (*hypA*, codiert für ein Nickel bindendes Protein welches für die Aktivierung der Urease und der Hydrogenase benötigt wird (Mehta et al., 2003) und das Gen *hp1155* (*murG*, codiert für eine Glykosyltransferase, die an der Peptidoglykansynthese beteiligt ist), haben keine Funktion bei der Flagellensynthese, werden aber dennoch von RpoN-RNA-Polymerase-Holoenzymen transkribiert (Niehus et al., 2004). Das Protein HP0958 interagiert mit dem Sigma-Faktor RpoN (Ryan et al., 2005, Douillard et al., 2008) und erlaubt somit eine Akkumulation des Sigma-Faktors (Pereira und Hoover, 2005). Der alternative σ^{28} -Faktor (FliA) ist beteiligt an der Transkription von Genen, die für die Filamentproteine FlaA und FliD codieren (Leying et al., 1992; Haas et al., 1993; Kim et al., 1999), die Transkription dieser Gene wird gehemmt durch die Anwesenheit des FliA Antagonisten FlgM. FlgM bindet mit seiner C-terminalen Domäne an FliA und inhibiert so die Interaktion zwischen FliA und dem RNA-Polymerase Core-Enzym (Colland et al., 2001; Josenhans et al., 2002). Auch FliA abhängige Gene, deren Genprodukte keine Rolle bei der Flagellenbiosynthese haben, wurden identifiziert. Diese codieren z. B. für HorE (Outer membrane protein, OMP), EnvZ (LipidA Biosynthese) sowie ein Protein unbekannter Funktion (HP1051) (Josenhans et al., 2002). Weitere Proteine die an

der Transkription von Klasse 2, intermediären und Klasse 3 Genen der Flagellensynthese eine entscheidende regulatorische Funktion ausüben und als „Checkpoint“ Proteine der Flagellenbiosynthese fungieren, sind die Proteine FlhA und FlhF, die Bestandteil des Hakens sind (Niehus et al., 2004).

In *E. coli* wird die Transkription des *groESL* und des *dnaK*-Operons durch den Sigma-Faktor σ^{32} , der unter Stress Bedingungen exprimiert wird, reguliert (Gross et al., 1996). Der Sigma-Faktor σ^{32} ist in *H. pylori* nicht vorhanden (Tomb et al., 1997), die entsprechenden Operone werden durch den vegetativen Sigma-Faktor σ^{80} transkribiert (Spohn und Scarlato; 1999b). Die Transkription der Hitzeschockgene wird in *H. pylori* durch die Regulatoren HspR und HrcA reprimiert (Spohn et al., 2004). Bei dem homologen HspR Protein aus *Streptomyces* handelt es sich um einen Repressor der GlnR-Familie, der so genannte HAIR-Motive (HspR-associated inverted repeats) in den Promotorregionen des *dnaK*-Operons und des *clpB*-Gens bindet (Bucca et al., 1995; Grandvalet et al., 1997; Grandvalet et al., 1999). Das Gen, welches für das HspR Protein codiert, ist das zweite Gen des *cbpA-hspR-hp1026*-Operons. *cbpA* codiert für ein DnaJ-Homolog und *hp1026* für eine putative Helicase (Tomb et al., 1997; Spohn und Scarlato, 1999b). HspR bindet unter physiologischen Bedingungen im Promotorbereich P_{cbpA} an HAIR-ähnliche Motive und verhindert die Transkription der nachfolgenden Gene, indem es die Interaktion der RNA-Polymerase mit der -10 und der -35 Region verhindert. Die Expression von HspR ist somit autoreguliert (Spohn und Scarlato, 1999b). HrcA aus *Bacillus subtilis* fungiert als Repressor des *groESL*-Operons indem es an die sogenannten CIRCE-Sequenzen (controlled inverted repeats of chaperon expression) bindet (Schulz und Schuhmann, 1996). HrcA von *H. pylori* ist ein Cytoplasmamembrangebundenes Protein, sein N-terminales DNA-bindendes Helix-Turn-Helix-Motiv ragt ins Cytoplasma (Roncarati et al., 2007a). HspR und HrcA fungieren als Korepressoren bei der Transkription des *groESL*-(codiert für Chaperon GroEL = Hsp60 und das Cochaperon GroES = Hsp10) und des *hrcA-grpE-dnaK*-Operons (codiert für den Hitzeschockrepressor HrcA, das Cochaperon GrpE und das Chaperon DnaK = Hsp70) (Spohn et al., 2004). Hier bindet HrcA an CIRCE-ähnliche Sequenzen im Promotorbereich P_{gro} und P_{hrcA} und verhindert somit die Bindung der RNA-Polymerase, HspR bindet weiter stromaufwärts an HAIR-ähnliche Sequenzen (Spohn und Scarlato, 1999b; Roncarati et al., 2007b). Bei einem Temperaturshift nach 42 °C dissoziieren die Regulatoren vermutlich von der DNA und es kommt zu einer verstärkten Transkription der Hitzeschockgene (Spohn et al., 2002). Vor kurzem wurden weitere Gene identifiziert, deren Transkription abhängig von HspR und/oder HrcA reguliert wird. Die Transkription von vielen Genen, die für Flagellenproteine codieren, wird durch die Regulatoren HspR und/oder HrcA aktiviert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass HspR- oder HrcA Deletionsmutanten nicht mehr motil sind. Unklar ist, ob die Transkription dieser Gene direkt durch Regulator-DNA-Interaktion reguliert wird, oder ob es sich nicht vielmehr um einen indirekten Effekt handelt. Zumindest in den Promotorsequenzen der Gene *flaB* und *mda66* konnte keine Bindung von HrcA und HspR beobachtet werden (Roncarati et al., 2007b).

Eisen wird als essentieller Nährstoff für die meisten Mikroorganismen benötigt, z. B. als Komponente der Cytochrome oder als Kofaktor von Enzymen, weshalb viele Bakterien hochaffine Eisenaufnahmesysteme für Fe^{2+} und Fe^{3+} entwickelt haben. Eine zu hohe Eisenkonzentration hingegen schadet der Wirtszelle, da unter Sauerstoffstressbedingungen Eisen die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten über die Fenton-Reaktion katalysiert (Harrison und Arosio, 1996), welche die Bakterienzellen schädigen, indem sie Makromoleküle zerstören. Die Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase ist somit essentiell für viele Bakterien (Andrews et al., 2003).

In der Magenmukosa, dem natürlichen Habitat von *H. pylori*, kann eine starke Schwankung der vorliegenden Eisenkonzentration beobachtet werden. Durch die Verarbeitung der aufgenommenen Nahrung im Magen und die Schädigung von Wirtsgewebe wird Eisen freigesetzt, es kann zum Vorliegen von toxischen Eisenkonzentrationen kommen. Jedoch kann durch die Sekretion des Chelators Laktoferrin in die Muzinschicht auch ein Eisenmangel induziert werden (Nakao et al., 1997a; 1997b; Miehle et al., 1996). Das Genom von *H. pylori* codiert für 13 Gene, die eine putative Funktion bei der Eisenaufnahme haben (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999; Berg et al., 1997) und besitzt somit hochaffine Eisenaufnahmesysteme mit deren Hilfe der Keim Eisen aus Laktoferrin, Transferrin, aus Dicitrat und aus Hämverbindungen lösen kann (Dhaenens et al., 1997; Husson et al., 1993; Velayudhan et al., 2000; Worst et al., 1995; 1998; 1999) oder eisengebundenes humanes Ferritin aufnehmen kann (Berg et al., 2001). Proteine, die vermutlich an der Eisenaufnahme in *H. pylori* beteiligt sind, sind die Siderophorrezeptoren der äußeren Membran FecA1, FecA2, FecA3, FrpB1, FrpB2/3, die periplasmatisch Eisenbindenden Proteine CeuE1 und CeuE2, die Membranpermease Proteine FecD und FecE, der Fe²⁺ Transporter FeoB, für welchen als einziges der Proteine die putative Funktion in *H. pylori* experimentell bestätigt wurde (Velayudhan et al., 2000), sowie das Ferritin Pfr (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999).

Durch globale Transkriptom- und Proteom-Studien konnten viele Gene identifiziert werden, deren Expression in Abhängigkeit von der vorliegenden Eisenkonzentration in *H. pylori* reguliert wird (Merrell et al., 2003b; Lee et al., 2004; Ernst et al., 2005a). Als eisenabhängiger Regulator ist das Protein Fur bekannt. Bei dem gut charakterisierten Fur-Protein aus *E. coli* handelt es sich um einen Repressor, der nach Bindung des Korepressors Fe²⁺ als Homodimer an Operator-Elemente im Promotor-Bereich der Target-Gene die Transkription von Genen, die an der Eisenaufnahme beteiligt sind, reprimiert (Stojiljkovic et al., 1994). Der C-terminale Bereich des Proteins beinhaltet die Eisenbindungsdomäne und die Dimerisierungsdomäne, der N-terminale Teil vermittelt über ein untypisches Helix-Turn-Helix-Motiv die Bindung an die DNA (Stojiljkovic und Hantke, 1995) an sogenannte Fur-Boxen, welche zunächst als 19 bp Palindrom beschrieben wurden, heute aber neu definiert wurden als drei Hexamere der Sequenz NAT(A/T)AT (Escolar et al., 1998; 1999; 2000).

In *H. pylori* konnte ein Fur-Homolog (HP1027) identifiziert werden (Bereswill et al., 1998a). Durch Vergleich des Transkriptoms- oder Proteomprofils des WT mit einer Mutante, in der kein funktionsfähiges Fur exprimiert wird, wurden mehrere Gene identifiziert, deren Expression direkt oder indirekt durch Fur beeinflusst wird (Merrell et al., 2003b; Lee et al., 2004; Ernst et al., 2005a). Ein Hinweis auf eine direkte Regulation der Transkription wird durch das Vorhandensein von Fur-Boxen in der upstream Region mehrerer dieser Gene erhalten (Merrell et al., 2003b, Ernst et al., 2005a). Kürzlich konnte das Fur-Regulon identifiziert werden, es konnte gezeigt werden, dass Fur in *H. pylori* als Aktivator oder als Repressor wirken kann (Danielli et al., 2006). Nur für wenige der identifizierten Fur-Target-Gene konnte jedoch durch DNA-Protein-Interaktionsversuche der experimentelle Nachweis einer direkten Fur-Regulation auf Transkriptionsebene erbracht werden.

Unter Eisenüberschussbedingungen muss die Expression von Eisentransportproteinen reprimiert werden, um somit durch eine Verminderung der Eisenaufnahme die Akkumulation von toxischen Eisenkonzentrationen im Cytoplasma der Bakterienzelle zu verhindern. Der Fe²⁺-Fur-Komplex bindet an Operatoren, die Fur-Boxen enthalten, im Promotorbereich der Gene *fecA2* und *frpB*, die für Eisenrezeptoren der äußeren Membran codieren, und verhindert somit die Bindung der RNA-Polymerase und die Transkription ausgehend von diesen Promotoren unter Eisenüberschussbedingungen (Fassbinder et al., 2000; Delany et al., 2001a; 2001b). Auch die Transkription der Gene *ribBA* wird durch Bindung des Fe²⁺-Fur-Komplexes an den Promotor P_{ribBA} reprimiert (Fassbinder et al., 2000). Die Gene *ribBA* codieren für Proteine der Riboflavin-Biosynthese. Riboflavin wird ebenfalls eine Rolle bei der Eisenaufnahme zugeordnet (Worst et al., 1998).

Eine Besonderheit von *H. pylori*-Fur ist, dass das Apo-Fur, welches kein Fe^{2+} gebunden hat, mit hoher Affinität an Operator-Elemente in den Promotoren P_{pfr} und P_{sod} bindet. Diese Bindestelle überlappt mit den -10 und -35 Regionen, die für die Bindung der RNA-Polymerase benötigt werden, und verhindert somit unter Eisenmangelbedingungen die Transkription dieser Gene (Fassbinder et al., 2000; Delany et al., 2001b; Waidner et al., 2002a; Ernst et al., 2005b). Unter Eisenüberschussbedingungen verliert der Fe^{2+} -Fur-Komplex seine Affinität für diese Operatoren und es kommt zur Transkription ausgehend von den Promotoren P_{pfr} und P_{sod} . *pfr* codiert für das Ferritin PfrA, welches für die Speicherung von Eisen im nicht reaktiven Zustand in granulären Komponenten im Cytoplasma verantwortlich ist, und somit die Bakterienzelle vor Eisentoxizität schützt (Bereswill et al., 1998b). 24 UE von PfrA bilden eine multimere Proteinhülle, in welcher Eisen intrazellulär gelagert wird (Andrews, 1998). *sodB* codiert für die Superoxid-Dismutase in *H. pylori* (Pesci und Pickett, 1994; Spiegelhalder et al., 1993). Unter Eisenüberschussbedingungen findet eine erhöhte Expression der Superoxid-Dismutase statt, welche an der Beseitigung von Sauerstoffradikalen beteiligt ist. SodB katalysiert die Reaktion von O_2^- zu H_2O_2 , dieses wird durch die Katalase weiter abgebaut.

Fur bindet autoregulatorisch an Operator-Elemente seines eigenen Promotors, die eine unterschiedliche Affinität für Apo-Fur oder den Fe^{2+} -Fur-Komplex aufweisen und somit in einem komplizierten Mechanismus die Repression oder Aktivierung der Transkription in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration steuern und in einer Art „Fine-Tuning“ dafür sorgen, dass immer adäquate Mengen an Fur in der Bakterienzelle vorhanden sind (Delany et al., 2002a; Delany et al., 2003).

Eine direkte Aktivierung der Transkription durch Fur konnte für den Promotor P_{nifS} experimentell bestätigt werden (Alamuri et al., 2006). Durch Bindung des Fe^{2+} -Fur-Komplexes unter Eisenüberschussbedingungen an weit stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegende Sequenzen wird die Transkription der Gene *nifS* und *nifU* aktiviert. Diese Gene codieren für Proteine, die an der Bildung von Eisenschwefelclustern beteiligt sind. Unter Sauerstoffstress und der Anwesenheit von Eisen werden bakterielle Makromoleküle durch Sauerstoffradikale zerstört, die Neubildung von Fe-S-Clustern ermöglicht die Herstellung von neuen Proteinen.

Der Fur-Regulator von *H. pylori* ist neben der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase auch an der Regulation der Säureresistenz beteiligt (Bijlsma et al. 2002, Bury-Moné et al., 2004), er beeinflusst unter anderem durch die direkte bzw. indirekte Transkriptionsregulation der Amidase-Gene die Aktivität der Amidase AmiE und der Formamidase AmiF (van Vliet et al., 2003; van Vliet et al., 2004a). Weiterhin vermittelt er die Expression von Resistenzmechanismen gegenüber oxidativem Stress (Cooksley et al., 2003, Ernst et al., 2005a; Harris et al., 2002) und spielt eine Rolle bei der Regulation der Motilität (Danielli et al., 2006).

Wie im Fall des Elements Eisen muss auch die Nickelhomöostase in der Bakterienzelle strikt reguliert sein. Nickel wird in ausreichender Menge von *H. pylori* als Cofaktor der Enzyme Urease und Hydrogenase benötigt, deren Aktivität essentiell für eine effiziente Kolonisierung im Tiermodell ist (Eaton et al., 1991; Olson und Meier, 2002). Eine zu hohe intrazelluläre Nickel-Konzentration kann jedoch zu für die Zelle toxischen Effekten durch die Bildung von freien Radikalen führen (Nies, 2003; Silver, 1996). NikR ist ein Regulator, der an der Nickelhomöostase in vielen Bakterien beteiligt ist. Gut charakterisiert ist NikR in *E. coli* (EcNikR), welcher in Anwesenheit von Ni^{2+} als Transkriptionsrepressor des *nikABCDE*-Operons, welches für Gene codiert, die an der Nickelaufnahme beteiligt sind, fungiert und so die Anreicherung von toxischen Nickel-Konzentration in der Zelle verhindert (De Pina et al., 1999). Auch in *H. pylori* ist ein NikR-Homolog (HpNikR) vorhanden, dieses wird im Stamm *H. pylori* 26695 durch das Gen *hp1338* codiert, welches das erste Gen des bicistronischen

hp1338-hp1337-Operons ist (Tomb et al., 1997). Wie Kristallstrukturanalysen ergeben haben, ist die globale Faltung des HpNikR vergleichbar zu den Strukturen von homologen EcNikR (Schreiter et al., 2003; 2006) und NikR aus *Pyrococcus horokoshii* (Chivers und Tahirov, 2005). Es handelt sich um ein Homotetramer, welches aus zwei identischen Dimeren zusammengesetzt ist. Jedes Monomer besteht aus zwei Domänen, der internen, C-terminalen Domäne, an welcher die Bindung der Metallionen stattfindet und welche die Tetramerisierung des Moleküls vermittelt, und einer DNA-bindenden Domäne, die eine $\beta\alpha\alpha$ -Struktur (Ribbon-Helix-Helix, RHH) aufweist, ein Motiv, welches in mehreren Transkriptionsfaktoren vorhanden ist (Dian et al., 2006). Vier Ni^{2+} Ionen werden an hochaffine Bindestellen in das Tetramer eingelagert, es kommt daraufhin zur Konformationsänderung der N-terminalen DNA-Bindedomäne und der Regulator kann an Operator-Sequenzen im Promotor von Ziel-Genen binden und somit deren Transkription regulieren (Dian et al., 2006; Zambelli et al., 2007; Zambelli et al., 2008). Die von NikR-Ni gebundene palindromische Konsensussequenz TATWATT-11N-AATWATA (Delany et al., 2005) weicht von der in *E. coli* beschriebenen NikR-Erkennungssequenz ab (Chivers und Sauer, 1999; 2000; Da Pina et al., 1999). Zusätzlich zu EcNikR besitzt HpNikR N-terminal noch 9 zusätzliche AS. Dieser N-terminale „Arm“ verhindert die unspezifische Bindung des Regulators an DNA (Bananti und Chivers, 2007).

Durch globale Transkriptomstudien konnten mehrere Gene identifiziert werden, deren Transkription direkt oder indirekt durch den Regulator NikR-Ni beeinflusst wird (Contreras et al., 2003), darunter die Gene *ureA* und *ureB*, Gene, die für Nickelaufnahmeproteine und Nickelspeicherung oder Eisenaufnahme oder Eisenspeicherung codieren, weiterhin Gene, die für Proteine codieren, die an der Motilität oder der Stressantwort beteiligt sind oder für OMPs codieren. Einige Gene des NikR-Regulons sind ebenfalls Bestandteil des Fur-Regulons (Danielli et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass NikR-Ni die Transkription von *fur* reprimiert, Fur-Fe reprimiert die Transkription von *nikR*. Fur und NikR können entweder um überlappende Bindestellen in den Promotorbereichen von identischen Target-Genen konkurrieren, wie für die Bindung an P_{fur} und P_{nikR} gezeigt werden konnte oder sie können unabhängig voneinander an verschiedene Operator-Sequenzen im selben Promotor binden, wie für den Promotor P_{exbB} , welcher die Transkription der Gene *exbB-exbD-tonB*, die für die Bestandteile des TonB-Komplexes codieren, gezeigt werden konnte (Delany et al., 2005). Über die Regulation der *fur* Transkription hat NikR auch einen indirekten Einfluss auf die Transkription von weiteren Target-Genen wie *amiE* (van Vliet et al., 2004a).

Bei einigen Genen des NikR-Regulons handelt es sich um Gene, deren Transkription säureabhängig reguliert wird, was darauf hindeutet, dass NikR bei der Vermittlung der Säureantwort in *H. pylori* eine wichtige Funktion erfüllt (Bury-Moné et al., 2004). Forciert wurde diese These von van Vliet et al., der postulierte, dass die Bindung von NikR die säurevermittelte Induktion der Transkription der Gene *ureA* und *ureB* ausgehend von dem Promotor P_{ureA} hervorruft (van Vliet et al., 2004b). Unbestritten ist die Tatsache, dass durch die Bindung von NikR-Ni an ein upstream-Operator Element des Promotors P_{ureA} die Transkription von *ureA* und *ureB* induziert wird, HpNikR somit im Gegensatz zu EcNikR als Aktivator fungieren kann (van Vliet et al., 2002; Davies et al., 2002; Ernst et al., 2005c; Delany et al., 2005; Zambelli et al., 2008), die durch das ArsRS Zweikomponenten-System (vgl. unten) vermittelte säureabhängige Induktion der Gene des Urease-Genclusters ist jedoch unabhängig vom Regulator NikR (Pflock et al., 2005). Denkbar ist jedoch, dass der von van Vliet et al., beobachtete Effekt der verstärkten *ureAB*-Transkription durch NikR unter sauren pH-Bedingungen auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Ni^{2+} bei saurem pH-Wert zurückzuführen ist.

NikR ist in *H. pylori* der Regulator der Nickelhomöostase. Es konnte experimentell bestätigt werden, dass in Anwesenheit von Nickel der Regulator NikR-Ni die Transkription von Genen, deren Genprodukte an der Nickelaufnahme beteiligt sind, reprimiert, indem er an

Operator-Sequenzen im Promotorbereich dieser Gene bindet und somit die Bindung der RNA-Polymerase verhindert. Reprimiert wird die Transkription des Gens *nixA* (Ernst et al., 2005c; Wolfram et al., 2006), welches für den 37 kDa hochaffinen monomeren Nickeltransporter NixA der CM codiert (Mobley et al., 1995b; Bauerfeind et al., 1996; Fulkerson et al., 1998; Fulkerson und Mobley, 2000; Mobley et al., 1999). Über diesen Transporter gelangt gelöstes Ni^{2+} in die Bakterienzelle. Unter physiologischen Bedingungen liegt Ni^{2+} jedoch meist komplexiert vor, diese Komplexe können im Gegensatz zu den gelösten Ni^{2+} Ionen nicht die äußere Membran über Porine passieren. Gram-negative Bakterien benötigen deshalb hochaffine Rezeptoren der äußeren Membran, die Nickelionen aus den Komplexen lösen können und sie somit für die Zelle verfügbar machen. Im Genom von *H. pylori* sind zwei als putative Eisenrezeptoren annotierte Gene vorhanden, *frpB4* (*hp1512*) und *fecA3* (*hp1400*), die Homologien zu dem FrpB Protein aus *Neisseria meningitidis* (Pettersson et al., 1995) bzw. zu dem Eisencitrat-Rezeptor FecA aus *E. coli* (Zimmermann et al., 1984) aufweisen, deren Transkription jedoch nicht Fur-abhängig reguliert wird (Ernst et al., 2005a). Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass ihre Transkription in Anwesenheit von Nickel durch den Regulator NikR-Ni reprimiert wird (Ernst et al., 2006), was zu der Spekulation führt, dass diese zwei Rezeptoren in der Lage sind, Nickel zu binden, und somit an der Nickelaufnahme beteiligt sind. Die postulierte Funktion bei der Nickelaufnahme konnte für FrpB4 vor kurzem experimentell validiert werden (Davis et al., 2006). Der Transport von Ni^{2+} durch die äußere Membran muss energetisiert werden. Die beiden Proteine FrpB4 und FecA3 zeigen Homologien zu TonB Rezeptorproteinen und besitzen eine TonB-abhängige Rezeptordomäne (Pfam, Bateman et al., 2004), was vermuten lässt, dass diese beiden Proteine zur Familie der TonB-abhängigen Transportproteine gehören und die Aufnahme somit durch den TonB-Komplex energetisiert wird. Die Transkription der Gene des *exbB-exbD-tonB*-Operons, die für den TonB-Komplex codieren, werden ebenfalls durch die Bindung von NikR-Ni an den Promotor P_{exbB} reprimiert (Delany et al., 2005; Ernst et al., 2006).

NikR-Ni bindet auch an den Promotor P_{hpn} (Zambelli et al., 2007) und aktiviert die Transkription des *hpn*-Gens (*hp1427*) (Contreras et al., 2003), welches für ein Nickelbindendes Protein codiert, dessen Funktion vermutlich die Nickelspeicherung ist (Gilbert et al., 1995; Ge et al., 2006). Eine *H. pylori* Mutante, die kein funktionsfähiges Hpn-Protein exprimiert, weist eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ni^{2+} auf (Mobley et al., 1999).

Im Genom von *H. pylori* sind weitere putative Transkriptionsregulatoren codiert, die durch Homologie zu bekannten Transkriptionsfaktoren aus anderen Bakterien identifiziert wurden, über deren Wirkungsweise und Funktion in *H. pylori* jedoch wenig bekannt ist. Das ursprünglich als hypothetisches Protein annotierte HP0222 weist strukturelle Ähnlichkeit zur Familie der Arc/MetJ Transkriptionsfaktoren auf, wie durch Analyse der Kristallstruktur gezeigt werden konnte. Es liegt als Dimer vor und besitzt die für diese Familie der Transkriptionsfaktoren charakteristische Ribbon-Helix-Helix-Faltung (Popescu et al., 2005). Eine Transkriptionsinduktion des Gens *hp0222* konnte unter sauren pH-Bedingungen (Ang et al., 2001) und nach der Adhärenz an Magenepithelzellen beobachtet werden (Kim et al., 2004). Des Weiteren findet man in *H. pylori* Homologe zu den Soj/Spo0J Proteinen aus anderen Organismen (HP1139, HP1338) welche an der Verteilung des bakteriellen Chromosoms und bakterieller Plasmide während der Zellteilung beteiligt sind (Figge und Gober, 2003; Yamaichi und Niki, 2000). Soj fungiert auch als Repressor von Sporulationsgenen in *B. subtilis* (Quisel und Grossmann, 2000; Quisel et al., 1999), Soj kann dabei im ADP-gebundenen Zustand an die DNA binden. Spo0J aktiviert die ATPase Aktivität von Soj, fungiert somit als Nukleotid-Austausch-Faktor (Easter und Gober, 2002) und beeinflusst so die Bindefähigkeit von Soj an die DNA (Bouet und Funnel, 1999). Mittlerweile konnten experimentelle Hinweise darauf erhalten werden, dass es sich bei HP1139/HP1138 in

H. pylori um ein funktionsfähiges Soj/Spo0J System handelt (Lee et al., 2006). Auch ein Homolog des BirA-Proteins aus *E. coli* (HP1140) ist im Genom von *H. pylori* codiert. BirA reprimiert in *E. coli* die Transkription des biotin-Operons (Cronan, 1989). Einen putativen Transkriptionsaktivator stellt das Protein HP1287, ein Homolog zu TenA aus *Bacillus subtilis*, dar. TenA ist in *Bacillus subtilis* beteiligt an der Produktion der alkalischen Phosphatase (Pang et al., 1991).

Weitere Expressions-Regulationsmechanismen in *H. pylori*

Da im Genom von *H. pylori* nur eine sehr geringe Anzahl an regulatorischen Proteinen vorliegt, sind evtl. alternative Regulationsmechanismen an der Genregulation in *H. pylori* beteiligt. Die komplett sequenzierten *H. pylori*-Stämme *H. pylori* 26695, *H. pylori* J99 und *H. pylori* HPAG1 weisen eine überdurchschnittlich hohe Anzahl an Genen auf, die für Bestandteile von Restriktions-Modifikationssystemen (R-M-Systeme) codieren (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999; Oh et al., 2006). Da es sich bei vielen Genen, die für R-M-Systeme codieren um stammspezifische Gene handelt (Akopyants et al., 1998a; Doig et al., 1999; Salama et al., 2000; Lin et al., 2004) und nicht jedes Gen für ein aktives Enzym codiert, unterscheidet sich das Expressionsmuster an funktionsfähigen R-M-Systemen von Stamm zu Stamm (Vitkute et al., 2001; Lin et al., 2001; Xu et al., 2000; Vale und Vitor, 2007). Interessanterweise konnte in den untersuchten Stämmen eine deutlich höhere Anzahl an aktiven TypII Methyltransferasen als an aktiven TypII Restriktionsendonukleasen beobachtet werden (Kong et al., 2000; Lin et al., 2001; Vitkute et al., 2001; Humbert und Salama, 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass die TypII Methyltransferasen eventuell eine Bedeutung bei der Genregulation haben könnten. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Inaktivierung der Methyltransferase HpyIM, welche in allen untersuchten Stämmen aktiv ist (Takada et al., 2002), reprimierend auf die Expression des *hrcA-dnaK-grpE* Operons auswirkt (Donahue et al., 2002). In vielen Stämmen ist auch die Methyltransferase HpyIIIM aktiv (Takada et al., 2002). Diese methyliert Adenin in der Erkennungssequenz GATC, wie auch die Dam-Methyltransferase, die an der Expressionsregulation von Virulenzgenen in *Salmonella*, *Escherichia coli* (reviewed in Low und Casadesús, 2008) und *Yersinia enterocolitica* (Fälker et al., 2006; 2007) beteiligt ist. Die Erkennungssequenz der Methyltransferase CcrM (GANTC) wird in *H. pylori* durch die Methyltransferase HpyAIVM methyliert (Lin et al., 2001). CcrM ist an der Regulation des Zellzyklus in *Caulobacter* (Reisenauer et al., 1999; Zweiger et al., 1994) und der Replikation des bakteriellen Chromosoms beteiligt (Marczynski und Shapiro, 2002). Die Methyltransferase HpyAIVM ist in knapp der Hälfte aller *H. pylori* Stämme aktiv und es konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle bei der Transkriptionsregulation des *katA*-Gens, welches für die Katalase codiert, spielt (Skoglund et al., 2007). Die Expression vieler Gene, die für Bestandteile von R-M-Systemen codieren, wird durch Phasenvariation (s.u.) reguliert (Alm et al., 1999; Saunders et al., 1998; Lin et al., 2001; Salaün et al., 2005; Skoglund et al., 2007), so dass die Transkriptions-/Expressionsregulation durch Methylierung ein sehr komplexer Vorgang zu sein scheint.

Bei der Phasenvariation handelt es sich um das offensichtlich zufällige An- oder Abschalten der Genexpression. Ein Mechanismus, über welchen die Phasenvariation hervorgerufen werden kann, ist das so genannte „slipped strand mispairing“. Während der Replikation kann es durch die Verschiebung der DNA-Polymerase an kurzen Mononukleotid- oder Dinukleotid Wiederholung zur Veränderung der Nukleotidanzahl in diesen Bereichen führen. Liegen diese Sequenzen im codierenden Bereich eines Gens, so kann die Veränderung der Nukleotidzahl in diesen Sequenzen zur Leserahmenverschiebung und somit durch Entstehung neuer Stop-Codons zur Expression eines verkürzten, nicht funktionsfähigen Proteins führen (Hammerschmidt et al., 1996; Murphy et al., 1989). Befinden sich die Sequenzen hingegen im

Promotorbereich eines Gens, so kann eine Veränderung der Nukleotidanzahl eine Veränderung der Promotoraktivität nach sich ziehen, die sich wiederum auf die Transkription des betreffenden Gens auswirkt (Belland et al., 1997; Sarkari et al., 1994; van der Ende et al., 1995). Durch Computeranalysen der Genome der Stämme *H. pylori* 26695 und *H. pylori* J99 konnten insgesamt 46 Kandidatengene identifiziert werden, deren Expression aufgrund des Vorhandenseins von Nukleotidwiederholungssequenzen im Promotorbereich der Gene oder im 5' intragenischen Bereich durch Phasenvariation reguliert sein könnte (Salaün et al., 2004), dies entspricht ca. 3 % aller vorhandenen ORFs. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Phasenvariation einen Einfluss auf die Expression von Genen hat, die an der LPS-Synthese beteiligt sind. Durch das An- oder Abschalten der Expression bestimmter Glykosyltransferasen wird die Expression von bestimmten Lewis-Antigenen in der Seitenkette der LPS definiert (Appelmelk et al., 1999; 2000; Wang et al., 2000, Khamri et al., 2005; Sanabria-Valentin et al., 2007; Nilsson et al., 2008). Auch die Expression von verschiedenen äußeren Membranproteinen wie SabA (Goodwin et al., 2008), HopA = OipA (Dossumbekova et al., 2006; Yamaoka et al., 2000) und BabA (Solnick et al., 2004) sowie des Proteins FliP, welches für die Flagellensynthese essentiell ist (Josenhans et al., 2000), wird durch das Auftreten von Phasenvariation reguliert. Die Phasenvariation ermöglicht einzelnen Varianten der Bakterien unter bestimmten Umweltbedingungen aufgrund eines „On“ oder „Off“ Zustandes der Expression von Proteinen einen Wachstumsvorteil. So konnte z. B. gezeigt werden, dass unter sauren pH-Bedingungen vermehrt Le^x und Le^y-Antigene in der Seitenkette der LPS vorhanden sind (Moran et al., 2001) und dass durch eine Selektion des „On“-Status der Phospholipase A ein erhöhter Prozentsatz an Lyophospholipiden in der Membran von Bakterien, die unter sauren pH-Bedingungen inkubiert wurden im Vergleich zu Bakterien, die unter neutralen pH-Bedingungen angezogen wurden, auftritt (Tannaes et al., 2001).

Ein weiterer Mechanismus, über welchen in Bakterien ein Einfluss auf die Genexpression erreicht werden kann, ist das sogenannte „Quorum sensing“. Bei diesem Mechanismus können die Bakterien die Zelldichte über ein sekretiertes Signalmolekül (Autoinduktor AI) wahrnehmen. Bei steigender Populationsdichte akkumulieren die AI und induzieren ab einem bestimmten Schwellenwert eine Signaltransduktionskaskade in der Bakterienzelle, 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, welches an der Produktion eines funktionsfähigen AI-2 beteiligt ist (Forsyth und Cover, 2000; Joyce et al., 2000). Eine verminderte Expression von LuxS geht einher mit einer verstärkten Biofilmbildung in *H. pylori* (Cole et al., 2004). Eine Deletion des *luxS*-Gens führt auch zu einer verminderten Motilität der Bakterien, was vermutlich auf eine verminderte Expression des an der Flagellenbiosynthese beteiligten Proteins FlaA zurückzuführen ist (Loh et al., 2004; Osaki et al., 2006; Rader et al., 2007) sowie zu einer verminderten Kolonisierung von mongolischen Gerbils (Osaki et al., 2006). Da in *H. pylori* kein orthologes Protein zu dem aus *Vibrio*-Arten bekannten periplasmatischen AI-2 bindenden Protein LuxP vorhanden ist, und auch die Proteine LuxQ, LuxU und LuxO, die an der Signaltransduktionskaskade in der Bakterienzelle beteiligt sind, in *H. pylori* vermutlich fehlen (Sun et al., 2004), stellt sich die Frage, ob *H. pylori* tatsächlich ein funktionsfähiges „Quorum sensing“-System besitzt, oder ob der AI-2 nur als Nebenprodukt bei der Detoxifizierung von S-Adenosyl-Homocystein im Methylzyklus der Bakterienzelle entsteht, an welchem LuxS beteiligt ist (Winzer et al., 2002). Die Transkriptionsinduktion des Gens *flaA* nach Zugabe von synthetischem DPD (4,5-Dihydroxy-2,3-Pentanedion = Vorstufe des AI-2) (Rader et al., 2007) spricht jedoch dafür, dass *H. pylori* vermutlich in der Lage ist, über „Quorum sensing“ einen Einfluss auf die Genexpression auszuüben, der genaue Mechanismus ist unklar.

Auch über posttranskriptionelle Regulation (mRNA-Stabilität, „antisense“ RNA-Transkripte oder Inhibierung der Translation), der immer öfter eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Genexpression zugeschrieben wird (Delilhas, 1995; Régnier und Arraiano, 2000; Takayama und Kjelleberg, 2000) kann eine Expressionskontrolle von bestimmten Genen hervorgerufen werden. Kenntnisse über posttranskriptionelle Expressionsregulation in *H. pylori* sind jedoch nur in geringem Maß vorhanden. Im Genom von *H. pylori* sind mind. 3 Gene codiert, deren Produkte an der RNA Prozessierung beteiligt sein können, *papS* (Poly(A)-Polymerase), *rnc* (RNaseIII) sowie *rnpA* (RNaseP-Untereinheit A). Das Produkt eines weiteren Gens, *pnp* (Polynukleotid-Phosphorylase), ist evtl. an der RNA-Degradation beteiligt (Tomb et al., 1997). Diese Genprodukte sind evtl. Bestandteil eines in *H. pylori* vorhandenen RNA-Degradosoms. Erste Hinweise, die darauf hindeuten, dass über den „Turnover“ von RNA die Expression von Genen in *H. pylori* reguliert wird, konnten durch die Arbeit von Akada et al., 2000, erbracht werden. Sie konnten zeigen, dass bei der Transkription des Urease Genclusters zunächst 3 Primärtranskripte gebildet werden, eines des Operons *ureAB*, eines des Operons *ureIEFGH* und ein „read-through“ Transkript *ureABIEFGH*, die anschließend weiter prozessiert werden, so dass RNA-Moleküle verschiedener Länge entstehen. Unter sauren pH-Bedingungen konnte eine erhöhte Stabilität dieser Prozessierungsprodukte beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die posttranskriptionelle Genregulation, die vermutlich durch RNA-Prozessierung und -Degradation vermittelt wird, als Antwort auf den Umweltreiz Säure reguliert wird. Von den Autoren wurde postuliert, dass dieser Prozess das „Fine-Tuning“ der Urease Expression reguliert.

Eine weitere Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation ist die Expressionsregulation durch CsrA. Im Genom von *H. pylori* ist ein homologes Gen zu *csrA* aus *E. coli* vorhanden (Tomb et al., 1997). EcCsrA (carbon storage regulator) ist ein posttranskriptioneller Regulator, der Glycogen-Synthese und -Katabolismus sowie die Glukoneogenese und die Biofilmbildung reprimiert und als Aktivator der Glykolyse, der Motilität und der Flagellenbiosynthese fungiert (Romeo et al., 1993; Romeo, 1998; Wei et al., 2001; Baker et al., 2002; Jackson et al., 2002). CsrA bindet die nichttranslatierte „leader“-Sequenz der RNA (Liu und Romeo, 1997) und kontrolliert somit die RNA-Stabilität (Liu et al., 1995) und den Zugang der Ribosomen zur Ribosomenbindestelle (RBS). Durch blockieren der RBS wird die Translation inhibiert (Baker et al., 2002), durch Stimulation der gekoppelten Transkription-Translation kann durch die Bindung von CsrA am 5'-Ende der mRNA die Translation aber auch aktiviert werden (Wei et al., 2001). Die Aktivität von CsrA in *E. coli* wird durch das Vorhandensein der sRNAs (kleine, nicht translatierte RNAs) CsrB und CsrC beeinflusst, welche mit CsrA Ribonukleinproteinkomplexe bilden und somit *in vivo* der Aktivität von CsrA entgegenwirken (Liu et al., 1997; Weilbacher et al., 2003; Dubey et al., 2005). Der Abbau der sRNAs wiederum wird durch ein weiteres Protein, CsrD reguliert, welches vermutlich an CrdB und CrdC bindet und somit die Degradation durch die Ribonuklease E aktiviert (Suzuki et al., 2006). In *H. pylori* konnten bisher keine *csrB* und *csrC* homologen ORFs detektiert werden (Barnard et al., 2004), die Kontrolle der CsrA-Aktivität und die Funktionsweise von CsrA ist somit in *H. pylori* unbekannt. Die Inaktivierung des Regulators CsrA beeinflusst in *H. pylori* die Expression der Regulatorgene *HspR* und *Fur*, *in vivo* Experimente ergaben, dass durch Deletion von CsrA die Virulenz der Mutanten im Maus-Infektionsmodell deutlich attenuiert war (Barnard et al., 2004).

Ein weiteres Protein, dem eine Funktion bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression zugesprochen wird, ist das RpoN Chaperon HP0958. HP0958 verhindert die Proteolyse von RpoN, es kommt zur Akkumulation des Sigma-Faktors RpoN und zu einer verstärkten Expression der RpoN-abhängig transkribierten Flagellengene (Pereira und Hoover, 2005). Weiterhin bindet HP0958 an die mRNA *fliA*, was zu einer verminderten Stabilität dieser Messenger RNA führt, jedoch gleichzeitig zu einer verstärkten Translation, es kommt zur stärkeren Expression von FliA (Douillard et al., 2008).

2. Zweikomponenten-Systeme

2.1 Allgemeine Charakterisierung

Um sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anpassen zu können, haben Zellen effiziente regulatorische Systeme entwickelt, mit deren Hilfe sie verschiedene Umweltreize wahrnehmen und daraufhin ihre zelluläre Antwort über die Veränderung der Genexpression modulieren können. Eine der fundamentalen Strategien, die zu diesem Zweck in allen Zellen eingesetzt wird, ist die reversible Proteinphosphorylierung nach Aufnahme eines Umweltreizes. In Eukaryonten wird diese Funktion überwiegend von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen übernommen, wohingegen in Prokaryonten vor allem Histidin-Kinasen als Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen vorkommen. Zweikomponenten-Systeme sind weit verbreitet im Reich der Eubakterien, es konnte jedoch auch das Vorhandensein von Zweikomponenten-Systemen im Reich der Archaeen, z. B. in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith et al., 1997), in eukaryotischen Einzellern wie z. B. in *Saccharomyces cerevisiae* (Loomis et al., 1998) und auch in höheren eukaryotischen Lebensformen, in Pflanzen, z. B. in *Arabidopsis thaliana* (Hwang et al., 2002; Stock et al., 2000) bestätigt werden. Die Anzahl der vorliegenden Zweikomponenten-Systeme variiert je nach Bakterienspezies, allgemein wurde beschrieben, dass vor allem diejenigen Mikroorganismen (MO), die häufig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt sind und sich an diese anpassen müssen, eine hohe Zahl an Zweikomponenten-Systemen aufweisen (Akerley und Miller, 1996; Parkinson und Kofoed, 1992). In dem sehr kleinen Genom des parasitären Bakterium *Mycoplasma genitalium*, welches nur in einer sehr eingeschränkten ökologischen Nische vorkommt, konnten keine Gene identifiziert werden, die für Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen codieren (Mizuno, 1998). In *Bacillus subtilis* und *E. coli* sind ca. 30 Zweikomponenten-Systeme vorhanden (Kobayashi et al., 2001, Zhou et al., 2003) und in *Nostoc punctiformis* konnten über 100 solcher Systeme identifiziert werden (Hoch und Varughese, 2001).

Mit Hilfe der Zweikomponenten-Systeme können Bakterien die verschiedensten Umweltsignale wahrnehmen, wie z. B. Verfügbarkeit von Nährstoffen, Veränderungen der Osmolarität, das Vorhandensein von Quorum-Sensing Signalmolekülen, pH-Wert, Temperatur, Licht, Sauerstoffkonzentration u. a. Die Zweikomponenten-Systeme regulieren daraufhin 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 und Courvalin, 1996).

Ein typischen Zweikomponenten-System (vgl. Abb. 3) besteht aus zwei Proteinen, einer sensorischen Histidin-Kinase (HK) und einem Response-Regulator (RR). Meist handelt es sich bei der HK um ein membranständiges Protein, welches über zwei Transmembrandomänen (TMD) in die Cytoplasmamembran verankert ist, die N-terminale Input- oder Sensordomäne ragt ins Periplasma, die C-terminale Transmitterdomäne ins Cytoplasma. Verbunden sind die beiden Domänen über die TMD2 und evtl. durch eine zusätzliche Linkerdomäne. Der cytoplasmatisch lokalisierte RR besteht meist ebenfalls aus zwei Domänen, einer N-terminalen Receiverdomäne und einer C-terminalen Outputdomäne, die über einen flexiblen Linker miteinander verknüpft sind (Ronson et al., 1987).

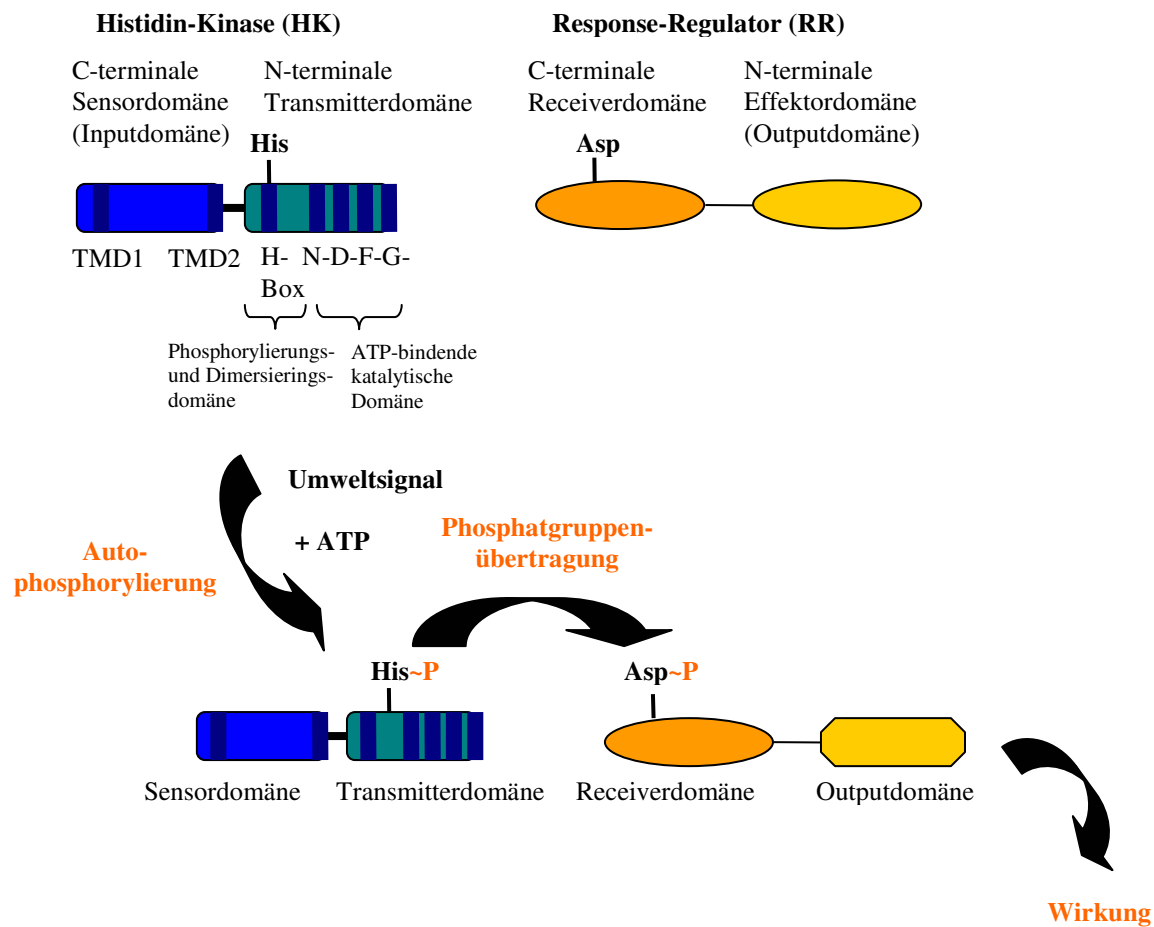


Abb. 3: Schematische Darstellung eines klassischen Zweikomponenten-Systems. Nähere Erörterungen im Text.

Nach Wahrnehmung des korrespondierenden Umweltreizes über die periplasmatische Sensordomäne der HK kommt es zu einer ATP-(Adenosin-tri-phosphat) abhängigen Autophosphorylierung der Kinase an einem konservierten Histidinrest (His) in der H-Box der Transmitterdomäne. Die H-Box besteht aus zwei α -Helices, die an der Dimerisierung von zwei Kinase-Proteinen beteiligt sind, indem sie im Homodimer ein vier Helix-Bündel ausbilden. Solch eine Dimerisierung geht häufig der Autophosphorylierung, bei der es sich um eine *trans*-Phosphorylierung der beiden Monomere handelt, voraus, wie für die HKs EnvZ, NtrB und CheA aus *E. coli* gezeigt werden konnte (Ninfa et al., 1993; Surette et al., 1996; Swanson et al., 1993; Yang und Inouye, 1991). Die ATP-abhängige Autophosphorylierung wird durch die C-terminale katalytische Region der Transmitterdomäne katalysiert.

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

Anschließend wird in einer Phosphotransfer-Reaktion die hochenergetisch gebundene Phosphatgruppe der Transmitterdomäne auf einen konservierten Aspartatrest (Asp) der N-terminalen Receiverdomäne des Response-Regulators übertragen (Sanders et al., 1989). Die Bezeichnung Receiverdomäne ist irreführend, da der übertragene Phosphatrest nicht passiv von der Receiverdomäne aufgenommen wird, sondern diese Phosphotransfer-Reaktion aktiv durch den RR katalysiert wird. Aus diesem Grund können auch niedermolekulare, phosphathaltige Moleküle wie Acetylphosphat, Carbomoylphosphat, Phosphoramidat oder

Imidazolphosphat als Phosphatdonatoren fungieren (Deretic et al., 1992; Lukat et al., 1992, McCleary und Stock, 1994).

2. Phosphotransfer: HK-His~P + RR-Asp ↔ HK-His + RR-Asp~P

Durch die Phosphorylierung des konservierten Aspartatrestes in der Receiverdomäne des RR kommt es zur Konformationsänderung des Proteins und somit zur Aktivierung der flexiblen Outputdomäne (Effektordomäne). In den meisten Fällen handelt es sich bei den RRs um Transkriptionsregulatoren, durch die Phosphorylierung verändert sich die DNA-bindende Eigenschaft und der phosphorylierte RR kann an die DNA binden und somit die Transkription von Target-Genen beeinflussen. Eine Beendigung des Signals erfolgt durch die Dephosphorylierung des RR, die entweder durch die Autophosphataseaktivität des RR selbst, durch eine Phosphataseaktivität der korrespondierenden HK oder durch eine zusätzliche Komponente, z. B. eine spezifische Aspartatphosphatase katalysiert wird (Jung und Altendorf, 1998; Perego et al., 1994; Perego et al., 1996; Stock und Mowbray, 1995). In allen Fällen wird über eine Hydrolysereaktion der Phosphatrest vom phosphorylierten Aspartat auf Wasser übertragen.

3. Dephosphorylierung: RR-Asp~P + H₂O ↔ RR-Asp + P_i

Alle drei Reaktionen finden nur in Anwesenheit von divalenten Metallionen statt, wobei *in vivo* Mg²⁺ das relevante Kation ist (Stock et al., 1993; 2000).

Die Histidin-Kinasen sind den eukaryontischen Ser/Thr/Tyr-Kinasen im katalytischen Mechanismus sehr ähnlich, unterscheiden sich aber im Bezug auf die chemischen Reaktionen, die sie katalysieren. Ser/Thr/Tyr-Kinasen produzieren bei der Phosphorylierung Phosphoester, wohingegen 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 Phosphotransfer-Reaktionen.

Die Histidin-Kinasen lassen sich, je nach Lokalisierung des Kinase-Sensors, in 3 Hauptgruppen einteilen (Mascher et al., 2006). Der ersten Gruppe, den periplasmatische Sensor-HK, die dadurch definiert sind, dass ihre Sensordomäne im Periplasma liegt, werden mit ca. 2500 HK die meisten aller vorhandenen HK zugeordnet. Zu dieser Gruppe der periplasmatischen Sensor-HK zählen auch die „typischen“ HK eines Zweikomponenten-Systems wie z. B. EnvZ aus *E. coli* (Forst et al., 1987) oder PhoQ aus *Salmonella* (Miller et al., 1989; Guo et al., 1997). Diese HK sind meist an der Wahrnehmung von gelösten Stoffen oder Nährstoffen beteiligt, die Wahrnehmung kann über die direkte Interaktion zwischen der Sensordomäne und einem definierten kleinen Molekül stattfinden (Wahrnehmung von Citrat durch CitA, Wahrnehmung von Nitrat/Nitrit durch NarX) (Sevvana et al., 2008; Williams und Stewart, 1997) oder auch über die Interaktion eines periplasmatisch gelösten Bindeproteins mit der periplasmatischen Sensordomäne. In *Agrobacterium tumefaciens* wird z. B. die Kinase VirA durch die Interaktion mit dem Glukosegebundenen Protein ChvA aktiviert (Shimoda et al., 1993), die Säurewahrnehmung durch die Kinase VirA erfolgt jedoch ohne ein zusätzliches periplasmatisches Protein, durch die periplasmatische Sensordomäne (Gao und Lynn, 2005).

Eine weitere Gruppe von HK sind die HK, bei denen der Wahrnehmungsmechanismus eines Signals mit der Transmembranregion verknüpft ist. Diese Kinasen besitzen N-terminal 2 - 20 membrandurchspannende Regionen, die durch kurze Linker miteinander verknüpft sind, eine periplasmatische Sensordomäne fehlt. Die Reizwahrnehmung erfolgt mit Hilfe der

membrandurchspannenden Regionen. Durch diese Kinasen werden u. a. Eigenschaften der Zellhülle wie z. B. der Turgordruck wahrgenommen (Mascher et al., 2003).

Zur dritten Gruppe der HK zählen alle HK, deren Sensordomäne im Cytoplasma der Bakterienzelle lokalisiert ist. Diese können entweder in der Membran verankert sein, wie z. B. die HK KdpD aus *E. coli*, welche die Kaliumkonzentration über einen cytoplasmatischen Sensor wahrnimmt (Rothenbücher et al., 2006), an integrale Membranproteine gebunden sein wie das Paradebeispiel einer cytoplasmatischen HK, die Chemotaxis HK CheA, die mit MCPs (methyl-accepting-chemotaxis-proteins) assoziiert ist, oder löslich im Cytoplasma vorliegen wie die HK NtrB aus *E. coli* und *Salmonella* (Reitzer, 2003). Das NtrBC Zweikomponenten-System reguliert die Expression von Genen, die an der Assimilation von Ammoniak und der Verwendung von alternativen Stickstoffquellen beteiligt sind.

Das gemeinsame Kennzeichen aller Histidin-Kinasen ist die Kinasedomäne. Während die AS-Sequenzen der Sensordomäne von Kinase zu Kinase Unterschiede aufweisen, ist die intrazelluläre Transmitterdomäne stark konserviert (Dutta et al., 1999; Grebe und Stock, 1999; Kim und Forst, 2001). Die Kinasedomäne weist eine Länge von ca. 350 Aminosäuren auf und kann in zwei funktionelle Abschnitte unterteilt werden, die Dimerisierungsdomäne (Phosphorylierungsdomäne) und die ATP-bindende, katalytische Domäne (Stock, 1999). Die Phosphorylierungsdomäne besitzt eine stark konservierte Region mit dem phosphorylierbaren Histidinrest (H-Box), an welchem die Autophosphorylierung stattfindet. Weiterhin sind die beiden durch die H-Box definierten α -Helices eines Kinasemonomers an der Dimerisierung der Kinaseproteine beteiligt. Aufgrund von verschiedenen konservierten AS Resten, die den konservierten Histidinrest umgeben, können die Histidin-Kinasen phylogenetisch in 5 verschiedene Klassen, I, II, IIIA, IIIB und IV unterteilt werden (Fabret et al., 1999). Diese konservierten „Anker“-AS sind auch an der Interaktion mit den RRs beteiligt, weshalb die einzelnen Klassen von HKs nur mit speziellen Gruppen von RRs interagieren können (Hoch und Varughese, 2001; Grebe und Stock, 1999; Koretke et al., 2000; Zapf et al., 2000; Tzeng und Hoch, 1997). In der ATP-Bindedomäne sind vier weitere hochkonservierte Sequenzmotive vorhanden, die als N-, D-, F- und G-Box bezeichnet werden (Grebe und Stock, 1999).

Neben dem simplen Phosphotransfer von dem konservierten Histidinrest der Transmitterdomäne der HK auf den konservierten Aspartatrest der Receiverdomäne des RR, kann der Phosphotransfer in einem komplizierteren Mechanismus, dem sogenannten Phosphorelay, über mehrere Zwischenstufen erfolgen. Im Phosphorelay wird der Phosphatrest der Transmitterdomäne der HK zunächst auf einen Aspartatrest einer zusätzlichen Receiverdomäne übertragen, dann weiter auf den Histidinrest einer Hpt-Domäne (histidine-containing phosphotransfer), die in ihrer Funktion als Phosphotransferase den Phosphatrest final auf den konservierten Aspartatrest in der Receiverdomäne des RR überträgt. Der mehrstufige Prozess der His-Asp-His-Asp Phosphatübertragung erlaubt den Zellen in mehreren Schritten eine Regulation des Phosphorelays durch die Aktivität von verschiedenen Phosphatasen. Die zusätzlichen Receiver- und Hpt-Domänen können entweder mit der HK fusioniert sein und bilden somit eine Hybride HK wie im Falle der Kinase BvgS von *Bordetella pertussis* (König et al., 2002), oder sie liegen als einzelne Proteine vor, wie beim Sporulationskontroll-System von *Bacillus subtilis* (Hoch, 1998; Perego, 1998, Errington, 2003). Unorthodoxe oder Hybride HK findet man bei ca. 20 % von prokaryontischen, jedoch bei fast allen eukaryontischen Zweikomponenten-Systemen (Grebe und Stock, 1999; Stock et al., 2000).

Die Response-Regulatoren bestehen aus einer Receiverdomäne und einer Output(Effektor)-domäne. Die Receiverdomäne besteht aus ca. 125 AS und weist eine $(\alpha\beta)_5$ -Faltung auf, ein zentrales Bündel, welches aus fünf parallelen β -Faltblättern besteht, die auf beiden Seiten von insgesamt fünf α -Helices eingerahmt werden (Ronson et al., 1987; Stock et al., 1989; Volz

und Matsumura, 1991). Das aktive Zentrum der Receiverdomäne wird auch als saure Tasche bezeichnet, da drei saure AS in allen aktiven Zentren der RRs hoch konserviert sind. Bei dem konservierten Aspartatrest D57 (bzgl. der AS-Position im RR CheY aus *E. coli*) handelt es sich um die Phosphorylierungsstelle des RRs (Sanders et al., 1989). Zwei weitere konservierte Aspartatreste (D12 und D13) sind an der Koordination des Mg^{2+} Ions beteiligt, welches sowohl für die Katalyse der Phosphorylierungs- als auch der Dephosphorylierungsreaktion benötigt wird (Lukat et al., 1991; Lukat et al., 1990, Needham et al., 1993). Weitere konservierte AS-Reste im Umfeld der sauren Tasche sind ein Threoninrest (T87) und ein Lysinrest (K109) (Stock et al., 1990). Der Lysinrest interagiert mit der Phosphatgruppe und trägt somit zur Stabilisierung des phosphorylierten Proteins bei, während der Threoninrest an der Aktivierung des Regulators beteiligt ist (Robinson et al., 2000). Die Phosphorylierung am Aspartatrest D57 bewirkt eine Konformationsänderung der Receiverdomäne (Lee et al., 2001; Birck et al., 1999; Halkides et al., 2000; Kern et al., 1999; Lewis et al., 1999), die vermutlich einen Einfluss auf die Konformation der Outputdomäne hat. Meist handelt es sich bei den Response-Regulatoren um Transkriptionsregulatoren, die die Genexpression in der Zelle regulieren. Aufgrund von Sequenz- und Strukturvergleich der C-terminalen DNA-Bindedomäne werden die RR in 3 Familien eingeteilt, und zwar aufgrund von Homologien zu gut charakterisierten RRs in die OmpR-(Martinez-Hackert und Stock, 1997a; 1997b), FixJ-(Baikalov et al., 1996) und NtrC(Pelton et al., 1999)-Familien.

Neben der häufigsten Funktion als Transkriptionsregulatoren mit DNA-bindender Eigenschaft können die Effektor-domänen auch andere Funktionen übernehmen und z. B. als Enzyme wirken, wie die cAMP(cyklisches Adenosinmonophosphat)-Phosphodiesterase RegA von *Dictyostelium* (Maeda et al., 2004) oder die an der Chemotaxis beteiligte Methylsterase CheB (Simms et al., 1985) oder über Protein-Protein-Interaktion zelluläre Vorgänge steuern, wie die Interaktion zwischen dem RR CheY und dem Flagellenmotorprotein, die je nach Phosphorylierungszustand von CheY einen Einfluss auf die Art der Bewegung (schwimmen oder taumeln) der Bakterienzelle hat (Bourret und Stock, 2002).

In den meisten Fällen bewirkt die Phosphorylierung des RR eine aktive Konformation der Effektor-domäne, jedoch sind auch hier Ausnahmen bekannt. Das DegU Protein aus *Bacillus subtilis* weist zwei aktive Konformationen auf: phosphoryliert aktiviert es die Expression von degradativen Enzymen, im unphosphorylierten Zustand aktiviert es die Expression von Kompetenzproteinen (Dahl et al., 1992).

2.2 Zweikomponenten-Systeme in *H. pylori*

Im Genom von *H. pylori* liegen nur wenige Gene vor, die für Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen codieren. Mit vier offenen Leserahmen (open reading frames ORF) mit Homologien zu Genen von Histidin-Kinasen (*hp0165*, *hp0244*, *hp0392*, *hp1364*) und sechs ORFs mit Homologien zu Genen von Response-Regulatoren (*hp0166*, *hp0703*, *hp1021*, *hp1043*, *hp1067*, *hp1365*) werden insgesamt nur 10 Proteine exprimiert, die Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen sind. Diese sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3: Proteine der Zweikomponenten-Systeme von *H. pylori*.

HK: Histidin-Kinase
RR: Response-Regulator

Lokus (26695)	vorhergesagte Funktion	Charakteristika
HP0392	Histidin-Kinase	CheA Homolog; Chemotaxis; zugehöriger RR: HP1067
HP0165	Histidin-Kinase	ArsS; Säureregulation; zugehöriger RR: HP0166
HP0244	Histidin-Kinase	FlgS; Flagellenbiosyntheseregulation; NtrB-ähnliche HK; cytoplasmatisches Protein; zugehöriger RR: HP0703
HP1364	Histidin-Kinase	CrdS; Kupfer-Resistenz; zugehöriger RR: HP1365
HP1067	Response-Regulator	CheY Homolog; Chemotaxis; zugehörige HK: HP0392
HP0166	Response-Regulator	ArsR; Säureregulation; essentieller OmpR-artiger RR; zugehörige HK: HP0165
HP0703	Response-Regulator	FlgR; Flagellenbiosyntheseregulation; NtrC-artiger RR; zugehörige HK: HP0244
HP1365	Response-Regulator	CrdR; Kupfer-Resistenz; OmpR-artiger RR; zugehörige HK: HP1364
HP1021	Response-Regulator	„orphan“, Acetonmetabolismus; DNA-bindendes Helix-Turn-Helix-Motiv, keine Homologie zu DNA-bindender Domäne anderer RR
HP1043	Response-Regulator	„orphan“; essentieller OmpR-artiger RR

Die genomische Anordnung der Gene, die für Zweikomponenten-System-Proteine in *H. pylori* codieren, ist in der Abb. 4 dargestellt.

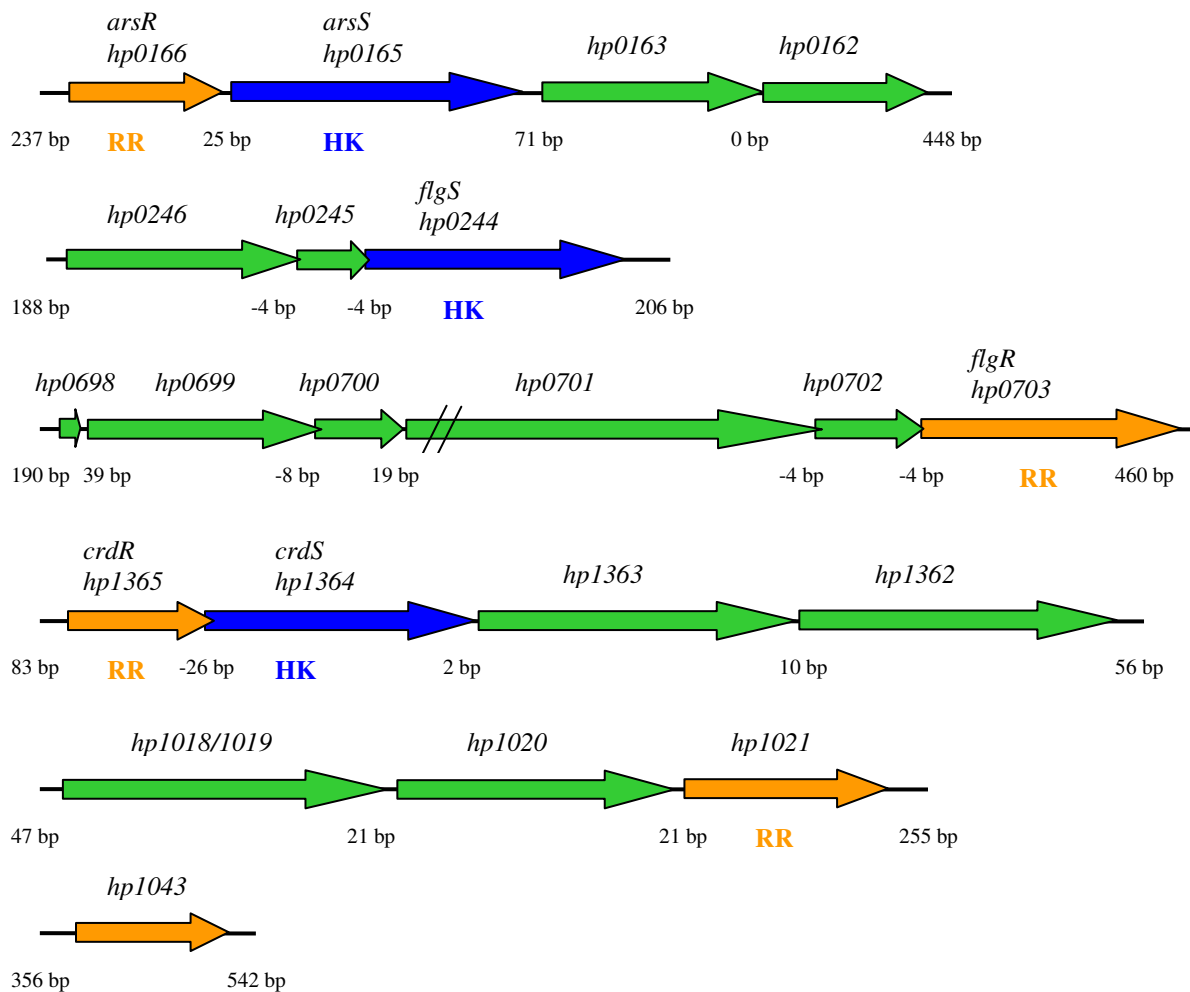


Abb. 4: Genomische Anordnung der ORFs, die für Zwei-Komponenten-System-Proteine in *H. pylori* codieren. Die Gene, die für Histidin-Kinasen (HK) codieren, sind in blau, die der Response-Regulatoren (RR) sind in orange eingezeichnet.

Basierend auf strukturellen und funktionellen Homologien wurde ein Paar von Zwei-Komponenten-System-Proteinen (HP0329/HP1067) als das CheA/CheY Zwei-Komponenten-System identifiziert, welches an Chemotaxis beteiligt ist (Beier et al., 1997; Jiménez-Pearson et al., 2005; Tomb et al., 1997). Die übrigen Zwei-Komponenten-System-Proteine sind an der Transkriptionsregulation beteiligt.

Anhand von *in vitro*-Phosphorylierungs-Experimenten konnte gezeigt werden, dass es sich bei der NtrB-artigen HK HP0244 (381 AS) und dem RR HP0703 (382 AS), trotz der Lokalisierung der Gene in zwei verschiedenen Operonen an unterschiedlichen Stellen des bakteriellen Chromosoms (vgl. Abb. 4), um ein funktionelles Zwei-Komponenten-System handelt (Beier und Frank, 2000). Es wird basierend auf der Genomannotation postuliert, dass die HK HP0244, die entsprechend der Einteilung von Fabret et al., 1999 der Klasse IIIB der HK zugeordnet wird, die einzige transkriptions-regulatorische cytoplasmatische HK in *H. pylori* ist (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999). *In vitro* ist es möglich, sowohl die HK HP0244 als auch den RR HP0703 zu deletieren (Spohn und Scarlato, 1999a; Beier und Frank, 2000), für die Kolonisierung eines Tiermodells *in vivo* ist das Vorhandensein einer funktionsfähigen HK HP0244 jedoch essentiell (Panthel et al., 2003). Die mangelnde Fähigkeit der HK HP0244-Deletionsmutante, den Magen von Mäusen zu kolonisieren, ist vermutlich auf die nicht vorhandene Motilität dieser Mutanten zurückzuführen. Zusammen

mit dem Sigma-Faktor σ^{54} reguliert der RR HP0703 die Transkription von verschiedenen Genen, die für Flagellenbestandteile codieren, weshalb er auch als FlgR (flagellum regulator) bezeichnet wird (Spohn und Scarlato, 1999a; Beier und Frank, 2000; Niehus et al., 2004; Brahmachary et al., 2004; Wen et al., 2009). Der Reiz, der die HK HP0244 aktiviert, ist nicht bekannt. Kürzlich wurde postuliert, dass die HK HP0244 Veränderungen des cytoplasmatischen pH-Wertes registriert und daraufhin bei einem sauren cytoplasmatischen pH-Wert unabhängig vom RR FlgR die Transkription von Genen aktiviert, die an der Säureresistenz von *H. pylori* beteiligt sind (Wen et al., 2009). Diese These bleibt jedoch spekulativ, da zum einen bisher neben dem RR FlgR kein Response-Regulator als Interaktionspartner der HK HP0244 identifiziert wurde (Beier und Frank, 2000) und zum anderen die von Wen und Kollegen postulierte HP0244 vermittelte Transkriptionsinduktion des *ureA* Gens bei einem pH-Wert von 4,5 in einer anderen Studie bei einem pH-Wert von 5 nicht beobachtet werden konnte (Loh und Cover, 2006).

Ein weiteres Zweikomponenten-System besteht aus der HK HP1364 und dem RR HP1365. Eine direkte Interaktion der HK mit dem RR konnte in *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten bisher nicht nachgewiesen werden, dies ist jedoch auf die nicht vorhandene Autophosphorylierungsfähigkeit der aufgereinigten Transmitterdomäne der HK HP1364 zurückzuführen. Da die Gene, die für den RR HP1365 und die HK HP1364 codieren, benachbart im bakteriellen Genom vorliegen (vgl. Abb. 4) und ihre Transkription innerhalb eines Operons reguliert wird, kann man davon ausgehen, dass es sich um die korrespondierenden Bestandteile eines funktionalen Zweikomponenten-Systems handelt (Beier und Frank, 2000). Bei der HK HP1364 (397 AS) handelt es sich um eine membranständige HK mit zwei Transmembrandomänen, die der Klasse IIIA der HK zugeordnet wird. Der RR HP1365 wird aufgrund der Sequenz der DNA-bindenden Outputdomäne den OmpR-artigen RR zugeordnet (Tomb et al., 1997). Interessanterweise ist im Genom von *H. pylori* J99 zusätzlich zu dem entsprechend homologen *hp1364-hp1365*-Lokus noch eine zusätzliche Genkopie des Regulorgens *hp1365* an einem weiteren Locus vorhanden (Alm et al., 1999). *In vitro* ist es möglich, sowohl eine Deletion der HK HP1364 als auch des RR HP1365 durchzuführen, bei den Target-Genen dieses Zweikomponenten-Systems handelt es sich somit nicht um essentielle Gene für das Wachstum *in vitro* (Beier und Frank, 2000). Diese Deletionsmutanten sind jedoch nicht in der Lage, im Tiermodell den Magen von Mäusen zu kolonisieren (Panthel et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass das HP1364/HP1365 Zweikomponenten-System in der Lage ist, die vorhandene Cu^{2+} -Konzentration als einen Umweltreiz wahrzunehmen. Cu^{2+} wird von den Bakterien als Kofaktor verschiedener Enzyme wie Oxidasen und Hydroxylasen sowie als Bestandteil von Elektronentransportketten benötigt (Malmström und Leckner, 1998; McGuirl und Dooley, 1999) und vermutlich unspezifisch von der *H. pylori*-Zelle aufgenommen (van Vliet et al., 2001). Um sich jedoch vor zu hohen intrazellulären Kupfer-Konzentrationen zu schützen, welche die Bildung von toxischen Hydroxylradikalen über Fenton-ähnliche Reaktionen katalysieren kann (Miller und Britigan; 1997), ist *H. pylori* in der Lage, über ein Cze-ähnliches Metalltransportsystem, welches aus den Kupfer Resistenz Determinanten CrdAB-CzbBA (codiert durch das Operon *hp1326-hp1327-hp1328-hp1329*) gebildet wird, überschüssige Cu^{2+} -Ionen aus der Zelle zu exportieren (Waidner et al., 2002b). In Anwesenheit von Kupfer wird das HP1364/HP1365 Zwei-Komponentensystem aktiviert, der RR HP1365 induziert die Transkription des *crdA-crdB-czcB-czcA*-Operons, indem er an die Sequenz AACACC-ATTT-CCACAA-TTTT direkt stromaufwärts der -35-Region im Promotor P_{crdA} bindet. Das HP1364/HP1365 Zweikomponenten-System wird deshalb auch als CrdRS-(Copper-Resistant-Determinant-Regulatory-System) bezeichnet (Waidner et al., 2005). Es wurde auch postuliert, dass das CrdRS Zweikomponenten-System an der

Säurewahrnehmung und der folgendenden bakteriellen Anpassung durch Expressionsinduktion von Säureresistenzgenen beteiligt ist (Loh und Cover, 2006).

Den beiden RR HP1021 (299 AS) und HP1043 (224 AS) kann keine korrespondierende HK zugeordnet werden, weshalb sie auch als „orphan“ RR bezeichnet werden (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999; Beier und Frank, 2000). Eine Deletion des RR HP1043 ist nicht möglich, dieser Response-Regulator ist somit vermutlich an der Transkription von für das Wachstum der Bakterienzelle essentiellen Target-Genen beteiligt (Beier und Frank, 2000). Eine Deletion des RR HP1021 bewirkt ein Wachstumsdefizit der Mutanten, dessen Phänotyp, der auch als „small-colony“ Phänotyp bezeichnet wird, je nach untersuchtem *H. pylori* Stamm unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Es konnte ein stark verlangsamtes Wachstum der Mutanten beobachtet werden oder es wurden aufgrund einer Wachstumsarrettierung nicht passagierbare Kolonien erhalten (MacDaniel et al., 2001; Beier und Frank, 2000; Pflock et al., 2004).

Das Gen *hp1021* wird als letzter ORF des Operons *htrA(hp1018/hp1019)-hp1020-hp1021* transkribiert (vgl. Abb. 4), *htrA* codiert für eine Serin-Protease und *hp1020* für ein hypothetisches Protein. Unter sauren pH-Bedingungen kann eine verstärkte Transkription ausgehend von dem Promotor P_{htrA} beobachtet werden (Merrell et al., 2003a), diese Transkriptionsinduktion ist unabhängig vom ArsRS Zweikomponenten-System (vgl. unten; Pflock et al., 2004; 2006). Aufgrund von fehlenden Homologien in der DNA-bindenden Domäne des RR HP1021 zu den Outputdomänen anderer RR kann HP1021 nicht in eine bestimmte Klasse von RR eingeteilt werden. Aufgrund eines vorhandenen Helix-Turn-Helix-Motivs in der Outputdomäne kann man jedoch postulieren, dass es sich bei HP1021 um einen DNA-bindenden Transkriptionsregulator handelt. In der Receiverdomäne des RR HP1021 liegen Abweichungen von der Konsensussequenz vor, der normalerweise hochkonservierte Aspartatrest D57 (bezogen auf die Sequenz von CheY aus *E. coli*) ist substituiert durch ein Serin (Tomb et al., 1997; Alm et al., 1999). Ein Aminosäureaustausch des Serins S57 oder des benachbarten Serins S58 hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum, diese beiden AS haben somit vermutlich keine essentielle Rolle als putative Phosphorylierungsstellen für die Aktivität des RR. Es konnte gezeigt werden, dass der RR HP1021 in der Anwesenheit von Acetylphosphat als Phosphatgruppendedonator nicht phosphoryliert wird (Schär et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität des RR HP1021, abweichend von dem bekannten Zweikomponenten-System Paradigma, unabhängig von einer Phosphorylierung reguliert wird. Das Regulon des RR HP1021 wurde kürzlich identifiziert, eine differentielle Transkription von 79 Genen in einer HP1021 Deletionsmutante im Vergleich zum WT wurde beschrieben (Pflock et al., 2007). Unter den Genen, deren Transkription durch den RR HP1021 reguliert wird, befinden sich die Gene *nifS* und *nifU*, deren Produkte an der Bildung von Fe-S-Clustern beteiligt sind. Weiterhin wird dem RR HP1021 eine Funktion beim Aceton-Metabolismus zugeordnet, da es sich bei den in den beiden Operonen *hp0690-hp0691-hp0692-hp0693* und *hp0695-hp0696-hp0697* vorliegenden Target-Genen um ORFs handelt, deren Produkte (Acetyl-CoA Acetyltransferase, Succinyl-CoA-Transferase UE A und B, UE α , γ und β einer Acetondecarboxylase) an der Verstoffwechslung von Aceton zu Acetyl-CoA beteiligt sein könnten. Die Umwandlung erfolgt vermutlich über die Zwischenprodukte Acetoacetat und Acetoacetyl-CoA. Eine Succinyl-CoA:Acetoacetat-CoA-Transferase-Aktivität konnte in *H. pylori*-Lysaten bereits nachgewiesen werden (Corthésy-Theulaz et al., 1997). Interessanterweise sind 19 der identifizierten HP1021-Target-Gene ebenfalls Bestandteil des ArsRS-Regulons.

Das Gen *hp1043*, welches für den „orphan“ RR HP1043 codiert, wird monocystronisch ausgehend von dem Promotor P_{hp1043} transkribiert. Aufgrund der AS-Sequenz der C-terminalen Outputdomäne (11 kDa) wird der RR in die Familie der OmpR-artigen RR eingeordnet. In der N-terminalen Receiver-Domäne (14 kDa) sind Abweichungen von der

Konsensussequenz der RR zu beobachten. Der konservierte Aspartatrest D8 (= D13 bezogen auf die Sequenz von CheY von *E. coli*) ist substituiert durch ein Lysin, an der benachbarten Position 9 (= D14 bezogen auf die Sequenz von CheY von *E. coli*), an welcher in der Konsensussequenz entweder eine negativ geladene AS oder die positiv geladene AS Histidin vorhanden ist, befindet sich ein Asparagin. Von CheY aus *E. coli* ist bekannt, dass eine Mutation D13K zu einem konstitutiv aktiven Regulator führt (Bourret et al., 1993). Durch AS-Austausch an den Positionen K8N9 konnte in *H. pylori* gezeigt werden, dass die Abweichungen von der Konsensussequenz nicht verantwortlich sind für die essentielle Funktion des RR HP1043 (Schär et al., 2005). Durch AS-Alignment des RR HP1043 mit den Sequenzen orthologer Proteine aus den nahe verwandten Arten *H. hepaticus*, *Wolinella succinogenes* und *Campylobacter jejuni* (Parkhill et al., 2000; Baar et al., 2003; Suerbaum et al., 2003) konnte eine vier AS umfassende Deletion in der Receiverdomäne des RR HP1043 detektiert werden, welche die normalerweise hochkonservierte Phosphorylierungsstelle Aspartat (D57 bezogen auf die Sequenz von CheY aus *E. coli*) umfasst. Aufgrund dieser Deletion gelangt formal ein potentiell phosphorylierbarer Serinrest an die Position der Phosphorylierungsstelle, welchem direkt ein Aspartatrest folgt. *In vitro* Phosphorylierungsexperimente ergaben jedoch, dass eine Phosphorylierung des RR HP1043 in Gegenwart von Acetylphosphat nicht möglich ist (Schär et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität des RR HP1043, wie auch für HP1021 beschrieben, nicht durch eine Phosphorylierung reguliert wird und HP1043 vermutlich im nicht phosphorylierten Zustand die Transkription von Target-Genen reguliert. Es wurde aufgrund von DNA-Bindestudien postuliert, dass der RR HP1043 die Transkription ausgehend von dem Promotor P_{tlpB} und seinem eigenem Promotor P_{hp1043} aktiviert und somit autoregulatorsich wirksam ist. *tlpB* codiert für das Methyl-akzeptierendes Chemotaxisprotein TlpB. HP1043 bindet *in vitro* auch in Abwesenheit von Acetylphosphat an eine 29 bp Nukleotidsequenz im Promotorbereich beider Gene, welche die Konsensussequenz ATTAxTxTxTxxTTAAxxxxAxxTxAA enthält. Hierbei handelt es sich um eine imperfekte invertierte Sequenzwiederholung, welche eine Bindung des RR als Dimer erlauben würde und welche mit der -35 Region der Promotorelemente überlappt (Delany et al., 2002b). Der RR HP1043 liegt als Dimer vor, die Dimerisierung erfolgt über eine Dimerisierungsdomäne am N-terminus der Receiverdomäne (Delany et al., 2002b; Lee HM et al., 2006; Hong et al., 2007). Über Kristallstruktur Analysen wurde die Struktur des RR HP1043 analysiert. Der RR HP1043 liegt nicht phosphoryliert als stabiles Dimer vor, jedes Monomer besteht aus 12 β -Faltblättern und 8 α -Helices, die Struktur ähnelt den bisher bekannten Strukturen von Proteinen, die der Gruppe der OmpR-artigen RR angehören. Eine Besonderheit des RR HP1043 ist, dass die Struktur der Interaktionsfläche zwischen den beiden Dimer-UE, welche durch α -Helix4- β -Faltblatt5- α -Helix5 gebildet wird, der Struktur der aktiven phosphorylierten Form der RR ArcA (Toro-Roman et al., 2005) und PhoB (Bachhavat et al., 2005) ähnelt. Diese Röntgenkristallanalysen bekräftigen die Vermutung, dass die Aktivität des RR HP1043 als Transkriptionsregulator phosphorylierungsunabhängig ist (Hong et al., 2007).

Das am besten charakterisierte Zwei-Komponentensystem aus *H. pylori* besteht aus der HK HP0165 (428 AS; HP0165/HP0164 basierend auf der Genomannotation von Tomb et al., 1997; die beiden Gene *hp0165* und *hp0164* wurden ursprünglich aufgrund eines Sequenzierungsfehlers, welcher zu einer Leserahmenverschiebung führte, als 2 unabhängige ORFs deklariert, tatsächlich bilden sie jedoch ein Gen, welches im folgenden als *hp0165*, das Protein entsprechend als HP0165 bezeichnet wird) und dem RR HP0166 (324 AS). Über *in vitro* Phosphorylierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine Bestandteile eines funktionalen Zweikomponenten-Systems sind (Beier und Frank, 2000). Die beiden Gene *hp0166* und *hp0165* sind Bestandteil des Operons *hp0166-hp0165-hp0163-hp0162* und werden ausgehend von dem Promotor P_{hp0166} transkribiert (vgl. Abb. 4). Die

orthodoxe, membranständige HK HP0165 besitzt zwei TMD und wird der Klasse IIIA der HK, entsprechend der Einteilung von Fabret et al., 1999, zugeordnet. Bei dem RR HP0166 handelt es sich um einen OmpR-artigen RR. Eine Deletion der HK HP0165 *in vitro* ist möglich (Beier und Frank, 2000), *in vivo* ist eine solche Deletionsmutante jedoch unfähig, den Magen von Mäusen zu kolonisieren (Panthel et al., 2003). Die Deletion des RR HP0166 *in vitro* ist nicht möglich (Beier und Frank, 2000). Eine Deletion des wildtypischen *hp0166* Gens ist jedoch dann möglich, wenn zuvor das Allel *hp0166*-D52N in das bakterielle Chromosom integriert wurde. Dieses codiert für den RR HP0166-D52N, an welchem der konservierte Asparatrest D52 (= D57 bezogen auf die Sequenz von CheY von *E. coli*), welcher für die Phosphorylierung des RR durch die HK benötigt wird, durch ein nicht phosphorylierbares Asparagin substituiert wurde. HP0166-D52N kann nicht mehr phosphoryliert werden (Schär et al., 2005). Der RR HP0166 in seiner nicht phosphorylierten Form ist somit essentiell für das Wachstum der *H. pylori* Zelle. Es wurde postuliert, dass von dem RR HP0166 mindestens zwei Klassen von Target-Genen reguliert werden müssen. Einmal Gene, deren Transkription von dem phosphorylierten RR HP0166~P reguliert wird, und einmal Gene, deren Transkription von dem nicht phosphorylierten RR HP0166 reguliert wird. Unter den Target-Genen des nicht phosphorylierten RR HP0166 muss sich mindestens ein Gen befinden, dessen Expression essentiell für *H. pylori* ist. Die HK HP0165 ist in der Lage, Säure als einen Umweltreiz wahrzunehmen (Pflock et al., 2004), der phosphorylierte RR HP0166 reguliert daraufhin säureabhängig die Transkription verschiedener Gene, darunter Gene, deren Produkte an der Aufrechterhaltung der pH-Homöostase beteiligt sind wie die Gene des Urease-Genclusters *ureAB*, *ureIEFGH*, die der Amidasen *amiE* und *amiF* (Pflock et al., 2005) sowie evtl. *hp1186*, welches für die α -Carbonatanhydrase codiert (Wen et al., 2007) und weitere Gene, wie *sabA*, welches für das Adhäsin SabA codiert (Goodwin et al., 2008). Das HP0165/HP0166 Zweikomponenten-System wird deshalb auch als ArsRS Zweikomponenten-System bezeichnet (acid responsive signalling regulatory system). Das komplette säureabhängige ArsRS-Regulon wurde identifiziert, in *H. pylori* G27 wird säureabhängig die Transkription von 109 Genen durch den phosphorylierten RR HP0166~P reguliert, die Transkription von 74 Genen wird induziert und von 34 Genen reprimiert (Pflock et al., 2005). Auch in *H. pylori* J99 wurde das säureregulierte ArsRS-Regulon analysiert (Loh und Cover, 2006), es sind jedoch nur wenige Überschneidungen mit dem zuvor in *H. pylori* G27 definierten ArsRS-Regulon vorhanden, was evtl. auf stammspezifische Unterschiede in der Transkriptionsregulation durch den RR ArsR zurückzuführen ist. Eine direkte Interaktion des phosphorylierten RR ArsR~P mit den Promotoren P_{hp0166} (deutet auf negative Autoregulation hin), P_{hp0119} , P_{hp1408} (Dietz et al., 2002), P_{ureA} , P_{ureI} (Pflock et al., 2005), P_{amiE} , P_{amiF} (Pflock et al., 2006), P_{hp0871} und P_{hp1186} (Wen et al., 2006) konnte über Footprint-Experimente nachgewiesen werden, jedoch konnte innerhalb der geschützten Bereiche kein Sequenzmotiv als allgemeines ArsR~P Bindemotiv identifiziert werden, welches in allen untersuchten Promotorregionen vorhanden ist. Ähnliche Bindesequenzen weisen zum einen die Promotoren P_{hp0119} und P_{hp1408} , in welchen 17 von 27 bp konserviert sind (AAACxxATCxxTTxAxxAxxxATTxAAT) und zum anderen die Promotoren P_{hp0871} und P_{hp1186} , in welchen 28 von 45 bp übereinstimmen (Wen et al., 2006). Interessanterweise konnten die von Wen et al., identifizierten Target-Gene *hp1186* und *hp0871-hp0866* in keiner der beiden zuvor durchgeführten Studien von Pflock et al., 2006 und Loh und Cover, 2006 als säureabhängig, durch das ArsRS Zweikomponenten-System reguliert, beobachtet werden. An einige Promotorbereiche von Genen, die Bestandteil des ArsRS-Regulons sind und deren Transkription somit durch den phosphorylierten RR ArsR~P reguliert wird, konnte auch eine Bindung des nicht phosphorylierten RR ArsR beobachtet werden, z. B. an den Promotoren P_{hp0119} und P_{hp1408} (Dietz et al., 2002), P_{hp0682} (Transkription von *hp0682-hp0681*, codieren für hypothetische Proteine), P_{hp1288} (Transkription von *hp1288-hp1289*, orthologe Gene zu *hp0682-hp0681*), P_{ureI} , P_{hp0485} (Transkription von *hp0485*, codiert für ein Katalase ähnliches

Protein) und weitere (Wen et al., 2006). Falls es sich bei diesen *in vitro* Protein-DNA-Interaktionen nicht um ein *in vitro* Artefakt handelt, indem der nicht phosphorylierte RR ArsR in hoher Konzentration an ArsR~P Bindestellen bindet, so muss man davon ausgehen, dass Gene vorhanden sind, deren Transkription sowohl durch den nicht phosphorylierten als auch durch den phosphorylierten RR ArsR reguliert wird. Auch unter diesen Genen könnten sich essentielle Target-Gene des nicht phosphorylierbaren RR ArsR befinden. Gene, deren Transkription allein durch den nicht phosphorylierten RR ArsR reguliert wird, sind bisher noch nicht identifiziert.

3. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Zweikomponenten-Systeme ArsRS und CrdRS sowie die beiden „orphan“ Response-Regulatoren von *H. pylori* näher zu charakterisieren.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Histidin-Kinase ArsS und ihre Orthologen aus den nahe verwandten Arten *H. hepaticus*, *W. succinogenes* und *C. jejuni* funktionell charakterisiert werden. Das ArsRS Zweikomponenten-System ist an der Säureregulation in *H. pylori* beteiligt. Bei sauren pH-Bedingungen wird der RR ArsR durch die aktivierte Histidin-Kinase ArsS phosphoryliert und reguliert die Transkription von Target-Genen, darunter auch die Gene, deren Produkte an der Ausbildung der Säureresistenz in *H. pylori* beteiligt sind. In dieser Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS analysiert werden. Es sollte auch untersucht werden, ob es sich bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS um eine spezifische Anpassung von *H. pylori* an sein saures Habitat handelt, oder ob Säure ein allgemeiner Stimulus für die Aktivierung von ArsS orthologen Histidin-Kinasen ist.

Weiterhin sollten die Mechanismen der Transkriptionsregulation durch den Response-Regulator ArsR näher beschrieben werden. Der phosphorylierte RR ArsR~P bindet an die DNA im Promotorbereich der ArsRS-Target-Gene und reguliert auf diese Weise deren Transkription. Mit Hilfe bioinformatischer Methoden konnte basierend auf den experimentell bestimmten Binderegionen im Promotorbereich der Gene *ureA*, *ureI*, *amiE*, *amiF* und *hp1408* eine Konsensussequenz (AN₉TN₃CN₇T) ermittelt werden, die auch stromaufwärts weiterer Target-Gene des phosphorylierten RR ArsR~P zu finden ist. Eine Bindung des phosphorylierten Response-Regulators ArsR an diese putativen Bindestellen sollte experimentell verifiziert werden. Da *arsR*, nicht jedoch *arsS*, ein essentielles Gen darstellt, muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der nicht phosphorylierte RR ArsR an der Transkriptionsregulation von essentiellen Target-Genen beteiligt ist. Es sollte das Regulon, welches unter der Kontrolle des unphosphorylierten RR ArsR steht, identifiziert werden. Unter diesen Target-Genen sollte sich folglich mindestens ein essentielles Gen befinden.

Neben dem ArsRS Zweikomponenten-System wurde auch für das CrdRS Zweikomponenten-System eine Funktion bei der Ausbildung der Säureresistenz in *H. pylori* J99 postuliert. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob neben dem ArsRS Zweikomponenten-System in *H. pylori* G27 auch das CrdRS Zweikomponenten-System an der Transkriptionsregulation von Genen beteiligt ist, deren Produkte zur Säureresistenz in *H. pylori* beitragen.

Es wurde postuliert, dass die Aktivität der beiden „orphan“ Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 vermutlich entgegen dem Zweikomponenten-System-Paradigma nicht über Phosphorylierung reguliert wird. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war zu analysieren, ob eine

strikte Expressionskontrolle dieser Response-Regulatoren ein möglicher Mechanismus ist, über den ihre Aktivität reguliert wird.

