

Die Rolle von Mutation und
Rekombination in der Mikroevolution
von *Helicobacter pylori*

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

vorgelegt von
Christian Kraft
aus Lippstadt

Würzburg, 2004

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

Gutachter: Prof. Dr. Roy Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Entdeckung von <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2	Morphologie und Physiologie	3
1.3	Der Genus <i>Helicobacter</i>	5
1.4	Pathogenität und Virulenzfaktoren	8
1.4.1	<i>H. pylori</i> assoziierte Krankheitsbilder	8
1.4.2	Virulenzfaktoren	9
1.4.2.1	Vakuolisierendes Zytotoxin VacA	9
1.4.2.2	<i>cag</i> -Pathogenitätsinsel	10
1.4.2.3	Lipopolysaccharide und Membranproteine	11
1.4.2.4	Flagellen	12
1.5	Diagnostik und Therapie	12
1.6	Genetische Variabilität und natürliche Kompetenz	14
1.6.1	Chromosomale Variabilität	14
1.6.2	Genetische Variabilität	14
1.6.3	Natürliche Kompetenz und DNA-Aufnahme	15
1.6.4	Rekombination und Reparatur-Systeme	17
1.6.5	Restriktions- und Methylierungssysteme	17
1.7	Populationsstruktur von <i>H. pylori</i>	18
1.8	Tiermodelle	19
1.9	Ziele der Arbeit	21
2	Material	23
2.1	<i>Helicobacter</i> Bakterienstämme	23
2.1.1	<i>Helicobacter pylori</i> -Stammkollektive	23
2.1.2	<i>Helicobacter pylori</i> -Stämme für das 'in vitro'-Flüssigkultur-Modell	24
2.1.2.1	<i>H. pylori</i> -Wildtyp- und antibiotikaresistente Stämme	24
2.1.2.2	<i>H. pylori</i> -Mutanten des NER-Systems	24
2.1.3	<i>H. pylori</i> -Infektionsstämme für das Rhesusaffen-Tiermodell	24
2.1.4	<i>Helicobacter nemestrinae</i>	24
2.1.5	<i>Helicobacter acinonychis</i>	24
2.2	Medien	25

2.2.1	Feste Medien	25
2.2.2	Flüssigmedium	25
2.2.3	Ureasetest.....	25
2.2.4	Puffer für Southern Blot.....	26
2.2.5	Aufreinigung von Plasmiden.....	26
2.3	Marker	26
2.3.1	DNA-Marker: 1kb Plus DNA ladder	26
2.3.2	DIG-markierter DNA-Marker.....	26
2.4	Primer.....	27
2.4.1	RAPD-PCR	27
2.4.2	Amplifikation der partiellen 16S rDNA	27
2.4.3	Amplifikation von 'housekeeping'- und virulenzassoziierten Genen	27
2.4.3.1	Amplifikation der Kernfragmente.....	27
2.4.3.2	Zusätzliche Primer für die Sequenzierung	28
2.4.3.3	Amplifikation von <i>H. acinonychis</i> -Genen.....	28
2.4.3.4	Amplifikation der flankierenden Fragmente.....	29
2.4.4	'empty site'-PCR der Microarray-Evaluation.....	30
2.4.5	Amplifikation einer IS-Element-Sonde.....	32
2.4.6	Amplifikation eines Vektorinserts	32
2.4.7	Amplifikation von Antibiotika-resistenzverleihenden Genen.....	32
2.4.7.1	Amplifikation und Sequenzierung des <i>rpoB</i> -Gens.....	32
2.4.7.2	Amplifikation und Sequenzierung des <i>rpsL</i> -Gens	32
2.4.8	Primer für <i>H. pylori</i> 'knock out'-Mutanten.....	33
3	Methoden	34
3.1	Anzucht der Bakterien	34
3.1.1	Feste Medien	34
3.1.1.1	<i>Helicobacter</i> -Spezies	34
3.1.1.2	<i>Escherichia coli</i>	34
3.1.2	Flüssigmedium	34
3.1.2.1	<i>Helicobacter</i> -Spezies	34
3.1.2.2	<i>Escherichia coli</i>	35
3.1.3	Magenbiopsien.....	35
3.1.4	Einfrierkulturen	35
3.1.4.1	<i>Helicobacter</i> -Spezies	35

3.1.4.2	<i>Escherichia coli</i>	35
3.2	Ureasetest	36
3.3	DNA-Isolierung	36
3.3.1	QiaAmp	36
3.3.2	TIP100	36
3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.4.1	Standard-PCR.....	36
3.4.2	Plasmidspezifische PCR direkt aus Zellmaterial	37
3.4.3	RAPD-PCR	37
3.4.4	'Empty site' PCR (ES-PCR).....	37
3.5	Sequenzierung	38
3.5.1	Vorbereitung der Sequenzierproben	38
3.5.2	Analyse der Sequenzen	38
3.6	T/A-Klonierung	39
3.7	Southern Blot	39
3.7.1	Vorbereitung der Proben	39
3.7.2	Präparation des Gels	40
3.7.3	Vakuum Blot.....	40
3.7.4	DIG-Markierung der Sonde	40
3.7.5	Hybridisierung	41
3.7.6	Strippen von Southernblots	41
3.8	Herstellung von <i>H. pylori</i> 'knock out'-Mutanten	41
3.8.1	Klonierung eines <i>H. pylori</i> Gens in einen Vektor	41
3.8.2	Transformation	42
3.8.3	Aufreinigung von Plasmiden.....	42
3.8.3.1	Mini-Präparation.....	42
3.8.3.2	Midi-Präparation.....	43
3.8.4	Einfügen einer Restriktionsschnittstelle.....	43
3.8.5	Einfügen einer Antibiotika-Resistenzkassette	43
3.8.6	Natürliche Transformation von <i>H. pylori</i>	45
3.9	Herstellung antibiotikaresistenter <i>H. pylori</i>-Isolate	46
3.10	Flüssigkultur-Transformation	46
3.11	Microarray-Analyse	46
4	Ergebnisse	48

4.1 Analyse genetischer und genomischer Veränderungen während einer persistierenden Infektion mit <i>H. pylori</i> untersucht anhand sequenzieller Isolate.....	48
4.1.1 RAPD-PCR-Analyse der sequenziellen Isolate	48
4.1.2 Sequenzierung von 'housekeeping'- und virulenzassoziierten Genen	51
4.1.3 Analyse der Sequenzunterschiede.....	56
4.1.3.1 Mathematisches Modell	56
4.1.3.2 Bestimmung der Importlängen von rekombinierter DNA.....	56
4.1.4 Analyse von Gesamt-DNA aus Magenbiopsien	57
4.1.5 Analyse von Gendeletion und -aquisition während einer fortwährenden <i>H. pylori</i> -Infektion mittels DNA-Microarray-Hybridisierung.....	59
4.1.5.1 Analyse der Microarray-Ergebnisse	59
4.1.5.2 'empty site'-PCR-Analyse und Sequenzierung der aufgenommenen und verlorenen Gene zur Bestätigung der Microarray-Analyse	61
4.1.5.3 Auswertung der Rekombinationsereignisse	71
4.2 Analyse von DNA-Import und Rekombination in <i>H. pylori</i> mit einem 'in vitro'-Transformationsmodell	71
4.2.1 Herstellung von DNA-Donoren für das Transformationsmodell durch Spontanmutation in Antibiotikaresistenz-verleihenden Genen	73
4.2.2 Analyse der Flüssigkultur- <i>in vitro</i> -Transformation von Wildtyp-Rezipientenstämmen mit Antibiotikaresistenz-vermittelnder Donor-DNA.....	74
4.2.2.1 Transformation von Wildtyp-Rezipientenstämmen bei Zugabe von genomischer DNA.....	74
4.2.2.2 Transformation von Wildtyp-Rezipientenstamm J99 bei Zugabe eines PCR-Produkts	76
4.2.2.3 Rekombinationslänge der importierten DNA in Wildtypstämme ...	77
4.2.3 Analysen des <i>in vitro</i> -Transformationsmodells mit <i>H. pylori</i> 'knock out'-Mutanten im Nukleotidexcisions-Reparatur-Mechanismus (NER).....	81
4.2.3.1 Transformation von <i>uvrA</i> ⁻ und <i>uvrD</i> ⁻ Mutanten der Rezipientenstämmen mit genomischer DNA und einem <i>rpoB</i> -PCR-Produkt ...	82
4.2.3.2 Rekombinationslänge der importierten DNA in <i>uvrA</i> ⁻ und <i>uvrD</i> ⁻ Mutanten der Rezipientenstämmen	84
4.2.4 Mutagenese durch UV-Bestrahlung der Stämme J99 und J99 <i>uvrA</i> ⁻ ...	85

4.2.5	Transformation der Wildtyp-Rezipientenstämme mit einzelsträngiger DNA.....	86
4.3	Analyse einer experimentellen <i>H. pylori</i>-Infektion und Etablierung eines neuen Tiermodells in Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>).....	87
4.3.1	Erstes Infektionsmodell: Etablierung einer persistierenden Infektion von Rhesusaffen mit klinischen <i>H. pylori</i> -Isolaten	87
4.3.1.1	Gewinnung von Reisolaten aus Magenbiopsiematerial	88
4.3.1.2	Analyse der Reisolate aus Rhesusaffen mittels RAPD-PCR	88
4.3.1.3	Sequenzierung der Reisolate aus Rhesusaffen.....	90
4.3.1.4	Microarray-Analyse des Drei-Jahres-Isolats MM30 und des Infektionsstamms BO417	90
4.3.2	Zweites Infektionsmodell: Superinfektion einer bestehenden <i>H. pylori</i> -Infektion mit vier neuen <i>H. pylori</i> -Stämmen.....	90
4.3.2.1	Reisolation von <i>H. pylori</i> aus Magenbiopsiematerial.....	91
4.3.2.2	Analyse der Reisolate mittels RAPD-PCR in den ersten fünf Wochen nach Superinfektion	91
4.3.2.3	Sequenzierung des <i>ureI</i> -Gens der Reisolate der Superinfektion .	92
4.4	Untersuchungen an weiteren Vertretern der Gattung <i>Helicobacter</i>	94
4.4.1	Analyse von zehn Genfragmenten aus <i>Helicobacter nemestrinae</i>	94
4.4.2	Analyse von zehn Genfragmenten aus <i>Helicobacter acinonychis</i>	96
5	Diskussion	100
5.1	Genetische und genomische Veränderungen während einer persistierenden Infektion mit <i>H. pylori</i>.....	100
5.2	DNA-Import und Rekombination in <i>H. pylori</i>, untersucht anhand eines neuen 'in vitro'-Transformationsmodells	106
5.2.1	<i>In vitro</i> -Transformation von Wildtyp-Stämmen	107
5.2.2	<i>In vitro</i> -Transformation mit Einzelstrang-DNA.....	108
5.2.3	<i>In vitro</i> -Transformation von <i>H. pylori</i> -'knock out' Mutanten im NER-Reparatursystem	109
5.3	Experimentelle <i>H. pylori</i>-Infektion und Etablierung eines neuen Tiermodells in Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>)	111
5.4	Untersuchungen an weiteren Vertretern des Genus <i>Helicobacter</i>: <i>H. nemestrinae</i> und <i>H. acinonychis</i>.....	114
6	Literatur.....	116

7	Anhang.....	131
7.1	Zusammenfassung.....	131
7.2	Summary	132
7.3	Abkürzungsverzeichnis	134
7.4	Abbildungsverzeichnis	136
7.5	Tabellenverzeichnis	138
7.6	Lebenslauf	140
7.7	Publikationsliste.....	141

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung von *Helicobacter pylori*

In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde es durch die Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie möglich, Bakterien sichtbar zu machen und zu beobachten. Die erstmalige Beschreibung spiraliger Bakterien, die in Mägen von Katzen und Mäusen gefunden wurden, geht auf Salomon (1896) zurück. Die Entdeckung von Bakterien im menschlichen Magen wurde 10 Jahre später von Krienitz dokumentiert (Krienitz, 1906). Bereits neun Jahre später konnte diese bakterielle Besiedlung mit Erkrankungen des Magens und des Zwölffingerdarms (Duodenum) in Verbindung gebracht werden (Rosenow und Sanford, 1915). Die damalige medizinische Lehrmeinung postulierte jedoch, dass kein Mikroorganismus in der lebensfeindlichen Umgebung des Magens bei einem pH-Wert von ca. 1-2 überleben könne. Daher wurden diese Bakterien für Kontaminationen gehalten, die mit dem Speichel in den Magen gelangten. Es dauerte über 60 Jahre bis der Gedanke von der Besiedlung des Gastrointestinaltraktes durch Mikroorganismen von Steer wieder aufgegriffen wurde (Steer, 1975). Im Jahr 1979 konnten dann erstmals spiralförmige Bakterien auf der Oberfläche der Epithelzellen im Lumen des menschlichen Magens nachgewiesen werden (Fung *et al.*, 1979). Es wurde zunächst erfolglos versucht diese Bakterien auch außerhalb des Magens *in vitro* zu kultivieren.

Die *in vitro* Kultivierung gelang erstmals 1982 den beiden australischen Ärzten Barry Marshall und Robin Warren, die ein Bakterium aus humanem Magenbiopsiematerial isolieren konnten (Marshall und Warren, 1983; Marshall *et al.*, 1984). Die Entdecker nannten das neue Bakterium zunächst *Campylobacter pyloridis* (pylorus, griechisch: der Torwächter), da es zum einen morphologische Übereinstimmungen der unipolaren Flagellenverteilung gab und zum anderen der GC-Gehalt mit dem Genus *Campylobacter* übereinstimmte. Das Bakterium war mikroaerophil, spiralig gewunden und Gram-negativ (Marshall und Warren, 1984). Der Name wurde später aus Nomenklatur-Gründen in *Campylobacter pylori* geändert (Marshall und Goodwin, 1987). In der Folgezeit stellte sich heraus, dass sich das neue Bakterium phylogenetisch doch nicht in das Genus *Campylobacter* eingliedern ließ, daher wurde das Genus *Helicobacter* 1989 ebenfalls in die ϵ -Gruppe der Proteobakterien eingeordnet und das Bakterium in *Helicobacter pylori* (helix, helicos, griechisch: Windung) umbenannt (Goodwin *et al.*, 1989). Der Name *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) steht

seitdem für dieses spiralförmige gram-negative Bakterium, das die Magenschleimhaut (Mukosa) von Menschen besiedelt. Es konnte auch aus Mägen von Katzen und einigen Primaten (Rhesusaffen, Schweinsaffen) isoliert werden (Handt *et al.*, 1994; Dubois *et al.*, 1994, Bronsdon *et al.*, 1991), diese Infektionen sind vermutlich vom Menschen auf die Tiere übertragen worden.

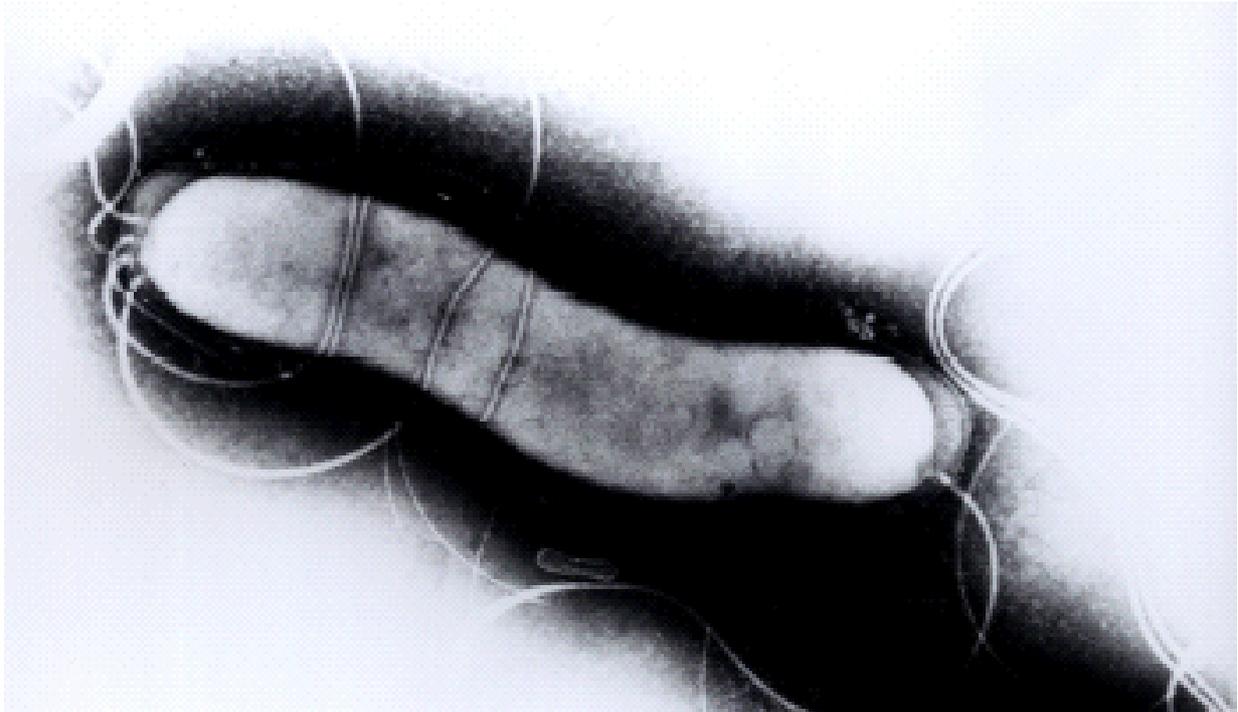


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Helicobacter pylori*

H. pylori ist ein spiralgewundenes, Gram-negatives Bakterium, das unipolar mit vier bis sechs Geißeln ausgestattet ist. Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme (40000fache Vergrößerung) des *H. pylori*-Stamms BO417. Aus Mätz-Rensing *et al.*, 2001.

Mehr als die Hälfte der adulten Weltbevölkerung trägt *H. pylori* in ihrem Gastrointestinaltrakt (Suerbaum und Michetti, 2002). In den Industrienationen beträgt die Infektionsrate 20-50%, während sie in einigen Entwicklungsländern bei über 95% liegen kann (Frenck und Clemens, 2003). Etwa 10-15% der Infizierten entwickeln ein klinisches Krankheitsbild. *H. pylori* kann nachweislich mit verschiedenen Erkrankungen des Magens, wie peptische Ulzera, aktive Gastritis und Krebs (Adenokarzinom, MALT-Lymphom) in Verbindung gebracht werden und wurde daher 1994 von der Weltgesundheitsbehörde WHO (World Health Organisation, New York/USA) als Karzinogen erster Klasse eingestuft (IARC, International Agency for Research on Cancer, 1994). Das chromosomale Genom des *H. pylori*-Stamms 26695 wurde 1997 vom amerikanischen Institute for Genomic Research (TIGR, Rockville/USA) vollständig sequenziert (Tomb *et al.*, 1997). Ein zweites komplett

sequenziertes Genom des *H. pylori*-Stamms J99 wurde vom Pharmaunternehmen AstraZeneca 1999 veröffentlicht (Alm *et al.*, 1999). *H. pylori* war das erste Bakterium, von dem zwei komplette Genomsequenzen bekannt waren. Bei der Analyse der chromosomalen Sequenz fiel auf, dass die meisten Gene nicht, wie beispielsweise bei *Escherichia coli* und den meisten anderen Proteobakterien, in polyzistronischen Operons organisiert sind, sondern die funktionell zusammengehörenden Gene zumeist über das ganze Chromosom verteilt vorlagen. Der Vergleich der beiden Genome zeigte eine unerwartet hohe Diversität zwischen den beiden Stämmen (Salama *et al.*, 2001). Der Stamm 26695 besitzt 117 Gene und der Stamm J99 89 Gene, die in dem jeweils anderen Stamm nicht vorkommen. Dies macht etwa 7% der Gene aus. Die meisten dieser stammspezifischen Gene (etwa 60%) sind in der sog. Plastizitätsregion lokalisiert. Die in beiden Stämmen vorhandenen Gene sind zu 85% in der gleichen Genabfolge auf dem Chromosom zu finden (Alm und Trust, 1999).

1.2 Morphologie und Physiologie

H. pylori ist ein 0,5-1,0 x 3-4 µm großes, spiralig gewundenes Stäbchen. Die 4-6 Flagellen (2,5 µm lang, Ø 30 nm) befinden sich unipolar an einem Ende des Bakteriums und dienen der Fortbewegung (Josenhans und Suerbaum, 2001). Es wächst nur unter mikroaeroben Bedingungen (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) auf Pferdeblutagar oder Schokoladenagar. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 37°C wachsen kleine, runde (Ø 2-3mm), durchsichtige Kolonien. Bei längerer Kultivierung auf Agarplatten (7-21 Tage) oder bei ungünstigen äußeren Bedingungen geht die spiralige Morphologie über verschiedene Zwischenstadien (u. a. die sog. U-Form) verloren und es bildet sich eine kokkoide Morphologie aus (Chan *et al.*, 1994). Auch die kokkoide Form ist in sehr geringem Maße noch stoffwechselaktiv. Sie ist somit als eine Art Überlebensform aber nicht als eine Spore anzusehen (Sörberg *et al.*, 1996). Die biologische Bedeutung dieser Form ist jedoch noch ungeklärt, da es bislang nur bedingt möglich war, Bakterien aus dem kokkoiden Stadium zu rekultivieren (Brenciaglia *et al.*, 2000). Möglicherweise stellt diese morphologische Konversion in die kokkoide Form auch nur eine Vorstufe zum Zelltod dar (Kusters *et al.*, 1997; Monstein und Jonasson, 2001).

Das komplette Genom von *H. pylori* ist mit nur 1,6 Megabasen (Mb) relativ klein. Im Vergleich dazu besteht das Chromosom von *Escherichia coli* K12 aus 4,6 Mb (Blattner *et al.*, 1997). Die Enzymausstattung und die Anzahl der Aufnahmesysteme

ist daher auf ein notwendiges Minimum konzentriert. So sind viele Systeme, die in *E. coli* in vielfacher Ausführung vorliegen (z. B. DNA-Reparatursysteme) nur einfach vorhanden (Tomb *et al.*, 1997). Die Stoffwechselwege entsprechen den bei Gram-negativen, chemoorganotrophen Bakterien weit verbreiteten Abbauwegen. Glucose stellt die Haupt-Kohlenstoffquelle zur Energiegewinnung dar, als Gärungsprodukte können Acetat und Lactat entstehen (s. Abbildung 2).