C. Material

1. Bakterienstämme

Tab. 4: Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz/ Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> -Stamm für effiziente Transformation; F-, Φ 80/ <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>supE44</i> , λ -, <i>tfi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Research Laboratories (BRL)
<i>E. coli</i> M15	<i>E. coli</i> -Stamm zur Klonierung in pQE-Vektoren und Überproduktion von His ₆ -tag Proteinen; trägt pREP4	Qiagen
<i>H. pylori</i> G27	Klinisches Isolat (TypI)	Xiang et al., 1995
<i>H. pylori</i> 26695	Klinisches Isolat (TypI)	Tomb et al., 1995
<i>W. succinogenes</i> DSMZ1740	Klinisches Isolat	Stephan Schuster
<i>C. jejuni</i> 4344	Klinisches Isolat	German <i>Campylobacter</i> and <i>Helicobacter</i> references laboratory, Freiburg
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> ::km	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, bei dem <i>arsS</i> durch eine Kan ^r -Kassette substituiert ist	Dagmar Beier
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H0	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H35Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H35Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H44Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H44Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H90Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H90Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H93Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H93Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H118Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H118Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H126Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H126Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H44A im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94R	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H44R im <i>arsS</i> -Lokus	M. Götz
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94,35AA	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94,35AA im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94,44AA	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94,44AA im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94,90AA	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94,90AA im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94,93AA	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94,33AA im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94,118AA	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94,118AA im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/ <i>arsS</i> -H94,126AA	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94,126AA im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit

Stamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz/ Herkunft
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H(36-126)Q	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H(36-126)Q im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AD60A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AD60A im <i>arsS</i> -Lokus	M. Götz
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AD66A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AD66A im <i>arsS</i> -Lokus	M. Götz
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AD107A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AD107A im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AD116A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AD60A im <i>arsS</i> -Lokus	M. Götz
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AD126A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AD126A im <i>arsS</i> -Lokus	M. Götz
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AE65A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AE65A im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AE75A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AE75A im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AE82A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AE82A im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AE101A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AE101A im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94AE117A	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -H94AE117A im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/arsS-ΔID	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält Fusion einer Cm ^r -Kassette an Allel <i>arsS</i> -ΔID im <i>arsS</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/HP165::km	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, bei dem <i>arsS</i> durch eine Kan ^r -Kassette substituiert ist	Beier und Frank, 2000
<i>H. pylori</i> G27/HH1607	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, das Gen <i>arsS</i> ist durch den ORF <i>hh1607</i> aus <i>H. hepaticus</i> substituiert	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/WS1818	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, das Gen <i>arsS</i> ist durch den ORF <i>ws1818</i> aus <i>W. succinogenes</i> substituiert	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/WS1818-H94Q	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, das Gen <i>arsS</i> ist durch das Allel <i>ws1818</i> -H94Q substituiert	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/Cj1262	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, das Gen <i>arsS</i> ist durch den ORF <i>cj1262</i> aus <i>C. jejuni</i> substituiert	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52N	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält zusätzlich Fusion des Promotors P _{cagA} mit dem Allel <i>arsR</i> -D52N integriert in den <i>cag</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52N	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, enthält zusätzlich Fusion des Promotors P _{hp0166} mit dem Allel <i>arsR</i> -D52N integriert in den <i>cag</i> -Lokus	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52NΔ	wie <i>H. pylori</i> 26695/P _{cagA} -ArsR-D52N, das wiltypische Gen <i>arsR</i> ist deletiert	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52NΔ	wie <i>H. pylori</i> 26695/P _{hp0166} -ArsR-D52N, das wiltypische Gen <i>arsR</i> ist deletiert	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> 26695/Δhp0650	Derivat von <i>H. pylori</i> 26695, des Gen <i>hp0650</i> ist deletiert	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/P _{pfr} 1021	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des Promotors P _{pfr} mit ORF <i>hp1021</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm ^r	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/P _{fecA} 1021Δ	wie <i>H. pylori</i> G27/P _{pfr} 1021, des wiltypische Gen <i>hp1021</i> ist deletiert; Cm ^r /Kan ^r	M. Pflock
<i>H. pylori</i> G27/P _{pfr} 1043	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des Promotors P _{pfr} mit ORF <i>hp1043</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm ^r	M. Pflock

Stamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz/ Herkunft
<i>H. pylori</i> G27/P _{fecA} 1043	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, enthält Fusion des Promotors P _{fecA} mit ORF <i>hp1043</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm ^r	M. Pflock
<i>H. pylori</i> G27/P _{fecA} 1043Δ	wie <i>H. pylori</i> G27/P _{fecA} 1043, des wildtypische Gen <i>hp1043</i> ist deletiert; Cm ^r /Kan ^r	M. Pflock diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/cj0355	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich Fusion des Promotors P _{cj0355} mit ORF <i>cj0355</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm ^r	diese Arbeit
<i>H. pylori</i> G27/P ₁₀₄₃ cj0355	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich Fusion des Promotors P ₁₀₄₃ mit ORF <i>cj0355</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm ^r	Jennifer Schär
<i>H. pylori</i> G27/P _{cagA} cj0355	Derivat von <i>H. pylori</i> G27, enthält zusätzlich Fusion des Promotors P _{cagA} mit ORF <i>cj0355</i> integriert in den <i>cag</i> -Lokus; Cm ^r	Jennifer Schär
<i>H. pylori</i> G27/HP1364::km	Derivat von <i>H. pylori</i> G27 bei dem das <i>crdS</i> -Gen durch eine Kan ^r -Kassette substituiert ist	Beier und Frank, 2000
<i>H. pylori</i> G27/crdRS::km	Derivat von <i>H. pylori</i> G27 bei dem das Gen <i>crdS</i> sowie der 5'-Bereich des Gens <i>crdS</i> , der für die ersten 48 AS der HK codiert, durch eine Kan ^r -Kassette substituiert sind	Beier und Frank, 2000
<i>E. coli</i> DH5α:pGEX-ArsS	<i>E. coli</i> DH5α:enthält Plasmid pGEX-ArsS zur Überexpression des Proteins ArsS	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α:pGEX-HH1607	<i>E. coli</i> DH5α: enthält Plasmid pGEX-HH1607 zur Überexpression des Proteins HH1607	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α:pGEX-WS1818	<i>E. coli</i> DH5α: enthält Plasmid pGEX-WS1818 zur Überexpression des Proteins WS1818	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α:pGEX-CJ1262	<i>E. coli</i> DH5α: enthält Plasmid pGEX-CJ1262 zur Überexpression des Proteins CJ1262	diese Arbeit
<i>E. coli</i> M15:pQE-HH1608	<i>E. coli</i> M15: enthält Plasmid pQE-HH1608 zur Überexpression des Proteins HH1608	diese Arbeit
<i>E. coli</i> M15:pQE-WS1817	<i>E. coli</i> M15: enthält Plasmid pQE-WS1818 zur Überexpression des Proteins WS1818	diese Arbeit
<i>E. coli</i> M15:pQE-CJ1261	<i>E. coli</i> M15: enthält Plasmid pQE-CJ1261 zur Überexpression des Proteins CJ1261	diese Arbeit

2. Vektoren und rekombinante Plasmide

Tab. 5: Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und rekombinante Plasmide.

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Referenz
pSL1180	„high copy number“ Klonierungsvektor, Derivat von pUC118, Amp ^r	Amersham Biosciences Qiagen
pQE30	Expressionsvektor zur Überproduktion von Proteinen mit N-terminalem His ₆ -tag; Amp ^r	Amersham Biosciences
pGEX-3X	GST Genfusion und Expressionsvektor, Amp ^r	B. Aricó Wang und Taylor, 1990
pVac :kan pDT2584	Enthält Kanamycin-Resistenz-Kassette Enthält das Chloramphenicol-Resistenz-Gen von <i>C. coli</i>	diese Arbeit
pSL-arsSID	Derivat von pSL1180, enthält 5' Bereich des Gens <i>arsS</i> , der für die TMD1, die periplasmatische Sensordomäne und die TMD2 codiert	diese Arbeit

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Referenz
pSL-arsSID-H35Q	wie pSL-arsSID; enthält <i>arsSID</i> mit der Mutation H35Q	diese Arbeit
pSL-arsSID-H44Q	wie pSL-arsSID; enthält <i>arsSID</i> mit der Mutation H44Q	diese Arbeit
pSL-arsSID-H90Q	wie pSL-arsSID; enthält <i>arsSID</i> mit der Mutation H90Q	diese Arbeit
pSL-arsSID-H93Q	wie pSL-arsSID; enthält <i>arsSID</i> mit der Mutation H93Q	diese Arbeit
pSL-arsSID-H94Q	wie pSL-arsSID; enthält <i>arsSID</i> mit der Mutation H94Q	diese Arbeit
pSL-arsSID-H118Q	wie pSL-arsSID; enthält <i>arsSID</i> mit der Mutation H118Q	diese Arbeit
pSL-arsSID-H126Q	wie pSL-arsSID; enthält <i>arsSID</i> mit der Mutation H126Q	diese Arbeit
pSL-arsSTD	Derivat von pSL1180, enthält Sequenzen, die sich von den Genen <i>arsR</i> , <i>arsS</i> und <i>hp0163</i> ableiten, Cm ^r	diese Arbeit
pSL-arsS-H0	Derivat von pSL1180, enthält Sequenzen, die sich von den Genen <i>arsR</i> und <i>hp0163</i> ableiten, trägt das Gen <i>arsS</i> , Cm ^r	diese Arbeit
pSL-arsS-H35Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H35Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H44Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H44Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H90Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H90Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H93Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H93Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H94Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H118Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H118Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H126Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H126Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H(35-126)Q	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H(35-126)Q	diese Arbeit
pSL-arsS-H94AD60A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AD60A	Monika Götz
pSL-arsS-H94AD66A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AD66A	Monika Götz
pSL-arsS-H94AD107A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AD107A	diese Arbeit
pSL-arsS-H94AD116A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AD116A	Monika Götz
pSL-arsS-H94AD124A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AD124A	Monika Götz
pSL-arsS-H94AE65A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AE65A	diese Arbeit
pSL-arsS-H94AE75A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AE75A	diese Arbeit
pSL-arsS-H94AE82A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AE82A	diese Arbeit
pSL-arsS-H94AE101A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AE101A	diese Arbeit
pSL-arsS-H94AE117A	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -H94AE117A	diese Arbeit
pSL-arsSID-ΔID	Derivat von pSL1180, enthält Fragment, welches für die ersten x und die letzten y AS der periplasmatischen Sensordomäne sowie die TMD1 und TMD2 der HK ArsS codiert	Monika Götz
pSL-arsS-ΔID	wie pSL-arsS-H0, trägt das Allel <i>arsS</i> -ΔID	Monika Götz
pSL-1432PE	Derivat von pSL-1180, enthält den Promotorbereich und 5'-Bereich des Gens <i>hp1432</i>	Pflock et al., 1004
pSL-119PE2	Derivat von pSL1180, enthält ein 700 bp Fragment der Promotorregion und des 5'-Bereich des Gens <i>hp0119</i> aus <i>H. pylori</i> G27	Dietz et al., 2002
pGEX-ArsS	Derivat von pGEX, enthält fusioniert an <i>gst</i> ein Fragment, welches für die Transmitterdomäne der HK ArsS codiert	Dagmar Beier
pGEX-HH1607	Derivat von pGEX, enthält fusioniert an <i>gst</i> ein Fragment, welches für die Transmitterdomäne der HK HH1607 codiert	diese Arbeit
pGEX-CJ1262	Derivat von pGEX, enthält fusioniert an <i>gst</i> ein Fragment, welches für die Transmitterdomäne der HK CJ1262 codiert	diese Arbeit
pGEX-WS1818	Derivat von pGEX, enthält fusioniert an <i>gst</i> ein Fragment, welches für die Transmitterdomäne der HK WS1818 codiert	diese Arbeit

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Referenz
pQE-HH1608	Derivat von pQE-30 zur Überexpression des Fusionsproteins His ₆ -HH1607	diese Arbeit
pQE-WS1817	Derivat von pQE-30 zur Überexpression des Fusionsproteins His ₆ -WS1817	diese Arbeit
pQE-CJ1261	Derivat von pQE-30 zur Überexpression des Fusionsproteins His ₆ -CJ1261	diese Arbeit
pSL-arsR-hp063	Derivat von pSL1180, enthält Teile der ORFs <i>arsR</i> und <i>hp0163</i>	diese Arbeit
pSL-HH1607	wie pSL-arsR-hp0163, die Fragmente <i>arsR</i> und <i>hp0163</i> flankieren das Gen <i>hh1607</i> , Cm ^r	diese Arbeit
pSL-CJ1262	wie pSL-arsR-hp0163, die Fragmente <i>arsR</i> und <i>hp0163</i> flankieren das Gen <i>cj1262</i> , Cm ^r	diese Arbeit
pSL-WS1818	wie pSL-arsR-hp0163, die Fragmente <i>arsR</i> und <i>hp0163</i> flankieren das Gen <i>ws1818</i> , Cm ^r	diese Arbeit
pSL-WS1818-H92Q	wie pSL-arsR-hp0163, die Fragmente <i>arsR</i> und <i>hp0163</i> flankieren das Allel <i>ws1818-H92Q</i> , Cm ^r	diese Arbeit
pSL-cagACD-P _{cagA} -arsR-D52N-Cm ^r	Derivat von pSL-cagAD (Schär et al., 2005), enthält das Allel <i>arsR</i> -D52N fusioniert an den Promotor P _{cagA} und eine Cm ^r -Kassette	diese Arbeit
pSL-Δhp0650	Derivat von pSL1180, „knock out“-Plasmid für <i>hp0650</i> , enthält Fragmente, die Teile der ORFs <i>hp0649</i> und <i>hp0651</i> umfassen, die beiden Fragmente flankieren eine Kan ^r -Kassette	diese Arbeit
pSL-Δhp1582/hp1583	Derivat von pSL1180, „knock out“-Plasmid für <i>hp1582/hp1583</i> , enthält Fragmente, die Teile der ORFs <i>hp1581</i> und <i>hp1584</i> umfassen, die beiden Fragmente flankieren eine Kan ^r -Kassette	Sarah Schlosser
pSL-Δhp1224	Derivat von pSL1180, „knock out“-Plasmid für <i>hp1224</i> , enthält Fragmente, die Teile der ORFs <i>hp1223</i> und <i>hp1225</i> umfassen, die beiden Fragmente flankieren eine Kan ^r -Kassette	Sarah Schlosser
pSL-Δhp0891	Derivat von pSL1180, „knock out“-Plasmid für <i>hp0891</i> , enthält Fragmente, die Teile der ORFs <i>hp0890</i> und <i>hp0892</i> umfassen, die beiden Fragmente flankieren eine Kan ^r -Kassette	Sarah Schlosser
pSL-P _{ppfr} -1021 cm	Derivat von pSL-cagAD (Schär et al., 2005), enthält den Promotor P _{ppfr} , das Gen <i>hp1021</i> und eine Cm ^r -Kassette	Simone Kennard
pSL-1043::km2	Derivat von pSL1180; „knock out“-Plasmid für <i>hp1043</i> ; enthält ein Fragment, das einen Teil des Gens <i>hp1044</i> codiert und ein Fragment, das einen Teil der intergenischen Region zwischen ORF <i>hp1043</i> und <i>hp1042</i> umfasst; Kan ^r	Schär et al., 2005
pSL-P _{fecA} -1043 cm	Derivat Derivat von pSL-cagAD (Schär et al., 2005), enthält das Gen <i>hp1043</i> fusioniert an den Promotor P _{fecA} und eine Cm ^r -Kassette	Michael Pflock
pSL-cj0355 cm	Derivat von pSL-cagAD (Schär et al., 2005), enthält den Promotor P _{cj0355} , das Gen <i>cj0355</i> und eine Cm ^r -Kassette	diese Arbeit

3. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (siehe Tab. 6) wurden von den Firmen Sigma ARK, MWG Biotech oder Metabion synthetisiert.

Tab. 6: Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

^aGroßbuchstaben: *H. pylori*, *C. jejuni* und *W. succinogenes*-Sequenzen

^aKleinbuchstaben: Sequenzen, die entweder für Klonierungszwecke angefügt wurden (Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen) oder zu Mutationszwecken geändert wurden

^bbezogen auf die Genomsequenz von *H. pylori*, *C. jejuni* bzw. *W. succinogenes* (Tomb et al., 1997; Parkhill et al., 2000; Baar et al., 2003)

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3') ^a	Schnittstelle	Strang	Position ^b
arsSID-5	gaata <u>ccccggg</u> TCTAATAAGGAGTTAAGGGGTT	<i>Sma</i> I	-	173774 -173753
arsSID-3	cactt <u>gagatct</u> TAACTCTCTTAAGGGCAATAAAA	<i>Bgl</i> II	+	173273 -173294
arsSTD-5	gagtt <u>aagatct</u> CAAGTGAAACGCTTCGCTCAAG	<i>Bgl</i> II	-	173266 -173246
arsSTD-3	cccttct <u>ctaga</u> CTCACTTCTCTCAAATTTTCG	<i>Xba</i> I	+	172460 -172480
arsR-5	tatggg <u>gaattc</u> GATTACCTCCCTAAACCCTATG	<i>Eco</i> RI	-	174167 -174146
arsR-3	ctcctt <u>ccggg</u> ATATCAGTATTCTAATTTATAA	<i>Sma</i> I	+	173775 -173796
0163-5	aattt <u>gctcag</u> GTGAGCGGAATGAAGGGGATAG	<i>Pst</i> I	-	172464 -172443
0163-3	agtgg <u>agactc</u> CATGATGGGCGTGTGGGTATAG	<i>Sac</i> I	+	171835 -171856
arsS-H35Q-1	GATAGTTTTCTtTGACTGATTTG	-	+	173641 -173662
arsS-H35Q-2	CAAATCAGTCAaGAAAACATC	-	-	173662 -173641
arsS-H44Q-1	CAAACCTGGTAfTGGCGCATTTTC	-	+	173614 -173635
arsS-H44Q-2	GAAATGCGCCAaTACCAGTTTG	-	-	173635 -173614
arsS-H90Q-1	GTGCAACTGtTGGCGTCTTTTG	-	+	173477 -173498
arsS-H90Q-2	CAAAAGACGCCAaCAGTTGCAC	-	-	173498 -173477
arsS-H93Q-1	ATTTCTGTGtTGCAACTGGTG	-	+	173468 -173488
arsS-H93Q-2	CACCAGTTGCAaCACAGAAAT	-	-	173488 -173468
arsS-H94Q-1	CCAATATTTCTtTGGTGCAACTG	-	+	173463 -173485
arsS-H94Q-2	CAGTTGCACCAaAGAAATATTGG	-	-	173485 -173463
arsS-H118Q-1	AAGCACAAAfTGCTCATCCTT	-	+	173393 -173413
arsS-H118Q-2	AAGGATGAGCAaTTTGTGCTT	-	-	173413 -173393

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3') ^a	Schnitt- stelle	Strang	Position ^b
arsS-H126Q-1	AGAAACCGAtTGCAAATCTTT	-	+	173369
				-173389
arsS-H126Q-2	AAAGATTTGCAaTCGGTTTCT	-	-	173389
				-173369
arsS-H94A-1	CCAATATTTCTGgcGTGCAACTG	-	+	173463
				-173485
arsS-H94A-2	CAGTTGCACgcCAGAAATATTGG	-	-	173485
				-173463
arsS-H94R-1	CCAATATTTCTGcGGTGCAA	-	+	173463
				-173482
arsS-H94R-2	CAGTTGCACCgCAGAAATATTGG	-	-	173485
				-173463
arsS-H35A-1	GATAGTTTTTCGgcACTGATTTG	-	+	173641
				-173662
arsS-H35A-2	CAAATCAGTgcCGAAAACATATC	-	-	173662
				-173641
arsS-H44A-1	CAAACGGTAAgcGCGCATTTTC	-	+	173614
				-173635
arsS-H44A-2	GAAATGCGCgcTTACCAGTTTG	-	-	173635
				-173614
arsS-H90A-1	GTGCAACTGGgcGCGTCTTTTG	-	+	173477
				-173498
arsS-H90A-2	CAAAGACGCgcCCAGTTGCAC	-	-	173498
				-173477
arsS-H93A-1	TATTTCTGTGGgcCAACTGGTG	-	+	173467
				-173488
arsS-H93A-2	CACCAGTTGgcCCACAGAAATA	-	-	173488
				-173467
arsS-H118A-1	AAGCACAAAgcCTCATCCTT	-	+	173393
				-173413
arsS-H118A-2	AAGGATGAGgcTTTTGTGCTT	-	-	173413
				-173393
arsS-H126A-1	AGAAACCGAAgcCAAATCTTT	-	+	173369
				-173389
arsS-H126A-2	AAAGATTTGgcTTCGGTTTCT	-	-	173389
				-173369
arsS-D60A-1	GGCTCTATAAgCAGAGTAGTT	-	+	173567
				-173587
arsS-D60A-2	AACTACTCTGcTTATAGAGCC	-	-	173587
				-173567
arsS-D66A-1	ATAGAGATAAgCTTCTATGGC	-	+	173549
				-173569
arsS-D66A-2	GCCATAGAAGcTTATCTCTAT	-	-	173569
				-173549
arsS-D107A-1	AAAAACCATtgCGCTGAATTT	-	+	173426
				-173446
arsS-D107A-2	AAATTCAGCGcTATGGTTTTT	-	-	173446
				-173426
arsS-D116A-1	AAAATGCTCAgCCTTTTTTAA	-	+	173399
				-173419
arsS-D116A-2	TTAAAAAAGGcTGAGCATTTT	-	-	173419
				-173399
arsS-D124A-1	CGAATGCAAAgCTTTATAAAG	-	+	173375
				-173395
arsS-D124A-2	CTTTATAAAGcTTTGCATTCG	-	-	173395
				-173375

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3') ^a	Schnitt- stelle	Strang	Position ^b
arsS-E65A-1	GAGATAATCTgCTATGGCTCT	-	+	173552
arsS-E65A-2	AGAGCCATAGcAGATTATCTC	-	-	-173572
arsS-E75A-1	TATTGTGGTTgCTCTAAAGCC	-	+	173522
arsS-E75A-2	GGCTTTAGAGcAACCACAATA	-	-	-173542
arsS-E82A-1	TAAAACCTTTgCTAAATTTTC	-	+	173501
arsS-E82A-2	GAAAATTTAGcAAAGGTTTTA	-	-	-173521
arsS-E101A-1	TTTAAACACTgCAGCATACCC	-	+	173444
arsS-E101A-2	GGGTATGCTGcAGTGTTTTAA	-	-	-173464
arsS-E117A-1	CACAAAATGCgCATCCTTTTT	-	+	173396
arsS-E117A-2	AAAAAGGATGcGCATTTTGTG	-	-	-173416
arsS-ΔID-1	ATTCCTATAAGAAACACTGATTTGAGAAG ACACGAA	-	+	173360
				-173374
				und
				173654
arsS-ΔID-2	TCTTCTCAAATCAGTGTCTTATAGGAAT TATTTCT	-	-	-173674
				173374
				-173353
				und
				173668
arsR-ext-5	CGGGCTTGAAGTGTGTAGGC	-	-	-173654
hp0163-ext-3	CTCGGCGCAGAATTGGCTAC	-	+	174279
hp0119-PE	TCATCATCATTGTTGCAAGC	-	+	-174260
hp1432-PE	CCGTAGTAATGGTGGTGGTGC	-	-	171767
ureA-PE	CATAGTGGAGCATCAAC	-	+	-171786
ArsS-E5	gataaaggatccAAGCAAAAAGATGAAATAGGG GATCTG	<i>Bam</i> HI	-	130723
ArsS-E3	tcccctctgcagCGCTCACTTCTCTCAAATTTTCG	<i>Pst</i> I	+	-130742
HH1607-E5	ttgactggatccAAAACACCAAAGATGAAATTGG GGAA	<i>Bam</i> HI	-	1502671
HH1607-E3	ctctctgaattcCTATTTTGGTTTTTTTATCAACAAG	<i>Eco</i> RI	+	-1502651
CJ1262-E5	tttctagatccAAGAAGATGAAGTAGGCAAGA	<i>Bam</i> HI	+	77911
CJ1262-E3	ccttttgaattcTTACCATTATTTTCTTTATCTCC A	<i>Eco</i> RI	-	-77927
WS1818-E5	ttcactggatccAAAACGATGAGATTGGTGAGC	<i>Bam</i> HI	+	173219
WS1818-E3	ctctctgaattcTCACTTCTCAACCACAACGCC	<i>Eco</i> RI	-	-173193

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3') ^a	Schnittstelle	Strang	Position ^b
HP0166-E5 = ER45	tgaagtggatccGAAGTTTTAATGATAGAAGATG ATATAG	<i>Bam</i> HI	-	174449 -174422
HP0166-E3 = ER43	cttattctgcagTCAGTATTCTAATTTATAACCAA TCC	<i>Pst</i> I	+	173778 -173803
WS1817-E5	ttcactggatccCTAGAGATTCTGATGATTGAGG	<i>Bam</i> HI	+	1711878 -1711899
WS1817-32	aaaaactgcagGTGCCACAGCAAAGAGAATCG	<i>Pst</i> I	-	1712611 -1712591
HH1608-E52	ttcactggatccTTAGAAGTTTTAATGATTGAAGA TG	<i>Bam</i> HI	-	1536061 -1536037
HH1608-E3	aaaaaactgcagTTATGTTTCAAG TTTATAGCCCACA	<i>Pst</i> I	+	1535384 -1535408
Cj1261E-5	acactaggatccATTAATGTGTTGATGATAGAAG ATG	<i>Bam</i> HI	+	1191791 -1191815
Cj1261E-3	aataatctgcagTCATCCTATCAGTTTATATCCTA TA	<i>Pst</i> I	-	1192459 -1192435
HH1607-5	aaatttccgggaaggagAGATTCTATGTTTCAATTT CG	<i>Sma</i> I	-	1535376 -1535356
HH1607-3	aaattttctagaCATAGATTCTCCTCTATTTTG	<i>Xba</i> I	+	1534097 -1534117
CJ1262-5	aaatttccgggaaggagTGATAGGATGACAAAAAAT TA	<i>Sma</i> I	+	1192449 -1192469
CJ1262-2	aaatttctgcagCAGGCCTTTTACCATTATTTT	<i>Pst</i> I	-	1193705 -1193685
WS1818-5	aaatttccgggaaggagCTCGACCATGACTAAAAAC TC	<i>Sma</i> I	+	1712553 -1712573
WS1818-3	aaattttctagaGAGAGAAAAGCCTCACTTCTC	<i>Xba</i> I	-	1713801 -1713781
WS1818-H92Q-1	TCCTTTGAATTGAGGATCGAT	-	-	1712845 -1712824
WS1818-H92Q-2	ATCGATCCTCAATTCAAAGGA	-	+	1712824 -1712845
HP0649-1	aagtcagaattcTGATCCCTGAAGTGGTCA	<i>Eco</i> RI	+	695588 -695605
HP0649-2	aagacgggatccATAAAGGGAGCGTAAAGT	<i>Bam</i> HI	-	696062 -696045
HP0651-1	gccttactgcagAACCCATCTCCTTATGGT	<i>Pst</i> I	+	696671 -696688
HP0651-2	attgatgagctcAAATACCTGCACACGCAC	<i>Sac</i> I	-	697207 -697190
Ppfr-5	aaatttggatccCCATGGTTAAATTGCCCTTTTCG	<i>Bam</i> HI	-	699573 -699552
Ppfr-3	aacataggtaccCCTTTGTGTTGGTTTAAGTTGTC C	<i>Kpn</i> I	+	699281 -699304
1021-52Kpn	ttagtcggtaccCATGTGAGCATGCGTTATAAA	<i>Kpn</i> I	+	1084078 -1084098
1021-3	caaaaactgcagAACAGGGCTTAAGGATTTTCT	<i>Pst</i> I	-	1085050 -1085030
1021-PE	ATTATGCGAAATACTCCTGGC	-	-	1084188 -1084168
cagC-seq	CTATATCTGGTTGGACATGG	-	-	580656 -580637
cagA-seq	GCTAACATAGCTATGGGTTGC	-	+	578813 -578833
1043-cag5	gtgcctggtaccCTCTTAAATGCAGGAGTCATAC ACC	<i>Kpn</i> I	-	1105441 -1105417

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3') ^a	Schnittstelle	Strang	Position ^b
1043-3	tatgac <u>ggtacc</u> ATTTAAGAGTAATTCAGGCAC	<i>Pst</i> I	+	1105433 -1105453
1043-PE	AAAGCCTTTAACATTTAAGCC	-	+	1105342 -1105362
Cj0355-3	gaaggt <u>ctgcag</u> TTGTTAAGATTTTTTAGGGAAG CA	<i>Pst</i> I	+	324160 -324183
cj0355-PE	TCAGAAGAATCGGTTTGATAACCA	-	+	324743 -324766
amiF-PE	AGGAAACTGAATGGCTGCC	-	-	1312221 -1312203
Cm-I	tttctctagaATTGCGTGATATAGATTG	<i>Xba</i> I		
Cm-II	caaactctgcagTTATTTATTCAGCAAGTCT	<i>Pst</i> I		
Cm-Pst-5	agctagctgcagATTGCGTGATATAGAATTG	<i>Pst</i> I		
Cm-3-Not	ttctaagcggccgCACGCACTACTCTCGACAGAG AG	<i>Not</i> I		
Cm-int-1	GAAATATCGAGTTTTACCGTCAT	-		
Cm-int-2	ATGTTTGCCGTTTTTTGGATGAA	-		
5'-Cm-Kas-PstI	agctagctgcagACGCACTACTCTCGACAG	<i>Pst</i> I		
3'-Cm-Kas-PstI	agctagctgcagATTGCGTGATATAGATTG	<i>Pst</i> I		

4. Proteine

Tab. 7: Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine.

Bezeichnung	Herkunft
Cj1261 (mit N-terminalem His ₆ -tag)	diese Arbeit
Cj1262 (mit N-terminalem GST-tag)	diese Arbeit
HH1607 (mit N-terminalem GST-tag)	diese Arbeit
HH1608 (mit N-terminalem His ₆ -tag)	diese Arbeit
HP0165 (mit N-terminalem GST-tag)	diese Arbeit
HP0166 (mit N-terminalem His ₆ -tag)	Jennifer Schär
WS1817 (mit N-terminalem His ₆ -tag)	diese Arbeit
WS1818 (mit N-terminalem GST-tag)	diese Arbeit

5. Antikörper

Tab. 8: Alle In dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Herkunft
anti-HP1021	Jennifer Schär
anti-HP1043	Isabel Delany und Enzo Scarlato
anti-HP0166	Jennifer Schär
anti-ureB	AUSTRAL Biologicals
goat-anti-rabbit	Dianova
goat-anti-mouse	Dianova

6. Verbrauchsmaterialien

6.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Serva, Sigma, Fluka, Roche und Oxoid bezogen. Die Nährmedien und der Agar wurden von den Firmen Difco und Gibco bezogen. Radiochemikalien lieferte die Firmen GE-Healthcare und Hartmann Analytik.

6.2 Enzyme

Polymerasen, Restriktionsendonukleasen, Ligasen und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden mit den zugehörigen Puffern von den Firmen Amersham Biosciences, Q-Biogene, Biorad, New England Biolabs, Promega, Roche, MBI Fermentas und OLS bezogen.

6.3 Sonstiges

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurden das „QIAquick-PCR-Purification-Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Plasmid Isolation im präparativen Maßstab aus einer 50 ml Übernachtskultur wurde mit Hilfe des Nucleobond-AX-Kit von Macherey & Nagel durchgeführt. RNA, die für MA-Analysen verwendet wurde, wurde nach der Isolation entsprechend dem Protokoll „RNA Cleanup“ mit dem RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

7. Wachstumsmedien und Zusätze

Die verwendeten Glasgeräte wurden für 3 h bei 180 °C trocken sterilisiert. Flüssigmedien und Agar wurden für 20 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wie z. B. Antibiotika wurden nach Abkühlen der Medien bzw. des Agars unter 50 °C als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben. Die Agarplatten wurden bei 4 °C und die Medien bei 4 °C bzw. RT gelagert.

7.1 Medien und Agarplatten für *E. coli*

LB-Medium: (Luria-Bertani)	Bactotrypton	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	dH ₂ O	ad 1 l

Lagerung bei RT

LB-Agar:	Bactotrypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	15 g
	dH ₂ O	ad 1 l

Lagerung bei 4 °C

7.2 Medien und Agarplatten für *H. pylori*

BHI-Medium (modifiziert):	Brain-Heart-Infusion	37 g
	dH ₂ O	ad 900 ml

Das Medium wird autoklaviert. Nach Abkühlen unter 50 °C werden 100 ml hitzeinaktiviertes FCS und 2,9 ml Antibiotika-Mix pro Liter Medium steril zugegeben.

Der **Antibiotika-Mix** setzt sich zusammen aus:

0,5 ml Vancomycin	Stocklösung 10 mg/ml in dH ₂ O Lagerung bei 4 °C
1 ml Trimethoprim	Stocklösung 10 mg/ml in N,N Dimethylformamid Lagerung bei 4 °C
0,6 ml Cefsulodin	Stocklösung 10 mg/ml in dH ₂ O Lagerung bei 4 °C
0,8 ml Amphotericin B	Stocklösung 10 mg/ml in Dimethylsulfoxid Lagerung bei -20 °C

Das mit FCS und Antibiotika supplementierte Medium wird bei 4 °C gelagert

Brucella-Medium:	Brucella Broth (Difco)	28 g
	dH ₂ O	ad 1 l

Lagerung bei RT

Medium für Glycerinkultur:	Brucella-Medium	80 ml
	steriles Glycerin	20 ml
	Endkonzentration Glycerin 20 %	

Lagerung bei RT

Columbia Blutagar:	Columbia Blood Agarbase (Gibco)	44 g
	dH ₂ O	940 ml

Der Agar wird autoklaviert. Nach Abkühlen auf unter 50 °C werden 5 % defibriniertes Pferdeblut, 2,9 ml Antibiotika-Mix und 1 ml Cycloheximid-Lösung (100 mg/ml in Aceton) steril zugegeben.

Lagerung bei 4 °C

7.3 sonstige Medien

SOB-Medium:	Bactotrypton	20 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	0,5 g

Nach dem Autoklavieren hinzugeben:	10 mM MgCl ₂	5 ml
	10 mM MgSO ₄	5 ml
	2 mM KCl	1,25 ml

SOC-Medium:	SOB-Medium	10 ml
	20 %ige Glukoselösung	200 µl

7.4 Medienzusätze

Den einzelnen Medien können je nach Bedarf verschieden Antibiotika zugegeben werden.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml in LB-Medium und –Agar
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in dH ₂ O	50 µg/ml in LB-Medium und –Agar 20 µg/ml in mod. BHI-Medium 20 µg/ml in Columbia-Agar
Chloramphenicol (Cm)	30 mg/ml in EtOH	30 µg/ml in LB-Medium und –Agar 20 µg/ml in mod. BHI-Medium 20 µg/ml in Columbia-Agar

8. Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gelelektrophorese

DAN Marker von MBI Fermentas:

1 kB-Leiter:

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

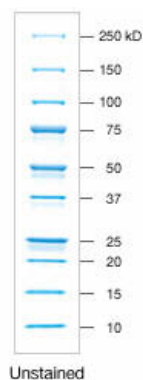
Fragmentlängen:	10000 bp	8000 bp	6000 bp	5000 bp	4000 bp
	3000 bp	2500 bp	2000 bp	1500 bp	1000 bp
	750 bp	500 bp	250 bp		

Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Es wurde der broad range Marker der Firma Biorad verwendet

Molekulargewichtsmarker für Western-Blot:

Abb. 5: Proteinmarker Precision Plus Protein™ All Blue Standard der Firma Bio-Rad auf einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel



9. Geräte

ÄKTA Prime:	GE-Healthcare
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:	Privileg
Magnetrührer:	Gerhardt; M32 von GLW
Microarrayscanner:	Perkin Elmer
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:	Eppendorf
Röntgenfilmentwickler:	Kodak M35 X-Omat Processor, Ecomax von Protec
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 Eppendorf 5417R
Tischzentrifugen:	Heraeus Biofuge 13 und 15 Eppendorf 5415 C

D. Methoden

1. Arbeiten mit Bakterien

Die hier beschriebenen Methoden gelten explizit nur für die verwendeten Wildtypstämme. Für die verschiedenen Mutanten müssen den Platten und dem Flüssigmedium die entsprechenden Selektionsantibiotika zugegeben werden.

1.1 Anzucht von *H. pylori* 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. Nach zwei bis drei Tagen 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 ein bis zwei Tage unter mikroaerophilen Bedingungen im Anaerobiertopf bei 37 °C inkubiert.

1.2 Anzucht von *H. pylori* in Flüssigkultur

Bakterien, die zwei Tage zuvor aus einer Glycerinkultur auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen wurden, werden in 1 ml modifiziertem BHI-Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wird nun in ein Grainerröhrchen, das 40 ml vorgewärmtes modifiziertes BHI-Medium enthält, 400 µl Zellmaterial gegeben. 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 OD₅₉₀ von 0,6-1,0 wird die Bakterienkultur in ein 50 ml Grainerröhrchen überführt und abzentrifugiert (5100-6000 rpm, 4 °C, 8 min). Werden die Bakterien für RNA-Isolierung verwendet, dann enthält das Grainerröhrchen 2 ml EtOH und 125 µl Phenol und wird auf -20 °C vorgekühlt. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand 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. Es kann ein Urease-Test und/oder ein LB-test durchgeführt werden.

Beim Urease-Test wird ca. 1 ml Flüssigkultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap pipettiert. Die Zellen werden für 3 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wird abgenommen. Zu dem verbliebenem Pellet werden 1 ml 3 mM Phosphatpuffer, 15,6 µl 7 M Harnstoff und 1,75 µl (4 mg/ml) Phenolrot gegeben und die Lösungen mit dem Pellet durch Vortexen vermischt. Mit diesem Test wird die Aktivität des Enzyms Urease, das von *H. pylori* sezerniert wird und Harnstoff spaltet, über einen Farbumschlag der Lösung von blaß-rot nach pink nachgewiesen. 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, weshalb meist anstelle des Urease-Test der LB-Test durchgeführt wurde. Beim LB-Test werden ca. 5 µl der Flüssigkultur entnommen und auf eine LB-Platte ausgestrichen. Die Platte wird über Nacht 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.

1.3 Säureinduktion in *H. pylori*

Zur Untersuchung der Genexpression bei niedrigem pH-Wert müssen die Bakterien einem sauren Milieu ausgesetzt werden. Dazu werden Bakterien einer Flüssigkultur nach Erreichen einer OD₅₉₀ von 0,6 – 0,8, je nach Versuch, zunächst in einem Grainerröhrchen abzentrifugiert (6000 rpm, RT, 8 min). Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 40 ml modifizierten BHI, pH 5 resuspendiert. Diese Suspension wird wieder in eine Zellkulturflasche mit Filterdeckel gegeben und unter mikroaerophilen Bedingungen im Anaerobiertopf für 1 -2 h bei ca. 115 rpm bei 37 °C geschüttelt. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit werden die Bakterien, wie unter D 1.2 beschrieben, abzentrifugiert und tiefgefroren.

1.4 Eisenüberschuss- bzw. Eisenmangelinduktion in *H. pylori*

Die Eisenüberschuss- bzw. Eisenmangelinduktion in *H. pylori* in Flüssigkultur erfolgt äquivalent zur Säureinduktion in *H. pylori*. Eine Flüssigkultur wird bis zum Erreichen einer gewünschten OD₅₉₀ inkubiert, bevor FeSO₄ bzw. der Eisenchelator Dipyriddy in der gewünschten Konzentration zugesetzt wird. Diese Suspension wird erneut unter mikroaerophilen Bedingungen im Anaerobiotopf für 1 h bei ca. 115 rpm bei 37 °C geschüttelt. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit werden die Bakterien, wie unter D 1.2 beschrieben, abzentrifugiert und tiefgefroren.

Eine Eisenüberschuss- bzw. Mangelinduktion kann auch auf Agarplatten durchgeführt werden. Die Bakterien werden auf Columbia-Blutagarplatten inkubiert (D 1.1), denen bei der Zubereitung die gewünschte Konzentration an FeSO₄ bzw. des Eisenchelator Dipyriddy zugegeben wurde. Von den konfluent bewachsenen Platten werden die Bakterien mit einer sterilen Impföse abgenommen und das erhaltene Bakterienpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2. Molekulargenetische Methoden

2.1 Isolierung von DNA

2.1.1 Herstellung von Zellysats von *E. coli*

Für das Screenen von *E. coli* Klonen wurde als Template für die PCR-Reaktion Zellysats von *E. coli* verwendet. Eine Einzelkolonie wurde zunächst mittels einer gelben Pippettenspitze für das „Backup“ auf eine frische LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum transferiert. Dann wurde dieselbe Pippettenspitze mehrmals in 100 µl dH₂O getaucht. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 100 °C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert um die Flüssigkeit am Boden des Eppendorf-Cap zu sammeln. 10 µl dieses Ansatzes wurden als Template für eine PCR-Reaktion eingesetzt.

2.1.2 Herstellung von Zellysats von *H. pylori*

Zellysats von *H. pylori* wurde hergestellt, indem Bakterienmaterial, welches mit einer gelben Pippettenspitze von einer Columbia-Blutagarplatte eintnommen wurde, zu 100 µl alkalischem Lysemedium gegeben wurde. Der Ansatz wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert um die Flüssigkeit am Boden des Eppendorf-Cap zu sammeln. 5 µl dieses Ansatzes wurden als Template für eine PCR-Reaktion eingesetzt.

2.1.3 Minipräparation chromosomaler *H. pylori*-DNA

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

Die Bakterien einer konfluent bewachsenen Columbia-Blutagarplatte werden in 1,5 ml STE-Puffer resuspendiert und anschließend abzentrifugiert (5 min, 14000 rpm). Der Überstand wird entfernt und das Pellet wird in 350 µl STE-Puffer aufgenommen. Zu dieser Suspension werden 6 µl Lysozym (100 mg/ml) und 6 µl RNase A (10 mg/ml) gegeben. Der Ansatz wird 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor noch 17,5 µl 10 %iges SDS zugegeben wird. Nach gründlichem Mischen wird die Lösung für 15 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend werden noch 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und es erfolgt eine weitere Inkubationsperiode bei 50 °C für 2 h, bis die Lösung klar erscheint. Nun wird die Lösung zweimal mit 400 µl Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) extrahiert, um verbliebene Proteine und Zelltrümmer zu entfernen. Die DNA befindet sich jeweils in der wässrigen oberen Phase und wird schließlich mit EtOH gefällt, mit 70 % EtOH gewaschen, in der Speed-vac getrocknet und in einem geeigneten Volumen dH₂O gelöst. Die DNA-Konzentration kann durch photometrische Messung bestimmt werden. Gelagert wird die chromosomale DNA bei -20 °C.

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

Lösung 1:	10 mM Na ₂ -EDTA 50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lösung 2:	200 mM NaOH 1 % SDS (w/v)
Lösung 3:	60 ml 5 M KOAc 11,5 ml Eisessig 28,5 ml dH ₂ O
Bindemix:	5 M Guanidiniumchlorid 25 mg/ml Silika 4 % Triton-X-100 (w/v)

3 ml einer *E. coli* Übernachtskultur werden bei 14000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und anschließend mit 100 µl Lösung 2 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei RT werden noch 100 µl Lösung 3 zugegeben, der Ansatz wird durchmischt und erneut für 3 min bei RT inkubiert. Im sich anschließenden Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 3 min, RT) werden Zelltrümmer und chromosomale DNA von der plasmidhaltigen Lösung abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap überführt und mit 800 µl Bindemix versetzt. Die darin enthaltene Glasmilch besitzt bei hoher Salzkonzentration eine starke Affinität zu DNA. Während dem dreiminütigen Inkubationsschritt bei RT bindet die Plasmid-DNA an die Silica-Matrix. Es schließen sich drei Zentrifugationsschritte (5000 rpm, 30 s, RT) an, bei denen zunächst die Silica-Matrix sedimentiert wird und diese dann zweimal mit 50 %igem EtOH gewaschen wird. Während des Waschens wird vorhandene RNA aus dem Sediment ausgewaschen. Das gewaschene Pellet wird in der Speed-vac getrocknet. Um die DNA von der Matrix zu lösen, wird das Pellet in 40 µl dH₂O resuspendiert und für 3 min auf 65 °C erhitzt. Der DNA-haltige Überstand wird durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 1 min, RT) von der Silica-Matrix getrennt. Der Überstand wird abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Cap überführt. Mit der so gewonnenen Plasmid-DNA können nun analytische Untersuchungen, wie z. B. ein Restriktionsverdau, PCR oder Sequenzierung durchgeführt werden.

2.1.5 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 positiven Ladungen können beim Durchfluss durch das Säulchen die negativ geladenen Plasmid-Moleküle binden. Ein Waschschritt bewirkt, dass sich nur noch Plasmid-DNA an der Matrix befindet, und diese Plasmid-DNA wird während des darauf folgenden Elutionsschritts von der Matrix gelöst.

Lösung S1:	10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 µg/ml RNase A
Lösung S2:	1 % SDS 200 mM NaOH
Lösung S3:	2,8 M KOAc, pH 5,2
Lösung N2:	0,9 M KCl 15 % Ethanol abs. 0,15 % Triton-X-100 100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 6,3

Lösung N3:	1,15 M KCl 15 % Ethanol abs. 100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 6,3
Lösung N5:	1M KCl 15 % Ethanol abs. 100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 8,5

Eine 50 ml *E. coli* Übernachtskultur wird in ein Grainerröhrchen überführt und abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wird in 4 ml Puffer S1 und RNase A resuspendiert. Anschließend werden 4 ml Puffer S2 zugegeben, das Grainerröhrchen wird ca. 6 - 8 mal geschwenkt und die Suspension für 2 - 3 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden lysiert und durch die alkalischen Bedingungen werden sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA denaturiert. Es werden 4 ml gekühlter (4 °C) Puffer S3 zugegeben und das Röhrchen wird erneut 6 - 8 mal invertiert. Der Ansatz wird nun für 5 min auf Eis inkubiert. Hierbei präzipitieren die chromosomale DNA und andere Zellbestandteile. Durch die Neutralisierung, die durch Zugabe des Puffers S3 erreicht wird, wird die Plasmid-DNA renaturiert. Sie nimmt wieder ihre ursprüngliche supercoiled Struktur an. Während dieser fünfminütigen Inkubationsperiode wird das Säulchen equilibriert, indem man auf dieses 2,5 ml Puffer N2 gibt. Das Zellysyt wird von der chromosomalen DNA und den Zellbruchstücken abgetrennt, indem man die Lösung durch einen Filter laufen lässt. Das aufgereinigte Lysat wird auf die Säule geladen, wobei die Plasmid-DNA an der Matrix haften bleibt. Nach einem Waschschrift (Zugabe von 10 ml Puffer N3) wird die DNA vom Säulenmaterial durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer N5 abgelöst. Um die DNA aus dem Elutionspuffer aufzureinigen, wird sie mit 3,5 ml Isopropanol gefällt und bei 15000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das DNA Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen (15000 rpm, 10 min, RT), luftgetrocknet und anschließend in dH₂O gelöst. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei -20 °C.

2.1.6 EtOH-Fällung von 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-haltigen Lösung gibt. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 30 min, 4 °C) erhält man ein DNA-Pellet. Dieses Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen (14000 rpm, 10 min, 4 °C) und anschließend in der Speed-Vac getrocknet. Die DNA wird dann in einem geeigneten Volumen dH₂O gelöst.

2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Probe wird 1:100 mit dH₂O verdünnt und deren Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration wird anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}): \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Photometern wird die Konzentration direkt durch das Gerät berechnet.

Der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ gibt den Reinheitsgrad der Probe an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2 Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge

2.2.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

10 x TBE-Puffer:	890 mM Tris-HCl 890 mM Borsäure 2 mM EDTA
------------------	---

2,5 x HSE-Puffer:	4 M Harnstoff
	50 mM EDTA
	50 % Saccharose
	0,1 % Bromphenolblau

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge in einem Agarosegel aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern entsprechend ihrer Ladung in einem Gel, an das eine Spannung gelegt wird, zur positiv geladenen Kathode. Dabei wandern kleine Moleküle schneller als Große, da das Agarosegel 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 %igem Agarosegel 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 Agarosegel werden dadurch enger, auch kleine Fragmente werden durch das dichtere Netz besser zurückgehalten und zeigen nun ein unterschiedliches Laufverhalten.

Die gewünschte Konzentration an Agarose wird in ein geeignetes Volumen 1 x TBE-Puffer gegeben (50 ml kleine Kammer, 100 ml mittlere Kammer, 120 ml grosse Kammer), die Flasche kurz geschwenkt und die Agaroselösung anschließend aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach Abkühlen der Lösung auf 50 °C wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Agarose wird in einen Gelschlitten, in dem sich die Kämme für die Taschen befinden, gegossen, und bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis das Gel vollständig polymerisiert ist. Nun werden die Kämme vorsichtig entfernt, das Gel mitsamt dem Schlitten in die Gelkammer gegeben, in der ausreichen 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 mV für 20-40 min angelegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Lauffront, also die des Farbstoff 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 mithilfe eines Videoprinters photographiert werden. Die Horizontale Agarose-Gelelektrophorese wird hauptsächlich angewendet, um bei PCR- Reaktionen und Kontrollverläufen 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 mithilfe 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 Gelextaktionskit von Qiagen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge in einem Agarosegel wird das gewünschte Fragment unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Skalpell 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 Agarosegelbestandteil 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 eluieren, wird das Gel für 10 min auf 50 °C erhitzt, wobei das Cap gelegentlich vorgetextet 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, 15000 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 vorhandenen Agarose- und QG-Pufferreste aus dem Säulchen. Nach einem sich anschließendem Zentrifugationsschritt (1 min, 15000 rpm, RT), der für die Trocknung der Säule und das vollständige Entfernen aller EtOH-Reste des Waschpuffers nötig ist, wird die DNA mit 30 - 50 µl Elutionspuffer bzw. dH₂O eluiert. Durch eine zweimalige Elution kann die absolute Ausbeute an DNA erhöht werden, die Konzentration nimmt jedoch ab. Mit dem QIAquick-Gelextaktionskit können Fragmente von 70 bp bis 10 kb aus einem Agarosegel aufgereinigt werden.

2.3 Amplifikation von DNA

2.3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) können definierte DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die verwendeten Oligonucleotide sollten eine Länge von 15 - 40 bp aufweisen, keine Sekundärstrukturen ausbilden, nicht zueinander komplementär sein und ihr G-C-Gehalt sollte bei 40 - 60 % liegen. Die Oligonucleotide sind für die Spezifität der Reaktion verantwortlich, dennoch können auch einzelne Basen variiert werden, um zum Beispiel Restriktionsschnittstellen einzubauen oder um punktgerichtete Mutationen einzelner Aminosäuren einzuführen. Im ersten Schritt einer PCR-Reaktion (Denaturierung) wird der DNA Doppelstrang durch Erhöhung der Temperatur auf 94 °C in Einzelstränge zersetzt. An diese Einzelstränge können nun während des zweiten Schritts (Annealing) die Oligonucleotidprimer binden. Dafür wird die Temperatur auf die so genannte Annealingtemperatur erniedrigt, die 2 - 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur T_m der Primer liegt. Die Schmelztemperatur für Oligonucleotide von ca. 20 bp Länge lässt sich näherungsweise nach folgender Formel bestimmen:

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

Hierbei entsprechen A, T, G und C der Anzahl der im Oligo vorhandenen jeweiligen Basen. Im letzten Schritt eines Replikationszyklus, der Elongation, erfolgt die Neusynthese eines DNA-Stranges durch hitzestabile Polymerasen. Der Elongationsschritt wird, bei Verwendung der Taq-Polymerase (Polymerase aus *Thermus aquaticus*) bei einer Temperatur von 72 °C durchgeführt, da bei dieser Temperatur die maximale Enzymaktivität vorhanden ist. Zum Klonieren wird die i-Proof-Polymerase (Biorat) verwendet, die im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine „proof-reading“-Aktivität aufweist, und somit den Einbau an falsch gepaarten Nukleotidbasen deutlich verringert.

Ein typischer PCR-Reaktionsansatz, in welchem die MolTaq Polymerase der Firma OLS verwendet wird, setzt sich wie folgt zusammen:

DNA-Template (20 ng/μl)	1 μl
Primer 1 (100 pmol/μl)	1 μl
Primer 2 (100 pmol/μl)	1 μl
dNTPs (20 mM)	1 μl
Enhancer	2 μl
10 x PCR-Puffer	10 μl
Polymerase (5U/μl)	0.5 μl
dH ₂ O	ad 100 μl

Die eingesetzten Mengen können im Einzelfall stark variieren. Durch Zugabe von MgCl₂ kann evtl. die Ausbeute an PCR-Produkt erhöht werden.

Eine typische PCR Reaktion durchläuft 30 Zyklen mit folgendem Schema:

94 °C	5 min	(first delay)	
94 °C	30 sec	(Denaturierung)	} 30 x
50 °C	30 sec	(Annealing)	
72 °C	1 min	(Elongation)	
72 °C	5 min	(last delay)	

Während der Elongation findet die eigentliche Amplifikation des DNA-Fragments 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 entsprechend verlängert werden. 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 10⁷-fache erhöht.

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

2.3.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN

Mit dem QIAquick PCR Purification Kit ist es möglich PCR-Produkte oder sonstige doppelsträngige oder einzelsträngige DNA-Fragmente aus anderen Enzymreaktionen (z. B. Restriktionsverdau, cDNA-Synthese), die eine Länge von 100 bp bis 10 kb haben, aufzureinigen. Dabei werden Primer, Nucleotide, Enzyme und Pufferreste entfernt.

Die Aufreinigung erfolgt auch hier ähnlich wie die Extraktion von DNA aus Agarosegelen (D.2.2.2). Zu dem PCR-Reaktionsansatz werden 5 Vol. Puffer PB gegeben und dieses Gemisch auf ein Säulchen zu laden. Die DNA bindet an die Silika-Matrix in dem Säulchen. Die restlichen Bestandteile der zuvor vorgenommenen Enzymreaktion binden nicht und werden in einem Zentrifugationsschritt durch das Säulchen durchgespült (15000 rpm, 1 min, RT). In einem Waschschrift werden durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und erneute Zentrifugation des Säulchens (15000 rpm, 1 min, RT) unspezifisch an die Matrix bindende Bestandteile des Reaktionsansatzes entfernt. Um die letzten Reste an EtOH-haltigem Puffer zu entfernen, der nachfolgende Enzymreaktionen inhibieren kann, wird die Säule in einem weiteren Zentrifugationsschritt getrocknet (15000 rpm, 1 min, RT). Im letzten Schritt wird die DNA durch Zugabe von dH₂O oder Elutionspuffer von der Matrix gelöst und der Durchfluss, der nun die DNA enthält, wird in einem 1,5 ml Eppendorf Cap aufgefangen.

Es wird das Protokoll „QIAquick PCR Purification Kit Protokoll using a microcentrifuge“ entsprechend den Anleitungen des Herstellers befolgt. Die eingesetzten Puffer werden vom Hersteller als Bestandteil des PCR-Purification-Kits geliefert.

2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Beim Restriktionsverdau macht man sich die Eigenschaften prokaryotischer Enzyme, der Restriktionsendonukleasen zunutze, die Teil des Restriktions-Modifikationssystems von Bakterien sind. Die natürliche Funktion der Restriktionsendonukleasen ist der Abbau von Fremd-DNA. Die Spaltung der Fremd-DNA erfolgt an spezifischen Erkennungssequenzen, oft Palindromen, durch Lösen von je einer Phosphodiester-Bindung im DNA-Rückgrat. Die eigene DNA ist an diesen Erkennungsmotiven durch Modifikationen geschützt. Im Labor werden diese Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um DNA an definierten Stellen zu spalten. Als Richtwerte für eine optimale Spaltung gelten ein Gesamtvolumen von 20 - 200 µl, eine DNA-Konzentration von 0,5 - 1 µg/µl, und 1 - 4 Einheiten (U) an Enzym pro 1 µg DNA. Ein typischer Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

20 µl DNA in dH₂O
 10 µl 10 x Reaktionspuffer
 4 µl Restriktionsendonuklease
66 µl dH₂O
 100 µl

Die Puffer der einzelnen Enzyme sind in ihrer Salzzusammensetzung exakt auf die einzelnen Enzyme abgestimmt und gewähren ihre maximale Effektivität. Der Ansatz wird für mind. 2 h auf 30 °C bzw. 37 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur sind die Enzyme aktiv und spalten die DNA. Die verdauten DNA-Fragmente können mithilfe des PCR Purification-Kit von QIAGEN aufgereinigt (D.2.3.2). Falls ein Fragment mit zwei unterschiedlichen Enzymen verdaut werden soll, so kann ein Doppelverdau durchgeführt werden, vorausgesetzt, es existiert ein Puffer, in dem beide Enzyme ausreichend aktiv sind. Falls kein solcher Puffer existiert, muss der erste Verdau aufgereinigt werden (D.2.3.2) bevor der zweite Verdau durchgeführt werden kann.

Soll das gewünschte Produkt von anderen Spaltprodukten getrennt werden, so führt man eine horizontale Gelelektrophorese durch (D.2.2.1) und isoliert das gewünschte Fragment mit Hilfe des QIAquick Gelelektrotraktions-Kit von QIAGEN (D.2.2.2).

2.4.2 Dephosphorylierung des Vektors

Falls ein Vektor für eine anschließende Klonierung nur mit einem Restriktionsenzym gespalten wird, muss vor der Verwendung des Vektors eine Dephosphorylierung durchgeführt werden. Mithilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase werden die 5'-Phosphatreste entfernt und die T4-DNA-Ligase kann keine Phosphodiesterbindung zwischen den 5'- und 3'-Termini der Vektor-DNA mehr ausbilden. Durch die Dephosphorylierung wird die Wahrscheinlichkeit einer Religierung ohne Einbau des Inserts minimiert. Ein typischer Dephosphorylierungsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

50 µl aufgereinigter, restriktionsverdauter Vektor
 10 µl 10 x Reaktionspuffer
 1 µl Alkalische Phosphatase
39 µl dH₂O
 100µl

Dieser Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem PCR Purification-Kit von QIAGEN aufgereinigt (D.2.3.2)

2.4.3 Ligation

Die T4-DNA-Ligase kann zwei Fragmente, die mit dem selben Restriktionsenzym gespalten wurden und somit komplementäre überhängende Enden (sticky-ends) besitzen miteinander verknüpfen, indem sie Phosphodiester-Bindungen im DNA-Rückgrat herstellt. Dabei werden unter ATP-Verbrauch freie 3'-Hydroxylenden mit freien 5'-Phosphatenden verknüpft. Eine weitere Eigenschaft der T4-DNA-Ligase ist, dass sie auch so genannte „blunt-ends“ wieder miteinander verknüpfen kann. Bei der Ligation von „sticky-ends“ ist das optimale Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3. Ein typischer Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

1 µl Vektor (1 µg/µl)
 1 - 3 µl Insert (200 ng/µl)
 1 µl 10 x T4 DNA-Ligase-Puffer
1 µl T4 DNA-Ligase
 10 µl

Dieser Ansatz wird nun über Nacht bei 16 °C inkubiert. Alternativ kann auch eine Inkubation für 3 h bei RT erfolgen.

2.5 Transformation

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

2.5.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen

Damit nicht natürlich kompetente *E. coli*-Zellen Fremd-DNA aufnehmen können, unterzieht man sie einer CaCl₂-Behandlung. Man impft eine Übernachtskultur von *E. coli* DH5α oder *E. coli* M15 in 10 ml LB-Medium an. Am nächsten Tag gibt man 1 ml dieser Übernachtskultur zu 100 ml LB-Medium und inkubiert diese Kultur dann weiter bei 37 °C bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ von 0,3 - 0,6). Die Zellen werden nun abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml (1/5 Volumen) 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen werden dann für mindestens 30 min auf Eis gelagert und anschließend erneut sedimentiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C). Der Überstand wird wiederum verworfen und das Pellet in 10 ml (1/10 Volumen) eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 20 % Glycerin resuspendiert. Von dieser Suspension werden Aliquots von 100 - 300 µl in Eppendorf-Caps pipettiert und diese bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Transformation von *E. coli* DH5a bzw. *E. coli* M15 mit Plasmid-DNA

Die CaCl₂-kompetenten *E. coli* Zellen werden auf Eis aufgetaut. Zu 50 - 100 µl kompetenten Zellen werden 10 µl Ligationsansatz gegeben, der Ansatz wird mit der Pipettenspitze vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wird er für 90 s auf 42 °C erhitzt und erneut für 2 min auf Eis gestellt. Es wird 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen werden für mindestens 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit werden die für die Antibiotikaresistenz verantwortlichen Proteine exprimiert, welche vom aufgenommenen Plasmid codiert werden. Nach 1 h werden die Bakterien sedimentiert (3 min, 15000 rpm, RT) und der Überstand wird bis auf 100 µl verworfen. Das Pellet wird in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und dann auf einer Selektionsplatte ausplattiert.

2.5.3 Transformation von natürlich kompetenten *H. pylori*-Stämmen

Manche Stämme von *H. pylori*, wie zum Beispiel *H. pylori* G27 oder *H. pylori* 26695 sind, im Gegensatz zu *E. coli* natürlich kompetent und können Fremd-DNA ohne Vorbehandlung aufnehmen. Dazu werden Bakterien einer konfluent bewachsenen Columbia-Blutagarplatte (D.1.1), die sich gerade in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, punktförmig auf eine frische Platte gestrichen. Dieser „Spot“ wird für 5 h im CO₂-Brutschrank (5% CO₂, 37 °C) inkubiert. Währenddessen werden 5 µg Plasmid DNA mit EtOH gefällt (D.2.1.6). Das DNA-Pellet wird in 10 µl Brucella-Medium resuspendiert, die Lösung wird auf den „Spot“ gegeben und mit einer Impföse gleichmäßig verteilt. Die Platte wird ÜN im CO₂-Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird der Spot zu je 1/3 bzw. 2/3 auf Columbia-Blutagarplatten mit den entsprechenden Selektions-Antibiotika ausplattiert. Diese Platten kommen für 5 Tage in einen Anaerobiotopf (mikroaerophile Atmosphäre, 37 °C). Nach 5 Tagen werden die erhaltenen Einzelkolonien auf eine frische Columbia-Blutagarplatte überstrichen (ca. 10 Klone pro Platte) und für zwei weitere Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Dann werden die Bakterien auf je eine halbe Columbia-Blutagarplatte überstrichen. Diese werden 2 Tage im Anaerobier-Topf kultiviert bevor sie als Glycerinkultur bei -80 °C tiefgefroren werden.

2.5.4 Transformation von *H. pylori* mittels Elektroporation

Bei der Transformation mittels Elektroporation kann DNA in Zellen eingebracht werden, die nicht natürlich kompetent sind. Des weiteren kann in manchen Fällen z. B. bei *H. pylori* 26695 die Transformationshäufigkeit im Vergleich zur natürlichen Transformation durch die Elektroporation deutlich erhöht werden. 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. Zu 50 - 100 µl Zellsuspension werden mind. 0,5 µg Plasmid-DNA gegeben. Der Ansatz wird für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend luftblasenfrei in eine auf -20 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wird zwischen den beiden Elektroden positioniert und das elektrische Feld wird angelegt. Die durch die Elektroporation beschädigten Bakterien werden zügig in 100 µl SOC-Medium überführt und auf Columbia-Blutagarplatten ohne Antibiotika ausplattiert. Die Platten werden für 48 h unter mikroaerophilen Bedingungen im Anaerobier-Topf bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit kann das aufgenommene Plasmid über homologe Rekombination in das bakterielle Genom integriert werden. Nach Einbau in das bakterielle Chromosom werden die Resistenzgene exprimiert. Die Bakterien, die nach 48 h einen Zellrasen ausgebildet haben, werden mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in 500 µl Brucella-Medium resuspendiert. Es werden je 3 x 100 µl und 1 x 200 µl auf 4 Columbia-Blutagarplatten mit Selektionsantibiotikum aufplattiert und diese Platten werden für weitere 5 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen im Topf bei 37 °C inkubiert. Nach 5 Tagen sind die Einzelkolonien deutlich sichtbar.

2.6 Sequenzierung

2.6.1 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.

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_{\max}	E_{\max}
A	RG6 (N,N'-diethyl-2,7-dimethyl-6-carboxyrhodamin)	grün	520 nm	545 nm
C	ROX (6-Carboxy-X-rhodamin)	rot	585 nm	605 nm
G	R110 (6-Carboxyrhodamin 110)	blau	500 nm	530 nm
T	TAMARA (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 Sequenzierungsreaktion wurde nur zu Beginn dieser Arbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie durchgeführt. Dann wurden die Sequenzierungsreaktionen von der Firma Seqlab durchgeführt.

2.6.2 DNA-Sequenzierung mit $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP

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_2O , 7 μl 3 M NaAc (pH 4,5) und 120 μl EtOH abs. wird die DNA ÜN 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_2O 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 Raumtemperatur.

Der „Annealing“-Ansatz wird mit 3 μl „Labelling-Mix“, 1,5 μl $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 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 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 Röntgenfilm aufgelegt.

2.7 Southern Blot

Gelelektrophorese und Vorbereitung des Gels

Depurinierungslösung:	0,25 N HCl
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0
20 x SSC:	3 M NaCl 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 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_2O abgespült und für 20 min in Denaturierungslösung und nach erneutem Abspülen mit dH_2O für weitere 20 min in Neutralisierungslösung inkubiert und wiederum mit dH_2O kurz gespült. Abschließend wird das Gel 20 min in 20 x SSC geschwenkt.

Transfer der DNA auf Hybond N⁺-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 Whatmanpapier 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 Whatmanpapier, 15-20 Schichten trockenes dünnes Whatmanpapier 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 Whatmanpapier 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 dH₂O 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/cm²) 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 Primärwaschpuffer (2-5 ml/cm² Membran) für 2 x 20 min bei 42 °C gewaschen und danach für 2 x 5 min bei RT mit Sekundärwaschpuffer gewaschen.

Detektion der Sonde

Die Entwicklungsreagenzien 1 und 2 werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (0,125 ml/cm² 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. Da das ECL-Signal innerhalb weniger Stunden abklingt, kann der Blot, falls gewünscht, am nächsten Tag mit einer weiteren Sonde behandelt werden.

2.8 DNaseI-Footprint

Labeln der Sonde

Als Ausgangsmaterial für die Sondenpräparation wurde der Promotor- und der 5' Bereich des zu analysierende Gens über die Schnittstellen *EcoRI* (5') und *BamHI* (3') in den Vektor pSLV1180 kloniert. Für eine radioaktive Markierung am 5' Ende wurde ein PCR-Produkt mit den Primern M13-reverse und M13-universal mit den Plasmid als template aufamplifiziert. Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BglII* verdaut. Für eine radioaktive Markierung am 3'-Ende des Gens wurde ein PCR-Produkt mit den Primern M13-reverse und pSL-MCS-univ. mit den entsprechenden Plasmid als Template aufamplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *BamHI* verdaut. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Fragmente über eine Extraktion aus einem Agarosegel aufgereinigt, die Elution erfolgte in 30 µl dH₂O. Die vorhandene Konzentration der Fragmente wurden bestimmt und zum Labeln der Sonde wurden jeweils 1,5 – 2,5 pmol das Fragmentes eingesetzt. Der Labelling-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

1,5 -2,5 pmol verdautes Fragment
 1 µl 10 x Kinasepuffer A
 1 µl Polynukleotidkinase PNK
 3 µl γ^{32} P-ATP (5000 Ci/mmol)
 ad 10 µl dH₂O

Der Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert, es erfolgt eine radioaktive Markierung auf beiden Seiten des Fragments. Um eine Markierung nur an der 5'-Seite bzw. an der 3'-Seite zu erhalten, wird der Phosphorylierungsansatz für 2 h mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI bzw. *Eco*RI verdaut. Die Sonden werden dann über das PCR-purifikation-Kit (Qiagen) aufgereinigt, die Elution erfolgt in 50 µl dH₂O. Die radioaktiv markierte Sonde kann für einige Tage bei -20 °C gelagert werden.

in vitro Phosphorylierung des Proteins

Soll das Experiment mit einem phosphorylierten Response-Regulator durchgeführt werden, so muss dieser zunächst phosphoryliert werden. Der Phosphorylierungsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Protein (0,2 µg/µg)	145 µl
MgCl ₂ (200 mM)	1,6 µl
Acetylphosphat (500 mM)	16 µl

Der Ansatz wird für 20 min bei RT inkubiert, bevor die Binderaktion zwischen radioaktiver Sonde und phosphoryliertem Regulator angesetzt wird.

Binderaktion

Die Bindereaktion setzt sich zusammen aus:

0,05 pmol radioaktiv markierte Sonde
 Unterschiedliche Mengen an Protein (0 - 10 µg)
 40 mM KCl
 50 mM Tris-HCl (pH 7,9)
 1 x Footprint-Puffer
 dH₂O ad 100 µl

Der **Footprint-Puffer** wird zunächst 10 x konzentriert angesetzt:

100 mM NaCl
 20 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 10 mM DTT

DNaseI-Verdau

Die Bindereaktion erfolgt für 20 min bei RT. Anschließend werden dem Ansatz 1 - 2 U DNaseI zugegeben (Verdünnung kann wenn gewünscht in 10 x Footprint Puffer erfolgen), der DNaseI-Verdau findet während einer 1 minütigen Inkubation bei 25 °C statt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 140 µl Stopp-Puffer beendet.

STOP-Puffer:

192 mM NaAc
32 mM Na ₂ EDTA (pH 7,9)
0,14 % SDS
64 ng/µl tRNA

Aufgereinigt wird der Ansatz über eine Phenol/Chloroform (1:1)-Extraktion, die DNA wird durch Zugabe von 2 Vol 100 % eiskaltes EtOH gefällt. Das Pellet wird mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend in der Speed-Vac getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 5 µl Formamid-Farbstoff-Puffer (0,3 % Bromphenolblau, 0,3 % Xylen Cyanol FF, 10 mM Na₂EDTA (pH 7,5), 97,5 % deionisiertes Formamid) resuspendiert. Das Pellet kann auf Eis gehalten werden oder weggefroren werden, bis auch der Längenstandard für die Elektrophorese präpariert wurde.

Längenstandard für die Gelelektrophorese:

Es wird eine modifizierte G+A Sequenzierungsreaktion nach Maxam und Gilbert durchgeführt, die als Längenstandard der Elektrophorese auf das Harnstoffgel aufgetragen wird. Zu 0,03 0,05 pmol radioaktiv markierter Sonde werden 1 µl PolydI:dC (1 µg/µl) und 1 µl 50 % Ameisensäure gegeben, der Ansatz wird mit TE Puffer (10 mM TrisHCl, 1 mM Na₂EDTA) auf 10 µl aufgefüllt und für 6 min bei 37 °C inkubiert. Dann werden 150 µl 1 M Piperidin zugegeben. Der Ansatz wird für 30 min auf 90 °C erhitzt, dann 3 min auf Eis inkubiert, kurz abzentrifugiert und es wird 3 µl tRNA-Lösung (1 µg/µl) hinzugefügt. Durch Zugabe von 1,2 ml 1-Butanol (gründlich mischen durch vortexen) und anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4 °C) wird die DNA gefällt. Der Überstand wird verworfen, auf das Pellet werden 1,2 ml 1-Butanol und 150 µl 1 % SDS gegeben (gründlich mischen) und der Ansatz erneut abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm, 4 °C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in der Speed-Vac getrocknet, bevor es in 5 µl Formamid-Farbstoff-Puffer resuspendiert wird.

Gelelektrophorese:

Die Proben und der Längenstandard werden für 2 min auf 80 °C erhitzt, bevor sie auf ein 6 % Polyacrylamid-Harnstoffgel (20 cm x 40 cm x 0,03 cm; vgl. PE-Analyse) geladen werden, welches bereits einen Vorlauf von 30 min ohne Proben hinter sich hat. Das Gel wird dann für ca. 2 h bei 1500 V, 30 mA und 40 W laufen gelassen. Das Gel kann nach Beendigung des Laufs auf eine dünnes Whatmanpapier gezogen werden und mit Klarsichtfolie bedeckt werden. Die Detektion des Signals kann mittels eines Röntgenfilms oder mittels des Phosphoimagers (vgl. PE) erfolgen.

3. Arbeiten mit 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. Um eine Degradation der RNA durch Kontamination mit RNasen zu verhindern, müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Für Arbeiten mit RNA werden 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 (D.1.2 bzw. D.1.3 bzw. D.1.4) 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 geschüttelt und der Ansatz wird erneut bei RT für 3 min inkubiert. Im nächsten Schritt wird die Suspension abzentrifugiert (10600 rpm, 15 min, 4 °C). Die wässrige, farblose Phase, welche die RNA enthält, 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 wieder ein Zentrifugationsschritt (10600 rpm, 10 min, 4 °C). Es bildet sich ein gelförmiges Pellet, das die Nukleinsäuren enthält. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 70 %igem EtOH gewaschen, erneut abzentrifugiert (8600 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand entfernt. Das Pellet wird luftgetrocknet und anschließend in 100 µl DEPC-dH₂O gelöst. Ist das Pellet schwer zu lösen, kann dieser Vorgang erleichtert werden, indem die Nukleinsäurelösung für 10 min auf 55 - 60 °C erhitzt wird.

3.1.2 DNase-Verdau

In der erhaltenen Nukleinsäurelösung aus D 3.1.1 befindet sich sowohl RNA als auch DNA. 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 MgCl₂ und 20 µl 1M Tris-HCl pH 7,5 in einem Gesamtvolumen von 500 µl gemischt und der Ansatz für 45 min bei 25 °C inkubiert. Ist nach einem DNase Verdau noch DNA in der RNA-Lösung enthalten, schließt man erneut einen DNase-Verdau an.

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 (15000 rpm, 5 min, RT). Die RNA befindet sich in der wässrigen oberen Phase. Diese wird abgenommen und mit 1/10 Volumen LiCl und 2,5 Volumen -20 °C kaltem EtOH abs. versetzt um die DNA zu fällen. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 14000 rpm, 4 °C) erhält man die RNA in Form eines Pellets. Dieses wird nun mit -20 °C kaltem 70 %igem EtOH gewaschen, um Salzreste zu entfernen, und dann in einem geeigneten Volumen DEPC-dH₂O (meist 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. Werden in der PCR noch Spuren an DNA detektiert, so schließt man erneut einen DNase-Verdau an.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Probe wird 1:100 mit dH₂O verdünnt, und deren Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration wird anhand folgender Formel errechnet:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}): \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Photometern wird die Konzentration direkt durch das Gerät berechnet.

Der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ gibt dabei den Reinheitsgrad der Probe an und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

3.2 Analyse von RNA

3.2.1 Microarray-Analysen

Die Microarray-Technik erlaubt durch die parallel Analyse den Vergleich des Expressionsprofils zweier unterschiedlicher Stämme oder des selben Stamms bei verschiedenen Wachstumsbedingungen. Durch die Analyse des kompletten Transkriptoms durch RNA-Microarrays wird die Geschwindigkeit der molekularbiologischen Forschung gesteigert. Die Microarray-Analyse basiert auf der Hybridisierung von einzelsträngigen Nukleinsäuren. Eine der einzelsträngigen Nukleinsäuren liegt auf der Matrix fest gebunden vor. In dieser Arbeit wurden Microarrays eingesetzt, die uns von Thomas Meier (MPI Berlin) zur Verfügung gestellt wurden (Gressman et al., 2005). Diese Arrays tragen 1649 PCR-Fragmente, die eine Größe von 68 bp bis 2568 bp aufweisen. 1588 dieser PCR-Fragmente leiten sich ab vom Genom des Stammes *H. pylori* 26695 und decken 98 % der ORFs dieses Stammes ab (Tomb et al., 1997). 91 PCR-Fragmente leiten sich ab von stammesspezifischen Genen des Stammes *H. pylori* J99 (Alm et al., 1999).

Zunächst wird die RNA der Bakterien entsprechend Punkt D.3.1 aufgereinigt. Jedoch wurde die RNA, die in den MA Analysen eingesetzt wurde, noch einem zusätzlichen Reinigungsschritt („RNA-Cleanup“-Protokoll des RNeasy extraction Mini Kit von Qiagen) ausgesetzt, die Elution erfolgte in 30 bis 50 µl DEPC-dH₂O. Diese RNA wird mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei werden fluoreszierende Nukleotide (dCTP) in die cDNA eingebaut. Die cDNA wird dann mit den DNA-Microarrays hybridisiert. Nach Abwaschen der nicht hybridisierten cDNA-Fragmente wird das Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays mittels eines Lasers detektiert.

cDNA-Synthese und Labelling der cDNA

Zu 20 µg RNA werden 9 µl Random Primer (3 µg/µl; Invitrogen) zugegeben und der Ansatz durch Zugabe von DEPC-dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 18 µl aufgefüllt, bevor er für 5 min bei 70 °C inkubiert wurde. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis und kurzer Zentrifugation, um die Flüssigkeit am Boden des Caps zu sammeln, werden jeweils 20 µl Mastermix zugegeben. Der Mastermix (Invitrogen) setzt sich wie folgt zusammen:

RNaseout	1 µl
dATP (20 mM)	1 µl
dGTP (20 mM)	1 µl
dTTP (20 mM)	1 µl
dCTP (20 mM)	0,8 µl
DTT (100 mM)	0,4 µl
First strand buffer (5 x)	8 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
DEPC-dH ₂ O	5,8 µl

Der Mutante A wurden 2 µl des fluoreszenzmarkierten dCTP Cyto dye 3 und der Mutante B 2 µl des fluoreszenzmarkierten dCTP Cyto dye 5 zugegeben (GE Healthcare). Nach Zugabe der fluoreszenzmarkierten dCTPs wird in einem abgedunkelten Raum weitergearbeitet. Die Ansätze werden für 10 min bei RT inkubiert, im Anschluss erfolgt eine Inkubation für 2 h bei 37 °C bevor die Proben für 15 min auf 70 °C erhitzt werden. Danach werden je 2 µl RNase (Roche, DNasefree) zugegeben und der Ansatz für 45 min auf 37 °C erwärmt. In dieser Zeit findet der RNA-Abbau statt. Die markierte cDNA wird mit Hilfe des pCR-purification-Kit von Qiagen aufgereinigt. Die Elution erfolgte nach einer 2 minütigen Einwirkzeit in 40 µl Elutionspuffer über Zentrifugation. Das erhaltene Eluat wurde in einem sich anschließenden zweiten Elutionsschritt erneut als Elutionspuffer eingesetzt. Die beiden Proben (A und B) werden vereinigt, das Gesamtvolumen wird in der Speed-Vac (30 °C) im Dunklen auf 30 µl reduziert. Zu 30 µl Volumen werden 6 µl 20 x SSC und 4 µl 1 % SDS gegeben und der Ansatz für 1 min auf 94 °C erhitzt. Direkt anschließend soll der Ansatz für die Hybridisierung mit den Slides eingesetzt werden.

Hybridisierung:

Zur Vorbereitung der Whole genome slides für die Hybridisierung werden die Slides zunächst für 2 min in dH₂O (95 °C) erhitzt und anschließend für 1 min in EtOH gelegt. Getrocknet werden sie anschließend über einen Zentrifugationsschritt (3 min, 1600 rpm). Es erfolgt dann eine 20 minütige Prähybridisierung der Slides in Prähybridisierungslösung (2,5 g BSA, 43,75 ml 20 x SSC, 2,5 ml 10 % SDS, dH₂O ad 250 ml), die auf 50 °C erwärmt wird. Anschließend werden die Slides erneut für 1 min in dH₂O (RT) und anschließend für 1 min in EtOH (RT) inkubiert, bevor die durch Zentrifugation getrocknet werden (3 min, 1600 rpm, RT). Die Slides werden in den Slidehalter gegeben, die markierte cDNA wird zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht (> 12 h) im Wasserbad bei 50 °C.

Waschen:

Die hybridisierten Slides werden für 5 min in Waschpuffer I (2,5 ml 10 % SDS, 1,25 ml 20 x SSC, dH₂O ad 250 ml) und dannach für 5 min in Waschpuffer II (1,25 ml 20 x SSC, dH₂O ad 250 ml) bei RT gewaschen. Über einen Zentrifugationsschritt (3 min, 1600 rpm, RT) werden die Slides getrocknet. Die Slides werden bis zum einscannen in einem abgedunkelten Plastikbehälter aufbewahrt.

Scannen und Auswerten:

Die Slides wurden mit dem ScanArrayLight HT Scanner (Perkin Elmer, Boston) gescannt. Die durchschnittliche Signalintensität jedes Spots und des Hintergrunds wurden mit der ScanArray Express Software (Perkin Elmer, Boston) bzw. GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices) ausgewertet. Der Cy3/Cy5 Quotient wird aus den korrigierten Werten für jedes einzelne Gen berechnet.

3.2.2 Primer Extension Analyse

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 stranded DNA) entsteht. Diese ssDNA wird nun in einem 6 %igem Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Will man den Transkriptionsstart eines Gens bestimmen, so ist es erforderlich, dass man eine radioaktive Sequenzierungsreaktion (D.2.6.2) als Längenstandard mitlaufen lässt. Auf Höhe des Signals der radioaktiv markierten ssDNA befindet sich in der Sequenzierungsreaktion das 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
dH₂O 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.2.6.2)

Radioaktive Markierung des Oligonukleotides:

Ein typischer Markierungsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

1 µl Primer (5 pmol/µl)
3 µl [γ ³²P]ATP
1 µl 10 x Kinase Puffer (MBI, Buffer A PNK)
4 µl DEPC-dH₂O
1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (MBI, PNK)

Der 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 Oligonukleotids übertragen, so dass der Primer radioaktiv markiert wird.

Das nicht eingebaute [γ ³²P]ATP wird mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal-Kit von QIAGEN entsprechend den Vorgaben des Herstellers entfernt. Der Primer wird mit 60 µl DEPC-dH₂O eluiert und die Effizienz der radioaktiven Markierung im Szintillationszähler bestimmt.

Primer Extension:

Es werden 30 µg RNA mit ca. 2000000 cpm des Oligonukleotids durch Zugabe von 2,5 Volumen EtOH abs. und 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 4,8) koprizipitiert 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 -20 °C kaltem 70 %igem EtOH gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und dann aufgenommen in:

5 µl DEPC-dH₂O
2 µl 5 x Reverse Transkriptase Puffer
2 µl 2 mM dNTPs

Um mögliche Sekundärstrukturen 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-Harnstoffgel aufgetragen, das bereits mindestens eine halbe Stunde zuvor an die Spannungsquelle angeschlossen

wurde. Das Gel wird dann bei 1500 V, 30 mA und 40 W für ca. 2 h laufen gelassen, bis die erste Blaufront ausgelaufen ist.

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 Phosphoimager:

Will man die Menge einer bestimmten mRNA quantifizieren, so muss die Detektion des Signals mit Hilfe des Phosphoimagers geschehen, so dass die Stärke des erhaltenen Signals mit dem Computerprogramm ImageMaster TotalLab ausgewertet werden kann. Der für die Detektion verwendete Screen ist Feuchtigkeitsempfindlich, weshalb das Gel vor Auflegen des Screens auf einem Gelrockner unter Vakuum getrocknet werden muss (mind. 1,5 h, 80 °C).

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamidlösung (30 %): 29,2 g Acrylamid
 0,8 g Bisacrylamid
 ad 100 ml dH₂O

Tab. 9: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels:

Reagenzien	Sammelgel (5 %, 3 ml)	Trenngel (8 %, 15 ml)	Trenngel (10 %, 15 ml)	Trenngel (12 %, 15 ml)	Trenngel (15 %, 15 ml)
dH ₂ O	2,1 ml	6,9 ml	5,9 ml	4,9 ml	3,4 ml
30 % Polyacrylamid-Lösung	1,0 ml	4,0 ml	5,0 ml	6,0 ml	7,5 ml
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	0,75 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
10 % (w/v) SDS	0,03 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
10 % (w/v) APS	0,03 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	0,003 ml	0,006 ml	0,006 ml	0,006 ml	0,006 ml

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

5 x Laufpuffer: 125 mM Tris
 1,25 M Glycin
 50 ml 10 % (w/v) SDS
 ad 1000 ml dH₂O

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch die Wahl der Polyacrylamidkonzentration wird die Porengröße so bestimmt, dass der lineare Trennungsbereich des Gels das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins einschließt (z. B. liegt der optimale Trennungsbereich eines 15 %igen Gels bei 12 - 43 kDa).

Die Elektrophorese findet unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptoethanol statt. Mercaptoethanol ist eine reduzierende Substanz, die S-S Bindungen im Protein löst und somit die Tertiärstruktur des Proteins aufhebt. SDS bindet an die hydrophoben Bereiche des Proteins und führt so zu dessen Denaturierung und Linearisierung. Die Menge an SDS und somit der negativen Ladungen, die an ein Protein binden, sind proportional zu dessen Molekulargewicht. Somit können die Proteine nun unabhängig von ihrer ursprünglichen Konformation und Ladung in einem Spannungsfeld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladenen, denaturierten Proteine wandern zur Anode, wobei kleine Proteine leichter durch das Polyacrylamid Netzwerk gelangen als große und somit schneller laufen.

Die einzelnen Chemikalien werden in den entsprechenden Mengen zusammenpipettiert. Am Schluss wird jeweils TEMED und der Radikalbildner APS zugegeben. Dies bewirkt eine Polymerisierung des Gels. Deshalb wird dies zunächst für das Trenngel durchgeführt und die noch flüssige Lösung möglichst zügig zwischen zwei, durch Spacer getrennte Glasplatten (8 x 11 cm) bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen. Zur Ausbildung einer geraden Front wird das Trenngel mit Wasser überschichtet. Nach vollständigem Polymerisieren des Trenngels wird das Wasser abgegossen und das mit TEMED und APS versetzte Sammelgel dazugefügt. In dieses wird noch vor dessen Polymerisierung ein Teflonkamm eingefügt.

Die Proteinlösung wird vor Beladen des Gels mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min aufgeköcht. Anschließend werden die Proben auf das Gel aufgetragen, welches zuvor in eine mit 1 x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebaut wurde. Die Elektrophorese wird mit einer anliegenden Spannung von 150 - 200 V durchgeführt und beendet, wenn die Blaufront aus dem Gel ausläuft.

Als Molekulargewichtsstandard werden 10 µl Precision Plus Protein™ All Blue Standards (Biorad) aufgetragen. Dieser Marker kann beim anschließenden Western-Blot mitgeblottet werden.

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

Färbelösung:	45 % EtOH 10 % Essigsäure 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250
Entfärben:	10 % Essigsäure

Für die Färbung wird das Gel für ca. 20 min in der Färbelösung geschwenkt. Zum Entfärben wird das Gel in der 10 % Essigsäure geschwenkt (2 – 3 x für 20 min) bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund absetzen.

4.2 Präparation von Gesamtzellprotein

Eine ÜN-Flüssigkultur (vgl D.1.2) von *H. pylori* wird abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in einer geeigneten Menge Lysispuffer (200 µl - 1 ml, je nach Größe des Pellets) resuspendiert und die Suspension für 10 min bei RT inkubiert. Alternativ können auch *H. pylori*-Zellen, die auf Columbia-Blutagarplatten angezogen wurden, direkt in den Lysispuffer gegeben werden. Der Lysispuffer setzt sich folgendermaßen zusammen:

65 mM DTE oder DTT
4 % CHAPS
9 M Harnstoff
35 mM Tris
Spur von 0,5 % Bromphenolblau

Nach 10 minütiger Inkubation wird die Suspension für 3 - 5 min bei 15000 rpm und RT abzentrifugiert. Die Zelltrümmer sedimentieren und bilden ein Pellet, wohingegen sich die Proteine im Überstand befinden. Dieser proteinhaltige Überstand wird abgenommen und bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert.

4.3 Überexpression von Proteinen

4.3.1 Überexpression mit Hilfe des pQE30 Plasmids

Mit Hilfe des Vektors pQE30 der Firma Qiagen kann ein Fusionsprodukt exprimiert werden, welches aus dem zu reinigenden Protein und einem N-terminalen His₆-tag besteht. Über diesen His₆-tag kann eine Aufreinigung des Proteins über eine Ni-NTA-Agarose-Säule erfolgen. Das Gen, welches das gewünschte Protein codiert, steht in dem „low-copy“-Plasmid unter der Kontrolle eines Promotors, der aus dem Promotor des T5-Phagen und zwei Sequenzabschnitten des *lac*-Operators zusammengesetzt ist. Dieser Promotor ist durch die Zugabe von IPTG induzierbar. Eine synthetische Ribosomenbindestelle sorgt für eine hohe Translationsrate und zwei starke Transkriptions-Terminatoren verhindern ein „read-through“ und stabilisieren das Expressionsprodukt. Der pQE30 Vektor trägt ein Gen, welches die Resistenz gegen Ampicillin vermittelt. Die Überexpression mit Hilfe dieses Vektors findet im Stamm *E. coli* M15 statt. Dieser Stamm trägt das „high-copy“-Plasmid pREP4, welches das Gen für den *lac*-Repressor codiert. Auf diese Weise wird in Abwesenheit von IPTG eine unkontrollierte Expression des zu reinigenden Proteins verhindert. pREP4 trägt ein Kanamycinresistenzgen.

Zur Überexpression des rekombinanten Proteins wird 1 l LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin; 50 µg/ml Kanamycin) mit 20 ml einer entsprechenden Übernachtskultur inokuliert und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 - 0,8 angezogen. Zu diesem Zeitpunkt wird ein Aliquot von 1 ml als Negativkontrolle entnommen, welches bis zur abschließenden Ernte der Bakterien weiter inkubiert wird. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt durch die Zugabe des Laktose-Analogons IPTG (Endkonzentration 1mM). IPTG bindet an den *lac*-Repressor, dieser löst sich vom Promotor und die Expression des Proteins kann stattfinden. Die Kultur wird nach der Zugabe von IPTG für ca. 3 h bei 37 °C weiter inkubiert. Vor der Ernte wird ein weiteres 1 ml Aliquot als Positivkontrolle entnommen. Die Bakterienkultur wird nach der Induktion für 15 min in einem JA-10 Rotor bei 5000 rpm und bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wird mit 20 ml kaltem French-Press Puffer (s. D.4.4.1) gewaschen und die Suspension erneut für 10 min bei 5000 rpm und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert werden.

Die Kontrollpellets werden in 100 µl Lämmli-Puffer resuspendiert, 5 min bei 100 °C aufgeköcht und anschließend auf Eis gehalten. 20 µl der Ansätze werden über ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (D.4.1) und das Gel wird gefärbt. Eine Überexpression sollte in der Positivkontrolle deutlich zu sehen sein.

4.3.2 Überexpression mit Hilfe des pGEX-3X Plasmids

Auch bei pGEX-3X handelt es sich um ein IPTG induzierbares Plasmid. Dieses Plasmid enthält den *lac*-Operator, eine Sequenz, die für den Lac-Repressor codiert, ein Gen *bla*, welches für die β-Lactamase codiert und auf diese Weise die Resistenz gegen Ampicillin vermittelt sowie das Gen *gst*, welches für die Glutathion-S-Transferase (GST) codiert. Der DNA-Abschnitt, der für das zu reinigende Protein codiert, wird im Leserahmen hinter des *gst*-Gen des Vektors kloniert. Das erhaltene Fusionsprotein trägt N-terminal das GST-Protein und kann mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden. Die Überexpression erfolgt im Stamm *E. coli* DH5α prinzipiell entsprechend der Anleitung zur Überexpression mit Hilfe des pQE30 Plasmids (D.4.3.1). Jedoch wird das verwendete Medium nur mit Ampicillin (100 µg/ml Ampicillin) supplementiert und nach der Induktion mit 1 mM IPTG wird die Kultur bei 30 °C weiter inkubiert.

4.4 Reinigung von Proteinen

4.4.1 Zellaufschluss

Zellaufschluss durch die French-Press

French-Press(FP)-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	50 mM KCl
	5 mM MgCl ₂
	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 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 $MgCl_2$ 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) 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).

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 µl 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) 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.

4.4.2 Proteinreinigung über die HisTrapTM HP Säule über die ÄKTA-Prime

Das Prinzip dieses Proteinreinigungsverfahrens 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. 6).

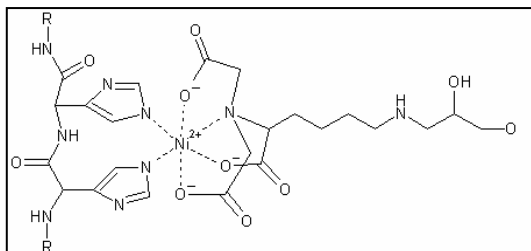


Abb. 6: Interaktion zwischen Ni-NTA und zwei Histidinresten

Verwendete Puffer:

Basispuffer:	50 mM TrisHCl (pH 7,5) 50 mM KCl 5 mM MgCl ₂ (bei der Aufreinigung von Response-Regulatoren, wird zur Faltung des aktiven Zentrums benötigt) 10 % Glycerin 1 mM DTT
Elutionspuffer:	50 mM TrisHCl (pH 7,5) 50 mM KCl 5 mM MgCl ₂ (bei der Aufreinigung von Response-Regulatoren, wird zur Faltung des aktiven Zentrums benötigt) 10 % Glycerin 1 mM DTT 500 mM Imidazol
Dialysepuffer:	1 x PBS mit 20 % Glycerin 1 mM DTT
1 x PBS:	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄

Neben DTT wurde in manchen Fällen den Lösungen und Puffern noch der Proteaseinhibitor PMSF (1 mM) zugegeben.

Die ÄKTAprime der Firma Amersham Biosciences erlaubt die Automatisierung und Dokumentation von verschiedensten chromatographischen Verfahren. In dieser Arbeit wurde das Gerät dazu verwendet, um His₆-tag Proteine über eine HisTrapTM HP Säule (Amersham Biosciences) aufzureinigen. Alle verwendeten Lösungen müssen vor Gebrauch entgast werden, um die Bildung von Luftblasen in den Schläuchen der ÄKTA-Prime zu verhindern. Vor Beginn der Proteinaufreinigung wird das Schlauchsystem zunächst mit 20 % EtOH gereinigt, bevor die Säule entsprechend den Anweisungen des Herstellers in das Gerät eingebaut. Das ganze System wird anschließend mit dH₂O gespült. Die Proteinaufreinigung erfolgt entsprechend dem Protokoll des Herstellers zur Aufreinigung von His₆-tag Proteinen. Die Säule wird mit 10 ml Basispuffer äquilibriert (wird als Puffer A angeschlossen), bevor die Proteinlösung, die nach dem Zellaufschluss erhalten wurde, über einen „Loop“ auf die Säule geladen wird. Die Säule wird mit 100 ml 22 mM Imidazol gewaschen (die Waschlösung wird durch das Gerät selbst zusammengestellt aus Basispuffer A und 5 % Elutionspuffer, der als Puffer B angeschlossen wird), bis der Durchfluss bei einer OD₂₈₀ wieder das Basislevel erreicht hat. In einem linearen Gradienten von 22 bis 500 mM Imidazol und anschließend 500 mM Imidazol werden die Proteine eluiert (20 ml, gemischt aus Puffer A und B; Puffer B wird im Gradienten von 22 - 100 % zugegeben, dann 20 ml Puffer B) und die Fraktionen gesammelt. Anhand des angeschlossenen Schreibers kann anhand der Zunahme der optischen Dichte in den Fraktionen bestimmt werden, in welchen der Fraktionen das gereinigt Protein vorhanden sein sollte, jedoch wurden zur Sicherheit je 10 µl dieser Fraktionen zusammen mit 10 µl Lämmli-Puffer zunächst für 5 min bei 100 °C aufgeköcht und anschließend mittels SDS-Page und Coomassie-Färbung (D.4.1) auf Reinheit und Ausbeute überprüft. Geeignete Fraktionen werden vereinigt und gegen den Dialysepuffer dialysiert (1 x ca. 12 h; 1 x ca. 4 h). Die Proteinlösung wird dann aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die ÄKTAprime und die Säule werden nach Beendigung des Durchlaufs mit dH₂O und anschließend mit 20 % EtOH gespült. Die Säule kann mit Parafilm umwickelt im Kühlschrank gelagert werden und für eine erneute Aufreinigung des selben Proteins wieder verwendet werden.

4.4.3 Proteinreinigung über die Glutathion-Sepharose 4B Säule

4.4.4 Vorbereitung der Säule

5 ml der Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) werden auf die Säule gegeben und gründlich mit dH₂O gewaschen, da es vom Hersteller als Suspension in 20 %igem Ethanol geliefert wird. Anschließend wird die Matrix gründlich mit kaltem 1 x PBS gespült. Die Schlauchklemme wird geschlossen und es werden 15 ml 1 x PBS auf die Säule gegeben. Nachdem sich die Matrix sedimentiert hat, wird der Stempel luftblasenfrei aufgesetzt und die Säule nochmals mit 50 ml 1 x PBS äquilibriert.

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 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 Mixers, die mit der Säule verbunden ist, während in die andere Hälfte Glutathion-Elutionspuffer gegeben wird. Das Eluat wird in 1,2 ml-Fraktionen aufgefangen. Es ist ratsam nach Anlegen des Gradienten nochmals einige Fraktionen zu sammeln, bei denen reiner Glutathion-Elutionspuffer eingesetzt wird, um sicherzustellen, dass auch wirklich die ganze Proteinmenge eluiert wird. 30 µl-Aliquots jeder zweiten Elutionsfraktion, vom Durchfluss und von den Waschfraktionen werden mit 10 µl Laemmli-Puffer versetzt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Fraktionen, die das Protein in möglichst reiner Form enthalten, werden vereinigt im Kühlraum gegen Dialysepuffer (vgl. D.4.4.2) dialysiert. Dadurch wird das Glutathion aus der Proteinlösung entfernt und die Glycerinkonzentration für die Lagerung des Proteins bei -80 °C auf 20 % erhöht.

4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein Protein-Assay der Firma Biorad verwendet, der ursprünglich auf einem von Bradford entwickelten Prinzip beruht, aber mittlerweile modifiziert wurde. Dieses Messverfahren nutzt die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250, Komplexe mit Proteinen in saurer Lösung zu bilden, deren Absorptionsmaxima bei einer OD von 595 nm liegen.

Zur Erstellung einer Eichgeraden werden verschiedenen Mengen BSA (1 - 10 µl) mit dH₂O auf ein Endvolumen von 800 µl gebracht und mit 200 µl Farbstofflösung G250 versetzt. Die Konzentration des dafür eingesetzten Proteins BSA ist bekannt und liegt bei 1 µg/µl. Ebenso werden je dreimal 2 µl und drei mal 5 µl einer 1:10 Verdünnung der zu untersuchenden Proteinlösung mit dH₂O und Farbstoff versetzt. Nach dem sorgfältigen Mischen der Ansätze werden die jeweiligen Absorptionswerte bei einer OD von 595 nm bestimmt; über die Eichgerade kann dann auf die vorliegenden Proteinkonzentrationen geschlossen werden.

4.6 Western-Blot

All-in-One-Puffer: 5,3 g Tris
 2,9 g Glycin
 0,37 g SDS
 100 ml EtOH abs.
 ad 1 l dH₂O

TBS/Tween-Lösung: 137 mM NaCl
 0,05 % Tween 20
 20 mM Tris-HCl, pH 7,6

TBS/Tween/Magermilchlösung: 3,6 g Magermilchpulver
 60 ml TBS/Tween-Lösung

ECL-Detektionsreagenz für	Reagenz 1 und Reagenz 2 unmittelbar vor
Meerrettich-Peroxidase:	Gebrauch im vom Hersteller angegebenen Verhältnis mischen

Beim Western-Blot nach Towbin et al. (1979) werden die Proteine, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Auf dieser fixiert, kann nun ein bestimmtes Protein mittels Antikörper detektiert werden.

Beim Western Blot befindet sich zuunterst die Anodenplatte, die mit dH₂O befeuchtet wird. Darauf werden drei dicke Whatmanpapiere (10 x 7 cm), die mit All-in-One-Puffer getränkt werden, gelegt. Als nächstes wird die Nitrocellulosemembran (9 x 6 cm) mit dH₂O äquilibriert und luftblasenfrei auf die Whatmanpapiere gelegt. Darauf wird das ebenfalls mit dH₂O befeuchtete Polyacrylamidgel luftblasenfrei aufgebracht. Es folgen wiederum drei zuvor mit All-in-one-Puffer versetzte Whatmanpapiere. Den Abschluss bildet die Kathodenplatte, die auch mit dH₂O befeuchtet wird. Dieser Aufbau wird nun für eine Stunde bei RT an eine Stromquelle angeschlossen (0,89 mA/cm², 100 V); die negativ geladenen Proteine wandern nun zur Anode und werden so auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

Nach Beendigung des Blottens wird die Markerspur abgeschnitten, die einzelnen Banden werden markiert, da das Markersignal mit der Zeit verblasst und der Markerstreifen wird für die spätere Größenbestimmung des Proteins aufbewahrt. Die Nitrocellulosemembran wird in 30 ml TBS/Tween/Magermilchpulver-Lösung überführt und für mind. zwei Stunden bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Die Blocklösung wird dann abgegossen, der Blot kurz in 1 x TBE geschwenkt und der erste Antikörper, verdünnt in TBS/Tween/Magermilchpulver, zugegeben. Es erfolgt eine mind. zweistündige Inkubation. In dieser Zeit bindet der erste AK spezifisch an das Protein. Durch drei Waschschrte (1 x 15 min, 2 x 5 min) bei RT mit TBS/Tween-Lösung werden nicht spezifisch gebundene AK entfernt. Es folgt eine mind. einstündige Inkubation der Membran in TBS/Tween/Magermilch-Lösung, in welcher der zweite Antikörper in der richtigen Verdünnung vorhanden ist. Der zweite AK bindet spezifisch an den ersten AK. An diesen zweiten AK gekoppelt ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase. Durch 5 Waschschrte (1 x 15 min, 4 x 5 min) in TBS/Tween-Lösung werden auch hier wieder die unspezifisch gebundenen AK entfernt.

Um den AK und somit das Protein zu detektieren, wird die Membran für 1 min mit Detektionsreagenz (Lösung 1 und Lösung 2; ECL Westernblotting Detection Reagents) bedeckt. Man benötigt ca. 0,125 ml Detektionsreagenz pro cm² Membran. Dieses enthält das Substrat für die Meerrettich-Peroxidase, welches in einer Licht emittierenden Reaktion umgesetzt wird. Dieses Lichtsignal wird mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert.

4.7 *in vitro* Phosphorylierung von Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren mit radioaktiv markiertem ATP

5 x Phosphorylierungspuffer:	250 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	250 mM KCl
	50 mM MgCl ₂

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) und anschließend autoradiographisch dargestellt. Unter Standardbedingungen werden folgende Ansätze zusammenpipettiert:

ATP-Mix:	ATP (10 mM, AmershamPharmacia):	10 µl
	γ ³³ P-ATP	
	(10 µCi/µl; 3000Ci /mmol):	25 µl
	dH ₂ O	ad 40 µl

Phosphorylierungsansatz (halber Ansatz):

5x Phosphorylierungspuffer:	5 µl
ATP-Mix:	5 µl
Response-Regulatoren:	5 µM
Histidin-Kinasen:	1 µM
dH ₂ O:	ad 25 µl

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 µl Laemmli-Puffer gestoppt

und 15 - 20 μ l der Ansätze über ein denaturierendes 15 %iges Polyacrylamid-Minigel aufgetrennt (D.4.1). Die Elektrophorese erfolgt bei 150 V und wird beendet, nachdem die Bromphenolblaufront das Gel verlässt. Nicht eingebautes radioaktiv markiertes ATP befindet sich dann im Puffer. 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.

E. Ergebnisse

1. Funktionelle Charakterisierung des Säuresensors ArsS von *H. pylori*

Das ArsRS Zweikomponenten-System spielt eine wichtige Rolle bei der Säurewahrnehmung in *H. pylori*. Die Histidin-Kinase (HK) ArsS nimmt Säure als einen Umweltreiz wahr, daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung, die wiederum zu einer Autophosphorylierung in der Transmitterdomäne der Kinase führt. Der Phosphatrest wird dann in einem weiteren Schritt auf den Response-Regulator (RR) ArsR übertragen. Der phosphorylierte RR ArsR~P ist für die Aktivierung bzw. Repression der Transkription der säureregulierten Target-Gene des ArsRS Regulons verantwortlich (Pflock et al., 2006). In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie die Kinase ArsS einen sauren pH-Wert als Umweltreiz wahrnehmen kann. Die Kinase kann in zwei funktionelle Bereiche unterteilt werden, eine periplasmatische Sensordomäne, flankiert von zwei Transmembrandomänen und eine cytoplasmatische Transmitterdomäne. Bei Absenken des pH-Wertes von pH 7 auf pH 5 kann eine Säureantwort in *H. pylori* beobachtet werden (Merrell et al., 2003; Bury-Moné et al., 2004; Pflock et al., 2006). Es ist bereits von mehreren Proteinen bekannt, dass sie durch Säure in ihrer Aktivität beeinflusst werden. So wird zum Beispiel der Harnstoffkanal UreI von *H. pylori* säureabhängig aktiviert, was eine Öffnung des Kanals und somit den Einstrom von Harnstoff ins Cytoplasma ermöglicht. Der Harnstoff wird durch das Enzym Urease in Ammoniak und CO₂ gespalten, Ammoniak gelangt durch Diffusion zurück in das Periplasma, wird dort protoniert zu Ammonium und puffert so den sauren pH-Wert ab. Der Zelle gelingt somit die Schaffung eines Mikromilieus, in welchem sie vor einem zu niedrigem pH-Wert geschützt ist. Die Aktivierung des UreI-Kanals erfolgt durch die Protonierung von Aminosäuren (AS) auf der periplasmatischen Seite des Kanals (Weeks et al., 2001; Bury-Moné et al., 2001). Mehrere AS können an ihren Seitenketten protoniert werden. Die Protonierung an den Seitenketten erfolgt bei unterschiedlichen pH-Werten, abhängig vom pK_a -Wert der Seitenkette der jeweiligen AS. Eine Zusammenstellung aller protonierbaren AS sowie deren Seitenketten- pK_a -Werte findet man in der Tab. 10.

Tab. 10: Zusammenstellung protonierbarer AS und deren Seitenketten- pK_a -Werte nach Taylor, 1986.

protonierbare AS	pK_a-Wert der Seitenkette
Arginin	12,5
Asparaginsäure	3,9
Cystein	8,2
Glutaminsäure	4,1
Histidin	6,0
Lysin	10,5
Tyrosin	10,5

Die Seitenketten der AS Arginin, Cystein, Lysin und Tyrosin sind aufgrund ihres hohen Seitenketten- pK_a -Wertes bereits bei pH 7 protoniert. Durch Absenken des pH-Wertes können nur die Seitenketten der AS Aspartat, Glutamat und Histidin von ihrer deprotonierten Form in die protonierte Form überführt werden. Jedoch ist Histidin mit einem pK_a -Wert von 6,0 die einzige AS, die bei einer Absenkung des pH-Wertes von pH 7 auf pH 5 protoniert wird. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Histidin-Kinase ArsS Säure durch die Protonierung von Histidinresten in ihrer periplasmatischen Sensordomäne wahrnimmt.

1.1 Konstruktion und Analyse verschiedener *H. pylori* 26695/arsS-X Mutanten, die unterschiedliche Allele des Gens *arsS* exprimieren

Um zu überprüfen, ob tatsächlich die Protonierung einzelner AS für die Säurewahrnehmung der Histidin-Kinase ArsS eine Rolle spielt, wurden einzelne AS der periplasmatischen Sensordomäne mittels punktgerichteter Mutagenese durch nicht protonierbare AS substituiert. In diesen Mutanten wurde die Säurewahrnehmung bei pH 5 durch Quantifizierung der Transkripte von gut charakterisierten Säure-induzierbaren Target-Genen des ArsRS Zweikomponenten-Systems wie *hp0119*, *hp1432* und *ureA* untersucht.

1.1.1 Konstruktion und Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ (X = 35, 44, 90, 93, 94, 118, 126)

In der Abb. 8 ist die AS-Sequenz der periplasmatischen Sensordomäne der Kinase ArsS zu sehen, welche aus den AS 26 - 133 des ArsS Proteins besteht.

```

      35           44
...YYFVSSQISHENYQNNRHYQFVTTINEILNNYSDYRAIEDYLYKIGFRETTIEN
LEKVLAKRRHQLEHHRNIGYAEVFKFSDMVFILLKKDEHFVLYKDLHSVSYRNY...
      90  93 94                               118       126

```

Abb. 8: AS-Sequenz der periplasmatischen Sensordomäne (AS 26-133) der Kinase ArsS. Die vorhandenen Histidinreste sind rot markiert. Die angegebenen Zahlen entsprechen der Position der Histidinreste im ArsS Protein.

In der periplasmatischen Sensordomäne des ArsS Proteins sind 7 Histidine vorhanden (Abb. 8), die aufgrund des Seitenketten pK_a -Wertes von 6,0 durch Protonierung unter sauren pH-Bedingungen zum Mechanismus der Säurewahrnehmung durch die Kinase ArsS beitragen könnten. Es wurden deshalb Aminosäureaustauschmutanten (AS-Austauschmutanten) konstruiert, bei denen jeweils ein Histidinrest durch die nicht protonierbare AS Glutamin (Q) ersetzt wurde. Insgesamt wurden 7 verschiedene AS-Austauschmutanten hergestellt, nämlich *H. pylori* 26695/arsS-H35Q, *H. pylori* 26695/arsS-H44Q, *H. pylori* 26695/arsS-H90Q, *H. pylori* 26695/arsS-H93Q, *H. pylori* 26695/arsS-H94Q, *H. pylori* 26695/arsS-H118Q und *H. pylori* 26695/arsS-H126Q. Im Folgenden werden die Mutanten kurz als *H. pylori* 26695/arsS-HXQ bezeichnet, wobei X für den jeweils ausgetauschten Histidinrest steht (X = 35, 44, 90, 93, 94, 118, 126).

Um die AS-Austauschmutationen einzuführen, wurde zunächst ein 502 bp Fragment mit den Primern *arsSID-5* und *arsSID-3* (ID = Inputdomäne) von chromosomaler *H. pylori* 26695 DNA aufamplifiziert, welches sich aus 19 bp der intergenischen Region zwischen *arsR* und *arsS* (dieser Bereich enthält die Shine-Dalgarno-Sequenz) sowie dem 5'-Ende des *arsS*-Gens, welches für die Transmembrandomäne 1 (TMD1), die periplasmatische Sensordomäne und die Transmembrandomäne 2 (TMD2) codiert, zusammensetzt. Das erhaltene Fragment, im Weiteren kurz als *arsSID* bezeichnet, wurde über die Schnittstellen *SmaI* und *BglII* in den Vektor pSL1180 kloniert. Die Erkennungssequenz für die *BglII*-Schnittstelle ist in der wildtypischen Sequenz des *arsS* Gens vorhanden, so dass gewährleistet ist, dass durch die Fusion der Fragmente *arsID* und *arsSTD* (TD = Transmitterdomäne) im weiteren Klonierungsvorgehen (s. unten) kein unerwünschter AS-Austausch in die Sequenz des *arsS*-Gens eingeführt wird.

Ausgehend von dem erhaltenen Plasmid pSL-arsSID wurden mit den Primern arsSID-5 und den Mutagenese Primern arsS-HXQ-1 (Fragment 1) bzw. arsSID-3 und den Mutagenese-Primern arsS-HXQ-2 (Fragment 2) zwei Fragmente aufamplifiziert. Bei den Mutagenese-Primern handelt es sich um 21 bp lange, zueinander komplementäre Oligonukleotide, in denen zentral die 3 bp, die normalerweise für die AS Histidin codieren, durch das Codon für die AS Glutamin ersetzt wurden. Eine Auflistung der für die Mutagenese verwendeten Primer findet man in der Tab. 11.

Tab. 11: Oligonukleotide, die zur Einführung der AS-Austauschmutationen in den Fragmenten arsSID-HXQ verwendet wurden (X = 35, 44, 90, 93, 94, 118, 126). Die Sequenz der einzelnen Primer findet man im Materialteil unter Punkt C.3 aufgelistet.

Mutation	Oligonukleotide
H35Q	arsS-H35Q-1/arsS-H35Q-2
H44Q	arsS-H44Q-1/arsS-H44Q-2
H90Q	arsS-H90Q-1/arsS-H90Q-2
H93Q	arsS-H93Q-1/arsS-H93Q-2
H94Q	arsS-H94Q-1/arsS-H94Q-2
H118Q	arsS-H118Q-1/arsS-H118Q-2
H126Q	arsS-H126Q-1/arsS-H126Q-2

Die beiden erhaltenen Fragmente wurden in einer weiteren PCR-Reaktion als Template verwendet. Über ihren 3'-Terminus (Fragment 1) bzw. 5'-Terminus (Fragment 2), die über die Mutagenese-Oligonukleotide definiert sind, können die beiden Fragmente überlappend aneinander hybridisieren, so dass nach Auffüllen der Überhänge vom freien 3'-OH Ende aus durch eine Amplifikation mit den Primern arsSID-5 und arsSID-3 erneut das komplette 502 bp arsSID-Fragment erhalten werden konnte. Die erhaltenden Fragmente sollten nun einen Aminosäureaustausch der jeweiligen Histidinreste zu Glutamin (HXQ) aufweisen. Die arsSID-HXQ-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bgl*III gespalten und in den Vektor pSL1180, der zuvor ebenfalls mit diesen beiden Enzymen verdaut wurde, ligiert. Die erhaltenen Plasmide pSL-arsSID-HXQ wurden sequenziert, um den jeweils gewünschten AS-Austausch zu bestätigen.

Im Folgenden wurden die Plasmide pSL-arsSID-HXQ mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bgl*III geschnitten und die erhaltenen Fragmente arsSID-HXQ in das Vorläuferplasmid pSL-arsSTD (TD = Transmitterdomäne), welches ebenfalls mit *Sma*I und *Bgl*III verdaut wurde, ligiert. Das Vorläuferkonstrukt setzt sich zusammen aus zwei für die homologe Rekombination benötigten flankierenden Fragmenten, bezeichnet als arsR und hp0163, einem weiteren Fragment, das für die Transmitterdomäne der HK ArsS codiert (arsSTD) und einer Cm^r (Chloramphenicol-Resistenz)-Kassette. Das 393 bp *Eco*RI/*Sma*I Fragment arsR (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar arsR-5/arsR-3) codiert für das 3'-Ende des Gens *arsR*, das 630 bp *Pst*I/*Sac*I Fragment hp0163 (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar 0163-5/0163-3) enthält 66 bp der intergenischen Region zwischen *arsS* und *hp0163* sowie das 5'-Ende des Gens *hp0163*. Zwischen den flankierenden Bereichen befindet sich eine 725 bp nicht polare Cm^r-Kassette von *C. coli* (Wang und Taylor, 1990) mit *Xba*I/*Pst*I-Termini (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar Cm-I/Cm-II) die keinen Terminator besitzt, so dass die RNA-Synthese der stromabwärts gelegenen Gene *hp0163* und *hp0162*, die Teil des *arsRS-hp0163-hp0162*-Operons sind, gewährleistet ist. Stromaufwärts der Cm^r-Kassette befindet sich das 820 bp lange *Bgl*III/*Xba*I arsSTD-Fragment (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar arsSTD-5/arsSTD-3).

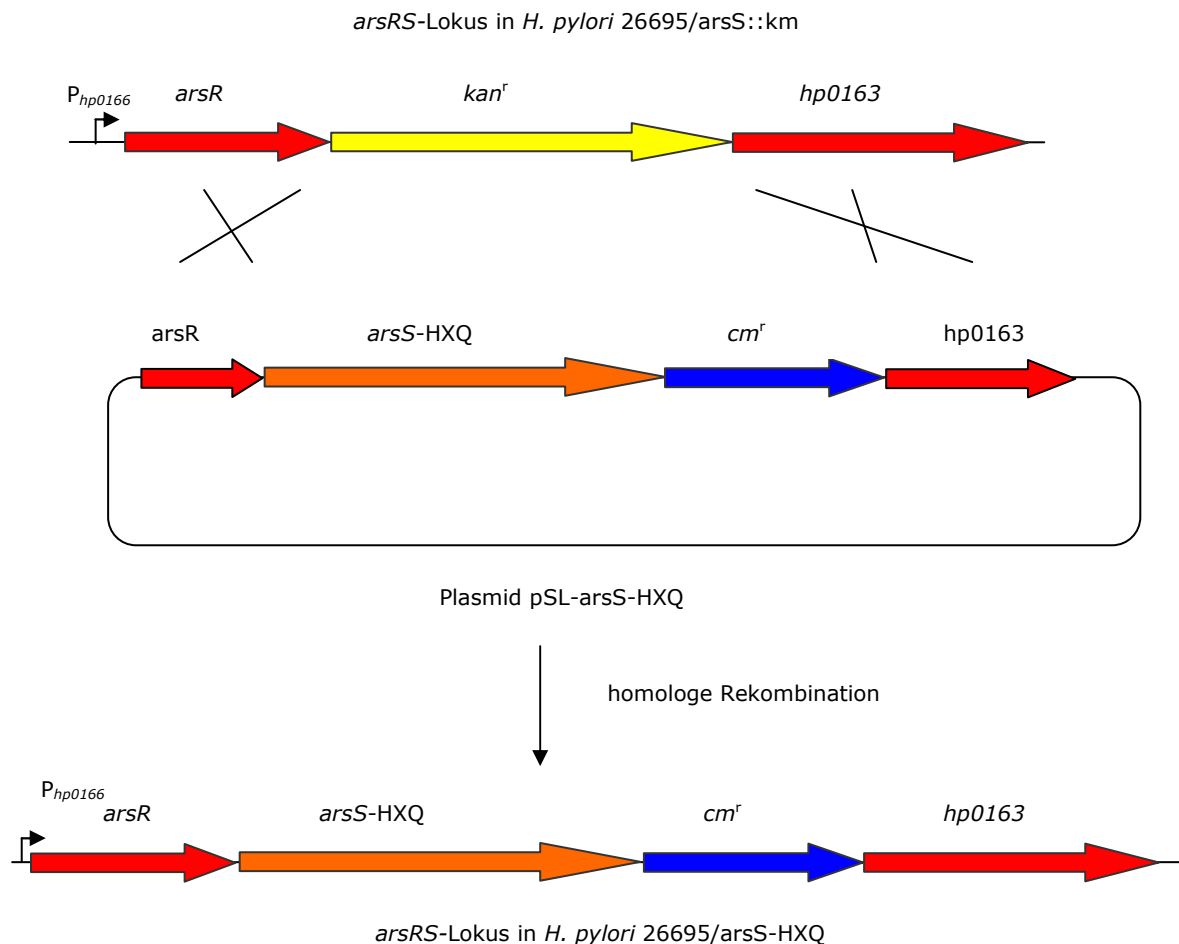


Abb. 9: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Konstruktion der Mutanten *H. pylori* 26695/*arsS*-HXQ. Nach der Transformation von *H. pylori* 26695/*arsS*::*km* mit dem Plasmid pSL-*arsS*-HXQ wird durch Rekombination der flankierenden Bereiche *arsR* und *hp0163* mit den homologen Bereichen des bakteriellen Genoms (dargestellt durch überkreuzte Striche) eine Genkopie des modifizierten Gens *arsS*-HXQ zusammen mit dem Selektionsmarker *Cm^r* in den *arsRS*-Lokus integriert.

Nach der Integration der *arsSID*-HXQ Fragmente in das Vorläuferkonstrukt erhielt man die Plasmide pSL-*arsS*-HXQ. Da die Verknüpfung zwischen dem *arsSID*- und dem *arsSTD*-Fragment über eine im *arsS*-Gen natürlicherweise vorhandene *Bg*/III-Schnittstelle erfolgte, liegen in den Plasmiden pSL-*arsS*-HXQ *arsS*-Allele vor, die sich nur durch die jeweils gezielt eingeführte HXQ AS-Austauschmutation in der periplasmatischen Sensordomäne vom wildtypischen *arsS* Gen unterscheiden. Die *ArsS*-Deletionsmutante *H. pylori* 26695::*km*, in welcher durch Transformation des Wildtyps (WT) *H. pylori* 26695 mit dem Plasmid pSL-165::*km* (Beier und Frank, 2000) das Gen *arsS* durch eine *Kan^r* (Kanamycin-Resistenz)-Kassette ersetzt worden war, wurde mit den Plasmiden pSL-*arsS*-HXQ transformiert. Durch homologe Rekombination wurde die *Kan^r*-Kassette in der *ArsS*-Deletionsmutante durch ein Allel *arsS*-HXQ und die *Cm^r* (Chloramphenicol-Resistenz)-Kassette ersetzt, es entstanden die AS-Austauschmutanten *H. pylori* 26695/*arsS*-HXQ. Die Rekombinationsereignisse, die zum Allelaustausch führen, sind in der Abb. 9 schematisch dargestellt.

Zusätzlich wurde nach der oben beschriebenen Vorgehensweise noch eine Kontrollmutante *H. pylori* 26695/*arsS*-HO konstruiert, in welcher die *Kan^r*-Kassette der *ArsS*-Deletionsmutante durch ein wildtypische *arsS*-Allel und eine *Cm^r*-Kassette substituiert wurde. Durch die Konstruktion dieser Mutante, die sich verhalten sollte wie der WT *H. pylori* 26695, sollte

gewährleistet werden, dass evtl. auftretende Unterschiede in der Säurewahrnehmung tatsächlich auf den Austausch einer speziellen AS zurückgeführt werden können und es sich nicht um ein Artefakt infolge der angewandten Klonierungsstrategie handelt.

In den AS-Austauschmutanten wurde via PCR überprüft, ob die Integration der *arsS*-HXQ-Allele in den *arsRS*-Lokus wie erwartet stattgefunden hatte. In der Tab. 12 sind die für die Charakterisierung der Mutanten verwendeten Primerkombinationen sowie die erwarteten Fragmentlängen aufgelistet. Die Oligonukleotide *arsR*-ext-5 und *hp0163*-ext-3 binden auf dem bakteriellen Chromosom außerhalb des klonierten Bereichs der flankierenden Fragmente *arsR* und *hp0163*.

Tab. 12: Verwendete Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/*arsS*-HXQ

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge
1) <i>arsR</i> -ext-5/ <i>arsSID</i> -3	1025 bp
2) <i>arsSID</i> -5/ <i>Cm</i> -int-1	1562 bp
3) <i>Cm</i> -int-2/ <i>hp0163</i> -ext-3	750 bp

In der Abb. 10 ist die Position der verwendeten PCR-Primer relativ zu den Gensequenzen schematisch angegeben.

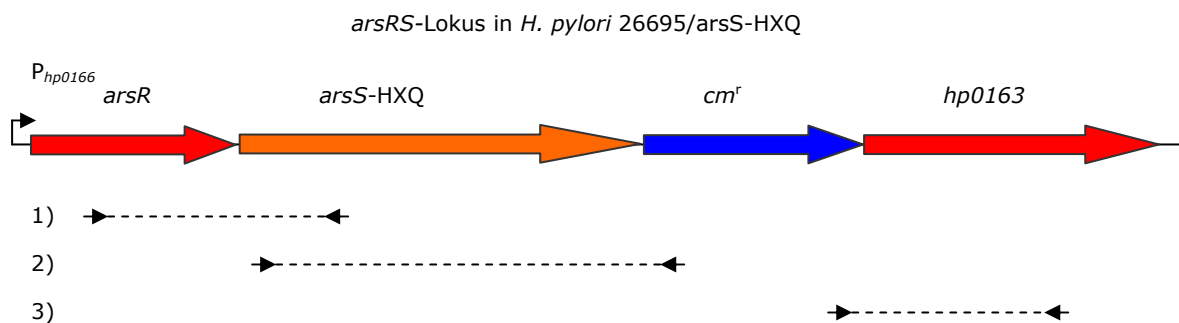


Abb. 10: Schematische Darstellung der Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide für die Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/*arsS*-HXQ. Durch Integration der Allele *arsS*-HXQ zusammen mit dem Selektionsmarker *Cm^r* in den *arsRS*-Lokus der Mutante *H. pylori* 26695/*arsS*::*km* entstand die Mutante *H. pylori* 26695/*arsS*-HXQ, deren *arsRS*-Lokus hier dargestellt ist. Für die PCR-Analyse wurden drei verschiedene Primerkombinationen eingesetzt.

In der PCR-Analyse (Abb. 11) wurden mit den Primerkombinationen 1), 2) und 3) Fragmente der erwarteten Länge von 1025 bp, 1562 bp bzw. 750 bp aufamplifiziert. Der jeweilige AS-Austausch in der Sensordomäne der Kinase *ArsS* in den AS-Austauschmutanten wurde über eine Sequenzierungsreaktion der via PCR amplifizierten *arsSID*-Fragmente bestätigt.

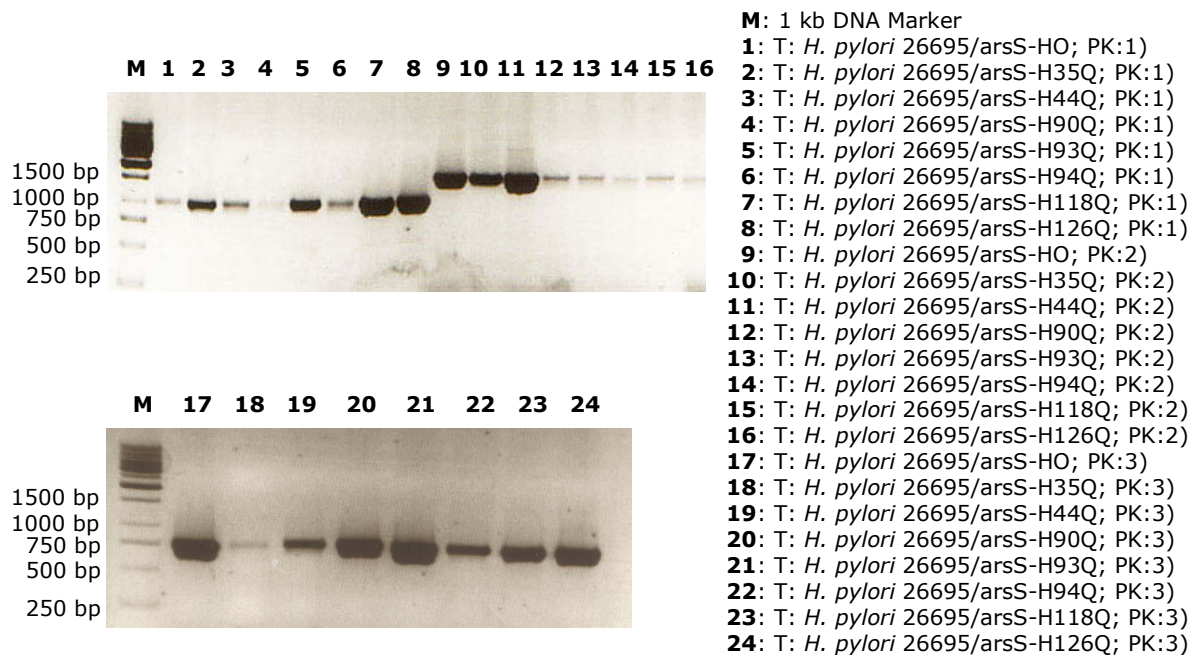


Abb. 11: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ und *H. pylori* 26695/arsS-H0. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 12 beschriebenen und in der Abb. 10 schematisch eingezeichneten Primerkombinationen verwendet, um die Integration der *arsS*-HXQ-Allele bzw. der wildtypischen *arsS*-Genkopie zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *arsRS*-Lokus der Mutanten zu verifizieren.

1.1.2 Analyse der pH-abhängigen Transkription der ArsRS Target-Gene *hp0119*, *hp1432* und *ureA* in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ

Die Säurewahrnehmung der HK ArsS-HXQ wurde in den einzelnen AS-Austauschmutanten analysiert, indem die säureabhängige Induktion der Transkription von gut charakterisierten Target-Genen des ArsRS Zweikomponenten-Systems, nämlich von *hp1432*, *hp0119* und *ureA* (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2004; Pflock et al., 2005) untersucht wurde. Die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ wurden über Nacht in BHI Flüssigmedium bei pH 7 inkubiert und am nächsten Morgen in der logarithmischen Phase nach Erreichen einer $OD_{590} = 0,70 - 0,75$ für eine Stunde in BHI-Medium bei pH 5 weiter inkubiert. In dieser Zeit sollte eine vollständige Säureantwort auf Transkriptebene stattgefunden haben. Diese Vorgehensweise wurde auch für alle weiteren Experimente angewandt, in welchen die Transkription bei sauren pH-Bedingungen analysiert wurde. Die bei pH 7 untersuchten Bakterien wurden bis zu einer $OD_{590} = 0,80 - 0,85$ inkubiert, bevor sie abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Aus den Bakterienpellets wurde Gesamtzell-RNA isoliert und diese RNA für Primer-Extension(PE)-Analysen verwendet. Als PE-Sonden wurden die Oligonukleotide *hp0119*-PE, *hp1432*-PE und *ureA*-PE eingesetzt. Das PE-Experiment wurde für jedes der untersuchten Gene mit mind. zwei voneinander unabhängig isolierten RNA-Präparationen durchgeführt. Die Abb. 12 zeigt repräsentative Autoradiogramme dieser Transkriptionsanalysen.

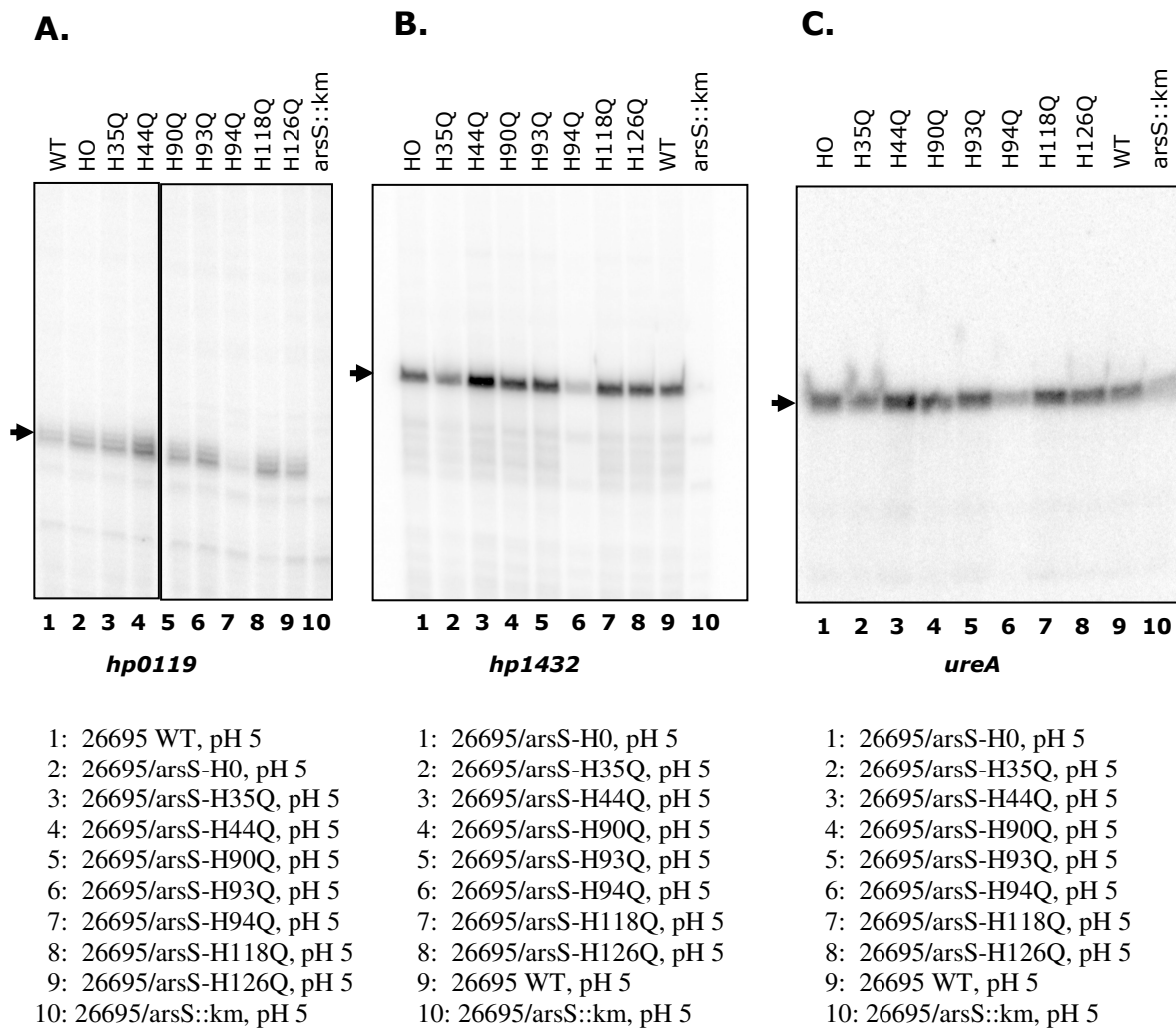


Abb. 12: PE-Analysen der AS-Austauschmutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ sowie der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0. Untersucht wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* (A), *hp1432* (B) sowie *ureA* (C), die Teil des ArsRS-Regulons sind, bei pH 5. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA für die Transkriptionsanalysen eingesetzt. Die *hp0119*-, *hp1432*- und *ureA*-spezifischen Transkripte sind durch einen schwarzen Pfeil links neben der Abb. markiert.

Die Ergebnisse der Transkriptionsstudien (Abb. 12) zeigen, dass sich die Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 (Spuren A2, B1, C1) nach Exposition bei pH 5 erwartungsgemäß so verhält wie der Wildtyp (Spuren A1, B9, C9). Ein Einfluss der zu Klonierungszwecken eingeführten Restriktionsschnittstellen in den *arsRS*-Lokus sowie der in das *arsRS-hp0163-hp0162*-Operon integrierten Cm^r -Kassette auf die Transkription von säureabhängigen Target-Genen des ArsRS-Regulons kann somit ausgeschlossen werden. Auch die AS-Austauschmutanten *H. pylori* 26695/arsS-H35Q, *H. pylori* 26695/arsS-H90Q, *H. pylori* 26695/arsS-H93Q, *H. pylori* 26695/arsS-H118Q und *H. pylori* 26695/arsS-H126Q verhalten sich bzgl. der säureinduzierten Transkription von *hp0119*, *hp1432* und *ureA* wie der Wildtyp. In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H44Q (Spuren A4, B3, C3) fand eine ca. zweifach stärkere Transkription der Gene *hp0119*, *hp1432* (Quantifizierung erfolgte mit der Typhon-Software) und *ureA* (nicht quantifiziert) bei pH 5 statt als in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 oder im WT *H. pylori* 26695 unter sauren pH-Bedingungen. Für die Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q (Spuren A7, B6, C6) konnte eine Verminderung der Säureantwort um den Faktor 4 (quantifiziert für die Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432*) beobachtet werden. Jedoch kann für die Gene *hp0119* und *hp1432* in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-

H94Q (Spur A6 bzw. B7) eine stärkere Transkription beobachtet werden als für die ArsS Deletionsmutante *H. pylori* 26695/arsS::km. In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q ist somit durch die Einführung des AS-Austauschs H94Q die Säurewahrnehmung zwar signifikant vermindert, jedoch nicht komplett ausgeschaltet.

In den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* und *ureA* auch unter neutralen pH-Bedingungen mittels PE-Experimenten analysiert. Im Fall des Gens *hp0119* kann weder im WT *H. pylori* 26695 und der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 noch in einer der AS-Austauschmutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ eine Transkription beobachtet werden (Ergebnis nicht dargestellt). Die Transkriptionsanalyse des Gens *ureA* mit dem Primer ureA-PE ist in der Abb. 13 zu sehen.

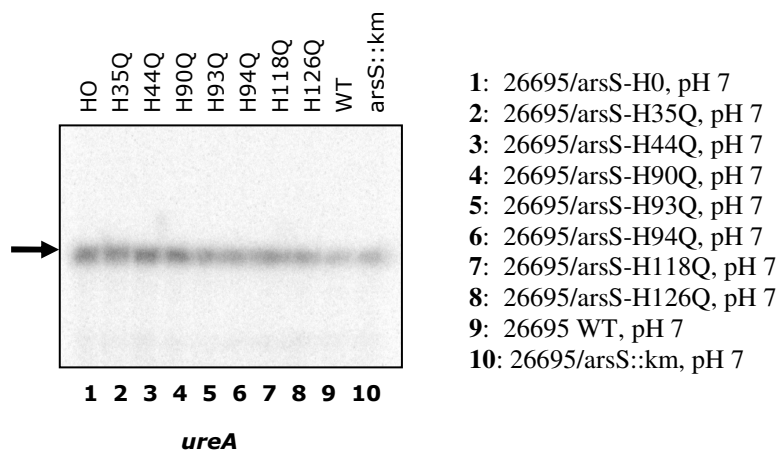


Abb. 13: PE-Analyse der Aminosäureaustauschmutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ bei pH 7. Untersucht wurde die Transkription des Target-Gens *ureA* bei pH 7. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA für die Transkriptionsanalysen eingesetzt. Das *ureA*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Die PE-Experimente (Abb. 13) ergaben, dass sich die Transkription des Gens *ureA* in den AS-Austauschmutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ (Spuren 2-8) nicht von der Transkription der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 unterscheidet (Spur 1). Man kann somit davon ausgehen, dass ein AS-Austausch von Histidin nach Glutamin in keiner der Mutanten einen Einfluss auf die Transkription der untersuchten Gene *hp0119* und *ureA* unter neutralen pH-Bedingungen hat. Zusammen mit den in der Abb. 12 dargestellten Ergebnissen kann man postulieren, dass der Histidinrest H94 eine signifikante Rolle bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS spielt.

1.1.3 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A

Die Bedeutung des Histidinrestes H94 bei der Säurewahrnehmung durch die HK ArsS sollte durch die Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A bestätigt werden. In dieser Mutante wurde der Histidinrest H94 durch Alanin (A), eine wie Glutamin nicht protonierbare AS, ersetzt. Diese AS-Austauschmutante wurde, wie unter Punkt 1.1.1 für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ beschrieben, hergestellt. Bei den für die Mutagenese verwendeten Primern handelt es sich um die Oligonukleotide arsS-H94A-1 und arsS-H94A-2.

Von der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A wurden 3 Klone mittels PCR charakterisiert (Abb. 14), um zu überprüfen, ob die Integration des arsS-H94A-Allels in den arsRS-Lokus

wie gewünscht stattgefunden hat. Hierbei wurden dieselben Primerkombinationen verwendet wie unter Punkt 1.1.1 in der Tabelle 12 angegeben.

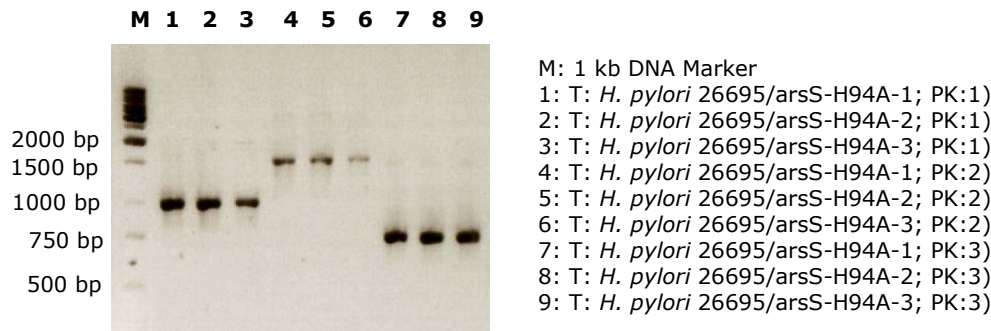


Abb. 14: Ergebnis der PCR-Analysen zur Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94A-1,-2 und -3. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 12 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration des *arsS*-H94A-Allels zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *arsRS*-Lokus zu verifizieren. Links neben der Abb. sind die Längen des verwendeten 1 kb DNA Markers aufgeführt.

Die PCR-Analysen (Abb. 14) ergaben, dass die Integration des *arsS*-H94A-Allels zusammen mit dem Selektionsmarker, der Cm^r -Kassette, in den *arsRS*-Lokus wie gewünscht stattgefunden hat. Für die weiteren Analysen wurde der Klon *H. pylori* 26695/arsS-H94A-1 verwendet, in welchem der AS-Austausch H94A mittels Sequenzierung des via PCR amplifizierten *arsSID*-Fragments bestätigt wurde. Im Folgenden wird dieser Klon kurz als *H. pylori* 26695/arsS-H94A bezeichnet.

Die Transkription der Gene *hp0119* bzw. *hp1432* wurde in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A anhand von mind. drei unabhängig voneinander isolierten RNA-Präparationen mit der säureinduzierten Transkription dieser *ArsRS*-Target-Gene im WT *H. pylori* 26695 bzw. in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 verglichen. Repräsentative Ergebnisse der durchgeführten PE-Analysen sind in der Abb. 15 zu sehen.

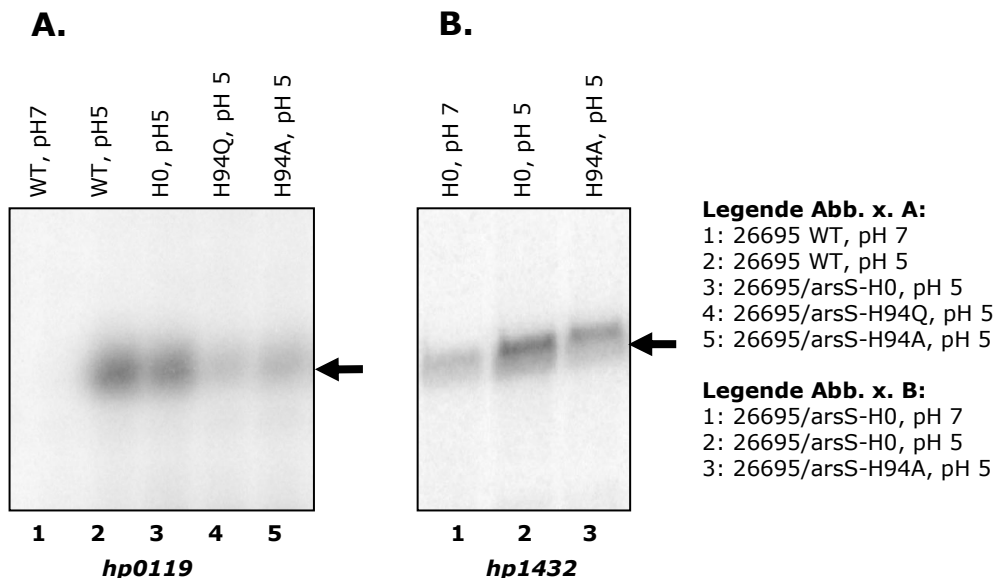


Abb. 15: Analyse der Transkription der *ArsRS* Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B) in der AS-Austauschmutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A bei pH 5. Die PE-Analysen wurden mit den Primern *hp0119*-PE bzw. *hp1432*-PE durchgeführt. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Das *hp0119*- bzw. *hp1432*-Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil rechts neben den Abb. markiert.

Die Transkriptanalysen der Gene *hp0119* (Abb. 15A) und *hp1432* (Abb. 15B) zeigten deutlich, dass auch in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A (Spuren A4 und B3) eine

verminderte Transkription dieser Gene im Vergleich zum WT *H. pylori* 26695 (Spur A2) und der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 (Spuren A3 und B2) bei einem pH-Wert von 5 beobachtet werden kann. Sowohl für das Gen *hp0119* als auch für das Gen *hp1432* konnte jedoch in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A unter sauren pH-Bedingungen mehr Transkript nachgewiesen als im WT bzw. in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 unter neutralen pH-Bedingungen.

1.1.4 Funktionelle Analyse der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q mittels RNA-Microarray-Analysen

Zur weiteren Bestätigung der These, dass der Histidinrest H94 eine wichtige Rolle bei der Säurewahrnehmung durch die HK ArsS spielt, wurden RNA-Microarray(MA)-Analysen durchgeführt, in welchen das komplette Transkriptom der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 mit dem der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q bei sauren pH-Bedingungen verglichen wurde. Die Bakterien wurden über Nacht in BHI bei pH 7 bis zu einer $OD_{550} = 0,70 - 0,75$ angezogen und danach für eine Stunde in BHI bei pH 5 inkubiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Gesamtzell-RNA wurde entsprechend Punkt D.3.1 isoliert. Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA mit dem RNA-Extraction-Kit von Qiagen aufgereinigt. Zunächst wurde mittels PE-Analysen überprüft, ob in den entsprechenden Kulturen eine ausreichende Säureinduktion stattgefunden hatte. In der Kontrollmutante war erwartungsgemäß deutlich mehr *hp1432*-spezifisches Transkript zu sehen als in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q (Ergebnis nicht dargestellt). Von jeder Mutante wurde eine RNA-Präparation mittels MA-Analysen untersucht, wobei jede RNA einmal mit Cy3 bzw. Cy5 gelabelt wurde („Dye-Switch“). Da auf jedem Array jedes Gen zweimal gespottet ist, wurden auf diese Weise vier Datensätze ermittelt. In der Tabelle 13 ist das Ergebnis der MA-Analysen zusammengefasst, es sind nur solche Gene aufgeführt, bei denen mind. 3 als positiv „geflaggte“ Spots eine Ratio (= Transkriptmenge *H. pylori* 26695/arsS-H94Q/Transkriptmenge *H. pylori* 26695/arsS-H0) von kleiner 0,5 bzw. größer 2,0 aufweisen.

16 Gene sind in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q schwächer exprimiert als in der Kontrollmutante und nur zwei Gene sind stärker exprimiert. Bei den schwächer exprimierten Genen handelt es sich ausschließlich um Gene, die bereits als Target-Gene des ArsRS-Regulons identifiziert wurden (Pflock et al., 2006) und die als stark säureabhängig reguliert bezeichnet werden können. Durch dieses Ergebnis kann eine Funktion des Histidinrestes H94 bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS weiter bestätigt werden.

Tab. 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der MA-Analysen zur Charakterisierung der Säureantwort in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q. In Teil A) der Tabelle findet man die Gene aufgelistet, die in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q weniger stark exprimiert werden als in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0, in Teil B) der Tabelle sind die Gene aufgelistet, die in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q stärker exprimiert werden als in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0. Die Ratio beschreibt das Verhältnis der Transkriptmenge eines Gens in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q zur Transkriptmenge in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H0. ORF: Open reading frame; m: monocystonisch; op: Operon; ?: vermutlich als m oder op organisiert.

A) In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q im Vergleich zur Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 weniger stark exprimierte Gene.

Kategorie	ORF	Ratio	Genfunktion	Genom-Organisation
Ammoniak Produktion und pH-Homöostase	HP0072	0,25	Urease Untereinheit B, <i>ureB</i>	op hp0072-hp0073
	HP0294	0,26	Aliphatische Amidase, <i>amiE</i>	m
	HP1238	0,11	Formamidase, <i>amiF</i>	m
Zellhülle	HP0078	0,36	verkürztes äußeres Membranprotein, <i>omp3</i>	op hp0078-hp0079
	HP0079	0,32	äußeres Membranprotein, <i>omp3 (hor3)</i>	op hp0078-hp0079
Energie-Metabolismus	HP0642	0,17	NAD(P)H-Flavin Oxidoreductase	op hp0640-hp0642
	HP1222	0,49	D-Lactat-Dehydrogenase, <i>dld</i>	op hp1222-hp1220
Transport- und Bindeproteine	HP0228	0,47	potentielle Sulfat-Permease	m
	HP1432	0,21	Histidinreiches Protein	m
hypothetische Proteine	HP0081	0,35	hypothetisches Protein	m
	HP0118	0,40	hypothetisches Protein	m
	HP0120	0,38	hypothetisches Protein	m
	HP0641	0,26	hypothetisches Protein	op hp0640-hp0642
	HP0731	0,31	hypothetisches Protein	op hp0733-hp0731
	HP1187	0,45	hypothetisches Protein	m
	HP1188	0,39	hypothetisches Protein	m

B) In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q im Vergleich zur Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 stärker exprimierte Gene

DNA-Metabolismus	HP0548	3,53	putative DNA-Helicase	op hp0547-hp0548?
Energie-Metabolismus	HP1135	2,11	ATP Synthase F1, Delta-Untereinheit, <i>atpH</i>	op hp1137-hp1123

1.1.5 Konstruktion und Analyse der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94R

Wenn die Protonierung von H94 für die Säurewahrnehmung durch die Kinase ArsS eine entscheidende Rolle spielt, wäre denkbar, dass der Austausch von H94 hin zu einer positiv geladene AS zu einem konstitutiv aktiven Zustand der HK ArsS bei pH 7 führt. Monika Götz konstruierte unter Verwendung der Mutagenese-Primer arsS-H94R-1 und arsS-H94R-2 die Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94R wie unter Punkt 1.1.1 für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ beschrieben. In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94R ist der Histidinrest H94 durch die positiv geladene AS Arginin (R) substituiert. Die Transkription der Target-Gene *hp0119* und *hp1432* wurde in dieser Mutante bei neutralem pH-Wert und bei pH 5 analysiert und mit der Transkription dieser Gene in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 verglichen. Das Ergebnis der Transkriptionsanalysen, die mittels PE-Experimenten mit den Primern hp0119-PE bzw. hp1432-PE durchgeführt wurden, ist in der Abb. 16 dargestellt.

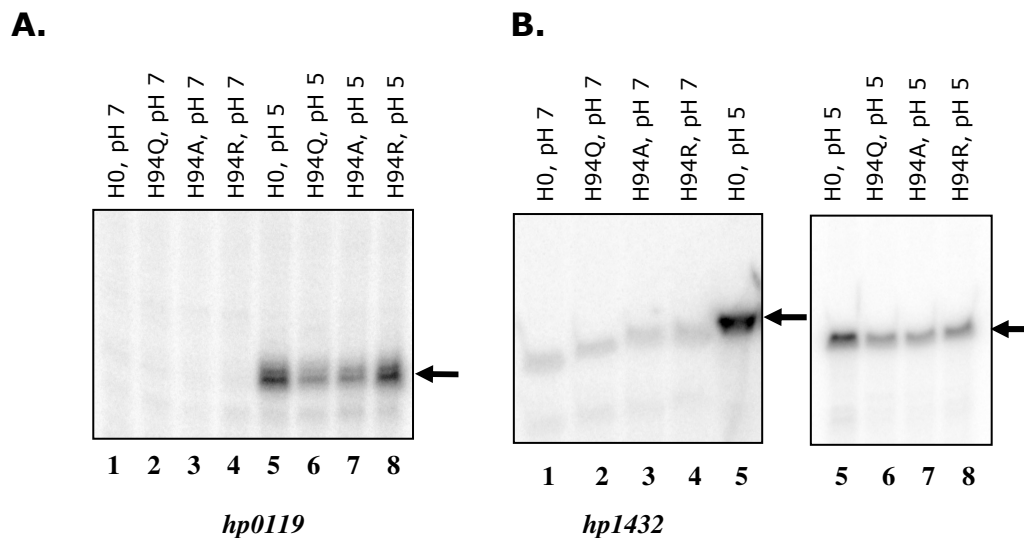


Abb. 16: Analyse der Transkription der ArsRS Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B) in der AS-Austauschmutante *H. pylori* 26695/arsS-H94R bei pH 7 und bei pH 5. Die PE-Analysen wurden mit den Primern hp0119-PE bzw. hp1432-PE durchgeführt. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Das *hp0119*- bzw. *hp1432*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

1: 26695/arsS-H0, pH7
 2: 26695/arsS-H94Q, pH 7
 3: 26695/arsS-H94A, pH 7
 4: 26695/arsS-H94R, pH 7
 5: 26695/arsS-H0 pH 5
 6: 26695/arsS-H94Q, pH 5
 7: 26695/arsS-H94A, pH 5
 8: 26695/arsS-H94R, pH 7

Sowohl die Transkription des Gens *hp0119* (Abb. 16A) als auch des Gens *hp1432* (Abb. 16B) ist in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94R unter neutralen pH-Bedingungen (Spur 4) vergleichbar zur Transkription dieser Gene in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 (Spur 1) und deutlich schwächer als in der Kontrollmutante bei pH 5 (Spur 5). Die Einführung der positiv geladenen AS Arginin an der Position H94R ist somit nicht ausreichend für die Aktivierung der HK ArsS. Bei pH 5 war die Transkription des Gens *hp0119* in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94R (Spur 8) vergleichbar zur Transkription in der Kontrollmutante, die Transkription des Gens *hp1432* entsprach der Transkription in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94Q (Spur 6) und *H. pylori* 26695/arsS-H94A (Spur 7) bei pH 5.

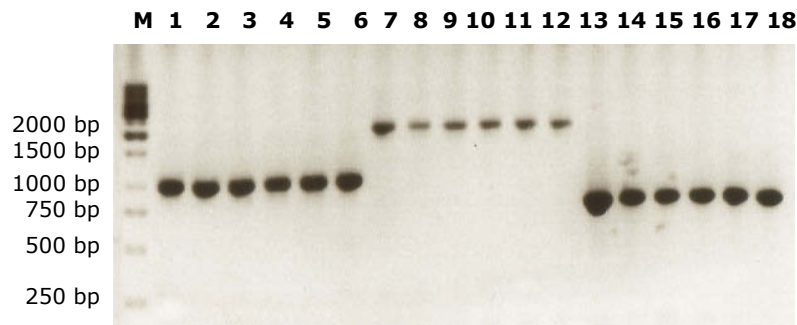
1.1.6 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94,XAA

Nur für die Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q wurde ein signifikanter Effekt bei der Säurewahrnehmung beobachtet. Da die Kinase ArsS-H94Q noch in der Lage ist, eine schwache Säureantwort auszulösen, wäre denkbar, dass ein weiterer Histidinrest zusammen mit dem Histidinrest H94 in einer Art additiven Effekt eine Funktion bei der Säurewahrnehmung hat. Aus diesem Grund wurden weitere AS-Austauschmutanten hergestellt, bei denen zusätzlich zu H94 ein weiterer Histidinrest zu Alanin mutiert wurde. Die Konstruktion der Mutanten erfolgte wie unter Punkt 1.1.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass anstelle des Plasmids pSL-arsSID das Plasmid pSL-arsSID-H94A als Template für die Mutagenese verwendet wurde. Die Oligonukleotide die für die Einführung der zweiten AS-Austauschmutationen verwendet wurden, sind in der Tab. 14 aufgelistet. Die erhaltenen Mutanten wurden als *H. pylori* 26695/arsS-H94,35AA, *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA, *H. pylori* 26695/arsS-H94,90AA, *H. pylori* 26695/arsS-H94,93AA, *H. pylori* 26695/arsS-H94,118AA, *H. pylori* 26695/arsS-H94,126AA bzw. allgemein als *H. pylori* 26695/arsS-H94,XAA (X = 35, 44, 90, 93, 118, 126) bezeichnet.

Tab. 14: Mutagenese-Oligonukleotide, die zur Konstruktion der Plasmide pSL-arsSID-H94,XAA eingesetzt wurden (X = 35, 44, 90, 93, 118, 126)

Mutation	Oligonukleotide
H94,35AA	arsS-H35A-1/ arsS-H35A-2
H94,44AA	arsS-H44A-1/ arsS-H44A-2
H94,90AA	arsS-H90A-1/ arsS-H90A-2
H94,93AA	arsS-H93A-1/ arsS-H93A-2
H94,118AA	arsS-H118A-1/ arsS-H118A-2
H94,126AA	arsS-H126A-1/ arsS-H126A-2

Mittels PCR-Analysen wurde für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94,XAA kontrolliert, ob die Integration des Allels *arsS*-H94,XAA zusammen mit der Cm^r-Kassette wie gewünscht in den *arsRS*-Lokus stattfand (Abb. 17). Die verwendeten Primerkombinationen 1) und 3) sowie die daraus resultierenden erwarteten Fragmentlängen entsprechen den Primerkombinationen, die unter Punkt 1.1.1 in der Tabelle 12 aufgeführt sind. Für die Primerkombination 2 wurde hier in Kombination mit dem Primer arsSID-5 ein alternatives Oligonukleotid Cm-II verwendet, welches am 3'-Ende der Cm^r-Kassette bindet. Die für diese Primerkombination resultierende Fragmentlänge beträgt erwartungsgemäß 2083 bp.



M: 1kb DNA Marker

- | | |
|--|---|
| 1: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,35AA; PK:1) | 10: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,93AA; PK:2) |
| 2: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,44AA; PK:1) | 11: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,118AA; PK:2) |
| 3: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,90AA; PK:1) | 12: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,126AA; PK:2) |
| 4: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,93AA; PK:1) | 13: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,35AA; PK:3) |
| 5: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,118AA; PK:1) | 14: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,44AA; PK:3) |
| 6: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,126AA; PK:1) | 15: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,90AA; PK:3) |
| 7: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,35AA; PK:2) | 16: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,93AA; PK:3) |
| 8: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,44AA; PK:2) | 17: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,118AA; PK:3) |
| 9: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,90AA; PK:2) | 18: T: <i>H. pylori</i> 26695/arsS-H94,126AA; PK:3) |

Abb. 17: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94,XAA. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 12 beschriebenen Primerkombinationen 1) und 3) sowie die alternative Primerkombination 2) (arsSID-5/Cm-II) verwendet, um die Integration der *arsS*-H94,XAA-Allele zusammen mit der Cm^r-Kassette in den *arsRS*-Lokus der Mutante zu verifizieren. Links neben der Abb. sind die Längen der Banden des verwendeten 1 kb DNA Markers aufgeführt.

In den PCR-Analysen (Abb. 17) wiesen alle erhaltenen PCR-Fragmente die erwartete Länge auf, der Allelaustausch erfolgte demnach wie erwartet. Nachdem durch die Sequenzierung der via PCR amplifizierten *arsSID*-Fragmente der korrekte AS-Austausch bestätigt wurde, wurde die Mutante *H. pylori* 26695/ArsS-H94,XAA zur Analyse der Säureinduktion pH-abhängiger Gene verwendet. Die Primer-Extension-Analysen wurden mit *hp0119*- und *hp1432*-spezifischen Oligonukleotiden (*hp0119*-PE bzw. *hp1432*-PE) durchgeführt. Die Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* bei pH 5 wurde an je zwei voneinander unabhängigen RNA-Präparationen untersucht. Repräsentative Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind in der Abb. 18 dargestellt.

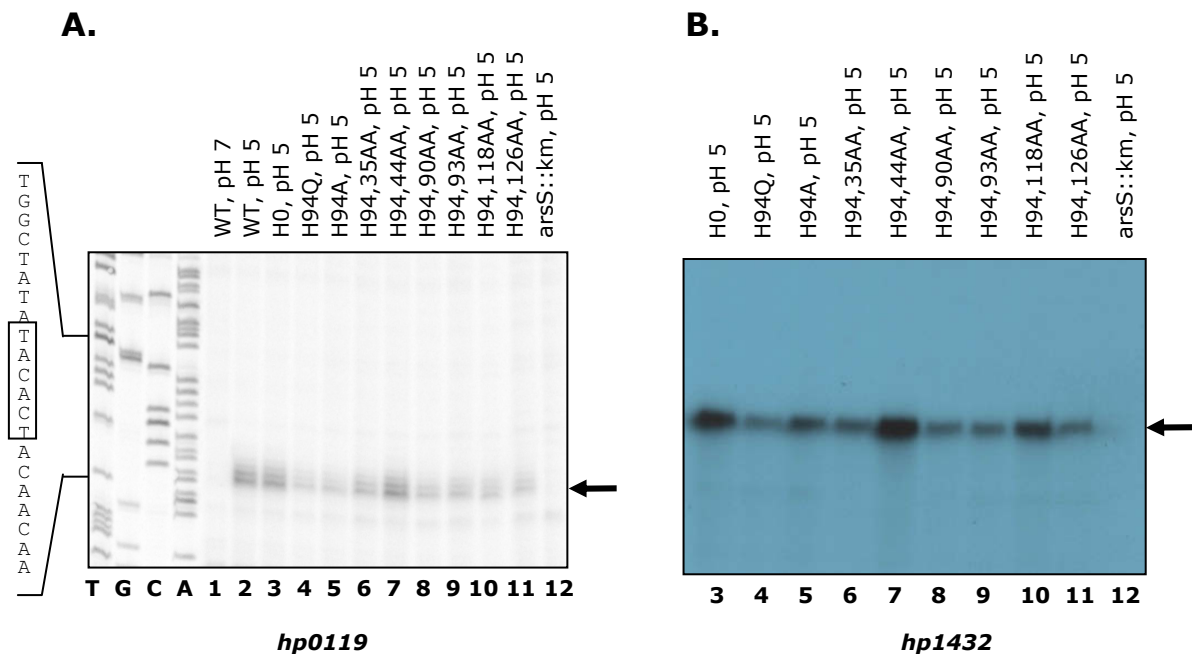


Abb. 18: Ergebnisse der PE-Analyses der Mutanten *H. pylori* 26695/ArsS-H94,XAA bei pH 5. Untersucht wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B). Zur Analyse der *hp0119*-spezifischen cDNA wurde zusätzlich eine Sequenzierungsreaktion aufgetragen (Spuren T, G, C, A), die durch Hybridisierung des Primers *hp0119*-PE mit dem Plasmid pSL-119PE2 durchgeführt wurde. Der Transkriptionsstart ist durch einen schwarzen Pfeil markiert. Zusätzlich ist die Sequenz der -10-Box des Promotors P_{hp0119} neben dem Autoradiogramm aufgezeigt, markiert durch eine schwarze Umrahmung. Auch das *hp1432*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil rechts neben der Abb. markiert.

- 1: 26695 WT, pH 7
- 2: 26695 WT, pH 5
- 3: 26695/arsS-H0, pH 5
- 4: 26695/arsS-H94Q, pH 5
- 5: 26695/arsS-H94A, pH 5
- 6: 26695/arsS-H94,35AA, pH 5
- 7: 26695/arsS-H94,44AA, pH 5
- 8: 26695/arsS-H94,90AA, pH 5
- 9: 26695/arsS-H94,93AA, pH 5
- 10: 26695/arsS-H94,118AA, pH 5
- 11: 26695/arsS-H94,126AA, pH 5
- 12: 26695/arsS::km, pH 5

Für keine der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94,XAA, in denen zusätzlich zum Histidin H94 noch ein weiterer Histidinrest ausgetauscht wurde (Spuren 6 – 11), konnte eine weitere Verminderung der Säureantwort im Vergleich zu der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A (Spur 5) beobachtet werden kann. Überraschenderweise war in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA (Spur 7), in welcher zusätzlich zu H94 noch der Histidinreste H44 durch Alanin substituiert wurde, die Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* vergleichbar zur Transkription dieser Gene im WT *H. pylori* 26695 bzw. in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 (Spur 3) bei pH 5. Im Falle des Gens *hp0119* wurde dieser Effekt qualitativ mit der Typhon-Software verifiziert. Für die Transkription des Gens *hp1432*, jedoch nicht für das Gen *hp0119* konnte dieser Effekt auch für die Mutante 26695/arsS-H94,118AA (Spur 10), in welcher neben dem AS-Austausch H94A noch eine Mutation des Histidinrestes H118 nach Alanin eingeführt worden war, beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob die bei pH 5 erhöhten Transkriptmengen der Gene *hp0119* und *hp1432* in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA auf eine pH-abhängige Induktion der Transkription zurückzuführen sind oder ob durch das Einführen der zweiten Mutation H44A zusätzlich zur Mutation H94A ein konstitutiv aktives ArsS-H94,44AA Protein entstanden ist, wurde die Transkription des Target-Gene *hp0119* für zwei unabhängig isolierte RNA-Präparationen dieser Mutante unter neutralen pH-Bedingungen untersucht. Ein repräsentatives Autoradiogramm der durchgeführten PE-Analyses ist in der Abb. 19 dargestellt.

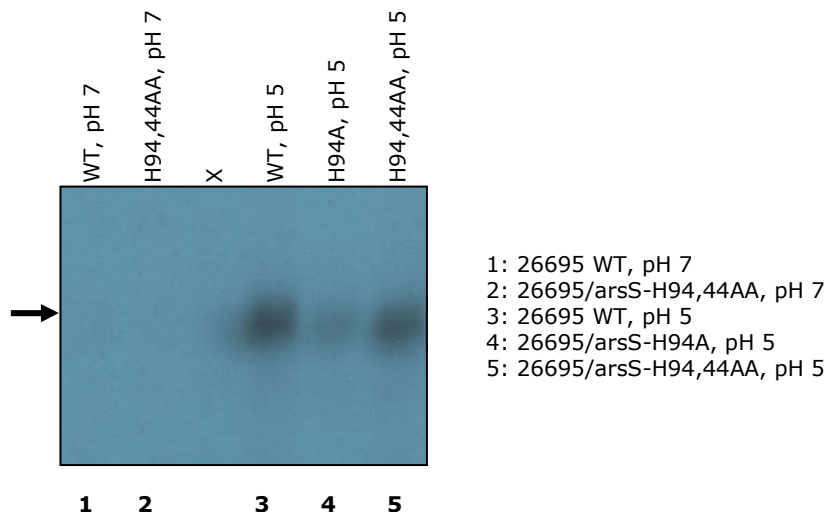


Abb. 19: Ergebnis der PE-Analyse der Aminosäureaustauschmutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA bei pH 7. Untersucht wurde die Transkription des Target-Gens *hp0119* mit dem Primer hp0119-PE. Das *hp0119*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil links neben der Abb. markiert.

Weder im WT *H. pylori* 26695 (Spur 1) noch in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA (Spur 2) fand unter neutralen pH-Bedingungen eine Transkription des Gens *hp0119* statt. Auch die Transkription des Gens *hp1432* bei pH 7 wurde in der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA anhand von zwei unabhängigen RNA-Präparationen mittels PE-Analysen unter Verwendung des Oligonukleotids hp1432-PE untersucht (Vgl. Abb. 27B, Pkt. 1.1.8b). Im Gegensatz zu *hp0119* kann für das Gen *hp1432* eine Basistranskription im WT *H. pylori* 26695 unter neutralen pH-Bedingungen beobachtet werden (Spur 1). Es kann auch eine leichte Steigerung der Transkription des Gens *hp1432* in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA (Spur 2) im Vergleich zum WT *H. pylori* 26695 unter neutralen pH-Bedingungen detektiert werden, die jedoch deutlich schwächer ist, als die säureinduzierte Induktion der *hp1432*-Transkription im WT bei pH 5 (Spur 8). Da die Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* säureabhängig induziert wird, kann ein konstitutiv aktiver Phänotyp der Kinase ArsS-H94,44AA als Erklärung für die beobachtete wildtypische Transkription dieser Gene in der Mutante *H. pylori*/arsS-H94,44AA bei pH 5 ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für die starke Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* bei pH 5 in der Mutante könnte sein, dass durch das Einführen der Mutation H44A der pK_a -Wert anderer Aminosäuren wie Glutamat oder Aspartat beeinflusst wird, so dass eine Protonierung dieser AS, die evtl. einen Beitrag zur Säurewahrnehmung leisten, bereits bei relativ „hohem“ pH-Wert stattfindet und auf diese Weise die H94A-Mutation kompensiert werden kann.

1.1.7 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H(35-126)Q

Parallel zu den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94,XAA wurde eine weitere Mutante konstruiert, in der alle sieben Histidinreste, die in der periplasmatischen Sensordomäne der Histidin-Kinase ArsS vorhanden sind, durch Glutamin ersetzt wurden. Ausgehend von dem Plasmid pSL-arsSID wurden schrittweise alle AS-Austauschmutationen in das Fragment arsSID eingeführt und dieses dann wie unter Punkt 1.1.1 beschrieben, eingesetzt, um das Suicide-Plasmid pSL-arsS-H(35-126)Q und nachfolgend die Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H(35-126)Q zu konstruieren. Bei den verwendeten Mutagenese-Primern handelt es sich um die Oligonukleotide, die auch zur Einführung der Einzelmutationen in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ verwendet wurden und die unter Punkt 1.1.1 in der Tabelle 11 aufgelistet sind. 4 Klone dieser Mutante wurden mittels PCR hinsichtlich der Integration des Allels arsS-

H(35-126)Q in den *arsRS*-Lokus überprüft. Das Ergebnis dieser Charakterisierungs-PCR ist in der Abb. 20 zu sehen. Es wurden die in der Tabelle 12 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, deren Bindestellen in der Abb. 10 schematisch eingezeichnet sind.



M: 1 kb DNA Marker

- 1: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-1; PK:1)
 2: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-2; PK:1)
 3: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-3; PK:1)
 4: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-4; PK:1)
 5: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-1; PK:2)
 6: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-2; PK:2)
 7: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-3; PK:2)
 8: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-4; PK:2)
 9: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-1; PK:3)
 10: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-2; PK:3)
 11: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-3; PK:3)
 12: T: *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-4; PK:3)

Abb. 20: Charakterisierungs-PCR für 4 Klone der Mutanten *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 12 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration des *arsS*-H(35-126)Q-Allels zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *arsRS*-Lokus zu verifizieren.

Die Längen der in der Charakterisierungs-PCR erhaltenen DNA-Fragmente entsprachen den Erwartungen (Abb. 20). Für die Klone 1 - 4 der Mutante *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q wurde die Einführung der Aminosäureaustauschmutationen über Sequenzierung der via PCR amplifizierten *arsSID*-Fragmente bestätigt.

Gesamtzell-RNA der Klone *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-2 und *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q-3 sowie des WTs *H. pylori* 26695 bzw. der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/*arsS*-H0 wurde sowohl aus Kulturen, die bei pH 7 angezogen wurden, als auch aus Kulturen, die für eine Stunde bei pH 5 säureinduziert wurden, isoliert. Mit der gewonnenen RNA wurden PE-Experimente zur Analyse der Transkription des Gens *hp1432* durchgeführt. Für den Klon -2 der Mutante *H. pylori* 26695/*arsS*-H(35-126)Q wurde die *hp1432*-Transkription jeweils anhand von zwei voneinander unabhängig isolierte RNA-Präparationen untersucht, für den Klon -3 wurde eine RNA-Präparation analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Analysen ist in der Abb. 21 dargestellt.

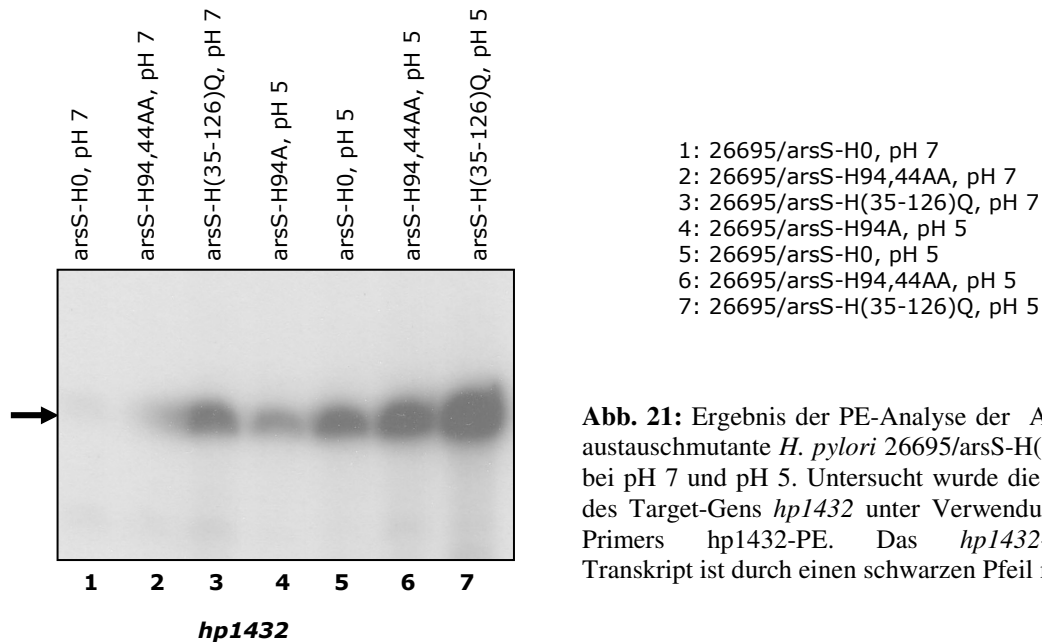


Abb. 21: Ergebnis der PE-Analyse der Aminosäureaustauschmutante *H. pylori* 26695/arsS-H(35-126)Q-2 bei pH 7 und pH 5. Untersucht wurde die Expression des Target-Gens *hp1432* unter Verwendung des PE-Primers *hp1432*-PE. Das *hp1432*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Überraschenderweise kann in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H(35-126)Q bei pH 7 (Spur 3) deutlich mehr *hp1432*-spezifisches Transkript detektiert werden, als für den WT *H. pylori* 26695 bei pH 7 (Spur 1). Die Transkription des Gens *hp1432* in der Mutante bei pH 7 entspricht in etwa der Transkription im WT *H. pylori* 26695 bei pH 5 (Spur 5). Ein Austausch aller Histidinreste durch Glutaminreste bewirkt somit eine Aktivierung der Histidin-Kinase ArsS bereits unter neutralen pH-Bedingungen. Eine Erniedrigung des pH-Werts hat zudem eine weitere Steigerung der Kinase-Aktivität zur Folge, was sich in einer Erhöhung der Transkriptmenge von *hp1432* bei pH 5 um den Faktor 4 (Spur 7, quantifiziert mit Typhon-Software) im Vergleich zur Kontrollmutante widerspiegelt. Dies spricht dafür, dass auch in dieser Mutante, die unter neutralen pH-Bedingungen einen aktiven ArsS-Phänotyp aufweist, ein Säurereiz wahrgenommen werden kann und dass außer den Histidinresten vermutlich noch andere AS der periplasmatischen Domäne an der Säurewahrnehmung beteiligt sind.

1.1.8 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA und *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA

Die Aminosäuren Aspartat (D) und Glutamat (E) weisen in ihren Seitenketten einen pK_a -Wert von 3,9 bzw. 4,1 auf. Eine Protonierung der freien AS findet somit theoretisch erst bei einem relativ niedrigem pH-Wert statt. Ursprünglich wurde angenommen, dass einige der negativ geladenen AS durch Wechselwirkungen (WW) mit protonierten, positiv geladenen Histidinresten an der Säurewahrnehmung beteiligt sind. Der pK_a -Wert einer AS innerhalb eines Proteins kann sich jedoch aufgrund von Wechselwirkungen mit benachbarten AS deutlich vom pK_a -Wert der Seitenkette der freien AS unterscheiden. Da die Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA eine wildtypische Säureinduzierbarkeit der Gene *hp0119* und *hp1432* zeigt, ist anzunehmen, dass die H44A Mutation die Protonierbarkeit einer oder mehrerer AS in der Inputdomäne bei pH 5 stark begünstigt, was zu einer phänotypisch dem WT entsprechenden Aktivierung des mutierten Proteins ArsS-H94,44AA führt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob evtl. die Protonierung von Aspartat- oder Glutamatresten in der periplasmatischen Sensordomäne von ArsS in *H. pylori* an der Wahrnehmung von Säure als Umweltreiz beteiligt ist. In der Abb. 22 ist nochmals die AS-Sequenz der periplasmatischen Sensordomäne von ArsS dargestellt (vgl. auch Abb. 8), jedoch sind hier die Glutamat- und

Aspartatreste farblich hervorgehoben. Es sind insgesamt 5 Aspartat- und 9 Glutamatreste in der periplasmatischen Inputdomäne vorhanden.

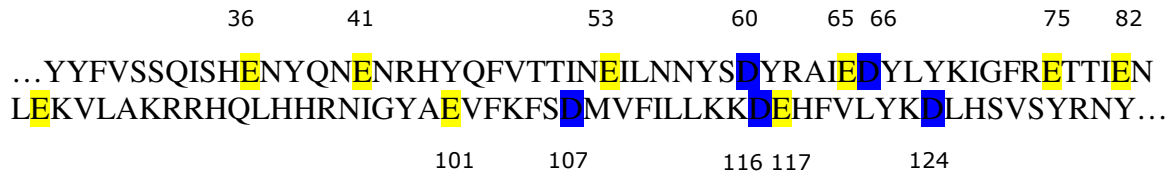


Abb. 22: AS-Sequenz der periplasmatischen Sensordomäne der Kinase ArsS. Die vorhandenen Glutamatreste (E) sind gelb markiert, die vorhandenen Aspartatreste (D) sind blau markiert. Die angegebenen Zahlen entsprechen der Position der Dicarbonsäuren im ArsS Protein.

Es wurden Mutanten konstruiert, in denen zusätzlich zu dem Austausch H94A ein Aspartatrest bzw. ein Glutamatrest in Alanin umgewandelt wurde. Sollten die Dicarbonsäuren durch Wechselwirkungen mit positiv geladenen Histidinen eine Rolle bei der Säurewahrnehmung spielen, so sollten diese WW durch die Einführung der nicht geladenen AS Alanin unterbunden werden, man würde gegebenenfalls eine weitere Verminderung der Säurewahrnehmung erwarten.

Falls die Dicarbonsäuren jedoch durch Protonierung an der Säurewahrnehmung der HK ArsS beteiligt sind, würde die Substitution von Aspartat bzw. Glutamat durch Alanin diese Protonierung imitieren. Es wird dann in der entsprechenden Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA und *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA ein Phänotyp vergleichbar zu der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA erwartet, jedoch sollte hier eine gesteigerte Transkription von säureabhängigen Target-Genen auch bei pH 7 beobachtet werden.

Eine weitere denkbare Möglichkeit ist, dass es durch den Austausch der relativ großen AS Aspartat und Glutamat durch die relativ kleine AS Alanin aufgrund sterischer Effekte zu einer Inaktivierung des ArsS-Proteins kommt. In diesem Fall wird keine Induktion der Transkription der untersuchten Target-Gene unter sauren pH-Bedingungen erwartet.

a) Konstruktion und Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA

Die in der Sensordomäne des ArsS-Proteins enthaltenen Aspartatreste sind in der Abb. 22 blau hervorgehoben. Ausgehend von dem Plasmid pSL-arsSID-H94A wurde der jeweilige Aspartat-Alanin Austausch in das Fragment arsSID-H94A eingeführt und dieses dann wie unter Punkt 1.1.1 beschrieben, eingesetzt, um das Suicide-Plasmid pSL-arsS-H94ADXA und nachfolgend die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA (X = 60, 66, 107, 116, 124) zu konstruieren. Die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AD60A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AD66A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AD116A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AD124A wurden von Monika Götz hergestellt und charakterisiert. Die für die Mutagenese verwendeten Oligonukleotide sind in der Tab. 15 aufgelistet.

Tab. 15: Oligonukleotide, die für die Mutagenese zur Konstruktion der Plasmide pSL-arsS-H94ADXA verwendet wurden (X = 60, 66, 107, 116, 124).

Mutation	Oligonukleotide
H94AD60A	arsS-D60A-1/arsS-D60A-2
H94AD66A	arsS-D66A-1/arsS-D66A-2
H94AD107A	arsS-D107A-1/arsS-D107-2
H94AD116A	arsS-D116A-1/arsS-D116A-2
H94AD124A	arsS-D124A-1/arsS-D124-2

Auch in diesen Mutanten wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* und *hp1432* zur Überprüfung der Säureantwort mittels PE-Analysen untersucht (Abb. 23). Die Transkription von *hp0119* bei pH 5 wurde anhand von zwei voneinander unabhängigen RNA-Präparationen analysiert, die Transkription von *hp1432* wurde nur für eine der beiden isolierten RNA-Präparationen durchgeführt.

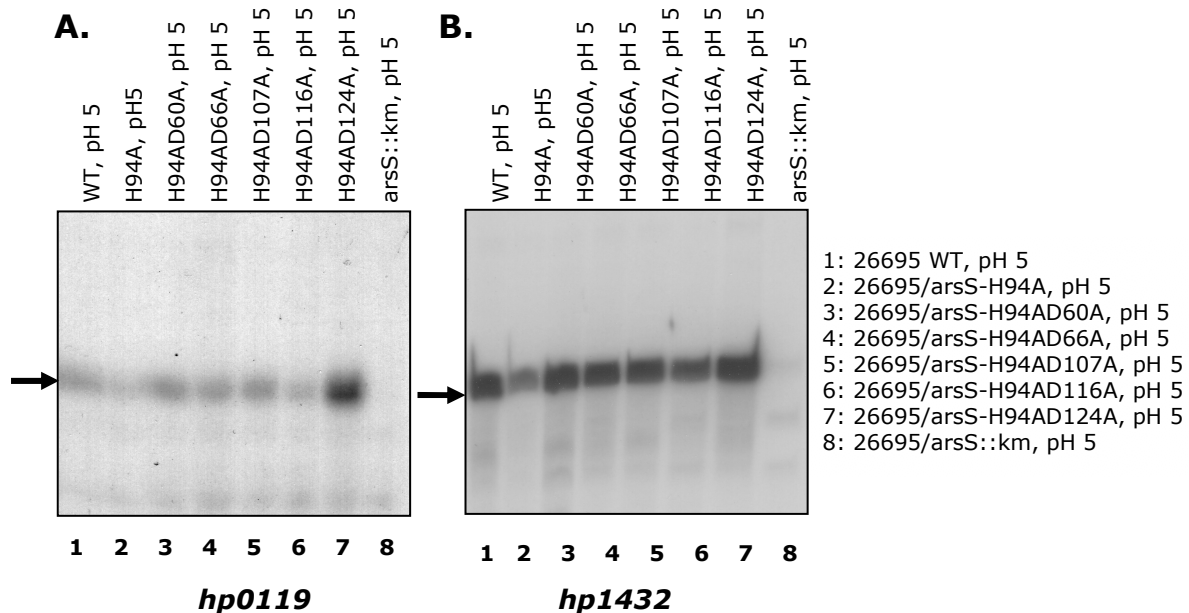


Abb. 23: Ergebnis der PE-Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA bei pH 5. Untersucht wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B) in Mutanten, die einer einstündigen Inkubation in BHI bei pH 5 ausgesetzt wurden. Durchgeführt wurde das PE-Experiment mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden *hp0119*-PE und *hp1432*-PE. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Für die Abb. A wurde nach Einscannen des Röntgenfilms das Bild durch Erhöhung des Kontrasts modifiziert, um das ursprünglich schwache Signal des *hp0119*-spezifischen Transkripts zu verstärken. Die *hp0119*- und *hp1432*-spezifischen Transkripte sind durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Durch den Austausch der negativ geladenen AS Aspartat zu der nicht geladenen AS Alanin kommt es in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AD60A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AD66A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AD107A (Spuren 3, 4 und 5) unter sauren pH-Bedingungen zu einer deutlich stärkeren Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* als in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A (Spur 2). Dies entspricht dem Phänotyp der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA. In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94AD116A (Spur 6) ist die Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* unter sauren pH-Bedingungen vergleichbar zur Transkription in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A. In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94AD124A (Spur 7) ist die Transkription der betrachteten Gene stärker als im WT *H. pylori* 26695 bei pH 5 (Spur 1), wobei hier der Effekt für *hp0119* deutlicher ist als für *hp1432*.

Die Transkription des Gens *hp1432* wurde in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA auch bei Wachstum in BHI bei pH 7 analysiert. Das Ergebnis der mit dem Primer *hp1432*-PE durchgeführten PE-Analysen ist in der Abb. 24 dargestellt.