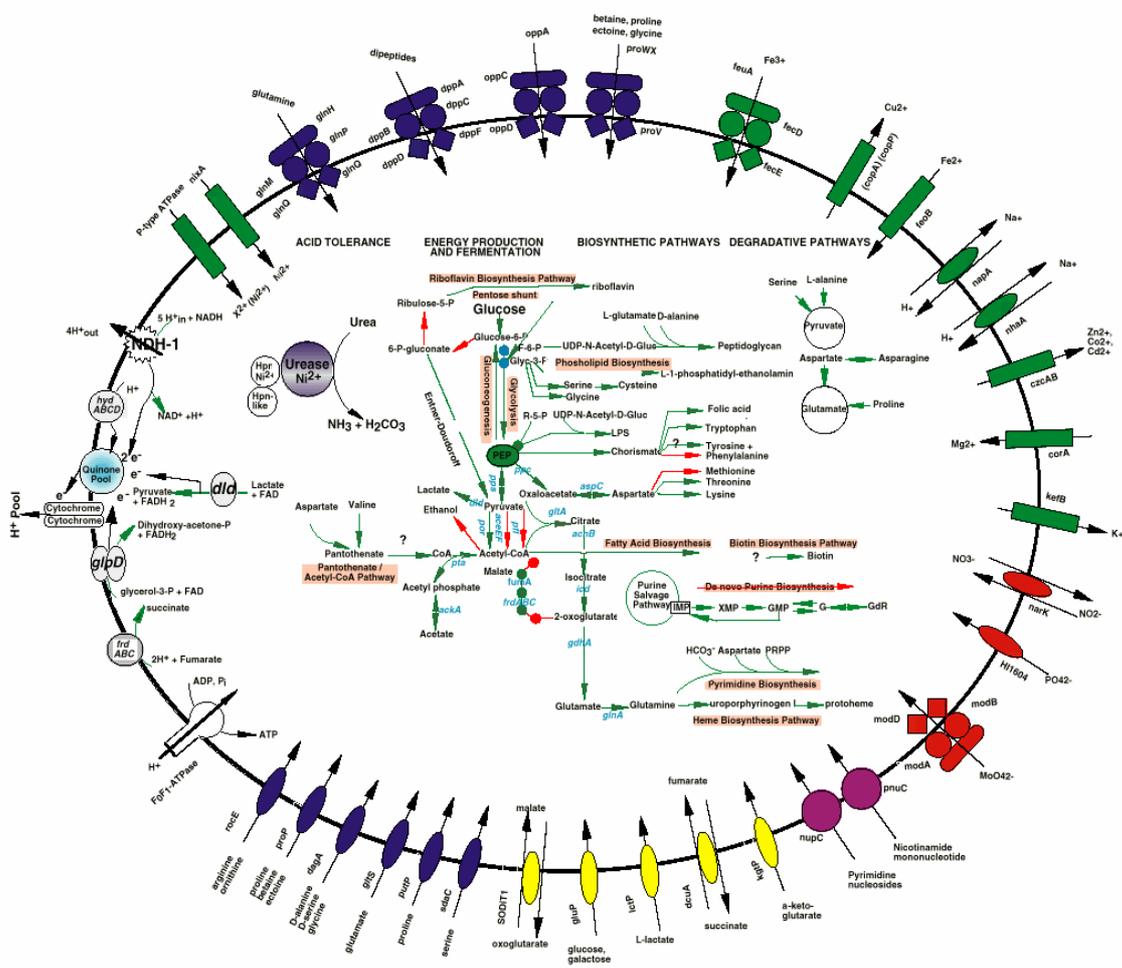


Abbildung 2: Darstellung der Stoffwechselwege, der Aminosäureproduktion und des Transports von Metaboliten über die Membran

Die Hauptenergiequelle des Stoffwechsels stellt Glucose dar. Die Stoffwechselreaktionen sind mit denen der meisten Gram-negativen Bakterien vergleichbar. Da *H. pylori* mikroaerophil ist, kann die Glucose sowohl veratmet, als auch zu Lactat und Acetat vergoren werden. Aus Tomb *et al.*, 1997.

Eine sehr charakteristische Eigenschaft ist die enorme Produktion von aktiver Urease, die sowohl intrazellulär als auch membrangebunden auf der Zelloberfläche zu finden ist (Dunn und Phadnis, 1998). Urease ist ein Enzym, das Harnstoff aus der Magenflüssigkeit zu Ammoniak und Kohlendioxid umsetzt ($2 \text{ CH}_4\text{N}_2\text{O} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow$

$4 \text{ NH}_3 + 2 \text{ CO}_2$). Für die Funktion der Urease ist die Aufnahme von Nickel-Ionen (Ni^{2+}) essentiell (Evans *et al.*, 1991). Durch die Katalyse wird ein Bereich höheren pH-Wertes geschaffen, der es dem Bakterium ermöglicht, solange in dem niedrigen pH-Wert der Magenflüssigkeit zu überleben, bis es in die Mukosa eingedrungen ist (Sachs *et al.*, 2003). In ebenfalls besonderen Mengen werden die Enzyme Katalase und Superoxid-Dismutase produziert, die schädliche Sauerstoffradikale, die von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Phagozyten sezerniert werden, abfangen und neutralisieren (Goodwin und Armstrong, 1990). Das Bakterium besitzt somit einen effektiven Mechanismus, der sauerstoffabhängigen, unspezifischen Immunabwehr des Wirtsorganismus zu entgehen. Das Immunsystem des Menschen ist nicht in der Lage eine *H. pylori*-Infektion selbstständig aus dem Magen zu eliminieren.

1.3 Der Genus *Helicobacter*

Die Spezies des Genus *Helicobacter* sind, wie auch *Wollinella* und *Campylobacter*, phylogenetisch in die chemoorganotrophe ϵ -Gruppe der Proteobakterien einzuordnen.

Nach der Entdeckung von *H. pylori* konnten in der Folgezeit mehrere Bakterien aus vielen verschiedenen Säugetieren isoliert werden, die taxonomisch in das Genus *Helicobacter* eingeordnet wurden, z. B. *Helicobacter acinonychis* in Wildkatzen, *Helicobacter felis* bei Hunden und Katzen, *Helicobacter rappini* bei Schafen, *Helicobacter mustelae* bei Frettchen oder *Helicobacter muridarum* bei Mäusen und Ratten (s. Abbildung 3). Es werden gastrische und nicht gastrische Spezies unterschieden. Die gastrischen Bakterienspezies des Genus *Helicobacter* zeichnen sich durch die Fähigkeit zum Überleben unter den extremen Bedingungen im Lebensraum des Säugetiermagens und Zwölffingerdarms aus, während die nicht gastrischen (sog. enterohepatischen) *Helicobacter*-Spezies den Darmtrakt und die Leber verschiedener Säugetiere besiedeln. Die gastrischen *Helicobacter*-Spezies verursachen in ihrem jeweiligen Wirt eine chronische Gastritis mit den entsprechenden Folgekrankheiten (s. Tabelle 1). Die enterohepatischen *Helicobacter*-Spezies können Gastroenteritis, chronische Hepatitis bis hin zum Leberkarzinom (z.B. *H. hepaticus* in Mäusen) verursachen (Ward *et al.*, 1994; Fox *et al.*, 1998). Die enterohepatischen *Helicobacter*-Spezies sind nicht ausschließlich auf

die Säugetiere beschränkt, sondern konnten auch in Vögeln nachgewiesen werden (Dewhirst *et al.*, 1994; Stanley *et al.*, 1994).

Tabelle 1: *Helicobacter* Spezies, ihre Wirte, Lebensräume und ausgelöste Krankheiten

<i>Helicobacter</i> ssp.	Verwandtschaft ¹	Wirt	Lebensraum	Krankheit
<i>H. pylori</i>		Mensch, Rhesusaffe	Magen	Gastritis, Ulcera
<i>H. acinonychis</i>	97,4%	Wildkatzen	Magen	Gastritis
<i>H. felis</i>	95,5%	Katze, Hund	Magen	Gastritis
<i>H. heilmannii</i>	95,0%	Schwein, Katze, Hund, Affen, Mensch	Magen	Gastritis
<i>H. mustelae</i>	93,9%	Frettchen	Magen	Gastritis, Ulcera
<i>H. pullorum</i>	94,9%	Huhn	Darm	Hepatitis
<i>H. canis</i>	93,9%	Katze, Hund	Darm	Gastroenteritis, Hepatitis
<i>H. bilis</i>	93,4%	Maus, Ratte	Darm	Hepatitis
<i>H. hepaticus</i>	93,4%	Maus	Darm	Hepatitis, Leberkarzinom
' <i>H. rappini</i> '	93,1%	Schaf, Hund, Maus, Mensch	Darm	Abort, Lebernekrose
<i>H. fennelliae</i>	93,1%	Mensch	Darm	Proctitis, Kolitis
<i>H. cinaedi</i>	92,8%	Mensch, Hamster	Darm	Proctitis, Kolitis

¹ die Verwandtschaft bezieht sich auf die DNA-Sequenz der 16S rDNA von *H. pylori*. Aus Ferrero und Fox, 2001.

Eine weitere Gruppe von *Helicobacter*-Spezies wird unter dem Namen *Flexispira rappini* zusammengefasst. Diese Spezies sind noch nicht eindeutig als *Helicobacter* identifiziert worden und gehören vermutlich unterschiedlichen *Helicobacter*-Spezies an (Dewhirst *et al.*, 2000a).

Die Stämme innerhalb der Spezies *H. pylori* können stark variieren und es ist daher in einigen Fällen schwierig zu unterscheiden, ob ein neues Isolat als ein Stamm dieser bereits beschriebenen Spezies anzusehen ist, oder aber eine neue Spezies

darstellt. Aus diesem Grund wurden minimale Standards festgelegt, die eine Beschreibung neuer *Helicobacter*-Spezies regeln (Dewhirst *et al.*, 2000b); so müssen beispielsweise mindestens fünf Isolate der neuen Spezies zuzuordnen sein und eine Reihe von biochemischen Untersuchungen durchgeführt worden sein.

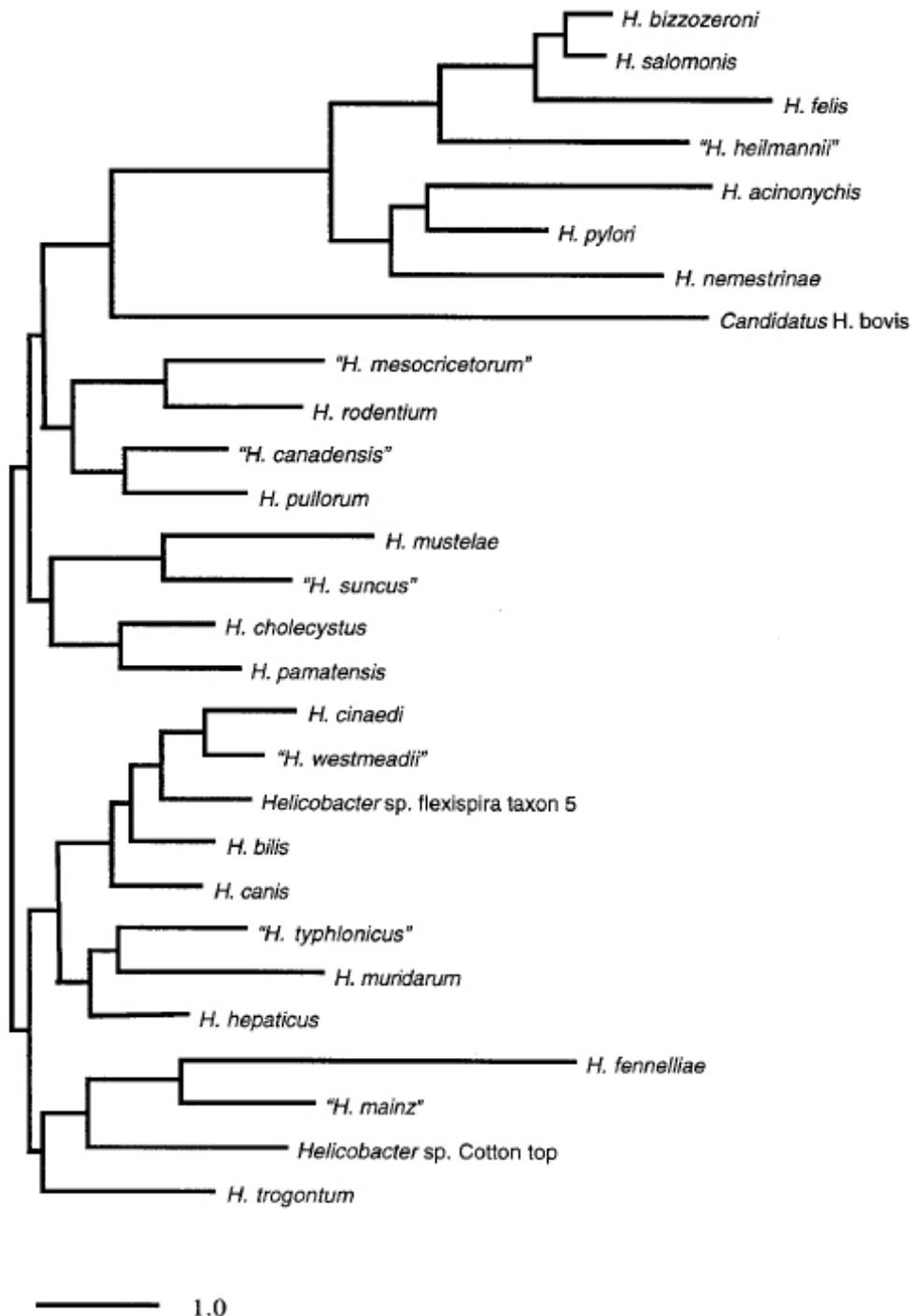


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum des Genus *Helicobacter*

Insgesamt 23 Spezies können im Genus *Helicobacter* basierend auf ihrer 16S rDNA unterschieden werden. Dazu sind einige provisorische Spezies beschrieben, die noch nicht etabliert sind (in Anführungszeichen). Die Spezies *H. nemestrinae* wurde kürzlich aus dem Stammbaum entfernt (Suerbaum *et al.*, 2002). Aus Solnik und Schauer, 2001.

1.4 Pathogenität und Virulenzfaktoren

Bereits lange vor der Entdeckung und Isolierung von *H. pylori* konnten spiralige Bakterien im menschlichen Magen mit Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Rosenow und Sanford, 1915). Seit 1982 konnten verschiedene Erkrankungen mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert werden. Die Infektion mit *H. pylori* erfolgt zumeist in der frühen Kindheit bis zum vierten Lebensjahr. *H. pylori* kann in Infizierten über mehrere Jahrzehnte persistieren, ohne dass es zu einer Erkrankung kommt. Bei etwa 10-15 Prozent der Infizierten kommt es zu einer *H. pylori*-induzierten Erkrankung (Suerbaum und Michetti, 2003).

1.4.1 *H. pylori* assoziierte Krankheitsbilder

Die Besiedlung der Mukosa mit *H. pylori* kann verschiedene Krankheitsbilder verursachen. Die Anwesenheit von *H. pylori* löst im Wirt verschiedene Reaktionen des Immunsystems aus. Die Zellen des Magenepithels locken durch Interleukin 8 (IL-8)-Ausschüttung neutrophile Granulozyten an, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Nahezu alle Infizierten entwickeln eine chronische Gastritis, die in der Mehrzahl der Fälle asymptomatisch verläuft. Die *H. pylori*-assoziierte chronisch-aktive Gastritis kann als Vorstufe für weitere Erkrankungen angesehen werden. Die wichtigste Folgeerkrankung ist die Ulkuskrankheit (*Ulcus ventriculi* im Magen und *Ulcus duodeni* im Zwölffingerdarm), ein gutartiges Geschwür. Etwa 80% dieser Erkrankungen sind mit *H. pylori* in Verbindung zu bringen (Nomura und Stemmermann, 1993). Bei diesen sog. peptischen Ulzera spielen jedoch auch noch weitere Faktoren, wie z.B. eine übermäßige Magensäureproduktion, genetische Prädisposition und Umweltfaktoren (Stress, Nikotin, Medikamente, etc.) eine Rolle. Meist geht der Krebserkrankung eine chronische Gastritis mit Atrophie der Magenschleimhaut voraus, nicht selten über mehrere Jahrzehnte hinweg, bis sich schließlich eine Krebsgeschwulst entwickelt. Das Magenkarzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung und die vierzehnthäufigste Todesursache weltweit (Murray und Lopez, 1997). Durch das Einwandern von Lymphozyten durch die Immunreaktion bildet sich in der Mukosa lymphoides Gewebe. *H. pylori*-infizierte Patienten haben ein sechsfach erhöhtes Risiko ein MALT-Lymphom (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) zu entwickeln (Nakamura *et al.*, 1997). Eine andere Form der Gastritis ist die Riesenfaltengastritis, eine besonders starke Entzündungsreaktion, die aber nur sehr selten vorkommt (Stolte *et al.*, 1993). Bei

einer Infektion werden *H. pylori*-spezifische Antikörper gebildet, die eine Autoimmunreaktion mit der auf den Parietalzellen vorzufindenden H^+/K^+ -ATPase hervorrufen können. Dadurch kann eine Atrophie des Gewebes ausgelöst werden (Claeys *et al.*, 1998).

1.4.2 Virulenzfaktoren

Es sind mehrere Faktoren bekannt, die mit der Virulenz und Pathogenität von *H. pylori* in Verbindung gebracht werden. Die Virulenzfaktoren bestehen zum einen aus Exotoxinen, die den Wirt aktiv schädigen können und zum anderen aus Faktoren, die vom Immunsystem erkannt werden und so zu einer Entzündungsreaktion und sogar Autoimmunerkrankungen führen können. Nicht alle *H. pylori*-Stämme bilden alle Virulenzfaktoren aus, wie beispielsweise die *cag*⁻-Stämme, die keine *cag*-Pathogenitätsinsel besitzen.

1.4.2.1 Vakuolisierendes Zytotoxin VacA

Das Gen *vacA* gilt als wichtiger Pathogenitätsfaktor (Cover und Blaser, 1992). Das extrazellulär wirksame, vakuolisierende Zytotoxin VacA wird durch einen Auto-transporter aus den Zellen heraustransportiert und bewirkt bei den Epithelzellen der Mukosa eine Vakuolisierung (Garner und Cover, 1996). Die Zellen nehmen das Exotoxin auf und bilden Vakuolen durch die Verschmelzung von Endosomen und Lysosomen (Molinari *et al.*, 1997). Das 95 kDa Protein besteht aus 2 Untereinheiten (37 kDa und 58 kDa), die sich in der aktivierten Form zu einem Hexa- oder Heptamer zusammenfinden (Lupetti *et al.*, 1996). Das aktivierte Protein kann sich als Ionen-Kanal in die Membran der Wirtszelle eingliedern (Pagiaccia *et al.*, 2000). Es gibt verschiedene Allele des *vacA*-Gens, die möglicherweise mit dem Auftreten von Krankheitssymptomen assoziiert sind. Dabei spielt zum einen die Genregion des Signalpeptides eine wichtige Rolle und zum anderen die m-Region, die in der Mitte des Gens liegt (Atherton *et al.*, 1997). Die Signalpeptide können in zwei Familien eingeteilt werden, s1 (s1a, s1b, s1c) und s2, wobei nur Proteine mit dem s1-Signalpeptid eine vakuolisierende Wirkung besitzen (Letley und Atherton, 2000). Der Allelstatus des Signalpeptids vom Typ s1 ist zudem ein wichtiger Marker in der klinischen Diagnostik und ist statistisch mit dem Vorhandensein der *cag*-Pathogenitätsinsel korreliert (van Doorn *et al.*, 1999a). Es ist noch nicht aufgeklärt, welcher Zusammenhang zwischen dem s1-Signalpeptid des *vacA*-Gens und dem Vorhandensein der *cag*-Pathogenitätsinsel besteht. Die beiden Genregionen

innerhalb des *vacA*-Gens eignen sich für epidemiologische und geographische Studien (van Doorn *et al.*, 1999b).

1.4.2.2 *cag*-Pathogenitätsinsel

Die *cag*-Pathogenitätsinsel ist ein etwa 40 Kilobasen großer Gencluster (Censini *et al.*, 1996), dessen 29 Gene für einen *H. pylori*-spezifischen Typ IV-Transporter kodieren (s. Abbildung 4; Odenbreit *et al.*, 2000). Die *cag*-Insel ist nicht in allen *H. pylori*-Stämmen zu finden, es besteht jedoch eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein der *cag*-Pathogenitätsinsel und dem Auftreten von Erkrankungen. 90% der aus Erkrankten isolierten Stämme enthielten die Pathogenitätsinsel (Covacci *et al.*, 1997).

Einige Strukturgene dieses Transporters weisen Ähnlichkeiten zu einem Transporter in *Agrobacterium tumefaciens* auf, der das Ti-Plasmid in den Wirt transportiert. Das Protein des zuerst identifizierten Gens dieses Clusters, das Gen *cagA* (cytotoxin associated gene A), wird durch den Transporter in die Epithelzellen des Magens transportiert und dort Tyrosin-phosphoryliert (Odenbreit *et al.*, 2000; Asahi *et al.*, 2000). Das in die Wirtszelle transportierte CagA bewirkt beispielsweise die Ausstülpung von Pseudopodien durch Rearrangierung des Zytoskeletts ('hummingbird'-Phänotyp) und eine Verlängerung der Wirtszelle (Segal *et al.*, 1996; Segal *et al.*, 1999). Die Anwesenheit der Pathogenitätsinsel hat auch ohne die Injektion des CagA-Proteins unterschiedliche Wirkungen auf die Wirtszelle, wie die Aktivierung des Transkriptionsaktivators NF- κ B und die Ausschüttung von Interleukin-8 (Crabtree, 1998; Guillemin *et al.*, 2002). Die genauen Wirkungsweisen innerhalb der Wirtszelle sind noch weitgehend unbekannt.