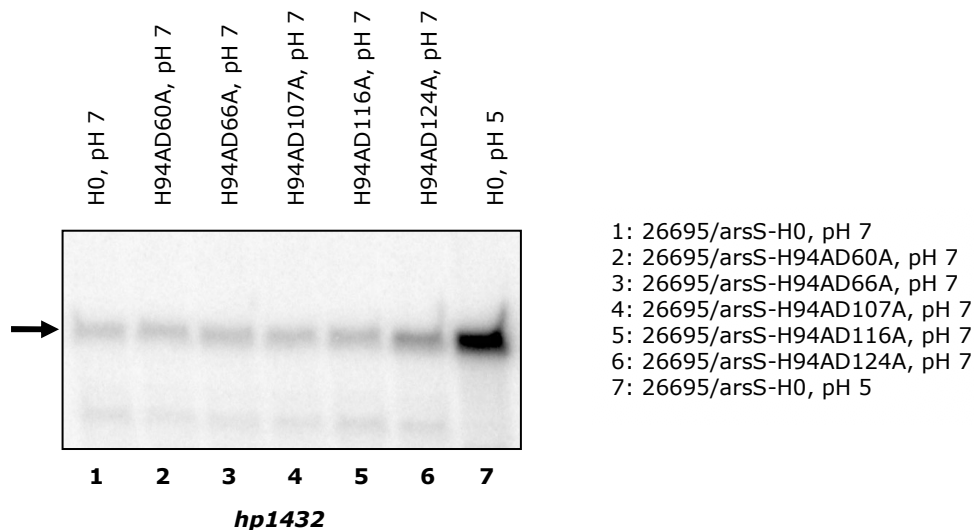


Abb. 24: Ergebnis der PE-Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA bei pH 7. Untersucht wurde die Transkription des Target-Gens *hp1432*. Durchgeführt wurde das PE-Experiment mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *hp1432*-PE. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Das *hp1432*-spezifischen Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

In den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AD60A (Spur 2), *H. pylori* 26695/arsS-H94AD66A (Spur 3), *H. pylori* 26695/arsS-H94AD107A (Spur 4) und *H. pylori* 26695/arsS-H94AD116A (Spur 5) ist die Transkription des Gens *hp1432* vergleichbar zur Transkription in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 bei pH 7 (Spur 1). In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94AD124A (Spur 6) findet eine signifikant erhöhte Basistranskription (ca. viermal so stark, analysiert mit Typhon-Software) unter neutralen pH-Bedingungen statt als in der Kontrollmutante. Der Austausch der negativ geladenen AS Aspartat durch die neutrale AS Alanin führt zu einer erhöhten Aktivität der HK ArsS-H94AD124A unter neutralen pH-Bedingungen. Allerdings konnte in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94AD124A unter neutralen pH-Bedingungen keine erhöhte Basistranskription des Gens *hp0119* beobachtet werden (Punkt 1.1.8b, Abb. 27A). In allen Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA ist die Transkription des Gens *hp1432* unter neutralen pH-Bedingungen deutlich geringer als in der Kontrollmutante bei pH 5 (Spur 7). Man kann davon ausgehen, dass in den analysierten Aspartat-Austauschmutanten eine säureabhängige Transkriptionsinduktion der ArsRS-Target-Gene stattfindet. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Protonierung der AS D124 ebenfalls eine Rolle bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS spielt. Eine Funktion der anderen Aspartatrete bei der Säurewahrnehmung bleibt unklar, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

b) Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA

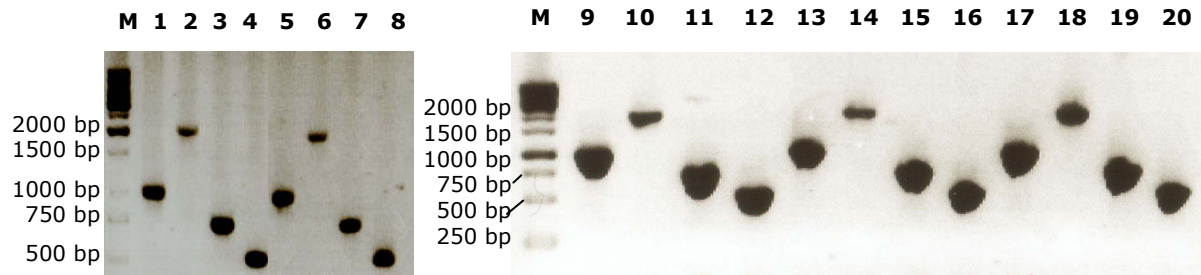
Wie man der Abb. 22 entnehmen kann, sind in der periplasmatischen Domäne der ArsS-Kinase neun Glutamatreste lokalisiert. Um Informationen über eine mögliche Beteiligung der Glutamatreste bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS zu erhalten, wurden Mutanten hergestellt, in denen zusätzlich zu dem Austausch H94A ein Glutamatrest in Alanin umgewandelt wurde. Es wurden nur die Glutamatreste mutiert, die nicht auch in der periplasmatischen Sensordomäne in dem orthologen Protein HH1607 von *H. hepaticus* konserviert sind. Da das natürliche Habitat von *H. hepaticus* der Darm bzw. die Leber von Mäusen ist, ist es wenig wahrscheinlich, dass dieser Keim mit der orthologen Kinase HH1607 Säure als Umweltreiz wahrnimmt (vgl. auch Punkt 1.2). Deshalb kann man vermuten, dass die in den Kinasen ArsS und HH1607 konservierten Glutamatreste nicht an der

Säurewahrnehmung durch ArsS beteiligt sind. Die Herstellung der Mutanten erfolgte wie unter Punkt 1.1.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass anstelle des Plasmids pSL-arsSID das Plasmid pSL-arsSID-H94A als Ausgangsplasmid für die Mutagenese verwendet wurde, um zunächst die Suicide-Plasmid pSL-arsS-H94AEXA (X = 65, 75, 82, 101 und 117) und im Weiteren die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA zu konstruieren. Die für die Mutagenese verwendeten Primer sind in der Tab. 16 aufgelistet.

Tab. 16: Oligonukleotide, die für die Mutagenese zur Konstruktion der Plasmide pSL-arsS-H94AEXA verwendet wurden (X = 35, 44, 90, 93, 118, 126)

Mutation	Oligonukleotide
H94AE65A	arsS-E64A-1/ arsS-E65A-2
H94AE75A	arsS-E75A-1/ arsS-E75A-2
H94AE82A	arsS-E82A-1/ arsS-E82A-2
H94AE101A	arsS-E101-1/ arsS-E101A-2
H94AH117A	arsS-E117A-1/ arsS-E117A-2

Die erhaltenen Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AE65A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AE75A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AE82A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AE101A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AE17A wurden mittels PCR auf die korrekte Integration der *arsSID*-H94AEXA-Allele zusammen mit dem Selektionsmarker, der Cm^r-Kassette, in den *arsRS*-Lokus überprüft. Es wurden die in der Tab. 12 aufgelisteten Primerkombinationen 1) und 3) verwendet. Für die Primerkombination 2) wurde hier in Kombination mit dem Primer *arsSID*-5 ein alternatives Oligonukleotid Cm-II verwendet, welches am 3'-Ende der Cm^r-Kassette bindet. Die daraus resultierende erwartete Fragmentlänge beträgt 2083 bp. Das Ergebnis der Charakterisierungs-PCR ist in der Abb. 25 zu sehen. In dieser Abb. ist auch noch das Ergebnis für die Primerkombination 4) (*arsSID*-5/*arsSID*-3; erwartete Fragmentlänge: 526 bp) dargestellt, die dazu verwendet wurde, das Fragment *arsSID* aufzuamplifizieren um mittels einer Sequenzierungsreaktion die korrekten AS-Austausche in der periplasmatischen Sensordomäne der Kinase ArsS-H94AEXA zu bestätigen.



- M: 1 kb DNA Marker
- | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1: T: 26695/arsS-H94AE65A; PK 1) | 11: T: 26695/arsS-H94AE75A; PK 3) |
| 2: T: 26695/arsS-H94AE65A; PK 2) | 12: T: 26695/arsS-H94AE75A; PK 4) |
| 3: T: 26695/arsS-H94AE65A; PK 3) | 13: T: 26695/arsS-H94AE82A; PK 1) |
| 4: T: 26695/arsS-H94AE65A; PK 4) | 14: T: 26695/arsS-H94AE82A; PK 2) |
| 5: T: 26695/arsS-H94AE117A; PK 1) | 15: T: 26695/arsS-H94AE82A; PK 3) |
| 6: T: 26695/arsS-H94AE117A; PK 2) | 16: T: 26695/arsS-H94AE82A; PK 4) |
| 7: T: 26695/arsS-H94AE117A; PK 3) | 17: T: 26695/arsS-H94AE101A; PK 1) |
| 8: T: 26695/arsS-H94AE117A; PK 4) | 18: T: 26695/arsS-H94AE101A; PK 2) |
| 9: T: 26695/arsS-H94AE75A; PK 1) | 19: T: 26695/arsS-H94AE101A; PK 3) |
| 10: T: 26695/arsS-H94AE75A; PK 2) | 20: T: 26695/arsS-H94AE101A; PK 4) |

Abb. 25: Charakterisierungs-PCR der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA (X = 65, 75, 82, 101, 117). T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 12 beschriebenen Primerkombinationen 1) und 3) sowie die im Text beschriebene Primerkombinationen 2) und 4) verwendet, um die Integration der *arsS*-H94AEXA-Allele zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *arsRS*-Lokus zu verifizieren. Links neben den Abb. sind die Längen der Fragmente des verwendeten 1 kb DNA Markers aufgeführt.

Die in der Charakterisierungs-PCR erhaltenen DNA-Fragmente wiesen die erwartete Länge auf (Abb. 25), weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die Integration der *arsS*-H94AEXA-Allele zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *arsRS*-Lokus der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA wie gewünscht stattgefunden hatte. Gesamtzell-RNA der Mutanten wurde eingesetzt, um die säureabhängige Induktion der Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* bei pH 5 zu analysieren. Es wurden jeweils zwei unabhängig voneinander isolierte RNA-Präparationen eingesetzt. Repräsentative Autoradiogramme der PE-Experimente sind in der Abb. 26 dargestellt.

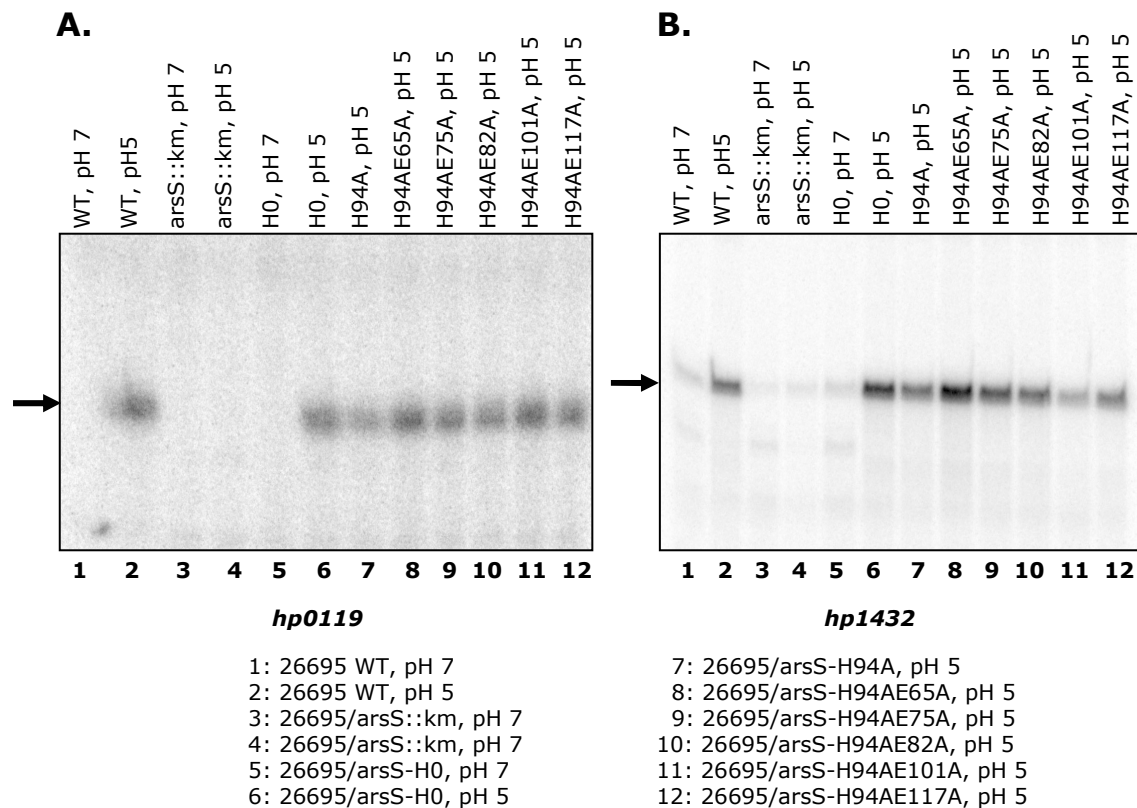
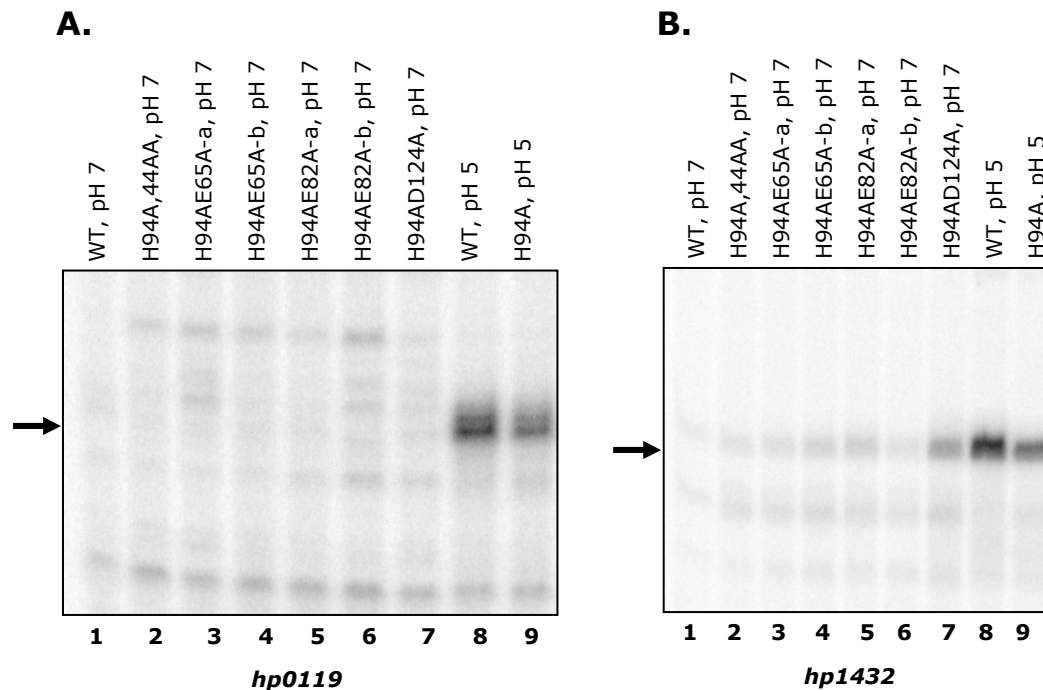


Abb. 26: PE-Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA (X = 65, 75, 82, 101, 117) bei pH 5. Untersucht wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B) unter Verwendung der Oligonukleotide *hp0119*-PE und *hp1432*-PE. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Das *hp0119*- bzw. *hp1432*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA (Spuren 8 - 12) konnte, wie auch für die Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA, eine Transkription des Gens *hp0119* bei pH 5 beobachtet werden (Abb. 26A), die der des WTs *H. pylori* 26695 bei pH 5 entspricht (Spur 2). Im Fall der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AE65A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AE75A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AE82A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AE117A (Spuren 8, 9, 10 und 12) wurde dasselbe Ergebnis auch für die Transkription des Gens *hp1432* beobachtet (Abb. 26B). Jedoch wurde für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AE101A (Spur 11) eine geringere *hp1432*-Transkriptmenge detektiert als für den WT *H. pylori* 26695 und die Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 (Spur 6).

Für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AE65A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AE82A wurde die Transkription unter neutralen pH-Bedingungen untersucht. Von beiden Mutanten wurde je zweimal unabhängig voneinander RNA isoliert. Das Ergebnis der durchgeführten PE-Analysen ist in der Abb. 27 dargestellt.



- 1: 26695 WT, pH 7
- 2: 26695/arsS-H94,44AA, pH 7
- 3: 26695/arsS-H94AE65A, a pH 7
- 4: 26695/arsS-H94AE65A, b pH 7
- 5: 26695/arsS-H94AE82A, a pH 7
- 6: 26695/arsS-H94AE82A, b pH 7
- 7: 26695/arsS-H94AD124A, pH 7
- 8: 26695 WT, pH 5
- 9: 26695/arsS-H94A, pH 5

Abb. 27: PE-Analyse der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AE65A, *H. pylori* 26695/arsS-H94AE82A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AD124A bei pH 7. Von jeder der beiden Mutanten wurde zweimal unabhängig Gesamtzell-RNA isoliert (a und b), die als Template für die PE-Analysen eingesetzt wurde. Untersucht wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B) unter Verwendung der PE-Primer *hp0119*-PE und *hp1432*-PE. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Die *hp0119*- bzw. *hp1432*-spezifischen Transkripte sind durch einen schwarzen Pfeil markiert.

In keiner der beiden untersuchten Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AE65A (Spuren 3 und 4) und *H. pylori* 26695/arsS-H94AE82A (Spuren 5 und 6) konnte eine Transkription von *hp0119* unter neutralen pH-Bedingungen beobachtet werden (Abb. 27A). Für die Transkription des Gens *hp1432* in den untersuchten Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AE65A (Spuren 3 und 4) und *H. pylori* 26695/arsS-H94AE82A (Spuren 5 und 6) konnte eine leichte Zunahme der Transkription des Gens *hp1432* unter neutralen pH-Bedingungen beobachtet werden. Jedoch ist für die beiden jeweils unabhängig isolierten RNAs der untersuchten Mutanten ein Unterschied in der Intensität des erhaltenen Signals zu beobachten. Die unter neutralen pH-Bedingungen in den beiden untersuchten Glutamat-Alanin-Austauschmutanten detektierte *hp1432*-spezifische Transkriptmenge ist deutlich geringer als die des WTs *H. pylori* 26695 bei pH 5 (Spur 8). Es findet in den Mutanten 26695/arsS-H94AE65A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AE82A eine säureabhängige Transkriptionsinduktion der ArsRS-Target-Gene *hp0119* und *hp1432* statt. Diese säureabhängige Transkriptionsinduktion ist stärker als in der Mutante 26695/arsS-H94A. Eine Beteiligung der negativ geladenen Glutamatreste an der Säurewahrnehmung der HK ArsS durch Protonierung kann somit nicht ausgeschlossen werden.

1.1.9 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID

Die Analysen der konstruierten AS-Austauschmutanten deuten darauf hin, dass der Histidinrest H94, der Aspartatrest D124 und evtl. weitere Asparat- und Glutamatreste durch Protonierung an der Säurewahrnehmung der HK ArsS beteiligt sind. Es konnte jedoch keine Mutante konstruiert werden, in der keine Säurewahrnehmung mehr stattfindet. Es stellt sich die Frage, ob tatsächlich nur die periplasmatische Sensordomäne an der Säurewahrnehmung der HK ArsS beteiligt ist. Es wurde deshalb eine Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID hergestellt, in welcher die periplasmatische Domäne weitgehend deletiert ist. Ein kleiner periplasmatische „Loop“, der die beiden Transmembrandomänen verbindet, wurde beibehalten, um eine Integration des ArsS- Δ ID Proteins in die Membran zu ermöglichen. In der Abb. 28 ist erneut die AS-Sequenz der periplasmatischen Inputdomäne zu sehen. Die AS, die in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID noch vorhanden sind, sind rot unterlegt, diejenigen, die deletiert wurden, sind nicht markiert. Wie man erkennen kann, sind in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID keine Histidinreste, Glutamatreste oder Aspartatreste der periplasmatischen Sensordomäne mehr vorhanden.

...**YYFVSSQIS**HENYQENRHYQFVTTINEILNNYS DYRAIEDYLYKIGFRET TIEN
LEKVLAKRRRHQLHHRNIGYAEVFKFSDMVFILLKKDEHFVLYKDLHS**VSYRNY**...

Abb. 28: AS-Sequenz der periplasmatischen Sensordomäne der Histidin-Kinase ArsS. Die AS, die in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID noch erhalten sind, um einen kleinen periplasmatischen „Loop“ zu formen, der den Einbau des Proteins ArsS- Δ ID in die Membran erlauben soll, sind rot unterlegt. Die AS, die in der *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID Mutante deletiert wurden, sind nicht markiert.

Um das Plasmid pSL-arsS- Δ ID und anschließend die Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID zu konstruieren, wurden zunächst zwei PCR-Fragmente ausgehend von chromosomaler DNA von *H. pylori* 26695 als Template aufamplifiziert. Das Fragment 1 (PCR-amplifiziert mit den Primern arsSID-5/arsS- Δ ID-1) besteht aus 19 bp der intergenischen Region zwischen *arsR* und *arsS* (dieser Bereich enthält die Shine-Dalgarno-Sequenz des *arsS*-Gens) und dem 5'-Ende des *arsS*-Gens, welches für die Transmembrandomäne 1 (TMD1) und die ersten 9 AS der periplasmatischen Sensor-Domäne codiert. Das Fragment 2 (PCR-amplifiziert mit den Primern arsS- Δ ID-2/arsSID-3) codiert für die letzten 6 AS der periplasmatischen Sensordomäne ArsSID sowie die Transmembrandomäne 2 (TMD2). Die beiden erhaltenen Fragmente wurden nun in einer weiteren PCR-Reaktion als Template verwendet. Da die für die vorhergehende Amplifikation verwendeten Oligonukleotide arsS- Δ ID-1 und arsS- Δ ID-2 im Bereich der ersten 30 Basen ihres jeweiligen 5'-Endes zueinander komplementär sind, können die Fragmente 1 und 2 über ihren 3'-Terminus bzw. 5'-Terminus überlappend aneinander hybridisieren. Über eine Amplifikation mit den Primern arsSID-5 und arsSID-3 konnte dann das 247 bp arsSID- Δ ID-Fragment erhalten werden. Dieses Fragment codiert für die TMD1, die ersten 7 und die letzten 6 AS der periplasmatischen ArsS Sensordomäne und die TMD2. Nach einer Zwischenklonierung dieses Fragments in den Vektor pSL1180 wurde das arsSID- Δ ID-Fragment durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Sma*I und *Bgl*II aus dem Plasmid pSL-arsSID- Δ ID reisoliert und mit dem unter Punkt 1.1.1 beschriebenen Vorläuferkonstrukt pSL-arsSTD (ebenfalls *Sma*I und *Bgl*II verdaut) ligiert. Somit wurde das Plasmid pSL-arsS- Δ ID erhalten, welches nach der beschriebenen Vorgehensweise von Monika Götz konstruiert wurde. Nachdem die Deletion der periplasmatischen Inputdomäne des *arsS*- Δ ID Allels in dem Plasmid pSL-arsS- Δ ID mittels Sequenzierungsreaktion bestätigt wurde, wurde das Plasmid für die Transformation der Mutante *H. pylori* 26695/arsS::km verwendet. Vier Klone der erhaltenen Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID wurden mittels PCR-Analysen charakterisiert (Abb. 29). Die für die Charakterisierungs-PCR verwendeten

Primerkombinationen sowie die erwartete Länge der PCR-Fragmente sind in der Tab. 17 aufgelistet.

Tab. 17: Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierung der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge
1) arsR-ext-5/arsSID-3	746 bp
2) arsSID-5/Cm-int-1	1283 bp
3) Cm-int-2/hp0163-ext-3	750 bp
4) arsSID-5/arsSID-3	247 bp

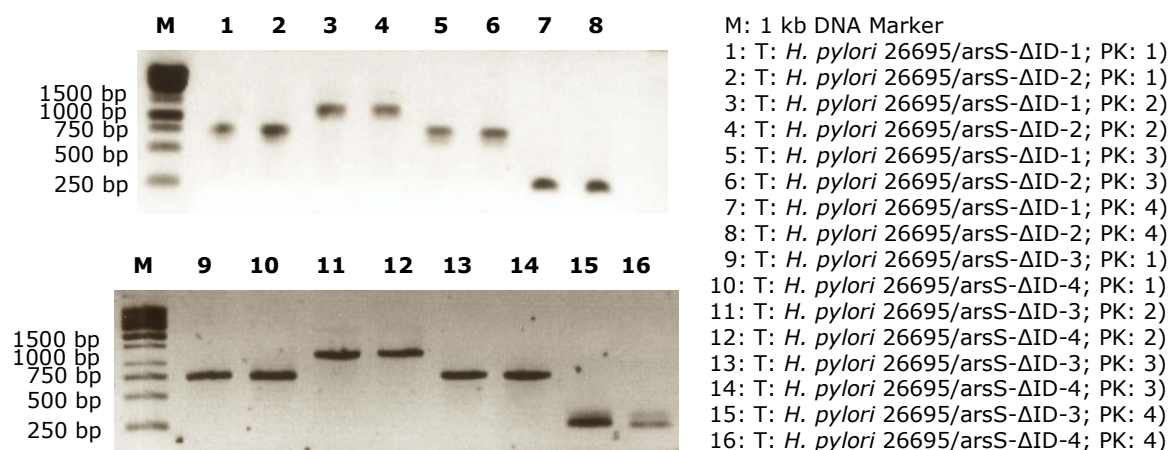


Abb. 29: Charakterisierungs-PCR für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID-1,-2,-3 und -4. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 17 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration der *arsS*- Δ ID-Allele zusammen mit der Cm^r-Kassette in den *arsRS*-Lokus zu verifizieren.

Die in den PCR-Analysen erhaltenen Fragmente wiesen Längen auf, die den Erwartungen entsprachen. Somit konnte eine korrekte Integration der *arsS*- Δ ID-Allele zusammen mit der Cm^r-Kassette in den *arsRS*-Lokus der untersuchten Klone verifiziert werden. Die Klone 1-4 der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID wurden für PE-Experimente zur Analyse der säureabhängigen Induktion der Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* eingesetzt. Das Ergebnis der PE-Analysen ist in der Abb. 30 dargestellt. Für die Klone -3 und -4 der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID wurden in dem durchgeführten Experiment je zwei voneinander unabhängig isolierte Gesamtzell-RNAs eingesetzt.

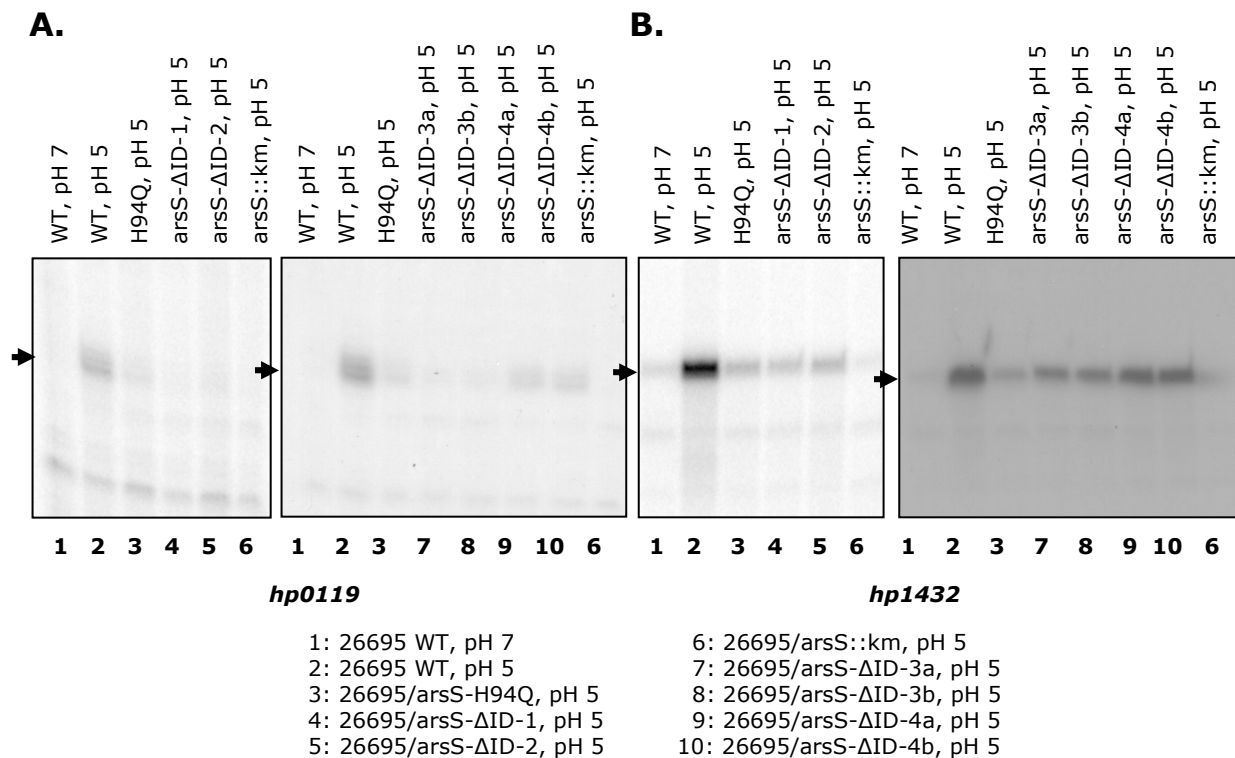


Abb. 30: Ergebnis der PE-Analyse der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-ΔID bei pH 5. Untersucht wurde die Transkription der Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B) unter Verwendung der PE-Primer *hp0119*-PE und *hp1432*-PE. Es wurden jeweils 30 μg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Die *hp0119*- bzw. *hp1432*-spezifischen Transkripte sind durch einen schwarzen Pfeil markiert. Für die Klone -3 und -4 der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-ΔID wurden zwei unabhängige RNA-Präparationen (a und b) als Template für die PE-Analysen eingesetzt.

Bei den Transkriptionsanalysen des Gens *hp0119* (Abb. 30A) konnte im Falle der Klone -1, -2 und -3 der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-ΔID (Spuren 4, 5, 7 und 8) bei pH 5 keine Transkription beobachtet werden. Im Fall des Klons -4 (Spuren 9 und 10) wurde jedoch ein *hp0119*-spezifisches Signal detektiert. Bei der Transkriptionsanalyse des säureregulierten Gens *hp1432* (Abb. 30B) konnte für alle analysierten Klone der Mutante 26695/arsS-ΔID (Spuren 4, 5, 7 – 10) bei saurem pH-Wert eine geringfügig stärkere Transkription des Gens *hp1432* beobachtet werden als im WT *H. pylori* 26695 bei pH 7 (Spur 1) oder der ArsS Deletionsmutante *H. pylori* 26695/arsS::km bei pH 5 (Spur 6). In den Klonen -1 und -2 (Spuren 4 und 5) entspricht die Transkription des Gens *hp1432* der Transkription in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A bei pH 5 (Spur 3). In den Klonen -3 und -4 ist die Transkription des Gens *hp1432* bei pH 5 (Spuren 7 – 10) deutlich stärker als in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A (Spur 3). Die unterschiedlichen Klone derselben Mutante, die basierend auf den durchgeführten PCR-Analysen, als genetisch identisch angesehen wurden, lieferten reproduzierbar unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der säureabhängigen Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432*. Eine Mutation im Bereich der Sensordomäne der HK ArsS-ΔID oder im Promotorbereich P_{hp0116} in den Klonen der Mutante als Erklärung für die beobachteten Unterschiede kann aufgrund einer Sequenzierung der entsprechenden Bereiche ausgeschlossen werden.

In den Klonen -3 und -4 der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-ΔID wurde die Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* unter neutralen pH-Bedingungen analysiert. Es wurde für jeden der beiden Klone zweimal unabhängig voneinander Gesamtzell-RNA isoliert. Mit diesen RNA-Präparationen wurden PE-Analysen durchgeführt, deren Ergebnis in der Abb. 31 dargestellt ist.

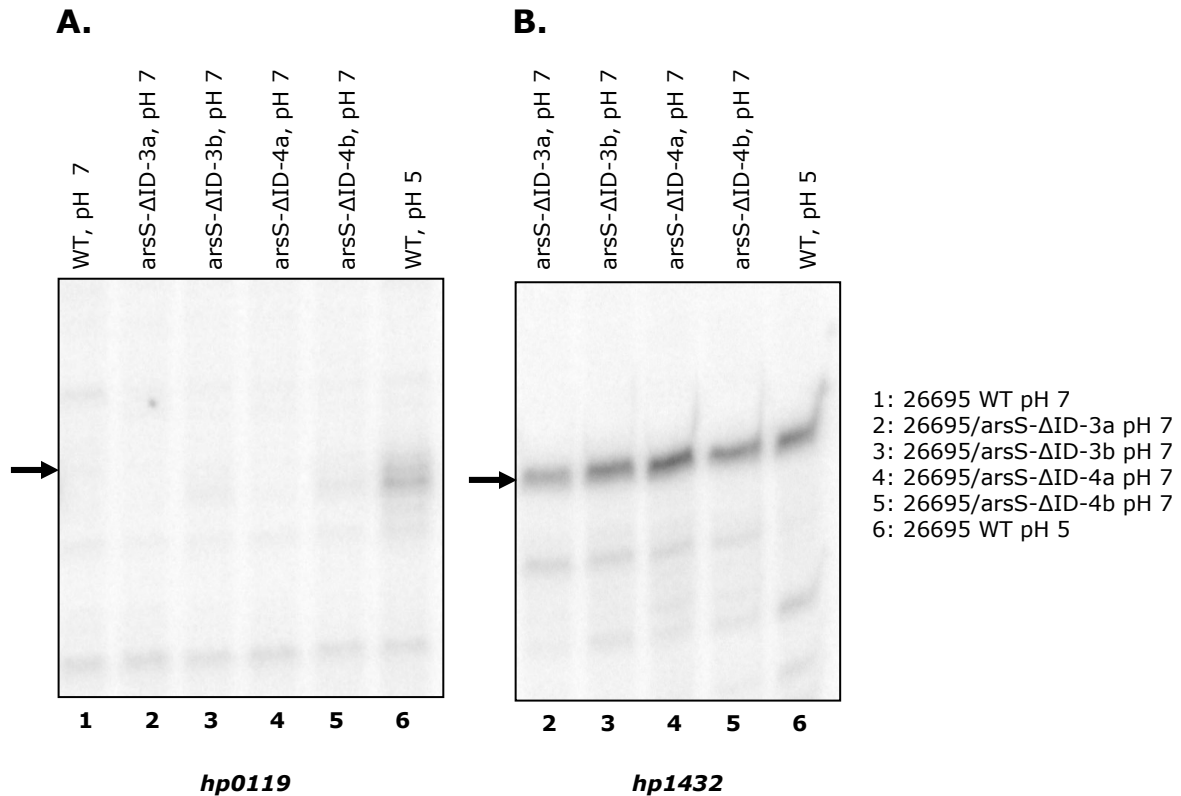


Abb. 31: Ergebnis der PE-Analyse der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-ΔID bei pH 7. Untersucht wurde die Expression des Target-Gens *hp0119* (A) und *hp1432* (B) der Klone -3 und -4 unter Verwendung der PE-Primer hp0119-PE und hp1432-PE. Es wurden jeweils 30 μg Gesamtzell-RNA als Ausgangsmaterial für das Experiment eingesetzt. Die *hp0119*- bzw. *hp1432*-spezifischen Transkripte sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Von den Klonen -3 und -4 der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-ΔID wurden zwei unabhängige RNA-Präparationen (a und b) als Template für die PE-Analyse eingesetzt.

Weder für die Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-ΔID-3 und -4 (Spuren 2, 3, 4 und 5) noch für den WT (Spur 1) konnte eine Transkription des Gens *hp0119* bei pH 7 detektiert werden. Für das Gen *hp1432* (Abb. 31B) jedoch entspricht das erhaltene Signal unter neutralen pH-Bedingungen in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-ΔID -3 und -4 (Spuren 2, 3, 4 und 5) dem des WT unter sauren pH-Bedingungen (Spur 6). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass in den Klonen -3 und -4 der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-ΔID durch die Deletion der periplasmatischen Sensor-Domäne eine konstitutiv aktive HK ArsS-ΔID konstruiert wurde. Die Frage, ob tatsächlich nur die periplasmatische Sensordomäne an der Säurewahrnehmung durch die HK ArsS beteiligt ist, konnte aufgrund der widersprüchlichen Resultate nicht geklärt werden.

1.2 Vergleichende Analyse der ArsS Orthologen von *Helicobacter hepaticus*, *Campylobacter jejuni* und *Wolinella succinogenes*

Ebenfalls der ϵ -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet werden die mit *H. pylori* nahe verwandten Arten *H. hepaticus*, *W. succinogenes* und *C. jejuni* (s. Abb. 32). Alle vier Bakterien-Arten sind Mitglied der Ordnung *Campylobacterales*, jedoch verschiedenen Familien zugeordnet. *H. pylori*, *H. hepaticus* und *W. succinogenes* gehören zur Familie der *Helicobacteraceae*, *C. jejuni* stellt ein Mitglied der Familie der *Campylobacteraceae*.

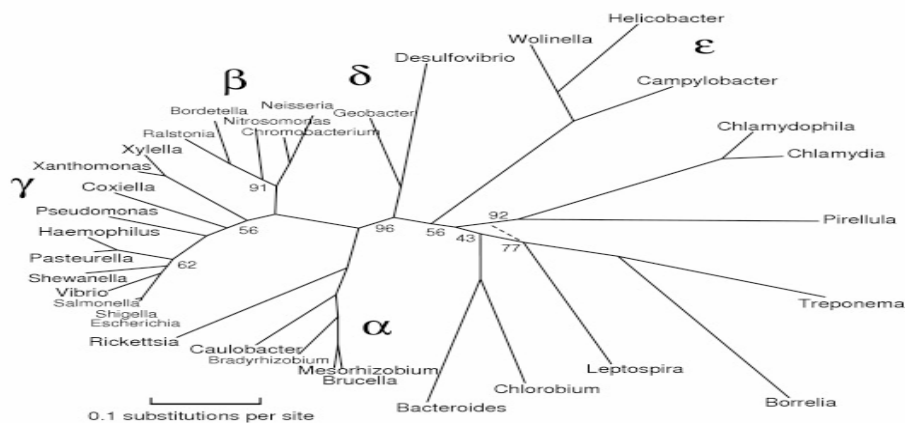


Abb. 32: Phylogenetischer Stammbaum der Eubakterien. Der ϵ -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet werden, wie auch *H. pylori*, die mit *H. pylori* nahe verwandten Arten *H. hepaticus*, *W. succinogenes* und *C. jejuni*.

Bei *H. hepaticus* handelt es sich um eine enterohepatische *Helicobacter*-Spezies, die den Darm von Mäusen kolonisiert und von dort in die Leber einwandern kann. Der Keim kann dort Leberentzündung (Hepatitis) und Leberkrebs auslösen (Fox et al., 1994). In immundefizienten Mäusen kann es nach einer Infektion mit *H. hepaticus* zu einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung kommen, die den menschlichen Krankheitsbildern von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa ähnelt (Kullberg et al., 1998). *C. jejuni* ist weltweit die Hauptursache für Durchfallerkrankungen des Menschen, die durch bakteriell kontaminierte Nahrungsmittel ausgelöst werden (Blaser, 1997). *W. succinogenes* ist im Gegensatz zu den drei anderen Bakterien-Arten kein Pathogen. Er kolonisiert als Kommensal den Pansen von Rindern (Wolin et al., 1961)

Die Stämme *Helicobacter hepaticus* ATCC 51449 (Suerbaum et al., 2003), *Wolinella succinogenes* DSMZ 1740 (Baar et al., 2003) und *Campylobacter jejuni* NCTC 1168 (Parkhill et al., 2000) sind komplett sequenziert. Aufgrund von Sequenzhomologien konnten in diesen Bakterienarten Orthologe zum ArsRS Zweikomponenten-System von *H. pylori* identifiziert werden (Suerbaum et al., 2003, Parkhill et al., 2000; Baar et al., 2003). Die zum ArsRS orthologen Zweikomponenten-System-Proteine sind in der Tabelle 18 zusammengefasst. Weder über die Funktion dieser homologen Zweikomponenten-Systeme noch über die durch die Histidin-Kinasen wahrgenommenen Umweltreize ist bisher etwas bekannt.

Tab. 18: Zusammenstellung der zum ArsRS Zweikomponenten-System von *H. pylori* orthologen Proteine aus *Helicobacter hepaticus*, *Campylobacter jejuni* und *Wolinella succinogenes*. Angegeben sind die Identitäten in % zwischen den orthologen HKs im Bereich der Inputdomäne (ID) und der Transmitterdomäne (TD) im Vergleich zur AS-Sequenz der HK ArsS.

Bakterium	Histidin-Kinase (HK)	% identische AS der ID von ArsS	% identische AS der TD von ArsS	Response-Regulator (RR)
<i>H. pylori</i>	ArsS (HP0165/HP0164)			ArsR (HP0166)
<i>H. hepaticus</i>	HH1607	26,9 %	43,5 %	HH1608
<i>C. jejuni</i>	CJ1262	18,5 %	34,3 %	CJ1261
<i>W. succinogenes</i>	WS1818	25,9 %	41,0 %	WS1817

Die Bakterien *H. hepaticus*, *C. jejuni* und *W. succinogenes* sind aufgrund ihrer ökologischen Nischen im Gegensatz zu *H. pylori* nicht ständig extrem niedrigen pH-Werten ausgesetzt. Wie man in einem AS-Alignment der HK sehen kann (Abb. 33), sind die zu ArsS homologen Histidin-Kinasen dieser Organismen vor allem im Bereich der Transmitterdomäne (TD) stark konserviert, nicht so stark dagegen im Bereich der periplasmatischen Inputdomäne (ID). Die Prozentzahlen der zu ArsS identischen AS der ID und der TD der orthologen HK sind in der Tab. 18 angegeben. Aus diesem Grund stellt sich nun die Frage, ob die orthologen Histidin-Kinasen ebenso wie die Kinase ArsS Unterschiede im pH-Wert als einen Umweltreiz wahrnehmen können. Es sollten hybride *H. pylori* Mutanten konstruiert werden, in welchen die Histidin-Kinase ArsS durch eine der drei orthologen Kinasen ersetzt ist. In diesen Mutanten sollte dann die Säurewahrnehmung durch die entsprechenden Kinasen analysiert werden, indem die säureabhängige Transkriptionsinduktion von bekannten ArsRS Target-Genen wie z. B. *hp0119* oder *ureA* untersucht wird. Sollte eine der drei Histidin-Kinasen HH1607, CJ1262 oder WS1818 Säure als einen Umweltreiz wahrnehmen, käme es zur Phosphorylierung des RR ArsR. ArsR~P könnte dann im Weiteren an die Promotorstrukturen der untersuchten Target-Gene binden und deren Transkription aktivieren.

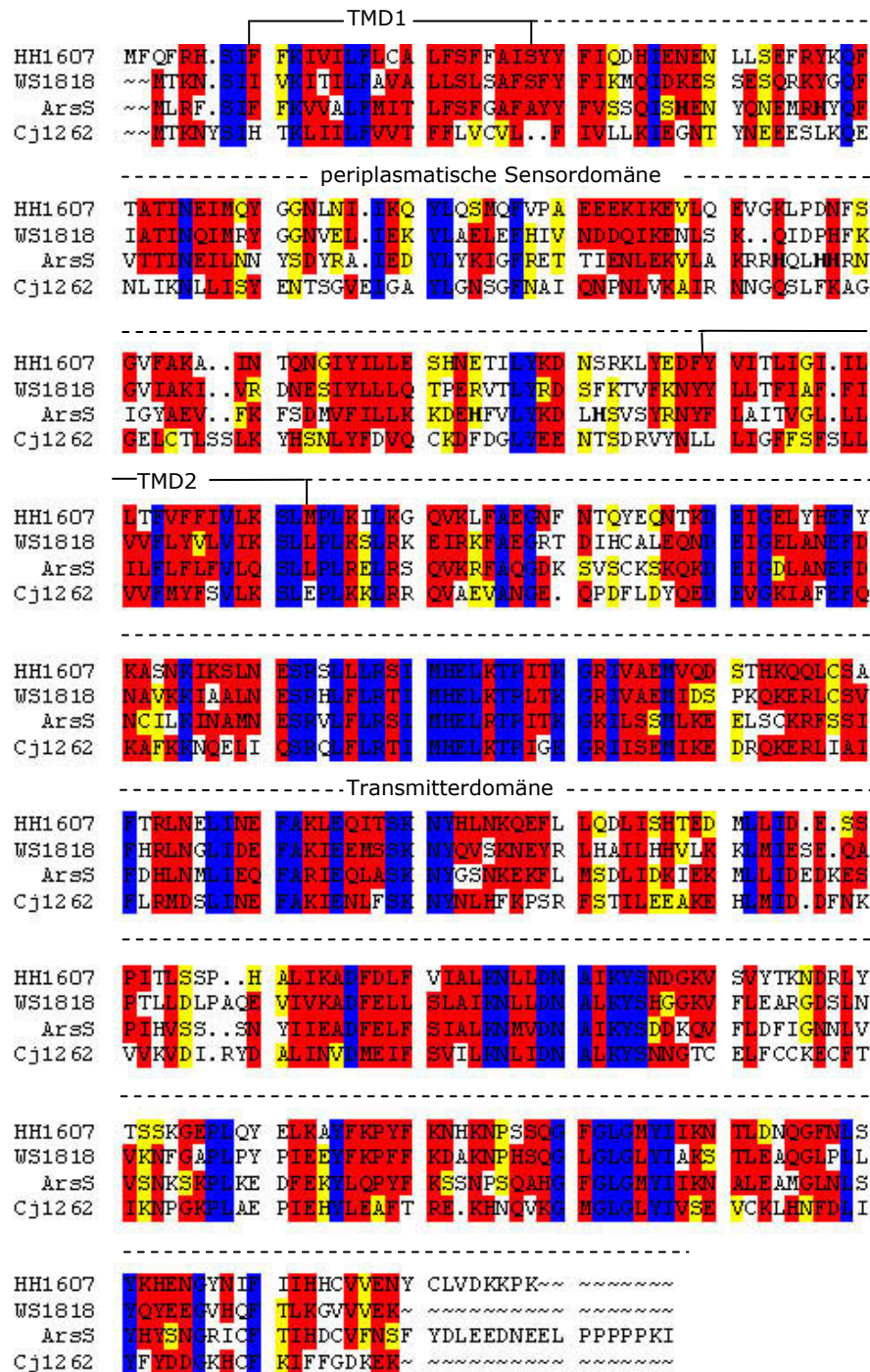


Abb. 33: AS-Alignment der orthologen HK HH1607, WS1818, ArsS und Cj1262 der nahe miteinander verwandten Bakterienarten *H. hepaticus*, *W. succinogenes*, *H. pylori* und *C. jejuni*. Das Alignment wurde mit dem HUSAR-Programm (http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/biounit/tools_db.shtml#husar) des „Biocomputing Service“ des DKFZ erstellt. Die TMDs 1 und 2, die periplasmatische Sensordomäne und die cytoplasmatische Transmitterdomäne sind eingezeichnet. TMD: Transmembrandomäne. 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.

1.2.1 Kreuzphosphorylierungen zwischen den orthologen Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren

Eine wichtige Voraussetzung für diese Versuche im genetischen Hintergrund von *H. pylori* ist, dass durch eine Kreuzphosphorylierung zwischen den verschiedenen Kinasen und dem Response-Regulator ArsR die Signaltransduktion von den Kinasen auf den RR gewährleistet ist. Um einen vollständigen Überblick über die Kreuzphosphorylierungseigenschaften der untersuchten Histidin-Kinasen zu gewinnen, wurden auch die zu ArsR orthologen RR HH1608, CJ1261 und WS1817 auf ihre Phosphorylierbarkeit durch die Histidin-Kinasen überprüft.

a) Überexpression und Aufreinigung der Histidin-Kinasen ArsS, HH1607, CJ1262 und WS1818

In einer früheren Arbeit konnte für die Histidin-Kinase ArsS gezeigt werden, dass in der Abwesenheit der Inputdomäne eine konstitutive Autophosphorylierungsaktivität der Kinase-Domäne beobachtet werden kann (Beier und Frank, 2000). Aus diesem Grund wurde von den orthologen Histidin-Kinasen ArsS, HH1607, CJ1262 und WS1818 nur die cytoplasmatische Transmitterdomäne (TD) überexprimiert und aufgereinigt. Die für die TD codierende Bereiche der Histidin-Kinase ArsS von *H. pylori* (AS 167 – 414; Beier und Frank, 2000) und der Orthologen HH1607 in *H. hepaticus* ATCC51449 (AS 181 - 419), CJ1262 in *C. jejuni* 4344 (AS 185 - 411) und WS1818 in *W. succinogenes* DSMZ1740 (AS 179 - 409) wurden mit den in der Tab. 19 aufgelisteten Primerkombinationen ausgehend von chromosomaler DNA der entsprechenden Stämme PCR-amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden in den *Bam*HI/*Eco*RI verdauten Vektor pGEX-3X (Amersham Biosciences) „in Frame“ mit dem *gst*-Gen, welches für die Glutathion-S-Transferase (GST) codiert, ligiert. Das pGEX-Überexpressionssystem wurde gewählt, um durch die Fusion der ca. 26 - 29 kDa TD der Histidin-Kinasen mit dem GST-Protein (~ 26 kDa) rekombinante Proteine mit einer Größe von ca. 52 - 55 kDa zu erzeugen, um in weiteren Versuchen (vgl. Punkt 1.2.1c) die Histidin-Kinasen aufgrund ihres Molekulargewichts von den Response-Regulatoren unterscheiden zu können.

Tab. 19: Verwendete Primerkombinationen zur Konstruktion der Plasmide pGEX-ArsS, pGEX-HH1607, pGEX-CJ1262 und pGEX-WS1818. Neben den Primerkombinationen sind in der Tabelle die erwarteten Molekulargewichte der rekombinanten Proteine GST-ArsS, GST-HH1606, GST-CJ1262 und GST-WS1818 aufgelistet.

Fragment	Primerkombination	Größe des rekombinanten Proteins (Fusionsprotein bestehend aus GST und der TD der jeweiligen HK)
ArsS	ArsS-E5/ArsS-E3	55,1 kDa
HH1607	HH1607-E5/ HH1607-E3	54,1 kDa
CJ1262	CJ1262-E5/CJ1262-E3	53,4 kDa
WS1818	WS1818-E5/WS1818-E3	52,6 kDa

Die Größe der rekombinanten Proteine wurde mit dem ProtParam-Programm, welches auf <http://expasy.org> zur Verfügung gestellt ist, basierend auf den bekannten Sequenzen von *H.*

pylori 26695, *H. hepaticus* ATCC 51449, *C. jejuni* NCTC 11168 und *W. succinogenes* DSMZ 1740, kalkuliert. In den durch Transformation mit den Ligationsansätzen erhaltenen Stämmen *E. coli* DH5 α :pGEX-ArsS, *E. coli* DH5 α :pGEX-HH1607, *E. coli* DH5 α :pGEX-CJ1262 und *E. coli* DH5 α :pGEX-WS1818 wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM) die Proteinexpression induziert (vgl. D.4.3.2). Anschließend wurden die Kinase-Proteine GST-ArsS, GST-HH1607, GST-CJ1262 und GST-WS1818 entsprechend der unter Punkt D.4.4.3 beschriebenen Vorgehensweise aufgereinigt. In der Abb. 34 sind die aufgereinigten GST-Kinase-Fusionsproteine zu sehen.

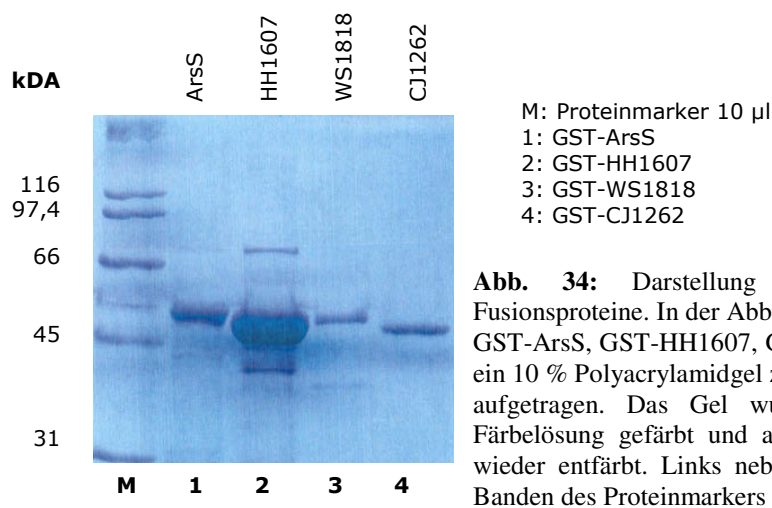


Abb. 34: Darstellung der gereinigten GST-Kinase-Fusionsproteine. In der Abb. sind 20 μ l der gereinigten Proteine GST-ArsS, GST-HH1607, GST-WS1818 und GST-CJ1262 auf ein 10 % Polyacrylamidgel zusammen mit 10 μ l Lämmli-Puffer aufgetragen. Das Gel wurde mit einer Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt und anschließend mit 10 % Essigsäure wieder entfärbt. Links neben der Abb. sind die Größen der Banden des Proteinmarkers dargestellt.

b) Überexpression und Aufreinigung der Response-Regulatoren ArsR, HH1608, CJ1261 und WS1817

Um die Response-Regulatoren HH1608, CJ1261 und WS1817 in rekombinanter Form aufzureinigen zu können, wurden zunächst ausgehend von der chromosomalen DNA der jeweiligen Stämme mit den in der Tabelle 20 aufgeführten Primerkombinationen die Fragmente HH1609, CJ1261 und WS1817 PCR-amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in den Vektor pQE30 ligiert und somit an einen N-terminalen His₆-Tag fusioniert.

Tab. 20: Verwendete Primerkombinationen zur Herstellung der Plasmide pQE-HH1608, pQE-CJ1261 und pQE-WS1817. Weiterhin sind in der Tabelle noch die Molekulargewichte der rekombinanten Proteine His₆-1608, His₆-CJ1261 und His₆-WS1817 aufgelistet.

Fragment	Primerkombination	Größe des rekombinanten His ₆ -Proteins
HH1608	HH1608-E5/ HH1608-E3	27,1 kDa
CJ1261	CJ1261-E5/CJ1261-E3	26,7 kDa
WS1817	WS1817-E5/WS1817-E3	27,3 kDa

In den durch Transformation mit den Ligationsansätzen erhaltenen Stämmen *E. coli* M15:pQE-HH1608, *E. coli* M15:pQE-CJ1261 und *E. coli* M15:pQE-WS1817 wurde durch

Zugabe von 1 mM IPTG die Proteinexpression der Response-Regulatoren induziert (vgl. Punkt D.4.3.1). Anschließend wurden die RR entsprechend der unter Punkt D.4.4.2 beschriebenen Vorgehensweise für die Aufreinigung rekombinanter His₆-Proteine aufgereinigt. Der RR His₆-ArsR (27,0 kDa) wurde von Jennifer Schär aufgereinigt. In der Abb. 35 sind die gereinigten His₆-RR zu sehen.

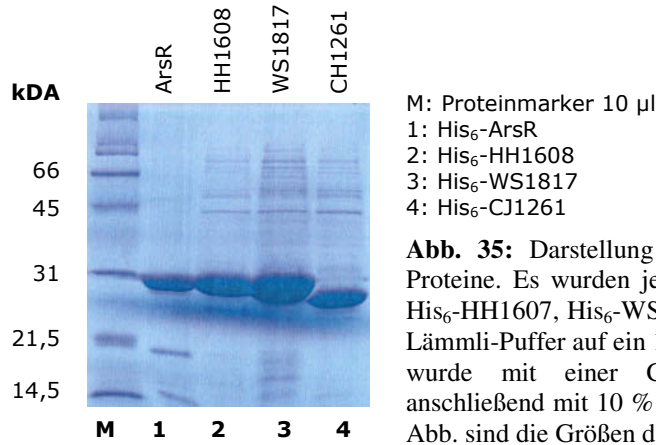


Abb. 35: Darstellung der gereinigten His₆-Response-Regulator-Proteine. Es wurden je 20 μ l der gereinigten Proteine His₆-ArsR, His₆-HH1607, His₆-WS1817 und His₆-CJ1261 zusammen mit 10 μ l Lämmli-Puffer auf ein 15 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde mit einer Coomassie-Blau-Färbelösung gefärbt und anschließend mit 10 % Essigsäure wieder entfärbt. Links neben der Abb. sind die Größen der Banden des Proteinmarkers angegeben.

c) Analyse der Phosphorylierbarkeit der ArsR Orthologen durch die Histidin-Kinasen ArsS, HH1607, WS1818 und CJ1262

Mit den gereinigten Kinase- und Response-Regulator-Proteinen wurden *in vitro* Phosphorylierungsexperimente durchgeführt. Zunächst sollte überprüft werden, ob eine Phosphorylierung des RR ArsR durch die zu ArsS orthologen Histidin-Kinasen HH1607, CJ1262 und WS1818 stattfinden kann. Die Kinase-Proteine GST-ArsS, GST-HH1607, GST-CJ1262 und GST-WS1818 (1 μ M) wurden mit γ ³³P-ATP phosphoryliert (vgl. Punkt D.4.7). Zu jeweils einem zweiten Ansatz wurde zu den jeweiligen Histidin-Kinasen der Response-Regulator His₆-ArsR (5 μ M) zugegeben. Das Ergebnis dieses *in vitro* Phosphorylierungsassays ist in der Abb. 36 zu sehen.

Eine Autophosphorylierung der Transmitterdomänen der Histidin-Kinasen ArsS (Spur 1), HH1607 (Spur 3) und CJ1262 (Spur 7) konnte beobachtet werden, eine Autophosphorylierung der Histidin-Kinase WS1818 (Spur 5) jedoch nicht (Abb. 36), auch nicht nach einer Verdopplung der Kinase-Konzentration im Phosphorylierungsansatz auf 2 μ M (Ergebnis nicht dargestellt). Auch ein erneut aufgereinigtes Kinase-Protein GST-WS1818 zeigte keine Autophosphorylierung. Es kann deshalb keine Aussage über die Fähigkeit der HK WS1818, die unterschiedlichen Response-Regulatoren zu phosphorylieren, gemacht werden. Eine Autophosphorylierung des Response-Regulatoren ArsR, CJ1261, WS1817 und HH1608 durch γ ³³P-ATP findet nicht statt, wie in einem weiteren Experiment (Ergebnisse nicht dargestellt) gezeigt werden konnte.

Eine Phosphorylierung des RR ArsR findet in Gegenwart der HK ArsS (Spur 2), HH1607 (Spur 4) und CJ1262 (Spur 8) statt. Für diese Kinasen konnte somit ein Phosphotransfer auf den RR ArsR bestätigt werden.

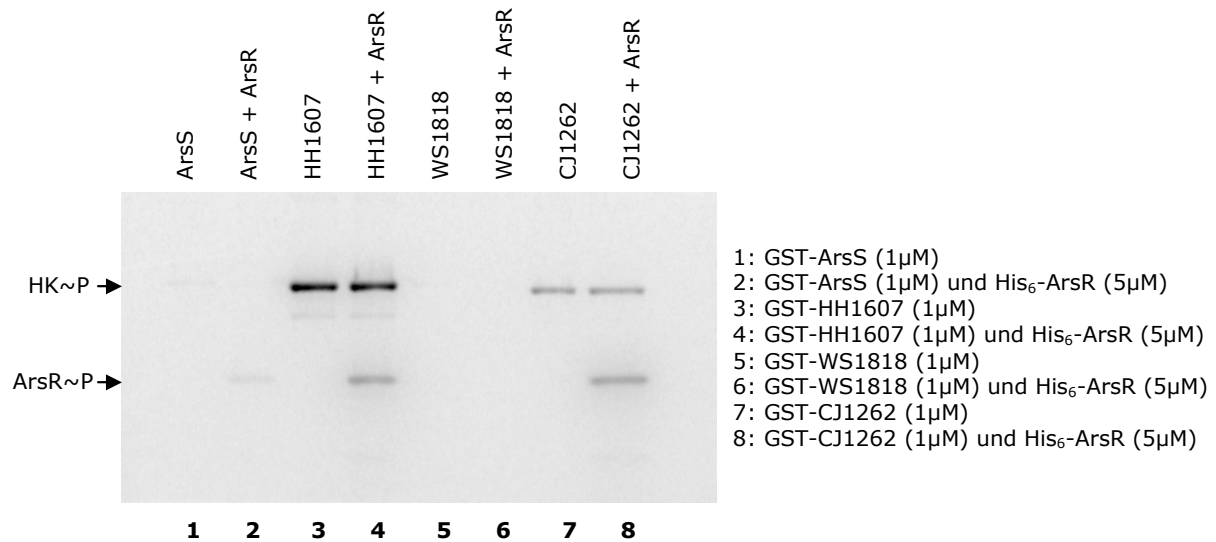


Abb. 36: *In vitro* Phosphorylierungsexperimente zur Analyse der Phosphorylierbarkeit des Response-Regulators His₆-ArsR durch die Transmitterdomänen der Histidin-Kinasen ArsS, HH1607, WS1818 und CJ1262. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese der Phosphorylierungsansätze auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel. Die schwarzen Pfeile markieren die jeweiligen Banden, die den ca. 52 - 55 kDa phosphorylierten GST-Kinase-Proteinen (HK~P) bzw. dem 27,1 kDa phosphoryliertem Response-Regulator ArsR (ArsR~P) entsprechen.

Das Ergebnis der Phosphorylierungsassays zur Analyse der Phosphorylierung der RR ArsR, HH1608, WS1827 und CJ1261 durch die Histidin-Kinasen ArsS, HH1607 und CJ1262 ist in der Abb. 37 zu sehen.

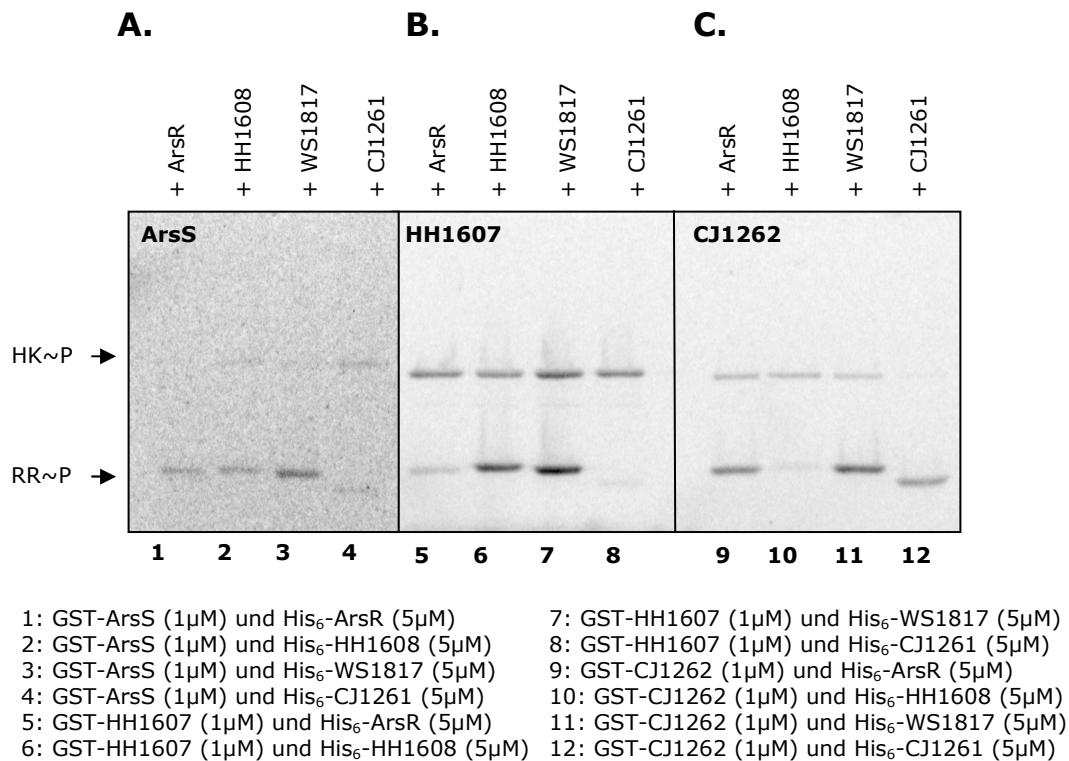


Abb. 37: *In vitro* Phosphorylierungsexperimente zur Analyse der Phosphorylierbarkeit der Response-Regulatoren His₆-ArsR, His₆-HH1608, His₆-WS1817 und His₆-CJ1261 durch die Transmitterdomänen der Histidin-Kinasen GST-ArsS (A), GST-HH1607 (B) und GST-CJ1262 (C). Die Abbildung zeigt die Autoradiogramme nach der Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden die Phosphorylierungsansätze auf ein 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel. Die schwarzen Pfeile markieren die jeweiligen Banden, die den ca. 52 - 55 kDa phosphorylierten GST-Kinase-Proteinen (HK~P) bzw. den ca. 27,1 kDa phosphorylierten Response-Regulatoren (RR~P) entsprechen.

Die untersuchten Histidin-Kinasen ArsS (Abb. 37A), HH1607 (Abb. 37B) und CJ1262 (Abb. 37C) sind in der Lage, sowohl den jeweils korrespondierende RR als auch die orthologen Proteine zu phosphorylieren. Die Kreuzphosphorylierung zwischen den ArsRS Orthologen von *H. hepaticus* und *C. jejuni* ist schwach (Spuren 8 und 10), der RR WS1817 wird von allen drei analysierten Histidin-Kinasen besonders gut phosphoryliert (Spuren 3, 7 und 11).

1.2.2 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818

Nachdem wie unter Pkt. 1.2.1 gezeigt werden konnte, eine Kreuzphosphorylierung zwischen den Histidin-Kinasen HH1607 und CJ1262 und dem RR ArsR stattfindet, wurden die Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818 konstruiert, in denen die Histidin-Kinase ArsS durch eine der orthologen Histidin-Kinasen HH1607, CJ1262 oder WS1818 ersetzt ist. Zur Analyse der Säurewahrnehmung der orthologen HK wurde in den hybriden *H. pylori* Stämmen die säureabhängige Induktion der Transkription des ArsRS Target-Gens *hp0119* analysiert.

Es wurden zunächst die Plasmide pSL-HH1607, pSL-CJ1262 und pSL-WS1818 konstruiert. Zu diesem Zweck wurden die für die Histidin-Kinasen codierenden Bereiche mit den Primerkombinationen HH1607-5/HH1607-3, CJ1262-5/CJ1262-3 und WS1818-5/WS1818-3 ausgehend von chromosomaler DNA von *H. hepaticus* AtCC51449, *C. jejuni* 4344 und *W. succinogenes* DSMZ1740 PCR-amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente HH1607, CJ1262 und WS1818 wurden zusammen mit einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (Cm^r-Kassette)

von *Campylobacter coli* (Wang und Taylor, 1990) in ein geeignetes Vorläuferkonstrukt ligiert.

Das Vorläuferkonstrukt pSL-arsR-hp0163 setzt sich zusammen aus zwei für die homologe Rekombination benötigten flankierenden Fragmenten, arsR und hp0163. Das 393 bp *EcoRI/SmaI* Fragment arsR codiert für das 3'-Ende des Gens *arsR*, das 630 bp *PstI/SacI* Fragment hp0163 enthält 66 bp der intergenischen Region zwischen *arsS* und *hp0163* sowie das 5'-Ende des Gens *hp0163*. Für die Konstruktion des Plasmids pSL-HH1607 wurde das HH1607-Fragment über die Schnittstellen *SmaI* und *XbaI*, die Cm^r-Kassette (PCR-amplifiziert mit den Primern Cm-I und Cm-II) über die Schnittstellen *XbaI* und *PstI* in das Vorläuferkonstrukt pSL-arsR-hp0163 integriert. Zur Konstruktion des Plasmids pSL-CJ1262 wurde das CJ1262-Fragment über die Schnittstellen *SmaI* und *PstI* in das Vorläuferkonstrukt integriert, da innerhalb des CJ1262-Fragmentes eine *XbaI*-Schnittstelle lokalisiert ist. Aus diesem Grund erfolgte die Integration der Cm^r-Kassette (PCR-amplifiziert mit den Primern Cm-Pst-5/Cm-II) in das Plasmid pSL-CJ1262 nur über *PstI*-Schnittstellen. Die gewünschte 5'-3'-Orientierung der Cm^r-Kassette zwischen den Fragmenten CJ1262 und hp0163 wurde mittels PCR-Analysen überprüft. Für die Konstruktion des Plasmids pSL-WS1818 wurde das Fragment WS1818 über die Schnittstellen *SmaI* und *XbaI* in pSL-arsR-hp0163 kloniert. Da innerhalb des WS1818 Fragments eine *PstI* Schnittstelle vorhanden ist, wurde die Cm^r-Kassette (PCR-amplifiziert mit den Primern Cm-I/Cm-3-Not) über die Schnittstellen *XbaI/NotI* integriert.

Die Konstruktion der Kinaseaustauschmutanten im genetischen Hintergrund von *H. pylori* 26695 gelang auch nach mehreren unabhängigen Transformationen nicht, weshalb die Mutanten im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27 erstellt wurden. Zur Konstruktion der Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818 wurde die ArsS-Deletionsmutante *H. pylori* G27/HP165::km (Beier und Frank, 2000), in welcher das Gen *arsS* durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette (Kan^r-Kassette) ersetzt ist, mit den Plasmiden pSL-HH1607, pSL-CJ1262 und pSL-WS1818 transformiert. Durch einen Allelaustausch sollte die Kan^r-Kassette der ArsS Deletionsmutante durch die Gene für die entsprechenden Histidin-Kinasen HH1607, CJ1262 und WS1818 sowie die Cm^r-Kassette ersetzt werden. Eine schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse, die zur Entstehung der hybriden *H. pylori* Stämme führen, ist beispielhaft für die Konstruktion der Mutante *H. pylori* G27/HH1607 in der Abb. 38 dargestellt.

In den erhaltenen Mutanten wurde mittels PCR-Analysen überprüft, ob die Integration der Genkopien für die Histidin-Kinasen HH1607, CJ1262 und WS1818 zusammen mit der Cm^r-Kassette in den *arsRS*-Lokus wie erwartet stattgefunden hat. In der Tabelle 21 sind die für die Charakterisierungs-PCR verwendeten Primerkombinationen aufgelistet.

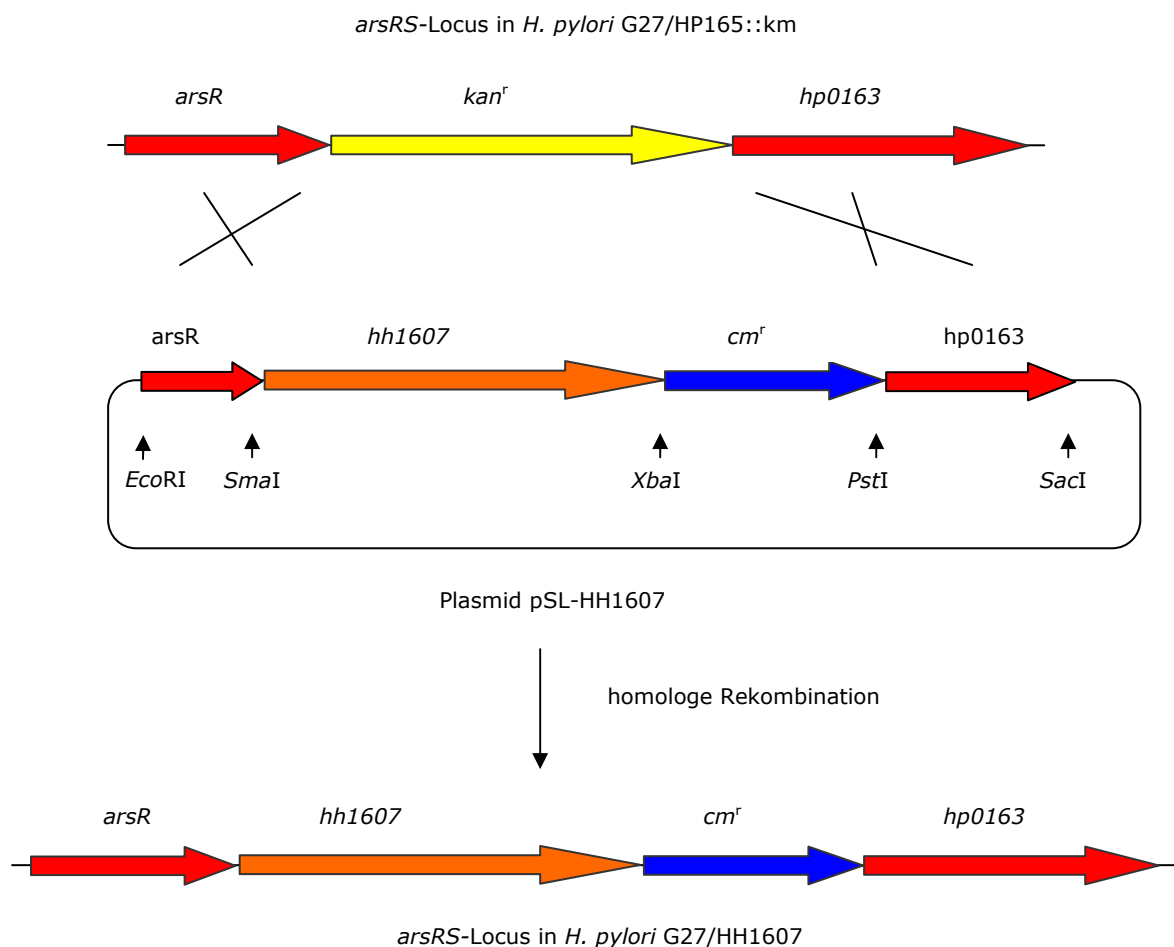


Abb. 38: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Konstruktion der Mutante *H. pylori* G27/HH1607. Nach der Transformation von *H. pylori* G27/HP165::km mit dem Plasmid pSL-HH1607 wird durch Rekombination der flankierenden Bereiche *arsR* und *hp0163* mit den homologen Bereichen des bakteriellen Genoms (dargestellt durch überkreuzte Striche) eine Genkopie der Histidin-Kinase HH1607 zusammen mit dem Selektionsmarker *Cm^r*-Kassette in den *arsRS*-Locus integriert.

Tab. 21: Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818

Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/HH1607

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge
1) <i>arsR</i> -ext-5/HH1607-3	1808 bp
2) HH1607-5/ <i>Cm</i> -II	2040 bp
3) <i>Cm</i> -I/ <i>hp0163</i> -ext-3	1441 bp
4) HH1607-5/HH1607-3	1309 bp

Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/CJ1262

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge
5) <i>arsR</i> -ext-5/CJ1262-3	1806 bp
6) CJ1262-5/ <i>Cm</i> -II	2038 bp
7) <i>Cm</i> -I/ <i>hp0163</i> -ext-3	1441 bp
8) CJ1262-5/CJ1262-3	1307 bp

Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/WS1818

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge
9) arsR-ext-5/WS1818-3	1778 bp
10) WS1818-5/Cm-II	2010 bp
11) Cm-I/hp0163-ext-3	1449 bp
12) WS1818-5/WS1818-3	1279 bp

Eine schematische Darstellung der Bindestellen der für die Charakterisierung der Kinaseaustauschmutanten verwendeten Oligonukleotide ist in der Abb. 39 beispielhaft für die Primerkombinationen, die zur Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/HH1607 verwendet wurden, zu sehen.

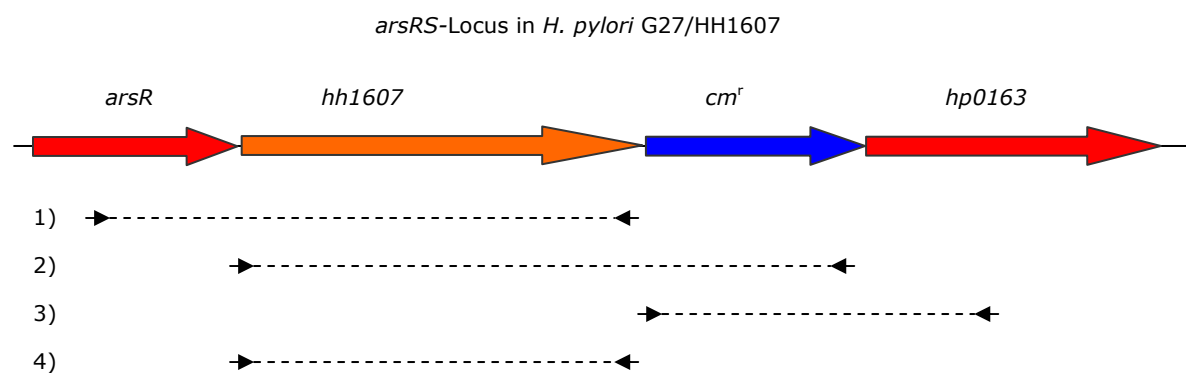


Abb. 39: Schematische Darstellung der Bindestellen der für die Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27HH1607 verwendeten Primerkombinationen. Durch Integration des ORFs *hh1607*, der für die Histidin-Kinase HH1607 aus *H. hepaticus* codiert, zusammen mit dem Selektionsmarker *Cm^r* in den *arsRS*-Locus der Mutante *H. pylori* G27/HP165::*km* entstand die Mutante *H. pylori* G27/HH1607, deren *arsRS*-Locus hier dargestellt ist. Für die PCR-Analyse wurden vier verschiedene Primerkombinationen eingesetzt.

In der Abb. 40 ist das Ergebnis der durchgeführten PCR-Analysen zu sehen. Es wurden von jeder Mutante zwei Klone (-1 und -2) charakterisiert.

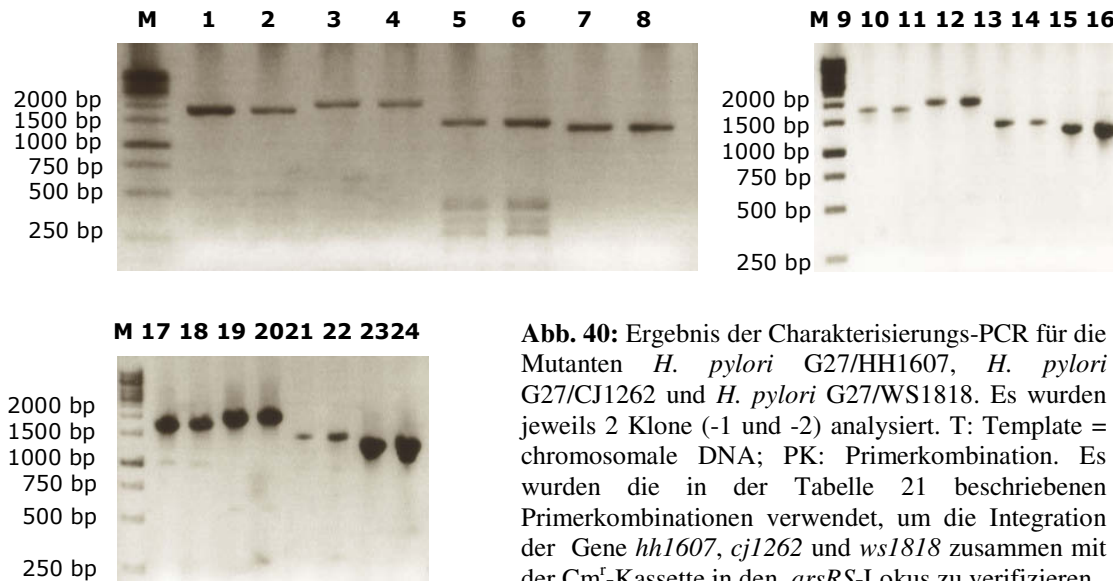


Abb. 40: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR für die Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818. Es wurden jeweils 2 Klone (-1 und -2) analysiert. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 21 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration der Gene *hh1607*, *cj1262* und *ws1818* zusammen mit der *Cm^r*-Kassette in den *arsRS*-Lokus zu verifizieren.

M: 1 kb DNA Marker

1: T: *H. pylori* G27/HH1607-1; PK: 1)
 2: T: *H. pylori* G27/HH1607-2; PK: 1)
 3: T: *H. pylori* G27/HH1607-1; PK: 2)
 4: T: *H. pylori* G27/HH1607-2; PK: 2)
 5: T: *H. pylori* G27/HH1607-1; PK: 3)
 6: T: *H. pylori* G27/HH1607-2; PK: 3)
 7: T: *H. pylori* G27/HH1607-1; PK: 4)
 8: T: *H. pylori* G27/HH1607-2; PK: 4)
 9: T: *H. pylori* G27/CJ1262-1; PK: 5)
 10: T: *H. pylori* G27/CJ1262-2; PK: 5)
 11: T: *H. pylori* G27/CJ1262-1; PK: 6)
 12: T: *H. pylori* G27/CJ1262-2; PK: 6)

13: T: *H. pylori* G27/CJ1262-1; PK: 7)
 14: T: *H. pylori* G27/CJ1262-2; PK: 7)
 15: T: *H. pylori* G27/CJ1262-1; PK: 8)
 16: T: *H. pylori* G27/CJ1262-2; PK: 8)
 17: T: *H. pylori* G27/WS1818-1; PK: 9)
 18: T: *H. pylori* G27/WS1818-2; PK: 9)
 19: T: *H. pylori* G27/WS1818-1; PK: 10)
 20: T: *H. pylori* G27/WS1818-2; PK: 10)
 21: T: *H. pylori* G27/WS1818-1; PK: 11)
 22: T: *H. pylori* G27/WS1818-2; PK: 11)
 23: T: *H. pylori* G27/WS1818-1; PK: 12)
 24: T: *H. pylori* G27/WS1818-2; PK: 12)

Die Längen der bei den PCR-Analysen erhaltenen DNA-Fragmente (Abb. 40) entsprachen den Erwartungen. Die charakterisierten Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818 wurden zur Analyse der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinasen HH1607, CJ1262 und WS1818 eingesetzt. In den Mutanten wurde die Transkription des ArsRS Target-Gens *hp0119* unter neutralen (pH 7) und unter sauren pH-Bedingungen (pH 5) untersucht, und die erhaltenen Ergebnisse mit denen des Wildtyps *H. pylori* G27 und der ArsS-Deletionsmutante G27/HP165::km verglichen. Insgesamt wurden jeweils drei voneinander unabhängig isolierte RNA-Präparationen bzgl. der Transkription des Gens *hp0119* untersucht. Ein repräsentatives Ergebnis dieser PE-Analysen ist in der Abb. 41 zu sehen.

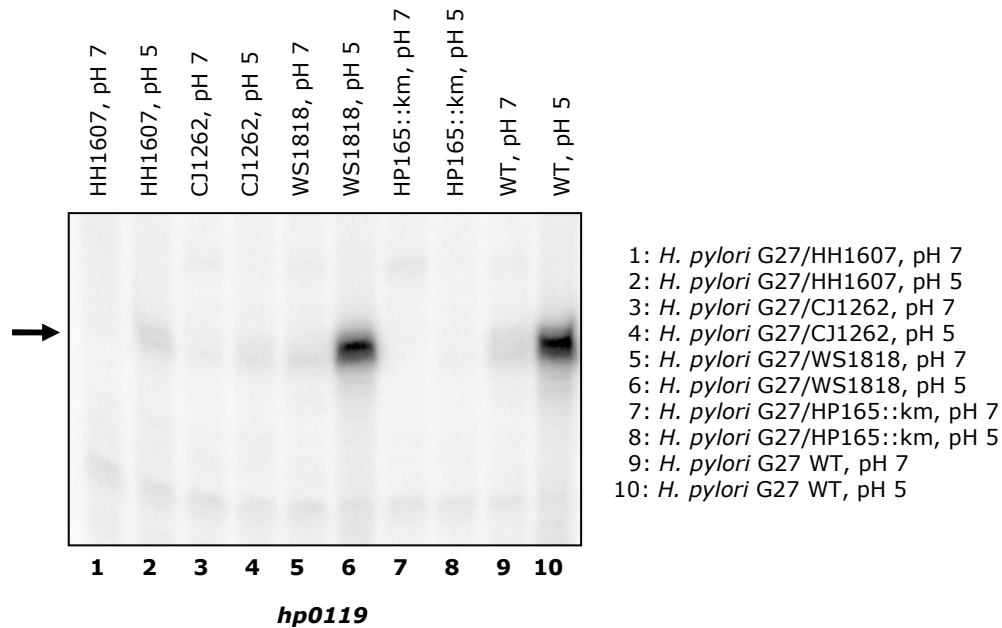


Abb. 41: PE-Analysen der Kinaseaustauschmutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818. Untersucht wurde die Transkription des Target-Gens *hp0119* in den verschiedenen Mutanten sowohl unter neutralen als auch sauren pH-Bedingungen. Das *hp0119*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil auf der linken Seite der Abbildung markiert.

Im WT *H. pylori* G27 findet bei sauren pH-Bedingungen (Spur 10) eine deutliche Induktion der Transkription des Gens *hp0119* im Vergleich zur Transkription unter neutralen pH-Bedingungen statt (Spur 9). Im Gegensatz zu *H. pylori* 26695 (vgl. z. B. Punkt 1.1.6, Abb. 18A) kann jedoch in *H. pylori* G27 auch unter neutralen pH-Bedingungen eine Basistranskription des Gens *hp0119* beobachtet werden. In der ArsS Deletionsmutante *H. pylori* G27/HP165::km kann weder unter neutralen (Spur 7) noch unter sauren pH-Bedingungen (Spur 8) ein *hp0119* spezifisches Transkript detektiert werden. Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die Mutante *H. pylori* G27/CJ1262. Unter neutralen pH-Bedingungen (Spur 3) ist kein Transkript detektierbar, unter sauren pH-Bedingungen kann ein sehr schwaches Signal erkannt werden (Spur 4). In der Mutante *H. pylori* G27/HH1607 kann bei pH 5 eine säureabhängige Induktion der *hp0119*-Transkription (Spur 2) im Vergleich zu neutralen pH-Bedingungen (Spur 1) beobachtet werden, jedoch ist die Transkriptionsinduktion deutlich schwächer als für den WT *H. pylori* G27. Für die Mutante *H. pylori* G27/WS1818 kann jedoch sowohl unter neutralen (Spur 5) als auch unter sauren pH-Bedingungen (Spur 6) eine dem Wildtyp entsprechende Transkription des Gens *hp0119* beobachtet werden.

Zusätzlich zu den durchgeführten PE-Analysen wurde in den Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818 die säureabhängige Induktion der Expression des ArsRS Target-Gens *ureB*, welches für die Untereinheit (UE) B des Urease-Proteins codiert, auf Proteinebene untersucht. Zu diesem Zweck wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, in welchen die UreB Expression in den Mutanten bei pH 7 und bei pH 5 mit der UreB Expression im Wildtyp und in der ArsS Deletionsmutante verglichen wurde. Es wurden je zwei unabhängig voneinander hergestellte Gesamtzell-Proteinlysate analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis der Western-Blot-Analysen ist in der Abb. 42 dargestellt.

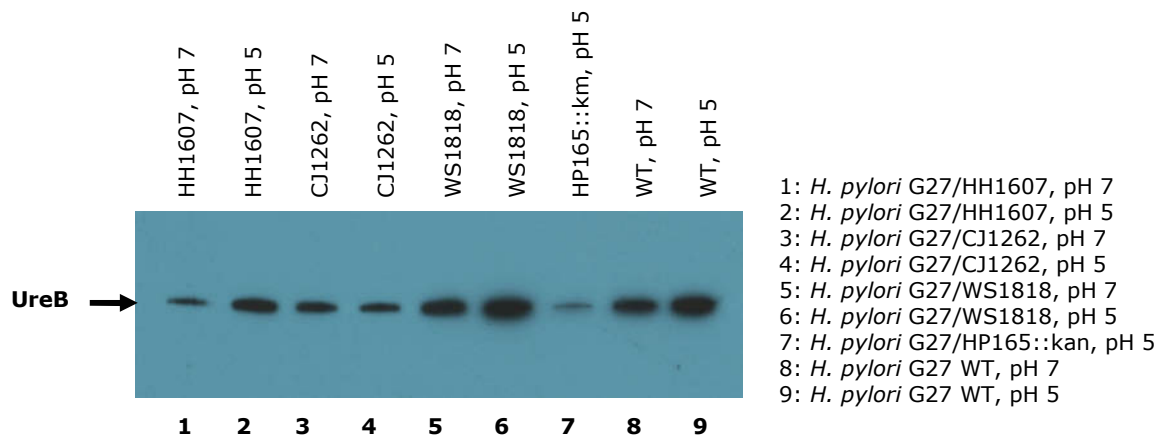


Abb. 42: Ergebnis der Western-Blot-Analysen der Kinaseaustauschmutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/ CJ1262 und *H. pylori* G27/WS1818. Untersucht wurde die Expression des Proteins UreB bei pH 7 und pH 5. Es wurden je 0,3 µg Gesamtzell-Protein auf das 8 % SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Eingesetzt wurden die AK α -UreB (1. AK; Verdünnung 1:8.000) und goat- α -rabbit-HRP (2. AK; Verdünnung 1:10.000). Der schwarze Pfeil markiert die Bande, welche dem 61,7 kDa UreB-Protein entspricht.

Die Western-Blot Analysen bestätigten das in der PE-Analyse (Vgl. Abb. 41) erhaltene Ergebnis. In der Mutante *H. pylori* G27/CJ1262 konnte unter sauren pH-Bedingungen (Spur 4) keine Zunahme der UreB-Expression im Vergleich zu neutralen pH-Bedingungen (Spur 3) beobachtet werden. In der Mutante *H. pylori* G27/HH1607 ist bei pH 5 (Spur 2) eine deutliche Zunahme an UreB Protein im Vergleich zu pH 7 (Spur 1) zu beobachten, jedoch ist die hier nachgewiesene Menge deutlich geringer als im WT *H. pylori* G27 bei pH 5 (Spur 9). Die Mutante *H. pylori* G27/WS1818 verhält sich bzgl. ihrer UreB-Expression sowohl unter neutralen (Spur 5) als auch unter sauren (Spur 6) pH-Bedingungen wie der WT *H. pylori* G27.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Histidin-Kinase WS1818 ebenso wie die Kinase ArsS in der Lage ist, Säure als einen Umweltreiz wahrzunehmen. Auch die Kinase HH1607 scheint in der Lage zu sein, Säure als einen Umweltreiz wahrzunehmen, jedoch nicht so effizient wie die Kinasen ArsS und WS1818. Die Histidin-Kinase CJ1262 ist nicht in der Lage, Säure als einen Umweltreiz wahrzunehmen.

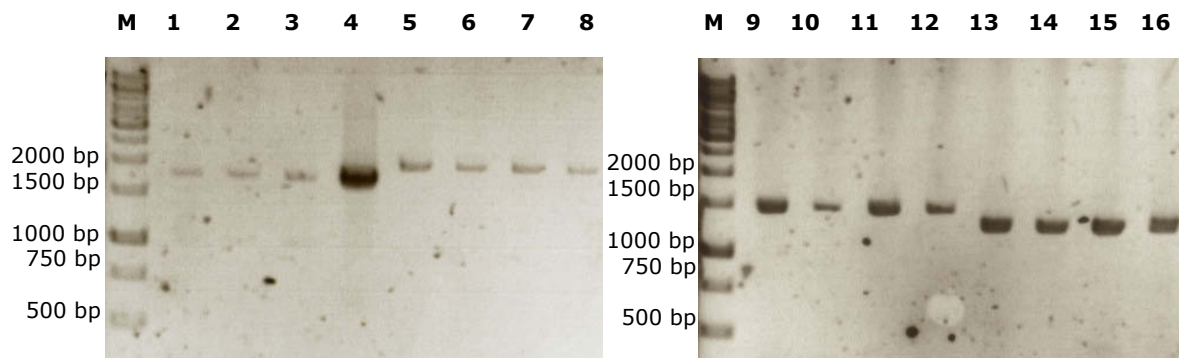
1.2.3 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q

In der Histidin-Kinase WS1818 ist im Gegensatz zu den Histidin-Kinasen HH1607 und CJ1262 der Histidinrest H92 (H94 bezogen auf die AS-Sequenz von ArsS), für den unter Pkt. 1.1.2 eine Funktion bei der Säurewahrnehmung der HK ArsS nachgewiesen wurde, konserviert (vgl. Abb. 43).



Abb. 43: AS-Alignment der TMD1, der periplasmatischen Sensor Domäne und der TMD2 der orthologen Histidin-Kinasen ArsS (*H. pylori*), HH1607 (*H. hepaticus*), WS1818 (*W. succinogenes*) und CJ1262 (*C. jejuni*). Markiert sind die Transmembrandomänen -1 und -2 (TMD1 und TMD2), die periplasmatische Inputdomänen befinden sich zwischen den beiden TMDs. Rot unterlegt sind die in den periplasmatischen Sensordomänen enthaltenen Histidinreste. Die angegebenen Nummern bezeichnen die Positionen der in der periplasmatischen Sensordomäne vorhandenen Histidinreste im ArsS-Protein.