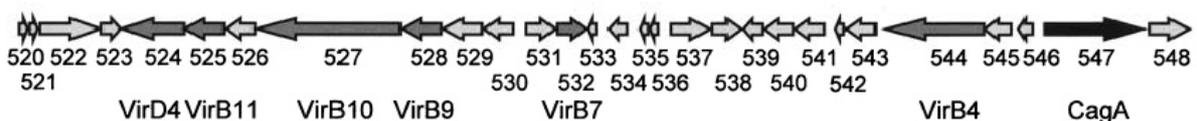


Abbildung 4: Genomische Struktur der *cag*-Pathogenitätsinsel in *H. pylori*

Die *cag*-Pathogenitätsinsel besteht aus einem ca. 40 Kb großen Gencluster mit 29 Genen, die für ein Typ IV-Transportsystem kodieren. Das *cagA*-Genprodukt wird in die Wirtszellen injiziert. Die Genanordnung entspricht dem *H. pylori*-Stamm 26695. Verändert aus Rohde *et al.*, 2003.

Die *cag*-Pathogenitätsinsel wird beiderseits durch einen 31 Basenpaar-Repeat flankiert (Censini *et al.*, 1996). Bei *cag*⁻-Stämmen ist dieser Repeat nur einfach

vorhanden. Dieser Repeat stellt die Rekombinationsstelle der Pathogenitätsinsel dar, an der sie aus dem Genom deletiert bzw. integriert werden kann. In einigen *H. pylori*-Stämmen kann die *cag*-Pathogenitätsinsel durch *H. pylori*-spezifische Insertionselemente (IS605) in zwei Teile geteilt werden, in anderen Fällen wird sie von ihnen flankiert (Kersulyte *et al.*, 2000).

1.4.2.3 Lipopolysaccharide und Membranproteine

In der äußeren Membran von *H. pylori* sind, wie bei allen Gram-negativen Bakterien, Lipopolysaccharid-Ketten (LPS) verankert. Das LPS ist ein bedeutender Faktor der bakteriellen Pathogenität (Moran *et al.*, 1996a). Die LPS-Antigene von *H. pylori* besitzen jedoch nur ein geringes Potenzial eine Immunreaktion auszulösen (Birkholz *et al.*, 1993).

Einige LPS-Oberflächenstrukturen von *H. pylori* ähneln Antigenen, die auch auf Zellen des Wirtes zu finden sind (molekulares Mimikri). Dazu zählen die Lewis-Blutgruppen-Antigene Le^x und Le^y (Appelmelk *et al.*, 1996). Durch diese 'Verkleidung' gelingt es *H. pylori*, sich getarnt vor dem Immunsystem im Magen zu etablieren (Moran *et al.*, 1996b). Die Blutgruppenantigene vermitteln eine Adhäsion der Bakterien an die Wirtszellen (Boren *et al.*, 1993). Der humorale Arm der Immunreaktion induziert die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene des Bakteriums. Diese Antikörper können jedoch auch auf die Oberflächenantigene der Wirtszellen (z.B. H⁺/K⁺-ATPase der säureproduzierenden Parietalzellen) reagieren, wodurch eine Autoimmunreaktion ausgelöst werden kann (Claeys *et al.*, 1998). Da diese Oberflächenantigene auch von den Mucosazellen gebildet werden, manifestiert sich die Schädigung.

H. pylori besitzt viele Gene, die der Familie der sog. 'Helicobacter outer membrane proteins' (Hop) angehören. Einige dieser Gene kodieren für Membrankanäle (Porine), andere sind für die Adhäsion an die Wirtszelle wichtig (*bab*-Gene, *sab*-Gene, *alp*-Gene; Mahdavi *et al.*, 2003; Odenbreit *et al.*, 1999). Viele der Hop-Gene werden durch das sog. 'slipped strand mispairing' (ssm) reguliert. Die Gene dieser Proteine besitzen eine Sequenz gleicher Basen (z.B. zehn aufeinander folgende Cytosine) oder Basentandems (Repeats) in unterschiedlicher Länge. Durch den Verlust oder das Hinzufügen eines Repeats kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens und das Gen kann (Anschalten) oder kann nicht (Abschalten) abgelesen werden. Dieser Mechanismus erlaubt es *H. pylori*, schnell auf sich ändernde

Umweltbedingungen (z.B. opsonierende Antikörper gegen ein Oberflächenantigen und eine Komplementreaktion) zu reagieren.

1.4.2.4 Flagellen

H. pylori besitzt 4-6 unipolare Flagellen, die dem Bakterium Mobilität verleihen (Josenhans und Suerbaum, 2001). Im Tiermodell zeigte sich die Beweglichkeit als essentieller Kolonisationsfaktor (Eaton *et al.*, 1996). Bakterien ohne Flagellen waren nicht in der Lage den Wirt zu besiedeln. Die Beweglichkeit ist auch während der persistierenden Infektion von Bedeutung, da sich *H. pylori* im viskosen Mukus bewegen muss, um gegen ein Ausschwemmen in den saureren Magenbereich anzuschwimmen (Hazell *et al.*, 1986). Die Flagellenfilamente bestehen aus zwei Flagellinen, FlaA und FlaB, die beide für ein voll funktionstüchtiges Flagellenfilament benötigt werden (Josenhans *et al.*, 1995). Sie sind mit einer Membranhülle ummantelt und besitzen einen terminalen 'bulb', dessen Funktion noch nicht bekannt ist. Durch die Membranhülle, die der äußeren Zellmembran entspricht, werden die Flagellen vermutlich vor dem sauren Milieu des Magenlumens geschützt (Geis *et al.*, 1993).

1.5 Diagnostik und Therapie

Seit der Entdeckung von *H. pylori* wurden verschiedene diagnostische Verfahrenen zur Isolierung und zum Nachweis von *H. pylori* entwickelt.

Die Isolierung von *H. pylori*-Stämmen erfolgt in der Regel invasiv durch die klassische Verfahrensweise der Biopsieentnahme während einer Magenspiegelung (Endoskopie). Die Biopsien können auf Blutagarkulturplatten ausgestrichen und die angezüchteten Bakterien auf verschiedene indikative Enzymreaktionen hin untersucht werden (Urease, Katalase, Superoxid-Dismutase). In histologischen Schnitten können die Bakterien mit der Warthin-Starry-Färbung angefärbt werden. Mit anderen Methoden können Bakterien in Einzelfällen auch nicht invasiv aus dem Magen der Patienten isoliert werden, z.B. mit einem sog. 'String-Test', bei dem ein umkapselter Faden verschluckt wird, der bis in den Magen reicht und nach einer bestimmten Zeit wieder herausgezogen wird. An dem Faden haftende Bakterien können anschließend kultiviert werden. Auch aus Stuhlproben konnten viable *H. pylori* rekultiviert werden (Thomas *et al.*, 1992).

Der diagnostische Nachweis einer *H. pylori*-Infektion ist nicht an die tatsächliche Isolierung eines Stamms gekoppelt. Die Bakterien können außer mit den direkten Nachweisverfahren auch mit indirekten Methoden diagnostiziert werden. Die am weitesten verbreitete Methode ist der ^{13}C -Atemtest. Dem Patienten wird Harnstoff, der mit dem stabilen Kohlenstoffisotop ^{13}C markiert ist, verabreicht und anschließend der Gehalt des Isotops in der Ausatemluft gemessen. Wenn *H. pylori* anwesend ist, wird der Harnstoff durch die von *H. pylori* produzierte Urease zu $^{13}\text{CO}_2$ abgebaut, das abgeatmet wird (Graham *et al.*, 1987).

Da durch *H. pylori* auch eine systemische Immunantwort ausgelöst wird, können Antikörper in der Magenflüssigkeit und im Blut durch einen ELISA-Test (Enzyme linked immuno sorbant assay) nachgewiesen werden (Feldman *et al.*, 1995). Da sich die Antikörpertiter nach einer Eradikationstherapie erst langsam im Patienten abbauen, ist diese Methode nicht geeignet, kurz nach der Therapie eine erfolgreiche Behandlung nachzuweisen. Der Stuhlantigentest weist *H. pylori*-Antigene im Stuhl nach, und eignet sich daher, wie auch der Atemtest, zum Nachweis eines Therapieerfolges (Vaira *et al.*, 2002). Durch genetische Methoden (PCR, Sequenzierung) ist es für den Nachweis nicht notwendig den Organismus erst zu kultivieren. *H. pylori* kann per PCR aus Speichel, Magensaft oder Stuhlproben nachgewiesen werden (Hammar *et al.*, 1992; Makristathis *et al.*, 1998).

Die medizinischen Therapien zielen darauf ab, das Bakterium aus dem Magen zu entfernen, die sog. Eradikation. *H. pylori* reagiert sensibel auf verschiedene Antibiotika wie beispielsweise das Amoxicillin (β -Lactam-Antibiotikum), Clarithromycin und Erythromycin (makrolide Antibiotika), Metronidazol (Nitroimidazol-Antibiotikum) und Tetracyclin. Ein weiteres wichtiges Therapeutikum stellen die Protonenpumpeninhibitoren (PPI) Omeprazol, Pantoprazol und Lansoprazol dar, die eine bakteriostatische Wirkung besitzen. Eine wirksame Reduzierung der Bakterienanzahl kann auch durch Wismut-Salze erreicht werden. Der Einsatz von H_2 -Rezeptorantagonisten (Ranitidin, Cimetidin) allein zeigt keine wirksame Eradikation, an Wismutsalze gekoppelt können sie jedoch erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden. Die aufgeführten antibakteriellen Substanzen sind jede für sich nicht oder nur unzureichend in der Lage eine Eradikation zu erzielen, daher werden sie in der Therapie in unterschiedlichen Zusammensetzungen miteinander kombiniert.

Bei einer Erstbehandlung (sog. 'first line therapy') wird eine Tripeltherapie, die einen Protonenpumperinhibitor und zwei Antibiotika enthält, über einen Zeitraum von einer Woche angewendet, z.B. PPI + Amoxicillin + Clarithromycin oder PPI + Amoxicillin + Metronidazol. Die Tripeltherapie weist eine bis zu 87%ige Erfolgsquote auf (Laheij *et al.*, 1999). Sollte die Therapie nicht zu einer Eradikation führen, kann eine zweite Eradikationstherapie (sog. 'second line therapy') angeschlossen werden. Hier wird eine Quadrupeltherapie empfohlen, die einen PPI oder H₂-Rezeptoranagonisten, ein Wismutsalz und zwei Antibiotika enthält (Suerbaum und Michetti, 2002).

Es gibt Anzeichen für sich ausbreitende Resistenzen gegen die verwendeten Antibiotika (Houben *et al.*, 1999), daher sollte die Entwicklung einer Vakzine gegen pathogene Stämme von *H. pylori* ein Ziel der Forschung sein.

1.6 Genetische Variabilität und natürliche Kompetenz

1.6.1 Chromosomale Variabilität

H. pylori ist die am meisten diverse Bakterien-Spezies, die derzeit bekannt ist (Suerbaum *et al.*, 1998; Kersulyte *et al.*, 2000). Jedes Isolat stellt einen eigenen Stamm dar, der sich von Isolaten anderer Patienten unterscheidet (Majewski und Goodwin, 1988). Innerhalb einer Familie können *H. pylori*-Isolate gewonnen werden, die starke Ähnlichkeit zueinander besitzen (van der Ende *et al.*, 1996). Dabei ist ein Patient in der Regel nur mit einem Stamm infiziert (Miehlke *et al.*, 1999). Der Vergleich der beiden komplett sequenzierten Genome der Stämme 26695 und J99 offenbarte, dass nur 85% der Gene in beiden Stämmen in der gleichen Abfolge auf dem Chromosom zu finden waren (Alm und Trust, 1999). Analysen an weiteren Stämmen zeigten, dass jeder Stamm stammsspezifische Gene besitzt (Salama *et al.*, 2000). Viele Stämme unterschieden sich in dem Vorhandensein verschiedener Restriktions-Modifikationssysteme (Takata *et al.*, 2002). In anderen Stämmen konnten durch subtraktive Hybridisierungsmethoden ebenfalls Gene gefunden werden, die in den sequenzierten Stämmen nicht vorhanden waren (Akopyants *et al.*, 1998b).

1.6.2 Genetische Variabilität

Die Allele der Gene, die in allen Stämmen zu finden sind unterscheiden sich von Stamm zu Stamm, so dass nahezu jeder Stamm ein eigenes Allel für jedes Gen besitzt (Kansau *et al.*, 1996). Der Homoplasie-Test ergibt für *H. pylori* den höchsten

bei Bakterien gemessenen Wert von 0,85. Der Homoplasie-Test misst die Unterschiede der Allele bestimmter Gene der Stämme eines Genus, der Wert kann Zahlen zwischen 0,0 (Klonalität) und 1,0 (freie Rekombination) annehmen (Suerbaum *et al.*, 1998). Die genetische Variabilität wird hauptsächlich durch Rekombination mit DNA anderer *H. pylori*-Stämme erzeugt. Die rekombinierten Fragmente unterscheiden sich häufig in den synonymen Basen, die keinen Austausch einer Aminosäure nach sich ziehen und daher keine physiologischen Auswirkungen haben (Achtman *et al.*, 1999a). Da das Bakterium natürlich kompetent ist DNA aufzunehmen, kann genetisches Material von anderen, nur transient vorhandenen *H. pylori*-Stämmen aufgenommen werden. Es kommt zu einer zwischenzeitlichen Vielzahl an Varianten des besiedelnden Stammes, von denen sich einige wenige durchsetzen können (Kuipers *et al.*, 2000; Israel *et al.*, 2001). Wird das Bakterium auf einen neuen Wirt übertragen, gelangen nur einige wenige Bakterien in den neuen Wirt (sog. bottleneck), die dann wieder zu einer zunächst klonalen Population heranwachsen. Es wird angenommen, dass diese hohe Rekombinationsrate dem Bakterium hilft, sich an die jeweiligen Bedingungen im Wirt anzupassen und sein Überleben sicherzustellen. Durch die lange Infektionszeit von mehreren Jahrzehnten bildet sich mit der Zeit in jedem Wirt ein eigener Stamm aus.

1.6.3 Natürliche Kompetenz und DNA-Aufnahme

Die Fähigkeit, genetisches Material aus der Umgebung aufzunehmen, wird als natürliche Kompetenz bezeichnet. Nur wenige Bakterienspezies sind zu dieser Leistung fähig, wie beispielsweise das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* oder die Gram-negative Spezies *Haemophilus influenzae*. Diese Bakterien besitzen sog. Aufnahmesequenzen, an denen sie bereits an der Oberfläche der Zellen genetisches Material der eigenen Spezies von fremder DNA unterscheiden können (Sisco und Smith, 1979). Diese Aufnahmesequenzen bestehen aus kurzen Basensequenzen (9-10), die über das ganze Genom verteilt sind (Smith *et al.*, 1999).

Auch die meisten Stämme von *H. pylori* sind natürlich kompetent (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990). Im Chromosom von beiden sequenzierten *H. pylori*-Genomen konnten jedoch keine solchen Aufnahmesequenzen gefunden werden (Saunders *et al.*, 1999). Es ist bisher noch nicht bekannt, wie und ob *H. pylori* Spezies-eigene und -fremde DNA auseinanderhalten kann. Der DNA-Aufnahmemechanismus ist bei *H. pylori* noch nicht komplett aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass er große

Analogien zu einem Transportmechanismus aus *Agrobacterium tumefaciens* besitzen könnte. In *A. tumefaciens* befördert dieser Typ IV-Transporter das sog. Ti-Plasmid aus der Zelle in den pflanzlichen Wirt. In *H. pylori* soll ein ähnlicher Transporter in umgekehrter Richtung funktionieren. Einige Gene, die in *A. tumefaciens* Bestandteile des Transporters sind, konnten auch in *H. pylori* identifiziert werden und sind für die Verleihung der Kompetenz verantwortlich (Hofreuter *et al.*, 1998; Hofreuter *et al.* 2000). Ein schematischer Aufbau der bislang bekannten Komponenten dieses Transporters ist in Abbildung 5 dargestellt (Smeets und Kusters, 2002). Einige Schritte des DNA-Transports, wie beispielsweise die DNA-Bindung an der Oberfläche, sind noch nicht aufgeklärt. Der Transporter stellt einen eigenen, unabhängigen Typ IV-Transporter dar, der nicht auf Bestandteile zurückgreift, die durch die *cag*-Pathogenitätsinsel kodiert werden.

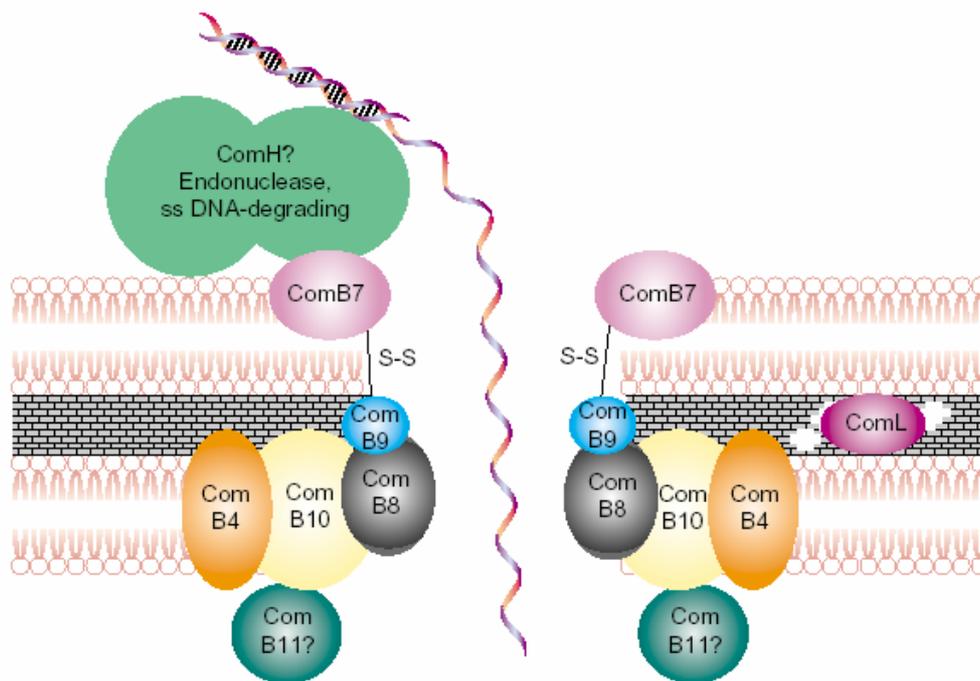


Abbildung 5: Hypothetischer Aufbau eines *H. pylori* Typ IV-DNA-Transporters

Doppelsträngige DNA wird an der Außenseite der Zelle gebunden und einzelsträngig über die Membran transportiert. Die ComB-Proteine formen einen membranständigen Transporter, durch den die DNA in die Zelle gelangt und bindet dort an intrazelluläre Proteine (z.B. *ssb*). Aus Smeets und Kusters, 2002.

1.6.4 Rekombination und Reparatur-Systeme

H. pylori zeichnet sich durch eine sehr hohe Rekombinationsrate aus (Suerbaum *et al.*, 1998). Dennoch sind Gene, die eine homologe Rekombination in der Zelle vermitteln, im Vergleich zu *E. coli* rar (Tomb *et al.*, 1997). Nur wenige DNA-Helikasen, die DNA-Polymerase I und die Rekombinase RecA, die für die Rekombination wichtig sind, sind vorhanden. Der genaue Verlauf der homologen Rekombination und die Beteiligung weiterer Enzyme konnte noch nicht aufgeklärt werden.

Auch die DNA-Reparatursysteme sind, bezogen auf *E. coli*, nur in kleiner Zahl vorhanden. Es gibt keinen SOS-Reparaturweg und auch keine 'Mismatch'- und 'Methyl directed'-Reparatur Systeme. Das in *H. pylori* gefundene *mutS*-Gen gehört zu einer Unterfamilie, die nicht an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Das einzige, komplett vorhandene Reparatursystem ist die Nukleotidexcisions-Reparatur (NER) bestehend aus den Genen *uvrABCD* (van Houten, 1990). Die Funktionalität dieses Reparatursystems ist in *H. pylori* noch nicht untersucht worden.

1.6.5 Restriktions- und Methylierungssysteme

Restriktions-Modifikations-Systeme (RM-Systeme) sind in Bakterien ubiquitär verbreitet. Diese Systeme bestehen jeweils aus zwei bis drei Genen (bzw. Proteinen). Zum einen aus einer Restriktionsendonuklease, die an einer für sie spezifischen DNA-Sequenz die DNA spaltet und zum anderen aus einer oder zwei Methyltransferasen, die Methylgruppen an das Glukose-Rückgrad der doppelsträngigen DNA anheftet und so die Schnittstelle des Restriktionsenzym schützt. Die RM-Systeme werden in drei Klassen eingeteilt, die sich in ihrer Enzymstruktur, der DNA-Erkennungsstelle und der DNA-Schnittstelle unterscheiden (Bickle und Kruger, 1993).

Untersuchungen der Restriktionsmuster verschiedener *H. pylori*-Stämme zeigten, dass sich die Bandenmuster aller Stämme unterschieden. Die Möglichkeit die genomische DNA von Stämmen mit den unterschiedlichen Restriktionsenzymen zu schneiden, variierte ebenfalls zwischen den Stämmen (Xu *et al.*, 2000). Die Sequenzierung der zwei *H. pylori*-Genome zeigte eine Vielzahl an Restriktions-Modifikations-Systemen, wie sie in nur wenigen anderen bakteriellen Spezies gefunden wurde (Vitkute *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2000). Viele der Gene für die RM-Systeme waren in den stammspezifischen Genen zu finden. Die in beiden

sequenzierten Stämmen vorhanden RM-Systeme sind zumeist nicht funktional, darunter alle Typ I und Typ III RM-Systeme. Im Gegensatz dazu kodieren die stammspezifischen Gene in der Regel für aktive RM-Systeme. In weiteren Stämmen bestätigte sich das Ergebnis, dass jeder Stamm sein eigenes Portfolio an RM-Systemen besitzt (Takata *et al.*, 2002). Viele Gene der RM-Systeme zeichnen sich durch einen abweichenden GC-Gehalt aus, was einen horizontalen Gentransfer aus einer anderen Spezies nahe legt (Lin *et al.*, 2001). Einige Gene der RM-Systeme sind, wie auch die *omp*-Gene, durch den 'slipped strand mispairing'-Mechanismus reguliert und können schnell an- und ausgeschaltet werden.

Die RM-Systeme dienen dem Schutz der chromosomalen DNA vor dem Einbau fremder DNA, da diese anders methyliert ist und von den zelleigenen Restriktionsendonukleasen zerschnitten wird. Die große Anzahl von RM-Systemen in *H. pylori* bewirkt eine Transformationsbarriere für Plasmide (Ando *et al.*, 2000), die jedoch mit einer stammspezifischen Methylierung aufgehoben werden kann (Donahue *et al.*, 2000). Die Transformation genomischer DNA ist davon nicht betroffen (Israel *et al.*, 2000). Ob die RM-Systeme auch eine Rolle bei dem DNA-Transfer während einer Konjugation spielen, ist noch nicht bekannt (Kuipers *et al.*, 1998).

1.7 Populationsstruktur von *H. pylori*

H. pylori-Stämme können in allen Regionen und aus allen Bevölkerungsgruppen der Welt isoliert werden. Die Infektionsrate mit *H. pylori* unterscheidet sich jedoch in verschiedenen Regionen.

Trotz der hohen Diversität der einzelnen *H. pylori*-Stämme kann innerhalb einer Familie eine Klonalität festgestellt werden, so dass von einer Übertragung innerhalb der Familie ausgegangen werden kann (Suerbaum *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1993). Ein geringeres Maß an Klonalität kann auch innerhalb verschiedener Bevölkerungsgruppen beobachtet werden, die sich über mehrere Jahrhunderte auseinanderentwickelt haben (Achtman *et al.*, 1999a). Die *H. pylori*-Isolate können in vier geographische Subgruppierungen eingeteilt werden (Afrika 1, Afrika 2, Europa und Ost-Asien). Anhand von Sequenzuntersuchungen an Stämmen aus Bevölkerungsgruppen der ganzen Welt konnten viele historische Bewegungen dieser Gruppen nachvollzogen werden, so beispielsweise die Besiedelung Nordamerikas über die Beringstraße vor etwa 12.000 Jahren oder die Verschiffung von

afrikanischen Sklaven nach Nord- und Südamerika vor 150 bis 470 Jahren (s. Abbildung 6). Diese Untersuchungen konnten unter anderem auch zeigen, dass einige heutige Populationen aus relativ kleinen Gruppen entstanden sein könnten. Beispielsweise sind die *H. pylori*-Stämme der Ureinwohner Neuseelands (Maori) relativ klonal, was auf einen kleinen Pool an unterschiedlichen Allelen schließen lässt (= kleine Anzahl an Menschen), während die amerikanischen Indianer einem größeren Pool an verschiedenen Allelen besaßen, bzw. vermutlich eine größere Menschenmasse die Beringsee überquert hat. *H. pylori* begleitet den Menschen schon viel länger als bislang angenommen (Falush *et al.*, 2003; Ghose *et al.*, 2002).

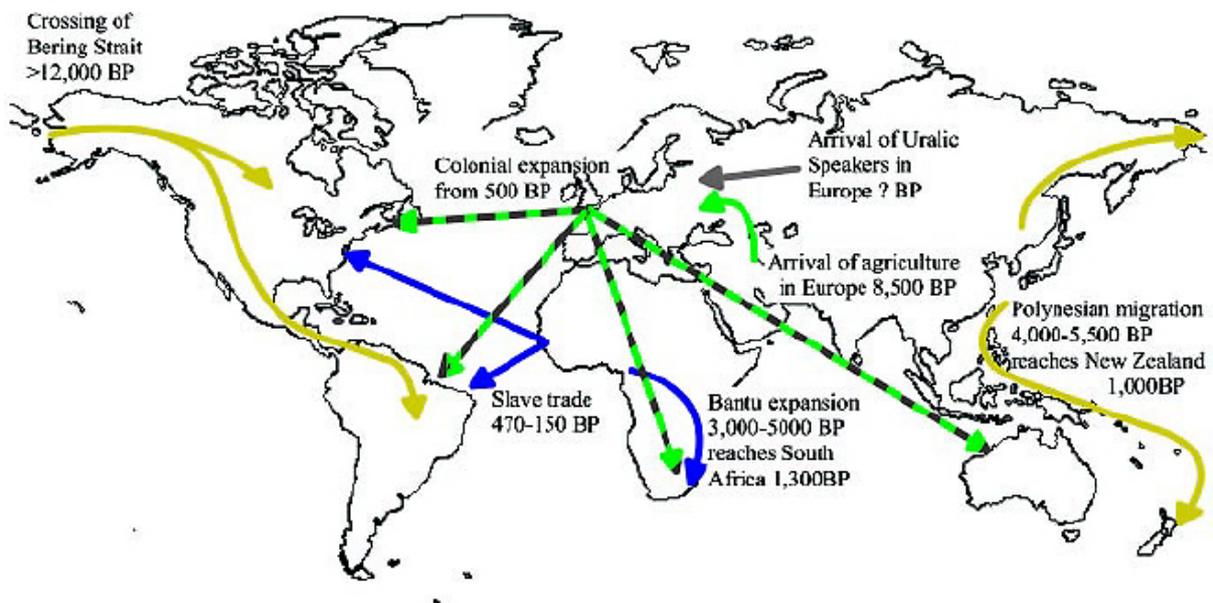


Abbildung 6: Begleitung von *H. pylori* bei menschlichen Bevölkerungswanderungen

Durch die einerseits hohe Diversität und andererseits regionale Klonalität können historische Völkerwanderungen anhand von *H. pylori*-Sequenzvergleichen vieler Stämme aus allen Regionen der Erde nachvollzogen werden. Die Pfeile geben die Bewegungen an, bei denen die Sequenzanalysen die 'Mitreise' von *H. pylori* bestätigt haben. Aus Falush *et al.*, 2003.

1.8 Tiermodelle

H. pylori-Infektionen können durch Ulkusblutungen die Lebensqualität deutlich einschränken oder durch Magenkarzinome sogar tödlich enden. Allerdings ist eine Behandlung mit Antibiotika und Protonenpumpeninhibitoren möglich, die zu einer guten Heilungsprognose führen. Jedoch breiten sich bereits multiantibiotikaresistente Stämme aus, die nur schwer zu behandeln sind (Megraud und Doermann, 1998).

Daher ist es wichtig, neue Strategien zur Bekämpfung des pathogenen Erregers zu entwickeln. Aufgrund der Komplexität des Organismus und des Immunsystems sind für die Entwicklung von Impfstoffen und neuen Therapeutika in der biomedizinischen Forschung Tiermodelle unverzichtbar. Grundlagenforschung zum Verständnis grundlegender, biomedizinischer und biophysikalischer Zusammenhänge, die aus ethischen Gründen nicht am Menschen selbst durchführbar sind, werden in einem Tiermodell erforscht. Zudem können in einem Tiermodell auch die Anfangsstadien der Erkrankung untersucht werden, die beim Menschen häufig unentdeckt bleiben.

Es gibt eine Reihe verschiedener Tiermodelle für *H. pylori* (Nedrud, 1999). Ein günstiges und leicht unterhaltbares Tiermodell ist das Maus-Tiermodell (Marchetti *et al.*, 1995). Es hat den Vorteil, dass Experimente mit einer großen Anzahl von Tieren durchgeführt werden können, wodurch statistische Effekte aufgefangen werden können. Zudem eignet sich das Immunsystem der Maus für bedingte Vergleiche mit dem humanen System. Jedoch ist die Etablierung von *H. pylori*-Stämmen nur mit wenigen, an die Maus angepassten Stämmen, möglich und das histologische Bild der hervorgerufenen Gastritis ist mit der menschlichen Erkrankung nicht vergleichbar (Lee *et al.*, 1997). Infektionsstudien mit *H. pylori* werden auch an anderen Nagetieren wie Ratten (Li *et al.*, 1998), Meerschweinchen (Shomer *et al.*, 1998) und Wüstenrennmäusen (Matsumoto *et al.*, 1997) durchgeführt. Durch die relativ kurze Lebensdauer eignen sich diese Tiere nur sehr eingeschränkt für Langzeitstudien, wie sie für eine Infektion mit *H. pylori* notwendig sind, um chronische Erkrankungen zu induzieren.

Andere Tiermodelle in höheren Säugetieren wie Hund, Katze und Schwein sind schwierig in ihrer Durchführung. Zu den höheren Kosten kommen noch Probleme mit der Haltung der Tiere. Die Schweine müssen beispielsweise steril in Inkubatoren gehalten werden, was nur für einen dreimonatigen Zeitraum möglich ist, und damit wiederum Langzeitstudien, wie sie für *H. pylori* angezeigt sind, ausschließen. Auch Hunde und Katzen müssen keimfrei gehalten werden, um experimentell infiziert werden zu können (Radin *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1995; Krakowa *et al.*, 1987).

Für die Erforschung der durch das Bakterium hervorgerufenen Krankheitsbilder, der Ökologie und der Reaktion des menschlichen Immunsystems ist ein Tiermodell notwendig, das möglichst nahe verwandt ist mit dem Menschen. Eine gute Alternative bieten hier die nicht-humanen Primaten und besonders der Rhesusaffe

Macaca mulatta (*M. mulatta*). Das Tiermodell Rhesusaffe wurde erstmals von Euler *et al.* 1990 beschrieben. Das Immunsystem dieser Affen reagiert sehr ähnlich wie das des Menschen, zudem stellen die Tiere einen natürlichen Wirt für *H. pylori* dar (Dubois *et al.*, 1994), was die experimentelle Infektion erleichtert. Vergleichbare anatomische Voraussetzungen und die Größe der Tiere erlauben endoskopische Eingriffe und Biopsieentnahmen. Durch die lange Lebensspanne von bis zu 35 Jahren werden auch longitudinale Studien ermöglicht, welche gerade bei der chronischen *H. pylori*-Infektion sehr wichtig sind. Ein Nachteil des Modells ist jedoch, dass durch die hohen Anschaffungs- und Unterhaltskosten Versuche nur mit relativ kleinen Tierzahlen durchgeführt werden können (verglichen mit dem Maus-Tiermodell). Das Tiermodell 'Rhesusaffe' für *H. pylori* wurde bereits an der Uniformed Services University of the Health Science (Bethesda/USA) erfolgreich eingesetzt (Dubois, 1999). Ein weiteres Rhesusaffen-Tiermodell wurde am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen etabliert (Mätz-Rensing *et al.*, 2001).

1.9 Ziele der Arbeit

H. pylori besiedelt etwa die Hälfte der Weltbevölkerung und ist die Hauptursache für Gastritis und Magenkarzinome. Zudem ist *H. pylori* die am stärksten diverse Spezies, bei der sich jedes Isolat von allen anderen Isolaten unterscheidet. Nach einer Infektion verändert sich *H. pylori* in seinem Wirt durch homologe Rekombination und Mutation sehr schnell, um sich seiner neuen Umgebung anzupassen. Diese schnelle Wandelbarkeit und die z.T. erheblichen Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten macht es sehr schwer Therapien gegen das Bakterium zu etablieren und aufrechtzuerhalten.

Um zu klären, wie es überhaupt zu dieser Diversität kommt und wie schnell dieses hohe Maß an Diversität zwischen den *H. pylori*-Stämmen zustande kommt, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Strategien verfolgt.

Anhand von sequenziellen Isolaten, die zu verschiedenen, genau definierten Zeitpunkten aus einem Patienten gewonnen wurden, sollte die Geschwindigkeit der Veränderungen gemessen werden. Durch die Sequenzierung von 10 Genen sollte zudem die durchschnittliche Länge der festgestellten Rekombinationsereignisse berechnet werden. Durch Microarray-Analysen dieser sequentiellen Stämme sollte auch die chromosomale Stabilität, die Aufnahme und der Verlust von genetischem Material über die Zeit bestimmt werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein *in vitro*-Transformationsmodell etabliert, das die Transformationsrate und die Länge von importierter DNA bestimmen konnte. Dieses Modell wurde zudem für die Fragestellung, welche Mechanismen bei der Rekombination eine Rolle spielen, eingesetzt. Durch 'knock out'-Mutanten von zwei Genen im NER-System sollte die Art und Weise einer Beteiligung dieses Systems nachgewiesen werden.

In einem Rhesusaffen-Tiermodell wurden Analysen analog zu den sequenziellen Isolaten durchgeführt. Die mit mehreren Infektionsstämmen infizierten Affen wurden zu definierten Zeitpunkten untersucht und Reisolat gewonnen. Zudem sollte in dieser Infektionsstudie die Anfangsphase einer Infektion nachvollzogen werden, die im Menschen zumeist unbemerkt bleibt.

Die Untersuchungen an weiteren Vertretern des Genus *Helicobacter* sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten bezüglich der Rekombinationshäufigkeit und Diversität aufzeigen.

2 Material

2.1 *Helicobacter* Bakterienstämme

2.1.1 *Helicobacter pylori*-Stammkollektive

Stämme	Therapie	maximale Zeitspanne [Monate]
LSU1010-1/-3	S	3
LSU1013-2/-6	T	23
LSU1014-1/-4/-6	T	24
LSU1016-1/-5	S	12
LSU1021-6/-7	T	12
LSU1027-1/-3	S	3
LSU1037-1/-2/-4/-5	S	12
LSU1040-1/-3/-5/-6	T	24
LSU1054-1/-5	S	12
LSU1062-1/-2/-3	S	3
LSU1067-1/-5	T	12
LSU1074-1/-4	S	6
LSU2002-1/-8	S	48
LSU2003-1/-2/-3/-4/-7	S	36
LSU3001-1/-6	S	24
LSU3005-1/-4	S	6
NQ267/1624	B	36
NQ299/1725		36
NQ315/1712	B	36
NQ331/1832		36
NQ351/1677	A,B,T	36
NQ352/1701	A	36
NQ366/1790		36
NQ367/1671	A,B	36
NQ372/1886		36
NQ392/1707	P	36

LSU-STÄMME: -1 = Zeitpunkt der Entnahme des ersten Isolats = Bezugspunkt für weitere Isolate, -2: nach einem Monat, -3: nach drei Monaten, -4: nach sechs Monaten, -5: nach einem Jahr, -6: nach zwei Jahren, -7: nach drei Jahren, -8: nach vier Jahren; NQ-STÄMME: dreistellige Nummer = erster isolierter (früherer) Stamm, vierstellige Nummer = zweiter isolierter (späterer) Stamm; THERAPIE: S: Sucralfat, T: Tripletherapie, A: Ascorbinsäure, B: Beta-Karotin, P: Plazebo; Zeitspanne = Zeitunterschied zwischen den untersuchten Isolaten

2.1.2 *Helicobacter pylori*-Stämme für das 'in vitro'-Flüssigkultur-Modell

2.1.2.1 *H. pylori*-Wildtyp- und antibiotikaresistente Stämme

Stamm	Rifampicinresistente Mutante	Streptomycinresistente Mutante
26695	26695-R1	26695-S1
J99	J99-R3	J99-S5
N6	N6-R1	N6-S1
RE7006	RE7006-R1	
RE8030	RE8030-R1	
NZ609	NZ609-R1	

2.1.2.2 *H. pylori*-Mutanten des NER-Systems

Stamm	<i>uvrA</i> -Mutante	<i>uvrD</i> -Mutante
26695	26695uvrA	26695uvrD
J99	J99uvrA	

2.1.3 *H. pylori*-Infektionsstämme für das Rhesusaffen-Tiermodell

	Stamm
Erste Infektion	BO417
	BO418
Superinfektion	BO238
	CC28c
	MM1303
	RE7006

2.1.4 *Helicobacter nemestrinae*

Stamm
<i>H. nemestrinae</i> ATCC49396

2.1.5 *Helicobacter acinonychis*

Stamm	Tier	Herkunft
ATCC51101	Gepard	
T1	Tiger	Zoo
T2	Tiger	Zoo

Material

Bombay A	Tiger	russ. Staatszirkus
Bombay B	Tiger	russ. Staatszirkus
Mac	Tiger x Löwe	russ. Staatszirkus
Sheba	Löwe	russ. Staatszirkus
Sheena	Löwe	russ. Staatszirkus
India	Tiger	russ. Staatszirkus

2.2 Medien

2.2.1 Feste Medien

Name	Zusammensetzung pro Liter
Blutagar	40g Blood Agar Base No. 2 (Oxoid), 100ml Pferdeblut, 10mg Vancomycin, 3,2mg Polymyxin B, 5mg Trimethoprim, 4mg Amphotericin B
LB-Agar	10g Trypton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl, 15g Agarose

2.2.2 Flüssigmedium

Name	Zusammensetzung pro Liter
BHI-Medium	37 g Brain-Heart-Infusion Broth, 2,5 g Hefeextrakt, 5-10% Pferdeserum (oder 0,1% Cyclodextrin), 10 mg Vancomycin, 3,2 mg Polymyxin B, 5 mg Trimethoprim, 4 mg Amphotericin B
MH-Medium	21 g Müller-Hinton Broth (Difco), 5-10% Pferdeserum (oder 0,1% Cyclodextrin), 10 mg Vancomycin, 3,2 mg Polymyxin B, 5 mg Trimethoprim, 4 mg Amphotericin B
LB	10 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
Einfriermedium	-20°C: 1xPBS, 50% Glycerin
<i>E. coli</i>	-80°C: 1xPBS, 35% Glycerin
Einfriermedium	37 g Brain-Heart-Infusion Broth, 2,5 g Hefeextrakt, 5-10% Pferdeserum (oder 0,1% Cyclodextrin), 10 mg Vancomycin, 3,2 mg Polymyxin B, 5 mg Trimethoprim, 4 mg Amphotericin B
<i>Helicobacter</i>	10% Pferdeserum, 10% Glycerin

2.2.3 Ureasetest

Name	Zusammensetzung pro Liter
Ureaseindikator-Puffer	0,8 mM KH ₂ PO ₄ , 0,6 mM Na ₂ HPO ₄ , in H ₂ O pH7, 0,1% Neutralrot (in Ethanol), 0,1% Bromthymolblau (in Ethanol)

2.2.4 Puffer für Southern Blot

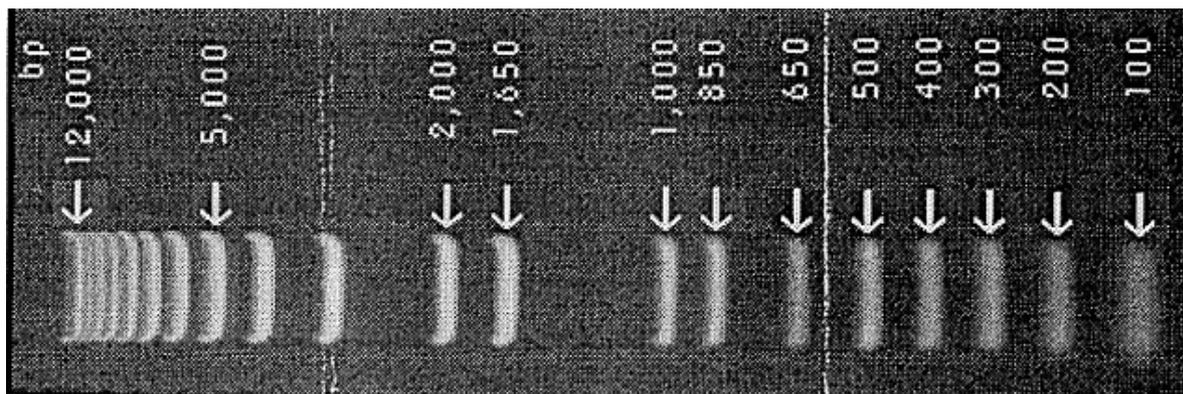
Name	Zusammensetzung pro Liter
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M TRIS-HCl pH 7
Monodpuffer	7% SDS, 0,5 M NaH ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA
Dig-Maleatpuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH7
Waschpuffer	0,3% Tween 20 in Maleatpuffer
Blockierlösung	1% Blockierlösung (Boehringer) in Maleatpuffer
Substratpuffer	0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂
SSC	150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7

2.2.5 Aufreinigung von Plasmiden

Name	Zusammensetzung pro Liter
Doly I	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA
Doly II	0,2 N NaOH, 1% SDS
Doly III	3 M Kaliumacetat, 11,5% Essigsäure

2.3 Marker

2.3.1 DNA-Marker: 1kb Plus DNA ladder



2.3.2 DIG-markierter DNA-Marker

Der DIG-markierte DNA-Marker enthält acht Banden folgender Länge:

23130 Bp, 9416 Bp, 6557 Bp, 4361 Bp, 2322 Bp, 2027 Bp, 564 Bp, 125 Bp

2.4 Primer

2.4.1 RAPD-PCR

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
AP1247	AAGAGCCCGT	36°C
AP1254	CCGCAGCCAA	36°C
AP1281	AACGCGCAAC	36°C
AP1283	GCGATCCCCA	36°C

2.4.2 Amplifikation der partiellen 16S rDNA

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
C97	GCTATGACGGGTATCC	46°C
C98	GATTTTACCCCTACACCA	46°C
16S-3	AGTTTGATC(ACT)TGGCTCAG	52°C
16S-4	GGACTAC(ACT)AGGGTATCTAAT	52°C