Es stellt sich somit die Frage, ob der Histidinrest H92 auch in der Histidin-Kinase WS1818 eine Rolle bei der Säurewahrnehmung spielt. Es wurde deshalb die Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q konstruiert, die im Prinzip der Mutante *H. pylori* G27/WS1818 gleicht, in der jedoch der Histidinrest H92 in der periplasmatischen Sensordomäne der WS1818-Kinase durch die nicht protonierbare AS Glutamin substituiert ist. Um das Plasmid pSL-WS1818-H92Q zu konstruieren, wurden zunächst ausgehend von chromosomaler DNA von *W. succinogenes* DSMZ1740 zwei Fragmente mit den Primerpaaren WS1818-5/WS1818-H92Q-1 (Fragment 1) und WS1818-H92Q-2/WS1818-3 (Fragment 2) PCR-amplifiziert. Bei den Primern WS1818-H92Q-1 und WS1818-H92Q-2 handelt es sich um Mutagenese-Primer, durch welche das Codon, welches für den Histidinrest H92 codiert durch ein Codon für die AS Glutamin ersetzt wird. Ausgehend von den beiden Fragmenten 1 und 2 wurde erneut eine PCR mit dem Primerpaar WS1818-5/WS1818-3 durchgeführt. Das erhaltene 1279 bp Fragment WS1818-H92Q entspricht bis auf die eingeführte Mutation dem bereits oben beschriebenen Fragment WS1818 und wurde zusammen mit einer Cm^r-Kassette (mit *XbaI/NotI*-Termini) über die Restriktionsschnittstellen *SmaI/XbaI* in das Vorläuferkonstrukt pSL-arsR-hp0163 integriert. Das daraus resultierende Plasmid pSL-WS1818-H92Q wurde für die Transformation der ArsS-Deletionsmutante *H. pylori* G27/HP165::km eingesetzt. Über homologe Rekombination der flankierenden Bereich arsR und hp0163 mit dem bakteriellen Genom kommt es zur Integration des *ws1818-H92Q*-Allels zusammen mit der Cm^r-Kassette in den *arsRS*-Lokus der Mutante (vgl. Abb. 38). Vier Klone (1 - 4) der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q wurden mittels PCR-Analysen charakterisiert. Die verwendeten Primerkombinationen entsprechen den Primerkombinationen 9 - 12 aus der Tabelle 21, die auch für die Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/WS1818 verwendet wurden. Das Ergebnis der Charakterisierungs-PCR ist in der Abb. 44 zu sehen.



M : 1 kb DNA Marker

1: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-1; PK: 9)
 2: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-2; PK: 9)
 3: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-3; PK: 9)
 4: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-4; PK: 9)
 5: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-1; PK: 10)
 6: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-2; PK: 10)
 7: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-3; PK: 10)
 8: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-4; PK: 10)

9: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-1; PK: 11)
 10: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-2; PK: 11)
 11: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-3; PK: 11)
 12: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-4; PK: 11)
 13: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-1; PK: 12)
 14: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-2; PK: 12)
 15: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-3; PK: 12)
 16: T: *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-4; PK: 12)

Abb. 44: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q. Es wurden 4 Klone -1, -2, -3 und -4 analysiert. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 21 beschriebenen Primerkombinationen 9 - 12 verwendet, um die Integration des Allels *ws1818-H92Q* zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *arsRS*-Lokus zu verifizieren.

Die PCR-Analysen (Abb. 44) ergaben, dass die Integration des Allels *ws1818-H94Q* zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *arsRS*-Lokus der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q wie gewünscht stattfand. Die charakterisierten Klone wurden in weiteren Versuchen eingesetzt, um die Säurewahrnehmung durch die HK WS1818-H92Q zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde die Säureinduktion in der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q zunächst auf RNA-Ebene anhand der Transkription der Target-Gene *hp0119* und *hp1432* untersucht. Die Gesamtzell-RNA von drei verschiedenen Klonen (-2, -3 und -4) wurde analysiert, so dass jeweils 3 voneinander unabhängig isolierte RNA-Präparationen untersucht wurden. Das Ergebnis der PE-Analysen ist in der Abb. 45 dargestellt.

Die Transkriptionsanalysen liefern für die untersuchten Target-Gene unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 45). Im Fall des Gens *hp0119* (Abb. 45A) kann in allen drei untersuchten Klonen *H. pylori* G27/WS1818-H92Q-2, -3 und -4 (Spuren 5, 6 und 7) unter sauren pH-Bedingungen ebensoviel *hp0119*-spezifisches Transkript detektiert werden, wie in der Mutante *H. pylori* G27/WS1818 (Spur 4) und im WT *H. pylori* G27 (Spur 2) bei pH 5. Für das Gen *hp1432* (Abb. 45B) entspricht die für die Mutanten *H. pylori* G27/WS1818-H94Q-2, -3 und -4 detektierte Signalstärke bei pH 5 (Spuren 5, 6 und 7) der Signalstärke in der Mutante *H. pylori* G27/WS1818 bei pH 5 (Spur 4), sie ist jedoch schwächer als für den WT *H. pylori* G27 bei pH 5 (Spur 2). Eine Funktion des Histidinrestes H92 bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase WS1818 konnte somit nicht bestätigt werden.

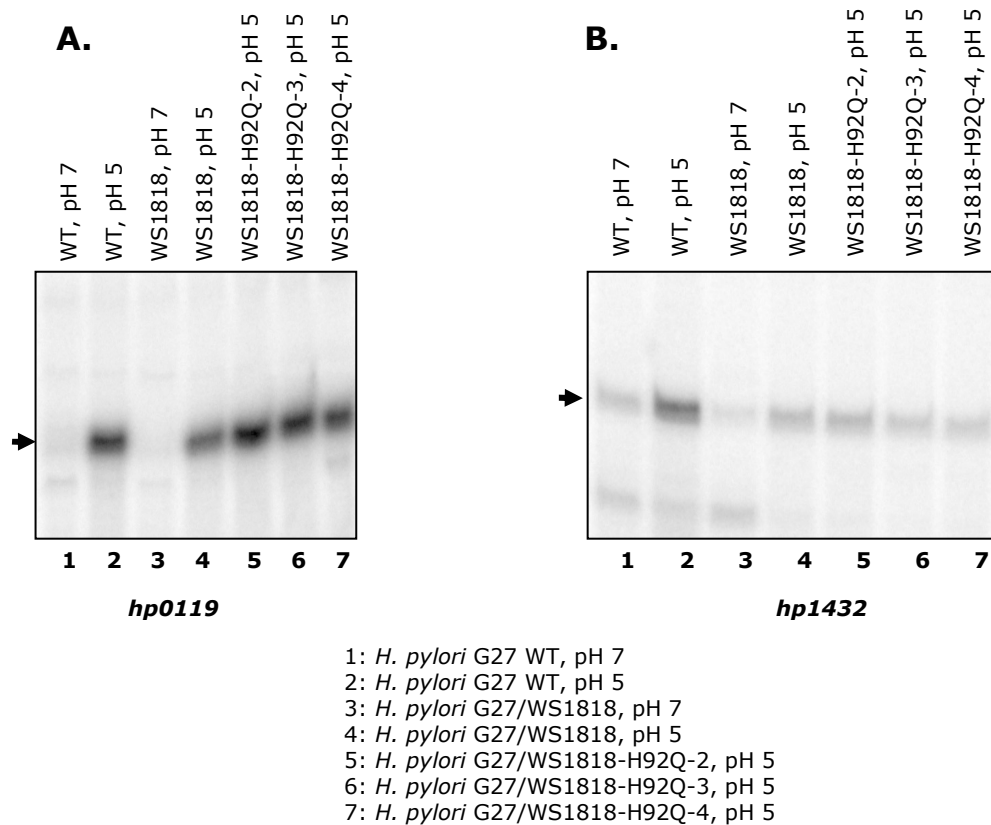


Abb. 45: PE-Analysen der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q. Untersucht wurde die Expression der Target-Gene *hp0119* (A) und *hp1432* (B) in drei Klonen der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q. Es wurden die Primer *hp0119*-PE und *hp1432*-PE für die Transkriptionsanalysen eingesetzt. Die PE-Analysen wurden mit jeweils 30 µg Gesamtzell-RNA durchgeführt. Die *hp0119*- und *hp1432*-spezifischen Transkripte sind durch einen schwarzen Pfeil links neben der Abb. markiert.

2. Identifizierung einer Konsensussequenz für die DNA-Bindung durch ArsR~P

Das säureabhängige Regulon des phosphorylierten RR ArsR~P wurde identifiziert (Pflock et al., 2006). Da sich neben dem Gen *arsR* kein weiteres Gen, welches für ein regulatorisches Protein codiert, unter den Target-Genen des RR ArsR~P befindet, ist anzunehmen, dass die Transkription dieser Gene direkt durch eine Bindung des RR ArsR~P an die entsprechenden Promotorsequenzen reguliert wird. Eine direkte Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P im Promotorbereich der Gene *hp0119*, *hp1408*, *hp1432*, *ureA*, *ureI*, *amiE* und *amiF* konnte mittels DNase I Footprint-Analysen bereits bestätigt werden (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006). Mit Hilfe bioinformatischer Methoden konnte ausgehend von den bekannten Bindemotiven im Promotorbereich der Gene *ureA*, *ureI*, *amiE*, *amiF* und *hp1408* eine 23 bp Konsensussequenz (AN₉TN₃CN₇T) der Bindestellen ermittelt werden, die in der Abb. 46 dargestellt ist.

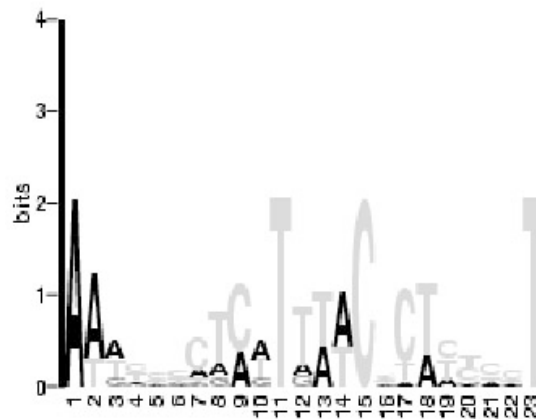


Abb. 46: Bioinformatisch ermittelte Konsensussequenz der Bindestelle des phosphorylierten RR ArsR~P. Als Ausgangspunkt für die Analysen dienten die durch DNase I Footprint Analysen identifizierten Bindestellen des phosphorylierten RR ArsR~P in den Promotorbereichen der Gene *ureI*, *ureA*, *amiE*, *amiF* und *hp1408*. Das Bindemotiv umfasst 23 bp, von denen vier hoch konserviert sind (AN₉TN₃CN₇T).

Basierend auf dieser Konsensussequenz konnten putative Bindestellen auch stromaufwärts des Translationstarts der Gene *tagD*, *rfaF*, *hp1022* und *hp1104*, deren Transkription durch den RR ArsR~P aktiviert wird (Pflock et al., 2006), identifiziert werden. Es sollte in diesem Teil der Arbeit analysiert werden, ob eine Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P an diese putativen Bindestellen erfolgt.

Zunächst wurde der Transkriptionstart der Gene *hp1022* und *hp1104* ermittelt. Die PE-Analysen, in denen RNA des WT *H. pylori* 26695 bei pH 7 und bei pH 5 sowie RNA der ArsS-Deletionsmutante *H. pylori* 26695/*arsS::km* bei pH 5 als Template eingesetzt wurde, wurde mit den Primern 1022-PE und 1104-PE durchgeführt (Abb. 47).

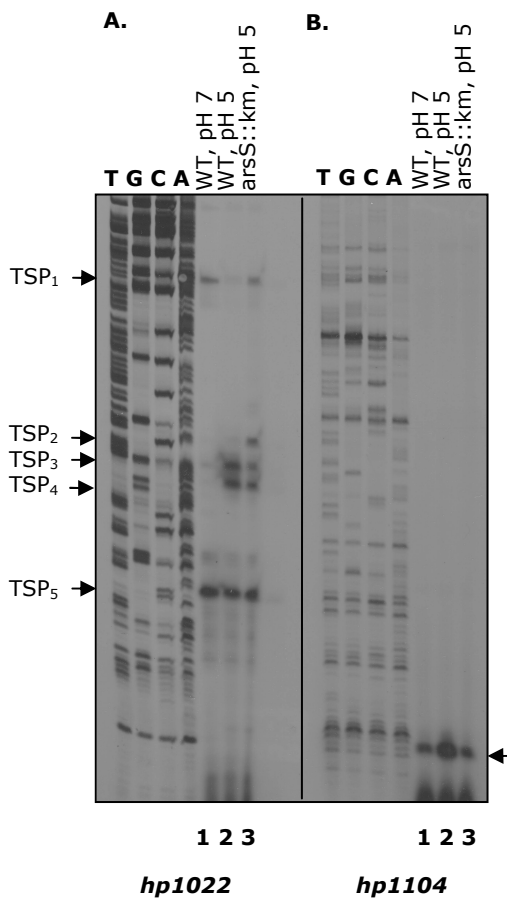


Abb. 47: Ergebnis der PE-Analysen zur Bestimmung des Transkriptionstarts der Gene *hp1022* und *hp1104*. Untersucht wurde die Transkription der Gene *hp1022* (A) und *hp1104* (B) im WT *H. pylori* 26695 bei pH 7 und bei pH 5 sowie in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS::km bei pH 5. Das PE-Experiment wurde mit den Primern hp1022-PE und hp1104-PE durchgeführt, es wurden je 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Die Sequenzierung (T,G,C,A) wurde durch Hybridisierung der Oligonukleotide hp1022-PE und hp1104-PE mit den Plasmiden pSL-hp1022 und pSL-hp1104 durchgeführt. Die Transkriptionsstartpunkte sind durch einen schwarzen Pfeil markiert. Für das Gen *hp1022* konnten fünf putative Transkriptionsstartpunkte (TSP) ermittelt werden, sie sind bezeichnet als TSP₁ - TSP₅. In Teil C. der Abb. sind die Transkriptionsstartpunkte in den Promotorsequenzen der Gene *hp1022* und *hp1104* grün unterlegt, das Startcodon ist rot unterlegt. Durch einen schwarzen Balken sind die putativen ArsR~P Bindestellen markiert. Mögliche -10 Boxen sind unterstrichen. Durch einen schwarzen Pfeil ist in der Promotorsequenz des Gens *hp1104* die Position bestimmt, bzgl. welcher sich einige Basen stromabwärts der Transkriptionstartpunkt befinden muss.

1: *H. pylori* 26695, pH 7
2: *H. pylori* 26695, pH 5
3: *H. pylori* 26695/arsS::km, pH 5

C.



Für das Gen *hp1022* konnten fünf potentielle Transkriptionsstarts detektiert werden (Abb. 47A), die scheinbar unterschiedlich reguliert werden. Die Transkription ausgehend von dem TSP₁ wird durch den phosphorylierten RR ArsR~P unter sauren pH-Bedingungen reprimiert (Spur 2), eine potentielle TATA-Box (TTTAAT) mit einem „Mismatch“ gegenüber der Konsensussequenz (TATAAT) liegt stromaufwärts des TSP₁ (vgl. Abb. 47C). Ausgehend vom TSP₂ wird nur in Abwesenheit der HK ArsS in der Deletionsmutante *H. pylori* 26695/arsS::km (Spur 3) ein Transkript hergestellt, stromaufwärts des TSP₂ ist eine optimale -10-Box (TATAAT) vorhanden. Ausgehend von den Transkriptionsstartpunkten TSP₃ und TSP₄ kann die größte Menge an *hp1022*-spezifischem Transkript unter sauren pH-

Bedingungen im WT *H. pylori* 26695 beobachtet werden (Spur 2). Jedoch findet ausgehend von diesen Transkriptionsstartpunkten auch in der Deletionsmutante *H. pylori* 26695/*arsS::km* (Spur 3) eine stärkere Transkription des Gens *hp1022* statt als im WT *H. pylori* 26695 bei pH 7. Stromaufwärts des TSP₃ und TSP₄ ist eine putative TATA-Box mit zwei Abweichungen (TTTAAC) gegenüber der Konsensussequenz lokalisiert. Die Transkription ausgehend von TSP₅ scheint nicht durch den RR ArsR reguliert zu werden, die Transkription im WT bei pH 7 (Spur 1) unterscheidet sich nicht von der Transkription im WT (Spur 2) und in der Deletionsmutante (Spur 3) bei pH 5. Stromaufwärts dieses Transkriptionstarts ist keine -10-Box vorhanden.

Der Transkriptionsstart für das Gen *hp1104* konnte nicht genau definiert und nur durch Vergleich mit der Sequenzierungsreaktion von *hp1022* als Längenstandard abgeschätzt werden, da er sich in einem Bereich befand, in welchem die Sequenzierungsreaktion nicht auswertbar war (Abb. 47B). Der Transkriptionstart des Gens *hp1104* muss sich stromabwärts der in Abb. 47C durch einen Pfeil markierten Base befinden. In der relevanten Region befinden sich zwei putative -10-Promotorelemente, sie jeweils einen „Missmatch“ im Vergleich zur Konsensussequenz der TATA-Box von *E. coli* aufweisen (TACAAT und TTTAAT). Unter sauren pH-Bedingungen konnte im WT *H. pylori* 26695 (Spur 2) deutlich mehr *hp1104*-spezifisches Transkript detektiert werden als im WT bei neutralen pH-Bedingungen (Spur 1) oder in der Deletionsmutante bei pH 5 (Spur 3). Dies stimmt mit den bereits publizierten Daten überein, wonach der phosphorylierte RR ArsR unter sauren pH-Bedingungen die Transkription des Gens *hp1104* aktiviert (Pflock et al., 2006).

Mit Hilfe von DNaseI Footprint Experimenten sollte eine Bindung des RR ArsR~P im Promotorbereich der Gene *tagD*, *rfaF*, *hp1022* und *hp1104* und somit eine direkte regulatorische Funktion des RR bei der Transkription dieser Gene nachgewiesen werden. Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonden wurden Derivate des Plasmid pSL-1180 verwendet, in welchen über die Schnittstellen *EcoRI/BamHI* die Promotorfragmente der entsprechenden Gene eingefügt wurden (konstruiert von Monika Götz). Eine Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P an die Promotorsequenzen der Gene *tagD* und *rfaF* konnte nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Es konnte jedoch eine Interaktion zwischen dem RR ArsR~P und den Promotorbereichen der Gene *hp1022* und *hp1104* beobachtet werden.

In der Abb. 48 ist das Autoradiogramm der Footprint-Analyse dargestellt, die mit dem 281 bp Fragment *hp1022* durchgeführt wurde, welches die Basen -166 bis + 114 bzgl. des TSP₃ des Gens *hp1022* beinhaltet.

In Anwesenheit von 1,1 μM des RR ArsR, der zuvor *in vitro* durch die Zugabe von Acetylphosphat phosphoryliert wurde (ArsR~P), konnte ein Bindung von ArsR~P direkt stromaufwärts der putativen TATA-Box des TSP₃ detektiert werden. Der geschützte Bereich umfasst die Basen -12 bis -55 bzgl. des TSP₃ und überlappt mit der putativen TATA-Box des Transkriptionstartpunktes TSP₂. Innerhalb dieses Bereichs liegt das aufgrund von Sequenzähnlichkeiten postulierte ArsR~P Bindemotiv. Durch sukzessive Erhöhung der ArsR~P Konzentration auf 2,1 bzw. 2,8 μM wird der geschützte Bereich vergrößert und umfasst die Basen -12 bis - 87 bzgl. des TSP₃.

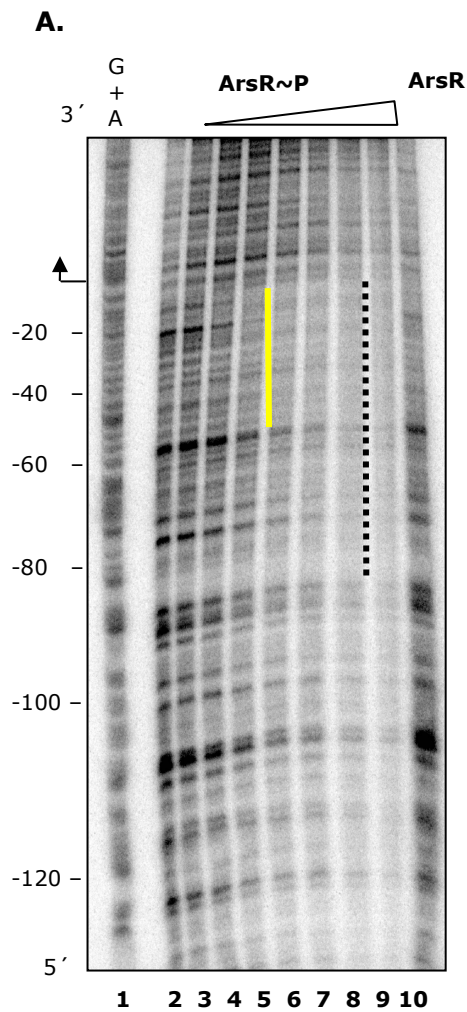
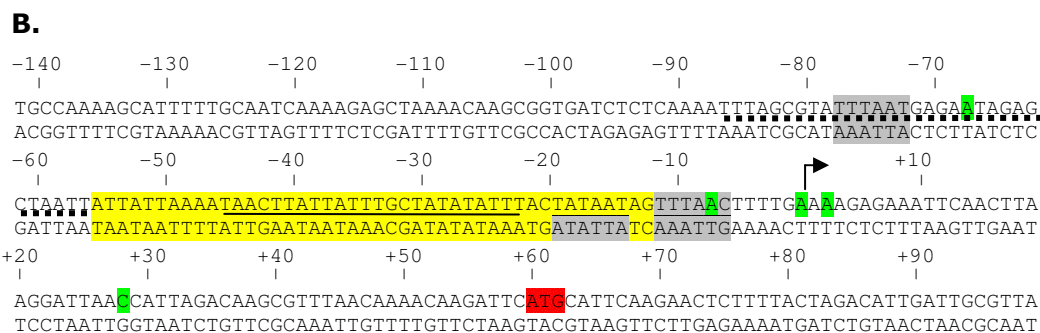


Abb. 48: Bindung des Response-Regulators ArsR~P an den Promotor P_{hp1022} . **A:** Autoradiogramm der DNase I Footprint-Analyse. Die Footprint-Analyse wurde ausgehend von einem 281 bp *EcoRI/BamHI* Fragment durchgeführt, welches durch Restriktionsverdau des Plasmids pSL-hp1022 erhalten wurde. Das Fragment enthält die Promotorsequenz des Gens *hp1022* und wurde am *EcoRI*-Terminus radioaktiv markiert. Es wurden in der Analyse steigende Mengen an His₆-ArsR, welches *in vitro* durch Zugabe von Acetylphosphat phosphoryliert wurde, eingesetzt. In den Spuren 2-9 wurden jeweils 0, 0,35, 0,71, 1,1, 1,4, 1,8, 2,1 und 2,8 μM His₆-ArsR~P zugegeben. In Spur 10 wurden der nicht phosphorylierten RR His₆-ArsR in einer Konzentration von 2,8 μM eingesetzt. In Spur 1 findet man die G+A Sequenzierungsreaktion, die ausgehend von der radioaktiv markierten DNA-Sonde durchgeführt wurde und als Längenstandard dient. Die Ziffern auf der rechten Seite bezeichnen die Positionen bzgl. des Transkriptionstartes TSP₃, der durch einen Pfeil markiert ist. In Gelb markiert ist die hochaffine Bindestelle für den RR ArsR~P, durch eine gestrichelte Linie ist das erweiterte ArsR~P-Bindemotiv markiert. Durch Erhöhung der Konzentration des phosphorylierten RR ArsR~P erweitert sich der geschützte Bereich (gestrichelte Linie).

B: Schematische Darstellung der *hp1022* Promotorregion P_{hp1022} . Rot unterlegt ist der Translationstart. Die Transkriptionstartpunkte TSP₁ – TSP₅ sind grün hervorgehoben, die potentiellen -10 Promotorelemente sind grau unterlegt. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf den TSP₃. Gelb unterlegt ist die hochaffine ArsR~P Bindestelle, die Erweiterung der Binderegion nach Zunahme der ArsR~P Konzentration ist durch eine schwarze, gestrichelte Linie angezeigt. Das aufgrund von Sequenzähnlichkeiten postulierte ArR~P Bindemotiv ist durch einen schwarzen Balken markiert.



In der Abb. 49 ist das Ergebnis der Footprint-Analyse dargestellt, die mit dem 394 bp Fragment hp1104 durchgeführt wurde, welches die Basen -339 bis + 54 bzgl. des Translationstarts des Gens *hp1104* umfasst. Als Bezugspunkt wurde hier die Position des Translationstarts gewählt, da die genaue Position des Transkriptionstartes in der PE-Analyse (Vgl. Abb. 47) nicht bestimmt werden konnte. In Anwesenheit von 1,8 μM des phosphorylierten RR ArsR~P konnte eine Bindung des RR an die Promotorsequenz im Bereich -53 bis -92 bzgl. des Translationstartes beobachtet werden. Die hochaffine Bindestelle befindet sich stromaufwärts der beiden putativen TATA-Boxen, eine Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P kann somit die Transkription des Gens *hp1104* aktivieren. Der geschützte Bereich überlappt größtenteils mit dem aufgrund von Sequenzähnlichkeiten postulierten Bindemotiv des phosphorylierten RR ArsR~P. Durch Erhöhung der Konzentration des phosphorylierten RR ArsR~P wird der geschützte Bereich der DNA auf

den Bereich -20 bis -92 bzgl. des Translationstarts erweitert und das Auftreten einer hypersensitiven Bande an der Position -38 kann beobachtet werden. Das erweiterte Bindemotiv überlappt mit der putativen -10-Box-1 und zum Teil mit der putativen -10-Box-2.

A.

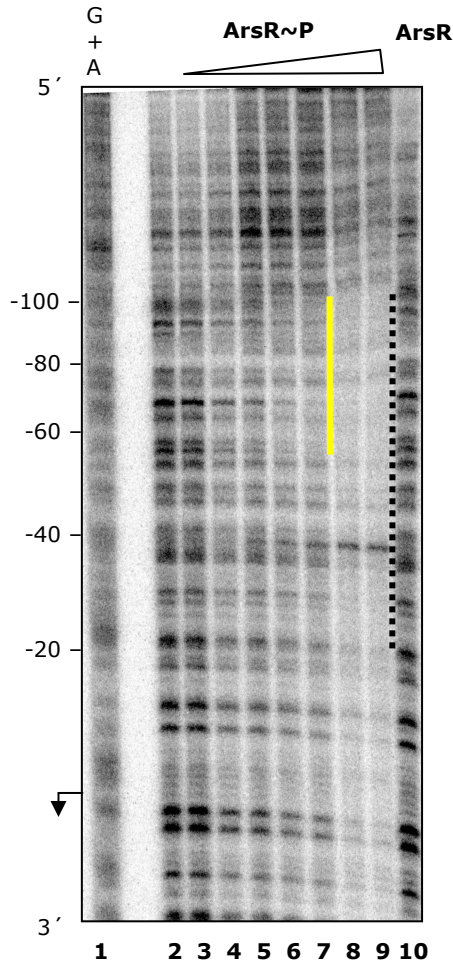
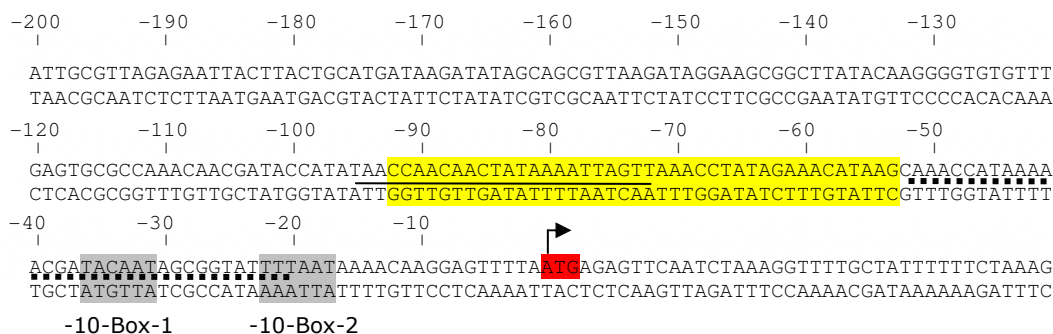


Abb. 49: Bindung des Response-Regulators ArsR~P an den Promotor P_{hp1104} . **A:** Autoradiogramm der DNase I Footprint-Analyse. Die Footprint-Analyse wurde ausgehend von einem 394 bp *EcoRI/BamHI* Fragment durchgeführt, welches durch Restriktionsverdau des Plasmids pSL-*hp1104* erhalten wurde. Das Fragment enthält die Promotorsequenz des Gens *hp1104* und wurde am *BamHI*-Terminus radioaktiv markiert. Es wurden in der Analyse steigende Mengen an His₆-ArsR, welches *in vitro* durch Zugabe von Acetylphosphat phosphoryliert wurde, eingesetzt. In den Spuren 2-9 wurden jeweils 0, 0,35, 0,71, 1,1, 1,4, 1,8, 2,1 und 2,8 μM His₆-ArsR~P zugegeben. In Spur 10 wurden der nicht phosphorylierten RR His₆-ArsR in einer Konzentration von 2,8 μM eingesetzt. In Spur 1 findet man die G+A Sequenzierungsreaktion, die ausgehend von der radioaktiv markierten DNA-Sonde durchgeführt wurde und als Längenstandard dient. Die Ziffern auf der rechten Seite bezeichnen die Positionen bzgl. des Translationstarts, der durch einen Pfeil markiert ist. In Gelb markiert ist die hochaffine Bindestelle für den RR ArsR~P, durch eine gestrichelte Linie ist das erweiterte ArsR~P-Bindemotiv markiert. **B:** Schematische Darstellung der *hp1104* Promotorregion P_{hp1104} . Rot unterlegt ist der Translationstart. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf den Translationstart. Die putativen -10 Boxen sind grau unterlegt. Gelb unterlegt ist die hochaffine ArsR~P Binderegion, die Erweiterung der Binderegion nach Zunahme der ArsR~P Konzentration ist durch eine schwarze, gestrichelte Linie angezeigt. Das aufgrund von Sequenzähnlichkeiten postulierte ArsR~P Bindemotiv ist durch einen schwarzen

B.



3. Identifikation von essentiellen Target-Genen des Response-Regulators ArsR-D52N

Im Gegensatz zur Histidin-Kinase ArsS ist eine Deletion des Response-Regulator ArsR in *H. pylori* *in vitro* nicht möglich (Beier und Frank, 2000). Eine Deletion des wildtypischen *arsR*-Gens kann aber dann erreicht werden, wenn zuvor eine Kopie des Allels *arsR*-D52N in den *cag*-Lokus von *H. pylori* integriert wurde (Schär et al., 2005). Das Allel *arsR*-D52N kodiert für einen Response-Regulator ArsR-D52N, in welchem die konservierte Aspartat-Phosphorylierungsstelle durch die nicht phosphorylierbare AS Asparagin substituiert ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der RR ArsR in seiner nicht phosphorylierten Form essentiell für die Zelle ist. Man geht davon aus, dass ArsR im nicht phosphorylierten Zustand eine Rolle bei der Transkription von essentiellen Target-Genen spielt. Um mittels globaler Transkriptomanalysen Target-Gene identifizieren zu können, deren Transkription durch den nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N reguliert wird, wurden Mutanten konstruiert, die unterschiedliche Mengen des Regulators ArsR-D52N exprimieren. Beide Mutanten besitzen nur das Allel *arsR*-D52N, das wildtypische *arsR*-Gen ist deletiert. In einer der beiden Mutanten wird die Transkription des Allels *arsR*-D52N ausgehend von dem Promotor P_{hp0166} reguliert, somit sollte die Menge an *arsR*-D52N-Transkript der im Wildtyp vorhandenen Menge an *arsR*-RNA entsprechen. In der anderen Mutante sollte eine starke Überexpression des RR ArsR-D52N erreicht werden, indem die Transkription unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{cagA} steht.

3.1 Konstruktion der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N- Δ und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N- Δ

Die Konstruktion der Mutanten erfolgte entsprechend dem bereits für *H. pylori* beschriebenen Komplementationssystem für essentielle Gene (Schär et al., 2005). Dabei wird zunächst eine Kopie des modifizierten, essentiellen Gens *arsR*-D52N in den *cag*-Locus integriert. In den erhaltenen merodiploiden Stämmen wird dann in einem zweiten Schritt das wildtypische *arsR*-Gen deletiert.

3.1.1 Konstruktion und Charakterisierung des merodiploiden Stammes *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N

Der merodiploide Stamm *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N, in welchem der nicht phosphorylierbare RR ArsR-D52N unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} überexprimiert werden soll, wurde durch Transformation des WT *H. pylori* 26695 mit dem Plasmid pSL-*cagACD*- P_{cagA} -*arsR*-D52N-Cm^r, welches bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit kloniert wurde, konstruiert. Das Plasmid pSL-*cagACD*- P_{cagA} -*arsR*-D52N-Cm^r setzt sich zusammen aus den beiden für die homologen Rekombinationsereignisse benötigten flankierenden Fragmenten *cagCD*' (ein 832 bp *EcoRI/Bam*HI Fragment, PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar 5'*cagD*/3'*cagC*) und *cagA*' (ein 862 bp *Pst*I/*Sac*I Fragment, PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar 5'*cagA*/3'*cagA*). Zwischen den flankierenden Bereichen befindet sich der Promotor P_{cagA} (ein 180 bp *Bam*HI/*Kpn*I Fragment, PCR-amplifiziert mit den Oligonukleotiden *pcag5/pcag32*) an welchen das 710 bp Allel *arsR*-D52N fusioniert ist. Als Selektionsmarker ist eine 805 bp Cm^r-Kassette aus *Campylobacter coli* (PCR-amplifiziert mit den Primern 5'-Cm-Kas-*Pst*I/3'-Cm-Kas-*Pst*I) an das *arsR*-D52N Allel fusioniert. Eine schematische Darstellung der nach der Transformation stattfindenden

Rekombinationsereignisse, die zur Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N führen, ist in Abb. 50 zu sehen.

Zwei Klone der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N wurden mittels PCR-Analysen (Abb. 52) auf die korrekte Integration der P_{cagA} -arsR-D52N-Fusion zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *cag*-Lokus überprüft. Die Bindestellen der für die Charakterisierungs-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in der Abb. 51 schematisch eingezeichnet.

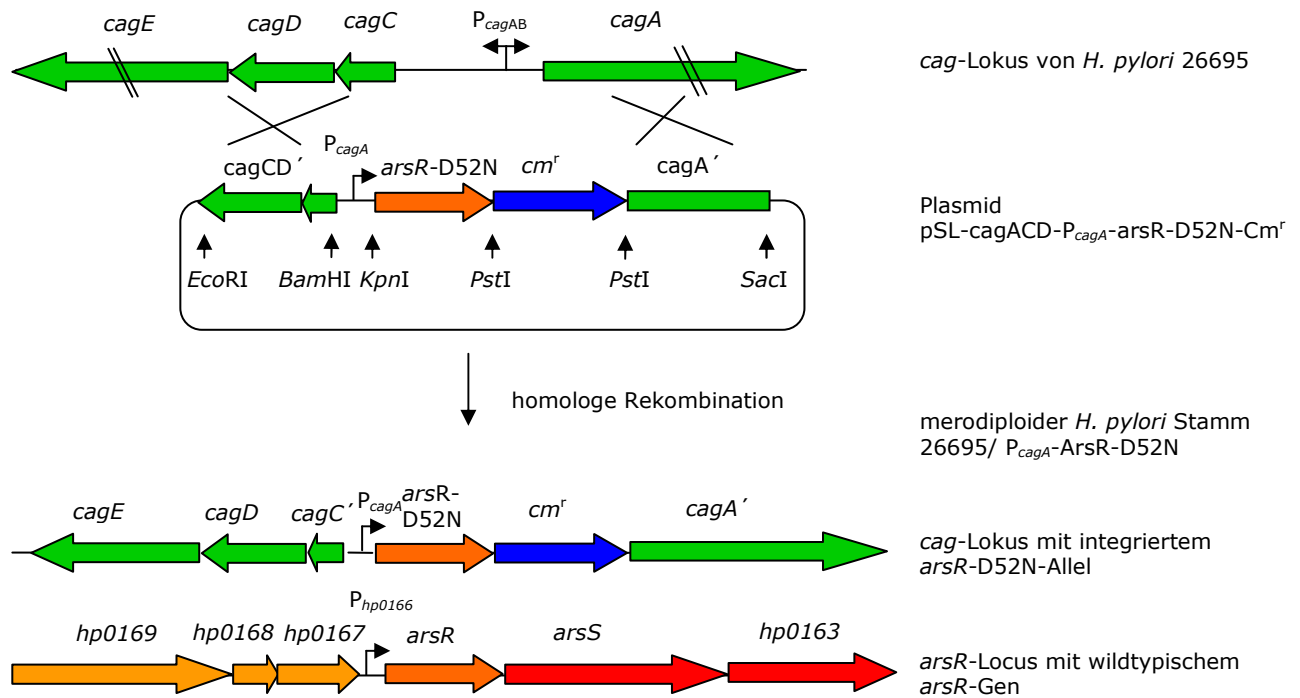


Abb. 50 : Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N- Cm^r . Nach der Transformation von *H. pylori* 26695 mit dem Plasmid pSL- $cagACD$ - P_{cagA} -arsR-D52N- Cm^r wird durch Rekombination der flankierenden Bereiche *cagCD'* und *cagA'* mit den homologen Bereichen des bakteriellen Genoms (dargestellt durch überkreuzte Striche), eine Genkopie des modifizierten Gens *arsR*-D52N zusammen mit dem Selektionsmarker Cm^r unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} in den *cag*-Lokus integriert. Eine wildtypische Kopie des *arsR* Gens ist im *arsR*-Lokus vorhanden.

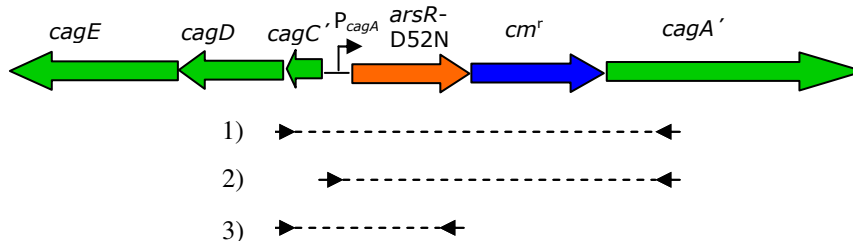


Abb. 51: Schematische Darstellung der Bindestellen der verwendeten Primerkombinationen, die für den Nachweis der Integration des Allels *arsR*-D52N zusammen mit dem Selektionsmarker Cm^r unter der Kontrolle des Promotors P_{cag} in den *cag*-Lokus der Mutante 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N- Cm^r verwendet wurden. Für die PCR-Analyse wurden drei verschiedene Primerkombinationen eingesetzt.

In der Tab. 22 sind die für die Charakterisierung der Mutante verwendeten Primerkombinationen sowie die erwarteten Fragmentlängen aufgelistet.

Tab. 22: Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierung der Klone -1 und -2 der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-HP0166-D52N

Primerkombination	Fragmentlänge
1) cagCDseq/cagAseq2	2018 bp
2) cagAseq2/Pcag5'	1888 bp
3) cagCDseq/0166-3	1050 bp

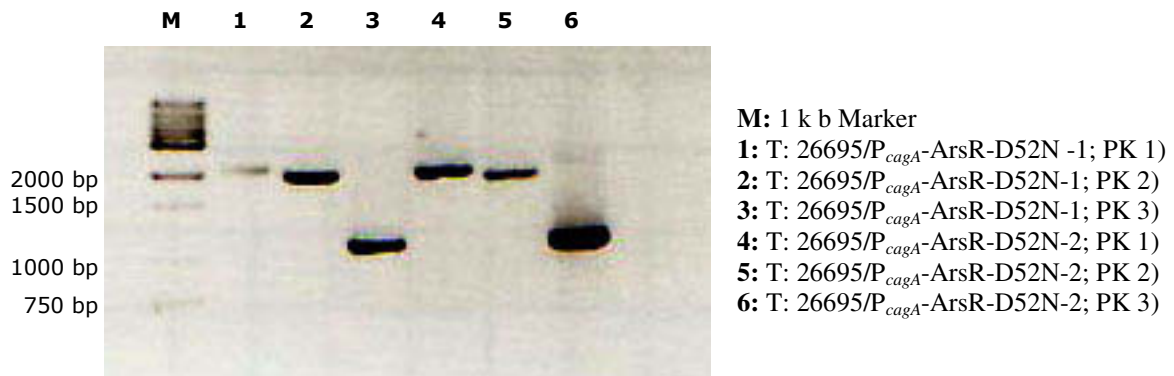


Abb. 52: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR für den Klon -1 und -2 der merodiploiden Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-HP0166-D52N. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 22 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors *P*_{cagA} in den *cag*-Lokus zu verifizieren.

Die in der PCR-Analyse (Abb. 52) erhaltenen DNA-Fragmente zeigten die erwartete Länge. Eine Integration des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors *P*_{cagA} zusammen mit dem Selektionsmarker, der *Cm*^r-Kassette, in den *cag*-Lokus der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-ArsR-D52N konnte somit bestätigt werden.

3.1.2 Konstruktion des merodiploiden Stammes *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-ArsR-D52N

Der merodiploide Stamm *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-ArsR-D52N, in welchem der nicht phosphorylierbare RR *ArsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors *P*_{hp0166} exprimiert werden soll, wurde durch Transformation von *H. pylori* 26695 WT mit dem Plasmid pSL-cagACD-*P*_{hp0166}-*arsR*-D52N-*Cm*^r (konstruiert von Jennifer Schär) hergestellt. Dieses Plasmid setzt sich zusammen aus den flankierenden Fragmenten cagCD' bzw. cagA', einer 805 bp *Cm*^r-Kassette und dem Allel *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors *P*₀₁₆₆. Das 1011 bp Fragment *P*₀₁₆₆-*arsR*-D52N wurde über die Schnittstellen *Cla*I und *Bam*HI in das Plasmid integriert. Zwischen den Schnittstellen *Cla*I und *Pst*I befinden sich 30 bp der MCS des pSK Blueskript-Vektors (*Cla*I bis *Kpn*I) sowie 81 bp des pSL-1180 Vektors (*Kpn*I bis *Pst*I). Eine schematische Darstellung der nach der Transformation stattfindenden Rekombinationsereignisse ist in Abb. 53 zu sehen.

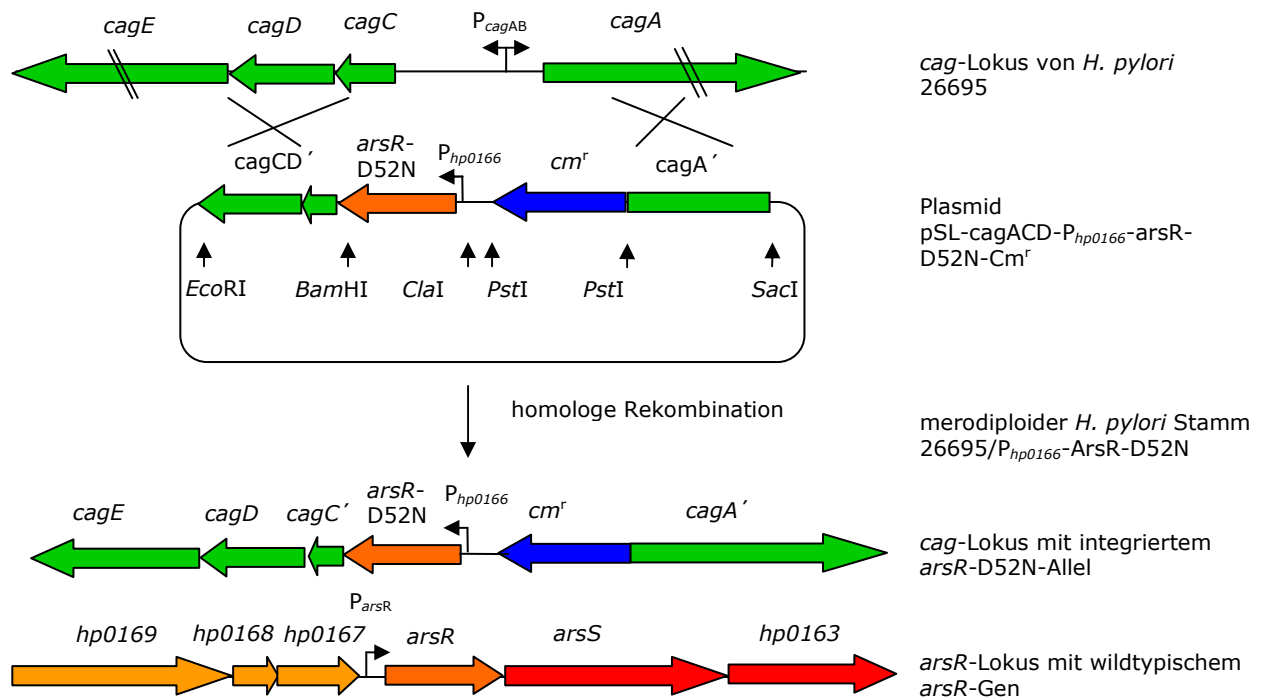
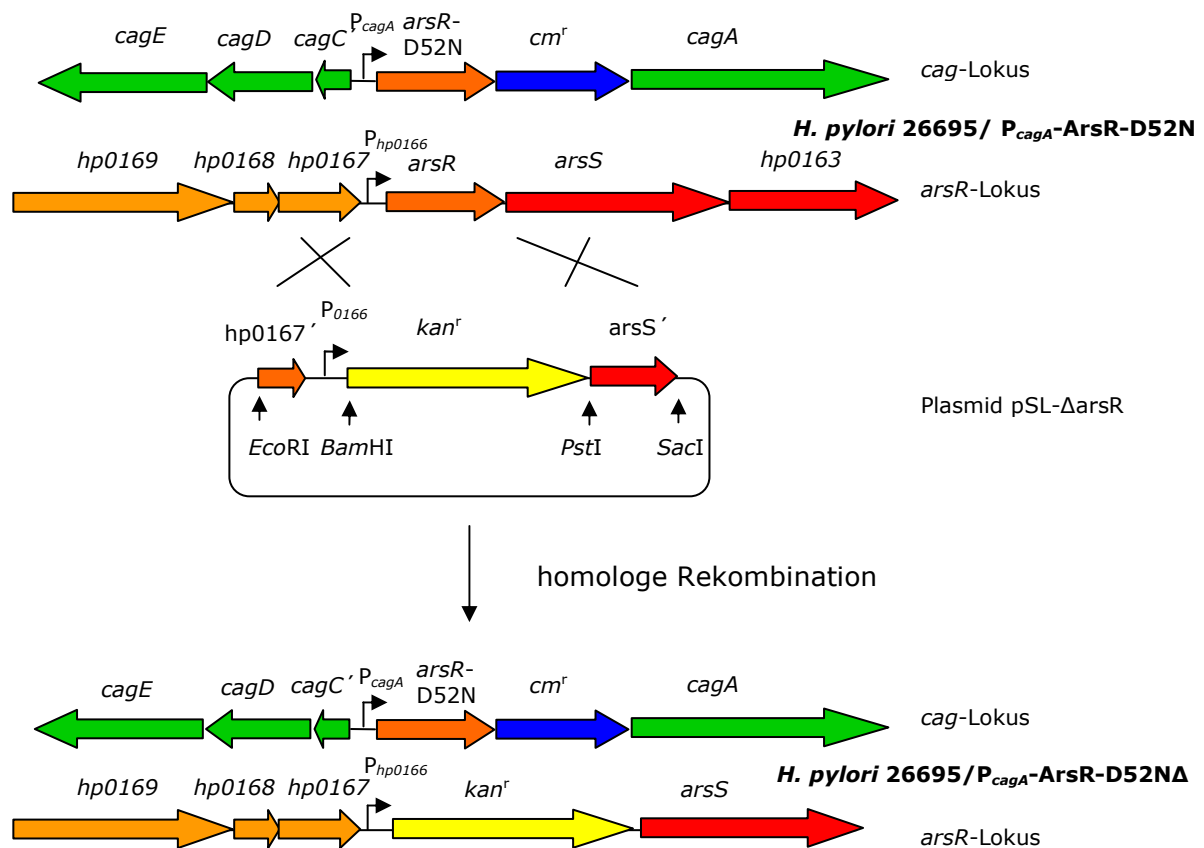


Abb. 53: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-*ArsR*-D52N. Nach der Transformation von *H. pylori* 26695 mit dem Plasmid pSL-*cagACD*-*P*_{hp0166}-*arsR*-D52N-*Cm*^r wird durch Rekombination der flankierenden Bereiche *cagCD*' und *cagA*' mit den homologen Bereichen des bakteriellen Genoms (dargestellt durch überkreuzte Striche), unter der Kontrolle des Promotors *P*_{hp0166}, eine Genkopie des modifizierten Gens *arsR*-D52N zusammen mit dem Selektionsmarker *Cm*^r-Kassette in den *cag*-Lokus integriert. Eine wildtypische Kopie des *arsR* Gens ist im *arsR*-Lokus vorhanden.

3.1.3 Konstruktion und Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-*ArsR*-D52N Δ und *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-*ArsR*-D52N Δ

In den merodiploiden Mutanten *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-*ArsR*-D52N und *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-*ArsR*-D52N sollte in einem zweiten Schritt durch die Transformation mit dem Suicide-Plasmid pSL- Δ *arsR* die wildtypische *arsR*-Genkopie deletiert werden. Dieses Deletionsplasmid besteht aus zwei Fragmenten, *hp0167*' und *arsS*', die für die homologe Rekombination mit dem bakteriellen Genom benötigt werden und die eine 1391 bp *Kan*^r-Kassette flankieren, die anstelle des wildtypischen *arsR*-Gens in das Genom integriert werden soll. Das Fragment *hp0167*' (ein *EcoRI*/*Bam*HI-Fragment, PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar RR-41/RR-42 ausgehend von chromosomaler DNA von *H. pylori* 26695) besteht aus dem 272 bp langen 3' Bereich des Gens *hp0167*, dem 247 bp langen Bereich der intergenischen Region zwischen *hp0167* und *arsR* sowie den ersten 10 bp des Gens *arsR* und enthält somit den Promotor *P*_{hp0166}. Das Fragment *arsS*' (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar R4-33-2/R4-43sac ausgehend von chromosomaler DNA von *H. pylori* 26695), wurde über die Schnittstellen *Pst*I und *Sac*I in das Plasmid integriert und setzt sich zusammen aus der intergenischen Region zwischen *arsR* und *arsS* sowie den ersten 492 bp des 5' Endes des Gens *arsS*. Eine schematische Darstellung des Plasmids pSL- Δ *arsR* sowie der Rekombinationsereignisse, die nach der Transformation der merodiploiden Stämme *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-*ArsR*-D52N und *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-*ArsR*-D52N mit dem Suicide-Plasmid stattfinden, sind in der Abb. 54 dargestellt.

A. Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N



B. Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N

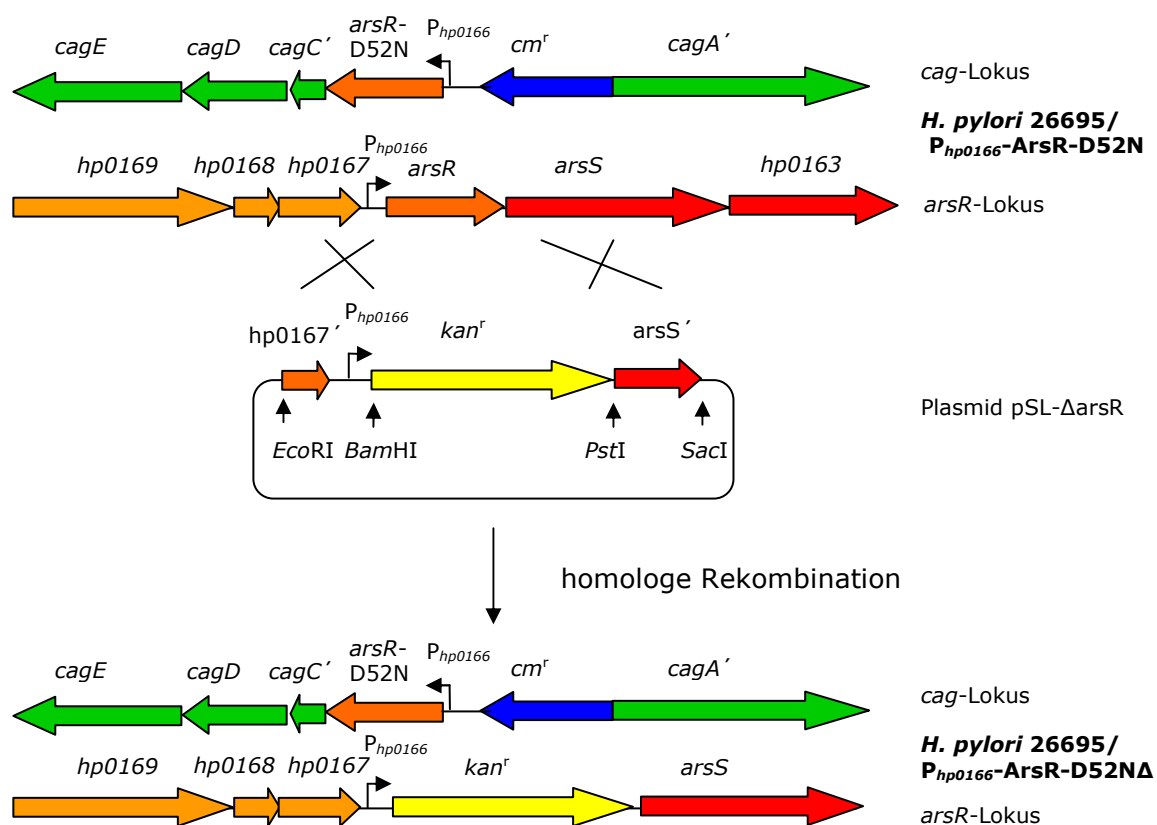
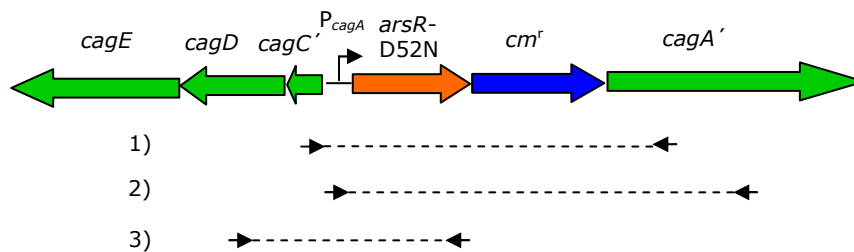


Abb. 54: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Konstruktion der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ (A) und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ (B). Nach der Transformation der merodiploiden Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N wird nach der Rekombination der flankierenden Fragmente hp0167' und arsS' mit dem bakteriellen Genom das Gen *arsR* durch den Selektionsmarker Kan^r-Kassette ersetzt.

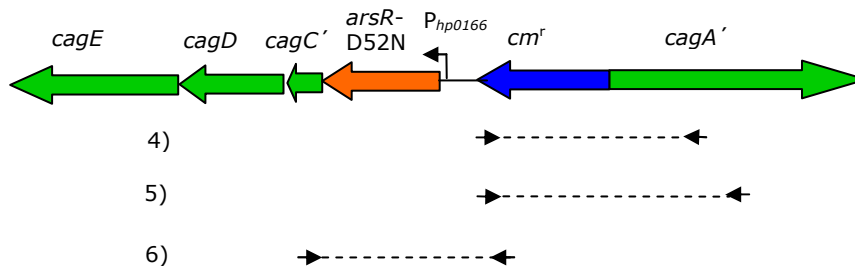
Da die für die Konstruktion der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N eingesetzte nicht polare Kan^r-Kassette keinen Terminator besitzt, sollte die Transkription der stromabwärts gelegenen Gene *arsS*, *hp0163* und *hp0162*, die Teil des *arsRS-hp0163-hp0162*-Operons sind, gewährleistet sein.

Die erhaltenen Mutanten wurden mittels PCR-Analysen charakterisiert (Abb. 56). In der Abb. 55 sind die Bindestellen der verwendeten Primerkombinationen schematisch eingezeichnet. Eine Auflistung der verwendeten Primerkombinationen sowie die erwartete Länge der DNA-Fragmente findet man in Tabelle 23.

A. Primerkombinationen für den Nachweis der Integration des Allels *arsR*-D52N in den *cag*-Locus der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ



B. Primerkombinationen für den Nachweis der Integration des Allels *arsR*-D52N in den *cag*-Locus der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ



C. Primerkombinationen für den Nachweis der Deletion des Gens *arsR* im *arsR*-Locus der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ

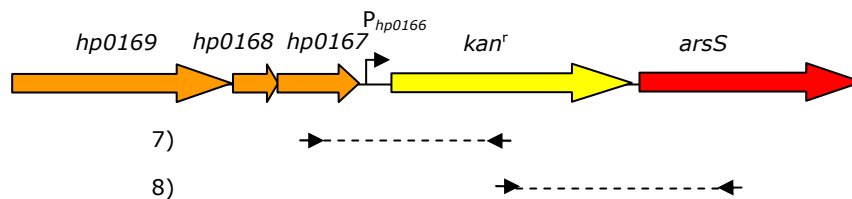


Abb. 55: Schematische Darstellung der Bindestellen der für die Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ verwendeten Primerkombinationen. Überprüft wurde die Integration des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} in den *cag*-Locus der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ (A), die Integration des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors P_{hp0166} in den *cag*-Locus der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ (B), sowie die Deletion des wildtypischen *arsR*-Gens in beiden Mutanten (C).

Tab. 23: Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-ArsR-D52N Δ und *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-ArsR-D52N Δ . In Teil A) und B) der Tabelle sind die Primerkombinationen aufgeführt, die für den Nachweis der Integration des Allels *arsR*-D52N in den *cag*-Locus verwendet wurden. In Teil C) der Tabelle sind die Primerkombinationen beschrieben, die zum Nachweis der Deletion des wildtypischen *arsR* Gens eingesetzt wurden.

Primerkombination	Fragmentlänge
A) Primerkombinationen für den Nachweis der Integration von <i>P</i>_{cagA}-<i>arsR</i>-D52N in den <i>cag</i>-Locus der Mutante <i>H. pylori</i> 26695/<i>P</i>_{cagA}-ArsR-D52NΔ	
1) cagCDseq/cagAseq2	2018 bp
2) cagA3/Pcag5	2599 bp
3) cagD5/0166-3'	1752 bp
B) Primerkombinationen für den Nachweis der Integration von <i>P</i>_{hp0166}-<i>arsR</i>-D52N in den <i>cag</i>-Locus der Mutante <i>H. pylori</i> 26695/<i>P</i>_{hp0166}-ArsR-D52NΔ	
4) CmII/cagAseq2	906 bp
5) CmII/cagA3	1617 bp
6) cagCDseq/Cm-int-2	1391 bp
C) Primerkombinationen für den Nachweis der Deletion des wildtypischen Gens <i>arsR</i> im <i>arsR</i>-Lokus der Mutanten <i>H. pylori</i> 26695/<i>P</i>_{cagA}-ArsR-D52NΔHP0166 und <i>H. pylori</i> 26695/<i>P</i>_{hp0166}-ArsR-D52NΔ	
7) hp0167-ext.-3'/Kan2	1451 bp
8) hp0165-ext.-5'/Kan1	1415bp

Charakterisiert wurden die Klone -1-1, -1-2, -2-1 und -2-2 der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-ArsR-D52N Δ und die Klone -1-1 und -1-2 der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-ArsR-D52N Δ (Abb. 56). Die Längen der in den PCR-Analysen erhaltenen Fragmente entsprachen den Erwartungen, der Allelaustausch fand wie gewünscht statt. In den Klonen -2-2 der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-ArsR-D52N Δ und -1-1 der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-ArsR-D52N Δ wurde mittels Sequenzanalysen der AS-Austausch von Aspartat nach Asparagin an der Phosphorylierungsstelle des RR ArsR verifiziert.

Abb. 56A: Nachweis der Integration des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} in den *cag*-Lokus der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -*ArsR*-D52N Δ

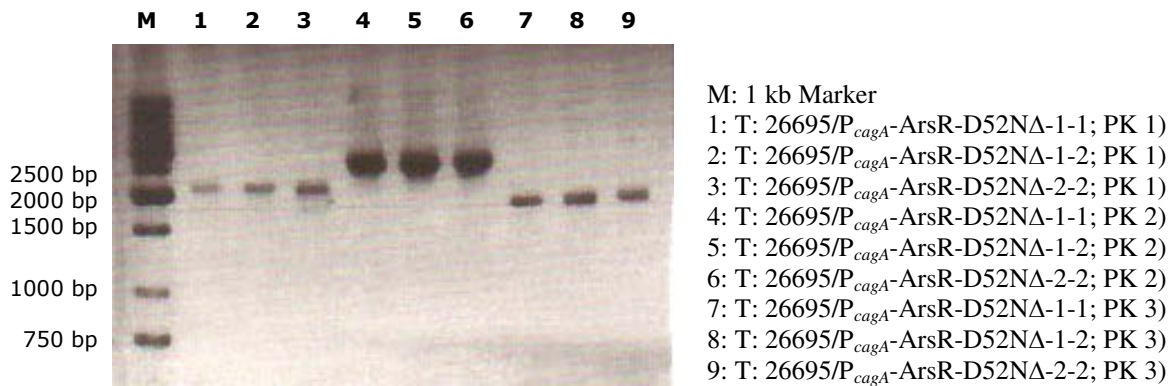


Abb. 56B: Nachweis der Integration des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors P_{hp0166} in den *cag*-Lokus in der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -*ArsR*-D52N Δ

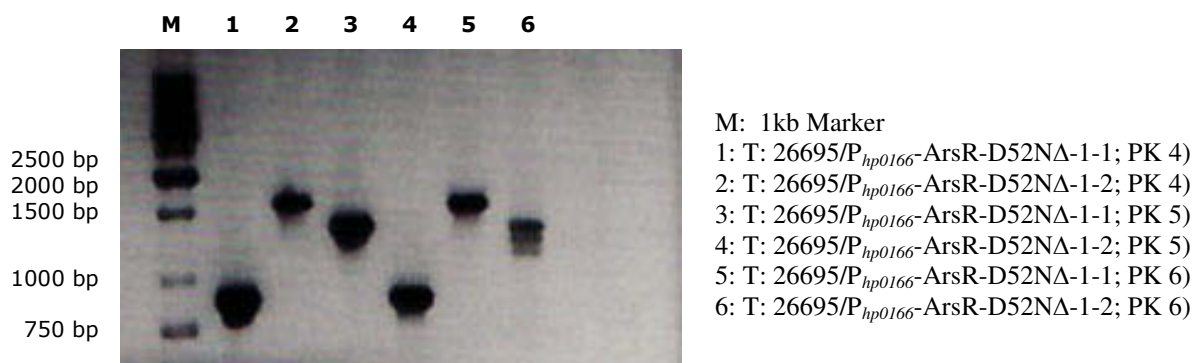


Abb. 56C: Nachweis der Deletion des wildtypischen Gens *arsR* im *arsR*-Lokus der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -*ArsR*-D52N Δ und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -*ArsR*-D52N Δ

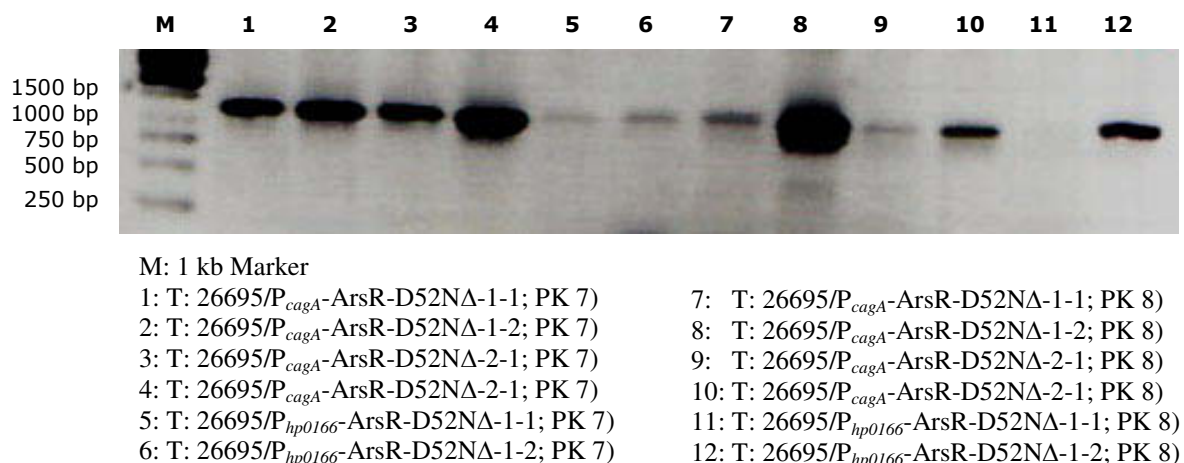


Abb. 56: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR für die Klone 1-1, 1-2, 2-1 und 2-2 der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -*ArsR*-D52N Δ sowie für die Klone 1-1 und 1-2 der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -*ArsR*-D52N Δ . T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 23 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration des Allels *arsR*-D52N unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} (A) bzw. P_{hp0166} (B) in den *cag*-Lokus der Mutanten zu verifizieren. In Abb. 56C ist das Ergebnis der PCR-Analyse zum Nachweis der Deletion des wildtypischen *arsR*-Gens im *arsR*-Lokus der beiden Mutanten zu sehen.

3.2 Analyse der Expression des modifizierten Response-Regulators ArsR-D52 in den Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ

In den beiden Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ wurde in einem Western-Blot-Experiment die Expression des modifizierten Response-Regulators ArsR-D52N analysiert (Abb. 57). Untersucht wurde die Expression des RR ArsR-D52N in Klon-1-1 der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ und in Klon -2-2 der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ .

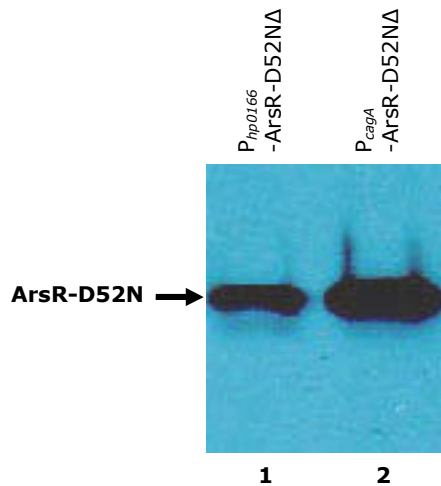


Abb. 57: Ergebnis der Western-Blot-Experimente zur Analyse der ArsR-D52N Expression in den Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ -1-1 (Spur 1) und *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ -2-2 (Spur 2). Es wurden je 20 μ g Gesamtzellprotein auf das 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Der 1. AK (α -HP0166) wurde in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt, der 2. AK (goat- α -rabbit-HRP, Dianova) wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Der schwarze Pfeil auf der linken Seite der Abb. markiert die Bande, die dem 25,9 kDa ArsR-D52N-Protein entspricht.

In der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ (Spur 2), in welcher die Transkription des Allels *arsR-D52N* ausgehend von dem konstitutiv aktiven Promotor P_{cagA} stattfindet, wurde erwartungsgemäß deutlich mehr ArsR-D52N exprimiert als in der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ (Spur 1), in welchem sich das Allel *arsR-D52N* unter der Kontrolle des wildtypischen Promotors P_{hp0166} befindet.

3.3 Transkriptomvergleich der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ und *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ mittels RNA-Microarray-Analysen

Durch den Vergleich des Transkriptoms der ArsR-D52N überexprimierenden Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ -2-2 mit dem Transkriptom der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ -1-1 sollten Gene identifiziert werden, deren Transkription abhängig vom nicht phosphorylierten RR ArsR ist. Eine Überexpression des Response-Regulators sollte eine Steigerung der Transkription von positiv regulierten Genen zur Folge haben.

Von den beiden Mutanten wurden Flüssigkulturen in BHI pH 7 angeimpft und über Nacht bis zum Erreichen einer $OD_{550nm} = 0,7 - 0,75$ inkubiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Aus den Bakterienpellets wurde Gesamtzell-RNA isoliert. Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA mit dem RNA-Extraction-Kit von Qiagen entsprechend dem Protokoll „RNA Cleanup“ aufgereinigt. Für die beiden Mutanten wurden jeweils zwei unabhängige RNA-Präparationen für die MA-Analysen eingesetzt. Jede RNA wurde einmal mit Cy3 bzw. Cy5 gelabelt („Dye-switch“), insgesamt wurde die MA-Analyse viermal durchgeführt. Da auf jedem Array jedes Gen zweimal gespottet ist, wurden auf diese Weise acht Datensätze ermittelt. In der Tab. 24 sind die Ergebnisse der durchgeführten MA-Analyse zusammengefasst. Es sind nur solche Gene aufgeführt, bei denen mindestens fünf als „gut“ definierte Spots eine Ratio (= Transkriptmenge eines Gens in *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-

D52N Δ /Transkriptmenge des Gens in *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-ArsR-D52N Δ) von kleiner 0,5 bzw. größer 2,0 aufweisen.

Tab. 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der MA-Analysen zur Identifizierung von essentiellen Target-Genen des nicht phosphorylierten Response-Regulators ArsR. In Teil A) der Tabelle findet man die Gene, deren Transkription durch den RR ArsR-D52N aktiviert wird, in Teil B) der Tabelle sind die Gene aufgelistet, deren Transkription durch ArsR-D52N reprimiert wird. Die Ratio beschreibt das Verhältnis der Transkriptmenge eines Gens in der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{cagA}-ArsR-D52N Δ zur Transkriptmenge des Gens in der Mutante *H. pylori* 26695/*P*_{hp0166}-ArsR-D52N Δ . ORF: Open reading frame; m: monocystonisch; op: Operon; ?: vermutlich als m oder op organisiert.

A) ArsR-D52N aktiviert

Kategorie	ORF	Ratio	Genfunktion	Genom-Organisation
Aminosäurebiosynthese	HP0380	2,47	Glutamat-Dehydrogenase, <i>gdhA</i>	m
	HP0695	3,48	Hydantoin verwertendes Protein A, <i>hyuA</i>	op hp0695-hp0697
Ammoniak Produktion und pH Homöostase	HP0696	2,91	potentielle N-Methyl-Hydantoinase	op hp0695-hp0697
	HP0067	4,13	Urease akzessorisches Protein, <i>ureH</i>	op hp0071-hp0067
	HP0068	3,75	Urease akzessorisches Protein, <i>ureG</i>	op hp0071-hp0067
	HP0069	2,76	Urease akzessorisches Protein, <i>ureF</i>	op hp0071-hp0067
	HP0070	5,70	Urease akzessorisches Protein, <i>ureE</i>	op hp0071-hp0067
	HP0071	4,38	Harnstoffkanal, <i>ureI</i>	op hp0071-hp0067
	HP0072	2,27	Urease Untereinheit B, <i>ureB</i>	op hp0073-hp0072
	HP0073	2,07	Urease Untereinheit A, <i>ureA</i>	op hp0073-hp0072
	HP0294	17,76	Aliphatische Amidase, <i>amiE</i>	m
	HP1238	25,31	Formamidase, <i>amiF</i>	m
Energie-Metabolismus	HP0844	2,21	Thiamin-Biosynthese-Protein, <i>thi</i>	op 846-843
Biosynthese	HP1050	2,71	Homoserin-Kinase, <i>thrB</i>	op
	HP1582	2,25	Pyridoxalphosphat-Biosynthese-Protein A	op hp1582-hp1583
	HP0163	2,27	Delta-Aminolävulinsäure-Dehydratase, <i>hemB</i>	op hp0166-hp0162
Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern	HP0172	2,15	Molybdoptererin-Biosynthese-Protein, <i>moeA</i>	op
	HP0306	2,50	Glutamat-1-Semialdehyd 2,1-Aminomutase, <i>hemL</i>	op hp0305-hp0308?
	HP1224	2,68	Uroporphorinogen III-Cosynthase, <i>hemD</i>	op hp1223-hp1225
Zellhülle	HP0227	2,13	äußeres Membranprotein, <i>omp 5</i>	m
	HP0896	2,90	äußeres Membranprotein, <i>omp 19</i>	m
	HP1342	2,20	äußeres Membranprotein, <i>omp 29</i>	m
zellulärer Prozess	HP0390	2,66	potentielle Thiol-Peroxidase, <i>tpx (tagD)</i>	m

Kategorie	ORF	Ratio	Genfunktion	Genom-Organisation
DNA-Metabolismus, Restriktion und Modifikation Energie-Metabolismus	HP1022	3,57	potentielle 5'-3' Exonuclease	m
	HP0691	3,43	3-Oxoadipinat CoA-Transferase Untereinheit A Oder: Succinyl-CoA:Acetoacetat- CoA-Transferase Untereinheit A A, <i>scoA</i> (<i>yxjD</i>)	op hp0690-hp0693
	HP0692	3,20	3-Oxoadipinat CoA-Transferase Untereinheit B Oder: Succinyl-CoA:Acetoacetat- CoA-Transferase Untereinheit B, <i>scoB</i> (<i>yxjE</i>)	op hp0690-hp0693
Fettsäure- und Phospholipid- Metabolismus	HP0891	2,21	potentielle Acyl-CoenzymA- Thioesterase	m
hypothetische Proteine	HP0242	2,71	hypothetisches Protein	op hp0243-hp0236?
	HP0305	2,51	hypothetisches Protein	op hp0305-hp0308?
	HP0388	2,10	konserviertes hypothetisches Protein	op hp0389-hp0388
	HP0424	2,02	hypothetisches Protein	op hp0427-hp0423?
	HP0425	4,41	hypothetisches Protein	op hp0427-hp0423?
	HP0526	5,74	hypothetisches Protein	op hp0427-hp0423?
	HP0650	2,39	hypothetisches Protein, Uracil- DNA-Glycosylase	m?
	HP0697	2,91	konserviertes hypothetisches Protein	op hp0695-hp0697
	HP1098	2,59	Cysteinreiches Protein C, <i>hcpC</i>	op hp1100-hp1097?
	HP1223	2,46	hypothetisches Protein	op 1223-1225
Motilität und Chemotaxis	HP1409	3,90	hypothetisches Protein	op hp1408-hp1412?
	HP1410	2,33	hypothetisches Protein	op hp1408-hp1412?
	HP1192	4,27	Sekretiertes Protein, beteiligt an der Flagellenmotilität	m
	HP0164	4,71	Histidin-Kinase, <i>arsS</i>	op hp0166-hp0162
Regulatorische Funktion	HP0165	1,66	Histidin-Kinase, <i>arsS</i>	op hp0166-hp0162
	HP0166	15,29	Response-Regulator, <i>arsR</i>	op hp0166-hp0162
	HP0693	3,22	potentieller Transporter für kurzkettige Fettsäuren	op hp0690-hp0693
Transport- und Bindeproteine	HP1077	2,24	Nickel-Transport Protein, <i>nixA</i>	m?
	HP1427	17,08	Histidinreiches Protein, <i>hpn</i>	m
	HP1432	22,49	Histidinreiches Protein	m
Unbekannte Proteine	HP0747	2,67	potentielle S-Adenosylmethionin- abhängige Methyltransferase	op hp0745-hp0750?

B) ArsR-D52N reprimiert

Kategorie	ORF HP	Ratio	Genfunktion	Genom-organisation
Biosynthese	HP0255	0,47	Adenylsuccinat-Synthetase, <i>purA</i>	op 255-259
Purine, Pyrimidine, Nucleoside und Nukleotide: Purin-Ribonucleotid-Biosynthese zellulärer Prozess	HP0220	0,48	Synthese von [Fe-S]-Clustern, <i>nifS</i>	op hp0220-hp0221
	HP0221	0,45	Gerüstprotein NifU, beteiligt am [Fe-S]-Cluster Aufbau	op hp0220-hp0221
	HP0630	0,41	putativer Modulator der "Drug-Activity"	m
Fettsäure und Phospholipid-Stoffwechsel	HP0561	0,46	3-Ketoacyl-Acyl-Carrierprotein-Reductase, <i>fabG</i>	m?
Allgemeine Stressantwort	HP0595	0,49	Dsb-ähnliches Protein	op
hypothetische Proteine	HP0222	0,47	hypothetisches Protein	m
	HP0256	0,45	hypothetisches Protein	op 255-259
	HP0681	0,36	hypothetisches Protein	op hp0682-hp0682
	HP0682	0,30	hypothetisches Protein	op hp0682-hp0682
	HP0720	0,45	hypothetisches Protein	op 719-721
	HP0781	0,43	hypothetisches Protein, Transposase	m
	HP0902	0,32	konserviertes hypothetisches Protein	op 902-901
	HP1288	0,26	hypothetisches Protein	op 1288-1289
	HP1289	0,23	hypothetisches Protein	op 1288-1289
	HP1291	0,23	konserviertes hypothetisches Protein	op 1290-1291
Transkription, Transkriptionsfaktoren und Translation	HP1317	0,39	Ribosomales Protein, <i>rpl23</i>	op 1320-1298?
Transport- und Bindeproteine	HP1174	0,24	Glucose/Galactose Transporter	m
	HP1290	0,26	Nicotinamid Mononukleotid Transporter, <i>pnuC</i>	op 1290-1291

Insgesamt konnten in den MA-Analysen 65 Gene identifiziert werden, deren Transkription in der Mutante *H. pylori* 26695/*P_{cagA}-ArsR-D52NΔ* differentiell reguliert wurde. Für 46 dieser Gene wirkt ArsR-D52N als Aktivator und für 19 als Repressor der Transkription. Bei 32 der identifizierten Target-Gene handelt es sich um säureregulierte Target-Gene des phosphorylierten Response-Regulators ArsR~P (Pflock et al., 2005). Diese Gene sind in der Tabelle 24 gelb hervorgehoben. Interessanterweise sind 15 Target-Gene des RR ArsR-D52N auch Bestandteil des HP1021 Regulons von *H. pylori* 26695 (Pflock et al., 2007). Diese sind in der Tab. 24 blau hervorgehoben, wobei eine hellblaue Markierung eine Aktivierung der Transkription durch HP1021 angibt und eine dunkelblaue eine Reprimierung.

3.4 Versuche zur Deletion on ArsRS Target-Genen mit potentiell essentieller Funktion

Es sollten mehrere Deletionsmutanten konstruiert werden, um eine essentielle Funktion ausgewählter Target-Gene zu untersuchen. Handelt es sich bei den ausgewählten Target-Genen tatsächlich um essentielle Gene, so sollte eine Deletion nicht möglich sein. Überprüft wurden auf diese Weise die Gene *hp0650*, *hp1582-hp1593*, *hp1224* und *hp0891*.

Das Gen *hp0650* codiert für ein hypothetisches Protein, welches basierend auf der AS-Sequenz zu 94,5 % mit dem hypothetischen Protein HPAG1_0635 aus *H. pylori* HPAG1 übereinstimmt. Für HPAG1_0635 wird eine Uracil DNA N-Glykosylase-Aktivität postuliert. Die Uracil DNA-N-Glykosylase wird in der Zelle benötigt, um Uracil-Basen in der

DNA zu entfernen, die durch Deaminierung von Cytidin entstanden sind oder durch Fehlpaarung mit Adenosin in den DNA-Strang eingebaut wurden und hat somit eine wichtige Funktion bei der DNA-Reparatur. Dieses Enzym spaltet in der DNA die N-C1'-glycosidische Bindung zwischen der DNA-Base und der Desoxyribose (Krokan et al., 1997).

Die Gene *hp1224* und *hp1582/hp1583* codieren für Proteine, die eine Funktion bei der Biosynthese von Cofaktoren haben. Der ORF *hp1224* (*hemD*) codiert für die Uroporphyrinogen-III-Cosynthase, welche die Hydrolyse von Hydroxymethylbilan zu Uroporphyrinogen III katalysiert (Jordan et al., 1979; Jordan und Berry, 1980) und somit eine wichtige Rolle bei der Cobalamin(Vitamin B₁₂)-Synthese der Bakterien spielt.

Die Enzyme PdxJ und PdxA (codiert durch *hp1582* und *hp1583*) sind an der Biosynthese des Coenzym Pyridoxal-5'-Phosphat (katalytisch aktive Form des Pyridoxins = Vitamin B₆) beteiligt. PdxA und PdxJ katalysieren in *E. coli* die intramolekulare Kondensation der Vorläufermoleküle 1-Desoxy-D-Xylose-5'-Phosphat, einer modifizierten Pentose, und der nicht proteinogenen Aminosäure 4(Phosphohydroxy)-L-Threonin, es entsteht Pyridoxin-5'-Phosphat (PNP). PNP wird in einem weiteren Schritt durch die Oxidase PdxH zu dem katalytisch aktivem Coenzym Pyridoxal-5'-Phosphat umgewandelt. Pyridoxal-5'-Phosphat ist das zentrale Vitamin des Aminosäurestoffwechsels und kann zusammen mit den verschiedensten Apoenzymen Reaktionen wie Transaminierungen, Decarboxylierungen, Deaminierungen und Aldolsplaltungen katalysieren (Laber et al., 1999).

Das Gen *hp0891* codiert für eine potentielle Acyl-Coenzym A-Thioesterase. Thioesterasen hydrolysieren Thioester zu den entsprechenden Thiolen und Carbonsäuren und es wird ihnen eine Funktion beim Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus zugeordnet. HP0891 weist in der AS Sequenz eine Übereinstimmung von 25,5 % und eine Ähnlichkeit von 48,9 % mit der YciA Thioesterase von *Haemophilus influenzae* KW20 Rd auf. Von YciA in *Haemophilus influenzae* ist bekannt, dass dieses Enzym verschiedenste Acyl-CoA-Thioester hydrolysieren kann und ihm wird eine potentielle Funktion bei der Membranbiosynthese zugeordnet, die genaue physiologische Funktion ist jedoch unbekannt (Zhuang et al., 2008).

Die Konstruktion der Deletionsmutante *H. pylori* 26695/ Δ hp0650 erfolgte durch Transformation des WT *H. pylori* 26695 mit dem Suicide-Plasmid pSL- Δ hp0650. Dieses Plasmid setzt sich zusammen aus zwei Fragmenten, hp0649' und hp0651', die eine Kan^r-Kassette flankieren. Das 475 bp *EcoRI/BamHI* Fragment hp0649' (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar hp0649-1/hp0649-2) enthält den Bereich des ORFs *hp0649*, der für die AS 327 - 469 des Proteins HP0649 codiert sowie 44 bp der intergenischen Region zwischen den ORFs *hp0649* und *hp0650*, das 537 bp *PstI/SacI* Fragment hp0651' (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar hp0651-1/hp0651-2) besteht aus dem Bereich des Gens *hp0651*, der für die AS 296 - 477 des Proteins HP0651 codiert. Eine schematische Darstellung des Plasmids pSL- Δ hp0650 sowie die nach der Transformation stattfindenden Rekombinationsereignisse zur Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/ Δ hp0650 ist in der Abb. 58 dargestellt.

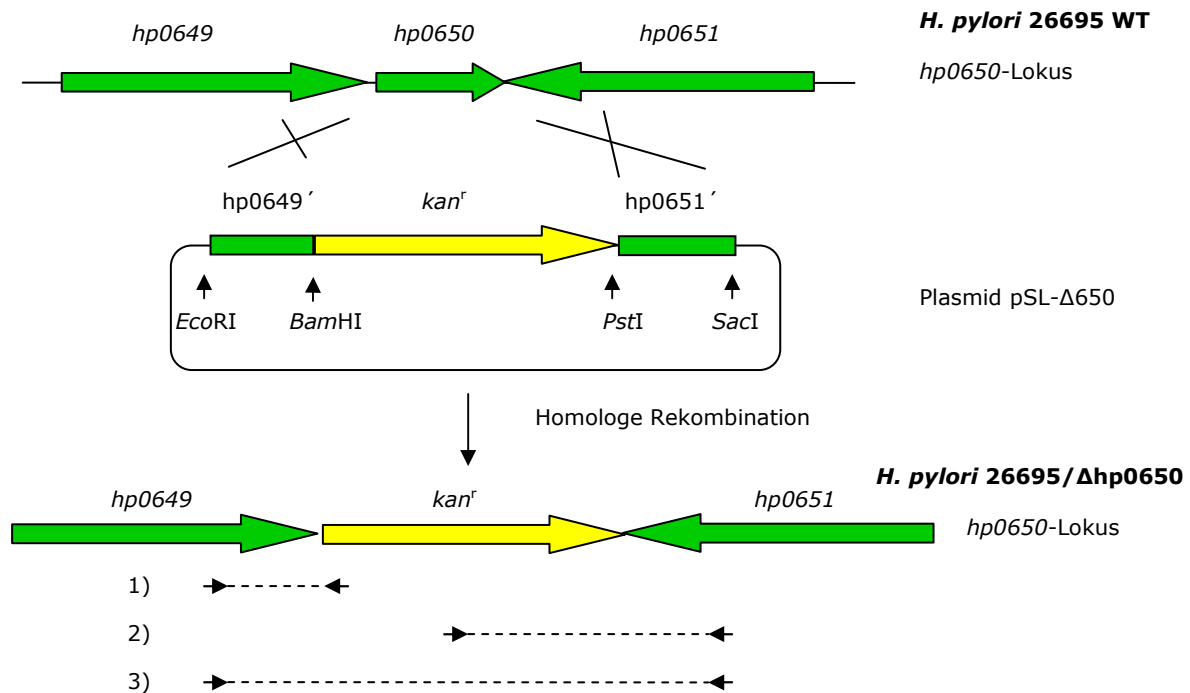
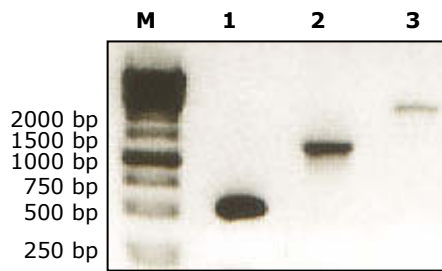


Abb. 58: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse zur Konstruktion der Mutante *H. pylori* 26695/ Δ hp0650. Nach der Transformation des WT *H. pylori* 26695 mit dem Plasmid pSL- Δ hp0650 wird nach der Rekombination der flankierenden Fragmente hp0649' und hp0651' mit dem bakteriellen Genom das Gen hp0650 durch den Selektionsmarker Kan^r-Kassette ersetzt. Ebenfall schematisch in der Abb. eingezeichnet sind die Bindestellen der Oligonukleotide, die für die Charakterisierungs-PCR der Mutante *H. pylori* 26695/ Δ hp0650 eingesetzt wurden.

Nach der Transformation wurden Kolonien erhalten, welche mittels PCR-Analysen charakterisiert wurden (Abb. 59). Die verwendeten Primerkombinationen sowie die erwarteten Fragmentlängen sind in der Tab. 25 aufgelistet. Eine schematische Darstellung der Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide ist in der Abb. 58 eingezeichnet.

Tab. 25: Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierung der Mutanten *H. pylori* 26695/ Δ hp0650. In der Tabelle sind die Primerkombinationen aufgeführt, die für den Nachweis der Deletion des Gens hp0650 verwendet wurden.

Primerkombination	Erwartete Fragmentlänge
1) hp0649-1/Hpkan2	514 bp
2) kan1/hp0651-2	1271 bp
3) hp0649-1/hp0651-2	2439 bp



M: 1 kb Marker

1: T: *H. pylori* 26695/ Δ hp0650; PK 1)

2: T: *H. pylori* 26695/ Δ hp0650; PK 2)

3: T: *H. pylori* 26695/ Δ hp0650; PK 3)

Abb. 59: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR für den Klon 1 der Mutante *H. pylori* 26695/ Δ hp0650. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 25 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Deletion des Gens *hp0650* zu verifizieren.

Die PCR-Analysen (Abb. 59) zeigten, dass eine Mutante *H. pylori* 26695/ Δ hp0650 konstruiert werden konnte, in welcher der ORF *hp0650* deletiert wurde. Bei dem Target-Gen *hp0650* des nicht phosphorylierten Response-Regulators ArsR-D52N handelt es sich somit nicht um ein essentielles Gen.

Von Sarah Schlosser wurden die Plasmide pSL- Δ hp1582/hp1583, pSL- Δ hp1224 und pSL- Δ hp0891 konstruiert. Durch Transformation des WT *H. pylori* 26695 bzw. *H. pylori* G27 mit den Suicide-Plasmiden sollten, falls die Gene nicht essentiell sind, die entsprechenden Deletionsmutante erhalten werden, in welchen die Gene *hp1582/hp1583*, *hp1224* und *hp0891* durch eine Kan^r-Kassette substituiert sein sollten. Es konnte eine Deletionsmutante *H. pylori* G27/ Δ hp0891 konstruiert werden, eine Deletion des ORF *hp0891* im genetischen Hintergrund von *H. pylori* 26695 war nicht möglich. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Gen *hp0891* essentiell für das Wachstum in *H. pylori* 26695 ist. Eine Deletion der Gene *hp1582/hp1582* und *hp1224* war weder im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27 noch von *H. pylori* 26695 möglich. Es handelt sich bei diesen Target-Genen somit vermutlich um essentielle Gene. Eine Bestätigung der im Array beobachteten Regulation durch den RR ArsR-D52N durch alternative Methoden steht noch aus.

4. Stammspezifische Unterschiede in der säureabhängigen Genregulation durch das CrdRS Zweikomponenten-System in *H. pylori*

Es ist bekannt, dass das ArsRS Zweikomponenten-System an der säureabhängigen Genregulation in *H. pylori* eine maßgebliche Rolle spielt (Pflock et al., 2004; 2005). Das säureabhängige ArsRS-Regulon konnte für *H. pylori* G27 mittels MA-Analysen definiert werden (Pflock et al., 2006), durch den phosphorylierten RR ArsR~P wird unter sauren pH-Bedingungen die Transkription von 75 Genen induziert und von 34 Genen reprimiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die säurevermittelte Transkriptionsinduktion der Gene des Urease Gen-Clusters wie auch die der Gene *amiE* und *amiF*, die ebenfalls für Ammoniak produzierende Enzyme codieren (Bury-Moné et al., 2003), durch eine direkte Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P an die Promotorregionen dieser Gene hervorgerufen wird (Pflock et al., 2005; 2006). In einer Arbeit von Loh und Cover (2006) wurde postuliert, dass in *H. pylori* J99 das HP1364/HP1365 Zweikomponenten-System ebenfalls an der Transkriptionsregulation von säureregulierten Genen beteiligt ist. Von diesem HP1364/HP1365 Zweikomponenten-System ist bekannt, dass es an der Zunahme der Expression der Kupfer-Resistenz-Determinanten CrdAB-CzcAB als Antwort auf eine Zunahme der Kupferkonzentration beteiligt ist (Waidner et al., 2005), weshalb es auch als CrdRS (Copper resistent determinant Regulatory System) bezeichnet wird.

In der Arbeit von Loh und Cover konnte in Macroarray-Analysen ein Unterschied im Transkriptionsprofil unter sauren pH-Bedingungen sowohl in einer ArsS- als auch in einer CrdS-Deletionsmutante im Vgl. zum WT beobachtet werden. Durch die Deletion der Histidin-Kinasen können in den Mutanten die Response-Regulatoren ArsR und CrdR nicht mehr phosphoryliert werden. Bei den identifizierten Target-Genen handelt es sich somit um säureregulierte Target-Gene der phosphorylierten Response-Regulatoren ArsR~P bzw. CrdR~S. Die in dieser Arbeit definierten ArsRS- und CrdRS-Regulons weisen starke Übereinstimmungen auf, weshalb vermutet werden kann, dass die Regulation dieser Target-Gene evtl. durch eine kooperative Bindung der beiden Response-Regulatoren ArsR~P und CrdR~P erfolgt. Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre, dass das CrdRS Zweikomponenten-System einen Einfluss auf die Expression des ArsRS Zweikomponenten-Systems ausübt oder umgekehrt.

Überraschenderweise konnte jedoch nur eine geringe Übereinstimmung zwischen dem ArsRS-Regulon von *H. pylori* J99 (Loh und Cover, 2006) und dem ArsRS-Regulon von *H. pylori* G27 (Pflock et al., 2006) festgestellt werden. Von 68 säureregulierten Target-Genen des ArsRS Regulons in *H. pylori* J99 sind nur 8 identisch mit den 109 detektierten Target-Genen des ArsRS-Regulons in *H. pylori* G27. Dabei handelt es sich um die säureabhängig aktivierten Gene *ureA*, *ureB*, *amiE*, *amiF*, *hp0118*, *hp1192* und *hp1432* sowie um das säurereprimierte Gen *hp0229*. Für die Gene *hp0118*, *hp1192* und *hp1432* konnte keine Regulation durch das CrdRS Zweikomponenten-System in *H. pylori* J99 beobachtet werden, wohl aber für die Gene *ureA*, *ureB*, *amiE*, *amiF* und *hp0229*.

Um eine mögliche gemeinsame Transkriptionsregulation der Gene *ureA*, *amiE* und *amiF* durch die Response-Regulatoren ArsR~P und CrdR~P, wie sie durch die Arbeit von Loh und Cover (2006) für *H. pylori* J99 vermutet werden kann, auch in den Stämmen *H. pylori* G27 und *H. pylori* 26695 nachzuweisen, wurde die Transkription der Target-Gene *ureA*, *amiE* und *amiF* in CrdS-Deletionsmutanten (*H. pylori* 26695/HP1364::km und *H. pylori* G27/HP1364::km) unter sauren pH-Bedingungen im Vergleich zum WT untersucht. In den Mutanten *H. pylori* G27/HP1364::km und *H. pylori* 26695/HP1364::km ist das *crdS* Gen durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt (Beier und Frank; 2000; Pflock et al., 2007).

Der größte Teil der Arbeit wurde von Michael Pflock durchgeführt. Er konnte zeigen, dass in *H. pylori* 26695 auch nach Deletion der Histidin-Kinase CrdS eine wildtypische Säureantwort der Target-Gene *ureA*, *amiE* und *amiF* erhalten wird. Dies bedeutet, dass ein Einfluss des phosphorylierten RR CrdR~P an der säureabhängigen Aktivierung dieser Gene in *H. pylori* 26695 ausgeschlossen werden kann. Für die Transkription der Gene *ureA* und *amiE* konnte dies von Michael Pflock auch für *H. pylori* G27 gezeigt werden. In der Mutante *H. pylori* G27/HP1364::km ist nach der Deletion der Kinase CrdS ebenfalls eine wildtypische Transkription dieser Gene unter sauren pH-Bedingungen zu beobachten. Auch für *H. pylori* G27 kann somit festgestellt werden, dass die säureabhängige Transkription der Gene *ureA* und *amiE* unabhängig vom CrdRS Zweikomponenten-System ist.

Die säureabhängige Induktion der Transkription des Gens *amiF* in Abhängigkeit vom CrdRS Zweikomponenten-System in *H. pylori* G27 wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht. In einem PE-Experiment wurde die Transkription des Gens *amiF* sowohl unter neutralen als auch unter sauren pH-Bedingungen im WT mit der Transkription in den Mutanten G27/HP1364::km und *H. pylori* G27/crdRS::km verglichen. In der Mutante *H. pylori* G27/crdRS::km ist das Gen *crdR* sowie der Bereich des Gens *crdS*, der für die ersten 48 AS der Histidin-Kinase CrdS codiert (bezogen auf die Genom Annotation von *H. pylori* 26695, Tomb et al., 1997), durch eine Kan^r-Kassette substituiert. Von jedem untersuchten Stamm wurde zweimal unabhängig RNA isoliert, sowohl für Kulturen, die unter neutralen pH-Bedingungen angezogen wurden, als auch für Kulturen, die für eine Stunde säureinduziert wurden. Dargestellt ist das Ergebnis dieser PE-Analyse, welche mit dem Primer *amiF*-PE durchgeführt wurde, in der Abb. 60.

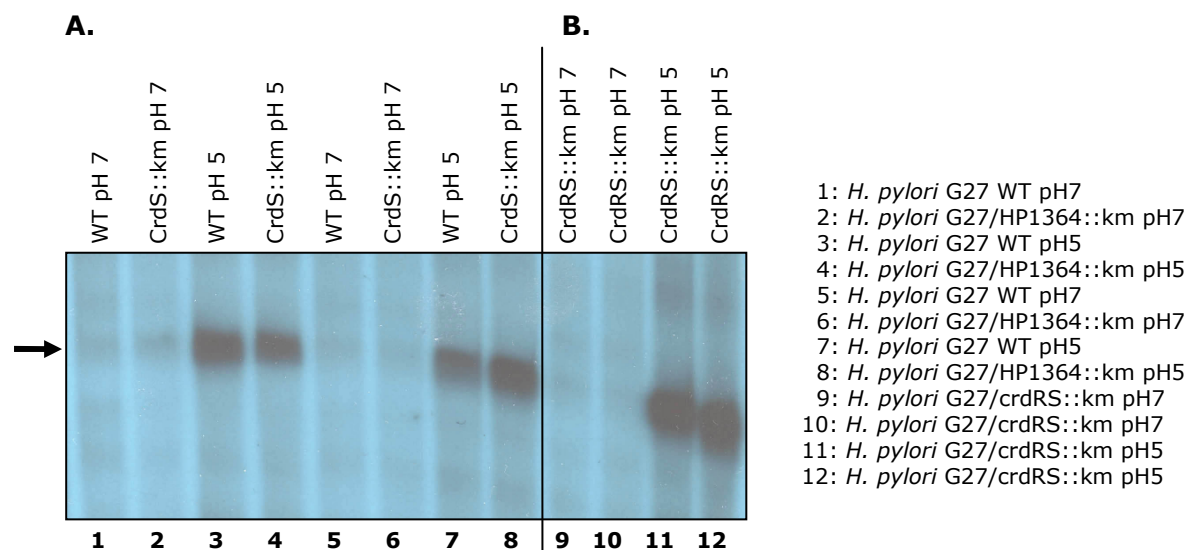


Abb. 60: Analyse der säureabhängigen Transkription des Gens *amiF* in *H. pylori* G27 WT und in der CrdS Deletionsmutante *H. pylori* G27/HP1364::km (A) bzw. in der CrdRS Deletionsmutante *H. pylori* G27/crdRS::km (B). Die PE-Analyse wurde mit dem Primer *amiF*-PE durchgeführt, es wurden je 30 µg Gesamtzell-RNA eingesetzt. Für jeden untersuchten Stamm wurde zweimal unabhängig voneinander Gesamtzell-RNA isoliert und diese als Template für die PE-Analyse eingesetzt: *H. pylori* G27 WT pH 7 (Spur 1 und 5) und pH 5 (Spur 3 und 7), *H. pylori* G27/HP1364::km pH 7 (Spur 2 und 6) und pH 5 (Spur 4 und 8) und *H. pylori* G27/crdRS::km pH 7 (Spur 9 und 10) und pH 5 (Spur 11 und 12). Das *amiF*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil auf der linken Seite der Abb. markiert

Eine deutliche Säureinduktion der Transkription des Gens *amiF* ist zu sehen, wenn man die Signalstärke des WT *H. pylori* G27 bei pH 7 (Spuren 1 und 5) mit der des WT bei pH 5 vergleicht (Spuren 3 und 7). In der Mutante G27/HP1365::km kann unter sauren pH-Bedingungen eine wildtypische säureabhängige Induktion der Transkription des *amiF*-Gens

beobachtet werden (Spuren 4 und 8). Diese Daten zeigen, dass die säurevermittelte *amiF*-Transkriptionsinduktion unabhängig von der Anwesenheit der Kinase CrdS ist.

Um auszuschließen, dass der RR CrdR in Abwesenheit von der Kinase CrdS unter sauren pH-Bedingungen von einer anderen Histidin-Kinase phosphoryliert werden kann und somit der phosphorylierte RR CrdR~P eine Funktion bei der säureabhängigen Induktion der Transkription des Gens *amiF* spielt, wurde auch in der Mutante *H. pylori* G27/crdRS::km die Transkription dieses Gens unter sauren pH-Bedingungen mittels PE-Analysen unter Verwendung des Primers *amiF*-PE analysiert (Abb. 60B). Auch nach der Deletion des Response-Regulators CrdR und einer Teildeletion der Histidin-Kinase CrdS kann in der Mutante *H. pylori* G27/crdRS::km eine deutliche Induktion der Transkription des *amiF* Gens bei Absenken des pH-Wertes von pH 7 (Spuren 9 und 10) auf pH 5 (Spuren 11 und 12) beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Säureinduktion des *amiF*-Gens in *H. pylori* G27 völlig unabhängig vom CrdRS Zweikomponenten-System ist.

Zusammen mit den von Michael Pflock erhaltenen Daten deuten diese Experimente darauf hin, dass in den Stämmen *H. pylori* G27 und *H. pylori* 26695 im Gegensatz zu *H. pylori* J99 die säureabhängige Expression der Ammoniak produzierenden Enzyme Urease, AmiE und AmiF nicht durch das CrdRS Zweikomponenten-System reguliert wird.

5. Untersuchungen zur Expressionsregulation der atypischen „orphan“-Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 in *H. pylori*

Da unklar ist auf welche Weise die Aktivität der RR HP1021 und HP1043 moduliert wird, sollte überprüft werden, ob evtl. eine strikte Kontrolle ihrer Expression für die regulatorische Funktion von HP1021 und HP1043 von Bedeutung sein könnte. Zu diesem Zweck wurden Mutanten konstruiert und analysiert, in welchen die Transkription der Gene *hp1043* und *hp1021* unter der Kontrolle der regulierbaren Promotoren P_{pfr} und P_{fecA} stattfindet. Die Transkriptionsaktivität beider Promotoren wird durch die im Medium vorhandene Fe^{2+} -Konzentration reguliert (Delany et al., 2001 a und b; van Vliet et al., 2002). Bei P_{pfr} handelt es sich um den Promotor des *pfr*-Gens, welches für ein Eisen „Storage“-Protein codiert. In Anwesenheit von Eisen wird die Transkription ausgehend von dem Promotor P_{pfr} induziert. Der Promotor P_{fecA} kontrolliert die Transkription des Gens *fecA2*, welches für ein Eisen-Dicitrat-Rezeptor-Protein codiert, das an der Eisenaufnahme in *H. pylori* beteiligt ist. Die Transkription ausgehend vom Promotor P_{fecA} wird unter Eisenmangelbedingungen dereprimiert.

5.1 Expressionsanalysen des Response-Regulators HP1021

5.1.1 Konstruktion und Analyse der Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} 1021

Zur Analyse der Expression des RR HP1021 wurde zunächst die merodiploide Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} 1021 hergestellt. In dieser Mutante befindet sich zusätzlich zu dem wildtypischen *hp1021*-Gen eine weitere *hp1021*-Genkopie unter der Kontrolle des eiseninduzierbaren Promotors P_{pfr} , welche in den *cag*-Lokus der Mutante integriert ist. Um die Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} 1021 zu konstruieren, wurde der Stamm *H. pylori* G27 mit dem Plasmid pSL- P_{pfr} 1021 cm, welches von Simone Kennard im Rahmen ihrer Diplomarbeit kloniert wurde, transformiert. Das Plasmid pSL- P_{pfr} 1021 cm setzt sich zusammen aus den flankierenden Bereichen *cagCD'* (ein 832 bp *EcoRI/BamHI* Fragment, PCR-amplifiziert von chromosomaler *H. pylori*-DNA mit dem Primerpaar 5' *cagD*/3' *cagC*) und *cagA'* (ein 862 bp *PstI/SacI* Fragment, PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar 3' *cagA*/5' *cagA*), die für die homologen Rekombinationsereignisse mit dem *cag*-Lokus des bakteriellen Chromosoms benötigt werden (Schär et al., 2005). Zwischen den flankierenden Bereichen befindet sich der 293 bp P_{pfr} -Promotor (ein *BamHI/KpnI*-Fragment, PCR-amplifiziert mit den Primern P_{pfr} -5/ P_{pfr} -3), an den das 962 bp Fragment *hp1021* (ein *KpnI/PstI*-Fragment, PCR-amplifiziert mit den Primern 1021-52Kpn/1021-3), welches für den RR HP1021 codiert, fusioniert ist. Als Selektionsmarker ist eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (Cm^r -Kassette, PCR-amplifiziert mit den Primern 5'-*Cm-Kas-PstI*/3'-*Cm-Kas-PstI*) an das *hp1021* Fragment fusioniert. Durch homologe Rekombination der flankierenden Bereiche mit den entsprechenden Bereichen des bakteriellen Chromosoms, findet eine Integration der P_{pfr} -*hp1021*-Fusion zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *cag*-Lokus von *H. pylori* statt. Eine schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse, die zur Entstehung der Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} 1021 führen, ist in der Abb. 61 dargestellt.

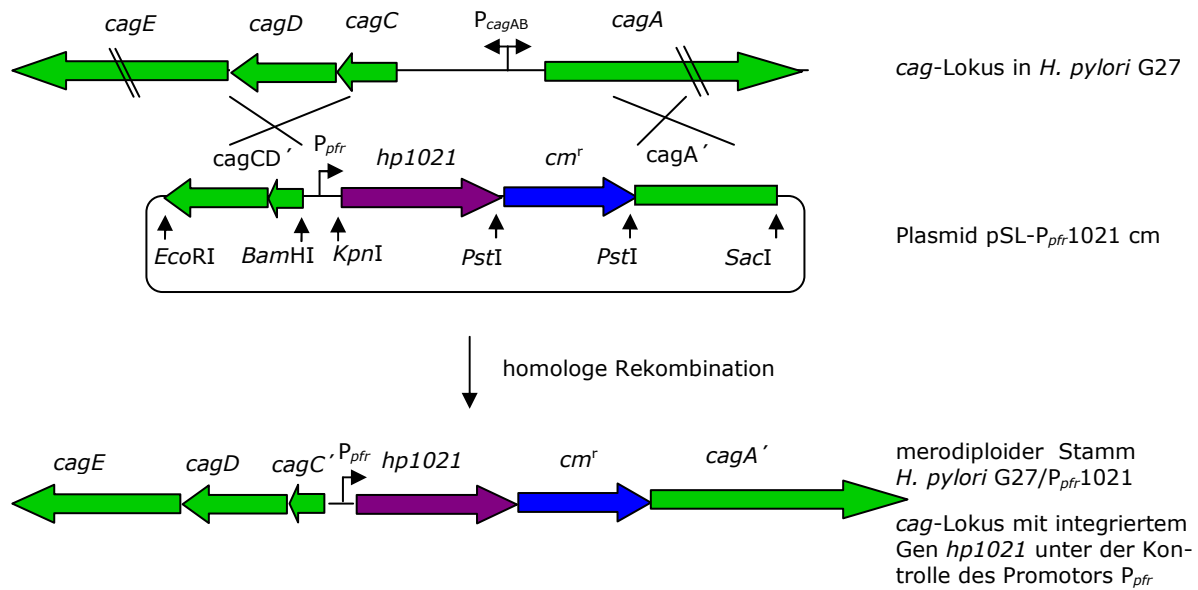


Abb. 61: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse nach der Transformation von *H. pylori* G27 mit dem Plasmid pSL- P_{pfr} -1021 cm. Durch Rekombination der flankierenden Bereiche *cagCD'* und *cagA'* mit den homologen Bereichen des bakteriellen Genoms (dargestellt durch überkreuzte Striche) wird eine Kopie des Gens *hp1021* unter der Kontrolle des Promotors P_{pfr} zusammen mit dem Selektionsmarker Cm^r in den *cag*-Lokus integriert. Es entsteht die Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} -1021.

Mittels PCR-Analysen wurden vier Klone der Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} -1021 auf die korrekte Integration der P_{pfr} -*hp1021*-Fusion zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *cag*-Lokus überprüft. In der Tab. 26 sind die für die Charakterisierungs-PCR verwendeten Primerkombinationen sowie die erwarteten Fragmentlängen aufgelistet.

Tab. 26: Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} -1021

Primerkombination	Fragmentlänge
1) <i>cagC</i> -seq/ P_{pfr} 2	447 bp
2) <i>cagC</i> -seq/1021-3	1415 bp
3) <i>cagA</i> -seq/1021-52Kpn	1954 bp

Die Abb. 62 zeigt eine schematische Darstellung der Bindestellen der für die Charakterisierungs-PCR verwendeten Oligonukleotide.

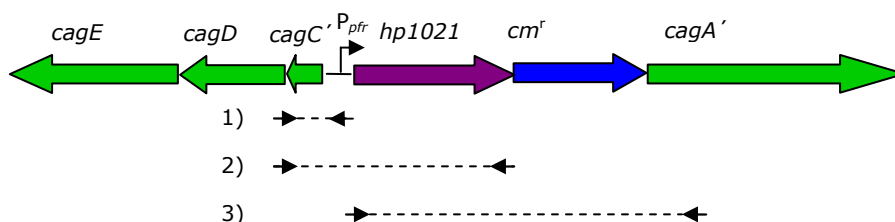


Abb. 62: Schematische Darstellung der Bindestellen der verwendeten Primerkombination für den Nachweis der Integration des Gens *hp1021* unter der Kontrolle des Promotors P_{pfr} in den *cag*-Lokus der Mutante *H. pylori* G27/ P_{pfr} -1021. Es wurden drei verschiedene Primerkombinationen eingesetzt.

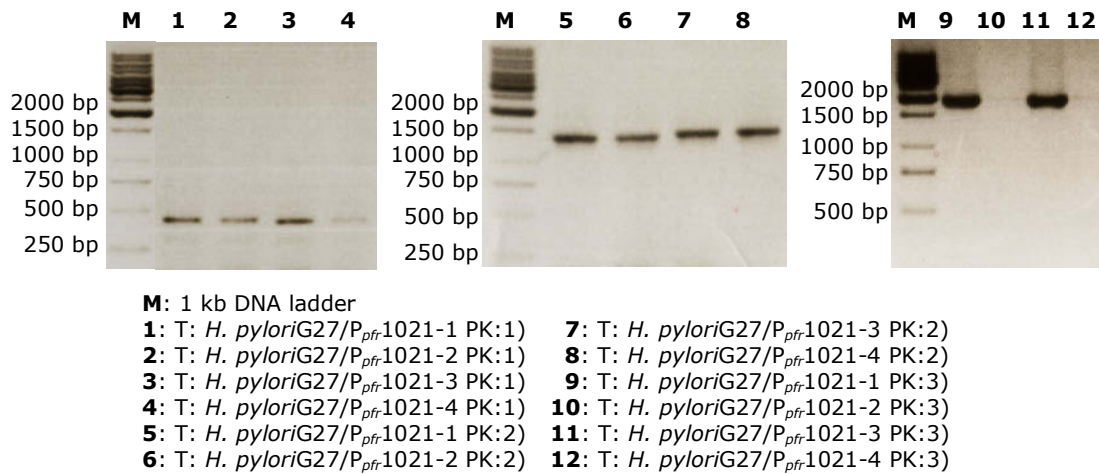


Abb. 63: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR der Mutanten *H. pylori* G27/P_{pfr}-1021. T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 26 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration des Gens *hp1021* unter der Kontrolle des P_{pfr}-Promotors zusammen mit der Cm^r-Kassette in den *cag*-Lokus der Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}-1021 zu verifizieren. Insgesamt wurden 4 Klone der Mutante (-1, -2, -3 und -4) charakterisiert. Links neben den Abbildungen sind die Fragmentlängen des verwendeten 1 kb DNA Markers aufgeführt.

Die bei der Charakterisierungs-PCR (Abb. 63) erhaltenen Fragmente wiesen die erwartete Länge auf (vgl. Tab. 26), die Integration des Gens *hp1021* unter der Kontrolle des Promotors P_{pfr} in den *cag*-Lokus der Mutante fand wie gewünscht statt. Die Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}-1021 zeigte auf Columbia-Blutagarplatten ein normales Wachstumsverhalten.

In dieser Mutante wurde die Transkription des Gens *hp1021* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert. Es wurden jeweils drei Über-Nacht(ÜN)-Kulturen der Klone *H. pylori* G27/P_{pfr}-1021-3 und *H. pylori* G27/P_{pfr}-1021-4 angeimpft. Die Kontrollen wurden ohne Zugabe von Fe²⁺ nach Erreichen einer OD₅₉₀ = 0,95 abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um eine Induktion der Transkription ausgehend von dem Promotor P_{pfr} zu bewirken, wurde zu den beiden verbleibenden Kultur nach Erreichen einer OD₅₉₀ = 0,75 - 0,8 Eisensulfat (FeSO₄) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,1 mM bzw. 5 mM Fe²⁺ in den Kulturen vorlag. Die Kulturen wurden anschließend für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden dann ebenfalls abzentrifugiert und die erhaltenen Bakterienpellets in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Aus den Bakterienpellets wurde Gesamtzell-RNA isoliert und in PE-Analysen mit dem Primer 1021-PE die Transkription des Gens *hp1021* in Abhängigkeit von der vorhandenen Eisenkonzentration ausgehend von dem Promotor P_{pfr} untersucht (Abb. 64). Da zwei Klone der Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}-1021 (-3 und -4) analysiert wurden, wurden zwei voneinander unabhängig isolierte RNA-Präparationen untersucht.

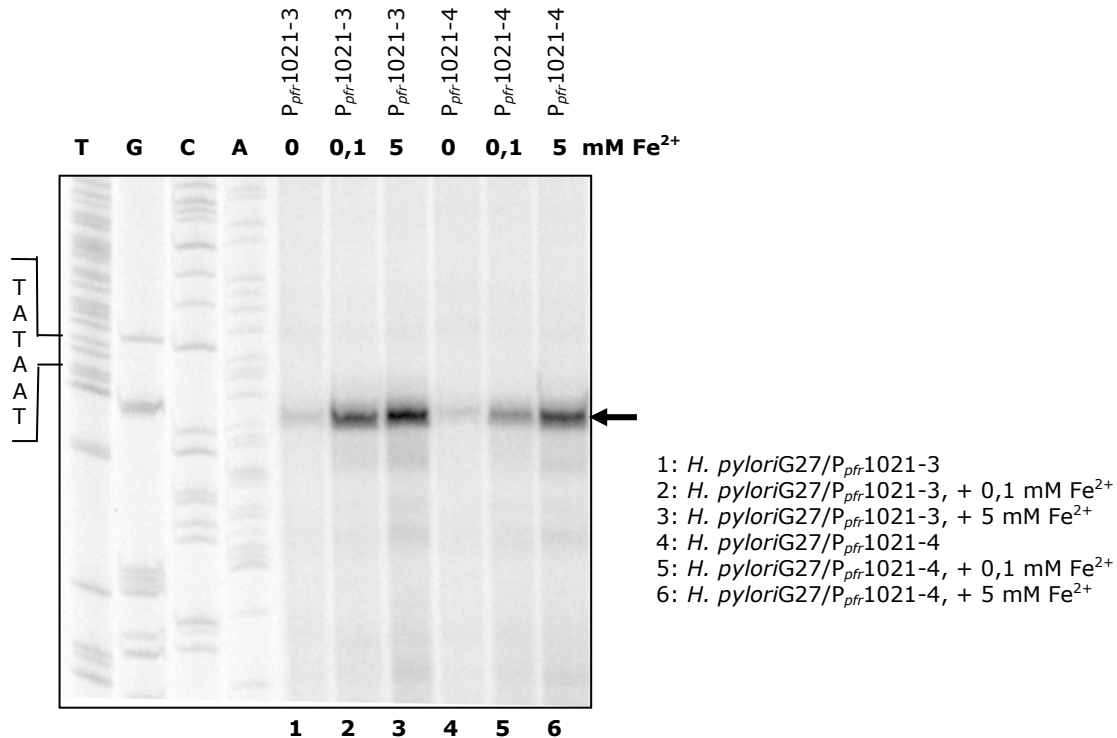


Abb. 64: Ergebnis der PE-Experimente zur Analyse der Transkription des Gens *hp1021* in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr1021}$. Untersucht wurde die Transkription des Gens *hp1021* ausgehend vom Promotor P_{pfrA} bei Zugabe von verschiedenen Fe^{2+} Konzentrationen (0, 0,1 bzw. 5 mM) unter Verwendung des PE-Primers 1021-PE. Es wurden jeweils 30 μ g RNA eingesetzt. Die Sequenzierung (T, G, C, A) wurde durch Hybridisierung des Primers 1021-PE mit dem Plasmid pSL- $P_{pfr1021}$ cm durchgeführt. Der Transkriptionsstart ausgehend vom Promotor P_{pfr} ist durch einen schwarzen Pfeil auf der rechten Seite der Abb. markiert. Zusätzlich ist die -10-Box des Promotors P_{pfr} links neben dem Autoradiogramm aufgezeigt.

Die Zugabe von 0,1 mM Fe^{2+} (Spuren 2 und 5) führte zu einer deutlich stärkeren Transkription des Gens *hp1021* ausgehend vom P_{pfr} -Promotor als in der Kultur ohne Zugabe von Eisen (Spuren 1 und 4). Durch die Erhöhung der Eisenkonzentration auf 5 mM im Medium konnte dieser Effekt noch weiter gesteigert werden (Spuren 3 und 6).

Mittels Western-Blot-Analysen wurde die Expression des RR HP1021 im WT *H. pylori* mit der Expression in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr1021}$ verglichen. In diesen Analysen wird die Summe der HP1021 Protein-Menge, die ausgehend von den beiden Promotoren P_{pfr} und P_{hp1018} hergestellt wird, nachgewiesen. Die Mutante wurde sowohl auf Columbia-Blutagarplatten mit 5 mM Fe^{2+} als auch auf Platten ohne zusätzliches Eisen angezogen, der WT *H. pylori* G27 wurde zur Kontrolle auf Standard-Columbia-Blutagarplatten inkubiert. Die Stämme wurden zunächst jeweils für 2 Tage auf den jeweiligen Platten angezogen. Anschließend wurden sie auf frische Platten überstrichen und erneut für 24 h inkubiert, um eine ausreichende Menge Ausgangsmaterial zur Herstellung der Gesamtzell-Proteinlysate zu erhalten. In den Klonen -3 und -4 der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr1021}$ wurde die Expression von HP1021 unter normalen Wachstumsbedingungen analysiert und in den Klonen -1, -2, -3 und -4 die Expression bei Zugabe von 5 mM Fe^{2+} . Das Ergebnis der Western-Blot-Analysen ist in der Abb. 65 dargestellt.

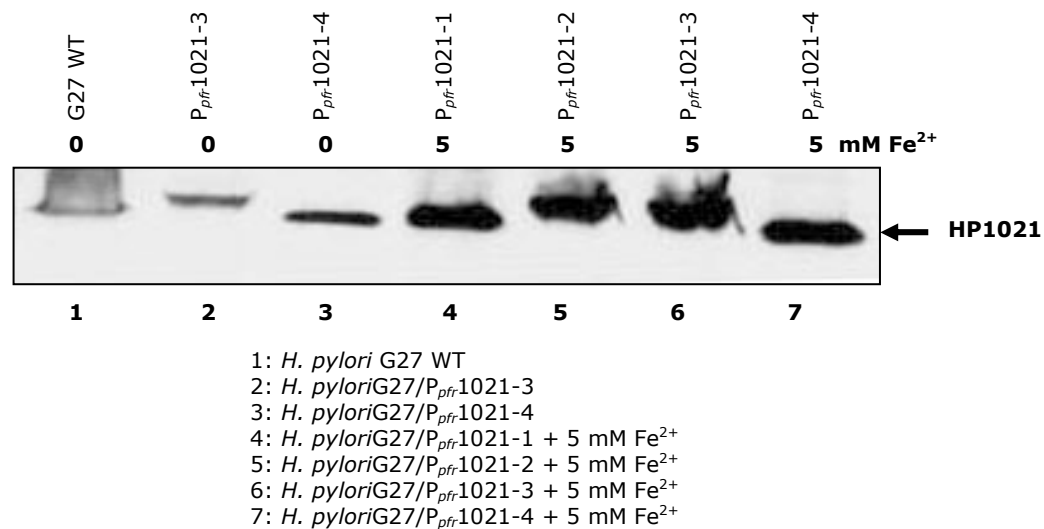


Abb. 65: Ergebnis der Western-Blot-Experimente zur Analyse der HP1021-Expression in der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1021. Untersucht wurde die Expression des Response-Regulators HP1021 sowohl unter Standardwachstumsbedingungen als auch unter eiseninduzierenden Bedingungen (Wachstum auf 5 mM FeSO₄-haltigen Columbia-Blutagarplatten). Es wurden je 40 µg Gesamtzellprotein auf das 15 % SDS-Polyacrylamidgel geladen. Der 1. AK (α-HP1021) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 und der 2. AK (goat-α-rabbit-HRP) in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Der schwarze Pfeil markiert die Bande, die dem 35,2 kDa HP1021 Protein entspricht.

In der Western-Blot-Analyse (Abb. 65) war zu erkennen, dass in Gegenwart von 5 mM Fe²⁺ (Spuren 4 - 7) eine deutlich erhöhte Proteinexpression von HP1021 in der Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1021 stattfand als in der Mutante (Spuren 3 und 4) bzw. im WT (Spur 1) unter Standardwachstumsbedingungen. Dies ist auf die eisenabhängige Induktion der *hp1021*-Transkription ausgehend vom Promotor P_{pfr} zurückzuführen. Weiterhin kann man in der Abb. 65 sehen, dass unter Standardwachstumsbedingungen in der Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1021 (Spuren 2 und 3) mehr HP1021 Protein exprimiert wurde, als im WT *H. pylori* G27. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in dem merodiploiden Stamm *H. pylori* G27/P_{pfr}1021 zusätzlich zu der Transkription ausgehend von dem wildtypischen Promotor P_{hp1018} noch eine Basistranskription des Gens *hp1021* ausgehend vom Promotor P_{pfr}, in Abwesenheit von Eisen, stattfand (vgl. auch Abb. 64 Spuren 1 und 4). Durch Zugabe von Fe²⁺ kann demzufolge eine deutliche Überexpression des Response-Regulators HP1021 erreicht werden, wenn das Gen *hp1021* unter der Kontrolle des Promotors P_{pfr} steht. Eine Mutanten *H. pylori* G27/P_{pfr}1021Δ, die durch Transformation der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1021 mit dem Suicide-Plasmid pSL-1021::km (Beier und Frank, 2000) erhalten wurde und in welcher das Gen *hp1021* am wildtypischen Locus deletiert wurde, zeigte einen normalen, wildtypischen Wachstumsphänotyp auf Columbia-Blutagarplatten.

5.1.2 Analyse der Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1021Δ

Die Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1021Δ wurde von Michael Pflock im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt. In dieser Mutante ist eine Kopie des Gens *hp1021*, die an den Promotor P_{fecA} fusioniert ist, in den *cag*-Lokus integriert (Vorgehensweise vergleichbar zur Abb. 61 unter Punkt 5.1.1). Das wildtypische *hp1021*-Gen ist durch eine Kan^r-Kassette substituiert. Auch diese Mutante zeigte ein normales, wildtypisches Wachstumsverhalten auf Columbia-Blutagarplatten. Unter Eisenmangelbedingungen, die in den durchgeführten Versuchen durch die Zugabe des Eisenchelators Dipyridyl verursacht wurden, findet eine Derepression der Transkription ausgehend vom Fur-abhängigen Promotor P_{fecA} statt. Ist genug

Eisen vorhanden, wird das Eisen-Dicitrat-Rezeptor-Protein FecA2 nicht benötigt, es kommt zu einer Repression der Transkription ausgehend von dem Promotor P_{fecA} . Auch in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1021\Delta$ wurde die Transkription des Gens *hp1021* bei verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert. Es wurden 4 Kulturen dieser Mutante in BHI angeimpft, denen nach Erreichen einer $OD_{590} = 0,58 - 0,63$ jeweils Dipyriddy (Endkonzentration 100 μM) oder FeSO_4 (Endkonzentration Fe^{2+} 100 μM bzw. 5 mM) zugegeben wurde. Anschließend wurden die Kulturen für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor sie für die Präparation von Gesamtzell-RNA eingesetzt wurden. Das Ergebnis der Transkriptionsanalysen ist in der Abb. 66 zu sehen.

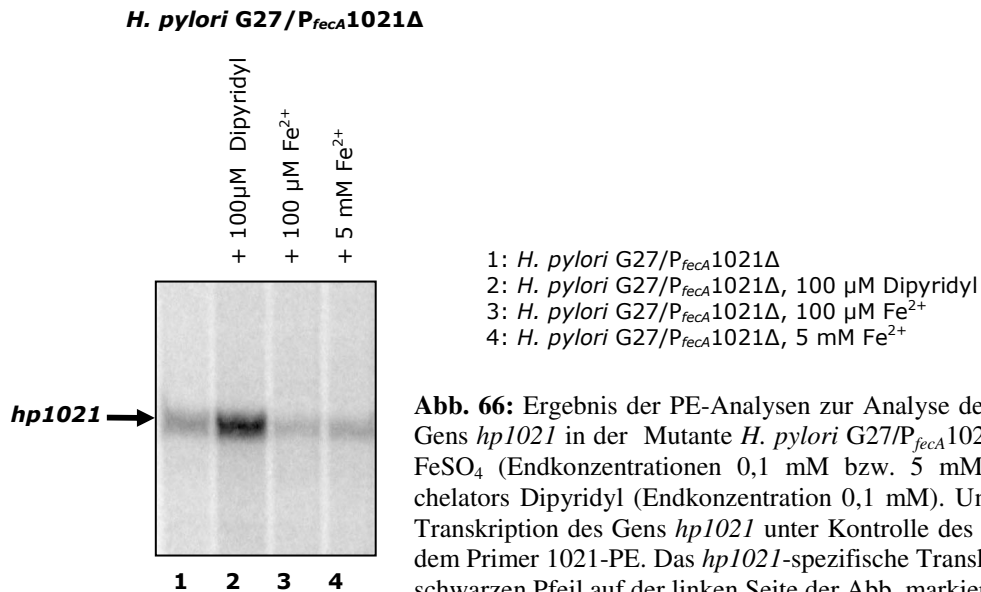


Abb. 66: Ergebnis der PE-Analysen zur Analyse der Transkription des Gens *hp1021* in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1021\Delta$ bei Zugabe von FeSO_4 (Endkonzentrationen 0,1 mM bzw. 5 mM) bzw. des Eisenchelators Dipyriddy (Endkonzentration 0,1 mM). Untersucht wurde die Transkription des Gens *hp1021* unter Kontrolle des Promotors P_{fecA} mit dem Primer 1021-PE. Das *hp1021*-spezifische Transkript ist durch einen schwarzen Pfeil auf der linken Seite der Abb. markiert.

In der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1021\Delta$ konnte unter Eisenmangelbedingungen (Spur 2) im Vergleich zum Wachstum in unbehandeltem BHI Medium (Spur 1) eine deutlich stärkere Transkription des Gens *hp1021* ausgehend vom Promotor P_{fecA} beobachtet werden. In Anwesenheit von Eisen (Spuren 3 und 4) konnte eine schwache Repression der Transkription ausgehend von diesem Promotor nachgewiesen werden, eine Basistranskription fand jedoch auch unter diesen Bedingungen statt. Die Induktion der *hp1021*-Transkription ausgehend vom Promotor P_{fecA} unter Eisenmangelbedingungen wurde auch für eine zweite RNA-Präparation bestätigt, das Ergebnis ist hier nicht dargestellt.

Da die Mutanten *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1021\Delta$ und *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1021\Delta$, in welchen die einzige Kopie des Gen *hp1021* unter der Kontrolle der Fremdpromotoren P_{fecA} und P_{pfr} steht, im Gegensatz zu der Deletionsmutante *H. pylori* G27/*hp1021*:kan (Beier und Frank, 2000) ein normales, wildtypisches Wachstumsverhalten auf Columbia-Blutagarplatten zeigten, kann man postulieren, dass eine strikte Regulation der *hp1021*-Transkription nicht essentiell für die wachstumsassoziierte Funktion des RR HP1021 ist. Bestärkt wird diese These dadurch, dass es in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1021\Delta$ möglich war, eine Veränderung der Transkription des Gens *hp1021* durch Modulation der im Medium vorliegenden Fe^{2+} Konzentration hervorzurufen. Die beobachtete Überexpression des RR HP1021 in der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1021$ auf Protein-Ebene deutet darauf hin, dass keine posttranskriptionelle Regulation der *hp1021*-Expression stattfindet. Die Aktivität des RR HP1021 wird somit vermutlich nicht über eine strikte Expressionskontrolle reguliert.

5.2 Expressionsanalysen des Response-Regulators HP1043

Zur Analyse der Expression des Response-Regulators HP1043 wurde von Jennifer Schär eine merodiploide Mutante *H. pylori* G27/P_{cagA}1043 konstruiert, in welcher sich eine zweite Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{cagA} befindet. In dieser Mutante konnte eine sehr starke Transkription des Gens *hp1043* ausgehend von dem Promotor P_{cagA} beobachtet werden. Auf Proteinebene konnte jedoch im Vergleich dieser Mutante mit dem WT *H. pylori* G27 keine verstärkte HP1043 Expression nachgewiesen werden. Eine Deletion des Gens *hp1043* an seinem wildtypischen Locus war nach der Transformation der merodiploiden Mutante mit dem Suicide-Plasmid pSL-1043::km2 (Schär et al., 2005) nicht möglich.

5.2.1 Konstruktion und Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1043Δ

Die Expression des RR HP1043 sollte unter der Kontrolle mehrere Promotoren analysiert werden, weshalb die Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1043Δ konstruiert werden sollte, in welcher eine Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle des Promotors P_{pfr} in den *cag*-Lokus integriert ist und der ORF *hp1043* am wildtypischen Genlocus deletiert ist. Zu diesem Zweck wurde die merodiploide Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1043, in welcher eine zusätzliche Kopie des ORF *hp1043* unter der Kontrolle des eiseninduzierbaren Promotors P_{pfr} sowie eine Cm^r-Kassette als Selektionsmarker in den *cag*-Lokus integriert sind, mit dem Deletionsplasmid pSL-1043::km2 (Schär et al., 2005) transformiert. Die merodiploide Mutante *H. pylori* G27/P_{pfr}1043 wurde von Michael Pflock im Rahmen seiner Diplomarbeit konstruiert. In dieser Mutante konnte eine Zunahme der Transkription des Gens *hp1043* ausgehend von dem Promotor P_{pfr} in Gegenwart von 5 mM Fe²⁺ beobachtet werden, die Transkription ausgehend von dem wildtypischen Promotor P_{hp1043} blieb dadurch unbeeinflusst. Jedoch konnte auch hier, wie bereits für die Mutante *H. pylori* G27/P_{cagA}1043 beschrieben, keine Zunahme der HP1043 Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Das Deletionsplasmid pSL-1043::km2 ist ein pSL1180 Derivat, welches eine Kan^r-Kassette trägt, die von einem 629 bp *EcoRI/BamHI* und einem 716 bp *BamHI/PstI* Fragment flankiert wird. Das *EcoRI/BamHI* Fragment setzt sich zusammen aus der Sequenz des Gens *hp1042*, die für die AS 330 bis 348 des Proteins HP1042 codiert sowie einem Teil der intergenischen Region zwischen den ORFs *hp1042* und *hp1043*. Das *BamHI/PstI* Fragment enthält einen Abschnitt des Gens *hp1044*.

Nach der Transformation der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/P_{cagA}1043 mit dem Suicide-Plasmid fand eine Selektion auf Kanamycin- und Chloramphenicol-haltigen Columbia-Blutagarplatten statt. Es wurden jeweils Platten ohne weitere Zusätze sowie Dipyridyl- und FeSO₄-haltige Platten für die Selektion der Bakterien nach der Transformation verwendet. Auch nach mehrmaliger Transformation konnten nur zwei Klone auf FeSO₄-haltigen Blutplatten erhalten werden. Aus den erhaltenen Klonen -1 und -2 und dem WT *H. pylori* G27 wurde DNA isoliert, die für eine Southern-Blot Analyse der Mutante verwendet wurde. Die für die Southern-Blot-Analyse verwendete Sonde hp1043-S ist komplementär zur codierenden Sequenz des ORF *hp1043* und wurde mit den Primern 1043-cag5/1043-3 ausgehend von chromosomaler DNA von *H. pylori* G27 PCR-amplifiziert. Das Ergebnis der Southern-Blot Analyse ist in der Abb. 67 dargestellt.

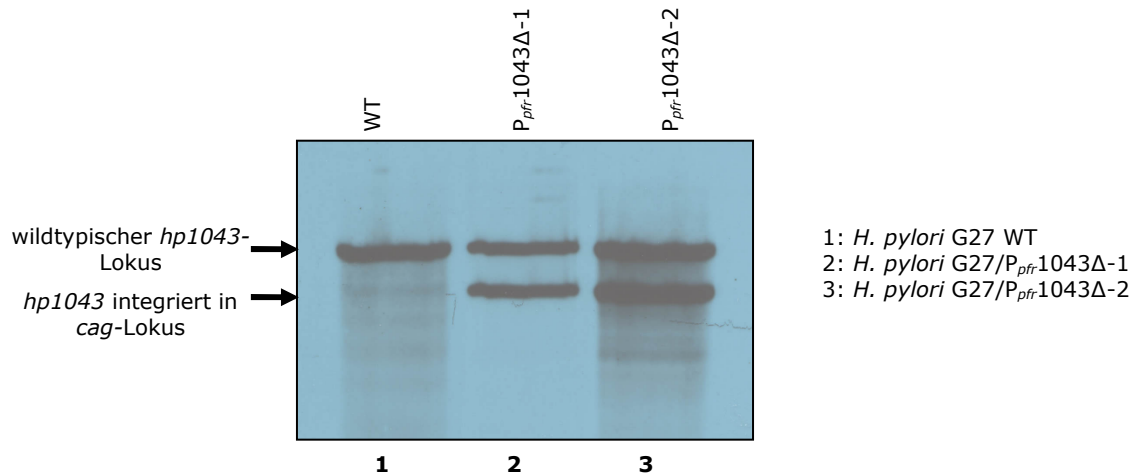


Abb. 67: Southern-Blot-Analysen zur Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1043\Delta$. Es wurden je 5 μ g HaeIII verdaute chromosomale DNA eingesetzt. HaeIII schneidet nicht innerhalb des Gens *hp1043*. Als Sonde wurde ein *hp1043* PCR-Fragment, PCR-amplifiziert mit den Primern 1043-cag5 und 1043-3, verwendet. Die *hp1043*-spezifischen Banden sind durch schwarze Pfeile auf der linken Seite der Abbildung markiert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Klonen der potentiellen Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1043\Delta$ (Spuren 2 und 3) ein Fragment derselben Länge wie auch im WT *H. pylori* G27 (Spur 2) mit der Sonde *hp1043*-S hybridisiert. Eine Deletion des Gens *hp1043* am wildtypischen *hp1043*-Lokus fand somit nicht statt. Mit der zweiten Bande in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1043\Delta$ wurde der ORF *hp1043* nachgewiesen, welcher in den *cag*-Lokus der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1043$ integriert wurde. Bei den erhaltenen Klonen handelte es sich somit nicht um die gewünschte Mutanten *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1043\Delta$, sondern um ein Derivat der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{pfr}1043$, bei welcher vermutlich eine Integration der Kan^r-Kassette stattgefunden hatte, ohne eine Deletion des wildtypischen *hp1043*-Gens zu bewirken. Es war demzufolge nicht möglich, eine Mutante zu konstruieren, in welcher die einzige Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle des Promotors P_{pfr} vorliegt.

5.2.2 Konstruktion, Charakterisierung und Analyse der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$

Es sollte auch eine Mutante konstruiert werden, in welcher die einzige Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle des durch Eisen reprimierbaren Promotors P_{fecA} transkribiert wird. Dazu wurde die Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043$, die von Michael Pflock im Rahmen seiner Diplomarbeit konstruiert wurde, mit dem bereits oben beschriebenen Deletionsplasmid pSL-1043::km2 transformiert. Die merodiploide Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043$ besitzt eine zweite Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle des Promotors P_{fecA} integriert in den *cag*-Lokus. An diese Kopie des Gens *hp1043* ist eine Cm^r-Kassette fusioniert, welche als Selektionsmarker dient. Durch die Transformation der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043$ mit dem Plasmid pSL-1043::km2 sollte es durch Allelaustausch zur Substitution des ORF *hp1043* am wildtypischen Locus durch eine Kan^r-Kassette kommen. Die Rekombinationsereignisse, die zur Entstehung der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ führen, sind in der Abb. 68 schematisch dargestellt.

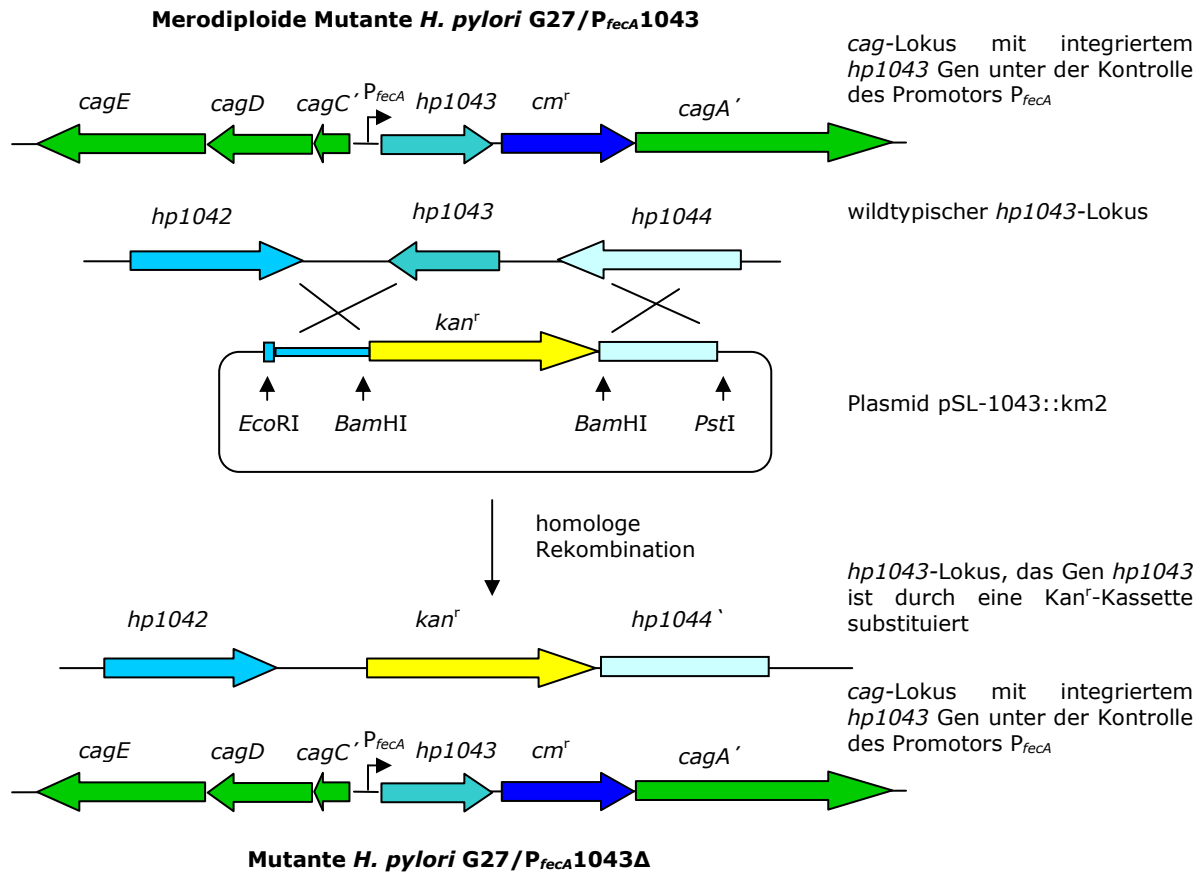


Abb. 68: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse nach der Transformation des merodiploiden Stammes *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043$ mit dem Plasmid pSL-1043::km2. Durch Rekombination der flankierenden 630 bp *EcoRI/BamHI* und 717 bp *BamHI/EcoRI* Fragmente mit den homologen Bereichen des bakteriellen Genoms (dargestellt durch überkreuzte Striche), wird am wildtypischen *hp1043* – Locus der ORF *hp1043* durch eine Kan^r -Kassette substituiert. In der resultierenden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ ist die einzige Kopie des Gens *hp1043* im *cag*-Lokus unter der Kontrolle des Promotors P_{fecA} vorhanden.

Bei den Transformationsversuchen konnten nur Einzelkolonien auf Standard-Columbia-Blutagarplatten ohne zusätzlichen Eisenchelator erhalten werden. Jedoch konnten die erhaltenen Klone im Weiteren sowohl auf Standard- als auch auf Dipyridyl-haltige Columbia-Blutagarplatten passagiert werden. Für die Versuche eingesetzt wurden solche Klone, die bis zur Herstellung der Glycerinkultur auf Standard-Columbia-Blutagarplatten inkubiert wurden.

Die Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ wurde mittels Southern-Blot-Analyse charakterisiert (Abb. 69). Als Template für diese Analyse wurde HindIII verdauete chromosomale DNA von *H. pylori* G27 WT und *H. pylori* 26695 WT, von der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043$ sowie von drei Klonen der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ eingesetzt.

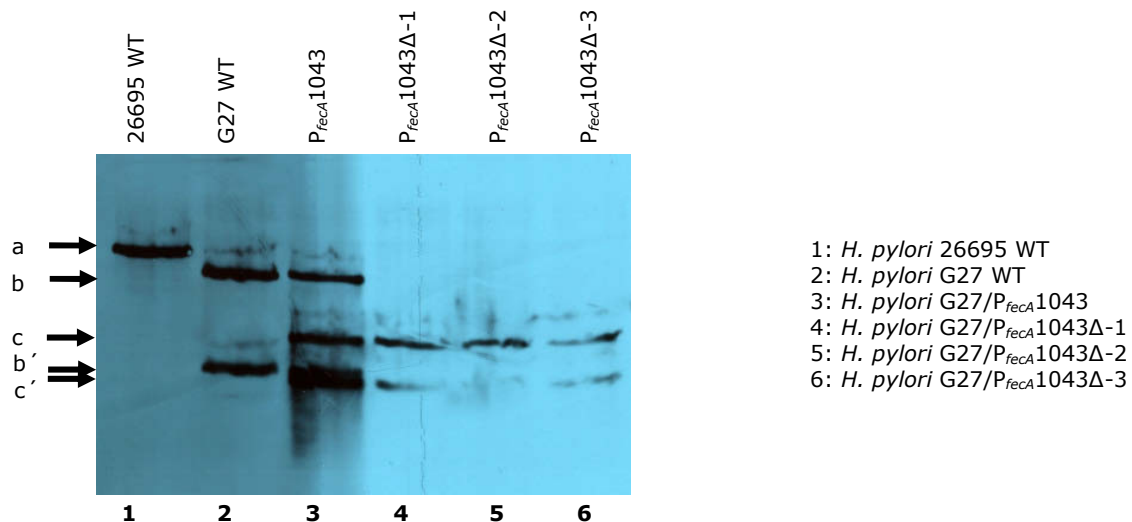
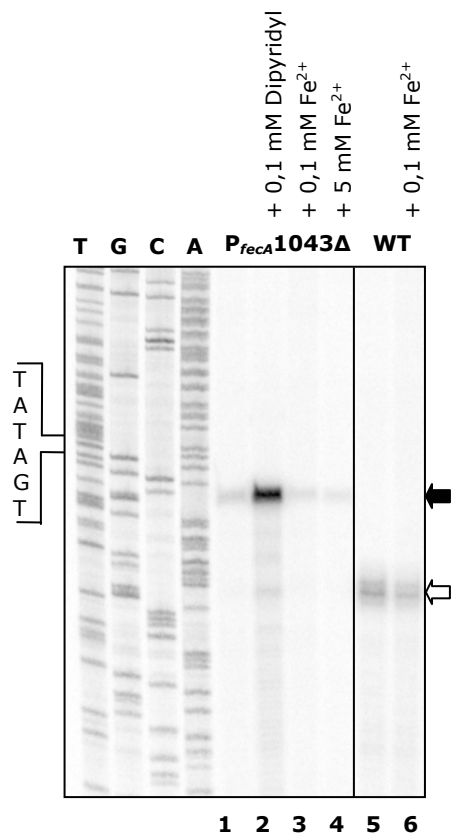


Abb. 69: Southern-Blot-Analysen zur Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$. Es wurden je 5 μ g HindIII verdaute chromosomale DNA eingesetzt. Als Sonde wurde ein *hp1043* PCR-Fragment (PCR-amplifiziert mit den Primern 1043-cag5 und 1043-3) verwendet. Durch eine HindIII Schnittstelle im ORF *hp1043* von *H. pylori* G27 hybridisiert die Sonde an jeweils zwei Fragmente, die Teile des ORFs *hp1043* codieren. Die *hp1043*-spezifischen Fragmente sind durch schwarze Pfeile auf der linken Seite der Abbildung markiert (a: Fragment enthält ORF *hp1043* von *H. pylori* 26695; b und b': zwei Fragmente, die Teile des ORF *hp1043* des wildtypischen Lokus enthalten; c und c': zwei Fragmente, die Teile des ORF *hp1043* des *cag*-Lokus enthalten).

In Spur 1 der Abb. 69 ist das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse für den WT *H. pylori* 26695 zu sehen. Wie erwartet konnte eine Bande (a) detektiert werden, die eine Länge von 2046 bp aufweist. Aufgrund einer HindIII Schnittstelle im ORF *hp1043* von *H. pylori* G27 konnten für den WT *H. pylori* G27 (Spur 2) 2 Fragmente (b und b'), die jeweils kürzer sind als das Fragment a des WT *H. pylori* 26695, mit der Sonde *hp1043*-S hybridisieren. In der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043$ in Spur 3 können neben den beiden Banden b und b' zwei weitere Banden c und c' mit der Sonde *hp1043* detektiert werden. Es handelt sich hierbei um Teile des ORF *hp1043*, welcher im *cag*-Lokus der Mutante lokalisiert ist. Für die Klone 1 - 3 der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ (Spuren 4, 5 und 6) können nur die Banden c und c', die charakteristisch für die Integration des Gens *hp1043* in den *cag*-Lokus sind, nachgewiesen werden. Es war somit gelungen, eine Mutante zu konstruieren und zu charakterisieren, in welcher die einzige Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle des Promotors P_{fecA} transkribiert wird.

In dieser Mutante wurde mittels Primer-Extension-Analysen analysiert, ob unter Eisenmangelbedingungen eine Derepression der Transkription des Gens *hp1043* ausgehend vom Promotor P_{fecA} beobachtet werden kann. Es wurden 4 Übernachtskulturen der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ in BHI angeimpft. Nach Erreichen einer $OD_{590} = 0,45 - 0,55$ wurde den Kulturen $FeSO_4$ (Endkonzentration 0,1 mM bzw. 5 mM) bzw. Dipyridyl (Endkonzentration 0,1 mM) zugegeben und die Kulturen für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Auch von *H. pylori* G27 wurden zwei ÜN-Kulturen angeimpft, einer der beiden Kulturen wurde ebenfalls $FeSO_4$ zugegeben. Aus den Kulturen wurde Gesamtzell-RNA isoliert und diese RNA für die Primer-Extension-Analysen mit dem Primer 1043-PE eingesetzt.



- 1: *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$
- 2: *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ + 0,1 mM Dipyriddy
- 3: *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ + 0,1 mM Fe^{2+}
- 4: *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ + 5 mM Fe^{2+}
- 5: *H. pylori* G27 WT
- 6: *H. pylori* G27 WT + 0,1 mM Fe^{2+}

Abb. 70: Autoradiogramm des PE-Experiments zur Analyse der Transkription des ORF *hp1043* in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$. Die Transkription des Gens *hp1043* wurde ausgehend vom Promotor P_{fecA} unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (BHI ohne weitere Zusätze bzw. nach der Zugabe von $FeSO_4$ (0,1 bzw. 5 mM) bzw. des Eisenchelators Dipyriddy (0,1 mM) unter Verwendung des PE-Primers 1043-PE analysiert. Zusätzlich wurde auch im WT *H. pylori* G27 die Transkription des Gens *hp1043* sowohl unter Standardwachstumsbedingungen als auch in Gegenwart von Fe^{2+} analysiert. Es wurden je 30 μ g Gesamtzell-RNA eingesetzt. Die von den Promotoren P_{fecA} bzw. P_{hp1043} regulierten *hp1043*-spezifischen Transkripte sind durch Pfeile (schwarz bzw. nicht gefüllt) auf der rechten Seite der Abbildung markiert. Zusätzlich ist die -10-Box des Promotors P_{fecA} links neben dem Autoradiogramm aufgezeigt. Die Sequenzierung (T, G, C, A) wurde durch Hybridisierung des Primers 1043-PE mit dem Plasmid pSL- $P_{fecA}1043$ durchgeführt.

Die Transkriptionsanalysen (Abb. 70) ergaben, dass in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ ausgehend vom Promotor P_{fecA} eine Transkriptionsregulation des Gens *hp1043* in Abhängigkeit von der vorhandenen Eisenkonzentration stattfindet. Unter Eisenmangelbedingungen (Spur 2) konnte ein deutlicher Anstieg der Transkription des Gens *hp1043* im Vergleich zur Mutante, die in BHI unter Standardwachstumsbedingungen angezogen wurde, beobachtet werden. Durch Zugabe von Fe^{2+} wurde die unter normalen Wachstumsbedingungen erhaltene Basistranskription ausgehend vom Promotor P_{fecA} leicht reprimiert, aber nicht komplett ausgeschaltet (Spuren 3 und 4). Wie in den Spuren 5 und 6 gezeigt, hatte die Zugabe von 0,1 mM Fe^{2+} keinen Einfluss auf die Transkription des Gens *hp1043* im WT *H. pylori* G27.

Die Expression des Gens *hp1043* wurde auch auf Proteinebene analysiert. Erneut wurden Kulturen der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{fecA}1043\Delta$ und des WT *H. pylori* G27 angeimpft und diese nach Erreichen einer $OD_{590} = 0,6$ entweder für eine Stunde wie oben beschrieben Eisenmangel- bzw. Eisenüberschussbedingungen ausgesetzt oder für eine weitere Stunde in BHI Medium ohne Zusätze inkubiert. Aus den erhaltenen Bakterienpellets wurde Gesamtzellprotein gewonnen (vgl. Punkt D.4.2) und dieses für die Expressionsanalysen des RR HP1043 eingesetzt. Das Ergebnis der Western-Blot-Analysen ist in der Abb. 71 dargestellt.

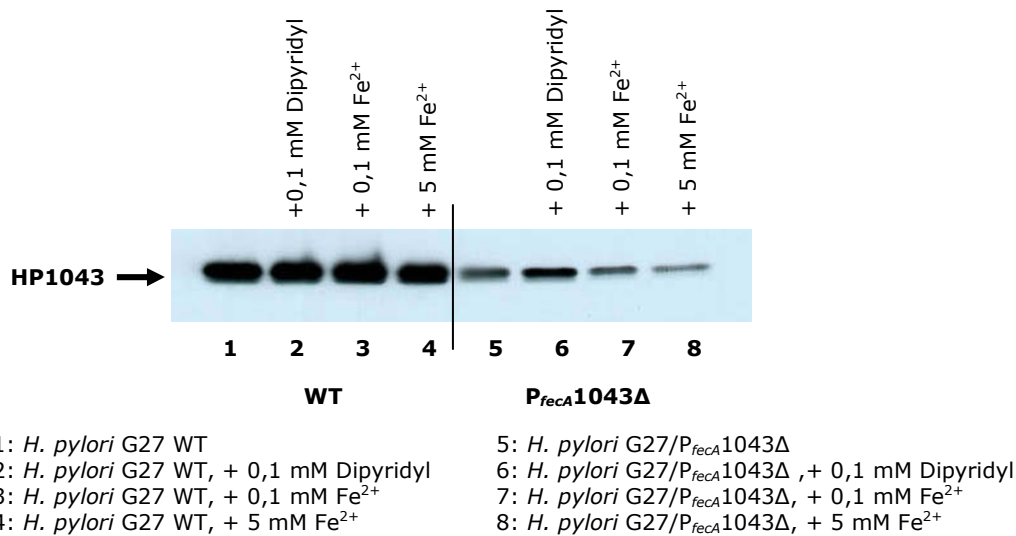


Abb. 71: Ergebnis der Western-Blot-Experimente zur Analyse der HP1043-Expression in der Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ. Untersucht wurde die Expression des Response-Regulators HP1043 unter Standard-Wachstumsbedingungen, unter Eisenmangelbedingungen und in der Anwesenheit von zusätzlichem Fe²⁺ (Zugabe von 0,1 mM Dipyridyl bzw. 0,1 mM bzw. 5mM FeSO₄) sowohl im WT *H. pylori* G27 als auch in der Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ. Es wurden je 40 µg Gesamtzellprotein auf das 15 % SDS-Polyacrylamidgel geladen. Der 1. AK (α-HP1043) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 und der 2. AK (goat-α-mouse-HRP) in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Der schwarze Pfeil links neben der Abbildung markiert die Bande, welche dem 25,5 kDa HP1043-Protein entspricht.

Wie erwartet war im WT *H. pylori* G27 die Expression des RR HP1043 unabhängig von der vorhandenen Eisenkonzentration im Medium. Sowohl bei Wachstum in nicht modifiziertem BHI-Medium (Spur 1) als auch unter Eisenmangelbedingungen (Spur 2) bzw. nach Zugabe von FeSO₄ (Spur 3 und 4) fand eine gleichmäßige Expression des RR HP1043 statt. In der Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ konnte jedoch in Abhängigkeit der vorhandenen Fe²⁺-Konzentration im Medium eine Regulation der Expression des RR HP1043 festgestellt werden. Ein leichter Anstieg in der Expression des RR HP1043 konnte in der Mutante, die Eisenmangelbedingungen ausgesetzt war (Spur 6) gegenüber der Mutante, die unter Standardwachstumsbedingungen inkubiert wurde (Spur 5), beobachtet werden. In den Kulturen der Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ, denen FeSO₄ zugesetzt wurde (Spuren 7 und 8), konnte eine leicht schwächere Expression des RR HP1043 nachgewiesen werden als für die Kultur, die unter Standardwachstumsbedingungen angezogen wurde. Unter allen gewählten Wachstumsbedingungen, selbst bei Eisenmangel, wurde in der Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ deutlich weniger HP1043 Protein exprimiert als im WT. Auf RNA-Ebene war jedoch unter Eisenmangelbedingungen die Transkription des Gens *hp1043* in der Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ deutlich stärker als im WT *H. pylori* G27 unter Standardwachstumsbedingungen (Abb. 71).

Die Analysen zur Expression des RR HP1043 ergaben, dass es nicht möglich war, Mutanten zu konstruieren, in denen die einzige Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle der Promotoren P_{cagA} oder P_{pfr} transkribiert wurde. Jedoch gelang es, eine Mutante *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ zu konstruieren, in welcher die Transkription der einzigen *hp1043* Genkopie ausgehend von dem Promotor P_{fecA} stattfand. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine strikte Kontrolle der Expression des Gens *hp1043* auf Transkriptionsebene für die regulatorische Funktion von HP1043 von Bedeutung ist. Weiterhin konnte in verschiedensten Mutanten (*H. pylori* G27/P_{cagA}1043, *H. pylori* G27/P_{pfr}1043 und *H. pylori* G27/P_{fecA}1043Δ) gezeigt werden, dass es zwar *in vitro* aufgrund der künstlich generierten Promotorfusionen möglich ist, eine verstärkte Transkription des Gens *hp1043* hervorzurufen, diese verstärkte

Transkription jedoch keine Überexpression des RR HP1043 auf Proteinebene zur Folge hat. Man kann deshalb postulieren, dass neben der Transkriptionsregulation die Expression des RR HP1043 durch posttranskriptionelle oder posttranslationale Regulation beeinflusst wird.

5.2.3 Expressionsanalysen des zu HP1043 orthologen Response-Regulators CJ0355 aus *C. jejuni* im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27

In den zu *H. pylori* nahe verwandten Bakteriengattungen *C. jejuni* und *W. succinogenes* findet man Orthologe zum RR HP1043. Von Jennifer Schär konnte im Rahmen ihrer Promotionsarbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, den RR HP1043 in *H. pylori* G27 durch den RR CJ0355 aus *C. jejuni* zu substituieren, wenn die Transkription des Gens *cj0355* ausgehend vom Promotor P₁₀₄₃ stattfindet. Für den Regulator WS0306 aus *W. succinogenes* konnte die Fähigkeit, den RR HP1043 zu ersetzen, nicht nachgewiesen werden.

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, das Gen *hp1043* durch das Gen *cj0355* zu ersetzen, wenn dieses unter der Kontrolle seines eigenen Promotors P_{*cj0355*} transkribiert wird. Zu diesem Zweck sollte die Mutante *H. pylori* G27/*cj0355*Δ hergestellt werden. Es wurde zunächst der WT *H. pylori* G27 mit dem Plasmid pSL-*cj0355* cm transformiert. Dieses Plasmid setzt sich zusammen aus den bereits oben beschriebenen Fragmenten *cagCD*' und *cagA*', die ein 937 bp *Bam*HI/*Pst*I Fragment (PCR-amplifiziert mit dem Primerpaar Cj0355-52 und Cj0355-3 ausgehend von chromosomaler DNA von *C. jejuni* 4344) flankieren, welches den Promotor P_{*cj0355*} zusammen mit dem ORF *cj0355* enthält. Als Selektionsmarker befindet sich eine Cm^r-Kassette fusioniert an das Gen *cj0355*. Durch homologe Rekombination der flankierenden Fragmente *cagCD*' und *cagA*' mit dem bakteriellen Chromosom sollte eine Integration des Gens *cj0355* unter der Kontrolle des Promotors P_{*cj0355*} in den *cag*-Lokus erfolgen. Abb. 72 zeigt eine schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse, die zur Entstehung der Mutante *H. pylori* G27/*cj0355* führen.

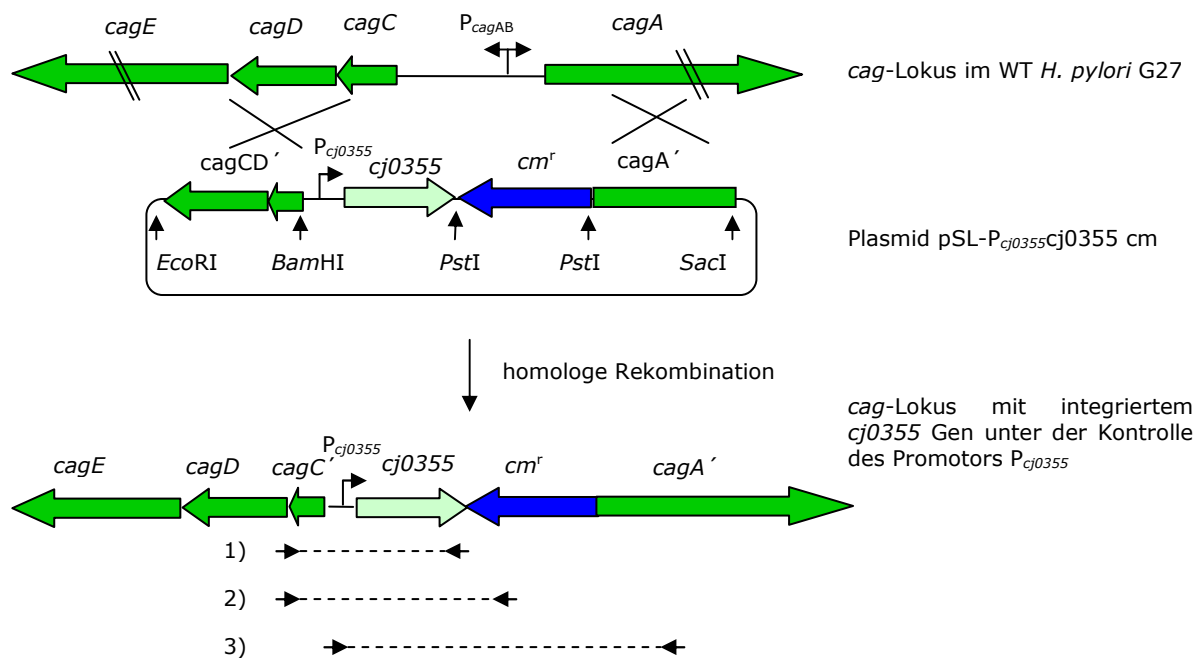


Abb. 72: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse nach der Transformation von *H. pylori* G27 mit dem Plasmid pSL-*cj0355* cm. Durch Rekombination der flankierenden Bereich *cagCD'* und *cagA'* mit den homologen Bereichen des bakteriellen Genoms (dargestellt durch überkreuzte Striche), wird eine Genkopie des Gens *cj0355* unter der Kontrolle des Promotors P_{cj0355} zusammen mit dem Selektionsmarker Cm^r in den *cag*-Lokus integriert. Es entsteht die merodiploide Mutante *H. pylori* G27/*cj0355*. Weiterhin sind in dieser Abb. die Primerkombinationen 1), 2) und 3) eingezeichnet, die für die PCR-Analysen zur Charakterisierung der Mutante *H. pylori* G27/*cj0355* eingesetzt wurden.

Die erhaltenen Klone wurden auf Chloramphenicol-haltigen Columbia-Blutagarplatten selektioniert und anschließend mittels PCR-Analysen charakterisiert. Die für die Charakterisierungs-PCR verwendeten Primerkombinationen sowie die erwartete Länge der PCR-Fragmente sind in der Tab. 27 zusammengestellt. Die Bindestellen der für die PCR-Analysen verwendeten Primerkombinationen sind ebenfalls schematisch in der Abb. 72 eingezeichnet.

Tab. 27: Verwendete Primerkombinationen und erwartete Fragmentlängen für die Charakterisierungs-PCR der Mutante *H. pylori* G27/*cj0355*

Primerkombination	Fragmentlänge
1) <i>cagC</i> -seq/ <i>Cj0355</i> -3	1091 bp
2) <i>cagC</i> -seq/ <i>Cm</i> -int-2	1182 bp
3) <i>Cj0355</i> -52/ <i>cagA</i> -seq	1929 bp

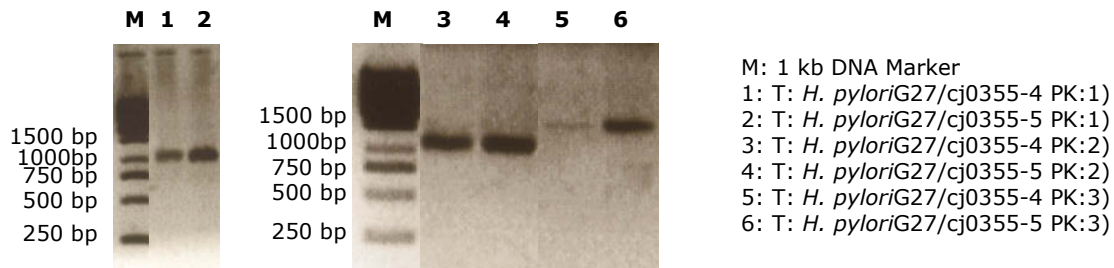


Abb. 73: Ergebnis der Charakterisierungs-PCR für die Mutanten *H. pylori* G27/cj0355. Analysiert wurden zwei Klone der Mutante *H. pylori* G27/cj0355 (-4 und -5). T: Template = chromosomale DNA; PK: Primerkombination. Es wurden die in der Tabelle 27 beschriebenen Primerkombinationen verwendet, um die Integration des Gens *cj0355* unter der Kontrolle des P_{cj0355} -Promotors zusammen mit der Cm^r -Kassette in den *cag*-Lokus der Mutante *H. pylori* G27/cj0355 zu verifizieren. Links neben den Abbildungen sind die Bandenlängen des verwendeten 1 kb DNA Markers aufgeführt.

Die in den PCR-Analysen erhaltenen Fragmente (Abb. 73) wiesen die erwartete Länge auf, es kann somit davon ausgegangen werden, dass in den Klonen -4 und -5 der Mutante *H. pylori* G27/cj0355 die Integration des $P_{cj0355}cj0355$ Fragmentes in den *cag*-Lokus wie erwartet stattfand. In einem nächsten Schritt sollte nun durch die Transformation der Mutante *H. pylori* G27/cj0355 mit dem Plasmid pSL-1043::km2 (Schär et al., 2005) das Gen *hp1043* deletiert werden. Auch nach mehrmaligem Durchführen der Transformation konnten keine Klone der gewünschten Mutante *H. pylori* G27/cj0355 Δ erhalten werden. Es scheint somit nicht möglich, das Gen *hp1043* durch das Gen *cj0355* zu ersetzen, wenn es unter der Kontrolle seines eigenen Promotors P_{cj0355} transkribiert wird. Nachdem gezeigt werden konnte, dass der RR CJ0355 in der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{1043}cj0355\Delta$ in der Lage ist, die Funktion des RR HP1043 zu übernehmen, kann man schließen, dass eine strikte Regulation der Transkription des Gens *cj0355* ausgehend vom *H. pylori*-spezifischem Promotor P_{hp1043} entscheidend für das Wachstum der Mutanten ist.

Der Vergleich der Transkription von *cj0355* in verschiedenen merodiploiden Mutanten (hergestellt von Jennifer Schär), in welchen zusätzlich zum wildtypischen *hp1043* Gen noch eine *cj0355*-Genkopie unter der Kontrolle verschiedener Promotoren im *cag*-Lokus vorhanden ist, sollte überprüft werden, ob eine Überexpression des RR CJ0355 möglich ist. Über eine solche Überexpression könnten auf diesem Umweg evtl. Target-Gene des RR HP1043 identifiziert werden. In den merodiploiden Mutanten *H. pylori* G27/ $P_{1043}cj0355$ und *H. pylori* G27/ $P_{cagA}cj0355$ wurde die Transkription des Gens *cj0355* mittels PE-Analysen untersucht. Bei der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{1043}cj0355$ handelt es sich um ein Derivat des Wildtyps *H. pylori* G27, in welchem eine Kopie des Gens *cj0355* unter der Kontrolle des *H. pylori* spezifischen Promotors P_{1043} in den *cag*-Lokus integriert ist. In der Mutante *H. pylori* G27/ $P_{cagA}cj0355$ wurde das Gen *cj0355* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{cagA} (Spohn et al., 1997) in den *cag*-Lokus integriert. Von den beiden Mutanten wurden $\bar{U}N$ -Kulturen angeimpft und diese am nächsten Morgen bis zu einer $OD_{590} = 0,85 - 0,92$ inkubiert, bevor die Kulturen abzentrifugiert wurden. Aus den erhaltenen Bakterienpellets wurde Gesamtzell-RNA isoliert und diese für die Primer-Extension Analysen mit dem Primer *cj0355*-PE eingesetzt (Abb. 74). Für jede der beiden Mutanten wurde zweimal unabhängig voneinander Gesamtzell-RNA isoliert (a und b) und analysiert.

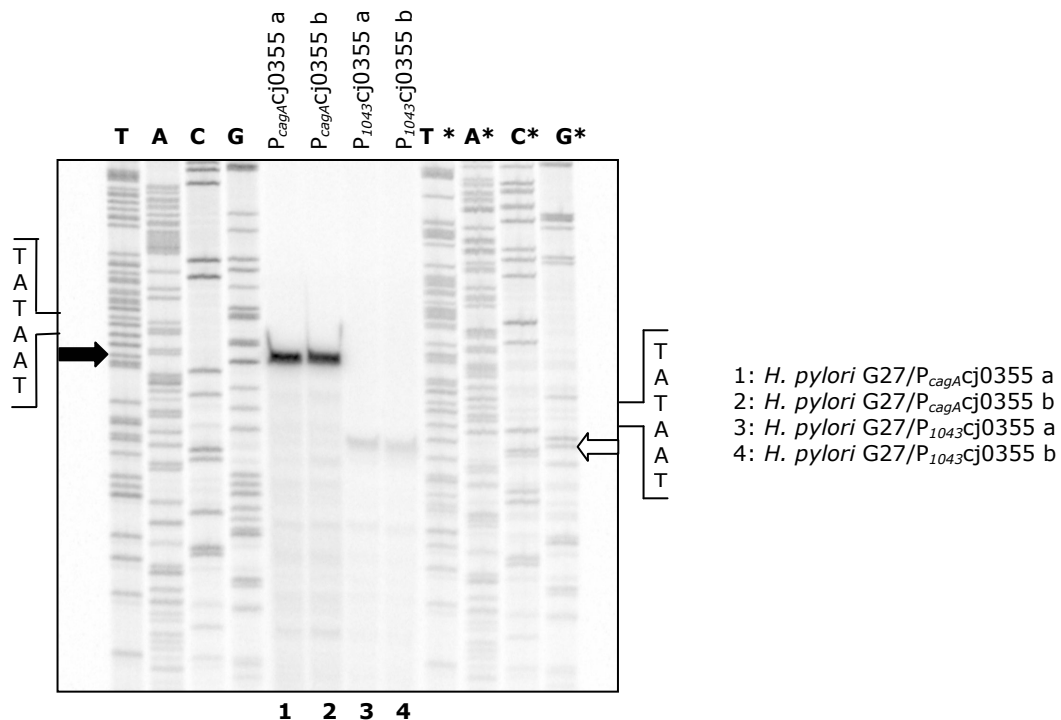


Abb. 74: PE-Experiment zur Analyse der *cj0355*-Transkription in den Mutanten *H. pylori* G27/ P_{cagA} *cj0355* und *H. pylori* G27/ P_{1043} *cj0355*. Untersucht wurde die Transkription des Gens *cj0355* unter der Kontrolle der Promotoren P_{cagA} und P_{1043} mit dem Primer PE-Cj0355. Es wurden je 30 μ g Gesamtzell-RNA eingesetzt. Die von den Promotoren P_{cagA} bzw. P_{1043} regulierten *cj0355*-Transkripte sind durch Pfeile (schwarz bzw. nicht gefüllt) markiert. Zusätzlich sind die -10-Box der Promotoren P_{cagA} bzw. P_{1043} neben dem Autoradiogramm aufgezeigt. Die Sequenzierungen wurden durch Hybridisierung des Primers 1043-PE mit den Plasmiden pSL- P_{cagA} *cj0355* cm (T, A, C, G) und pSL- P_{1043} *cj0355* cm (T*, A*, C*, G*) durchgeführt.

Ausgehend von dem konstitutiv aktivem Promotor P_{cag} findet in der Mutante *H. pylori* G27/ P_{cagA} *cj0355* eine deutlich stärkere Transkription des Gens *cj0355* statt (Spuren 1 und 2) als ausgehend von dem Promotor P_{hp1043} in der Mutante *H. pylori* G27/ P_{1043} *cj0355* (Spuren 3 und 4).

In einer Western-Blot-Analyse wurde die Expression der Proteine HP1043 und CJ0355 in den beiden Mutanten untersucht. Für den 1. Antikörper α -HP1043 konnte eine Kreuzreaktion mit dem zu HP1043 orthologen Protein CJ0355 bereits bestätigt werden (Schär, 2006). Die Stämme *H. pylori* G27 WT, *C. jejuni* WT, *H. pylori* G27/ P_{1043} *cj0355* und *H. pylori* G27/ P_{cagA} *cj0355* wurden auf Columbia-Blutagarplatten angezogen und aus den erhaltenen Bakterien wurde Gesamtzellprotein gewonnen. Das Ergebnis der durchgeführten Western-Blot-Analyse ist in der Abb. 75 gezeigt.

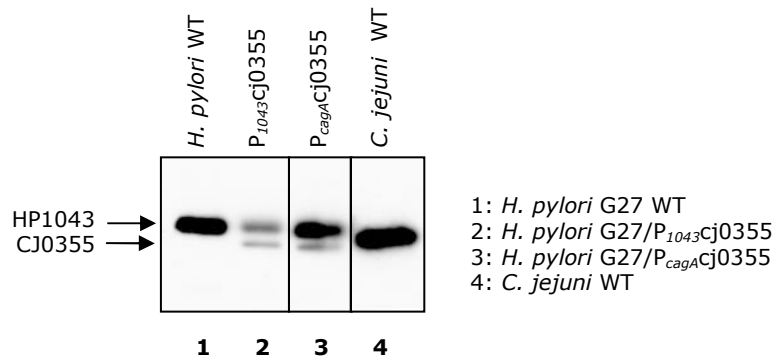


Abb. 75: Western-Blot-Analysen der Mutanten *H. pylori* G27/ P_{hp1043} cj0355 und *H. pylori* G27/ P_{cj0355} cj0355. Untersucht wurde die Expression der Response-Regulatoren HP1043 und CJ0355. Es wurden je 20 μ g Gesamtzellprotein auf das SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Der 1. AK (α -HP1043) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 und der 2. AK (goat- α -mouse-HRP) in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Die schwarzen Pfeile links neben der Abbildung markieren die Banden, welche dem 25,5 kDa HP1043-Protein bzw. dem 25,5 kDa CJ0355 Protein entsprechen.

Der Vergleich der Spuren 1 und 4 der in Abb. 75 dargestellten Western-Blot-Analyse zeigt, dass im WT *H. pylori* G27 und im WT *C. jejuni* in etwa die gleiche Menge an HP1043 bzw. CJ0355 Protein exprimiert wurde. Die beiden Proteine konnten jedoch, obwohl sie in etwa die gleiche Größe von 25,5 kDa aufweisen, aufgrund ihres Laufverhaltens unterschieden werden. Für die merodiploiden Mutanten *H. pylori* G27/ P_{1043} cj0355 (Spur 2) und *H. pylori* G27/ P_{cagA} cj0355 (Spur 3) konnte sowohl eine Expression von HP1043 (obere Bande) als auch von CJ0355 (untere Bande) beobachtet werden. Eine Überexpression des RR CJ0355 auf Proteinebene konnte jedoch in der Mutante G27/ P_{cagA} cj0355 nicht nachgewiesen werden, im Gegensatz zur zuvor gezeigten Überexpression auf RNA-Ebene (Abb. 74). Der RR CJ0355 kann in der Mutante *H. pylori* G27/ P_{1043} cj0355 Δ , in welcher eine Kopie des Gens *cj0355* unter der Kontrolle des Promotors P_{1043} in den *cag*-Lokus integriert wurde, eine Deletion des RR HP1043 kompensieren. Befindet sich das Gen *cj0355* jedoch unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} oder seines eigenen Promotors P_{cj0355} ist eine Deletion des Gens *hp1043* nicht möglich. Für die Übernahme der Funktion des RR HP1043 durch den RR CJ0355 in *H. pylori* scheint somit eine Kontrolle der Transkription ausgehend von dem Promotor P_{hp1043} eine wichtige Voraussetzung zu sein. In der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ P_{cagA} cj0355 konnte eine deutliche Zunahme der Transkription des Gens *cj0355* unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} gegenüber der Transkription in der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ P_{1043} cj0355 ausgehend von dem Promotor P_{1043} nachgewiesen werden. Diese verstärkte Transkription resultierte jedoch nicht in einer Überexpression des RR CJ0355 auf Proteinebene, so dass postuliert werden kann, dass, wie auch für die Expression des Gens *hp1043* gezeigt wurde, eine posttranskriptionelle oder posttranslationale Regulation der Expression des Gens *cj0355* stattfindet.

F. Diskussion

H. pylori besitzt ein sehr eingeschränktes Repertoire an regulatorischen Proteinen, darunter neben dem CheA/CheY Zweikomponenten-System, welches an der Chemotaxis beteiligt ist, nur acht weitere Proteine, die Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen sind (Tomb et al., 1997). Neben den kompletten Zweikomponenten-Systemen CrdRS, HP0244/HP0703 und ArsRS exprimiert *H. pylori* zwei sogenannte „orphan“ Response-Regulatoren, HP1043 und HP1021, denen bisher keine zugehörige Histidin-Kinase zugeordnet werden konnte und deren Aktivität vermutlich entgegen dem Zweikomponenten-System Paradigma nicht über Phosphorylierung reguliert wird (Schär et al., 2005). Die Analyse von 60 publizierten bakteriellen Genomen ergab, dass eine direkte Korrelation zwischen der von einem Keim exprimierten Anzahl an regulatorischen Proteinen und der Größe des bakteriellen Genoms sowie der Spezialisierung im Bezug auf die ökologische Nische besteht (Cases et al., 2003). In *H. pylori* kann das sehr begrenzte regulatorische Repertoire als eine Anpassung an sein einziges Habitat, den menschlichen Magen, gedeutet werden. Interessanterweise ist das Vorhandensein von zwei Response-Regulatoren, ArsR und HP1043, absolut essentiell für das Wachstum der Bakterienzellen (Beier und Frank, 2000). Eine Deletion des RR HP1021 *in vitro* führt zu einem deutlichen Wachstumsdefizit (Beier und Frank, 2000). Der Response-Regulator CrdR sowie die Histidin-Kinasen HP0244, ArsS und CrdS sind essentiell für eine Kolonisierung von *H. pylori in vivo* (Panthel et al., 2003), über die Bedeutung des RR HP1021 *in vivo* kann keine Aussage gemacht werden, da noch keine Kolonisierungsstudien mit einer HP1021 Deletionsmutante durchgeführt wurden. Die Zweikomponenten-Systeme von *H. pylori* sowie deren Target-Gene, die für Proteine codieren, die eine essentielle Funktion für das Wachstum *in vitro* sowie für die Kolonisierung *in vivo* haben, sind somit attraktive Targets für neue Klassen von antimikrobiellen Substanzen.

Gut charakterisiert ist das ArsRS Zweikomponenten-System von *H. pylori*. Die Histidin-Kinase ArsS nimmt *in vitro* nach Absenken des pH-Wertes von pH 7 auf pH 5 Säure als einen Umweltreiz wahr. Die Kinase wird daraufhin phosphoryliert und überträgt den Phosphatrest auf den RR ArsR, der im phosphorylierten Zustand die Transkription von Target-Genen reguliert (Pflock et al., 2004). Das säureabhängige Regulon des phosphorylierten RR ArsR~P ist identifiziert (Pflock et al., 2006). Unter den Target-Genen befinden sich die Gene *ureABIEFGH*, *amiE*, *amiF* und *hp1186*, die für die Proteine codieren, die maßgeblich an der Ausbildung der Säureresistenz in *H. pylori* beteiligt sind (vgl. Abb. 2). Die Ausbildung der Säureresistenz durch Abpuffern des periplasmatischen pH-Wertes ist die Voraussetzung dafür, dass *H. pylori* den sauren pH-Wert des Magens nicht nur überleben kann, sondern sich nach Einnisten in die Muzinschicht der Magenschleimhaut dort auch vermehren kann. Das ArsRS Zweikomponenten-System hat somit eine essentielle Funktion für die Kolonisierung von *H. pylori in vivo*.

Es sind bereits mehrere Proteine beschrieben, deren Aktivität durch Absenken des pH-Wertes verändert wird. In Eukaryoten findet man die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die als Gemeinsamkeit sieben Transmembran-Helices aufweisen. Die OGR1 Unterfamilie der GPCRs besteht aus vier Mitgliedern. Für drei der Rezeptoren, nämlich für OGR1, GPR4 und TDAG8, konnte eine Aktivierung der Rezeptoren nach Absenken des pH-Wertes von leicht alkalisch (pH 7,8) nach leicht sauer (pH 6,8) beobachtet werden (Ludwig et al., 2003; Wang et al., 2004; Ishii et al., 2005; Radu et al., 2005). Auch in Prokaryoten konnte eine Aktivierung von Proteinen nach Absenken des pH-Werts beobachtet werden. Die cytoplasmatische cyclische Adenylatcyclase Rv1264 aus *Mycobacterien*, die an der Herstellung des „Second-Messengers“ cAMP beteiligt ist, erfährt unter sauren pH-Bedingungen strukturelle Veränderungen und wird dadurch aktiviert (Tews et al., 2005). Auch Proteine, die in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind, können durch Säure aktiviert

werden, wie z. B. für CadC von *E. coli* gezeigt werden konnte (Dell et al., 1994). Bei CadC handelt es sich um einen membrangebundenen Transkriptionsaktivator, der nach Absenken des pH-Wertes von pH 7,6 auf pH 5,8 aktiviert wird und die Transkription der Gene *cadAB*, die für eine Lysin-Decarboxylase und einen Lysin-Cadaverin-Antiporter codieren, direkt induziert (Dell et al., 1994; Kuper und Jung, 2005). Zu CadC homologe Proteine sind auch in anderen Enterobakterien zu finden. Für CadC aus *Salmonella enterica* serovar Typhimurium konnte gezeigt werden, dass unter sauren pH-Bedingungen eine proteolytische Spaltung des periplasmatischen C-Terminus eine Aktivierung der cytoplasmatischen DNA-bindenden Domäne bewirkt (Lee et al., 2008). Es sind auch bereits mehrere bakterielle Zweikomponenten-Systeme beschrieben, deren Kinasen Säure als einen Umweltreiz wahrnehmen, wie z. B. das ChvG/ChvI Zweikomponenten-System aus *Agrobacterium tumefaciens* oder das PmrA/PmrB Zweikomponenten-System aus *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Li et al., 2002; Soncini und Groisman, 1996). Das ChvG/ChvI Zweikomponenten-System reguliert unter leicht sauren pH-Bedingungen die Transkription der Gene *katA* (codiert für Katalase) und der Virulenzgene *virE* und *virB*. Weiterhin wird durch den RR ChvI auch die Expression der Histidin-Kinase VirG induziert, weshalb man heute davon ausgeht, dass die ursprünglich beschriebene Säurewahrnehmung durch die HK VirG tatsächlich auf die Aktivierung des ChvG/ChvI Zweikomponenten-Systems unter sauren pH-Bedingungen zurückzuführen ist (Yuan et al., 2008). Das PmrA/PmrB Zweikomponenten-System reguliert unter anderem die Transkription von Genen, deren Produkte für Modifikationen der LPS-Struktur verantwortlich sind (Gunn et al., 1998; Trent et al., 2001; Zhou et al., 2001; Nishino et al., 2006; Delgado et al., 2006). Die Wahrnehmung der Säure durch die Histidin-Kinase PmrA erfolgt über Protonierung von AS in der periplasmatischen Sensordomäne des Kinase-Proteins, die unter sauren pH-Bedingungen in direktem Kontakt mit Protonen steht (Perez und Groisman, 2007).

In *H. pylori* wird neben der Aktivität der Kinase ArsS auch die Aktivität des Harnstoffkanals UreI unter sauren pH-Bedingungen gesteigert. Die halbmaximale Aktivität des UreI-Kanals liegt bei einem pH-Wert von 6,0 (Weeks und Sachs, 2001), dies entspricht in etwa dem postulierten pH-Wert des Periplasmas, der unter sauren pH-Bedingungen mit Hilfe der Säureresistenzmechanismen in *H. pylori* in Anwesenheit von Harnstoff auf ca. 6,1 abgepuffert wird (Marcus et al., 2005). Der UreI-Kanal besteht aus 6 Transmembrandomänen, drei cytoplasmatischen und zwei periplasmatischen Loops, die N- und C-Termini des Proteins ragen ins Periplasma. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene protonierbare AS wie Histidin, Glutamat und Aspartat im zweiten periplasmatischen Loop und im C-Terminus des Proteins maßgeblich an der Aktivierung des UreI-Kanals beteiligt sind (Weeks und Sachs, 2001; Bury-Moné et al., 2001). Nach der Protonierung dieser AS unter sauren pH-Bedingungen kommt es vermutlich zu Konformationsänderungen der TMDs, woraufhin der Kanal durchlässig für Harnstoff wird und Harnstoff in das Cytoplasma der Bakterienzelle einströmen kann (Weeks et al., 2004).

Bei der Histidin-Kinase ArsS handelt es sich um eine membranständige Histidin-Kinase mit zwei Transmembrandomänen, die Sensordomäne ragt ins Periplasma und die Kinasedomäne ins Cytoplasma. Die Vermutung liegt nahe, dass die Säurewahrnehmung über die periplasmatische Sensordomäne erfolgt. Interessanterweise sind in der periplasmatischen Sensordomäne von ArsS sieben Histidinreste vorhanden, die in orthologen Kinasen aus den mit *H. pylori* nahe verwandten Arten *W. succinogenes*, *H. hepaticus* und *C. jejuni* nicht konserviert sind, tatsächlich befinden sich in den periplasmatischen Domänen der orthologen Kinasen nur jeweils 2 - 3 Histidinreste. Aufgrund des pK_a -Wertes von 6,1 wurde den Histidinresten der periplasmatischen Sensordomäne eine Funktion bei der Säurewahrnehmung der Histidin-Kinase ArsS durch Protonierung unter sauren pH-Bedingungen zugeschrieben. Die Analyse von AS-Austauschmutanten (*H. pylori* 26695/arsS-HXQ), in denen jeweils ein Histidinrest der periplasmatischen Sensordomäne durch die nicht protonierbare AS Glutamin

substituiert wurde, ergab, dass in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q unter sauren pH-Bedingungen eine deutlich verminderte Transkriptionsinduktion der säureregulierten ArsRS Target-Gene *hp0119*, *hp1432* und *ureA* beobachtet werden konnte als im WT. Es wurde postuliert, dass der Histidinrest H94 durch Protonierung eine wichtige Rolle bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS spielt. Auch in einer Mutante *H. pylori* 26695/ArsS-H94A, in welcher der Histidinrest H94 durch die nicht protonierbare AS Alanin substituiert wurde, war eine verminderte Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* zu beobachten.