2.4.3 Amplifikation von 'housekeeping'- und virulenzassoziierten Genen

2.4.3.1 Amplifikation der Kernfragmente

Primer	Sequenz	Annealing-Temp.
atpA4	TGCCCGTCTGTAATAGAAATG	55°C
atpA7	CGCTTTGGGTGAGCCTATTG	55°C
atpA1964	GGACTAGCGTTAAACGCACG	57°C
atpA1965	CTTGAAACCGACAAGCCCAC	57°C
efpF01	GGCAATTGGGATGAGCGAGCTC	53°C
efpR02	CTTCACCTTTTCAAGATACTC	53°C
efpF02	GGGCTTGAAAATTGAATTGGGCGG	57°C
efpR01	GTATTGACTTTAATGATCTCACCC	57°C
flaA4	ATTGATGCTCTTAGCGTC	47°C
flaA9	CAAGCGTTATTGTCTGGTC	47°C
flaB9	AAGGCATGCTCGCTAGCG	53°C
flaB10	TAATGTCTCTAGCGTCCG	53°C
mutY101	AGCGAAGTGATGAGCCAACAAAC	52°C

Material

mutY102	AAAGGGCAAATCGCACATTTGGG	52°C
mutY1979	GTGGTTGTAG(CT)TGGAACTTTACAC	53°C
mutY1980	CAACGCCCAAGTAACGCTCTTC	53°C
ppa1	GTGAGCCATGACGCTGATTCTTTGT	58°C
ppa2	GCCTTGATAGGCTTTTATCGCTTTCT	58°C
trpC6	TAGAATGCAAAAAGCATCGCCCTC	57°C
trpC7	TAAGCCCGCACACTTTATTTTCGCC	57°C
trpC1968	AAAAGCATCGCCCTC(CT)AAAGGTT	52°C
trpC1969	GCGTCTTTAAT(AG)(AG)TTGTAAGCCCG	52°C
ureI71S1	CAATAAAGTGAGCTTGGCGCAACT	55°C
ureI71AS1	TCCCTTAGATTGCCAACTAAACGC	55°C
vacA3	ACAACCGTGATCATTCCAGC	53°C
vacA4	ATACGCTCCCACGTATTGC	53°C
vacA1958	CTGCTGTAGGAACGGTCTC	53°C
vacA1959	GCGTGGCGCCATCATAAAGAG	53°C
yphCF1	CACTATTACCACGCCTATTTTTTTGAC	57°C
yphCR4	AAGCAGCTGGTTGTGATCACGGGGGC	57°C
yphC1960	CACGCCTATTTTTTTGACTAAAAAC	55°C
yphC1961	GCGTTTAAGAGCGARCTTTTGC	55°C

2.4.3.2 Zusätzliche Primer für die Sequenzierung

Primer	Sequenz	Annealing-Temp.
ppa-n1	GGCTTAATGGTGGATAGG	49°C
ppa-n2	TTCACCCATTT(AG)TTAGGCTC	52°C
ureI-1	TCAAGTATCGCACCATTTGAC	55°C
ureI-2	GTTATTCGTAAGGTGCGTTTG	55°C

2.4.3.3 Amplifikation von *H. acinonychis*-Genen

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
HAflaB-1	CAAACTTGACTGAAGTGGG	55°C
HAflaB-2	ATGGCTAAAATTCACACCGC	55°C
ureI-3	TGGGAAGGA(AT)AAGGCAATGC	55°C

2.4.3.4 Amplifikation der flankierenden Fragmente

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
atpA-11	GAAGCCACACTTTTAGTCCC	52°C
atpA-12	GATTTTCTGTCCATAATGCC	52°C
atpA-9	GTGGAAACGAGTTTCATCGC	56°C
atpA-10	ACTCAAGCGGGCGATGTTTC	56°C
efp-3	TATCCCCCGCATGGAAAGTC	55°C
efp-4	CAAGTGGATTACTTAGCCCC	55°C
efp-5	TGACAAGGCGATTTTCAGTGG	55°C
efp-6	ACACGATTGGCTCTCTTTGC	55°C
flaA-11	ACATCATTCACGCCATCCAC	53°C
flaA-1	GGAGAGATTGAGTTCAGGTTTAAGG	53°C
flaA-12	AAAGGGCGCTTGAATTTGCG	55°C
flaA-13	TGGCTTGACTCATCGCATAG	55°C
flaB-11	TTGCACCGCATTCGCTTG	53°C
flaB-12	AGCGGTCAGGTTTTTGGG	53°C
flaB-13	CT(CA)ACGGTTCCTGATTGCAC	55°C
flaB-14	GATCAATAAAGCCGCTGACG	55°C
mutY-1	ATGTGTCTAATTACAGCGGG	53°C
mutY-2	AAGCCCTAATTGATCTAGGG	53°C
mutY-3	AGCATGCTCACTTGGATCCG	53°C
mutY-5	CTTGAATAATAGCCAAGCCC	53°C
ppa-3	AAAGTGTTAGGCACAAAGCC	53°C
ppa-4	TAAAATCATAGAGCCGGTGG	53°C
ppa-5	ACTTACAAGGATTTAGAGCC	51°C
ppa-6	AAGAAATCCATAAAGCGAGC	51°C
trpC-8	TACTCTCTTAAAATTCGGGC	52°C
trpC4	AGCCCCTTATGTGAATGG	52°C
trpC-9	AATGTTTTTCATAAGAGCC	47°C
trpC-10	TTAAAAGGGCGATGGTGGTT	47°C
urel-4	ACACCGCATCATTGACTTGC	54°C
urel-5	CTCTTTATCCAACACTGGGT	54°C
vacA-6	GGGTTTAAAGACCCTAGCGC	57°C

Material

vacA5	CCA(AG)TCCCA(AG)CCTCCATCAATC	57°C
vacA-7	AATCGTGTGGGTTCTGGAGC	55°C
vacA-9	ATCAACGGTGATATTCCCGG	55°C
yphC-1	TTAGGCTGGCCTAAAATCGC	55°C
yphC-2	AAACGCTTCAAGGCTTTGG	55°C
yphC-3	ACAATAG(GA)GGCATTAGCGC	55°C
yphCR4	AAGCAGCTGGTTGTGATCACGGGGGC	55°C

2.4.4 'empty site'-PCR der Microarray-Evaluation

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
O_2872	CCAAATACATTTTGGCTAAATAAAC	49°C
O_2874	GGTTGCACGCATTTTCCCTT	55°C
O_2875	TCTCCATGTTGCCATTATGCT	53°C
O_2876	GTGCCT(AG)CTAGTTTGTGTCAGCGA	55°C
HP0413ES-1	TGTTTCATGCTCTTCAACCG	53°C
HP0413ES-2	AATTCTGGAGGTTTTGTCCC	53°C
HP526-1	AAAATCTTGCGGATCGTTGC	53°C
HP526-2	AAAAGATAGCAACGATCCGC	53°C
HP526-3	TTAGTCCCTATATCTTGGAC	51°C
HP526-4	AAAATCTTGCGGATCGTTGC	53°C
HP526-5	TGATAGCTTGACCCAAAGCG	55°C
HP526-7	CTCGCTTGCTTGATGCAACC	57°C
HP526-8	CTTTATCTTTTTGTTGGCGC	51°C
HP549-2	GTTTTTGATAGCGGTGTGGG	55°C
HP549-3	CATGAAATTCCACTTTAGGG	51°C
HP549-4	TCAAATTGCCTGAAAGTTCG	51°C
HP549-5	CTTAAAGCGTTCCTCATCGC	55°C
HP549-6	AAACTTCGATCAAACACCCC	53°C
HP549-7	GACAGACACTAACGAAAGGC	55°C
HP549-8	AAACTCCGTCCTTTAGGGC	55°C
HP0765-ES1	TCCAAAATTTGCACACCCC	53°C
HP0765-ES2	TTGAGCGGTATTTTCATGGG	53°C
HP0765-1	TGGAAGAACAAAAGGATATGG	51°C

Material

HP0765-2	TGCTTTTTTGAAGTTCAGCG	51°C
HP0765-3	TTTCGTGGTTCTTACTGGGC	55°C
HP0765-4	TTATGGAAAAAGTCCTAGCG	51°C
HP0780-ES1	GAGTGAAAAGCTAGAGAGCC	55°C
HP0780-ES2	TGAGAAGCGATGAATACGGG	55°C
HP0802-ES1	CCAACCACTCTTTAAGCCC	55°C
HP0802-ES2	GGCTCTTTATTTTAGGGCG	53°C
HP0891-1	AACAGAGGTTGAAATCCGCC	55°C
HP0892-1	AAAGACCACCCACTCAAAGG	55°C
HP902-2	GGCATGCAAATGCGGATTC	55°C
HP905-2	TCGCTGTAGGGTTATTTGCG	55°C
HP0995-1	AGACCAAAGAAAGCTTACCC	53°C
HP0995-2	AGAGAGTAAGGAGCTATGCC	55°C
HP0996-1	TGAAGAGACAATGCAAGGGC	55°C
HP0996-2	ACTTCATTTCTTAGCTGGGC	53°C
JHP0933-1	AAAAATCTAGCCGACACCCC	55°C
JHP0933-2	CCTTGTTGCTCTTGCAAGGC	57°C
JHP0934-1	AAGAACAAGCCCAAGATACC	53°C
JHP0934-2	TAAGCTGATATAAAGTGCGG	51°C
HP1006-1	AGCTCCTACTTAATGCTGGC	55°C
HP1009-1	ATATTGACACACTCGCACCG	55°C
HP1283-1	TCGTTTTGATGGTTGCAACC	53°C
HP1283-2	AACAAACCCTATATCCACGC	53°C
HP1350-1	AGAAACGACTGAACGCTTCC	55°C
HP1350-2	ATCGGGTAAGGTTTCACGCC	57°C
HP1352-1	AGAAAACGGACAAGTGAGGG	55°C
HP1352-3	GAAACGCTTATTTGGTGCGC	55°C
HP1561-ES1	TTTTTAGGATCGCTAACCGC	53°C
HP1561-ES2	CGCAATGATTTCTGTAGGGC	55°C
HP1561-1	TCGTTATGTTAGTTACTCGC	51°C
HP1561-2	TAAGCCTAGCACGATACACG	55°C
HP1566-ES1	GCAAAAACACGCCAAACACC	55°C
HP1566-ES1	TAAAAACGAGCAACACCGCC	55°C

2.4.5 Amplifikation einer IS-Element-Sonde

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
HP1008-1	ATTGATGATATGAGACACGG	51°C
HP1008-2	CTTAATCATCTCTAAAGGCG	51°C

2.4.6 Amplifikation eines Vektorinserts

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
M13for	GTTTTCCCAGTCACGACG	56°C
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC	56°C

2.4.7 Amplifikation von Antibiotika-resistenzverleihenden Genen**2.4.7.1 Amplifikation und Sequenzierung des *rpoB*-Gens**

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
rpoB1	CCCAACAGATTTAGAAGT	52°C
rpoB2	TACCATAACAGGCTCAGC	52°C
rpoB3	ATGTGCCTGATTACATCACGAC	55°C
rpoB4	TTGGCGCTGCATGTTAGTCC	55°C
rpoB5	GGTAGCCGCATCGCTCATTC	57°C
rpoB6	TTCCCTAACGCTAACTCGC	57°C
rpoB9	AGACGCCAATCAAAGAATGG	53°C
rpoB10	CATCAATCTTGCCCTGATTG	53°C

2.4.7.2 Amplifikation und Sequenzierung des *rpsL*-Gens

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
rpoB7	TCGTGTTAAGAGCGCTTGAGG	55°C
rpsG1	GTTCCATAAACAGGATCGC	55°C
rpsL2	AAAAGAACGGTTTCACGCTC	55°C
fusA1	TCAATGTGAGCGGCGATAACC	55°C
rpoB8	GTTTTGGCAAACCCATTCGC	55°C
rpsL3	CAGATTGATAGTAGGCAC	55°C

2.4.8 Primer für *H. pylori* 'knock out'-Mutanten

Name	Sequenz	Annealing-Temp.
uvrA-1s	ATAGGATCCATTATTCAAGGGGCTAGGG	55°C
uvrA-2s	ATAGGATCCTATCCACAACAAAATCCGC	55°C
uvrA-3s	ATAAGATCTTGAAGGAAAACTCAAAGGC	53°C
uvrA-4s	ATAAGATCTATTTTAGATCCTAACACGCC	53°C
uvrD-3s	ATAGGATCCTAGCGATGAAGTCAAACGC	55°C
uvrD-4s	ATAGGATCCTCAAAGCCTCCCTCAAACG	55°C
uvrD-5s	ATAAGATCTATGAGAGAATTAGCGCACGC	55°C
uvrD-6s	ATAAGATCTTCAAAGTTTCAAAGGCTCGC	55°C

3 Methoden

3.1 Anzucht der Bakterien

3.1.1 Feste Medien

3.1.1.1 *Helicobacter*-Spezies

Die als Einfrierkultur (-80°C) vorliegenden *Helicobacter*-Stämme wurden angetaut, ca. 50 µl der Kultur entnommen und auf eine Blutagarplatte aufgetropft. Die Agarplatten wurden anschließend bei 37°C für 48 Stunden in einem Anaerobentopf unter mikroaeroben Bedingungen (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) durch Benutzung eines Anaerocult C-Beutels (Merck, Darmstadt) angezüchtet. Die angewachsenen Bakterien wurden bei der ersten Überimpfung auf eine komplette Agarplatte expandiert und im folgenden alle zwei Tage auf eine frische Agarplatte überimpft.

3.1.1.2 *Escherichia coli*

Die Stämme von *E. coli* wurden auf LB-Platten angezüchtet. Die Kultur erfolgte aerob in einem Inkubator bei 37°C über Nacht. Je nach Anwendung wurden dem Agar zusätzlich Antibiotika (Amp, Km) oder weitere Reagenzien (X-Gal, IPTG) zugesetzt. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf eine frische Agarplatte überimpft.

3.1.2 Flüssigmedium

3.1.2.1 *Helicobacter*-Spezies

Für die Anzucht von *Helicobacter* Spezies in Flüssigmedien wurden die Bakterien auf 3 Agarplatten für 20-24 Stunden unter mikroaeroben Bedingungen angezüchtet. Der Zellrasen dieser Agarplatten wurde in 5 ml des jeweiligen Flüssigkulturmediums transferiert. Als Kulturmedien wurden Brain-Heart-Infusion Medium (BHI) oder Müller-Hinton Medium (MH) verwendet. Die Medien enthielten die Antibiotika Vancomycin (10 µg/ml), Polymyxin B (3,2 µg/ml), Trimethoprim (5 µg/ml) und Amphotericin B (4 µg/ml), sowie entweder 5% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Gibco BRL) oder 0,1% Cyclodextrin (Sigma). Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die optische Dichte (OD) bei 600nm mit einem Photometer (GeneQuant, amersham pharmacia biotech, Piscataway, NJ/USA) gemessen. Dabei entspricht eine OD=1 3×10^8 Bakterienzellen. Die Start-OD der Bakterienkultur wurde ausgehend von der Messung auf eine OD

von $0,05$ ($1,5 \times 10^7$ Zellen/ml) eingestellt und in einem Anaerobentopf in mikroaerober Atmosphäre bei 37°C in einem Schüttelinkubator durchgeführt.

3.1.2.2 *Escherichia coli*

Die Flüssigkultur von *E. coli* wurde in LB-Medium durchgeführt. Die Bakterienzellen wurden von einer Agarplatte in das Flüssigmedium transferiert und für 12-16 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur ihrer weiteren Verwendung zugeführt (Plasmidisolierung, Einfrierkultur).

3.1.3 Magenbiopsien

Eingefrorenes Magenbiopsiematerial (-80°C) von Rhesusaffen ($\varnothing 2-3$ mm) wurde umgehend auf Blutagarplatten aufgetragen und auf der gesamten Platte ausgestrichen. Befand sich das Biopsiematerial in Flüssigmedium wurden in einigen Fällen $100 \mu\text{l}$ dieses Mediums auf der Blutagarplatte ausgebracht und nicht die Biopsie selbst. Die Agarplatten wurden in einem Anaerobentopf unter mikroaeroben Bedingungen für 3-5 Tage bei 37°C kultiviert. Die gewachsenen Kolonien wurden zunächst mit einem Binokular (Zeiss, Jena) betrachtet. Kolonien, die der Morphologie von *H. pylori* entsprachen, wurden vereinzelt und in Reinkultur gebracht.

3.1.4 Einfrierkulturen

3.1.4.1 *Helicobacter*-Spezies

Kulturen von *H. pylori* wurden ausschließlich bei -80°C eingefroren. Dazu wurden die Bakterien von einer gut bewachsenen Blutagarplatte abgenommen und in das bereits aliquotierte Einfriermedium (BHI + 10% Glycerin) eingerieben. Die Einfrierkultur wurde umgehend bei -80°C eingefroren.

3.1.4.2 *Escherichia coli*

Kulturen von *E. coli* wurden sowohl bei -80°C als auch bei -20°C eingefroren. Hierzu wurden entweder Zellen von einer Agarplatte in das Einfriermedium eingerieben (analog zu der *H. pylori*-Kultur), oder Zellen einer Flüssigkultur pelletiert und in dem Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium bestand aus LB-Medium und Glycerin. Der Glycerin-Anteil betrug 50% bei der -20°C -Einfrierkultur und 35% bei der -80°C -Einfrierkultur.

3.2 Ureasetest

Der Ureasetest ist ein Farbindikator-Test (0,1% Neutralrot, 0,1% Bromthymolblau), der die Anwesenheit von für *H. pylori* typische Urease bestimmt. Kleine Mengen von Bakterienmaterial wurden in die Ureasetest-Lösung gebracht. Durch das Vorhandensein von Urease wurde das Medium alkalisiert und ein Farbumschlag wurde sichtbar. Der Farbumschlag erfolgte binnen weniger Minuten.

3.3 DNA-Isolierung

3.3.1 QiaAmp

Für die Isolierung kleinerer Mengen DNA wurde das Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Extraktion der DNA folgte dem angegebenen Protokoll des Herstellers.

3.3.2 TIP100

Der Zellrasen von 2-3 Agarplatten wurde in physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) eingerieben und bei 3500 rpm für 15 min zpellietiert (Omnifuge2.0RS, Haereus, Osterode). Die DNA-Isolierung mit TIP100/G-Säulen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden), alle Puffer waren Bestandteil des 'Genomic DNA Buffer Set' (Qiagen). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.4.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde zur Amplifikation von einzelnen Genen aus dem Genom benutzt, die Amplifikate wiesen typischerweise eine Länge von 400-1500 Basenpaaren (Bp) auf. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl in 0,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt, die aus 5 µl 10x-PCR-Puffer, 8 µl dNTP's (200 µM), 3 µl MgCl₂ (25 mM), je 0,5 µl Primer (20 pmol/µl), 0,2 µl Polymerase (1 U AmpliTaq Gold, Roche), 28 µl H₂O und 5 µl einer DNA-Präparation bestand. Als DNA-Vorlage wurde entweder genomische DNA oder ein aufgereinigtes Plasmid verwendet. Die PCR wurde anschließend in einem TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Das Programm bestand aus folgenden Schritten: Anfängliche Denaturierung bei 95°C für 5 min, zyklische Denaturierung bei 94°C für 60 s, Primerbindung ('Annealing') bei 49-60°C für 60 s, Elongation bei 72°C für 1-2 min. Die Anzahl der Zyklen wurde auf 30 begrenzt, anschließend wurde eine terminale

Elongation von 7 min bei 72°C durchgeführt und letztlich bis zur Entnahme bei 15°C gekühlt. Die Annealing-Temperatur wurde für jedes Primerpaar aufgrund der Primersequenz berechnet (s. 2.4). Die Zeit der Elongation ergab sich aus der zu erwartenden Länge der PCR.

3.4.2 Plasmidspezifische PCR direkt aus Zellmaterial

Eine PCR direkt aus Bakterienzellen war nur mit *E. coli*-Zellen möglich, wenn der zu amplifizierende DNA-Abschnitt auf einem Plasmid lag, das in hoher Konzentration in jeder Zelle vorlag ('high-copy Plasmid'). Dazu wurde ein 25 µl-Ansatz einer PCR wie beschrieben (s. 3.4.1) hergestellt. Anstelle der Zugabe von DNA wurde aus Einzelkolonien Zellmaterial abgenommen und in den Reaktionsansatz eingebracht.

3.4.3 RAPD-PCR

Die 'Random Amplified Polymorphic DNA'-PCR (RAPD) ist eine 'Fingerprint'-Methode, da jedes Bakterium, im Fall von *H. pylori* jeder Stamm, ein charakteristisches Bandenmuster produziert. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Die Ansätze bestanden aus 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 4,8 µl dNTP's, 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl Primer (5 pmol/µl), 0,2 µl Polymerase (1 U PharmaciaTaq) und 6 µl H₂O. Diesem Mix wurden 5 µl (5 ng) genomische DNA zugegeben. Jede PCR wurde mit nur einem Primer durchgeführt. Es standen insgesamt vier unterschiedliche Primer zur Verfügung (AP1247, AP1254, AP1281, AP1283). Das PCR-Programm war für alle Primer gleich und erfolgte gemäß der Standard-PCR, die Elongation wurde auf 2 min beschränkt, abweichend wurde die Reaktion mit 40 Zyklen durchgeführt.

3.4.4 'Empty site' PCR (ES-PCR)

Die 'empty site' PCR diente dem Nachweis, ob die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) in einem Stamm vorhanden ist. Dazu wurde eine PCR mit Primern in den angrenzenden Genen durchgeführt. Die PCR (Standard-Programm, s. 3.4.1) sollte im Falle der Anwesenheit der Pathogenitätsinsel kein PCR-Produkt ergeben, bei Abwesenheit konnte hingegen ein PCR-Fragment amplifiziert werden.

3.5 Sequenzierung

3.5.1 Vorbereitung der Sequenzierproben

Die zu sequenzierende DNA war unterschiedlichen Ursprungs. Befand sich der DNA-Abschnitt auf einem Plasmid, musste dieser zunächst aufgereinigt werden (s. 3.8.3). Für die meisten Sequenzierungen dienten jedoch PCR-Produkte als Ausgangsmaterial.

Die PCR-Ansätze wurden mit dem 'QIAquick PCR purification Kit' (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Wurde ein PCR-Fragment über ein Agarosegel aufgereinigt, wurde das gewünschte Fragment mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Agarosegel eluiert.