Die Einführung der positiv geladenen AS Arginin an der Position H94 in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94R, die eine Protonierung des Histidinrestes H94 und somit die Säurewahrnehmung der periplasmatischen Sensordomäne der Kinase ArsS imitieren sollte, führte nicht zu einer verstärkten Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* unter neutralen pH-Bedingungen. Somit konnte kein direkter Nachweis erbracht werden, dass eine Protonierung des Histidinrestes H94 die Aktivierung der Histidin-Kinase ArsS vermittelt. Denkbar wäre deshalb auch, dass der Histidinrest H94 rein strukturell für die Säurewahrnehmung der Histidin-Kinase ArsS benötigt wird. Jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass evtl. der eingeführte Argininrest strukturell nicht optimal einem protonierten Histidinrest gleicht. Für den Harnstoff-Kanal UreI wurde z. B. postuliert, dass unter anderem der Histidinrest H193, der sich im periplasmatischen C-Terminus des Proteins befindet, durch Protonierung an der säureabhängigen Aktivierung des Kanals beteiligt ist. Die Substitution des Histidinrestes H193 durch die positiv geladenen AS Arginin oder Lysin führt zu unterschiedlichen Aktivitäten des Kanals. In beiden Fällen konnte unter neutralen pH-Bedingungen eine leichte Zunahme der Aktivität beobachtet werden, jedoch konnte unter sauren pH-Bedingungen nur eine wildtypische Aktivierung für das UreI Allel UreI-H193K und nicht für UreI-H193R beobachtet werden. Die positiv geladenen AS Lysin scheint somit hier den protonierten Histidinrest deutlich besser imitieren zu können als Arginin (Weeks et al., 2001).

Denkbar wäre auch, dass eine Protonierung des Histidinrestes H94 in der periplasmatischen Domäne der Kinase ArsS alleine nicht ausreichend ist für eine vollständige Aktivierung und noch weitere AS an der Säurewahrnehmung beteiligt sind. Für diese Annahme spricht, dass in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94Q und *H. pylori* 26695/arsS-H94A zwar eine deutliche Verminderung der Säurewahrnehmung durch die Kinasen ArsS-H94Q und ArsS-H94A im Vergleich zum WT beobachtet werden konnte, eine leichte säureabhängige Transkriptionsinduktion der ArsRS-Target-Gene *hp0119* und *hp1432* jedoch immer noch stattfand. Bei Abwesenheit der Kinase ArsS in der Deletionsmutante *H. pylori* 26695/ Δ ArsS konnte keine verstärkte Transkription dieser Gene bei pH 5 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten in der MA-Analyse, in welcher das Transkriptom der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q mit dem der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 bei pH 5 verglichen wurde, die meisten der differentiell transkribierten Genen zwar den bereits identifizierten Target-Genen des ArsRS Regulons (Pflock et al., 2006) zugeordnet werden, sie decken jedoch nur 15 der insgesamt 109 Target-Gene des ArsRS Regulons ab. Interessanterweise konnten in der MA-Analyse nur solche Gene als differentiell exprimiert beobachtet werden, deren Transkription durch den phosphorylierten RR ArsR~P stark induziert wird (Faktor 3,4 bis 16,7).

In den weiteren AS-Austauschmutanten *H. pylori* 26695/arsS-HXQ konnte keine Verminderung der säureabhängigen Transkriptionsinduktion der Gene *hp0119* und *hp1432* beobachtet werden. Auch in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94,XAA, in welchen zusätzlich zu dem Histidinrest H94 noch ein weiterer Histidinrest durch die nicht protonierbare AS Alanin substituiert wurde, konnte keine weitere Verminderung der säureabhängigen Transkription im Vergleich zur Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Histidinreste

keine direkte Funktion bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS haben. Überraschenderweise konnte in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA unter sauren pH-Bedingungen eine Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* vergleichbar zur Transkription in der Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 beobachtet werden, die deutlich stärker war als in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94Q und *H. pylori* 26695/arsS-H94A. Auch in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H44Q konnte bei pH 5 eine leicht stärkere Transkription dieser Gene als in der Kontrollmutante nachgewiesen werden. Durch die Analyse der Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA bei pH 7 konnte ein konstitutiv aktiver ArsS-Phänotyp ausgeschlossen werden. Eine säureabhängige Transkriptionsinduktion dieser Gene findet in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA statt. Es wurde postuliert, dass durch die Substitution des Histidinrestes H44 durch Alanin der pK_a -Wert von weiteren AS wie Glutamat oder Aspartat, die evtl. ebenfalls durch Protonierung einen Beitrag zur Säurewahrnehmung leisten könnten, beeinflusst wird. Eine Protonierung dieser AS bei relativ „hohem“ pH-Wert könnte auf diese Weise die H94A-Mutation kompensieren.

Anzumerken ist noch, dass auch in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,188AA bei pH 5 eine stärkere Transkription des Gens *hp1432* zu beobachten war als in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94Q und *H. pylori* 26695/arsS-H94A. Für die Transkription des Gens *hp0119* konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden. In der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94,44AA fiel ein unterschiedliches Transkriptionsprofil der beiden Gene bei pH 7 auf. Für das Gen *hp0119* konnte unter neutralen pH-Bedingungen keine Transkription nachgewiesen werden, für die Transkription des Gens *hp1432*, für welches unter neutralen pH-Bedingungen im WT eine Basistranskription stattfindet, konnte eine leichte Zunahme der Transkriptmenge gegenüber dem WT beobachtet werden. Unterschiede im Transkriptionsprofil der beiden ArsRS-Target-Gene *hp0119* und *hp1432* sowohl bei pH 5 als auch bei pH 7 konnten auch in weiteren AS-Austauschmutanten, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, festgestellt werden. Hervorzuheben ist, dass niemals eine Transkription des Gens *hp0119* bei neutralen pH-Bedingungen nachgewiesen wurde und Unterschiede im Transkriptionsprofil bei pH 5 meist dadurch entstehen, dass im Verhältnis mehr *hp1432*-spezifisches Transkript als *hp0119*-spezifisches Transkript gebildet wird. Es wird deshalb vermutet, dass die Transkription ausgehend von den Promotoren P_{hp0119} und P_{hp1432} unterschiedlich reguliert wird. Für den Promotor P_{hp0119} wurde eine direkte Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P experimentell bestätigt (Dietz et al., 2002), für den Promotor P_{hp1432} wurde ein solcher Nachweis bisher nicht erbracht. Jedoch ist im Promotorbereich des Gens *hp1432* eine Sequenz mit Ähnlichkeiten zur Bindestelle des phosphorylierten RR ArsR~P im Promotorbereich des Gens *hp0119* vorhanden (Forsyth et al., 2002; Pflock et al., 2004), so dass man davon ausgehen kann, dass auch hier eine direkte Interaktion zwischen Regulator und DNA stattfindet. Es wird angenommen, dass sich im Promotorbereich P_{hp1432} Bindestellen mit deutlich höherer Affinität für den RR ArsR befinden als im Promotorbereich P_{0119} , so dass eine Aktivierung des Promotors P_{hp1432} schon bei einer geringeren Konzentration an ArsR~P stattfindet als eine Aktivierung des Promotors P_{hp0119} . Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass die Transkription des Gens *hp1432*, nicht jedoch die Transkription des Gens *hp0119* auch durch die Überexpression des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N aktiviert werden kann (vgl. unten). Ein weiterer Unterschied in der Transkriptionsregulation der Gene *hp1432* und *hp0119* besteht darin, dass die Transkription von *hp1432* durch den Fe-Fur-Komplex reprimiert wird (Gancz et al., 2006) und durch den Ni-NikR-Komplex aktiviert wird (Contreras et al., 2003). Eine Regulation der Transkription von *hp0119* durch Fur oder NikR konnte in globalen Transkriptionsstudien bisher nicht nachgewiesen werden (Ernst et al., 2005a; Contreras et al., 2003). Auch die Transkription von Genen, deren Produkte an der Ausbildung der Säureresistenz beteiligt sind, wird neben dem ArsRS Zweikomponenten-System durch Fur oder NikR reguliert. Die Transkription des Gens *amiE* wird durch den

phosphorylierten RR ArsR~P aktiviert (Pflock et al., 2006) und durch den Regulator Fur reprimiert (van Vliet et al., 2003), die Transkription des Gens *ureA* wird sowohl durch den phosphorylierten RR ArsR~P (Pflock et al., 2005) als auch durch den Regulator NikR (Ernst et al., 2005c) aktiviert, die säureabhängige Transkriptionsinduktion ausgehend von dem Promotor P_{ureA} ist unabhängig von NikR. Für die Gene *amiE* und *ureA* konnte unter neutralen pH-Bedingungen eine Basistranskription bei pH 7 nachgewiesen werden (Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006), vergleichbar zur Transkription des Gens *hp1432*.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass neben den Histidinresten der periplasmatischen Domäne noch weitere AS an der Aktivierung der Kinase bei sauren pH-Bedingungen beteiligt sind, lieferten die Transkriptionsanalysen der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H(35-126)Q. Bereits bei neutralen pH-Bedingungen konnte eine Transkription des Gens *hp1432* vergleichbar zur Kontrollmutante *H. pylori* 26695/arsS-H0 bei pH 5 beobachtet werden. Die Kinase ArsS-H(35-126)Q ist dennoch in der Lage, Säure als einen Umweltreiz wahrzunehmen, da unter sauren pH-Bedingungen eine weitere Steigerung der Transkription des Gens *hp1432* zu beobachten war. Sowohl an der Säurewahrnehmung durch den Harnstoffkanal UreI als auch durch die Kinase PmrA sind neben Histidinresten auch negativ geladene AS an der Säurewahrnehmung beteiligt (Weeks et al., 2001; Perez und Groisman, 2007). Die AS Aspartat (D) und Glutamat (E) weisen in ihren Seitenketten einen pK_a -Wert von 3,9 bzw. 4,1 auf. Die freien AS Aspartat und Glutamat werden somit bei einem pH-Wert von 5, bei welchem die Analysen zur Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS durchgeführt wurden, nicht protoniert, jedoch ist bekannt, dass der pK_a -Wert der Seitenkette einer AS im Protein deutlich von dem pK_a -Wert der freien AS abweichen kann (Tanford und Roxby, 1972). Diese Veränderungen des pK_a -Wertes sind auf Wechselwirkungen mit anderen AS im Protein zurückzuführen. Es wurde z. B. postuliert, dass sich der pK_a -Wert der AS E88 in dem Protein TraM, welches am Transfer von F-Plasmiden beteiligt ist, durch die Faltung des Proteins bei 7,7 befindet. Eine Protonierung des AS-Restes E88 wird für die aktive Form des TraM Proteins benötigt (Lu et al., 2006).

Die Transkriptionsstudien der Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA und *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA liefern erste Indizien darauf, dass auch an der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS negativ geladene AS beteiligt sind. Da in keiner der Mutanten, in welchen zusätzlich zu dem Histidinrest H94 eine der negativ geladenen AS durch die neutrale AS Alanin substituiert wurde, eine weitere Verminderung der Säurewahrnehmung im Vergleich zur Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A erzielt werden konnte, kann ausgeschlossen werden, dass diese negativ geladenen AS durch potentielle WW mit protonierten Histidinresten (H35, H44, H90, H93, H118 oder H126) an der Säurewahrnehmung beteiligt sind. In den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94AD116A und *H. pylori* 26695/arsS-H94AE101 entsprach die Transkription des Gens *hp1432* der Transkription in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94A. Da die Einführung der zweiten AS-Mutation keinen weiteren Effekt auf die Säurewahrnehmung zu haben scheint, kann vermutet werden, dass die AS D116 und E101 keine Funktion bei der Säurewahrnehmung haben. In den restlichen Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA und *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA deuten die Transkriptionsanalysen daraufhin, dass die negativ geladenen AS D60, D66, D107, D124, E65, E75, E82 und E118 durch Protonierung an der Säurewahrnehmung beteiligt sein könnten. Durch die Substitution der negativ geladenen AS durch Alanin könnte eine Protonierung imitiert werden, die normalerweise erst bei einem pH-Wert von kleiner als pH 5 stattfinden sollte. Diese zweite Substitution könnte die Mutation H94A kompensieren. Die Ergebnisse von PE-Analysen zur Quantifizierung der Transkription des Gens *hp1432* bei pH 7 in den Mutanten *H. pylori* 26695/arsS-H94ADXA und *H. pylori* 26695/arsS-H94AEXA lassen jedoch vermuten, dass die Protonierung einer einzigen negativ geladenen AS nicht ausreichend für die Aktivierung der Histidin-Kinase ArsS ist. Deshalb wird ein Modell vorgeschlagen, in welchem die gleichzeitige Protonierung mehrerer Aspartat- und

Glutamatreste sowie die Protonierung des Histidinrestes H94 eine Voraussetzung für die vollständige, säureabhängige Aktivierung der Kinase ArsS ist. Es wird postuliert, dass neben dem Histidinrest H94 vor allem auch der Aspartatrest D124 einen großen Beitrag bei der Säurewahrnehmung leistet, da in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94AD124A bei neutralen pH-Bedingungen eine ca. viermal so starke Transkription des Gens *hp1432* nachgewiesen werden konnte wie in der Kontrollmutante.

Es wurde spekuliert, dass die Säurewahrnehmung der Histidin-Kinase ArsS über die periplasmatische Sensordomäne erfolgt. Für die Transkriptionsstudien der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID, in welcher der größte Teil der periplasmatischen Sensordomäne deletiert wurde, wurden reproduzierbar für verschiedene Klone inhomogene Ergebnisse erhalten. Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht nur je nach untersuchtem Klon sondern weisen auch eine deutliche Diskrepanz bezüglich der beiden untersuchten Target-Gene *hp0119* und *hp1432* auf. Im Falle des Gens *hp0119* konnte nur in einem der vier untersuchten Klone in Gegenwart von Säure eine leichte Zunahme der Transkription beobachtet werden, bei pH 7 fand keine Transkription des Gens *hp0119* statt. Im Falle des Gens *hp1432* konnte bei pH 5 für die untersuchten Klone eine Transkription nachgewiesen werden, die in zwei Klonen der Transkription der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H94Q bei pH 5 und in zwei Klonen der Transkription des WT *H. pylori* 26695 bei pH 5 entsprach. Jedoch handelte es sich hierbei nicht um eine säureabhängige Transkriptionsinduktion, da die gleiche Menge an *hp1432*-spezifischem Transkript in diesen Mutanten auch bei pH 7 nachgewiesen werden konnte. Die Deletion der periplasmatischen Sensordomäne könnte zu strukturellen Veränderungen der cytoplasmatischen Domäne führen, die in einem konstitutiv aktiven ArsS Phänotyp resultieren. Für die Transkription des Gens *hp1432* konnte für die Klone -3 und -4 der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID ein solcher Phänotyp beobachtet werden. Die beobachteten Unterschiede der ArsRS abhängigen Transkription der Gene *hp0119* und *hp1432* in den einzelnen Klonen der Mutante beruhen nicht auf einer Sekundärmutation im Bereich des verbleibenden periplasmatischen Loops oder auf Mutationen im Promotorbereich P_{hp0166} , von dem ausgehend die Transkription des *arsS-arsR- Δ ID-hp0163-hp0163* Operons reguliert wird. Es kann spekuliert werden, dass die beobachteten Unterschiede der Transkription evtl. auf der Einführung von Sekundärmutationen im Bereich der Promotoren P_{hp0119} und P_{hp1432} beruhen könnten. Auf diese Weise könnten die Bakterien eine unkontrollierte Expression der Gene *hp0119* und *hp1432*, die durch eine konstitutiv aktive Histidin-Kinase hervorgerufen würde, verhindern. Eine Sequenzierung der Promotorbereiche von ArsRS-Target-Genen in verschiedenen Klonen der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID könnte Klarheit bzgl. evtl. vorliegender Sekundärmutationen bringen. Jedoch konnten in der Mutante *H. pylori* 26695/arsS-H(1-7)Q, in welcher die Kinase ArsS konstitutiv aktiv ist und die Gene *hp0119* und *hp1432* auch bei pH 7 stark exprimiert werden, keine Hinweise darauf erhalten werden, dass eine solche Überproduktion einen Selektionsdruck erzeugt, der die Anhäufung von Sekundärmutationen im Bereich der Promotoren dieser Gene begünstigt. Aufgrund der inhomogenen Daten, die für die Transkriptionsanalysen verschiedener Klone der Mutante *H. pylori* 26695/arsS- Δ ID erhalten wurden, kann nicht definitiv bestätigt werden, dass die säureabhängige Aktivierung der Histidin-Kinase ArsS allein auf die Säurewahrnehmung durch die periplasmatische Sensordomäne zurückzuführen ist. Auch AS-Reste der TMDs oder der cytoplasmatischen Domäne könnten an der Säurewahrnehmung beteiligt sein. Denkbar ist auch, dass für eine vollständige Aktivierung der Kinase eine Interaktion der periplasmatischen Domäne mit einem weiteren periplasmatischen Sensorprotein benötigt wird. Eine ähnliche Interaktion konnte in *Agrobacterium tumefaciens* nachgewiesen werden. Das zuckergebundene periplasmatische Protein ChvE interagiert mit der periplasmatischen Sensordomäne der Histidin-Kinase VirA, woraufhin in Anwesenheit einer erhöhten Konzentration an Monosacchariden die Transkription der *vir* Gene durch den

RR VirG induziert wird (Shimoda et al., 1993; Doty et al., 1996). Ein Interaktionspartner der Histidin-Kinase ArsS wurde jedoch bisher nicht identifiziert.

Die Annotation von Genen erfolgt meist nicht über den direkten Nachweis der Funktion des betreffenden codierten Proteins sondern basiert in der Vielzahl der Fälle auf Sequenzhomologien zu Proteinen mit bekannter Funktion. In den mit *H. pylori* nahe verwandten Arten *H. hepaticus*, *W. succinogenes* und *C. jejuni* sind Orthologe zum ArsRS Zweikomponenten-System vorhanden (HH1607/HH1608; WS1818/WS1817 und CJ1262/CH1261) (Suerbaum et al., 2003; Baar et al., 2003; Parkhill et al., 2000). *In vitro* Phosphorylierungsstudien haben gezeigt, dass die Histidin-Kinasen und die Response-Regulatoren hinreichend ähnlich sind, um eine Kreuzphosphorylierung zwischen den orthologen Proteinen zu ermöglichen (Abb. 36 und 37). Es ist bekannt, dass die Interaktion zwischen einer Histidin-Kinase und dem korrespondierenden Response-Regulator zwischen der C-terminalen Transmitterdomäne der Histidin-Kinase und der Receiver-Domäne des Response-Regulators stattfindet. Durch die Kombination von Mutagenesestudien, strukturellen Analysen der Zweikomponenten-System-Proteine und bioinformatischen Methoden weiß man heute, dass die Spezifität der Interaktion zwischen Histidin-Kinase und Response-Regulator durch WW zwischen AS der beiden Proteine vermittelt wird, die sich auf der Oberfläche der Proteine befinden und in der Nähe der Phosphorylierungsstellen der Kinase bzw. der Phosphorylierungsstelle des Regulators lokalisiert sind. Für den OmpR-artigen Response-Regulator Spo0F aus *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass die meisten der AS-Reste, die an der Interaktion mit der Phosphotransferase Spo0B beteiligt sind (ähnelt strukturell der Phosphorylierungs- und Dimerisierungsdomäne der Histidin-Kinase HK853 von *Thermotoga maritima*) in der α -Helix 1 und den fünf β - α -Loops der Receiverdomäne des Response-Regulators, welche die Aspartatphosphorylierungsstelle umgeben, lokalisiert sind. AS, die die Spezifität der Interaktion zwischen der Histidin-Kinase und dem Response-Regulator vermitteln, sind in orthologen Proteinen häufig konserviert (reviewed in Laub und Goulian, 2007).

Durch AS-Alignment der Receiver-Domänen der ArsR Orthologen und des Response-Regulators OmpR aus *E. coli* konnten 16 AS identifiziert werden, die nur in den ArsR Orthologen konserviert sind. sechs dieser AS befinden sich innerhalb der fünf β - α -Loops (D47, T54, A80, R81, Y103 und D104, bezogen auf die AS-Sequenz von ArsR) und eine AS innerhalb der α -Helix 1 (A14, bezogen auf die AS-Sequenz von ArsR). Diese AS könnten an der spezifischen Interaktion zwischen den orthologen Histidin-Kinasen und Response-Regulatoren beteiligt sein.

Durch Expression der orthologen Kinasen im genetischen Hintergrund von *H. pylori* und die Transkriptionsanalyse von säureabhängigen Target-Genen des ArsRS Zweikomponenten-Systems in den Mutanten *H. pylori* G27/HH1607, *H. pylori* G27/WS1818 und *H. pylori* G27/CJ1262 sollte geklärt werden, ob die orthologen Histidin-Kinasen, die den geringsten Grad an Homologie in ihrer periplasmatischen Sensordomäne aufweisen, ebenfalls Säure als einen Umweltreiz wahrnehmen können. Eine Konstruktion der Mutanten im genetischen Hintergrund von *H. pylori* 26695 war nicht möglich. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass innerhalb der ORFs *hh1607*, *ws1818* und *cj1262*, die in den Kinaseaustauschmutanten das Gen *hp0165* substituieren, Schnittstellen für das Restriktionsenzym *HpyAV* vorhanden sind. Dieses Enzym erkennt die Sequenzen CCTTC (schneidet 11 bp stromabwärts) und GAAGG (schneidet 5 bp stromaufwärts) (HUSAR: unpublished data). Vier dieser Erkennungssequenzen liegen im ORF *ws1818*, zwei im ORF *hh1607* und eine im ORF *cj1262*. Die für *H. pylori* 26695 angegebene Schnittstelle innerhalb des *arsS*-Allels liegt zufälligerweise genau in dem Bereich, in dem in der veröffentlichten Genomsequenz ein Sequenzierungsfehler vorliegt, so dass tatsächlich keine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *HpyAV* innerhalb des *arsS*-Gens in *H. pylori*

26695 vorhanden ist. *H. pylori* 26695 exprimiert eine funktionsfähige HpyAV Restriktionsendonuklease (Lin et al., 2001), die durch das Gen *hp0053* codiert wird. Auch die betreffende Methyltransferase, die den Stamm vor dem Verdau der endogenen DNA schützt, wird exprimiert (codiert durch das Gen *hp0054*). In den in *E. coli* konstruierten und vermehrten Plasmiden pSL-WS1818, pSL-HH1607 und pSL-CJ1262 sind die vorhandenen Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym HpyAV nicht durch Methylierung geschützt, nach der Transformation wird das aufgenommenen Plasmid innerhalb der Gene *ws1818*, *cj1262* und *hh1607* geschnitten und somit die Konstruktion der gewünschten Mutanten im genetischen Hintergrund von *H. pylori* 26695 verhindert. Es wurde bereits beschrieben, dass die Expression von Restriktions-Modifikationssystemen in *H. pylori* eine Barriere bei der Aufnahme von Plasmiden darstellen kann (Ando et al., 2000). Die Kinaseaustauschmutanten konnten jedoch im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27 konstruiert werden. Bei vielen Genen, die für R-M-Systeme codieren handelt es sich um stammspezifische Gene in *H. pylori* (Akopyants et al., 1998a; Doig et al., 1999; Salama et al., 2000; Lin et al., 2004). Somit unterscheidet sich das Expressionsmuster an funktionsfähigen R-M-Systemen von Stamm zu Stamm. Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, dass nicht jede Sequenz mit Homologie zu Genen für Bestandteile von R-M-Systemen für ein funktionsfähiges Protein codiert (Vitkute et al., 2001; Lin et al., 2001; Xu et al., 2000; Vale und Vitor, 2007). In *H. pylori* G27 wird vermutlich keine funktionsfähige HpyAV-Restriktionsendonuklease exprimiert, da die zu *hp0053* homologe Sequenz in zwei ORFs (*hpG27_48*, codiert für die AS 1-305 des HpyAV Enzyms, Protein Identität zu *H. pylori* 26695: 96,7% und *hpG27_47*, codiert für die AS 332-419 des HpyAV Enzyms, Proteine Identität zu *H. pylori* 26695: 90,9%) gesplittet ist. Eine entsprechende Methyltransferase ist in *H. pylori* G27 nicht annotiert, jedoch befindet sich stromaufwärts des Gens *hpG27_48* eine Sequenz mit 97 % Übereinstimmung zur Sequenz des Gens *hp0054* aus *H. pylori* 26695. Auch hier konnte jedoch eine Unterbrechung des Leserahmens festgestellt werden, so dass man davon ausgehen kann, dass *H. pylori* G27 im Gegensatz zu *H. pylori* 26695 kein funktionsfähiges HpyAV-R-M-System exprimiert. Somit kommt es nach der Transformation von *H. pylori* G27 nicht zur Spaltung der Plasmide und über homologe Rekombination entstehen die gewünschten Mutanten *H. pylori* G27/WS1818, G27/HH1607 und G27/CJ1262.

Entgegen den Erwartungen, dass es sich bei der Säurewahrnehmung durch die Histidin-Kinase ArsS in *H. pylori* um eine spezifische Anpassung des Keims an seine sehr saure ökologische Nische, den menschlichen Magen, handelt, ergaben die Transkriptionsanalysen der Kinaseaustauschmutanten, dass die Kinase WS1818 aus *W. succinogenes* ebenfalls Säure als einen Umweltreiz wahrnehmen kann. Auch die Kinase HH1607 aus *H. hepaticus* kann Säure als Umweltreiz wahrnehmen, jedoch deutlich weniger effektiv als die Kinasen ArsS und WS1818. Die Kinase CJ1262 aus *C. jejuni* hingegen zeigt keine verstärkte Aktivität in Gegenwart von Säure. In *H. pylori* aktiviert das ArsRS Zweikomponenten-System bei saurem pH-Wert unter anderem die Transkription der Gene, deren Produkte die Säureresistenz vermitteln. Interessanterweise findet man in den Arten *H. hepaticus*, *W. succinogenes* und *C. jejuni* keine homologen Gene, die für die aliphatische Amidase AmiE oder die Formamidase AmiF codieren. Gene mit Ähnlichkeiten zu dem Urease-Gencluster *ureABIEFGH* und mit Ähnlichkeit zu dem Gen *hp1186*, welches für die α -Carbonat-Anhydrase codiert, sind nur in *H. hepaticus* vorhanden, jedoch nicht in *C. jejuni* und *W. succinogenes*. *H. hepaticus* kolonisiert den Darm von Mäusen und kann von dort in die Leber einwandern (Fox et al., 1994). Um in den Darm zu gelangen, muss der Keim jedoch zunächst das saure Magenlumen durchqueren. Denkbar wäre, dass unter diesen Bedingungen die Kinase HH1607 aktiviert wird und an der Ausbildung der Säureresistenz beteiligt ist. Eine Aktivierung der Transkription des Urease-Genclusters unter sauren pH-Bedingungen durch das HH1607/HH1608 Zweikomponenten-System vergleichbar zum Mechanismus der Säureresistenz in *H. pylori* (Pflock et al., 2005) ist in *H. hepaticus* unwahrscheinlich, da

gezeigt wurde, dass die Aktivität der Urease in *H. hepaticus* unabhängig vom pH-Wert ist. Unter sauren pH-Bedingungen konnte keine verstärkte Transkription des Urease-Genclusters beobachtet werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Urease in *H. hepaticus* mit steigender Konzentration an Ni^{2+} zunimmt (Belzer et al., 2005).

C. jejuni besiedelt als harmloses Bakterium den Darmtrakt von Geflügel und Rindern, im Menschen jedoch löst *C. jejuni* nach der Aufnahme über kontaminierte Nahrungsmittel schwere, zum Teil blutige Durchfallerkrankungen aus. Wie *H. hepaticus* muss auch *C. jejuni*, um an seinen Kolonisierungsort, den Darm zu gelangen, das saure Lumen des Magens durchqueren. Die Kinase CJ1262 aus *C. jejuni* zeigte keine gesteigerte Aktivität in Gegenwart von einem sauren Medium, so dass davon ausgegangen werden muss, dass sie nicht Säure sondern einen anderen Umweltreiz wahrnimmt. Die bekannten Gene der Säureresistenz aus *H. pylori* sind in *C. jejuni* nicht vorhanden, so dass postuliert werden kann, dass die Säureresistenz in *C. jejuni* durch andere Mechanismen als in *H. pylori* vermittelt wird. Viele neutralophile pathogene Bakterien, die den Darm von Säugetieren kolonisieren, wie z. B. *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* und pathogene Stämme von *E. coli* können den Magen unbeschadet durchqueren. Sie können sich in dem sauren Milieu nicht vermehren, jedoch haben sie Säureresistenzmechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, ihr Cytoplasma bei einem pH-Wert von 5 zu halten, was ihnen ein Überleben ermöglicht (Foster et al., 1991; Merrell und Camilli, 1999). Bekannte Säureresistenzmechanismen dieser Bakterien sind die Nutzung der F_1F_0 -ATP-Synthase/ATPase zum Export von Protonen unter ATP-Verbrauch (Suzuki et al., 2003), die Expression von Aminosäure-Decarboxylasen, mit deren Hilfe Protonen des Cytoplasmas bei der Decarboxylierung von AS an das entstehende Produkt gebunden werden, welches anschließend über einen Substrat/Produkt-Antiporter aus der Zelle exportiert wird (Foster, 2004; Iyer et al., 2003, Merrell und Camilli, 1999) und Veränderungen der Permeabilität der äußeren Membran. In einer globalen Transkriptionsstudie, die für *C. jejuni* bei pH 4,5 durchgeführt wurde, konnten jedoch keine Hinweise darauf erhalten werden, dass diese typischen Säureresistenzmechanismen neutralophiler Bakterien in *C. jejuni* ebenfalls zum Tragen kommen (Reid et al., 2008). In Gegenwart von Säure wird in *C. jejuni* eine verminderte Transkription von Genen, die für ribosomale Proteine codieren, und eine verstärkte Transkription von Genen, deren Produkte an der allgemeinen Stressantwort beteiligt sind, beobachtet. Weiterhin wurden Hinweise darauf erhalten, dass sich die Zusammensetzung der Zellhülle verändert und es wurde auch eine differentielle Expression von Genen beschrieben, deren Produkte am bakteriellen Metabolismus und der Energiegewinnung beteiligt sind. Als Säureresistenzmechanismus wurde ein Export von Protonen über einen C_4 -Dicarboxylat/ H^+ Symporter postuliert.

W. succinogenes besiedelt den Pansen von Rindern (Wolin et al., 1961). Da *W. succinogenes* jedoch ein deutlich größeres Genom als die nahe verwandten Arten *H. pylori*, *H. hepaticus* und *C. jejuni* besitzt, welches für ca. 25 % mehr ORFs codiert und da in seinem Genom eine hohe Anzahl von Zweikomponentensystem-Proteinen codiert wird (27 HK, 13 hybride HK und 38 RR), wird spekuliert, dass *W. succinogenes* nicht auf den Pansen als ökologische Nische beschränkt ist (Baar et al., 2003). Im Pansen werden mit der Nahrung des Wiederkäuers aufgenommene Strukturkohlenhydrate wie Cellulose von der mikrobiellen Pansen-Flora abgebaut und zu Produkten wie z. B. Propionsäure, Buttersäure oder Essigsäure fermentiert. Es kann durch die Entstehung dieser Produkte der pH-Wert des Pansens abgesenkt werden, so dass der physiologische pH-Wert des Pansens je nach Verdauungsstadium in einem Bereich von pH 5,5 bis pH 7 liegt. Somit ist *W. succinogenes* im Pansen pH-Schwankungen ausgesetzt. Die Kinase WS1818 aus *W. succinogenes* kann Säure als einen Umweltreiz wahrnehmen. Denkbar ist deshalb, dass das WS1818/WS1817 Zweikomponenten-System auch in *W. succinogenes* an der Säurewahrnehmung und der Vermittlung der zellulären Säureantwort beteiligt ist. Untersuchungen zur differentiellen

Genexpression unter sauren pH-Bedingungen in *W. succinogenes* wurden bisher noch nicht durchgeführt. Es kann jedoch vermutet werden, dass die in *W. succinogenes* ausgebildeten Säureresistenzmechanismen von denen in *H. pylori* abweichen, da ein Urease-Gencluster sowie die Gene, die für die Amidasen oder die α -Carbonat-Anhydrase codieren, in *W. succinogenes* nicht vorhanden sind. Interessanterweise befindet sich an der AS-Position 92 der Kinase WS1818 ein Histidinrest, der sich somit im Protein vermutlich an ähnlicher Position befindet wie der Histidinrest H94 aus ArsS. Ob dieser Histidinrest H92 eine Funktion bei der Säurewahrnehmung durch die HK WS1818 entsprechend dem Histidinrest H94 in der Kinase ArsS ausübt ist unklar, da Transkriptionsanalysen der Mutante *H. pylori* G27/WS1818-H92Q bisher zu keinem eindeutigen Ergebnis führten.

Nach der Wahrnehmung von Säure als Umweltreiz wird die Histidin-Kinase ArsS aktiviert, es kommt zur Phosphorylierung in der Transmitterdomäne. Der Phosphatrest wird über einen Phosphotransfer auf den konservierten phosphatakzeptierenden Aspartatrest D52 in der Receiverdomäne des RR ArsR übertragen. Der phosphorylierte RR ArsR aktiviert oder reprimiert dann die säureabhängige Transkription von ArsRS Target-Genen (Pflock et al., 2004; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006). Unter den identifizierten Target-Genen befindet sich neben dem Gen *arsR* kein weiteres Gen, welches für ein regulatorisches Protein codiert, so dass man davon ausgehen kann, dass die beobachtete Transkriptionsregulation durch direkte Bindung des phosphorylierten RR an die Promotorbereiche der entsprechenden Gene hervorgerufen wird. Über DNaseI-Footprint Experimente konnte in den Promotorbereichen der Gene *hp0119*, *hp1408*, *ureA*, *ureI*, *amiE*, *amiF*, *hp1186* und *hp0866* Bindestellen des phosphorylierten RR ArsR~P bestimmt werden (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006; Wen et al., 2006). Interessanterweise können zwischen einzelnen Binderegionen starke Sequenzähnlichkeiten beobachtet werden (Abb. 75).

```

BS hp0866:      TAGGTTAAAATTCATTAAAATAATCATAATGATTAAAGA-TTTTAACCACT
BS hp1186:      -TTGTTACCATATAAAACAGAAATTAAAATCATTTCCAACTTTTAACCAAT

BS amiE:       ATAATCATAATGATTAAAAGTTTCATATTCATTATAAAATCCGTTTACACAATTATT
BS amiF:       AAAAATCICGCATTACTCTAAATTAGTTTTCTTACAA

BS hp1408:     AAACGCATCATTAAACCAATTGATTGAA
BS hp0119:     AAACCAATCGTTTAAATAGCGATTAAA

BS ureA1:      TTCTAAAGGGGTATTAAACGCACTTC-TAATAACG
BS ureA2:      TAATTCATTTAAATAATAATTAGTTAATGAAACCCCTTCGTAAATCTTAGTAAATCA

BS ureA2:      TAATTCATTTAAATAATAATAATTAGTTAATGAAACCCCTTCGTAAATCTTAGTAAATCA
BS rocF:      GAAATGTTCATTTAATTATCCATTGCTTATT-AAATAATGGTIGTTAATTTTGSTTTAGAAT

```

Abb. 75: Alignment bekannter Bindestellen des phosphorylierten RR ArsR~P. BS: Bindestelle im Promotorbereich des entsprechenden Gens. Eine gewisse Ähnlichkeit weisen die Bindestellen des phosphorylierten RR ArsR~P im Promotorbereich der Gene *hp0688/hp1186* (Wen et al., 2006), *amiE/amiF* (Pflock et al., 2006), *ureA1/ureA2* (Pflock et al., 2005), sowie *ureA2/rocF* (Pflock et al., 2005; 2006) auf. Gelb unterlegt sind identische Nukleotide. Dargestellt sind die hoch affinen Bindestellen, die in der entsprechenden Literatur (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006; Wen et al., 2006) beschrieben sind

Mittels bioinformatischer Methoden wurde basierend auf den experimentell bestimmten ArsR~P Bindestellen im Promotorbereich der Gene *ureA*, *ureI*, *amiE*, *amiF* und *hp1408* eine Konsensussequenz ermittelt. Diese Konsensussequenz umfasst 23 bp, von denen vier hoch konserviert sind (AN₉TN₃CN₇T). Im Promotorbereich vieler ArsRS-Target-Genen kann eine Sequenz gefunden werden, die in höchstens einer der konservierten Basen eine Abweichung zeigt. Für den Promotorbereich der Gene *hp1022* und *hp1104*, deren Transkription unter sauren pH-Bedingungen durch den phosphorylierten RR ArsR~P induziert wird (Pflock et al., 2006) konnte eine Bindung des RR ArsR~P an die postulierte Bindestelle über DNaseI-Footprint Experimente bestätigt werden. Die identifizierten Bindestellen sind vereinbar mit

der in den PE-Analysen beobachteten Transkriptionsregulation. Der phosphorylierte RR ArsR~P bindet im Promotorbereich des Gens *hp1104* stromaufwärts der beiden putativen -10 Boxen (Vgl. Abb. 49) und kann somit bei sauren pH-Bedingungen die Transkription aktivieren. Die Transkriptionsregulation des Gens *hp1022* erfolgt durch einen komplizierteren Mechanismus ausgehend von fünf differentiellen Transkriptionsstartpunkten (TSP₁-TSP₅, vgl. Abb. 47). Ausgehend von dem TSP₁ findet die Transkription bei pH 7 statt, bei pH 5 bindet der phosphorylierte RR ArsR~P an die stromabwärts gelegene Bindestelle und verhindert die Transkription. Der TSP₂ ist nur aktiviert, wenn die Kinase ArsS deletiert ist, im WT findet weder bei pH 7 noch bei pH 5 eine Transkription statt. Dies liegt vermutlich daran, dass die Bindestelle des RR ArsR~P mit diesem Promotor überlappt. Es wird angenommen, dass auch bei neutralen pH-Bedingungen eine geringe Menge an phosphoryliertem RR ArsR~P in der Zelle vorliegt (Dietz et al., 2002; Forsyth et al., 2002). Diese Konzentration scheint ausreichend, um durch Interaktion mit der DNA im Bereich der Bindestelle die Transkription ausgehend von dem TSP₂ auch bei pH 7 zu verhindern. Ausgehend von den Transkriptionsstartpunkten TSP₃ und TSP₄ wird die Transkription bei pH 5 induziert. Der phosphorylierte RR ArsR~P bindet direkt stromaufwärts und wirkt als Aktivator. Interessanterweise konnte auch in der ArsS-Deletionsmutante bei pH 5 eine stärkere Transkription ausgehend von diesen beiden Promotoren beobachtet werden als im WT bei pH 7. Da unter sauren pH-Bedingungen in der ArsS Deletionsmutante mehr *arsR*-spezifische mRNA transkribiert wird als im WT bei sauren pH-Bedingungen (Pflock et al., 2006), kann man spekulieren, dass eine erhöhte Konzentration des nicht phosphorylierten RR ArsR, der mit niedriger Affinität an die Bindestelle des phosphorylierten RR ArsR~P binden kann, eine ausreichende Bindung an die DNA bewirkt und somit die Transkription stimulieren kann. Diese Annahme wird bestärkt durch die Tatsache, dass das Gen *hp1022* als potentiell Target-Gen des nicht phosphorylierten RR ArsS-D52N (vgl. Tab. 24) identifiziert wurde. Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre, dass neben dem RR ArsR~P noch weitere Regulatoren an der Transkription des Gens *hp1022* beteiligt sind, die bei sauren pH-Bedingungen die Transkription ausgehend von den TSP₃ und TSP₄ unabhängig vom phosphorylierten RR ArsR~P regulieren. Eine Transkriptionsregulation durch mehrere Regulatoren wurde bereits für das Gen *ureA* beschrieben, die Transkription des Promotors *P_{ureA}* wird sowohl durch den phosphorylierten RR ArsR~P als auch durch den Transkriptionsregulator NikR aktiviert (Pflock et al., 2005; van Vliet et al., 2002). Die Transkription von *hp1022* ausgehend von dem weiter stromabwärts gelegenen TSP₅ erfolgt unabhängig vom RR ArsR.

Die beiden identifizierten Bindestellen im Promotorbereich der Gene *hp1022* und *hp1104* weisen eine gewisse Ähnlichkeit zueinander sowie zur Bindestelle im Promotorbereich des Gens *hp0866* auf (vgl. Abb. 76).

```

BS hp1104:      CCAACAACCTA-TAAAATTAGTTAAACCTATAGAAACATAAG
BS hp1022:      ATTATTAAAATAACTTATTATTGCTATATATTACTATAATAGTTTA

BS hp0866:     TAAGTTAAAATTCATTAAAATAATCATAATGATT-AAAGATTTTAACCACT
BS hp1022:     ATTATTAAAATAA-CCTATTATTGCTATATATTACTATAATAGTTTA

BS hp1104:     CCAACAACCTATAAAAATTAGTTAAACCTATAGAAAACATAAG
BS hp0866:     TAAGTTAAAATTCATTAAAATAATCATAATGATTAAAGATTTTAACCACT

```

Abb. 76: Alignment der Bindestellen des phosphorylierten RR ArsR~P aus dem Promotorbereich der Gene *hp1104*, *hp1022* und *hp0866*. BS: Bindestelle im Promotorbereich des entsprechenden Gens. Die Bindestellen im Promotorbereich der Gene *hp1104*, *hp1022* (vgl. Abb. 48 und 49) und *hp0866* (Wen et al., 2006) weisen eine Ähnlichkeit auf. Gelb unterlegt sind identische Nukleotide.

Die bioinformatisch definierte Konsensussequenz mit nur vier hoch konservierten Nukleotiden (AN₉TN₃CN₇T) sollte entsprechend der Wahrscheinlichkeitsrechnung einmal

innerhalb von 256 bp auftreten und ist somit als alleinige Vorhersage bzgl. einer Bindestelle des phosphorylierten RR ArsR~P nicht geeignet. Jedoch korrelieren die identifizierten Bindestellen des phosphorylierten RR ArsR~P im Promotorbereich der Gene *hp1104* und *hp1022* mit der Konsensussequenz (vgl. Abb. 48 und 49). Somit stellt sie ein hilfreiches Werkzeug bei der Lokalisierung von Bindestellen im Promotorbereich von bereits identifizierten Target-Genen dar, kann jedoch den experimentellen Nachweis nicht ersetzen. Interessanterweise beinhalten die Bindemotive des RR ArsR~P keine direkten oder invertierten Sequenzwiederholungen, wie bereits für die Bindemotive mehrerer RR vom OmpR Typ beschrieben wurde (Forst et al., 1995; Schaaf und Bott, 2007; Sola-Landa et al., 2008). Es ist somit unklar, auf welche Weise die Bindung des phosphorylierten RR ArsR~P an die Zielsequenz der DNA stattfindet. Es konnte jedoch kürzlich, basierend auf der Röntgenkristallstruktur des RR, gezeigt werden, dass theoretisch eine Bindung des RR ArsR als Monomer oder Dimer an direkte oder invertierte Sequenzwiederholungen möglich ist (Gupta et al., 2008). Die Bindung erfolgt über ein „winged“ Helix-Turn-Helix-Motiv in der C-terminalen Outputdomäne des Regulators, in welcher viele positiv geladene AS lokalisiert sind, die eine Interaktion mit der DNA erlauben. Es wurde postuliert, dass eine Interaktion zwischen den AS K190, S191, V194 und R198 des Regulators und der großen Furche der DNA stattfindet. Die Methylgruppe des Valinrestes könnte WW mit der Methylgruppe von Thymidin ausbilden, eine Bindung an eine AT-reiche Bindestelle könnte somit bevorzugt werden. Anzumerken ist, dass tatsächlich alle bisher publizierten Bindestellen des RR ArsR sehr AT reich sind (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006; Wen et al., 2006).

Eine Besonderheit des ArsRS Zweikomponenten-Systems ist, dass es sich bei dem RR ArsR um ein essentielles Protein handelt. Während eine Deletion der Histidin-Kinase ArsS *in vitro* möglich ist, *in vivo* jedoch eine Kolonisierung verhindert (Panthel et al., 2003), ist eine Deletion des RR ArsR *in vitro* nicht möglich (Beier und Frank, 2000). Eine Phosphorylierung des RR ArsR ist für die essentielle Funktion des Regulators nicht nötig (Schär et al., 2005). Es wird deshalb postuliert, dass der RR ArsR in seiner nicht phosphorylierten Form an der Transkription von essentiellen Target-Genen beteiligt ist. Das säureabhängige Regulon des phosphorylierten RR ArsR~P ist gut charakterisiert (Pflock et al., 2006), jedoch wurden bisher keine Gene identifiziert, deren Transkription durch den nicht phosphorylierten RR ArsR reguliert wird.

In Prokaryoten sind bisher nur wenige essentielle Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen identifiziert, die größte Zahl der Zweikomponenten-Systeme wird für ein Wachstum unter stressfreien *in vitro*-Bedingungen vermutlich nicht benötigt (Kobayashi et al., 2001; Oshima et al., 2002). Das Bakterium *Caulobacter crescentus* weist bisher die höchste Anzahl an essentiellen Genen, die für Bestandteile von Zweikomponenten-Systemen codieren, auf. Dieser Keim verändert zwischen den Replikationszyklen seine Morphologie. Zunächst entsteht eine flagellierte Schwärmerzelle die sich verbreiten kann. Diese setzt sich ab und wird zur gestielten, nicht beweglichen Zelle, aus welcher durch binäre Teilung erneut eine Schwärmerzelle hervorgeht. Das essentielle CckA/CtrA Zweikomponenten-System (Jacobs et al., 1999; Quon et al., 1998) sowie der essentielle RR DivK (Wu et al., 1998) sind u. a. an der Regulation des komplizierten Mechanismus der Morphogenese, der DNA-Replikation und der Zellteilung beteiligt (Wortinger et al., 2000; Laub et al., 2002). Ein zu CtrA orthologer RR konnte auch in *Sinorhizobium meliloti* identifiziert werden (Barnett et al., 2001), dieses Bakterium durchläuft ebenfalls eine Morphogenese - vom freilebendem Bodenbakterium zum symbiontischen, stickstofffixierenden Bakteroid. Zwei weitere essentielle Zweikomponentensysteme wurden in *Caulobacter crescentus* identifiziert, cc2932/cc2932 und CenR/CenK (Skerker et al., 2005). Der RR cc2931 weist Homologien zu dem RR PetR aus *R. capsulatus* auf, der für die aerobe Atmung essentiell ist (Tokito und

Daldal), das CenR/CenK-Zweikomponenten-System reguliert die Transkription von Genen, deren Produkte an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind. Ebenfalls an der Regulation der Zellwandbiosynthese beteiligt sind das essentielle YycF/YycG Zweikomponenten-System aus *Bacillus subtilis* und die essentiellen orthologen Proteine aus Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* und *Listeria monocytogenes* (Fabret und Hoch, 1998; Fukuchi et al., 2000; Kallipolitis und Ingmer, 2001; Le Breton et al., 2003; Martin et al., 1999; Throup et al., 2000). In *Streptococcus pneumoniae* ist nur das Gen, welches für den RR YycF, nicht jedoch das Gen, welches für die HK YycG codiert, essentiell für die Zelle (Ng et al., 2005). Das YycF/YycG Zweikomponenten-System spielt eine Rolle bei der Mureinbiosynthese, der Zellteilung, der Integrität der Membran sowie der Exopolysaccharid Biosynthese und der Biofilmbildung (zusammengefasst in Winkler und Hoch, 2008). In *Mycobacterium tuberculosis* wird der essentielle RR MtrA exprimiert, der über die Regulation des Replikationsinitiationsfaktors DnaA an der Replikation der Zelle beteiligt ist (Fol et al., 2006).

Die Überexpression eines Regulatorproteins ist eine geeignete Möglichkeit, um Target-Gene des betreffenden Regulators zu identifizieren. Auf diese Weise konnten z. B. in *E. coli* neben Genen, deren Produkte an der „drug“-Resistenz beteiligt sind (Nishino und Yamaguchi, 2001; Hirakawa et al., 2003) weitere Target-Gene der Response-Regulatoren BaeR (Nishino et al., 2005) und EvgA (Nishino et al., 2003) bestimmt werden. Auch in *Bacillus subtilis* wurden durch Überexpression von Response-Regulatoren Target-Gene von Zweikomponenten-Systemen identifiziert (Ogura et al., 2001; Kobayashi et al., 2001). Eine Überexpression des wildtypischen RR ArsR scheint jedoch in *H. pylori* kein geeigneter Ansatz zu sein, um Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR zu identifizieren und von denen des phosphorylierten RR ArsR~P zu differenzieren, da die Überexpression des RR ArsR unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{cagA} in der Mutante *H. pylori* G27/ P_{cagA} 166 zu einer verstärkten Transkription der Target-Gene *hp0119*, *hp1432* und *hp1408* des phosphorylierten RR auch in Abwesenheit von Säure als Umweltreiz führt (Pflock et al., 2004). Es wurde postuliert, dass die Kinase ArsS auch in Abwesenheit von Säure eine gewisse (verminderte) Aktivität aufweist, so dass auch unter neutralen pH-Bedingungen ein Teil der RR ArsR in der phosphorylierten Form vorliegt. Die durch die Kinase vermittelte Gleichgewichtsreaktion $\text{ArsR} \leftrightarrow \text{ArsR}\sim\text{P}$ bewirkt bei Vorliegen einer erhöhten Konzentration des RR ArsR nach der Überexpression die Zunahme der absoluten Menge an phosphoryliertem RR ArsR~P in der Zelle, was wiederum zur Transkriptionsinduktion der ArsR~P Target-Gene *hp0119*, *hp1432* und *hp1408* führt. Um diesen Effekt zu verhindern, wurden potentielle Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR über einen Transkriptomvergleich der Mutanten *H. pylori* 26695/ P_{hp0166} -ArsR-D52N Δ und *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ mittels MA-Analysen identifiziert. In beiden Mutanten wird anstelle des wildtypischen RR ArsR ein modifizierter RR ArsR-D52N, der aufgrund der Substitution der Phosphorylierungsstelle D52 durch einen Glutaminrest nicht mehr phosphoryliert werden kann, exprimiert. In der Mutante *H. pylori* 26695/ P_{cagA} -ArsR-D52N Δ findet eine Überexpression des Regulator-Derivats ArsR-D52N ausgehend von dem konstitutiv aktiven Promotor P_{cagA} statt. Insgesamt wurden auf diese Weise 65 potentielle Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N identifiziert. Die Transkription von 47 Genen wurde durch die Überexpression des RR ArsR-D52N induziert und von 22 Genen reprimiert. Die Transkription von 32 dieser Gene, was immerhin ca. 50 % der identifizierten Target-Gene entspricht, wird ebenfalls durch den phosphorylierten RR ArsR~P reguliert (Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005; Pflock et al., 2006). Unter den Genen, deren Transkription potentiell sowohl durch den phosphorylierten als auch durch den nicht phosphorylierten RR ArsR reguliert wird, befinden sich unter anderem ORFs, deren Produkte

an der Säureresistenz beteiligt sind, wie die Gene des Urease-Genclusters *ureABIEFGH* sowie die Gene *amiE* und *amiF*, das Gen *hp1342*, welches für ein äußeres Membranprotein *Omp29* codiert, verschiedene ORFs, deren Produkten eine Rolle als Transport- oder Bindeprotein zugeordnet wird (*hp1427* (Histidinreiches Protein *hpn*), *hp1432* (*hpn*-ähnliches Protein) und *hp1174* (Glukose-Galaktose-Transporter)), sowie viele Gene, die für hypothetische Proteine codieren wie die Gene des bicistronischen Operons *hp0681-hp0682* und des homologen Operons *hp1288-hp1289*. Dieses Ergebnis war unerwartet, da zuvor in einer Mutante *H. pylori* G27/P_{cagA} 166Δ, in welcher eine Überexpression des RR ArsR stattfindet und in welcher gleichzeitig das Gen *arsS*, welches für die Histidin-Kinase ArsS codiert, deletiert ist, keine verstärkte Transkription der ArsRS-Target-Gene *hp0119* und *hp1432* nachgewiesen werden konnte (Pflock et al., 2004). Unter den in dieser Arbeit identifizierten Target-Genen des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N befindet sich das Gen *hp1432*, nicht jedoch das Gen *hp0119*. Zudem konnte in *in vitro* Bindestudien bisher keine Bindung des nicht phosphorylierten RR ArsR im Promotorbereich der Gene *ureAB*, *ureIEFGH*, *amiE* und *amiF* nachgewiesen werden (Pflock et al., 2005; 2006). Diese Gene wurden jedoch in den in dieser Arbeit durchgeführten MA-Analysen als Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N identifiziert. Unklar ist, ob die Transkription der in dieser Arbeit identifizierten Mitglieder des ArsR-D52N Regulons auch unter natürlichen Bedingungen durch den nicht phosphorylierten RR ArsR reguliert werden kann, oder ob der beobachtete Effekt ausschließlich auf die artifizielle Situation der Überexpression von ArsR zurückzuführen ist. Anzumerken ist, dass die Überexpression von Response-Regulatoren auch in Abwesenheit der Histidin-Kinasen in *Bacillus subtilis* die Transkription von Target-Genen der phosphorylierten RR beeinflusst (Kobayashi et al., 2001). Es wird spekuliert, dass in diesem Fall der nicht phosphorylierte RR mit geringerer Affinität als der phosphorylierte RR an die entsprechende Bindestelle im Promotorbereich der Target-Gene binden kann (Kobayashi et al., 2001). Da es sich auch bei der Bindung des Regulators an die DNA um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, bewirkt eine intrazelluläre Konzentrationserhöhung eine verstärkte Bindung des nicht phosphorylierten RR an die Promotorsequenzen der Target-Gene, was eine Aktivierung der entsprechenden Promotoren zur Folge hat.

In der Promotorregion der Operons *hp1408-hp1412*, *hp0681-hp0682* und *hp1288-hp1289* konnte bereits eine Bindung des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N nachgewiesen werden (Dietz et al., 2002; Wen et al., 2006). In Übereinstimmung mit der bereits oben beschriebenen These, dass der nicht phosphorylierte RR ArsR-D52N evtl. mit geringerer Affinität an die selben Bindestellen binden kann wie der phosphorylierte RR ArsR~P, konnte beobachtet werden, dass für die Bindung des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N an die Promotorregion P_{hp1408} eine deutlich höhere Konzentration des Regulators benötigt wird als für die Bindung durch den phosphorylierten RR ArsR~P (Dietz et al., 2002; Wen et al., 2006). Es könnte deshalb sein, dass es sich bei den Genen des Operons *hp1408-hp1412* sowie ihren homologen Genen *hp0427-hp0423* *in vivo* nicht um Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR handelt. Eine Bindung bei gleicher Konzentration des phosphorylierten als auch des nicht phosphorylierten RR ArsR konnte in den Promotorbereichen der Gene *hp0681-hp0682* und *hp1288-hp1289* nachgewiesen werden (Wen et al., 2006). Das Ergebnis dieser *in vitro* Bindestudie steht jedoch im Gegensatz zu Daten von Pflock et al. (2006), die zeigen, dass die Deletion der Histidin-Kinase ArsS eine Derepression der Transkription ausgehend von dem Promotor P_{hp0682} unabhängig vom pH-Wert bewirkt. Der nicht phosphorylierte RR ArsR kann der Derepression nicht entgegenwirken, weshalb angenommen werden muss, dass der nicht phosphorylierte RR ArsR nicht mit gleicher Affinität an die Promotorregion P_{hp0682} binden kann wie der phosphorylierte RR ArsR~P. Ob es sich bei den Genen *hp0681-hp0682* und *hp1288-hp1289* *in vivo* um Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR handelt, ist unklar. Denkbar ist auch, dass die Transkription von Genen, an deren Promotorregionen sowohl der phosphorylierte als auch der unphosphorylierte RR binden kann, durch eine

kooperative Bindung der beiden Formen des RR ArsR reguliert wird. Ein solches Phänomen wurde für den RR TorR aus *E. coli* beschrieben (Ansaldi et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde eine Gruppe von 33 Genen identifiziert, deren Transkription nur durch den nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N reguliert wird, jedoch ist anzumerken, dass eine direkte Bindung zwischen dem RR ArsR-D52N und den Promotorregionen der potentiellen Target-Gene noch nicht nachgewiesen wurde. Auffällig ist, dass die Transkription der meisten dieser Gene aufgrund ihrer im MA-Experiment ermittelten Ratio nur als schwach reguliert eingestuft werden kann. Ein Subset von Target-Genen, deren Transkription durch den nicht phosphorylierten RR reguliert wird, wurde auch für die RR AlgR und AlgB aus *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben. Diese beiden RR regulieren im nicht phosphorylierten Zustand die Transkription von Genen, die an der Alginat-Synthese beteiligt sind (Ma et al., 1998). Im phosphorylierten Zustand reguliert der RR AlgR, der durch die Histidin-Kinase FimS phosphoryliert wird, die Motilität der Bakterien (Whitchurch et al., 1996). Ein ähnliches Phänomen wurde auch bzgl. des DegU/DegS Zweikomponenten-System aus *Bacillus subtilis* beschrieben. Die Histidin-Kinase DegS phosphoryliert den RR DegU, der in seiner phosphorylierten Form DegU~P die Transkription von Genen induziert, die für degradative Enzyme (extrazelluläre Proteasen) codieren. Der nicht phosphorylierte RR DegU aktiviert die Expression von Kompetenzproteinen (Dahl et al., 1992; Hamoen et al., 2000; Msadek et al., 1990).

Basierend auf den Ergebnissen der MA-Analysen können theoretisch drei Klassen von potentiellen Target-Genen des ArsRS Zweikomponenten-Systems postuliert werden. In die erste Gruppe werden Gene eingruppiert, deren Transkription ausschließlich durch den phosphorylierten RR ArsR~P reguliert wird, in die zweite Gruppe Gene, deren Transkription sowohl durch den phosphorylierten als auch durch den nicht phosphorylierten RR ArsR moduliert wird und in die dritte Gruppe Gene, deren Transkription ausschließlich von dem nicht phosphorylierten RR abhängig ist (Abb. 77).

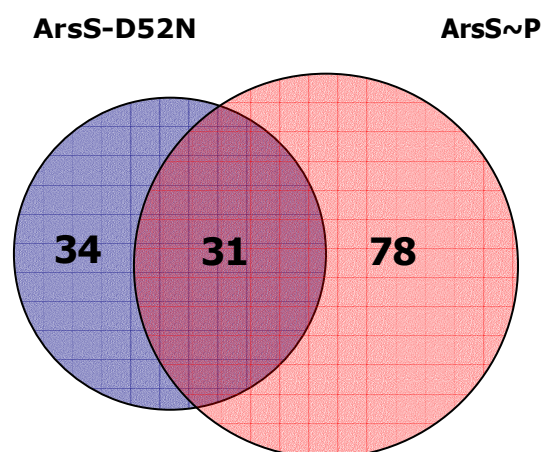


Abb. 77: Schematische Darstellung der drei verschiedenen Klassen von ArsR Target-Genen. Die Transkription von 109 Target-Genen wird säureabhängig durch den phosphorylierten RR ArsR~P reguliert (rot; Pflock et al., 2006), die Transkription von 65 Target-Genen wird durch den nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N reguliert (blau). Die Regulons des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N und des phosphorylierten RR überlappen zum Teil (lila, 31 Target-Gene), so dass die Transkription dieser Gene vermutlich durch den phosphorylierten und durch den nicht phosphorylierten RR reguliert wird.

Die Transkription von essentiellen Target-Genen des RR ArsR sollte durch den nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N reguliert werden, da eine Phosphorylierung des RR ArsR keine Voraussetzung für seine essentielle Funktion ist (Schär et al., 2005). Es wurde bereits

eine globale Studie durchgeführt, in welcher über Transposonintegration potentiell essentielle Target-Gene in *H. pylori* bestimmt wurden (Salama et al., 2004). Da in dieser Studie jedoch auch Transposonhits innerhalb der als essentiell beschriebenen Gene *hp0166* und *hp1043* (Beier und Frank, 2000; Schär et al., 2005) erhalten wurden, scheint ein Bezug auf diese Studie nur mit Einschränkungen sinnvoll. In dieser Arbeit wurden deshalb zunächst alle Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N als potentiell essentiell angesehen, die Teil des Core-Genoms von *H. pylori* sind (Gressmann et al., 2005). Jeder Stamm von *H. pylori* weist stammspezifische Gene auf, jedoch sollten essentielle Gene konserviert in jedem Stamm vorliegen. Unter den potentiell essentiellen Genen des RR ArsR-D52N befinden sich im Gegensatz zu den Target-Genen anderer essentieller Zweikomponenten-Systeme wie CckA/CtrA oder YycF/YycG, keine Gene, deren Produkte an der Zellteilung oder der Zellwandbiosynthese beteiligt sind. Die potentiell essentiellen Target-Gene des RR ArsR codieren vielmehr für Proteine, die an vielfältigen Funktionen des bakteriellen Metabolismus beteiligt sind sowie für hypothetische Proteine. Für einige der identifizierten Target-Gene findet man in der Literatur bereits Angaben bzgl. der essentiellen Funktion unter *in vitro* Kulturbedingungen, diese sind in der Tabelle 28 zusammengefasst. Als nicht essentiell wurden dabei Gene definiert, deren Deletion bereits in der Literatur beschrieben wurde.

Tab. 28: Abgleich potentiell essentieller Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N mit Angaben in der Literatur. Als nicht essentiell wurden solche Gene definiert, die in bereits konstruierten Mutanten *in vitro* deletiert werden konnten. * Gene, die nur bei Wachstum in einem nährstoffreichen Medium nicht essentiell sind. p. M.: persönliche Mitteilung.

essentielle Gene		
	ORF und Genfunktion	Literatur
ArsR-D52N reprimiert	HP0220: Synthese von [Fe-S]-Clustern, <i>nifS</i> HP0221: Gerüstprotein, <i>nifU</i>	Olson et al., 2000 Olson et al., 2000
nicht essentielle Gene		
	ORF und Genfunktion	Literatur
ArsR-D52N aktiviert	HP0067: Urease akzessorisches Protein, <i>ureH</i> HP0068: Urease akzessorisches Protein, <i>ureG</i> HP0069: Urease akzessorisches Protein, <i>ureG</i> HP0070: Urease akzessorisches Protein, <i>ureE</i> HP0071: Harnstoffkanal, <i>ureI</i> HP0072: Urease-Untereinheit B, <i>ureB</i> HP0073: Urease-Untereinheit A, <i>ureA</i> HP0165: Histidin-Kinase ArsS, <i>arsS</i> HP0380: Glutamat-Dehydrogenase, <i>gdhA</i> HP0691: 3-Oxoacetyl-CoA-Transferase UE A, <i>scoA</i> HP0692: 3-Oxoacetyl-CoA-Transferase UE B, <i>scoB</i> HP0693: potentieller Transporter für kurzkettige FS HP1050*: Homoserin-Kinase, <i>thrB</i> HP1077: Nickel-Transport-Protein, <i>nixA</i>	Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005 Beier und Frank, 2000 Thiele et al., 2005 Beier und Fritsch, p. M. Beier und Fritsch, p. M. Beier und Fritsch, p. M. Thiele et al., 2005 Thiele et al., 2005
ArsR-D52N reprimiert	HP0255*: Adenylsuccinat-Synthetase, <i>purA</i> HP0595: Dsb-ähnliches Protein HP1174: Glucose/Galactose Transporter	Thiele et al., 2005 Raczko et al., 2005 Psakis et al., 2009

Die einzigen bisher identifizierten essentiellen Gene, die Bestandteil des ArsR-D52N Regulons sind, sind die Gene *nifS* und *nifU* (Olson et al., 2000), deren Produkte an der Synthese von [Fe-S]-Clustern beteiligt sind (Yuvaniyama et al., 2000). [Fe-S]-Cluster werden für die volle Funktionsfähigkeit einiger Enzyme in *H. pylori* benötigt. Da jedoch die Transkription der Gene *nifS* und *nifU* durch den nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N reprimiert wird, kann man spekulieren, dass die Regulation dieser Gene durch den RR ArsR-D52N nicht zur essentiellen Funktion dieses RR beiträgt. Anzumerken ist, dass die Transkription dieser Gene ebenfalls durch den RR HP1021 (aktiviert) und durch den Transkriptionsregulator Fur (verstärkte Transkription in Gegenwart von Fe²⁺) reguliert wird

(Pflock et al., 2007a; Alamuri et al., 2006). Wahrscheinlicher ist, dass die Transkription von essentiellen Target-Genen des RR ArsR-D52N durch diesen aktiviert wird. Durch die Konstruktion von Deletionsmutanten der ArsR-D52N aktivierten Gene *hp0650*, *hp1582/hp1583*, *hp0891* und *hp1224* sollten Informationen über eine essentielle Funktion der durch diese Gene codierten Proteine erhalten werden. Eine essentielle Funktion des Gens *hp0650*, welches für ein hypothetisches Protein codiert, konnte ausgeschlossen werden. Eine Deletion des Gens *hp0891* war nur im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27, jedoch nicht im genetischen Hintergrund von *H. pylori* 26695 möglich. In beiden Stämmen ist jeweils nur eine Kopie des entsprechenden Gens vorhanden (Tomb et al., 1997; Baltrus et al., 2009), jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass evtl. ein weiteres Gen in *H. pylori* G27 für ein Protein codiert, welches die Funktion der potentiellen Acyl-CoenzymA-Thioesterase (HP0891) übernehmen kann. Eine Deletion der Gene *hp1224* und *hp1582/hp1583* ist weder in dem Stamm *H. pylori* G27 noch in dem Stamm *H. pylori* 26695 möglich, was darauf hindeutet, dass es sich bei den betreffenden Genen tatsächlich um essentielle Target-Gene des RR ArsR-D52N handeln könnte. Der ORF *hp1224* (*hemD*) codiert für die Uroporphyrinogen-III-Cosynthase, welche die Hydrolyse von Hydroxymethylbilan zu Uroporphyrinogen III katalysiert (Jordan und Seehra, 1979; Jordan und Berry, 1980) und somit eine wichtige Rolle bei der Häm-Synthese der Bakterien spielt. Häm wird in *H. pylori* z. B. als prosthetische Gruppe des Enzyms Katalase benötigt (Loewen et al., 2004), Protohäm ist ein Bestandteil der Cytochromc-Oxidase des Typ *cbb3* (Nagata et al., 1996). Von diesem Syntheseweg zweigt zudem der Syntheseweg für Vitamin B₁₂ ab (KEGG). In *H. pylori* findet jedoch vermutlich keine Vitamin B₁₂-Synthese statt, da homologe zu den *cob*-Genen, deren Produkte an der weiteren Vitamin B₁₂-Synthese beteiligt sind, fehlen.

Die Gene *hp1582/hp1583* codieren für die Enzyme PdxA und PdxJ. PdxA und PdxJ katalysieren in *E. coli* die intramolekulare Kondensation der Vorläufermoleküle 1-Desoxy-D-Xylose-5'-Phosphat, einer modifizierten Pentose, und der nicht proteinogenen Aminosäure 4(Phosphohydroxy)-L-Threonin, es entsteht Pyridoxin-5'-Phosphat (PNP). PNP wird in einem weiteren Schritt durch die Oxidase PdxH zu dem katalytisch aktiven Coenzym Pyridoxal-5'-Phosphat umgewandelt. Diese Pyridoxamin 5'-Phosphat-Oxidase fehlt in *H. pylori* und in anderen *Helicobacter* Arten sowie in den nahe verwandten Arten *W. succinogenes* und *C. jejuni*, der Pyridoxalphosphat Biosyntheseweg ist nicht vollständig. Pyridoxal-5'-Phosphat ist das zentrale Vitamin des Aminosäurestoffwechsels und kann zusammen mit den verschiedensten Apoenzymen Reaktionen wie Transaminierungen, Decarboxylierungen, Deaminierungen und Aldospaltungen katalysieren (Laber et al., 1999). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass PdxJ den letzten Syntheseschritt zum Pyridoxalphosphat katalysieren kann oder dass ein nicht annotiertes alternatives Enzym dafür in *H. pylori* existiert. Die Synthese von Pyridoxal-5'-Phosphat kann auch über einen alternative Biosynthesewege ausgehend von Glutamin und einem Pentose- oder Triose-Zucker stattfinden (Fitzpatrick et al., 2007), die entsprechenden Gene sind jedoch in *H. pylori* nicht annotiert.

Um die These zu verifizieren, dass es sich bei den Genen *hp1224* und *hp1582/hp1583* tatsächlich um essentielle Target-Gene des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N handelt, müssten Mutanten konstruiert werden, in welchen zunächst eine zweite Kopie des entsprechenden Gens in das bakterielle Chromosom integriert wird, bevor eine Deletion am wildtypischen Locus erfolgreich durchgeführt wird.

Interessanterweise überlappen die identifizierten Regulons des phosphorylierten RR ArsR~P und des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N nicht nur teilweise untereinander sondern auch mit dem Regulon des „orphan“ RR HP1021 (vgl. Abb. 78).

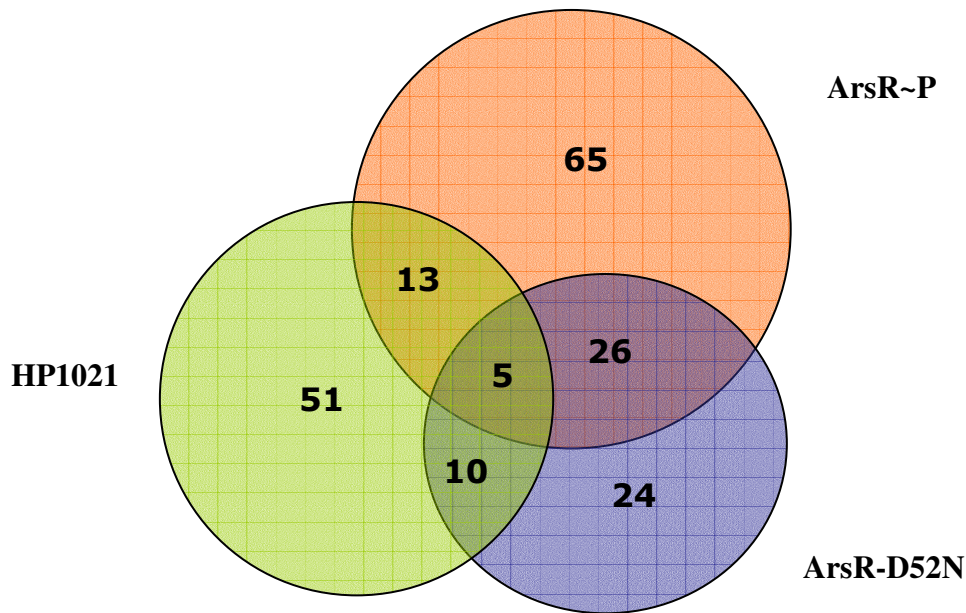


Abb. 78: Schematische Darstellung der überlappenden Regulons des phosphorylierten RR ArsR~P (rot; Dietz et al., 2002; Pflock et al., 2005), des nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N (blau) sowie des „orphan“ RR HP1021 (grün; Pflock et al., 2007b). Die Transkription von 109 Target-Genen wird säureabhängig durch den phosphorylierten RR ArsR~P reguliert (rot; Pflock et al., 2006), die Transkription von 65 Target-Genen wird durch den nicht phosphorylierten RR ArsR-D52N reguliert (blau) und die Transkription von 79 Genen wird durch den RR HP1021 moduliert (grün).

In *H. pylori* wurde bereits für mehrere Gene, darunter auch die Gene des Urease-Genclusters, die Gene *amiE*, *amiF* und *hp1432*, eine Transkriptionsregulation durch mehrere Regulatoren beschrieben (Contreras et al., 2003; Davies et al., 2002; Gancz et al., 2006; Pflock et al., 2005; 2006; van Vliet et al., 2002; 2003; 2004a und b). Man kann spekulieren, dass *H. pylori* durch die kombinierte Regulation durch mehrere Transkriptionsregulatoren sein beschränktes regulatorisches Repertoire kompensieren und sich auf diese Weise optimal an verschiedene Umweltbedingungen anpassen kann.

Neben dem ArsRS Zweikomponenten-System wurde auch dem CrdRS(HP1365/HP1364)-Zweikomponenten-System aus *H. pylori* eine Rolle bei der Säurewahrnehmung und der Vermittlung der Säureresistenz zugeordnet (Loh und Cover, 2006). Das HP1364/HP1365-Zweikomponenten-System aktiviert in Gegenwart von Kupfer die Transkription der Gene, die für die Kupfer-Resistenz-Determinanten CrdAB-CzcAB codieren, weshalb es auch als Copper resistant determinant Regulatory System bezeichnet wird (Waidner et al., 2005). In der Arbeit von Loh und Cover wurde das Transkriptionsprofil von ArsS- und CrdS-Deletionsmutanten bei pH 5 verglichen mit dem Transkriptionsprofil des WT *H. pylori* J99. Interessanterweise wiesen die säureabhängigen Regulons der phosphorylierten RR ArsR~P und CrdR~P starke Übereinstimmungen auf. Dies deutet darauf hin, dass die Transkription der Target-Gene in *H. pylori* J99 kooperativ durch die beiden RR ArsR~P und CrdR~P reguliert wird. Weiterhin denkbar wäre auch, dass das CrdRS Zweikomponenten-System einen Einfluss auf die Expression des ArsRS Zweikomponenten-Systems hat. Eine solche Abhängigkeit der Expression konnte jedoch in *H. pylori* G27 ausgeschlossen werden, die Expression des RR ArsR ist unabhängig vom Vorhandensein der Histidin-Kinase CrdS (Pflock et al., 2007b). Überraschenderweise konnte nur eine geringe Übereinstimmung des Regulons des phosphorylierten RR ArsR~P in *H. pylori* J99 (Loh und Cover, 2006) und *H. pylori* G27 (Pflock et al., 2006) beobachtet werden. Von 68 Target-Genen des RR ArsR~P in

H. pylori J99 stimmen nur 8 mit den 109 identifizierten Target-Genen des ArsR~P Regulons in *H. pylori* G27 überein. Von diesen 8 Genen befindet sich die Transkription der Gene *amiE*, *amiF*, *ureAB* und *hp0229* in *H. pylori* J99 auch unter der Kontrolle des CrdRS Zweikomponenten-Systems. Die Transkription der Gene *amiE*, *amiF* und *ureA* ist in den Stämmen *H. pylori* 26695 und *H. pylori* G27 unabhängig vom CrdRS Zweikomponenten-System (Pflock et al., 2007b). Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass der phosphorylierte RR ArsR~P direkt an die Promotorsequenzen der Gene *ureA*, *amiE* und *amiF* binden kann (Pflock et al., 2005; 2006) und auf diese Weise als Aktivator der Transkription fungiert, wohingegen bisher kein experimenteller Nachweis einer Bindung des RR CrdR~P an diese Promotoren erbracht wurde. Es befinden sich stromaufwärts der Gene *ureA*, *amiE* und *amiF* auch keine Sequenzen, die Übereinstimmungen mit dem postulierten Bindemotiv des phosphorylierten RR CrdR~R (Waidner et al., 2005) aufweisen. Die beobachteten Unterschiede der Transkriptionsregulation der Ammoniak produzierenden Enzyme AmiE, AmiF und Urease durch das CrdRS Zweikomponenten-System deuten darauf hin, dass stammspezifische Unterschiede der Genregulation vorliegen. Die molekularen Mechanismen der differentiellen Regulation sind bisher noch unklar. Interessanterweise zeigen die Stämme *H. pylori* 26695 und *H. pylori* J99 ein unterschiedliches Verhalten bei Wachstum in saurem Medium *in vitro*. Während *H. pylori* J99 bei pH 5 genau so gut wachsen kann wie bei pH 7 (Loh und Cover, 2006), konnte für *H. pylori* 26695 ein deutlich vermindertes Wachstum bei saurem pH-Wert beobachtet werden (Bury-Moné et al., 2004). Stammspezifische Unterschiede der Transkription bei sauren pH-Bedingungen sind bereits beschrieben. In drei verschiedenen globalen Transkriptionsstudien die zur Analyse der Säureantwort in verschiedenen Stämmen von *H. pylori* durchgeführt wurden (*H. pylori* 26695: Bury-Moné et al., 2004; Wen et al., 2003; *H. pylori* G27: Merrell et al., 2003b) wurden insgesamt 429 Gene als differentiell exprimiert beschrieben. In jeder Studie wurden zwischen 109 und 279 Gene identifiziert, deren Transkription durch den sauren pH-Wert beeinflusst ist, die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der anderen Studien war jeweils gering. Unabhängig von den eingesetzten Stämmen könnten die beobachteten Unterschiede auch auf unterschiedliche experimentelle Bedingungen zurückzuführen sein. Kürzlich wurde auch eine Funktion der Histidin-Kinase HP0244, unabhängig vom RR HP0703, bei der Ausbildung der Säureresistenzmechanismen in *H. pylori* 26695 ab einem pH-Wert von kleiner als 4,5 postuliert (Wen et al., 2009). Somit scheint die Ausbildung der Säureresistenz in *H. pylori* ein sehr komplex regulierter Vorgang zu sein.

Im Genom von *H. pylori* liegen zwei Gene vor, die für die „orphan“ Response-Regulatoren HP1021 und HP1043 codieren (Tomb et al., 1997). Der RR HP1043 ist essentiell für das Wachstum in *H. pylori in vitro* (Beier und Frank, 2000; Schär et al., 2005). Eine Deletion des RR HP1021 bewirkt ein deutliches Wachstumsdefizit, welches je nach analysiertem *H. pylori* Stamm unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Beier und Frank, 2000; Pflock et al., 2004). Es wurde deshalb postuliert, dass die beiden „orphan“ Response-Regulatoren an der Regulation von wachstumsassoziierten Vorgängen in der Bakterienzelle beteiligt sind. Weiterhin wird vermutet, dass die Aktivität der RR HP1021 und HP1043 entgegen dem Zweikomponenten-System-Paradigma unabhängig von einer Phosphorylierung reguliert wird (Schär et al., 2005). Anhand von Expressionsanalysen der Regulator-Gene in Mutanten, in denen die Transkription von *hp1021* und *hp1043* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors P_{cagA} und der Fe^{2+} /Fur abhängigen Promotoren P_{pfr} und P_{fecA} stattfand, sollte untersucht werden, ob eine strikte Kontrolle der Expression die Aktivität der beiden „orphan“ Response-Regulatoren modulieren kann.

In der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{cagA}1021$ konnte eine sehr starke Transkription des Gens *hp1021* ausgehend von dem konstitutiv aktiven Promotor P_{cagA} nachgewiesen werden, die in einer starken Überexpression des Regulators auf Proteinebene resultierte. Auch

in der merodiploiden Mutanten *H. pylori* G27/ P_{pfr} 1021 konnte in Gegenwart von Fe^{2+} eine Transkriptionsinduktion des Gens *hp1021* ausgehend von dem Promotor P_{pfr} bestätigt werden, die ebenfalls eine Überexpression des RR HP1021 auf Proteinebene im Vergleich zum WT zur Folge hatte. In der Mutante *H. pylori* G27/ P_{fecA} 1021 Δ , in welcher die einzige Kopie des Gens *hp1021* an den Promotor P_{fecA} fusioniert ist, konnten Unterschiede in der Transkription des Gens *hp1021* in Abhängigkeit von der im Medium vorliegenden Eisenkonzentration beobachtet werden. Alle Mutanten zeigten unter *in vitro* Kulturbedingungen ein normales Wachstumsverhalten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine strikte Regulation der *hp1021* Expression nicht für die regulatorische Funktion des RR HP1021 benötigt wird. Die Aktivität des RR HP1021 ist vermutlich unabhängig von einer Phosphorylierung, wie durch die Konstruktion der Mutante *H. pylori* G27/1021-S47N Δ , in welcher die putative Serinphosphorylierungsstelle S47 des RR HP1021 durch die AS Asparagin substituiert wurde, gezeigt werden konnte (Schär et al., 2005) und der vorliegenden Konzentration des Regulators in der Zelle zu sein. Auf welche Weise die Aktivität des RR HP1021 moduliert wird, bleibt unklar.

Im Falle des RR HP1043 konnte nur eine Mutante *H. pylori* G27/ P_{fecA} 1043 Δ konstruiert werden, in welcher sich die einzige Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle eines Fremd-Promotors P_{fecA} befand. Die Konstruktion von Mutanten, in welchen sich die einzige Kopie des Gens *hp1043* unter der Kontrolle des Promotors P_{cagA} oder P_{pfrA} befindet, war nicht möglich. Dies deutet darauf hin, dass eine strikte Kontrolle der Transkription des Gens *hp1043* stattfindet, die einen Einfluss auf die wachstumsassoziierte regulatorische Funktion des RR HP1043 hat. Eine Erklärung für die Beobachtung, dass der Promotor P_{1043} durch den Promotor P_{fecA} , nicht jedoch durch die Promotoren P_{pfr} und P_{cagA} ersetzt werden kann, könnten Unterschiede im Wachstumsphasen-abhängigen Aktivitätsprofil dieser Promotoren sein. Die maximale Transkription des Gens *hp1043* konnte in der frühen logarithmischen Phase beobachtet werden während die Transkription in der stationären Phase deutlich abnimmt (Delany et al., 2002b). Die Transkription der Gene *cagA* und *pfrA* ausgehend von den Promotoren P_{cagA} und P_{pfr} hingegen wird jedoch mit Eintreten in die stationäre Phase induziert (Thompson et al., 2003). Wird die Aktivität des RR HP1043 tatsächlich über die in der Zelle vorhandene Konzentration reguliert, so könnte eine Expression des RR HP1043 zu einem falschen Zeitpunkt im Zellzyklus nicht kompatibel mit dem Zellwachstum sein. Für die Transkription des Gens *fecA* wurden bisher keine Unterschiede im Transkriptionsprofil in Abhängigkeit von der Wachstumsphase beschrieben, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Transkription der *fecA* orthologen Gene *fecA1* und *fecA3* mit Beginn der stationären Phase reprimiert wird, was mit dem Wachstumsphasen-abhängigen Transkriptionsprofil des Gens *hp1043* übereinstimmt (Delany et al., 2002b; Thompson et al., 2003). Während in den merodiploiden Mutanten *H. pylori* G27/ P_{cagA} 1043 und *H. pylori* G27/ P_{pfr} 1043 eine Überexpression des Gens *hp1043* stattfindet bzw. durch die Zugabe von Fe^{2+} induziert werden kann, resultierte diese Zunahme an *hp1043*-spezifischer mRNA jedoch nicht in einer Proteinüberexpression. Dieselbe Beobachtung wurde auch von Delany et al. (2002b) gemacht, in diesem Falle wurde die Expression des Gens *hp1043* in einer Mutante analysiert, in welcher das *vacA*-Gen durch eine zusätzliche Kopie des Gens *hp1043* fusioniert an den Promotor P_{pfrA} im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27 ersetzt wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression des Gens *hp1043* posttranskriptionell oder posttranslational strikt reguliert wird. Eine Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation ist die Inhibierung der Translation oder ein Einfluss auf die Stabilität der mRNA durch die Interaktion der mRNA mit kleinen sRNA-Molekülen. Kürzlich wurden im Genom von *H. pylori* mehrere sRNAs identifiziert, die an der posttranskriptionellen Regulation der Gene *fliM*, *fumC*, *frpB* und *ceuE* beteiligt sind (Xiao et al., 2008; Xiao et al., 2009). sRNAs die mit der *hp1043*-mRNA interagieren sind bisher noch nicht beschrieben, jedoch steckt dieses Forschungsgebiet in *H. pylori* noch in den Anfängen. Ein weiterer denkbarer

posttranskriptioneller Regulationsmechanismus wäre die Regulation über CsrA. Im Genom von *H. pylori* ist ein orthologes Gen zu *csrA* aus *E. coli* vorhanden. CsrA in *E. coli* kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Translation fungieren (Romeo et al., 1993; 1998; Wei et al., 2001; Baker et al., 2002; Jackson et al., 2002). Für die kleinen regulatorischen RNAs *csrB* und *csrA*, die in *E. coli* die Aktivität des Regulatorproteins beeinflussen, indem sie mit CsrA Ribonukleinkomplexe bilden und somit der Aktivität von CsrA entgegenwirken (Liu et al., 1997; Weilbacher et al., 2003; Dubey et al., 2005), konnten bisher jedoch im Genom von *H. pylori* noch keine entsprechenden Sequenzen identifiziert werden. Es wurde beschrieben, dass CsrA in *H. pylori* an der zellulären Antwort auf Umweltstress beteiligt ist und die Expression von Virulenzfaktoren reguliert, indem es die Prozessierung oder die Translation der Target-RNAs beeinflusst (Barnard et al., 2003). Ob CsrA an der posttranskriptionellen Regulation der *hp1043* Expression beteiligt ist, ist unklar. Eine *in silico* Analyse zeigte, dass die nicht translatierte „leader-Sequenz“ der *hp1043*-mRNA eine nicht perfekte „inverted-repeat“-Sequenz (AAUUACUCUUAAAUGCGGGAGUCAUA) aufweist, die möglicherweise die Ausbildung einer Sekundärstruktur („stem loop“) bewirken kann. Ein solcher „stem loop“ verhindert möglicherweise die Bindung des Ribosoms an die Ribosomenbindestelle. Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass die Expressionsregulation über die Ausbildung dieser „stem loop“ stattfindet, da sich die nicht translatierte „leader Sequenz“ in den Mutanten mit unterschiedlichen Promotorfusionen unterscheidet aber in keiner der Mutanten eine Überexpression des RR HP1043 nachgewiesen werden konnte. Auch eine posttranslationale Regulation der *hp1043* Expression durch Proteolyse wäre denkbar. Mehrere Gene, die für Proteasen codieren, wurden im Genom von *H. pylori* identifiziert (Tomb et al., 1997). Für die Proteasen Clp und Lon kann eine Beteiligung bei der Expressionsregulation des RR HP1043 vermutlich ausgeschlossen werden, da auch in Mutanten, in denen die Gene, die für diese Proteasen codieren, deletiert wurden, keine Überexpression des RR HP1043 erreicht werden konnte (Götz und Beier, persönliche Mitteilung).

In der Mutante *H. pylori* G27/*P_{fecA}*1043Δ konnte in Gegenwart des Eisenchelators Dipyrindyl eine Induktion der Transkription des Gens *hp1043* ausgehend von dem Promotor *P_{fecA}* bestätigt werden, unter diesen Bedingungen lag in der Mutante mehr *hp1043*-spezifische mRNA vor als im WT *H. pylori* G27 unter Standardwachstumsbedingungen. Auch in der Western-Blot-Analyse konnte eine Zunahme der HP1043 Proteinexpression in der Mutante in Gegenwart von Dipyrindyl beobachtet werden, jedoch war die Menge an exprimiertem RR HP1043 in der Mutante unter allen Wachstumsbedingungen deutlich geringer als im WT *H. pylori* G27. Da weder eine Deletion noch eine Überexpression des Gens *hp1043* möglich zu sein scheint, könnte diese Mutante eine Alternative sein, um in globalen Transkriptionsstudien das Regulon des RR HP1043 zu identifizieren.

Die strikte Regulation der Expression des Gens *hp1043* könnte darauf hindeuten, dass die Aktivität des RR HP1043 abhängig ist von der vorhandenen Konzentration an Regulatorprotein in der Zelle. Gestützt wird diese These durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur des RR HP1043 (Hong et al., 2007). Der RR HP1043 liegt nicht phosphoryliert als stabiles Dimer vor. Eine Besonderheit des RR HP1043 ist, dass die Struktur der Interaktionsfläche zwischen den beiden Dimer-UE der Struktur der aktiven phosphorylierten Form der RR ArcA und PhoB (Toro-Roman et al., 2005; Bachhawat et al., 2005) ähnelt. Somit liegt der RR HP1043 nicht phosphoryliert in einer aktiven Form vor. Über unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen des RR HP1043 zu verschiedenen Wachstumsphasen könnte der RR HP1043 eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus haben. Eine solche Funktion wurde bereits für viele essentielle Zweikomponenten-System Proteine beschrieben.

In der Mutante *H. pylori* G27/*P₁₀₄₃*cj0355Δ kann der orthologe RR CJ0355 aus *C. jejuni* die Deletion des essentiellen RR HP1043 komplementieren und somit dessen Funktion übernehmen. Diese Komplementation war jedoch nur dann möglich, wenn sich die

Transkription des Gens *cj0355* unter der Kontrolle des Promotors P_{hp1043} befand. Eine Fusion des Gens *cj0355* an die Promotoren P_{cagA} und P_{cj0355} erlaubte dagegen keine Deletion des Gens *hp1043*, in diesen Fällen kann der RR CJ0355 nicht die Funktion des RR HP1043 übernehmen. Da der Promotor P_{cj0355} , von dem ausgehend eine Transkription des Gens *cj0355* nachgewiesen werden konnte, nicht den Promotor P_{hp1043} ersetzen kann, kann man spekulieren, dass sich die Transkriptionsregulation, die an diesen beiden Promotoren stattfindet, in *H. pylori* und *C. jejuni* unterscheidet. Der RR CJ0355 und der RR HP1043 weisen einen hohen Grad an Übereinstimmung in der AS-Sequenz auf, sie sind zu 60 % identisch, wobei die C-terminale Outputdomäne mit einer Identität von 85 % stärker konserviert ist als die N-terminale Receiverdomäne. Interessanterweise weist auch der RR CJ0355 Abweichungen in der Konsensussequenz auf (Parkhill et al., 2000). Der normalerweise hoch konservierte Aspartatrest, an dem die Phosphorylierung stattfindet, ist substituiert durch einen Asparaginrest. Auch dem RR CJ0355 konnte bisher keine korrespondierende Histidin-Kinase zugeordnet werden, so dass spekuliert werden kann, dass die Aktivität des RR CJ0355 unabhängig von einer Phosphorylierung ist und ähnlich reguliert wird wie die Aktivität des RR HP1043. Auch eine Überexpression des Gens *cj0355* konnte in der merodiploiden Mutante *H. pylori* G27/ $P_{cagA}cj0355$ auf RNA-Ebene beobachtet werden, die verstärkte Transkription führte jedoch nicht zu einer verstärkten Expression des RR CJ0355 auf Proteinebene. Somit scheint im genetischen Hintergrund von *H. pylori* G27 auch die Expression des Gens *cj0355* posttranskriptionell oder posttranslational reguliert zu werden, vermutlich durch die selben Mechanismen, die auch an der Expressionsregulation des Gens *hp1043* beteiligt sind. Interessanterweise konnte keine Mutante konstruiert werden, in welcher das Gen *ws0306*, welches für den zu HP1043 orthologen RR WS0306 aus *W. succinogenes* codiert, eine Deletion des Gens *hp1043* komplementieren kann. Der RR WS0306 trägt ein Aspartat an der konservierten Phosphorylierungsstelle (Baar et al., 2003). Benachbart zu dem Gen *ws0306* befindet sich auf dem bakteriellen Chromosom von *W. succinogenes* das Gen *ws0305*, welches für eine Histidin-Kinase codiert. Anhand von *in vitro* Experimenten (Ergebnisse nicht dargestellt) konnte gezeigt werden, dass die HK WS0305 den RR WS0306 phosphorylieren kann. Die Aktivität des RR WS0306 wird vermutlich über Phosphorylierung entsprechend dem Zweikomponenten-System-Paradigma reguliert und ist somit nicht in der Lage, die Funktion der RR HP1043 und CJ0355, deren Aktivität vermutlich über eine strikte Expressionskontrolle reguliert wird, zu übernehmen.