Für die Sequenzierung wurden ca. 50 ng DNA eingesetzt. Das Endvolumen der Sequenzprobe betrug 7,5 µl. Die entsprechende Menge aufgereinigte DNA wurde mit H₂O auf 7 µl aufgefüllt, dann wurden 0,5 µl des Sequenz-Primers (20 pmol/µl) zugegeben. Die fertigen Proben wurden dann im zentralen DNA-Labor des Instituts weiterbearbeitet. Die Sequenzreaktion wurde mit dem 'Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit' (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, jedoch mit nur 25% der vorgeschriebenen Reagenzien-Menge. Die amplifizierten Proben wurden mit einem automatischen Sequenzierer ABI377 (Applied Biosystems) aufgetrennt. Die endgültigen Sequenzen wurden als Computer-Dateien zur Verfügung gestellt.

3.5.2 Analyse der Sequenzen

Jede Sequenzreaktion wurde in zwei Computer-Dateien abgelegt. Eine Datei enthielt die eigentliche Sequenzinformation, zudem wurde die Sequenz in einer Textdatei abgelegt. Zur schnellen Betrachtung der sequenzierten DNA wurde das Computer-Programm 'Chromas' verwendet.

Die weitergehende Analyse wurde mit einem umfangreichen Software-Paket durchgeführt. Dazu wurden die Sequenzdaten via FTP-Server auf einen Unix-Server am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin übertragen. Mit der STADEN-Software wurden die Sequenzen weiterbearbeitet. Die Qualität der Sequenzen wurde durch das PEARL-Script 'qualityclip.pl' beurteilt und die Rohdaten in neue Dateien umgewandelt (*.exp, *.scf). Alle Sequenzen eines PCR-Produkts (*.exp-Dateien) wurden in einer neuen Datei zusammengefasst (*.explist), die es dem Programm

'gap4' ermöglichte einen 'Contig' zu erstellen (Zusammensortierung von Sequenzen, die einen Überlappungsbereich besitzen), der die Sequenzen zusammenlagert und graphisch darstellt. Die bearbeiteten Sequenzen wurden anschließend in das gcg-Format konvertiert und so für das Programm 'Seqlab' lesbar gemacht. In diesem Programm waren sowohl multiple Sequenzvergleiche möglich ('PileUp'-Alignment), als auch die Übersetzung der DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz. Die Referenzsequenzen wurden aus Textdateien in ein 'gcg'-Format umgewandelt und dem Programm zugefügt. Je nach Anwendung wurden die sortierten Sequenzen auf eine zuvor festgelegte Länge gekürzt, gespeichert und gegebenenfalls in einer öffentlichen Datenbank abgelegt (z.B. Genbank, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

3.6 T/A-Klonierung

Für die T/A-Klonierung wurden hauptsächlich Bestandteile des T/A TOPO Cloning Kit (Invitrogen, Groningen/Niederlande) verwendet. Die aufgereinigten PCR-Produkte (2 µl) wurden 5 min mit dem Vektor (1 µl, Lösung enthielt das Enzym Topoisomerase I) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Die bei -80°C eingefrorenen *E. coli*-Zellen (50 µl) wurden auf Eis langsam aufgetaut, 2 µl des Ligationsansatzes zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s bei 42°C hitzegeschockt und wiederum 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 950 µl SOC-Medium wurde der Ansatz nochmals für 60 min bei 37°C geschüttelt. Auf zwei LB-Agarplatten (enthielten Ampicillin (100 µg/ml), X-Gal, IPTG) wurden je 100 µl dieses Ansatzes verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Transformation wurden entweder kompetente TOP10F' *E. coli*-Zellen oder der *E. coli*-Stamm DH5α verwendet. Pro Transformationsansatz wurden bis zu 50 der weißen Kolonien auf eine neue LB-Agarplatte übertragen. Die klonierte DNA im Plasmid wurde mit einer PCR (s. 3.4.2) untersucht.

3.7 Southern Blot

3.7.1 Vorbereitung der Proben

Die hochmolekulare, genomische DNA (TIP100, s. 3.3.2) der zu untersuchenden Stämme wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (Gibco BRL) verdaut. Das Enzym wurde anschließend durch Hitze inaktiviert und der gesamte Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt.

3.7.2 Präparation des Gels

Die DNA im Agarosegel wurde in Salzsäure (0,25 M) depuriniert. Anschließend wurde das Gel zweimal in einem denaturierenden Puffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) gewaschen und dann zweimal in einen neutralisierenden Puffer (1,5 M NaCl, 0,5 M TRIS-HCl pH 7) gelegt.

3.7.3 Vakuum Blot

Die DNA aus dem Agarosegel wurde mittels eines Vakuublots auf eine Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) übertragen. Die positiv geladene Nylonmembran wurde in 6x SSC Puffer equilibriert. Ein mit 6x SSC Puffer getränktes Stück Whatman-Papier wurde auf den Vakuublottler gelegt. Auf dieses Papier wurde die Membran aufgelegt. Anschließend wurde das zuvor vorbereitete Agarosegel auf die Nylonmembran platziert. Die Vakuumpumpe wurde angeschlossen und der Blot bei -0,3 bar für zwei Stunden durchgeführt. Nach dem Vakuublott wurde die Membran kurz in 2x SSC Puffer mit 0,1% SDS getaucht und dann die DNA durch UV-Lichtbestrahlung (1200 μ J) fest an die Membran gebunden.

3.7.4 DIG-Markierung der Sonde

Die DNA, die zum Hybridisieren genutzt werden sollte (Sonde), wurde zunächst mit Digoxigenin (DIG) markiert. Als Sonden wurden ausschließlich PCR-Produkte des *H. pylori*-Referenzstammes 26695 verwendet. Um das an dUTP gebundene Digoxigenin in die DNA einzubauen, wurden zwei verschiedene Methoden benutzt.

Zum einen wurde das 'DIG-DNA labeling Kit' (Roche, Mannheim) verwendet. Etwa 250-300 ng DNA wurden bei 95°C für 10 min denaturiert. Anschließend wurden einem insgesamt 20 μ l-Ansatz 2 μ l Hexanukleotide, 2 μ l DIG-dNTP's und 2 U Klenowenzym zugefügt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 μ l 0,2 M EDTA gestoppt. Die DNA wurde mit 4 M LiCl und Ethanol (pro analysi, 100%, kalt) gefällt und 30 min bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen und bei 11000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in TE Puffer aufgenommen.

Bei der zweiten Methode wurde das Digoxigenin durch eine PCR-Reaktion eingebaut. Hierzu wurden 1 μ l der regulären Menge an dNTP's durch DIG-markierte dUTP's ersetzt, ansonsten wurde das Standard-PCR-Protokoll verwendet. Der

erfolgreiche Einbau des Digoxigenins konnte anhand einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

3.7.5 Hybridisierung

Die zuvor hergestellte Nylonmembran wurde luftblasenfrei mit 5 ml Monodpuffer gefüllte Folientüte eingeschweißt und für eine Stunde bei 42°C vorinkubiert. Danach wurde der Puffer durch Neuen ersetzt, der den kompletten Ansatz (50 µl) der hergestellten Sonde, die zuvor bei 100°C denaturiert worden war, enthielt. Die Folientüte wurde über Nacht im 42°C-Wasserbad hybridisiert. Die der Membran anhaftende Sonde wurde hoch- oder niedrig-stringent gewaschen. Beim hochstringenten Waschen wurde der Blot zweimal 15 min bei Raumtemperatur in 2x SSC + 0,1% SDS-Puffer und anschließend dreimal 20 min bei 62°C in 0,1 SSC + 0,1% SDS-Puffer gewaschen. Beim niedrigstringenten Waschen wurde der Blot lediglich zweimal 60 min bei Raumtemperatur in 2x SSC + 0,1% SDS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Blot entwickelt. Dazu wurde er 5 min in Waschpuffer gewaschen und dann 30 min in Blockierpuffer geschwenkt, gefolgt von weiteren 30 min in Blockierpuffer mit αDIG-AP Konjugat (1:10000), zweimal 5 min Waschpuffer, zweimal 5 min Substratpuffer und 5 min Substratpuffer mit CSPD (1:200). Die getrocknete Membran wurde faltenfrei in Frischhaltefolie gewickelt und abgedunkelt 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm MP, amersham pharmacia biotech) gelegt und für 5, 15 und 30 min exponiert. Der Röntgenfilm wurde im Fotolabor entwickelt.

3.7.6 Strippen von Southernblots

Sollte ein Blot wiederverwendet werden, musste das alkali-labil an die DNA gebundene Digoxigenin abgespalten werden. Der Blot wurde in H₂O gewässert und anschließend zweimal 15 min bei 37°C in 0,2 M NaOH + 0,1% SDS gewaschen. Nach weiteren zweimal 5 min in 2x SSC Puffer konnte der Blot wieder prähybridisiert werden. Jeder Blot wurde maximal einmal 'gestrippt'.

3.8 Herstellung von *H. pylori* 'knock out'-Mutanten

3.8.1 Klonierung eines *H. pylori* Gens in einen Vektor

Das auszuschaltende Zielgen wurde aus dem *H. pylori* -Stamm 26695 mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden Primer verwendet, die an ihrem 5'-Ende einige Nukleotide besaßen, die für eine Restriktionsschnittstelle kodierten. Das PCR-Produkt wurde mit

dem entsprechenden Restriktionsenzym (*Bam*HI) verdaut, so dass an beiden Enden des Fragments ein einzelsträngiger Bereich von wenigen Basen entstand. Parallel wurde auf gleiche Weise ein aufgereinigtes pUC18-Plasmid mit *Bam*HI verdaut. Zur Verhinderung der Selbstligation des Vektors wurde das endständige Phosphat mittels alkalischer Phosphatase entfernt. Dazu wurden 40 µl des verdauten Plasmids mit 1 µl One-phor-all-Puffer (OPA), 2 µl CIAP 1:20 und 7 µl H₂O gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 85°C inaktiviert. Das DNA-Fragment ('Insert') und der Vektor wurden mit dem 'Quick Ligation Kit' (New England Biolabs, Beverly, MA/USA) nach Herstellerangaben zusammengefügt.

3.8.2 Transformation

Für die Transformation wurde der kompetente *E. coli*-Stamm DH5α verwendet, der zur α-Komplementation befähigt ist. Die Transformation wurde wie bereits bei der T/A-Klonierung beschrieben durchgeführt (s. 3.6). Weiße Kolonien wurden abgenommen und auf eine neue Agarplatte überimpft.

3.8.3 Aufreinigung von Plasmiden

3.8.3.1 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation ermöglichte eine schnelle Aufreinigung einer größeren Anzahl von Klonen. Hierzu wurden weiße Kolonien von der Agarplatte abgeimpft und in je 5 ml LB-Flüssigmedium (mit Antibiotika) überführt. Diese Kulturen wurden über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C angezüchtet. Die angewachsenen Kulturen wurden abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl Doly1-Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl eiskaltem Doly2-Puffer wurde der Ansatz mehrmals vorsichtig geschwenkt und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 400 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gemischt und bei 13000 rpm 3 min zentrifugiert. 350 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2 vol Ethanol (pro analysi, 100%) gemischt. Die Plasmide wurden anschließend bei 13000 rpm für 30 min bei 4°C in der Zentrifuge gefällt. Nach einem weiteren Waschschrift (Ethanol, 70%) wurde der Überstand dekantiert und die Reaktionsgefäße an der Luft getrocknet. Die gewonnenen Plasmide wurden in 10 mM TRIS pH 8 + RNase (10 mg/ml) aufgenommen. Zur Kontrolle wurde sowohl das

isolierte Plasmid, als auch ein mit einem Restriktionsenzym verdautes Plasmid auf ein Agarosegel aufgetragen und die sich ergebenden Banden ausgewertet.

3.8.3.2 Midi-Präparation

Von ausgewählten Plasmiden, ist eine Midi-Präparation durchgeführt worden, die eine höhere Reinheit und eine größere Menge an Plasmid-DNA ergab. Diese Präparation wurde mit dem 'Qiagen Plasmid Midi Kit' (Qiagen, Hilden) nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Die aufgereinigten Plasmide wurden in TRIS-HCl pH 8,5 aufgenommen. Das isolierte Plasmid wurde mit einer Bezeichnung belegt (pSUS17xx, s. Abbildung 7 und 8) und beschrieben.

3.8.4 Einfügen einer Restriktionsschnittstelle

Sollte in einem späteren Schritt ein Kanamycin-Antibiotikaresistenzgen in das in dem Plasmid enthaltene *H. pylori*-Gen eingebaut werden, musste zunächst, soweit nicht natürlicherweise vorhanden, eine Restriktionsschnittstelle eingebaut werden. Hierzu wurden neue Primer erstellt, die dicht beieinander im Insert lagen und durch eine auseinanderlaufende Orientierung bei einer PCR-Reaktion den kompletten Vektor amplifizierten (inverse PCR). Die Primer besaßen an ihrem 5'-Ende einige Basen, die für eine Restriktionsschnittstelle (*Bgl*II) kodierten. Das PCR-Produkt wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut, ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert und aufgereinigt (s. 3.8.2 - 2.2.5).

3.8.5 Einfügen einer Antibiotika-Resistenzkassette

Ein Kanamycin-Resistenzgen, das *Bam*HI-Schnittstellen flankierten, wurde aus dem Plasmid pILL600 ausgeschnitten. Das Plasmid pILL600 wurde wie beschrieben isoliert (s. 3.8.3.2), und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten. Das ausgeschnittene Fragment hatte eine Länge von 1380 Bp. Es diente nun als Insert für das zuvor hergestellte Plasmid (s. 3.8.4), das mit *Bgl*II linearisiert worden war. Nach erfolgter Klonierung des Inserts in den Vektor wurden die transformierten *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten kultiviert, die sowohl Ampicillin als auch Kanamycin enthielten. Um spätere polare Effekte ausschließen zu können, sollte die Leserichtung des zuerst klonierten *H. pylori*-Gens und die des Kanamycinresistenzgens in die gleiche Richtung erfolgen. Zu diesem Zweck wurden die erhaltenen Klone mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut, da sich eine Schnittstelle am 3'-Ende des Kanamycin-Resistenzgens und eine weitere auf dem

pUC18-Plasmid befand. Durch diesen Verdau konnte die Leserichtung des Resistenzgens beurteilt werden.

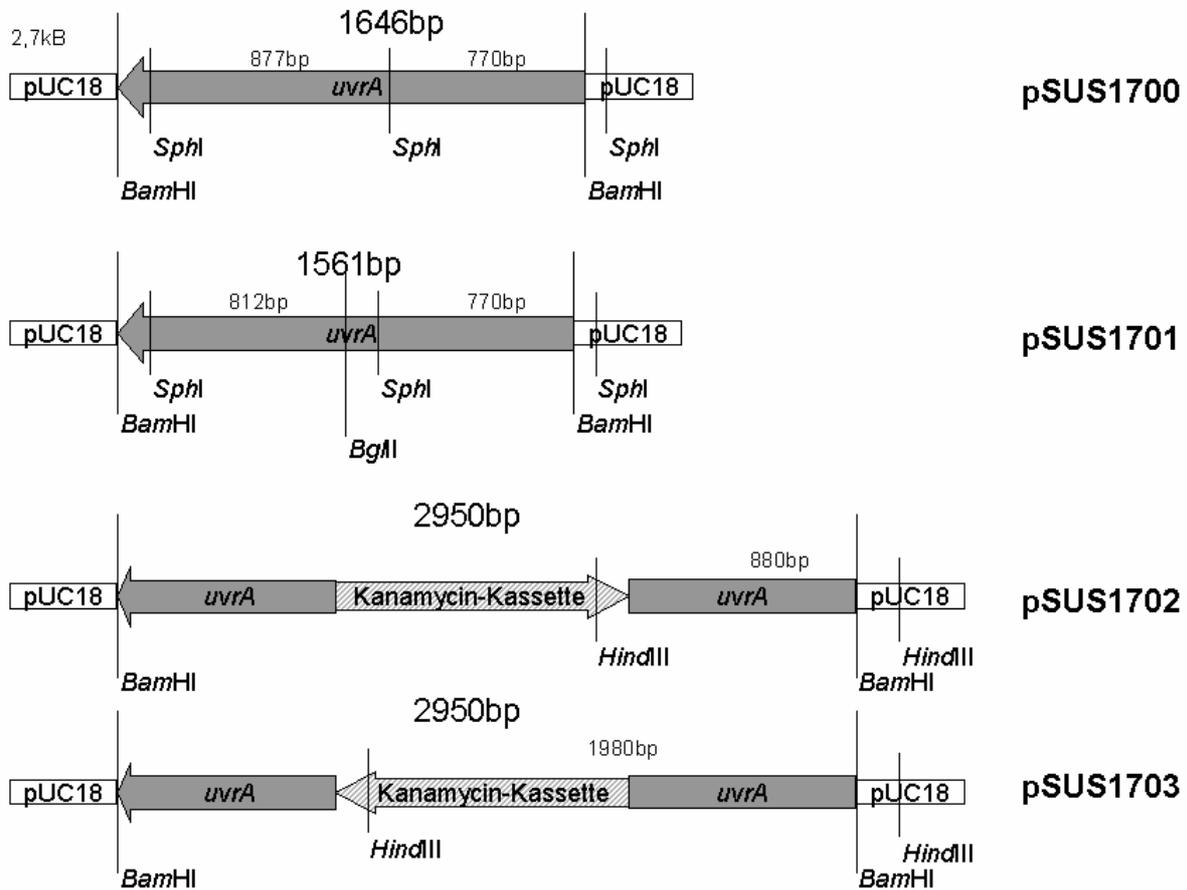


Abbildung 7: Plasmide zur Herstellung einer *uvrA*-Mutante

Das PCR-Produkt des Gens *uvrA* wurde in einen pUC18-Vektor transformiert, anschließend wurde durch inverse PCR eine *BglII*-Schnittstelle eingefügt, in die ein Kanamycinresistenz-Kassette kloniert wurde. pSUS1700-1703= Namen der Plasmide, *BamHI*, *SphI*, *BglII*, *HindIII*= Schnittstellen der Restriktionsenzyme

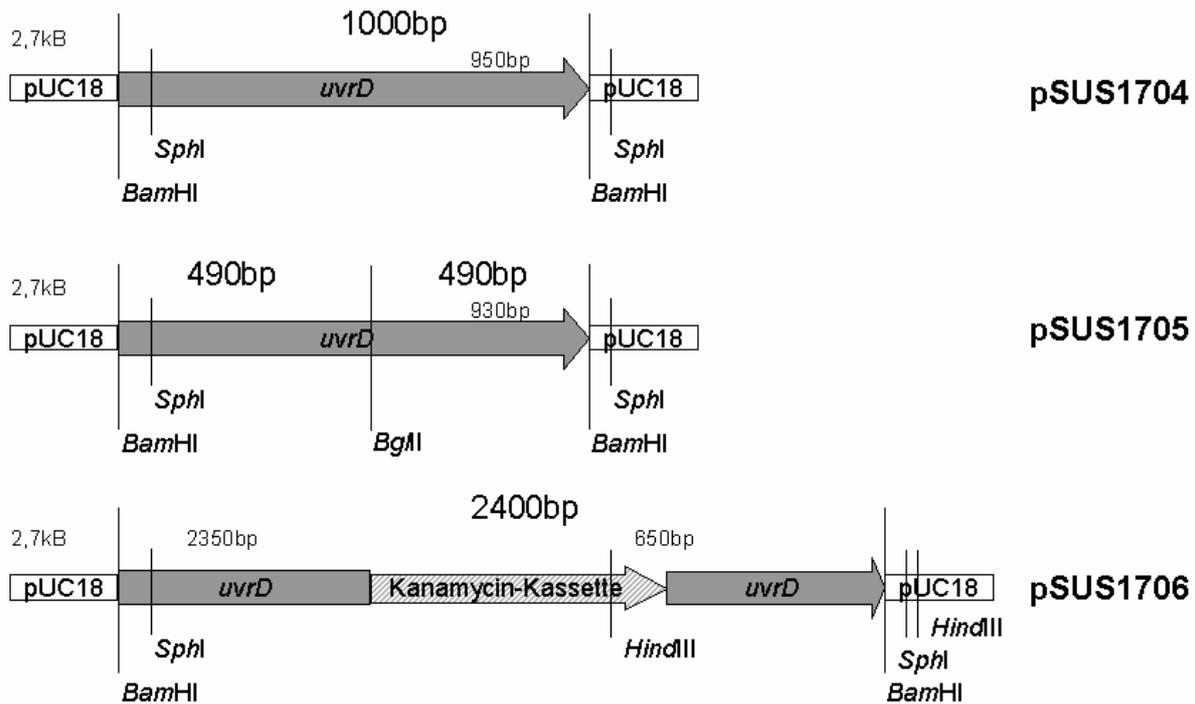


Abbildung 8: Plasmide zur Herstellung einer *uvrD*-Mutante

Das PCR-Produkt des Gens *uvrD* wurde in einen pUC18-Vektor transformiert, anschließend wurde durch inverse PCR eine *BglII*-Schnittstelle eingefügt, in die ein Kanamycinresistenz-Kassette kloniert wurde. pSUS1704-1706= Namen der Plasmide, *BamHI*, *SphI*, *BglII*, *HindIII*= Schnittstellen der Restriktionsenzyme

3.8.6 Natürliche Transformation von *H. pylori*

Das Plasmid sollte durch die natürliche Fähigkeit von *H. pylori*, DNA aufzunehmen, in die Zelle gelangen und dort durch homologe Rekombination in das Genom eingebaut werden. Hierzu wurden Zellen des Zielstammes auf eine frische Blutagarplatte übertragen und etwa 2 cm groß ausgestrichen. Der Stamm wuchs etwa vier Stunden auf der neuen Platte an, dann wurden 5 µl der Plasmidpräparation (s. 3.8.5) auf der beimpften Fläche verteilt. Die Agarplatte wurde 48 Stunden inkubiert und die gewachsene Kultur auf zwei neue Blutagarplatten verteilt, die Kanamycin enthielten. Auf diesen Selektivplatten konnten nur erfolgreich rekombinierte Klone wachsen, die das im Plasmid befindliche Zielgen samt Kanamycinresistenzgen in ihr Genom integriert hatten, da sich das Plasmid nicht in *H. pylori* replizieren konnte ('Suicide Plasmid'). Ein Klon wurde als Mutante in die Stammsammlung aufgenommen und beschrieben.