G. Literaturverzeichnis

- Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, Suerbaum S, Thompson SA, van der Ende A, van Doorn LJ.** 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol.*, 32(3), pp. 459-70.
- Akada JK, 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.
- Akerley BJ, Miller JF.** 1996. Understanding signal transduction during bacterial infection. *Trends Microbiol.*, 4(4), pp. 141-6. Review.
- Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L, Hill JE, Siebert PD, Lukyanov SA, Sverdlov ED, Berg DE.** 1998a. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(22), pp. 13108-13.
- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE.** 1998b. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.*, 28(1), pp. 37-53.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE.** 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 20(19), pp. 5137-42.
- Alamuri P, Mehta N, Burk A, Maier RJ.** 2006. Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S cluster synthesis protein NifS by iron, oxidative stress conditions, and fur. *J Bacteriol.*, 188(14), pp. 5325-30.
- Allan E, Clayton CL, McLaren A, Wallace DM, Wren BW.** 2001. Characterization of the low-pH responses of *Helicobacter pylori* using genomic DNA arrays. *Microbiology.*, 147(Pt 8), pp. 2285-92.
- Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397(6715), pp. 176-80. Erratum in: *Nature*, 397(6721), p. 719.
- Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, 300(5624), pp. 1430-4.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A.** 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(26), pp. 9247-52.
- Anderson LA, Murphy SJ, Johnston BT, Watson RG, Ferguson HR, Bamford KB, Ghazy A, McCarron P, McGuigan J, Reynolds JV, Comber H, Murray LJ.** 2008. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy and the stages of the oesophageal inflammation, metaplasia, adenocarcinoma sequence: results from the FINBAR case-control study. *Gut*. 57(6), pp. 734-9.
- Ando T, Xu Q, Torres M, Kusugami K, Israel DA, Blaser MJ.** 2000. Restriction-modification system differences in *Helicobacter pylori* are a barrier to interstrain plasmid transfer. *Mol Microbiol.*, 37(5), pp. 1052-65.
- Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM, Takata T, Lee YC, Kusugami K, van der Ende A, Kuipers EJ, Kusters JG, Blaser MJ.** 2002. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *J Clin Microbiol.*, 40(1), pp. 239-46.
- Andrews SC.** 1998. Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol.*, 40, pp. 281-351. Review.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.*, 27(2-3), pp. 215-37. Review.
- Ang S, Lee CZ, Peck K, Sindici M, Matrubutham U, Gleeson MA, Wang JT.** 2001. Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infect Immun.*, 69(3), pp. 1679-86.
- Ansaldi M, Simon G, Lepelletier M, Méjean V.** 2000. The TorR high-affinity binding site plays a key role in both torR autoregulation and torCAD operon expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 182(4), pp. 961-6.
- Appelmeik BJ, Negrini R, Moran AP, Kuipers EJ.** 1997. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol.*, 5(2), pp. 70-3. Review.
- Appelmeik BJ, Martin SL, Monteiro MA, Clayton CA, McColm AA, Zheng P, Verboom T, Maaskant JJ, van den Eijnden DH, Hokke CH, Perry MB, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG.** 1999. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect Immun.*, 67(10), pp. 5361-6. Erratum in: *Infect Immun.*, 67(12), pp. 6715.

- Appelmek BJ, Martino MC, Veenhof E, Monteiro MA, Maaskant JJ, Negrini R, Lindh F, Perry M, Del Giudice G, Vandenbroucke-Grauls CM.** 2000. Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.*, 68(10), pp. 5928-32. Erratum in: *Infect Immun.*, 68(12), pp. 7214.
- Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC.** 2004. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 127(2), pp. 514-23.
- Aspholm M, Olfat FO, Nordén J, Sondén B, Lundberg C, Sjöström R, Altraja S, Odenbreit S, Haas R, Wadström T, Engstrand L, Semino-Mora C, Liu H, Dubois A, Teneberg S, Arnqvist A, Borén T.** 2006. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog.*, 2(10), pp. e110.
- Aspinall GO, Monteiro MA, Pang H, Walsh EJ, Moran AP.** 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 JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL.** 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.
- Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M.** 2002. Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis.*, 186(11), pp. 1621-30.
- 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 SC.** 2003. Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(20), pp. 11690-5.
- Bachhawat P, Swapna GV, Montelione GT, Stock AM.** 2005. Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure*, 13(9), pp. 1353-63.
- Backert S, Müller EC, Jungblut PR, Meyer TF.** 2001. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the *Helicobacter pylori* CagA protein after translocation into gastric epithelial cells. *Proteomics*, 1(4), pp. 608-17.
- Backert S, Selbach M.** 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.*, 10(8), pp. 1573-81. Review.
- Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS, Jun JS, Lee SG, Song JY, Park JU, Kang HL, Lee WK, Cho MJ, Youn HS, Ko GH, Rhee KH.** 2004. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol.*, 186(4), pp. 949-55. Erratum in: *J Bacteriol.*, 187(4), p. 1541.
- Baikalov I, Schröder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Grzeskowiak K, Gunsalus RP, Dickerson RE.** 1996. Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry*, 35(34), pp. 11053-61.
- Baker CS, 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.
- Baltrus DA, Amieva MR, Covacci A, Lowe TM, Merrell DS, Ottemann KM, Stein M, Salama NR, Guillemin K.** 2009. The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27. *J Bacteriol.*, 191(1), pp. 447-8.
- Barnard FM, Loughlin MF, Fainberg HP, Messenger MP, Ussery DW, Williams P, Jenks PJ.** 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 MJ, Hung DY, Reisenauer A, Shapiro L, Long SR.** 2001. A homolog of the CtrA cell cycle regulator is present and essential in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol.*, 183(10), pp. 3204-10.
- Bauerfeind P, Garner RM, Mobley LT.** 1996. Allelic exchange mutagenesis of *nixA* in *Helicobacter pylori* results in reduced nickel transport and urease activity. *Infect Immun.*, 64(7), pp. 2877-80.
- Baumgartner HK, Montrose MH.** 2004. Regulated alkali secretion acts in tandem with unstirred layers to regulate mouse gastric surface pH. *Gastroenterology*, 126(3), pp. 774-83.
- Beckwith CS, McGee DJ, Mobley HL, Riley LK.** 2001. Cloning, expression, and catalytic activity of *Helicobacter hepaticus* urease. *Infect Immun.*, 69(9), pp. 5914-20.
- 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.
- Beier D, Frank R.** 2000. Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 182(8), pp. 2068-76.

- Béji A, Mégraud 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.
- Belland RJ, Morrison SG, Carlson JH, Hogan DM.** 1997. Promoter strength influences phase variation of neisserial *opa* genes. *Mol Microbiol*, 23(1), pp. 123-35.
- Belzer C, Stoof J, Beckwith CS, Kuipers EJ, Kusters JG, van Vliet AH.** 2005. Differential regulation of urease activity in *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 151(Pt 12), pp. 3989-95.
- Benanti EL, Chivers PT.** 2007. The N-terminal arm of the *Helicobacter pylori* Ni²⁺-dependent transcription factor NikR is required for specific DNA binding. *J Biol Chem*, 282(28), pp. 20365-75.
- Bereswill S, Lichte F, Vey T, Fassbinder F, Kist M.** 1998a. Cloning and characterization of the *fur* gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett.*, 159(2), pp. 193-200.
- Bereswill S, Waidner U, Odenbreit S, Lichte F, Fassbinder F, Bode G, Kist M.** 1998b. Structural, functional and mutational analysis of the *pf_r* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 144 (Pt 9), pp. 2505-16.
- Bijlsma JJ, Waidner B, Vliet AH, Hughes NJ, Hög S, Bereswill S, Kelly DJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Kist M, Kusters JG.** 2002. The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun*, 70(2), pp. 606-11.
- Berg DE, Hoffman PS, Appelmek BJ, Kusters JG.** 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol*, 5(12), pp. 468-74. Review.
- Berg G, Bode G, Blettner M, Boeing H, Brenner H.** 2001. *Helicobacter pylori* infection and serum ferritin: A population-based study among 1806 adults in Germany. *Am J Gastroenterol*, 96(4), pp. 1014-8.
- Bijlsma JJ, Lie-A-Ling M, Nootenboom IC, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG.** 2000. Identification of loci essential for the growth of *Helicobacter pylori* under acidic conditions. *J Infect Dis*, 182(5), pp. 1566-9.
- Birck C, Mourey L, Gouet P, Fabry B, Schumacher J, Rousseau P, Kahn D, Samama JP.** 1999. Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure*, 7(12), pp. 1505-15.
- Blaser MJ, Crabtree JE.** 1996. CagA and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Clin Pathol*, 106(5), pp. 565-7.
- Blaser MJ.** 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis*, 176 Suppl 2, pp. S103-5. Review.
- Blaser MJ.** 1999. In a world of black and white, *Helicobacter pylori* is gray. *Ann Intern Med*, 130(8), pp. 695-7.
- Blaser MJ, Atherton JC.** 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, 113(3), pp. 321-33. Review.
- Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elis MM, Telford JL, Baldari CT.** 2003. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med*, 198(12), pp. 1887-97.
- Booth IR.** 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev*, 48, pp. 359-378.
- Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, 262(5141), pp. 1892-5.
- Bouet JY, Funnell BE.** 1999. P1 ParA interacts with the P1 partition complex at parS and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *EMBO J*, 18(5), pp. 1415-24.
- Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park JH, Ewings KE, Bowie AG, Ong SJ, Cook SJ, Sorensen OE, Manzo BA, Inohara N, Klein NJ, Nuñez G, Atherton JC, Bajaj-Elliott M.** 2006. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem*, 281(17), pp. 11637-48.
- Bourret RB, Drake SK, Chervitz SA, Simon MI, Falke JJ.** 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.
- Bourret RB, Stock AM.** 2002. Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J Biol Chem*, 277(12), pp. 9625-8. Review.
- Brahmachary P, Dashti MG, Olson JW, Hoover TR.** 2004. *Helicobacter pylori* FlgR is an enhancer-independent activator of sigma54-RNA polymerase holoenzyme. *J Bacteriol*, 186(14), pp. 4535-42.
- Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S.** 2005. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(26), pp. 9300-5.

- Bucca G, Ferina G, Puglia AM, Smith CP.** 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.
- Bury-Moné S, Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H.** 2001. The *Helicobacter pylori* UreI protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol Microbiol.*, 42(4), pp. 1021-34.
- Bury-Moné S, Skouloubris S, Dauga C, Thiberge JM, Dailidienne D, Berg DE, Labigne A, De Reuse H.** 2003. Presence of active aliphatic amidases in *Helicobacter* species able to colonize the stomach. *Infect Immun.*, 71(10), pp. 5613-22.
- Bury-Moné S, Thiberge JM, 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 CA.** 2003. Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends Microbiol.*, 11(6), pp. 248-53.
- Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E.** 2007. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents.*, 29(4), pp. 389-96.
- Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Di Giulio M, Traini T, Trubiani O.** 2008. Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain. *J Appl Microbiol.*, 105(3), pp. 761-9.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, 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.
- 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.
- Chédin F, Dervyn E, Dervyn R, Ehrlich SD, Noirot P.** 1994. Frequency of deletion formation decreases exponentially with distance between short direct repeats. *Mol Microbiol.*, 12(4), pp. 561-9.
- Chen YY, Weaver CA, Mendelsohn DR, Burne RA.** 1998. Transcriptional regulation of the *Streptococcus salivarius* 57.I urease operon. *J Bacteriol.*, 180(21), pp. 5769-75.
- Chen J, Bu XL, Wang QY, Hu PJ, Chen MH.** 2007. Decreasing seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection during 1993-2003 in Guangzhou, southern China. *Helicobacter*, 12(2), pp. 164-9.
- Chen Y, Blaser MJ.** 2007. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med.*, 167(8), pp. 821-7.
- Chivers PT, Sauer RT.** 1999. NikR is a ribbon-helix-helix DNA-binding protein. *Protein Sci.*, 8(11), pp. 2494-500.
- Chivers PT, Sauer RT.** 2000. Regulation of high affinity nickel uptake in bacteria. Ni²⁺-Dependent interaction of NikR with wild-type and mutant operator sites. *J Biol Chem.*, 275(26), pp. 19735-41.
- Chivers PT, Tahirov TH.** 2005. Structure of *Pyrococcus horikoshii* NikR: nickel sensing and implications for the regulation of DNA recognition. *J Mol Biol.*, 348(3), pp. 597-607.
- Chevillat AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng CM, Kaspar CW.** 1996. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.*, 62(5), pp. 1822-4.
- Chirica LC, Elleby B, Lindskog S.** 2001. Cloning, expression and some properties of alpha-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Biochim Biophys Acta.*, 1544(1-2), pp. 55-63.
- Chirica LC, Petersson C, Hurtig M, Jonsson BH, Borén T, Lindskog S.** 2002. Expression and localization of alpha- and beta-carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori*. *Biochim Biophys Acta.*, 1601(2), pp. 192-9.
- Chu S, Montrose MH.** 1997. Transepithelial SCFA fluxes link intracellular and extracellular pH regulation of mouse colonocytes. *Comp Biochem Physiol A Physiol.*, 118(2), pp. 403-5.
- Chu S, Tanaka S, Kaunitz JD, Montrose MH.** 1999. Dynamic regulation of gastric surface pH by luminal pH. *J Clin Invest.*, 103(5), pp. 605-12.
- Clayton CL, Pallen MJ, Kleanthous H, Wren BW, Tabaqchali S.** 1990. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucleic Acids Res.*, 18(2), p. 362.
- Clyne M, Labigne A, Drumm B.** 1995. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun.*, 63(5), pp. 1669-73.
- Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG.** 2004. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 186(10), pp. 3124-32.

- Colland F, Rain JC, Gounon P, Labigne A, Legrain P, De Reuse H.** 2001. Identification of the *Helicobacter pylori* anti-sigma28 factor. *Mol Microbiol.*, 41(2), pp. 477-87.
- Contreras M, Thiberge JM, Mandrand-Berthelot MA, 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 PJ, Green A, Cockayne A, Logan RP, Hardie KR.** 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.
- Corley DA, Kubo A, Levin TR, Block G, Habel L, Zhao W, Leighton P, Rumore G, Quesenberry C, Buffler P, Parsonnet J.** 2008. *Helicobacter pylori* infection and the risk of Barrett's oesophagus: a community-based study. *Gut*, 57(6), pp. 727-33.
- Corthésy-Theulaz IE, Bergonzelli GE, Henry H, Bachmann D, Schorderet DF, Blum AL, Ornston LN.** 1997. Cloning and characterization of *Helicobacter pylori* succinyl CoA:acetoacetate CoA-transferase, a novel prokaryotic member of the CoA-transferase family. *J Biol Chem.*, 272(41), pp. 25659-67.
- Couturier MR, Tasca E, Montecucco C, Stein M.** 2006. Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect Immun.*, 74(1), pp. 273-81.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni 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.** 2000. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med.*, 191(4), pp. 587-92. Review.
- Cover TL, Blaser MJ.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.*, 267(15), pp. 10570-5.
- Cover TL, Hanson PI, Heuser JE.** 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 JE Jr.** 1989. The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell*, 58(3), pp. 427-9. Review.
- Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B.** 2002. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun.*, 70(5), pp. 2311-8.
- Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL, Shao Z.** 1999. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(5), pp. 2001-6.
- Dahl MK, 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.
- Danielli A, Roncarati D, Delany I, Chiarini V, Rappuoli R, Scarlato V.** 2006. In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *J Bacteriol.*, 188(13), pp. 4654-62.
- Davies BJ, de Vries N, Rijpkema SG, van Vliet AH, Penn CW.** 2002. Transcriptional and mutational analysis of the *Helicobacter pylori* urease promoter. *FEMS Microbiol Lett.*, 213(1), pp. 27-32.
- Davis GS, Flannery EL, Mobley HL.** 2006. *Helicobacter pylori* HP1512 is a nickel-responsive NikR-regulated outer membrane protein. *Infect Immun.*, 74(12), pp. 6811-20.
- de Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers EJ, van Vliet AH, Kusters JG.** 2004. Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J Med Microbiol.*, 53(Pt 5), pp. 375-9.
- Delany I, Pacheco AB, 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, 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, Pacheco AB, 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.** 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.
- Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V.** 2003. An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.*, 50(4), pp. 1329-38.

- 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.
- Delgado MA, Mouslim C, Groisman EA.** 2006. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol Microbiol.*, 60(1), pp. 39-50.
- Delihias N.** 1995. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Mol Microbiol.*, 15(3), pp. 411-4. Review.
- Dell CL, Neely MN, Olson ER.** 1994. Altered pH and lysine signalling mutants of cadC, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli* cadBA operon. *Mol Microbiol.*, 14(1), pp. 7-16.
- De Pina K, Desjardin V, Mandrand-Berthelot MA, Giordano G, Wu LF.** 1999. Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 181(2), pp. 670-4.
- Deretic V, Leveau JH, Mohr CD, Hibler NS.** 1992. In vitro phosphorylation of AlgR, a regulator of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, by a histidine protein kinase and effects of small phospho-donor molecules. *Mol Microbiol.*, 6(19), pp. 2761-7.
- Dhaenens L, Szczebara F, Husson MO.** 1997. Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 65(2), pp. 514-8.
- Dian C, Schauer K, Kapp U, McSweeney SM, Labigne A, Terradot L.** 2006. Structural basis of the nickel response in *Helicobacter pylori*: crystal structures of HpNikR in Apo and nickel-bound states. *J Mol Biol.*, 361(4), pp. 715-30.
- 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.
- Doig P, de Jonge BL, Alm RA, Brown ED, Uria-Nickelsen M, Noonan B, Mills SD, Tummino P, Carmel G, Guild BC, Moir DT, Vovis GF, Trust TJ.** 1999. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63(3), pp. 675-707. Review.
- Donahue JP, Israel DA, Torres VJ, Necheva AS, Miller GG.** 2002. Inactivation of a *Helicobacter pylori* DNA methyltransferase alters *dnaK* operon expression following host-cell adherence. *FEMS Microbiol Lett.*, 208(2), pp. 295-301.
- Dong Q, Hyde D, Herra C, Kean C, Murphy P, O'Morain CA, Buckley M.** 2001. Identification of genes regulated by prolonged acid exposure in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett.*, 196(2), pp. 245-9.
- Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, Reindl W, Backert S, Saur D, Schmid RM, Rad R.** 2006. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of *hopH* gene polymorphisms. *J Infect Dis.*, 194(10), pp. 1346-55.
- Doty SL, Yu MC, Lundin JI, Heath JD, Nester EW.** 1996. Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.*, 178(4), pp. 961-70.
- Douillard FP, Ryan KA, Caly DL, Hinds J, Witney AA, Husain SE, O'Toole PW.** 2008. Posttranscriptional regulation of flagellin synthesis in *Helicobacter pylori* by the RpoN chaperone HP0958. *J Bacteriol.*, 190(24), pp. 7975-84.
- Dubey AK, Baker CS, Romeo T, Babitzke P.** 2005. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA*, 11(10), pp. 1579-87.
- Dutta R, Qin L, Inouye M.** 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol.*, 34(4), pp. 633-40. Review.
- Easter J Jr, Gober JW.** 2002. ParB-stimulated nucleotide exchange regulates a switch in functionally distinct ParA activities. *Mol Cell.*, 10(2), pp. 427-34.
- Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S.** 1989. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.*, 57(4), pp. 1119-25.
- Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, 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 KA, Morgan DR, Krakowka S.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.*, 37(2), pp. 123-7.
- Eaton KA, Dewhirst FE, Radin MJ, Fox JG, Paster BJ, Krakowka S, Morgan DR.** 1993. *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *Int J Syst Bacteriol.*, 43(1), pp. 99-106.
- Eaton KA, Krakowka S.** 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 62(9), pp. 3604-7.
- Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S.** 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun.*, 64(7), pp. 2445-8.

- Eidt S, Stolte M, Fischer R.** 1994. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol.*, 47(5), pp. 436-9.
- Edwards NJ, Monteiro MA, Faller G, Walsh EJ, Moran AP, Roberts IS, High NJ.** 2000. Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. *Mol Microbiol.*, 35(6), pp. 1530-9.
- Engel E, Peskoff A, Kauffman GL Jr, Grossman MI.** 1984. Analysis of hydrogen ion concentration in the gastric gel mucus layer. *Am J Physiol.*, 247(4 Pt 1), pp. 321-38.
- Enroth H, Engstrand L.** 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microbiol.*, 33(8), pp. 2162-5.
- Eppinger M, Baar C, Raddatz G, Huson DH, Schuster SC.** 2004. Comparative analysis of four *Campylobacteriales*. *Nat Rev Microbiol.*, 2(11), pp. 872-85. Review.
- Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, Keller H, Morelli G, Gressmann H, Achtman M, Schuster SC.** 2006. Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genet.*, 2(7), pp. e120.
- Ernst FD, Bereswill S, Waidner B, Stoof J, Mäder U, Kusters JG, Kuipers EJ, Kist M, van Vliet AH, Homuth G.** 2005a. Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology.*, 151(Pt 2), pp. 533-46.
- Ernst FD, Homuth G, Stoof J, Mäder U, Waidner B, Kuipers EJ, Kist M, Kusters JG, Bereswill S, van Vliet AH.** 2005b. Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol.*, 187(11), pp. 3687-92.
- Ernst FD, Kuipers EJ, Heijens A, Sarwari R, Stoof J, Penn CW, Kusters JG, van Vliet AH.** 2005c. The nickel-responsive regulator NikR controls activation and repression of gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 73(11), pp. 7252-8.
- Ernst FD, Stoof J, Horrevoets WM, Kuipers EJ, Kusters JG, van Vliet AH.** 2006. NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immun.*, 74(12), pp. 6821-8.
- Errington J.** 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol.*, 1(2), pp. 117-26. Review.
- Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V.** 1998. Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol.*, 283(3), pp. 537-47.
- Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol.*, 181(20), pp. 6223-9. Review.
- Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V.** 2000. Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 275(32), pp. 24709-14.
- 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 JA.** 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.
- Fabret C, Feher VA, Hoch JA.** 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol.*, 181(7), pp. 1975-83. Review.
- Fälker S, Schmidt MA, Heusipp G.** 2006. Altered Ca(2+) regulation of Yop secretion in *Yersinia enterocolitica* after DNA adenine methyltransferase overproduction is mediated by Clp-dependent degradation of LcrG. *J Bacteriol.*, 188(20), pp. 7072-81.
- Fälker S, Schilling J, Schmidt MA, Heusipp G.** 2007. Overproduction of DNA adenine methyltransferase alters motility, invasion, and the lipopolysaccharide O-antigen composition of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.*, 75(10), pp. 4990-7.
- Fallone CA, Barkun AN, Göttke MU, Best LM, Loo VG, Veldhuyzen van Zanten S, Nguyen T, Lowe A, Fainsilber T, Kouri K, Beech R.** 2000. Association of *Helicobacter pylori* genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal diseases. *Am J Gastroenterol.*, 95(3), pp. 659-69.
- Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S.** 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299(5612), pp. 1582-5.
- Fassbinder F, van Vliet AH, Gimmel V, Kusters JG, 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.

- Figge RM, Gober JW.** 2003. Cell shape, division and development: the 2002 American Society for Microbiology (ASM) conference on prokaryotic development. *Mol Microbiol.*, 47(5), pp. 1475-83.
- Figueiredo C, Van Doorn LJ, Nogueira C, Soares JM, Pinho C, Figueira P, Quint WG, Carneiro F.** 2001. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol.*, 36(2), pp. 128-35.
- Fischer W, Püls 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. Erratum in: *Mol Microbiol.*, 2003 47(6), p. 1759.
- Fitzpatrick TB, Amrhein N, Kappes B, Macheroux P, Tews I, Raschle T.** 2007. Two independent routes of de novo vitamin B6 biosynthesis: not that different after all. *Biochem J.*, 407(1), pp. 1-13. Review.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), pp. 496-512.
- Fol M, Chauhan A, Nair NK, Maloney E, Moomey M, Jagannath C, Madiraju MV, Rajagopalan M.** 2006. Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator. *Mol Microbiol.*, 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.
- Forst S, Kalve I, Durski W.** 1995. Molecular analysis of OmpR binding sequences involved in the regulation of *ompF* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.*, 131(2), pp. 147-51.
- Forsyth MH, Cover TL.** 2000. Intercellular communication in *Helicobacter pylori*: *luxS* is essential for the production of an extracellular signaling molecule. *Infect Immun.*, 68(6), pp. 3193-9.
- Forsyth MH, Cao P, Garcia PP, Hall JD, Cover TL.** 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.
- Foster JW, Hall HK.** 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.*, 173, pp. 5129-5135.
- Foster JW.** 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol.*, 2(11), pp. 898-907. Review.
- Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, Brinkac LM, DeBoy RT, Parker CT, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Sullivan SA, Shetty JU, Ayodeji MA, Shvartsbeyn A, Schatz MC, Badger JH, Fraser CM, Nelson KE.** 2005. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *campylobacter* species. *PLoS Biol.*, 3(1), pp. e15.
- Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ Jr, Gorelick PL, Ward JM.** 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.
- Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, Shintani T, Wada A, Aoyama N, Hirayama T, Fukamachi H, Noda M.** 2003. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet.*, 33(3), pp. 375-81. Erratum in: *Nat Genet.*, 33(4), p. 533.
- Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ.** 1994. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.*, 32(2), pp. 331-4.
- Fujimoto Y, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H, Sawayama Y, Hayashi J.** 2007. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* among the population of endemic areas in Japan. *Helicobacter*, 12(2), pp. 170-6.
- Fujinaga R, Nakazawa T, Shirai M.** 2001. Allelic exchange mutagenesis of *rpoN* encoding RNA-polymerase sigma54 subunit in *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother.*, 7(3), pp. 148-55.
- Fulkerson JF Jr, Garner RM, Mobley HL.** 1998. Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions. *J Biol Chem.*, 273(1), pp. 235-41.
- Fulkerson JF Jr, Mobley HL.** 2000. Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III. *J Bacteriol.*, 182(6), pp. 1722-30.
- 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.

- Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de Thillot V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P.** 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.*, 19(23), pp. 6361-70.
- Gancz H, Censini S, Merrell DS.** 2006. Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 74(1), pp. 602-14.
- Gangwer KA, Mushrush DJ, Stauff DL, Spiller B, McClain MS, Cover TL, Lacy DB.** 2007. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(41), pp. 16293-8.
- Gao R, Lynn DG.** 2005. Environmental pH sensing: resolving the VirA/VirG two-component system inputs for *Agrobacterium* pathogenesis. *J Bacteriol.*, 187(6), pp. 2182-9.
- Gauthier NC, Ricci V, Gounon P, Doye A, Tauc M, Poujeol P, Boquet P.** 2004. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and actin cytoskeleton modulate chloride transport by channels formed by the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA in HeLa cells. *J Biol Chem.*, 279(10), pp. 9481-9.
- Ge R, Watt RM, Sun X, Tanner JA, He QY, Huang JD, Sun H.** 2006. Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: potential for Ni²⁺ storage in *Helicobacter pylori*. *Biochem J.*, 393(Pt 1), pp. 285-93.
- 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.
- Geisse NA, Cover TL, Henderson RM, Edwardson JM.** 2004. Targeting of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin to lipid raft membrane domains analysed by atomic force microscopy. *Biochem J.*, 381(Pt 3), pp. 911-7.
- Genisset C, Puhar A, Calore F, de Bernard M, Dell'Antone P, Montecucco C.** 2007. The concerted action of the *Helicobacter pylori* cytotoxin VacA and of the v-ATPase proton pump induces swelling of isolated endosomes. *Cell Microbiol.*, 9(6), pp. 1481-90.
- Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, Miehlke 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.
- Gibson JR, Slater E, Xerry J, Tompkins DS, Owen RJ.** 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.*, 36(9), pp. 2580-5.
- Gilbert JV, Ramakrishna J, Sunderman FW Jr, Wright A, Plaut AG.** 1995. Protein Hpn: cloning and characterization of a histidine-rich metal-binding polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun.*, 63(7), pp. 2682-8.
- Giraud AT, Calzolari A, Cataldi AA, 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. Erratum in: *FEMS Microbiol Lett.*, 180(1), p. 117.
- Goodman KJ, Correa P.** 2000. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet*, 355(9201), pp. 358-62.
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConell W, Harper WES.** 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* und *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter pylori* comb-nov and *Helicobacter mustelae* comb-nov, respectively. *Int J Sys Physiol.*, 39, pp. 397-405.
- Goodwin AC, Weinberger DM, Ford CB, Nelson JC, Snider JD, Hall JD, Paules CI, Peek RM Jr, Forsyth MH.** 2008. Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction system. *Microbiology*, 154(Pt 8), pp. 2231-40.
- Granstrom M, Lehours P, Bengtsson C, Mégraud F.** 2008. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 13 (1), pp. 7-12.
- 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.
- Grandvalet C, de Crécy-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.
- Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner KP, Schlapbach R, Yamaoka Y, Kraft C, Suerbaum S, Meyer TF, Achtman M.** 2005. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet.*, 1(4), pp. e43.
- Grebe TW, Stock JB.** 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol.*, 41, pp. 139-227. Review.
- Gross CA, Chan CL, Lonetto MA.** 1996. A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 351(1339), pp. 475-82. Review.
- Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, Miller SI.** 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol.*, 27(6), pp. 1171-82.

- Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI.** 1997. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science*, 276(5310), pp. 250-3.
- Gupta SS, Borin BN, Cover TL, Krezel AM.** 2008. Structural analysis of the DNA-binding domain of the *Helicobacter pylori* response regulator ArsR. *J Biol Chem.*, Dec 30. [Epub ahead of print]
- Gussin GN, Ronson CW, Ausubel FM.** 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu Rev Genet.*, 20, pp. 567-91. Review.
- Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH.** 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol.*, 8(6), pp. 505-9.
- Haas R, Meyer TF, van Putten JP.** 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.
- Halkides CJ, McEvoy MM, Casper E, Matsumura P, Volz K, Dahlquist FW.** 2000. The 1.9 Å resolution crystal structure of phosphono-CheY, an analogue of the active form of the response regulator, CheY. *Biochemistry*, 39(18), pp. 5280-6.
- Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H, Mühlenhoff M, Borrow R, Fox A, van Putten J, Zollinger WD, Gerardy-Schahn R, Frosch M.** 1996. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol.*, 20(6), pp. 1211-20.
- Hamoen LW, Van Werkhoven AF, Venema G, Dubnau D.** 2000. The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(16), pp. 9246-51.
- Harris AG, Hinds FE, Beckhouse AG, Kolesnikow T, Hazell SL.** 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(Pt 12), pp. 3813-25.
- Harrison PM, Arosio P.** 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.*, 1275(3), pp. 161-203. Review.
- Hazell SL, Evans DJ Jr, Graham DY.** 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol.*, 137(1), pp. 57-61.
- Helmann JD, Chamberlin MJ.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem.*, 57, pp. 839-72. Review.
- Hegarty JP, Dowd MT, Baker KH.** 1999. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J Appl Microbiol.*, 87(5), pp. 697-701.
- Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M.** 2002a. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(22), pp. 14428-33.
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M.** 2002b. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 295(5555), pp. 683-6.
- Hirakawa H, Nishino K, Yamada J, Hirata T, Yamaguchi A.** 2003. Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.*, 52(4), pp. 576-82.
- Hoch JA.** 1998. Initiation of bacterial development. *Curr Opin Microbiol.*, 1(2), pp. 170-4. Review.
- Hoch JA, Varughese KI.** 2001. Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol.*, 183(17), pp. 4941-9. Review.
- Hong W, Sano K, Morimatsu S, Scott DR, Weeks DL, Sachs G, Goto T, Mohan S, Harada F, Nakajima N, Nakano T.** 2003. Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.*, 52(Pt 3), pp. 211-6.
- Hong E, Lee HM, Ko H, Kim DU, Jeon BY, Jung J, Shin J, Lee SA, Kim Y, Jeon YH, Cheong C, Cho HS, Lee W.** 2007. Structure of an atypical orphan response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *J Biol Chem.*, 282(28), pp. 20667-75.
- Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH.** 2003. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology.*, 125(6), pp. 1636-44.
- Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA.** 1998. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 66(9), pp. 4061-7.
- Humbert O, Salama NR.** 2008. The *Helicobacter pylori* HpyAXII restriction-modification system limits exogenous DNA uptake by targeting GTAC sites but shows asymmetric conservation of the DNA methyltransferase and restriction endonuclease components. *Nucleic Acids Res.*, 36(21), pp. 6893-906.

- Husson MO, 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 HC, Sheen J.** 2002. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 129(2), pp. 500-15. Review.
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279(5349), pp. 373-7.
- Ilver D, Barone S, Mercati D, Lupetti P, Telford JL.** 2004. *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol.*, 6(2), pp. 167-74.
- Ishii S, Kihara Y, Shimizu T.** 2005. Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem.*, 280(10), pp. 9083-7.
- Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, Tham KT, Camorlinga M, Blaser MJ, Falkow S, Peek RM 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.
- Iyer R, Williams C, Miller C.** 2003. Arginine-agsmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 185(22), pp. 6556-61.
- Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, 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 IJ, Maddock JR, 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.
- Jafri NS, Hornung CA, Howden CW.** 2008. Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for *Helicobacter pylori* infection in patients naive to treatment. *Ann Intern Med.*, 148(12), pp. 923-31. Erratum in: *Ann Intern Med.*, 149(6), p. 439.
- Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor DE.** 1996. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol.*, 20(4), pp. 833-42.
- Jiménez-Pearson MA, Delany I, Scarlato V, Beier D.** 2005. Phosphate flow in the chemotactic response system of *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 151(Pt 10), pp. 3299-311.
- Jordan PM, Sehra JS.** 1979. The biosynthesis of uroporphyrinogen III: order of assembly of the four porphobilinogen molecules in the formation of the tetrapyrrole ring. *FEBS Lett.*, 104(2), pp. 364-6.
- Jordan PM, Berry A.** 1980. Preuroporphyrinogen, a universal intermediate in the biosynthesis of uroporphyrinogen III. *FEBS Lett.*, 112(1), pp. 86-8.
- Josenhans C, Eaton KA, Thevenot T, Suerbaum S.** 2000. Switching of flagellar motility in *Helicobacter pylori* by reversible length variation of a short homopolymeric sequence repeat in *fljP*, a gene encoding a basal body protein. *Infect Immun.*, 68(8), pp. 4598-603.
- Josenhans C, Suerbaum S.** 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol.*, 291(8), pp. 605-14. Review.
- Josenhans C, Niehus E, Amersbach S, Hörster A, Betz C, Drescher B, Hughes KT, Suerbaum S.** 2002. Functional characterization of the antagonistic flagellar late regulators FljA and FljM of *Helicobacter pylori* and their effects on the H. pylori transcriptome. *Mol Microbiol.*, 43(2), pp. 307-22.
- Joyce EA, Bassler BL, Wright A.** 2000. Evidence for a signaling system in *Helicobacter pylori*: detection of a *luxS*-encoded autoinducer. *J Bacteriol.*, 182(13), pp. 3638-43.
- Jung K, Altendorf K.** 1998. Individual substitutions of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* modulate the ratio of kinase to phosphatase activity. *J Biol Chem.*, 273(41), pp. 26415-20.
- Kallipolitis BH, Ingmer H.** 2001. *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett.*, 204(1), pp. 111-5.
- Kavermann H, Burns BP, Angermüller 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.
- Kern D, Volkman BF, Luginbühl P, Nohaile MJ, Kustu S, Wemmer DE.** 1999. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature*, 402(6764), pp. 894-8.
- Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE.** 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol.*, 31(1), pp. 31-43.

- Khamri W, Moran AP, Worku ML, Karim QN, Walker MM, Annuk H, Ferris JA, Appelmeik BJ, Eggleton P, Reid KB, Thursz MR.** 2005. Variations in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein D. *Infect Immun.*, 73(11), pp. 7677-86.
- Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS.** 1999. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J Bacteriol.*, 181(22), pp. 6969-76.
- Kim D, Forst S.** 2001. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology*, 147(Pt 5), pp. 1197-212.
- Kim N, Marcus EA, Wen Y, Weeks DL, Scott DR, Jung HC, Song IS, Sachs G.** 2004. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect Immun.*, 72(4), pp. 2358-68.
- Kimura M, Goto S, Wada A, Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Hirayama T, Kondo T.** 1999. Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog.*, 26(1), pp. 45-52.
- 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 LF, Porter N, Stickel S, Byrd D, Posfai J, Roberts RJ.** 2000. Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Res.*, 28(17), pp. 3216-23.
- König J, Bock A, Perraud AL, Fuchs TM, Beier D, Gross R.** 2002. Regulatory factors of *Bordetella pertussis* affecting virulence gene expression. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 4(3), pp. 197-203. Review.
- Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, Rosenberg M, Brown JR.** 2000. Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol.*, 17(12), pp. 1956-70.
- Kostrzynska M, Betts JD, Austin JW, Trust TJ.** 1991. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J Bacteriol.*, 173(3), pp. 937-46.
- Krokan HE, Standal R, Slupphany G.** 1997. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J.*, 325(Pt1), pp. 1-16. Review.
- Kuipers EJ, Lee A, Klinkenberg-Knol EC, Meuwissen SG.** 1995a. Review article: the development of atrophic gastritis--*Helicobacter pylori* and the effects of acid suppressive therapy. *Aliment Pharmacol Ther.*, 9(4), pp. 331-40. Review.
- Kuipers EJ, Pérez-Pérez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ.** 1995b. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst.*, 87(23), pp. 1777-80.
- Kuipers EJ.** 1998. Review article: Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther.*, 12 Suppl 1, pp. 25-36. Review.
- Kullberg MC, Ward JM, Gorelick PL, Caspar P, Hieny S, Cheever A, Jankovic D, Sher A.** 1998. *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun.*, 66(11), pp. 5157-66.
- Kunst F, Pascal M, Lepesant-Kejzlarova J, Lepesant JA, 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. No abstract available.
- Kuo CH, Wang WC.** 2003. Binding and internalization of *Helicobacter pylori* VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 303(2), pp. 640-4.
- Kuper C, Jung K.** 2005. CadC-mediated activation of the *cadBA* promoter in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 10(1), pp. 26-39.
- Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, Misselwitz R, Berger J, Sewald N, König W, Backert S.** 2007. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, 449(7164), pp. 862-6.
- Laber B, Maurer W, Scharf S, Stepusin K, Schmidt FS.** 1999. Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate by PdxA and PdxJ protein. *FEBS Lett.*, 449(1), pp. 45-8.
- Labigne A, Cussac V, Courcoux P.** 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol.*, 173(6), pp. 1920-31.
- Laub MT, Chen SL, Shapiro L, McAdams HH.** 2002. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(7), pp. 4632-7.
- Laub MT, Goulian M.** 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet.*, 41, pp. 121-45. Review.

- Le Breton Y, Boël G, Benachour A, Prévost H, Auffray Y, Rincé A.** 2003. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* two-component signal transduction pathways related to environmental stresses. *Environ Microbiol.*, 5(5), pp. 329-37.
- Lee SY, Cho HS, Pelton JG, Yan D, Henderson RK, King DS, Huang L, Kustu S, Berry EA, Wemmer DE.** 2001. Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. *Nat Struct Biol.*, 8(1), pp. 52-6.
- Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C.** 2003. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect.*, 5(15), pp. 1345-56.
- Lee HW, Choe YH, Kim DK, Jung SY, Lee NG.** 2004. Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics*, 4(7), pp. 2014-27.
- Lee MJ, Liu CH, Wang SY, Huang CT, Huang H.** 2006. Characterization of the Soj/SpoJ chromosome segregation proteins and identification of putative parS sequences in *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 342(3), pp. 744-50.
- Lee HM, Hong E, Jeon BY, Kim DU, Byun JS, Lee W, Cho HS.** 2006. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of HP1043, a *Helicobacter pylori* orphan response regulator. *Biochim Biophys Acta.*, 1764(5), pp. 989-91.
- Lee YH, Kim JH, Bang IS, Park YK.** 2008. The membrane-bound transcriptional regulator CadC is activated by proteolytic cleavage in response to acid stress. *J Bacteriol.*, 190(14), pp. 5120-6.
- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.*, 26(2), pp. 93-9.
- Lewis RJ, Brannigan JA, Muchová K, Barák I, Wilkinson AJ.** 1999. Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein. *J Mol Biol.*, 294(1), pp. 9-15.
- 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.
- Li L, Jia Y, Hou Q, Charles TC, Nester EW, Pan SQ.** 2002. A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(19), pp. 12369-74.
- Lilie H, Schwarz E, Rudolph R.** 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol.*, 9(5), pp. 497-501.
- Lin LF, Posfai J, Roberts RJ, Kong H.** 2001. Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(5), pp. 2740-5.
- Lin TL, Shun CT, Chang KC, Wang JT.** 2004. Isolation and characterization of a HpyC1I restriction-modification system in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.*, 279(12), pp. 11156-62.
- Lindén S, Nordman H, Hedenbro J, Hurtig M, Borén T, Carlstedt I.** 2002. Strain- and blood group-dependent binding of *Helicobacter pylori* to human gastric MUC5AC glycoforms. *Gastroenterology*, 123(6), pp. 1923-30. Erratum in: *Gastroenterology*, 124(2), p. 588.
- Lindén S, Mahdavi J, Hedenbro J, Borén T, Carlstedt I.** 2004. Effects of pH on *Helicobacter pylori* binding to human gastric mucins: identification of binding to non-MUC5AC mucins. *Biochem J.*, 384(Pt 2), pp. 263-70.
- Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M.** 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature.*, 445(7130), pp. 915-8.
- Liu MY, 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.
- Liu MY, Romeo T.** 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J Bacteriol.*, 179(14), pp. 4639-42.
- Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF 3rd, Oakford L, Yüksel U, Giedroc DP, Romeo T.** 1997. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 272(28), pp. 17502-10.
- Liu H, Prugnolle F, Manica A, Balloux F.** 2006. A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. *Am J Hum Genet.*, 79, pp. 230-237.
- Loewen PC, Carpena X, Rovira C, Ivancich A, Perez-Luque R, Haas R, Odenbreit S, Nicholls P, Fita I.** 2004. Structure of *Helicobacter pylori* catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 Å resolution. *Biochemistry.*, 43(11), pp. 3089-103.
- Loh JT, Forsyth MH, Cover TL.** 2004. Growth phase regulation of *flaA* expression in *Helicobacter pylori* is luxS dependent. *Infect Immun.*, 72(9), pp. 5506-10.

- Loh JT, Cover TL.** 2006. Requirement of histidine kinases HP0165 and HP1364 for acid resistance in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 74(5), pp. 3052-9.
- Low DA, Casadesús J.** 2008. Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr Opin Microbiol.*, 11(2), pp. 106-12.
- Lu J, Edwards RA, Wong JJ, Manchak J, Scott PG, Frost LS, Glover JN.** 2006. Protonation-mediated structural flexibility in the F conjugation regulatory protein, TraM. *EMBO J.*, 25(12), pp. 2930-9.
- Lu H, Wu JY, Beswick EJ, Ohno T, Odenbreit S, Haas R, Reyes VE, Kita M, Graham DY, Yamaoka Y.** 2007. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem.*, 282(9), pp. 6242-54.
- Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K.** 2003. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*, 425(6953), pp. 93-8.
- Lukat GS, Stock AM, Stock JB.** 1990. Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry*, 29(23), pp. 5436-42.
- Lukat GS, Lee BH, Mottonen JM, Stock AM, Stock JB.** 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 GS, McCleary WR, Stock AM, Stock JB.** 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.
- Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, Dallai R, Rappuoli R, Telford JL.** 1996. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol.*, 133(4), pp. 801-7.
- Ma S, Selvaraj U, Ohman DE, Quarless R, Hassett DJ, Wozniak DJ.** 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.
- Ma Z, Richard H, and Foster JW.** 2003. pH-dependent modulation of cyclic AMP levels and GadW-dependent repression of RpoS affect synthesis of the GadX regulator and *Escherichia coli* acid resistance. *J Bacteriol.*, 185, pp. 6852-6859.
- Maeda M, Lu S, Shaulsky G, Miyazaki Y, Kuwayama H, Tanaka Y, Kuspa A, Loomis WF.** 2004. Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science*, 304(5672), pp. 875-8.
- Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 297(5581), pp. 573-8.
- Malferteiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ.** 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56(6), pp. 772-81.
- Malmström BG, Leckner J.** 1998. The chemical biology of copper. *Curr Opin Chem Biol.*, 2(2), pp. 286-92. Review.
- Marcus EA, Moshfegh AP, Sachs G, Scott DR.** 2005. The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J Bacteriol.*, 187(2), pp. 729-38.
- Marczynski GT, Shapiro L.** 2002. Control of chromosome replication in *caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol.*, 56, pp. 625-56. Review.
- Marshall BJ, Warren JR.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390), pp. 1311-5.
- Marshall DG, Dundon WG, Beesley SM, Smyth CJ.** 1998. *Helicobacter pylori*-a conundrum of genetic diversity. *Microbiology*, 144 (Pt 11), pp. 2925-39. Review.
- Martin PK, Li T, Sun D, Biek DP, Schmid MB.** 1999. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.*, 181(12), pp. 3666-73.
- Martínez-Hackert E, Stock AM.** 1997a. The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure*, 5(1), pp. 109-24.
- Martínez-Hackert E, Stock AM.** 1997b. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol.*, 269(3), pp. 301-12. Review.
- Mascher T, Helmann JD, Unden G.** 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 70(4), pp. 910-38. Review.

- McClain MS, Iwamoto H, Cao P, Vinion-Dubiel AD, Li Y, Szabo G, Shao Z, Cover TL.** 2003. Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem.*, 278(14), pp. 12101-8.
- McCleary WR, Stock JB.** 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem.*, 269(50), pp. 31567-72.
- McDaniel TK, Dewalt KC, Salama NR, Falkow S.** 2001. New approaches for validation of lethal phenotypes and genetic reversion in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 6(1), pp. 15-23.
- McGowan CC, Necheva A, Thompson SA, Cover TL, Blaser MJ.** 1998. Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.*, 30(1), pp. 19-31.
- McGuirl MA, Dooley DM.** 1999. Copper-containing oxidases. *Curr Opin Chem Biol.*, 3(2), pp. 138-44. Review.
- Mehta N, Olson JW, Maier RJ.** 2003. Characterization of *Helicobacter pylori* nickel metabolism accessory proteins needed for maturation of both urease and hydrogenase. *J Bacteriol.*, 185(3), pp. 726-34.
- Merrell DS, Camilli A.** 1999. The cadA gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol Microbiol.*, 34, pp. 836-849.
- Merrell DS, Camilli A.** 2000. Regulation of *Vibrio cholerae* genes required for acid tolerance by a member of the "ToxR-like" family of transcriptional regulators. *J Bacteriol.*, 182, pp. 2342-2350.
- Merrell DS, Goodrich ML, Otto G, Tompkins LS, Falkow S.** 2003a. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 71(6), pp. 3529-39.
- Merrell DS, Thompson LJ, Kim CC, Mitchell H, Tompkins LS, Lee A, Falkow S.** 2003b. Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect Immun.*, 71(11), pp. 6510-25.
- Miehlke S, Reddy R, Osato MS, Ward PP, Conneely OM, Graham DY.** 1996. Direct activity of recombinant human lactoferrin against *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.*, 34(10), pp. 2593-4.
- Miehlke S, Genta RM, Graham DY, Go MF.** 1999. Molecular relationships of *Helicobacter pylori* strains in a family with gastroduodenal disease. *Am J Gastroenterol.*, 94(2), pp. 364-8.
- Miller RA, Britigan BE.** 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.*, 10(1), pp. 1-18. Review.
- Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ.** 1989. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86(13), pp. 5054-8.
- Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C.** 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell.*, 10(4), pp. 745-55.
- Mimuro H, Suzuki T, Nagai S, Rieder G, Suzuki M, Nagai T, Fujita Y, Nagamatsu K, Ishijima N, Koyasu S, Haas R, Sasakawa C.** 2007. *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe.*, 2(4), pp. 250-63.
- Mitchell HM, Hu P, Chi Y, Chen MH, Li YY, Hazell SL.** 1998. A low rate of reinfection following effective therapy against *Helicobacter pylori* in a developing nation (China). *Gastroenterology*, 114(2), pp. 256-61.
- Mizuno T.** 1998. His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem.*, 123(4), pp. 555-63. Review.
- Mobley HL, Island MD, Hausinger RP.** 1995a. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.*, 59(3), pp. 451-80. Review.
- Mobley HL, Garner RM, Bauerfeind P.** 1995b. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA*: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol Microbiol.*, 16(1), pp. 97-109.
- Mobley HL, Garner RM, Chippendale GR, Gilbert JV, Kane AV, Plaut AG.** 1999. Role of Hpn and NixA of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to bismuth and other metal ions. *Helicobacter*, 4(3), pp. 162-9.
- Moese S, Selbach M, Kwok T, Brinkmann V, König W, Meyer TF, Backert S.** 2004. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun.*, 72(6), pp. 3646-9.
- Molinari M, Galli C, de Bernard M, Norais N, Ruysschaert JM, Rappuoli R, Montecucco C.** 1998a. The acid activation of *Helicobacter pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. *Biochem Biophys Res Commun.*, 248(2), pp. 334-40.
- Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, Montecucco C.** 1998b. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med.*, 187(1), pp. 135-40.
- Moll G, Papini E, Colonna R, Burrone D, Telford J, Rappuoli R, Montecucco C.** 1995. Lipid interaction of the 37-kDa and 58-kDa fragments of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Eur J Biochem.*, 234(3), pp. 947-52.

- 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.
- Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA.** 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem.*, 267(10), pp. 2871-81.
- Molloy MP, Phadke ND, Maddock JR, Andrews PC.** 2001. Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis*, 22(9), pp. 1686-96.
- Moran AP, Knirel YA, Senchenkova SN, Widmalm G, Hynes SO, Jansson PE.** 2002. Phenotypic variation in molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in Lewis(x) and Lewis(y) expression by *H. Pylori* lipopolysaccharides. *J Biol Chem.*, 277(8), pp. 5785-95.
- Morbiato L, Tombola F, Campello S, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E.** 2001. Vacuolation induced by VacA toxin of *Helicobacter pylori* requires the intracellular accumulation of membrane permeant bases, Cl(-) and water. *FEBS Lett.*, 508(3), pp. 479-83.
- 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.
- Mullis KB, Faloona FA.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, pp. 335-50. No abstract available.
- Muotiala A, Helander IM, Pyhälä L, Kosunen TU, Moran AP.** 1992. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.*, 60(4), pp. 1714-6.
- Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM Jr, Azuma T, Hatakeyama M.** 2007. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, 26(32), pp. 4617-26.
- Murphy GL, Connell TD, Barritt DS, Koomey M, Cannon JG.** 1989. Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence. *Cell*, 56(4), pp. 539-47.
- Myakishev MV, Kapaadze GI, Shaikhayev GO, Georgiev GP, Beritashvili DR.** 1995. Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. www.ras/biogen/blood.html.
- Needham JV, Chen TY, Falke JJ.** 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.
- Nagata K, Tsukita S, Tamura T, Sone N.** 1996. A cb-type cytochrome-c oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 142(Pt 7), pp. 1757-63.
- Nakao K, Imoto I, Gabazza EC, Yamauchi K, Yamazaki N, Taguchi Y, Shibata T, Takaji S, Ikemura N, Misaki M.** 1997a. Gastric juice levels of lactoferrin and *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.*, 32(6), pp. 530-4.
- Nakao K, Imoto I, Ikemura N, Shibata T, Takaji S, Taguchi Y, Misaki M, Yamauchi K, Yamazaki N.** 1997b. Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection and with the degree of gastric inflammation. *Am J Gastroenterol.*, 92(6), pp. 1005-11.
- Nakayama M, Kimura M, Wada A, Yahiro K, Ogushi K, Niidome T, Fujikawa A, Shirasaka D, Aoyama N, Kurazono H, Noda M, Moss J, Hirayama T.** 2004. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J Biol Chem.*, 279(8), pp. 7024-8.
- Nedenskov-Sørensen P, Bukholm G, Bøvre K.** 1990. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis.*, 161(2), pp. 365-6.
- Niehus E, Gressmann H, Ye F, Schlapbach R, Dehio M, Dehio C, Stack A, Meyer TF, 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.
- Nies DH.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*, 27(2-3), pp. 313-39. Review.
- Nilsson C, Skoglund A, Moran AP, Annuk H, Engstrand L, Normark S.** 2008. Lipopolysaccharide diversity evolving in *Helicobacter pylori* communities through genetic modifications in fucosyltransferases. *PLoS ONE*, 3(11), e3811.
- Ninfa EG, Atkinson MR, Kamberov ES, Ninfa AJ.** 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J Bacteriol.*, 175(21), pp. 7024-32.
- Nishino K, Yamaguchi A.** 2001. Overexpression of the response regulator evgA of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters. *J Bacteriol.*, 183(4), pp. 1455-8.

- Nishino K, Inazumi Y, Yamaguchi A.** 2003. Global analysis of genes regulated by EvgA of the two-component regulatory system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 185(8), pp. 2667-72.
- Nishino K, Honda T, Yamaguchi A.** 2005. Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J Bacteriol.*, 187(5), pp. 1763-72.
- Nishino K, Hsu FF, Turk J, Cromie MJ, Wösten MM, Groisman EA.** 2006. Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Mol Microbiol.*, 61(3), pp. 645-54.
- Ng WL, Tsui HC, Winkler ME.** 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.
- 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.
- 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, Püls 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, Faller G, Haas R.** 2002. Role of the *alpAB* proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int J Med Microbiol.*, 292(3-4), pp. 247-56.
- Ogura M, Yamaguchi H, Yoshida Ki, Fujita Y, Tanaka T.** 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.*, 29(18), pp. 3804-13.
- Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, Cordum HS, Wang C, Elliott G, Edwards J, Mardis ER, Engstrand LG, Gordon JI.** 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(26), pp. 9999-10004.
- Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M.** 2008. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(3), pp. 1003-8.
- Olson JW, Agar JN, Johnson MK, Maier RJ.** 2000. Characterization of the NifU and NifS Fe-S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry.*, 39(51), pp. 16213-9.
- Olson JW, Mehta NS, Maier RJ.** 2001. Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.*, 39(1), pp. 176-82. Erratum in: *Mol Microbiol.*, 40(1), p. 270.
- Olson JW, Maier RJ.** 2002. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science*, 298(5599), pp. 1788-90.
- Osaki T, Hanawa T, Manzoku T, Fukuda M, Kawakami H, Suzuki H, Yamaguchi H, Yan X, Taguchi H, Kurata S, Kamiya S.** 2006. Mutation of *luxS* affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J Med Microbiol.*, 55(Pt 11), pp. 1477-85.
- Oshima T, Aiba H, Masuda Y, Kanaya S, Sugiura M, Wanner BL, 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.
- Ota H, Nakayama J, Momose M, Hayama M, Akamatsu T, Katsuyama T, Graham DY, Genta RM.** 1998. *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch.*, 433(5), pp. 419-26.
- O'Toole, P W; Kostrzynska, M; Trust, T J.** 1994. Non-motile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. *Mol Microbiol.*, 14, pp. 691-703.
- Owen RJ.** 1995. Bacteriology of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin Gastroenterol.*, 9(3), pp. 415-46. Review.
- Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S.** 1981. pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta.*, 650, 151-166.
- Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burrone D, Cover TL, Papini E, Rappuoli R, Telford JL, Reytrat JM.** 1998. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(17), pp. 10212-7.
- Pang AS, Nathoo S, Wong SL.** 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.
- Pantel K, Dietz P, Haas R, Beier D.** 2003. Two-component systems of *Helicobacter pylori* contribute to virulence in a mouse infection model. *Infect Immun.*, 71(9), pp. 5381-5.
- Papini E, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, 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.

- Park SR, Mackay WG, Reid DC.** 2001. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res.*, 35(6), pp. 1624-6.
- Park JU, Song JY, Kwon YC, Chung MJ, Jun JS, Park JW, Park SG, Hwang HR, Choi SH, Baik SC, Kang HL, Youn HS, Lee WK, Cho MJ, Rhee KH.** 2005. Effect of the urease accessory genes on activation of the *Helicobacter pylori* urease apoprotein. *Mol Cells*, 20(3), pp. 371-7.
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG.** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403(6770), pp. 665-8.
- Parkinson JS, Kofoid EC.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.*, 26:71-112. Review.
- Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Friedman GD.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med.*, 330(18), pp. 1267-71.
- Parsonnet J, Friedman GD, 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, Isaacson PG.** 2004. Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med.*, 350(3), pp. 213-5.
- Pattis I, Weiss E, Laugks R, Haas R, Fischer W.** 2007. The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology*, 153(Pt 9), pp. 2896-909.
- Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, 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.
- Pelton JG, Kustu S, Wemmer DE.** 1999. Solution structure of the DNA-binding domain of NtrC with three alanine substitutions. *J Mol Biol.*, 292(5), pp. 1095-110.
- Perego M, Hanstein C, Welsh KM, Djavakhishvili T, Glaser P, Hoch JA.** 1994. Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell*, 79(6), pp. 1047-55.
- Perego M, Glaser P, Hoch JA.** 1996. Aspartyl-phosphate phosphatases deactivate the response regulator components of the sporulation signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.*, 19(6), pp. 1151-7. Review.
- Perego M.** 1998. Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol.*, 6(9), pp. 366-70. Review.
- Pereira L, Hoover TR.** 2005. Stable accumulation of sigma54 in *Helicobacter pylori* requires the novel protein HP0958. *J Bacteriol.*, 187(13), pp. 4463-9.
- Perez JC, Groisman EA.** 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.*, 63(1), pp. 283-93.
- Pesci EC, Pickett CL.** 1994. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Gene*, 143(1), pp. 111-6.
- Peterson WL.** 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med.*, 324(15), pp. 1043-8. Review.
- Pettersson A, Maas A, van Wassenaar D, van der Ley P, Tommassen J.** 1995. Molecular characterization of FrpB, the 70-kilodalton iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.*, 63(10), pp. 4181-4.
- 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, 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.
- Pflock M, Finsterer N, Joseph B, Mollenkopf H, Meyer TF, Beier D.** 2006. Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J Bacteriol.*, 188(10), pp. 3449-62.
- Pflock M, Bathon M, Schär J, Müller S, Mollenkopf H, Meyer TF, Beier D.** 2007a. The orphan response regulator HP1021 of *Helicobacter pylori* regulates transcription of a gene cluster presumably involved in acetone metabolism. *J Bacteriol.*, 189(6), pp. 2339-49.
- Pflock M, Müller S, Beier D.** 2007b. The CrdRS (HP1365-HP1364) two-component system is not involved in pH-responsive gene regulation in the *Helicobacter pylori* Strains 26695 and G27. *Curr Microbiol.*, 54(4), pp. 320-4.
- Popescu A, Karpay A, Israel DA, Peek RM Jr, Krezel AM.** 2005. *Helicobacter pylori* protein HP0222 belongs to Arc/MetJ family of transcriptional regulators. *Proteins*, 59(2), pp. 303-11.

- Poppe M, Feller SM, Römer G, Wessler S.** 2007. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene*, 26(24), pp. 3462-72.
- Prinz C, Schöniger M, Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rösch T, Schepp W, Gerhard M.** 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.*, 61(5), pp. 1903-9.
- Psakis G, Saidijam M, Shibayama K, Polaczek J, Bettaney KE, Baldwin JM, Baldwin SA, Hope R, Essen LO, Essenberg RC, Henderson PJ.** 2009. The sodium-dependent D-glucose transport protein of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.*, 71(2), pp. 391-403.
- Queralt N, Bartolomé R, Araujo R.** 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J Appl Microbiol.*, 98(4), pp. 889-95.
- Queralt N, Araujo R.** 2007. Analysis of the survival of *H. pylori* within a laboratory-based aquatic model system using molecular and classical techniques. *Microb Ecol.*, 54(4), pp. 771-7.
- Quisel JD, Lin DC, Grossman AD.** 1999. Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell*, 4(5), pp. 665-72.
- Quisel JD, Grossman AD.** 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.
- Quon KC, Marczyński GT, Shapiro L.** 1996. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell*, 84(1), pp. 83-93.
- Raczko AM, Bujnicki JM, Pawlowski M, Godlewska R, Lewandowska M, Jagusztyn-Krynicka EK.** 2005. Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria. *Microbiology*, 151(Pt 1), pp. 219-31.
- Rader BA, Campagna SR, Semmelhack MF, Bassler BL, Guillemin K.** 2007. The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 189(17), pp. 6109-17.
- Radu CG, Nijagal A, McLaughlin J, Wang L, Witte ON.** 2005. Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(5), pp. 1632-7.
- Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, Lenzen G, Petel F, Wojcik J, Schächter V, Chemama Y, Labigne A, Legrain P.** 2001. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*, 409(6817), pp. 211-5. Erratum in: *Nature*, 409(6820), p. 553. *Nature*, 409(6821), p. 743.
- Reeve JN, et al.** 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol.*, 179(22), pp. 7135-55.
- Régnier P, Arraiano CM.** 2000. Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays*, 22(3), pp. 235-44. Review.
- Reid AN, Pandey R, Palyada K, Naikare H, Stintzi A.** 2008. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. *Appl Environ Microbiol.*, 74(5), pp. 1583-97.
- Reisenauer A, Kahng LS, McCollum S, Shapiro L.** 1999. Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator? *J Bacteriol.*, 181(17), pp. 5135-9. Review.
- Reitzer L.** 2003. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.*, 57, pp. 155-76. Review.
- Rektorschek M, Weeks D, Sachs G, Melchers K.** 1998. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 115(3), pp. 628-41.
- Rektorschek M, Buhmann A, Weeks D, Schwan D, Bensch KW, Eskandari S, Scott D, Sachs G, Melchers K.** 2000. Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier. *Mol Microbiol.*, 36(1), pp. 141-52.
- Ren S, Higashi H, Lu H, Azuma T, Hatakeyama M.** 2006. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol Chem.*, 281(43), pp. 32344-52.
- Reyrat JM, Lanzavecchia S, Lupetti P, de Bernard M, Pagliaccia C, Pelicic V, Charrel M, Olivieri C, Norais N, Ji X, Cabiliaux V, Papini E, Rappuoli R, Telford JL.** 1999. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J Mol Biol.*, 290(2), pp. 459-70.
- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC.** 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, 133(3), pp. 926-36.

- Robinson VL, Buckler DR, Stock AM.** 2000. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol.* 7(8), pp. 626-33. Review.
- Roche N, Angström J, Hurtig M, Larsson T, Borén T, Teneberg S.** 2004. *Helicobacter pylori* and complex gangliosides. *Infect Immun.* 72(3), pp. 1519-29.
- Romeo T, Gong M, Liu MY, Brun-Zinkernagel AM.** 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.
- 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. Review.
- Roncarati D, Spohn G, Tango N, Danielli A, Delany I, Scarlato V.** 2007a. Expression, purification and characterization of the membrane-associated HrcA repressor protein of *Helicobacter pylori*. *Protein Expr Purif.* 51(2), pp. 267-75.
- Roncarati D, Danielli A, Spohn G, Delany I, Scarlato V.** 2007b. Transcriptional regulation of stress response and motility functions in *Helicobacter pylori* is mediated by HspR and HrcA. *J Bacteriol.* 189(20), pp. 7234-43.
- Ronson CW, Nixon BT, Ausubel FM.** 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell.* 49(5), pp. 579-81.
- Rothenbacher D, Bode G, Brenner H.** 2000. *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet.* 355(9219), pp. 1998; author reply 1999.
- Rothenbücher MC, Facey SJ, Kiefer D, Kossmann M, Kuhn A.** 2006. The cytoplasmic C-terminal domain of the *Escherichia coli* KdpD protein functions as a K⁺ sensor. *J Bacteriol.* 188(5), pp. 1950-8.
- Rowland M, Drumm B.** 1998. Clinical significance of *Helicobacter infection* in children. *Br Med Bull.* 54(1), pp. 95-103. Review.
- Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B.** 2006. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 130(1), pp. 65-72.
- 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.
- Ryan KA, Karim N, Worku M, Moore SA, Penn CW, O'Toole PW.** 2005. HP0958 is an essential motility gene in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett.* 248(1), pp. 47-55.
- Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M.** 2007. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature.* 447(7142), pp. 330-3.
- Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR.** 2002. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol.* 65, pp. 349-69, Review.
- Sachs G, Weeks DL, Wen Y, Marcus EA, Scott DR, Melchers K.** 2005. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology (Bethesda)*, 20, pp. 429-38. Review.
- Sachs G, Kraut JA, Wen Y, Feng J, Scott DR.** 2006. Urea transport in bacteria: acid acclimation by gastric *Helicobacter* spp. *J Membr Biol.* 212(2), pp. 71-82. Review.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839), pp. 487-91.
- Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, 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 NR, Shepherd B, Falkow S.** 2004. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 186(23), pp. 7926-35.
- Salaün L, Linz B, Suerbaum S, Saunders NJ.** 2004. The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology.* 150(Pt 4), pp. 817-30.
- Salaün L, Ayraud S, Saunders NJ.** 2005. Phase variation mediated niche adaptation during prolonged experimental murine infection with *Helicobacter pylori*. *Microbiology.* 151(Pt 3), pp. 917-23.
- Salyers AA, Whitt DD.** 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. *ASM Press.*
- Sanabria-Valentín E, Colbert MT, Blaser MJ.** 2007. Role of futC slipped strand mispairing in *Helicobacter pylori* Lewisy phase variation. *Microbes Infect.* 9(14-15), pp. 1553-60.

- Sanders DA, Gillice-Castro BL, Stock AM, Burlingame AL, Koshland DE 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 AR.** 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74, pp. 5463-67.
- Sarkari J, Pandit N, Moxon ER, Achtman M.** 1994. Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol Microbiol.*, 13(2), pp. 207-17.
- Saunders NJ, Peden JF, Hood DW, Moxon ER.** 1998. Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol Microbiol.*, 27(6), pp. 1091-8.
- Schaaf S, Bott M.** 2007. Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.*, 189(14), pp. 5002-11.
- Schade C, Flemström G, Holm L.** 1994. Hydrogen ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and -inhibited rat gastric mucosa. *Gastroenterology*, 107(1), pp.180-8.
- Schär J, Sickmann A, Beier D.** 2005. Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 187(9), pp. 3100-9.
- Schär J.** 2006. Molekulare Charakterisierung der Response-Regulatoren ArsR (HP0166), HP1043 und HP1021 von *Helicobacter pylori*. Dissertation.
- 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.
- Schmitz A, Josenhans C, Suerbaum S.** 1997. Cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fibA* gene, which codes for a membrane protein involved in coordinated expression of flagellar genes. *J Bacteriol.*, 179(4), pp. 987-97.
- Schraw W, Li Y, McClain MS, van der Goot FG, Cover TL.** 2002. Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts. *J Biol Chem.*, 277(37), pp. 34642-50.
- Schreiber S, Nguyen TH, Konradt M, Scheid P.** 2003. Recovery from gastric mucus depletion in the intact guinea pig mucosa. *Scand J Gastroenterol.*, 38(11), pp. 1136-43.
- Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S.** 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(14), pp. 5024-9.
- Schreiter ER, Sintchak MD, Guo Y, Chivers PT, Sauer RT, Drennan CL.** 2003. Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol.*, 10(10), pp. 794-9.
- Schreiter ER, Wang SC, Zamble DB, Drennan CL.** 2006. NikR-operator complex structure and the mechanism of repressor activation by metal ions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(37), pp. 13676-81.
- Schröder HD, Ludwig C, Jakob W, Reischl U, Stolte M, Lehn N.** 1998. Chronic gastritis in tigers associated with *Helicobacter acinonyx*. *J Comp Pathol.*, 119(1), pp. 67-73.
- 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 DR, Weeks D, Hong C, Postius S, Melchers K, Sachs G.** 1998. The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 114(1), pp. 58-70.
- Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G.** 2002. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 123(1), pp. 187-95.
- Segal ED, Falkow S, Tompkins LS.** 1996. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(3), pp. 1259-64.
- Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS.** 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.
- Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S.** 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem.*, 277(9), pp. 6775-8.
- Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, 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 Lett.*, 431(3), pp. 347-50.

- Sewald X, Gebert-Vogl B, Prassl S, Barwig I, Weiss E, Fabbri M, Osicka R, Schiemann M, Busch DH, Semmrich M, Holzmann B, Sebo P, Haas R.** 2008. Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host Microbe*, 3(1), pp. 20-9.
- Sevvana M, Vijayan V, Zweckstetter M, Reinelt S, Madden DR, Herbst-Irmer R, Sheldrick GM, Bott M, Griesinger C, Becker S.** 2008. A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J Mol Biol*, 377(2), pp. 512-23.
- Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Aoki S, Machida Y.** 1993. Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *J Biol Chem*, 268(35), pp. 26552-8.
- Silver S.** 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene*, 179(1), pp. 9-19. Review.
- Simms SA, Keane MG, Stock J.** 1985. Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing. *J Biol Chem*, 260(18), pp. 10161-8.
- Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT.** 2005. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol*, 3(10), pp. e334.
- Skoglund A, Björkholm B, Nilsson C, Andersson AF, Jernberg C, Schirwitz K, Enroth C, Krabbe M, Engstrand L.** 2007. Functional analysis of the M.HpyAIV DNA methyltransferase of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 189(24), pp. 8914-21.
- Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H.** 1997. Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*. 25(5), pp. 989-98.
- Skouloubris S, Thiberge JM, 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.
- Smith DR, Doucette-Stamm LA, 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 JN, et al.** 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol*, 179(22), pp. 7135-55.
- Smoot DT, Resau JH, Earlington MH, Simpson M, Cover TL.** 1996. Effects of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on primary cultures of human gastric epithelial cells. *Gut*, 39(6), pp. 795-9.
- Snelling WJ, Moran AP, Ryan KA, Scully P, McGourty K, Cooney JC, Annuk H, O'Toole PW.** 2007. HorB (HP0127) is a gastric epithelial cell adhesin. *Helicobacter*, 12(3), pp. 200-9.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Apel AK, Martín JF.** 2008. Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res*, 36(4), pp. 1358-68.
- Solnick JV, Hansen LM, Syvanen M.** 1997. The major sigma factor (RpoD) from *Helicobacter pylori* and other gram-negative bacteria shows an enhanced rate of divergence. *J Bacteriol*, 179(19), pp. 6196-200.
- Solnick JV, Chang K, Canfield DR, Parsonnet J.** 2003. Natural acquisition of *Helicobacter pylori* infection in newborn rhesus macaques. *J Clin Microbiol*, 41(12), pp. 5511-6.
- Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, Syvanen M.** 2004. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), pp. 2106-11.
- Soncini FC, Groisman EA.** 1996. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol*. 178(23), pp. 6796-801.
- Spenny JG, Flemstrom G, Shoemaker RL, Sachs G.** 1975. Quantitation of conductance pathways in antral gastric mucosa. *J Gen Physiol*, 65(5), pp. 645-62.
- Spiegelhalter 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, Scarlato V.** 1999a. Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J Bacteriol*, 181(2), pp. 593-9.
- Spohn G, Scarlato V.** 1999b. The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, 34(4), pp. 663-74.
- Spohn G, Delany I, Rappuoli R, Scarlato V.** 2002. Characterization of the HspR-mediated stress response in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 184(11), pp. 2925-30.
- 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.

- Stähler FN, Ganter L, Lederer K, Kist M, Bereswill S.** 2005. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* carbonic anhydrases. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44(2), pp. 183-9.
- Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, 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.
- Stock AM, Mottonen JM, Stock JB, Schutt CE.** 1989. Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature*, 337(6209), pp. 745-9.
- Stock JB, Stock AM, Mottonen JM.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature*, 344(6265), pp. 395-400. Review.
- Stock AM, Martinez-Hackert E, Rasmussen BF, West AH, Stock JB, Ringe D, Petsko GA.** 1993. Structure of the Mg(2+)-bound form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry*, 32(49), pp. 13375-80.
- Stock AM, Mowbray SL.** 1995. Bacterial chemotaxis: a field in motion. *Curr Opin Struct Biol*, 5(6), pp. 744-51. Review.
- Stock J.** 1999. Signal transduction: Gyration protein kinases. *Curr Biol*, 9(10), pp. R364-7. Review.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, pp. 183-215. Review.
- Stojiljkovic I, Bäumlér AJ, 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. Erratum in: *J Mol Biol*, 240(3), p. 271.
- 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, 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.** 1995. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol*, 3(5), pp. 168-70.
- Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, Achtman M.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), pp. 12619-24.
- Suerbaum S, Josenhans C.** 1999. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Mol Med Today*, 5(1), pp. 32-9. Review.
- Suerbaum S.** 2000. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol*, 290(2), pp. 175-81. Review.
- Suerbaum S, Michetti P.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, 347(15), pp. 1175-86. Review.
- Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droge M, Fartmann B, Fischer HP, Ge Z, Horster A, Holland R, Klein K, König J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen Z, Weber J, Frosch M, Fox JG.** 2003. The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), pp. 7901-6.
- Sun J, Daniel R, Wagner-Döbler I, Zeng AP.** 2004. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol*, 4:36.
- Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL.** 2004. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(20), pp. 7727-32.
- Surette MG, Levit M, Liu Y, Lukat G, Ninfa EG, Ninfa A, Stock JB.** 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 MG, Miller MB, Bassler BL.** 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.
- Suzuki T, Murakami T, Iino R, Suzuki J, Ono S, Shirakihara Y, Yoshida M.** 2003. F₀F₁-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of epsilon subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. *J Biol Chem*, 278, pp. 46840-46846.
- Suzuki M, Mimuro H, Suzuki T, Park M, Yamamoto T, Sasakawa C.** 2005. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J Exp Med*, 202(9), pp. 1235-47.
- Suzuki K, Babitzke P, Kushner SR, Romeo T.** 2006. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev*, 20(18), pp. 2605-17.

- Swanson RV, Bourret RB, Simon MI.** 1993. Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol.*, 8(3), pp. 435-41.
- Szabò I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, 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.
- Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y.** 2008. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell Microbiol.*, 10(4), pp. 1008-20.
- Takata, T., R. Aras, D. Tavakoli, T. Ando, A. Z. Olivares, and M. J. Blaser.** 2002. Phenotypic and genotypic variation in methylases involved in type II restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.*, 30, pp. 2444-2452.
- Takayama K, Kjelleberg S.** 2000. The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ Microbiol.*, 2(4), pp. 355-65. Review.
- Tammer I, Brandt S, Hartig R, König W, Backert S.** 2007. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology*, 132(4), pp. 1309-19.
- Tanford C, Roxby R.** 1972. Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme. *Biochemistry*, 11(11), pp. 2192-8.
- Tannaes T, Dekker N, Bukholm G, Bijlsma JJ, Appelmek BJ.** 2001. Phase variation in the *Helicobacter pylori* phospholipase A gene and its role in acid adaptation. *Infect Immun.*, 69(12), pp. 7334-40.
- Taylor WR.** The classification of amino acid conservation. 1986. *J Theor Biol.*, 119, pp. 205-218;
- Taylor DE, Eaton M, Chang N, Salama SM.** 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol.*, (21), pp. 6800-6.
- Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, et al.** 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med.*, 179(5), pp. 1653-58.
- Tews I, Findeisen F, Sinning I, Schultz A, Schultz JE, Linder JU.** 2005. The structure of a pH-sensing mycobacterial adenyl cyclase holoenzyme. *Science.*, 308(5724), pp. 1020-3.
- The EUROGAST Study Group.** 1993. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet*, 341(8857), pp. 1359-62. Erratum in: *Lancet.*, 341(8861), p. 1668.
- Thiele I, Vo TD, Price ND, Palsson BØ.** 2005. Expanded metabolic reconstruction of *Helicobacter pylori* (iIT341 GSM/GPR): an in silico genome-scale characterization of single- and double-deletion mutants. *J Bacteriol.*, 187(16), pp. 5818-30.
- Thompson LJ, Merrell DS, Neilan BA, 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 JP, Koretke KK, Bryant AP, Ingraham KA, Chalker AF, Ge Y, Marra A, Wallis NG, Brown JR, Holmes DJ, Rosenberg M, Burnham MK.** 2000. A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.*, 35(3), pp. 566-76.
- Tkachenko MA, Zhannat NZ, Erman LV, Blashenkova EL, Isachenko SV, Isachenko OB, Graham DY, Malaty HM.** 2007. Dramatic changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 45(4), pp. 428-32.
- Tokito MK, 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 JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), pp. 539-47. Erratum in: *Nature*, 389(6649), p. 412.
- Tombola F, Carlesso C, Szabò I, de Bernard M, Reytrat JM, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M.** 1999. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys J.*, 76(3), pp. 1401-9.
- Toro-Roman A, Mack TR, Stock AM.** 2005. Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5-alpha5 face. *J Mol Biol.*, 349(1), pp. 11-26.

- 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.
- Trent MS, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR.** 2001. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem.*, 276(46), pp. 43122-31.
- Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa T.** 1994. 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.
- Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M.** 2003. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem.*, 278(6), pp. 3664-70.
- Tzeng YL, Hoch JA.** 1997. Molecular recognition in signal transduction: the interaction surfaces of the Spo0F response regulator with its cognate phosphorelay proteins revealed by alanine scanning mutagenesis. *J Mol Biol.*, 272(2), pp. 200-12.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ.** 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, Bergström J, Borén 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.*, 280(15), pp. 15390-7.
- Utt M, Danielsson B, Wadström T.** 2001. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binding to a putative cell surface receptor, heparan sulfate, studied by surface plasmon resonance. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 30(2), pp. 109-13.
- Vale FF, Vitor JM.** 2007. Genomic methylation: a tool for typing *Helicobacter pylori* isolates. *Appl Environ Microbiol.*, 73(13), pp. 4243-9.
- Van de Bovenkamp JH, Mahdavi J, Korteland-Van Male AM, Büller HA, Einerhand AW, Borén T, Dekker J.** 2003. The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter*, 8(5), pp. 521-32.
- Van den Brink GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J.** 2000. *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut*, 46(5), pp. 601-7.
- van der Ende A, Hopman CT, Zaat S, Essink BB, Berkhout B, Dankert J.** 1995. Variable expression of class 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between the -10 and -35 regions of the promoter. *J Bacteriol.*, 177(9), pp. 2475-80.
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W.** 1998. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 115(1), pp. 58-66.
- Vanet A, Marsan L, Labigne A, Sagot MF.** 2000. Inferring regulatory elements from a whole genome. An analysis of *Helicobacter pylori* sigma(80) family of promoter signals. *J Mol Biol.*, 297(2), pp. 335-53.
- van Vliet AH, Kuipers EJ, Waidner B, Davies BJ, de Vries N, Penn CW, Vandembroucke-Grauls CM, Kist M, Bereswill S, Kusters JG.** 2001. Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect Immun.*, 69(8), pp. 4891-7.
- van Vliet AH, Poppelaars SW, Davies BJ, Stoof J, Bereswill S, Kist M, Penn CW, Kuipers EJ, Kusters JG.** 2002. NikR mediates nickel-responsive transcriptional induction of urease expression in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 70(6), pp. 2846-52.
- van Vliet AH, Stoof J, Poppelaars SW, Bereswill S, Homuth G, Kist M, Kuipers EJ, Kusters JG.** 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 AH, Kuipers EJ, Stoof J, Poppelaars SW, Kusters JG.** 2004a. 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 AH, Ernst FD, Kusters JG.** 2004b. NikR-mediated regulation of *Helicobacter pylori* acid adaptation. *Trends Microbiol.*, 12(11), pp. 489-94.
- Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ.** 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.
- Veldhuyzen van Zanten SJ, Lee A.** 1999. The role of *Helicobacter pylori* infection in duodenal and gastric ulcer. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 241, pp. 47-56. Review.

- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL.** 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.*, 5(11), pp. 1166-74.
- Vitkute J, Stankevicius K, Tamulaitiene G, Maneliene Z, Timinskas A, Berg DE, Janulaitis A.** 2001. Specificities of eleven different DNA methyltransferases of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol.*, 183(2), pp. 443-50.
- Voland P, Weeks DL, Marcus EA, 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, Greiner S, Odenbreit S, Kavermann H, Velayudhan J, Stähler F, Guhl J, Bissé E, van Vliet AH, Andrews SC, Kusters JG, Kelly DJ, Haas R, Kist M, Bereswill S.** 2002a. Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun.*, 70(7), pp. 3923-9.
- Waidner B, Melchers K, Ivanov I, Loferer H, Bensch KW, Kist M, Bereswill S.** 2002b. Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants CrdA (HP1326), CrdB (HP1327), and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 184(23), pp. 6700-8.
- Waidner B, Melchers K, Stähler FN, 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. 4683-8.
- Walz A, Odenbreit S, Mahdavi J, Borén T, Ruhl S.** 2005. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology*, 15(7), pp. 700-8.
- Wang G, Ge Z, Rasko DA, Taylor DE.** 2000. Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. *Mol Microbiol.*, 36(6), pp. 1187-96. Review.
- TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor.
- Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Murata N, Kimura T, Kuwabara A, Wakamatsu K, Koizumi H, Uede T, Tsujimoto G, Kurose H, Sato T, Harada A, Misawa N, Tomura H, Okajima F.** 2004. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem.*, 279(44), pp. 45626-33.
- Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G.** 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 287(5452), pp. 482-5.
- Weeks DL, Sachs G.** 2001. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.*, 40(6), pp. 1249-59.
- Weeks DL, Gushansky G, Scott DR, Sachs G.** 2004. Mechanism of proton gating of a urea channel. *J Biol Chem.*, 279(11), pp. 9944-50.
- Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Prüss BM, 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 AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, Baker CS, 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 EA, Matrubutham U, Gleeson MA, Scott DR, Sachs G.** 2003. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.*, 71, pp. 5921-5939.
- Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G.** 2006. Involvement of the HP0165-HP0166 two-component system in expression of some acidic-pH-upregulated genes of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 188(5), pp. 1750-61.
- Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G.** 2007. The HP0165-HP0166 two-component system (ArsRS) regulates acid-induced expression of HP1186 alpha-carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori* by activating the pH-dependent promoter. *J Bacteriol.*, 189(6), pp. 2426-34.
- Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G.** 2009. The pH-responsive regulon of HP0244 (FlgS), the cytoplasmic histidine kinase of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.*, 191(2), pp. 449-60.
- Whitchurch CB, Alm RA, Mattick JS.** 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.
- Willhite DC, Cover TL, Blanke SR.** 2003. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. *J Biol Chem.*, 278(48), pp. 48204-9.

- Willhite DC, Blanke SR.** 2004. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol.*, 6(2), pp. 143-54.
- Williams SB, Stewart V.** 1997. Discrimination between structurally related ligands nitrate and nitrite controls autokinase activity of the NarX transmembrane signal transducer of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.*, 26(5), pp. 911-25.
- Wilson SA, Williams RJ, Pearl LH, Drew RE.** 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.
- Winkler ME, Hoch JA.** 2008. Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J Bacteriol.*, 190(8), pp. 2645-8.
- Winzer K, Hardie KR, Burgess N, Doherty N, Kirke D, Holden MT, Linforth R, Cornell KA, Taylor AJ, Hill PJ, Williams P.** 2002. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology.*, 148(Pt 4), pp. 909-22.
- 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.
- Wolin MJ, Wolin EA, Jacobs NJ.** 1961. Cytochrome-producing anaerobic *Vibrio succinogenes*, sp. n. *J Bacteriol.*, 81, pp. 911-7.
- Worst DJ, Otto BR, de Graaff J.** 1995. Iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* involved in heme uptake. *Infect Immun.*, 63(10), pp. 4161-5.
- Worst DJ, Gerrits MM, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG.** 1998. *Helicobacter pylori* ribBA-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition. *J Bacteriol.*, 180(6), pp. 1473-9.
- Worst DJ, Maaskant J, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG.** 1999. Multiple haem-utilization loci in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 145 (Pt 3), pp. 681-8. Erratum in: *Microbiology*, 145(Pt 4), p. 985.
- Wortinger M, Sackett MJ, Brun YV.** 2000. CtrA mediates a DNA replication checkpoint that prevents cell division in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.*, 19(17), pp. 4503-12.
- 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.
- Xia X, Palidwor G.** 2005. Genomic adaptation to acidic environment: evidence from *Helicobacter pylori*. *Am Nat.*, 166(6), pp. 776-84.
- Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, 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.
- Xiao B, Li W, Guo G, Li BS, Liu Z, Tang B, Mao XH, Zou QM.** 2008. Screening and identification of natural antisense transcripts in *Helicobacter pylori* by a novel approach based on RNase I protection assay. *Mol Biol Rep.*, Dec 23. [Epub ahead of print]
- Xiao B, Li W, Guo G, Li B, Liu Z, Jia K, Guo Y, Mao X, Zou Q.** 2009. Identification of small noncoding RNAs in *Helicobacter pylori* by a bioinformatics-based approach. *Curr Microbiol.* 58(3), pp. 258-63.
- Xu Q, Stickel S, Roberts RJ, Blaser MJ, Morgan RD.** 2000. Purification of the novel endonuclease, Hpy188I, and cloning of its restriction-modification genes reveal evidence of its horizontal transfer to the *Helicobacter pylori* genome. *J Biol Chem.*, 275(22), pp. 17086-93.
- 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, Niidome T, Aoyagi H, Yoshino K, 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. 19183-9.
- Yahiro K, Wada A, Yamasaki E, Nakayama M, Nishi Y, Hisatsune J, Morinaga N, Sap J, Noda M, Moss J, Hirayama T.** 2004. Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem.*, 279(49), pp. 51013-21.
- Yamaichi Y, Niki H.** 2000. Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(26), pp. 14656-61.
- Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY.** 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(13), pp. 7533-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(20), p. 11133.

- Yamaoka Y, Soucek J, Odenbreit S, Haas R, Arnqvist A, Borén T, Kodama T, Osato MS, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY.** 2002. Discrimination between cases of duodenal ulcer and gastritis on the basis of putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.*, 40(6), pp. 2244-6.
- Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HM, Reddy R, Arnqvist A, Graham DY.** 2006. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 55(6), pp. 775-81.
- 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.
- Ye W, Held M, Lagergren J, Engstrand L, Blot WJ, McLaughlin JK, Nyrén O.** 2004. *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *J Natl Cancer Inst.*, 96(5), pp. 388-96.
- Young GM, Amid D, Miller VL.** 1996. A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J Bacteriol.*, 78, pp. 6487-6495.
- Yuan ZC, Liu P, Saenkham P, Kerr K, Nester EW.** 2008. Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *J Bacteriol.*, 190(2), pp. 494-507.
- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR.** 2000. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(2), pp. 599-604.
- Zakharova N, Hoffman PS, Berg DE, Severinov K.** 1998. The largest subunits of RNA polymerase from gastric *helicobacters* are tethered. *J Biol Chem.*, 273(31), pp. 19371-4.
- Zakharova N, Paster BJ, Wesley I, Dewhirst FE, Berg DE, Severinov KV.** 1999. Fused and overlapping *rpoB* and *rpoC* genes in *Helicobacters*, *Campylobacters*, and related bacteria. *J Bacteriol.*, 181(12), pp. 3857-9.
- Zambelli B, Bellucci M, Danielli A, Scarlato V, Ciurli S.** 2007. The Ni²⁺ binding properties of *Helicobacter pylori* NikR. *Chem Commun (Camb)*, (35), pp. 3649-51.
- Zambelli B, Danielli A, Romagnoli S, Neyroz P, Ciurli S, Scarlato V.** 2008. High-affinity Ni²⁺ binding selectively promotes binding of *Helicobacter pylori* NikR to its target urease promoter. *J Mol Biol.*, 383(5), pp. 1129-43.
- Zapf J, Sen U, Madhusudan, Hoch JA, Varughese KI.** 2000. A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure*, 8(8), pp. 851-62.
- Zeaiter Z, Cohen D, Müsch A, Bagnoli F, Covacci A, Stein M.** 2008. Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol.*, 10(3), pp. 781-94.
- Zheng PY, Jones NL.** 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 Z, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Miller SI, Raetz CR.** 2001. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem.*, 276(46), pp. 43111-21.
- Zhou L, Lei XH, Bochner BR, Wanner BL.** 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol.*, 185(16), pp. 4956-72.
- Zhuang Z, Song F, Zhao H, Li L, Coo J, Eisenstein G, Herzberg O, Dunaway-Mariano D.** 2008. Divergence of function in the hot dog fold enzyme superfamily: the bacterial thioesterase YciA. *Biochemistry*, 47(9), pp. 2789-96.
- Zimmermann L, Hantke K, Braun V.** 1984. Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.*, 159(1), pp. 271-7.
- Zullo A, Lorenzetti R, Hassan C.** 2007. A quintuple therapy for *H. pylori* eradication. *Am J Gastroenterol.*, 102(11), pp. 2601.
- Zweiger G, Marczyński G, Shapiro L.** 1994. A *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisional cell. *J Mol Biol.*, 235(2), pp. 472-85.

H. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A	Alanin
A	Amper
Å	Ångström
α	alpha
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AI	Autoinduktor
AK	Anitkörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asp	Aspartatrest
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaar
BSA	Riderserumalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytidin
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
ca.	circa
CagA	Cytotoxin assoziiertes Protein A
cAMP	cyclisches Adenosintriphosphat
Ci	Curie
CM	Cytoplasmamembran
Cm	Chloramphenicol
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
C-terminal	carboxyterminal
d	2'-desoxy
D	Aspartat
Da	Dalton
d. h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
ϵ	Epsilon
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
Fe	Eisen
FP	French Press
g	Gramm
G	Guanosin
GERD	Refluxösophagitis
h	Stunde
H	Histidin/Histidinrest
H ₂ O	Wasser
<i>H. influenzae</i>	<i>Hämophilus influenzae</i>
<i>H. hepaticus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
His	Histidin/Histidinrest
HK	Histidin-Kinase
HTH	Helix-Turn-Helix
IAA	Isoamylalkohol
ID	Inputdomäne
IEP	isoelektrischer Punkt
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid
IS-Elemente	Insertionselemente
K	Kalium
k	Kilo-
Kan	Kanamycin
l	Liter
L	Luria-Bertani
Le	Lewis
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
m	Milli-
m	Meter
M	Marker
M	Molar
μ	Mikro-
MALT	Mukosa assoziiertes lymphoides Gewebe
Mbp	Mega Basenpaare
MCP	Methyl-accepting cheomotaxis protein
min	Minute
mind.	mindestens
MO	Mikroorganismen
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Asparagin
n	Nano-
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
Ni	Nickel
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
OM	äußere Membran
OMP	outer membrane protein, äußeres Membranprotein
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
p	Piko

P _{xy}	Promotor des Gens xy
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Primer Extension
pH	pondus hydrogenii
Pkt.	Punkt
Q	Glutamin
R	Arginin
RHH	Ribbon-Helix-Helix
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR	Response-Regulator
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
σ	Sigma
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	Transmitterdomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
T _M	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TSP	Transkriptionsstartpunkt
T4SS	Typ-IV-Sekretionssystem
U	Units
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheiten
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
V	Volt
VacA	Vakuolisierendes Cytotoxin A
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
<i>W. succinogenes</i>	<i>Wolinella succinogenes</i>
WT	Wildtyp
w/v	„weight per volume“
WW	Wechselwirkung
www	world wide web
z. B.	zum Beispiel

3. Publikationsliste

3.1 Originalarbeiten

Müller S, Götz M, Beier D.: H94 is involved in acid sensing by histidine kinase ArsS of *Helicobacter pylori*. (submitted)

Pflock M, Müller S, Beier D. (2007): The CrdRS (HP1365-HP1364) two-component system is not involved in pH-responsive gene regulation in the *Helicobacter pylori* Strains 26695 and G27.
Curr Microbiol. 2007 Apr;54(4):320-4.

Pflock M, Bathon M, Schär J, Müller S, Mollenkopf H, Meyer TF, Beier D. (2007): The orphan response regulator HP1021 of *Helicobacter pylori* regulates transcription of a gene cluster presumably involved in acetone metabolism. J Bacteriol. 2007 Mar;189(6):2339-49.

Müller S, Pflock M, Schär J, Kennard S, Beier D. (2007): Regulation of expression of atypical orphan response regulators of *Helicobacter pylori*. Microbiol Res. 2007;162(1):1-14.

Müller S, Förster J, Beier D. (2006): Repeated sequence motifs in the *Helicobacter pylori* P1408 promoter do not affect its transcription. Microbiol Res. 2006;161(3):212-21.

3.2 Posterpräsentation

Müller S, Beier D.: “Functional characterization of the input domain of the acid sensing histidine kinase ArsS from *Helicobacter pylori*” Young investigator symposium, Würzburg, 2007

3.3 Vorträge

“Functional characterisation of the input domain of the acid sensing histidine kinase ArsS from *H. pylori*”; 6. *Helicobacter pylori*-Workshop, Herrsching am Ammersee, 2007

„Funktionelle Charakterisierung des Säuresensors ArsS von *Helicobacter pylori*“; Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU München, auf Einladung von Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Oktober 2008

„Charakterisierung des ArsRS Zwei-Komponentensystems von *Helicobacter pylori* - ein Überblick“; ZIEL - Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung - Freising (TU-München), auf Einladung von Prof. Dr. S. Scherer, Dez. 2008