3.9 Herstellung antibiotikaresistenter *H. pylori*-Isolate

Die Ausgangsstämme wurden auf Blutagarplatten angezüchtet und auf einer frischen Agarplatte, die das jeweilige Antibiotikum (Rifampicin 10 µg/ml oder Streptomycin 5 µg/ml) enthielt, ausgestrichen. Nach 4-6 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien expandiert. Eine weitere Möglichkeit stellte die Anzucht der Ausgangsstämme in Flüssigkultur dar. Durch die Ausplattierung einer definierten Zellzahl konnte gleichzeitig die spontane Mutationsrate im jeweils resistenzverleihenden Gen (*rpoB* für Rifampicin und *rpsL* für Streptomycin) untersucht werden. Die Sequenz des Zielgens wurde von allen Klonen bestimmt und mit der Sequenz des Ausgangsstamms verglichen.

3.10 Flüssigkultur-Transformation

Flüssigkulturen der beiden komplett sequenzierten *H. pylori*-Stämme 26695 und J99, sowie der Mutanten 26695uvrA⁻, 26695uvrD⁻ und J99uvrA⁻, wurden wie beschrieben angezüchtet (s. 3.1.2.1). Alle Experimente bestanden aus zunächst drei gleichen Ansätzen. Bei einer Zelldichte von 3×10^8 Zellen/ml (OD=1) wurde bei zwei der Ansätze DNA eines antibiotikaresistenten Stamms zugegeben (1 µg TIP100 DNA/ml Flüssigkultur; 0,1 µg PCR-Produkt/ml Flüssigkultur), der dritte Ansatz lief als interne Kontrolle ohne Zugabe weiter. Nach weiteren 8 Stunden Inkubation wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigen Agarplatten (Ansätze 1+2: 2×10^8 , 1×10^8 , 1×10^7 Zellen pro Platte; Ansatz 3: 1×10^8 Zellen pro Platte) und als Viabilitätskontrolle alle Ansätze auf einer normalen Blutagarplatte ausplattiert. Nach 4-6 tägiger Inkubation wurden die auf den Selektivplatten gewachsenen Kolonien ausgezählt und auf eine neue Platte übertragen. Die Transformationsfrequenz (s. Tabelle 10-12) wurde durch den Quotienten der ausgezählten Kolonien und der zuvor ausplattierten Zellzahl gebildet. Von allen Klonen wurde die DNA isoliert und ein Teil des Zielgens sequenziert (ca. 1650 Bp) im Fall des *rpoB*-Gens bzw. zusätzlich die flankierenden Genbereiche im Fall des *rpsL*-Gens.

3.11 Microarray-Analyse

Der in dieser Arbeit verwendete Microarray basiert auf PCR-Produkten von 96,1% aller Gene der Stämme 26695 und J99 ('whole genome DNA microarray'), die zumeist den gesamten Leserahmen umfassten. Alle Gene, die in den beiden komplett sequenzierten Genomen vorhanden sind, wurden aus dem Stamm 26695 generiert, nur die stammspezifischen Gene entsprachen der J99-Sequenz. Jedes

PCR-Produkt wurde in zweifacher Ausfertigung auf Epoxy-beschichtete Glaträger aufgetragen und kovalent gebunden.

Von den sequenziellen Isolaten wurden TIP100-DNA Präparationen durchgeführt (s. 3.3.2). Die DNA je eines Stamms jedes Paares wurde entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 oder Cy5 markiert. Die unterschiedlich markierte DNA der beiden Stämme eines Paares wurde anschließend kompetitiv an den Microarray hybridisiert. Anschließend wurde der Microarray bei 6 verschiedenen Laserintensitäten in den unterschiedlichen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe eingelesen. Die Quantifizierung und qualitative Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageneTM 5.2 (BioDiscovery). Mit der Software Mavi 2.3 (MWG, Ebersberg) wurde der lineare Bereich der Hybridisierungssignale der beiden an die DNA gebundenen Farbstoffe für jeden DNA-Spot ermittelt, und daraus der Signalquotient der beiden Farbstoffe gebildet. Bei einem Signalquotienten größer als 2 oder kleiner als 0,5 (Signalunterschied um mehr als das doppelte) wurde das Gen, von dem dieser DNA-Spot amplifiziert worden war, als aufgenommen oder ausgeschnitten bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse genetischer und genomischer Veränderungen während einer persistierenden Infektion mit *H. pylori* untersucht anhand sequenzieller Isolate

Die Veränderungen im *H. pylori*-Genom während einer fortwährenden Infektion ließen sich durch sequenzielle Stammissolate aus demselben Patienten bestimmen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus Magenbiopsiematerial isoliert wurden. Hierzu standen zwei Stammsammlungen aus zwei unterschiedlichen Regionen zur Verfügung.

Das erste Kollektiv, bestehend aus 16 Patienten, stammte von der Louisiana State University in New Orleans, Louisiana/USA (im folgenden LSU-Stämme, s. 2.1.1). Die aus der näheren Umgebung von New Orleans stammenden Patienten waren hauptsächlich afro-amerikanischer Abstammung und kamen aus niedrigen sozio-ökonomischen Verhältnissen (Taylor *et al.*, 1995).

Aus jedem Patienten wurden an maximal acht, aber zu mindestens zwei Zeitpunkten ein *H. pylori*-Stamm isoliert, die Zeitspanne zwischen erstem und letztem Isolat variierte zwischen drei Monaten und vier Jahren. Es wurden jeweils der erste und letzte verfügbare Stamm für die Analysen verwendet. Von einigen Patienten standen auch einige Stämme zur Verfügung, die an Entnahmetermeninen zwischen dem ersten und zeitlich letzten Isolat entnommen worden waren.

Die zweite Stammsammlung, bestehend aus 10 Patienten, wurde in zwei Gemeinden in den kolumbianischen Anden isoliert (Pasto, Tuquerres). Die Zeitspanne zwischen den Isolaten aus einem Patienten betrug jeweils drei Jahre (im folgenden NQ-Stämme, s. 2.1.1; Correa *et al.*, 2000). Alle Isolate beider Stammsammlungen sind Reinkulturen, die aus Einzelkolonien gewonnen wurden.

4.1.1 RAPD-PCR-Analyse der sequenziellen Isolate

Die Stammpaare wurden einer RAPD-PCR-Analyse (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) unterzogen, um die Verwandtschaft der beiden Stämme eines Paares zu bestimmen. Die Heterogenität einzelner *H. pylori*-Isolate erlaubte es, jeden Stamm mittels der 'Fingerprint'-Methode RAPD-PCR zu unterscheiden. Die RAPD-PCR wird mit nur einem Primer durchgeführt, der viele potentielle Bindungsstellen im Genom

besitzt, so dass viele PCR-Produkte unterschiedlicher Länge amplifiziert werden können. Aufgrund der unterschiedlich langen PCR-Produkte entsteht in der elektrophoretischen Auftrennung ein spezifisches Bandenmuster. Durch Rekombination oder Punktmutation können sich die Primerbindungsstellen verändern. Die sequenziellen Stämme der Patienten wurden miteinander verglichen, um eventuelle Veränderungen im Bandenmuster zu bestimmen.

Bei der Verwendung des Primers AP1281 zeigten vier der LSU-Stammpaare Unterschiede in ihrem Bandenmuster bezogen auf die beiden Stämme, die aus einem Patienten isoliert worden waren. In den Paaren LSU2002, LSU2003, LSU1037 und LSU3005 verschwand jeweils in einem der beiden Stämme eine Bande, oder wurde zumindest wesentlich schwächer amplifiziert (s. Pfeile in Abbildung 9), die übrigen 12 Stammpaare zeigten ein identisches Bandenmuster. Jedes Stammpaar besaß sein 'eigenes' Bandenmuster, das sich von den anderen Paaren unterschied.

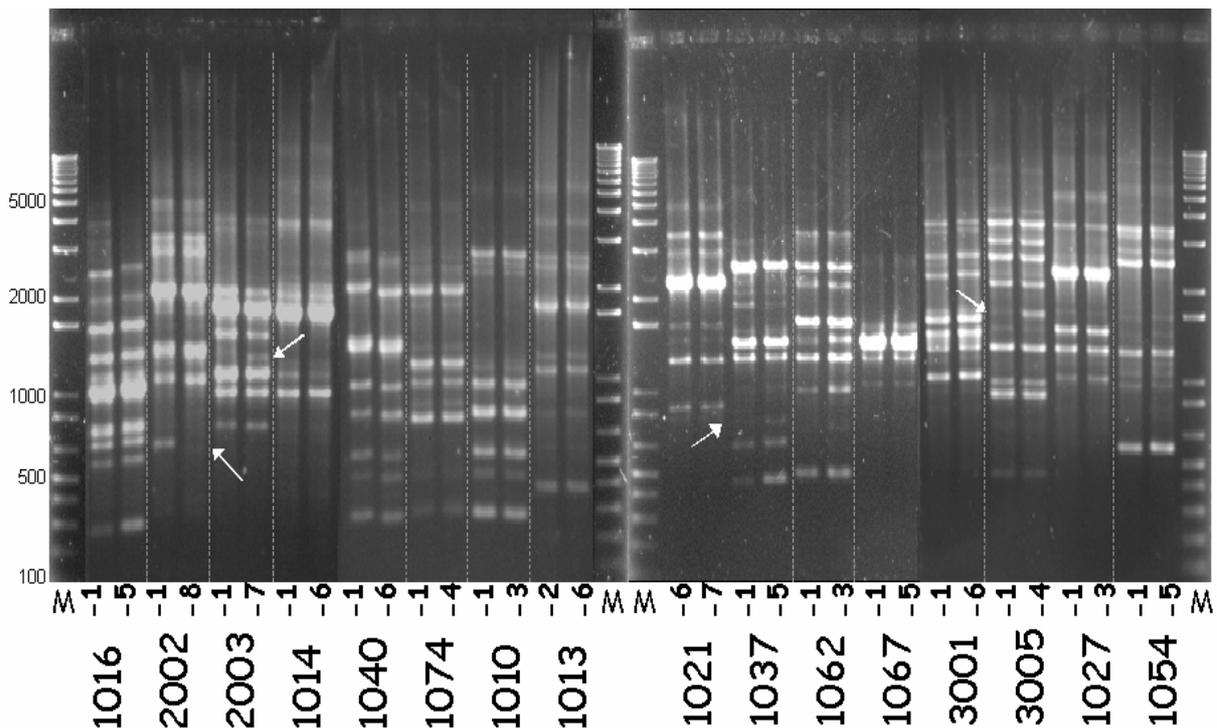


Abbildung 9: RAPD-PCR der LSU-Stammpaare mit Primer AP1281

Jeweils das zeitlich erste und letzte Isolat jedes LSU-Stammpaars wurde mit dem Primer AP1281 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die zusammengehörenden Stämme der Stammpaare LSU2002, LSU2003, LSU1037 und LSU3005 wichen in jeweils einer Bande voneinander ab (s. Pfeilmarkierungen), die übrigen Stammpaare zeigten keine Unterschiede in ihrem individuellen Bandenmuster. Die vierstellige Zahl bezeichnet den Stamm, die Zahl nach dem Bindestrich gibt den Zeitpunkt der Isolierung des einzelnen Stammes an, M = Marker

Wie schon die LSU-Stämme zeigten auch die NQ-Stämme ein individuelles Bandenmuster für jedes Stammpaar (s. Abbildung 10). Die Hälfte der NQ-Stammpaare unterschied sich bei der RAPD-PCR mit dem Primer AP1281. Die Stammpaare NQ267/1624, NQ351/1677, NQ352/1701 und NQ299/1725 zeigten jeweils ein Bandenmuster, das deutlich voneinander abwich und sich in mehreren Banden unterschied. Das Stammpaar NQ315/1712 zeigte mehrere identische Banden und unterschied sich nur in je einer Bande, die in nur einem der beiden Stämme vorhanden war. Die RAPD-PCR's mit anderen Primern (AP1243, AP1254, AP1283) bestätigten dieses Ergebnis für vier der Stammpaare, das Stammpaar NQ315/1712 zeigte bei Verwendung dieser Primer jedoch ein identisches Bandenmuster.

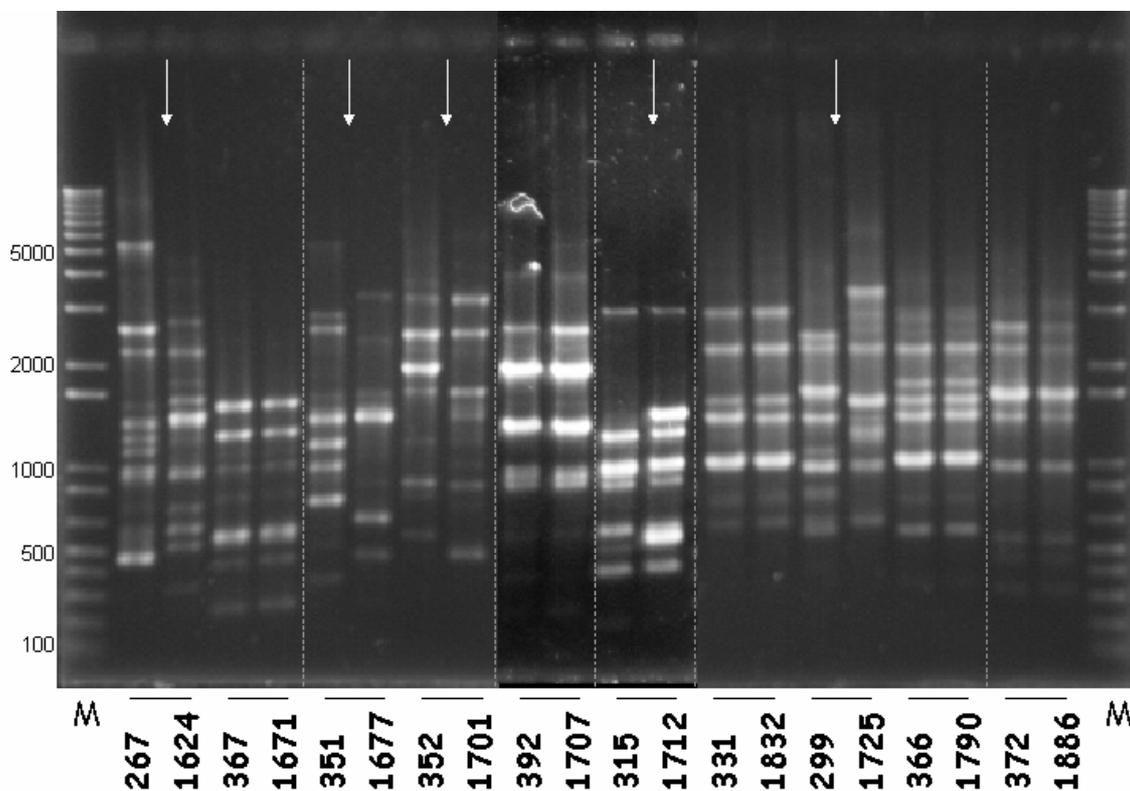


Abbildung 10: RAPD-PCR der NQ-Stammpaare mit Primer AP1281

Die beiden Stämme jedes NQ-Stammpaars wurden mit dem Primer AP1281 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bandenmuster von fünf Paaren waren innerhalb des Stammpaars identisch. Bei fünf Paaren konnten Abweichungen im Bandenmuster zwischen den beiden Stämmen eines Paares festgestellt werden, dabei wichen die Paare NQ267/1624, NQ351/1677, NQ352/1701, NQ315/1712 und NQ299/1725 (s. Pfeile) in einer oder mehreren Banden voneinander ab. Waagerechte Striche markieren die Zusammengehörigkeit der Stämme, M = Marker

Die RAPD-PCR kann nur Veränderungen der Primerbindungsstellen bestimmen, sie gibt jedoch keinen Aufschluss über die Art und die Häufigkeit von Veränderungen.

Um diese Frage zu beantworten wurden von allen sequenziellen Isolaten Fragmente von mehreren Genen amplifiziert, sequenziert und die erhaltenen Sequenzen der zusammengehörenden Stämme miteinander verglichen.

4.1.2 Sequenzierung von 'housekeeping'- und virulenzassoziierten Genen

Die Gene, die für Proteine kodieren, die an Stoffwechsel-Prozessen beteiligt sind (sog. 'housekeeping' Gene), sind einem relativ geringen Selektionsdruck unterlegen, während die virulenzassoziierten Gene einem höheren selektiven Druck ausgesetzt sind. Für diese Analyse wurden DNA-Fragmente von 10 Genen, darunter sieben 'housekeeping'-Gene (Achtman *et al.*, 1999a) und drei virulenzassoziierte Gene (Suerbaum *et al.*, 1998) ausgesucht. Die für eine Multilokus-Sequenz-Typisierung ausgesuchten Gene waren über das gesamte Chromosom verteilt und stellen einen repräsentativen Querschnitt dar (s. Tabelle 2). Sie wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen der paarigen Stämme wurden miteinander verglichen und auftretende Veränderungen untersucht.

Die Länge der einzelnen DNA-Fragmente lag zwischen 339 und 627 Basenpaaren mit einer Gesamtlänge von 4658 Bp (s. Tabelle 2). Bei allen Genfragmenten, in denen sich Sequenz-Unterschiede zwischen den beiden Stämmen eines Paares ergaben, wurden zusätzlich die flankierenden Bereiche beiderseits des Kernfragments von etwa je 500-800 Bp sequenziert.

Tabelle 2: Für die Sequenzanalyse ausgewählte 'housekeeping' und virulenzassoziierten Gene

26695-Nr.	Gen	Bezeichnung	Fragmentlänge [Bp]
HP1134	<i>atpA</i>	ATP Synthase, F1 Untereinheit	627
HP0177	<i>efp</i>	Elongationsfaktor P	410
HP0601	<i>flaA</i>	Flagellin A	471
HP0115	<i>flaB</i>	Flagellin B	339
HP0142	<i>mutY</i>	A/G-spezifische Adenin Glykosylase	420
HP0620	<i>ppa</i>	Anorganische Pyrophosphatase	396
HP1279	<i>trpC</i>	Anthranilat Isomerase	456
HP0071	<i>ureI</i>	Urease assessorisches Protein	585
HP0887	<i>vacA</i>	Vakuolisierendes Zytotoxin	444
HP0834	<i>yphC</i>	GTP-bindendes Protein-Homolog	510

Von den 26 untersuchten Stammpaaren waren die Sequenzen von 13 Paaren in allen zehn analysierten Genen identisch. Zehn dieser Paare stammten aus dem LSU-Kollektiv (1013, 1016, 1021, 1027, 1054, 1067, 1074, 2002, 3001, 3005), was einem Anteil von fast zwei Dritteln (62,5%) aus dieser Stammsammlung entsprach. Drei Paare ohne Sequenzunterschiede stammten aus dem NQ-Kollektiv (30%; 366/1790, 372/1886, 392/1707).

Bei drei weiteren LSU-Stammpaaren konnte jeweils nur in einem Fragment ein einziger Basenunterschied festgestellt werden. In Stammpaar LSU1010 war im *flaA*-Gen eine Base ausgetauscht, was zu einer veränderten Aminosäuresequenz führte (Serin → Asparagin), die Stammpaare LSU1037 und LSU2003 trugen je einen Basenaustausch im *urel*-Gen, was ebenfalls zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führte (LSU1037: Leucin → Prolin; LSU2003: Leucin → Valin). In allen drei Fällen waren die flankierenden Sequenzen identisch, so dass von einem sehr kurzen DNA-Import oder einer Punktmutation ausgegangen werden konnte. Alle Punktmutationen wurden, zum Ausschluß von PCR- oder Sequenzierartefakten, mit einem zweiten PCR-Produkt und einer zweiten Sequenzierung überprüft und bestätigt.

Bei einem LSU-Stammpaar konnten mehrere Unterschiede zwischen den Sequenzen für je ein Gen festgestellt werden. Der Sequenzunterschied des Stammpaares LSU1014 bestand aus zwei veränderten Basen in einem Abstand von 39 Bp im 5'-Bereich des *vacA*-Genfragments, die Sequenz der flankierenden Bereiche zeigte im 5'-Bereich eine weitere vereinzelt Veränderung, das zusätzliche Fragment am anderen Ende war identisch. Die Stammpaare LSU1040 und LSU1062 unterschieden sich in je zwei der sequenzierten Genfragmente, die sich in drei Fällen auch auf die flankierenden Sequenzregionen ausdehnten (LSU1040 *vacA*, LSU1062 *mutY*, LSU1062 *urel*) und in einem Fall auf das Kernfragment beschränkt blieb (LSU1040 *trpC*).

Für einige LSU-Paare standen zusätzliche Isolate zur Verfügung, die zeitlich zwischen dem am frühesten und am spätesten isolierten Stamm lagen (sog. Mittelstämme). Die Sequenzen dieser Mittelstämme konnten zusätzliche Hinweise über das Auftreten der Veränderungen liefern. Der einzelne Basenunterschied im Stammpaar LSU1037 war ab dem zweiten isolierten Stamm (LSU1037-2) festzustellen (= 'Allel 2', s. Tabelle 3), der einen Monat nach dem ersten LSU1037-1

Stamm (= 'Allel 1') isoliert wurde. Der Unterschied im LSU2003-Paar war ab dem vierten Isolat (LSU2003-4) nachzuweisen, alle isolierten Zwischenstämme entsprachen dem ersten Isolat. Ebenso verhielt es sich mit dem Rekombinationsereignis im Stammpaar LSU1014, auch hier konnte die Rekombination zuerst im letzten, 6-Monatsisolat festgestellt werden, der Zwischenstamm trug das gleiche Allel wie der zuerst isolierte Stamm. Die beiden Rekombinationen im Paar LSU1040 waren beide auch in den Zwischenstämmen nachzuweisen, ebenso verhielt es sich bei den beiden Rekombinationen im Paar LSU1062. Der Isolationszeitpunkt der Zwischenstämme legt nicht automatisch den Zeitpunkt der Rekombination fest. Die kontinuierliche Isolation eines neuen Allels gibt nur einen Hinweis, dass sich eine Rekombination ab einem gewissen Zeitpunkt durchgesetzt haben könnte und das vorherige Allel ausselektiert wurde. Der tatsächliche Zeitpunkt der Rekombination kann schon viel früher stattgefunden haben.

Tabelle 3: Analyse der Mittelstämme aus dem LSU-Kollektiv

Stamm	Gen	Stämme mit 'Allel 1'	Stämme mit 'Allel 2'
LSU1037	<i>urel</i>	-1	-2, -4, -5
LSU2003	<i>urel</i>	-1, -2, -3, -4	-7
LSU1014	<i>vacA</i>	-1, -4	-6
LSU1040	<i>vacA</i>	-1	-3, -5, -6
	<i>trpC</i>	-1	-3, -5, -6
LSU1062	<i>mutY</i>	-1	-2, -3
	<i>urel</i>	-1	-2, -3

Bei den Stammpaaren der NQ-Stammsammlung konnten keine Punktmutationen festgestellt werden, alle Veränderungen zeichneten sich durch multiple Basenveränderungen aus. Dabei traten im Gen *urel* des Stammpaars NQ315/1712 Sequenzunterschiede über das gesamte Kernfragment auf, die flankierenden Bereiche waren jedoch identisch. Ebenfalls eine große Anzahl von Polymorphismen konnte im Gen *mutY* in Stammpaar NQ367/1671 und im Gen *flaB* in Stammpaar NQ331/1832 festgestellt werden. In diesen beiden Fällen setzten sich die Unterschiede in der Sequenz auch in den flankierenden Bereichen fort.

Bei vier NQ-Paaren, die bereits in der RAPD-PCR deutliche Abweichungen im Bandenmuster zeigten, konnten auch bei der Sequenzanalyse Rekombinationen

festgestellt werden. Zwei dieser Paare zeigten Veränderungen in drei (NQ352/1707) bzw. sieben (NQ267/1624) der zehn untersuchten Gene. Die Sequenzierung der flankierenden Bereiche dieser Gene, auch bei den identischen Kernsequenzen, erhöhte die Zahl der von Rekombinationsereignissen betroffenen Gene auf fünf bzw. acht. Die Sequenzunterschiede waren auf unterschiedliche Bereiche der jeweiligen Fragmente verteilt.

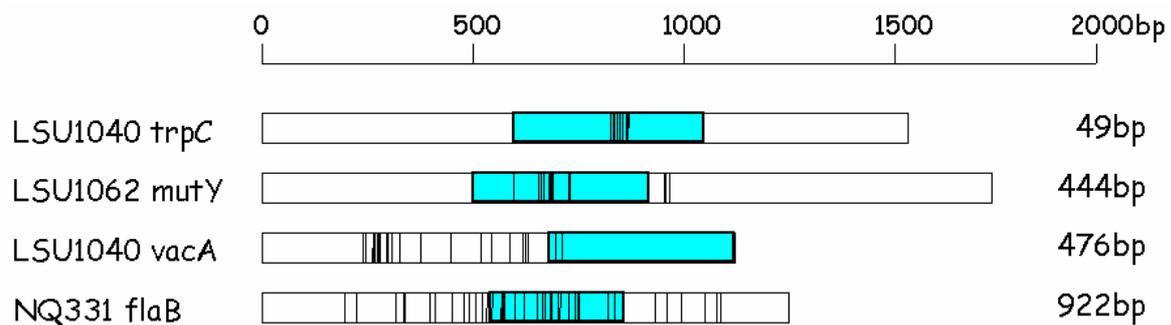


Abbildung 11: Beispiele für festgestellte Rekombinationsereignisse in den NQ- und LSU-Stammpaaren

Die Sequenzen der beiden Stämme eines Paares wichen in mehreren Basen voneinander ab. Diese Basenunterschiede blieben entweder auf das Kernfragment (grau) beschränkt (LSU1040 *trpC*) oder erstreckten sich auch auf die flankierenden sequenzierten Bereiche (LSU1040 *vacA*, LSU1062 *mutY*, NQ331/1832 *flaB*).

Die übrigen zwei Paare (NQ299/1725, NQ351/1677) unterschieden sich in allen zehn Sequenzen der Kernfragmente, so dass von einer Sequenzierung der flankierenden Bereiche abgesehen wurde. Diese Stammpaare wurden aus den weiteren Analysen ausgeschlossen, da es sich offenbar um nicht verwandte Stämme handelte (s. Tabelle 4).

Ergebnisse

Tabelle 4: Vergleich der Sequenzen der Kernregionen (ohne flankierende Sequenzen) innerhalb der Stammpaare von sieben 'housekeeping' Genen und drei virulenzassoziierten Genen

Stammpaar	Monate	Sequenzvergleich									
		<i>atpA</i>	<i>flaA</i>	<i>flaB</i>	<i>vacA</i>	<i>mufY</i>	<i>trpC</i>	<i>ppa</i>	<i>efp</i>	<i>urel</i>	<i>yphC</i>
LSU1013-2/-6	23	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1016-1/-5	12	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1021-6/-7	12	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1027-1/-3	3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1054-1/-5	12	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1067-1/-5	12	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1074-1/-4	6	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU2002-1/-8	48	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU3001-1/-6	24	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU3005-1/-4	6	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1010-1/-3	3	I	P	I	I	I	I	I	I	I	I
LSU1037-1/-5	12	I	I	I	I	I	I	I	I	P	I
LSU2003-1/-7	36	I	I	I	I	I	I	I	I	P	I
LSU1014-1/-6	24	I	I	I	R	I	I	I	I	I	I
LSU1040-1/-6	24	I	I	I	R	I	R	I	I	I	I
LSU1062-1/-3	3	I	I	I	I	R	I	I	I	R	I
NQ 366/1790	36	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
NQ 372/1886	36	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
NQ 392/1707	36	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
NQ 315/1712	36	I	I	I	I	I	I	I	I	R	I
NQ 331/1832	36	I	I	R	I	I	I	I	I	I	I
NQ 367/1671	36	I	I	I	I	R	I	I	I	I	I
NQ 352/1701	36	R	I	I	I	I	R	I	I	R	I
NQ 267/1624	36	R	R	R	R	I	R	I	I	R	R
NQ 299/1725	36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NQ 351/1677	36	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R

I: identische Sequenz, R: multipler Nukleotidpolymorphismus, P: einzelner Nukleotidpolymorphismus, -: keine Sequenz

4.1.3 Analyse der Sequenzunterschiede

Bei den festgestellten Rekombinationsereignissen fiel auf, dass die Sequenzhomologie von zwei unterschiedlichen Allelen eines Genfragments weniger als 92% betragen konnte. Bei den 5 Rekombinationen der LSU-Stämme gab es insgesamt 32 Basenunterschiede von denen 23 synonym (d.h. sie führten nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz und hatten somit keinen Einfluss auf das Protein) und nur sechs nicht synonym waren. Ähnliche Werte trafen für die NQ-Stämme zu, von den insgesamt 119 veränderten Basen waren 98 synonym und 21 nicht synonym (s. Tabelle 5). Die importierte DNA unterschied sich von der ersetzten, wie sich Allele unabhängiger *H. pylori*-Stämme unterscheiden. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei der importierten DNA um *H. pylori*-spezifische DNA aus möglicherweise transient kolonisierenden Stämmen handelte.

Tabelle 5: Anzahl und Art der Basenunterschiede

Kollektiv	Anzahl und Art der Basenunterschiede		
	gesamt	synonym	nicht synonym
LSU	32	26	6
NQ	119	98	21

4.1.3.1 Mathematisches Modell

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Sequenz-Daten der zehn Genfragmente der sequenziellen Isolate wurde von Dr. Daniel Falush am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin ein mathematisches Modell entwickelt. Mit diesem mathematischen Modell konnte die Länge der Rekombinationsereignisse, die Rekombinationshäufigkeit und das minimale Alter von *H. pylori* bestimmt werden. Weiterhin konnte die Wahrscheinlichkeit der Länge der nötigen flankierenden identischen Sequenz berechnet werden, um die Enden eines DNA-Importes zu bestimmen (Falush *et al.*, 2001). Die Kalkulation dieses Modells besagte, dass es bei *H. pylori* sehr unwahrscheinlich ist, bei zwei nicht verwandten Stämmen eine identische Sequenzabfolge von mehr als 200 Basenpaaren zu finden (0,8‰), da jeder Stamm für fast jedes Gen ein eigenes Allel besitzt.

4.1.3.2 Bestimmung der Importlängen von rekombinierter DNA

Auf der Basis dieser Berechnungen wurde ein DNA-Import, der von 200 Bp oder mehr identischer Sequenz flankiert wurde, als abgeschlossen betrachtet. Für 11 Ereignisse (ohne die Punktmutationen) konnte somit die Länge des Importes

festgelegt werden. Die Länge der bestimmaren Importe variierte zwischen nur vier Basenpaaren (NQ267/1624, *trpC*) und 992 Bp (NQ331/1832, *flaB*). Für die weiteren Rekombinationsereignisse konnte die Länge des Importes nicht eindeutig bestimmt werden, da sich die Sequenzunterschiede entweder über das gesamte Fragment verteilten, oder sie sich am äußeren Rand des sequenzierten Fragments befanden und zumindest auf einer Seite keine 200 Bp identischer Sequenz vorhanden war. In diesen Fällen war davon auszugehen, dass nicht die volle Länge des Rekombinationsereignisses festgestellt worden war (s. Abbildung 12).

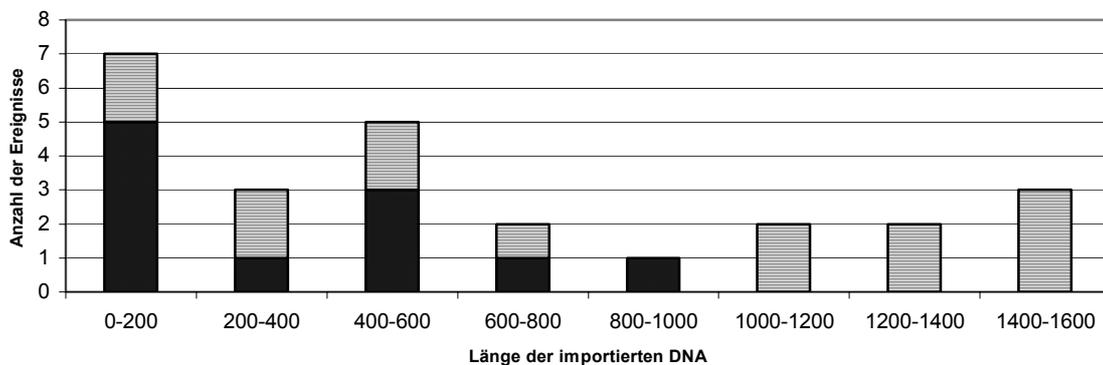


Abbildung 12: Anzahl und Länge der Rekombinationsereignisse

Die Sequenzierungen von zehn Genfragmenten von 24 Stammpaaren ergaben insgesamt 25 Unterschiede zwischen den Stämmen der jeweiligen Paare (von denen allein 13 in nur zwei Stammpaaren zu finden waren). Die schwarzen Balken stehen für Rekombinationen mit mehr als 200 Bp flankierender identischer DNA-Sequenz, die gestreiften Balken für Rekombinationen, die zumindest an einer Seite keine entsprechend lange identische Sequenz aufwiesen, da sie über das sequenzierte Fragment hinausreichten.

Durch Berechnungen des mathematischen Modells konnte die durchschnittliche Länge der importierten DNA-Fragmente auf 417 Basenpaare bestimmt werden. Eine derart kurze Rekombinationslänge ist für Prokaryonten bislang noch nicht beschrieben worden.

4.1.4 Analyse von Gesamt-DNA aus Magenbiopsien

Von einigen Patienten des NQ-Kollektivs standen Gesamt-DNA-Isolierungen je einer Magenbiopsie zur Verfügung (NQ1624, 1671, 1701, 1707, 1712). Die Biopsien waren zum gleichen Zeitpunkt wie der später isolierte Stamm entnommen worden. Aus der Gesamt-DNA der Magenbiopsie wurden PCR-Fragmente der Gene hergestellt, die sich in den vorangegangenen Sequenzierungen als unterschiedlich zwischen den

Stämmen eines Paares erwiesen hatten. Diese Fragmente wurden anschließend in einen T/A-Vektor kloniert und die Plasmidinserts der erhaltenen Klone sequenziert. Da in der Gesamt-DNA der Biopsie nur ein sehr geringer Anteil *H. pylori*-DNA enthalten war, konnte nicht für jedes Fragment ein PCR-Produkt amplifiziert werden (NQ1701, NQ1712 jeweils *ureI*). Das Stammpaar NQ267/1624 wurde aus dieser Analyse ausgeschlossen.

Das Stammpaar NQ367/1671 unterschied sich in der Sequenzanalyse im Gen *mutY* über das gesamte Fragment, einschließlich der flankierenden Bereiche. Es wurden die Plasmidinserts von 15 Klonen sequenziert und alle erhaltenen Sequenzen entsprachen der Sequenz des späteren Stamms NQ1671. Ebenso verhielt es sich mit den Klonen des Stammpaares NQ352/1701 für das Gen *atpA*. Bei diesem Stammpaar waren die erhaltenen Sequenzen von 11 Klonen mit der Sequenz des Stammes NQ1701 identisch. Das Allel des jeweils ersten Stamms konnte in der Magenbiopsie nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen der Plasmidinserts (*trpC*) des Paares NQ352/1701 zeigten unterschiedliche Sequenzen (Abbildung 13). Das Rekombinationsereignis des *trpC*-Gens begann kurz vor dem 5'-Ende des Kernfragments und ging über das 3'-Ende der Gesamtsequenz hinaus. Nur drei der 15 Klone entsprachen der Sequenz des Stammes NQ1701. Die anderen 12 Klone trugen nur einen kleinen Teil der bekannten Rekombination aus NQ1701, ein 59 Bp langes Fragment am 5'-Ende der zuvor festgestellten Rekombination. Es gab keine Sequenz, die nicht diese kurze Veränderung gegenüber der Sequenz des Stammes NQ352 aufwies. Möglicherweise wurde in einer ersten Rekombination nur dieses kurze Fragment ausgetauscht. Anschließend erfolgte eine Rekombination, die zu der Sequenz im Stamm NQ1701 führte. Zwischen den beiden Rekombinationsereignissen lagen lediglich 40 Bp identischer Sequenz, daher wurde die Rekombination in der vorangegangenen Sequenzanalyse als nur ein Ereignis angesehen.

Ergebnisse

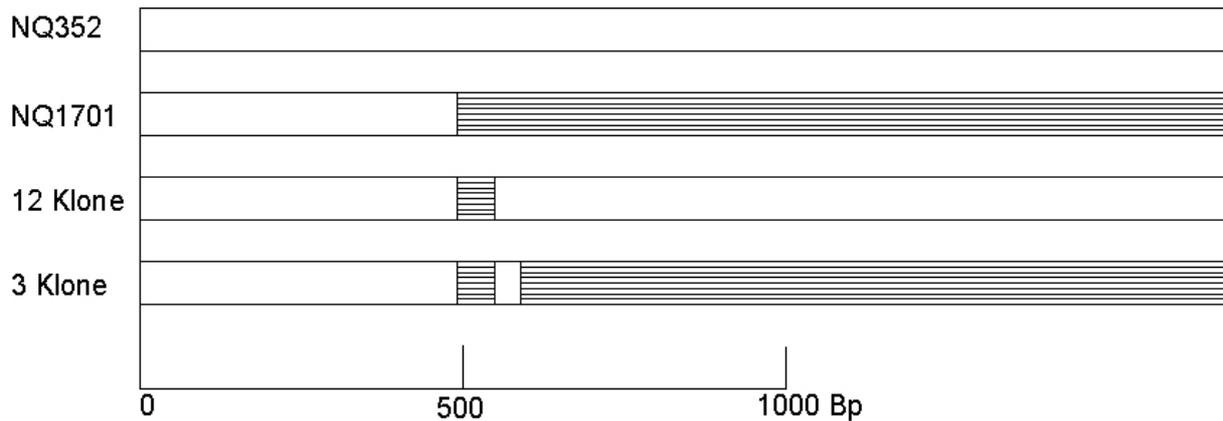


Abbildung 13: Klonierung des *trpC*-Fragments aus Biopsie-DNA

Das Rekombinationsereignis in Stamm NQ1701 bestand aus zwei unabhängigen DNA-Importen. Zum einen gab es eine Rekombination von nur 59 Bp Länge, die in allen Klonen gefunden werden konnte, zum anderen erfolgte ein weiterer DNA-Import, der mindestens 1 Kb lang war und über den sequenzierten Bereich hinausging und nur in drei Klonen gefunden werden konnte. Gerade Schraffierung: Markierung der Rekombination

4.1.5 Analyse von Gendeletion und -aquisition während einer fortwährenden *H. pylori*-Infektion mittels DNA-Microarray-Hybridisierung

4.1.5.1 Analyse der Microarray-Ergebnisse

Die Microarray-Technik macht es möglich, die Anwesenheit aller Gene, die von den beiden komplett sequenzierten Genomen der Stämme 26695 und J99 bekannt sind, zu überprüfen. Wie bereits die vollständige Sequenzierung der beiden Genome gezeigt hat, unterscheiden sich nicht nur die Allele eines Gens zwischen den beiden Stämmen, sondern auch ihre genetische Ausstattung. Die beiden Genome tragen 117 bzw. 89 Gene, die der jeweils andere Stamm nicht besitzt (Alm *et al.*, 1999). Erste Microarray-Daten bestätigten diese Divergenz zwischen unabhängigen *H. pylori*-Stämmen (Salama *et al.*, 2000).

Die beiden Stämme eines Paares wurde mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, kompetitiv an einen Microarray hybridisiert und die sich ergebenden Signalstärken der an die einzelnen DNA-Spots gebundenen DNA gemessen. Signalstärken, die für einen Farbstoff mehr als das doppelte bezüglich des zweiten Farbstoffes ergaben, wurden als aufgenommen oder verloren bewertet.

Neun der 14 untersuchten LSU-Paare (ohne LSU2002, LSU3005) zeigten keine Unterschiede in ihrer Genausstattung, während in den weiteren fünf Paaren insgesamt 42 Gene in neun Loci verändert waren, darunter eine partiell verlorene *cag*-Pathogenitätsinsel, ein Restriktions-Modifikationssystem (RM-System), ein

mehrere Gene umfassender aufgenommener Genabschnitt in der Plastizitätsregion, mehrere IS-Elemente und ein einzelnes hypothetisches Gen (s. Tabelle 6).

Bei den NQ-Paaren unterschied sich das Paar NQ267/1624 in 59 Genen und wurde von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Dieses Maß an Unterschieden deutete, in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Sequenzanalysen, auf zwei unabhängige, nicht verwandte Stämme hin. Von den verbleibenden sieben Paaren zeigten vier Paare Veränderungen in ihrer genetischen Zusammensetzung, insgesamt 36 Gene in acht Loci, darunter eine komplett ausgeschnittene *cag*-Pathogenitätsinsel, zwei IS-Elemente, ein vermeintliches Eisenbindeprotein, eine Cyclohydrolase und mehrere einzelne hypothetische Gene (s. Tabelle 6), wurden aufgenommen oder aus dem Chromosom ausgeschnitten.

Tabelle 6: Auswertung der Microarray-Hybridisierung

Stammpaar	Gen		Status
LSU1062	HP0530-HP0548	Partielle <i>cag</i> -Insel	verloren
	HP0414	IS-Element	verloren
	HP1008	IS-Element	verloren
	HP0427	hypothetisches Gen	verloren
	JHP827	IS-Element	verloren
LSU1040	HP0903/0904	Acetatkinase, <i>ackA</i> Phosphotransacetylase	verloren
LSU1014	HP0990-0996	hypothetische Gene in der Plastizitätsregion	aufgenommen
	JHP0929-0936		
LSU1037	HP1283	hypothetisches Gen	aufgenommen
LSU1016	HP1351/1352	RM-System, <i>HpyAIV</i>	aufgenommen
NQ315/1712	HP0520-0548	komplette <i>cag</i> -Insel	verloren
	HP0413/0414	IS-Element	aufgenommen
	HP1007/1008	IS-Element	aufgenommen
	HP1561/1562	Eisenbindeprotein, <i>ceuE</i>	aufgenommen
	HP1566	hypothetisches Gen	verloren
NQ352/1701	HP0780	hypothetisches Gen	verloren
NQ331/1832	HP0802	Cyclohydrolase, <i>ribA</i>	aufgenommen
NQ366/1790	HP0765	hypothetisches Gen	aufgenommen

4.1.5.2 'empty site'-PCR-Analyse und Sequenzierung der aufgenommenen und verlorenen Gene zur Bestätigung der Microarray-Analyse

Die in der Microarray-Hybridisierung aufgefallenen Genorte wurden auf der Sequenzebene bei den beiden Stämmen des jeweiligen Paares untersucht, um die genauen Vorkommnisse und Mechanismen festzustellen, die zu einer Aufnahme oder den Verlust von genetischem Material geführt haben. Mit einer Ausnahme wurden alle Gene mittels der sog. 'empty site'-PCR (ES-PCR) überprüft, indem Primer in die beiderseits flankierenden, vorhandenen Gene platziert und anschließend die sich ergebenden PCR-Produkte sequenziert wurden.

Die meisten Veränderungen im LSU-Kollektiv wurden im Paar LSU1062 gefunden. Die Microarray-Hybridisierung zeigte einen partiellen Verlust der *cag*-Pathogenitätsinsel der Gene HP0530-0548. Eine PCR, die je das Vorhandensein des 5'- und 3'-Bereichs der Pathogenitätsinsel nachwies, war im ersten Stamm beiderseits erfolgreich, im zweiten jedoch nur für den 5'-Bereich (HP0519/0520).

Das PCR-Produkt des ersten Stamms war am 3'-Ende der *cag*-Pathogenitätsinsel ungewöhnlich lang. Zwischen dem Ende der *cag*-Insel (HP0547, *cagA*) und dem ersten Gen außerhalb der Insel (HP0549, *glr*) konnte ein kurzes Fragment einer Transposase gefunden werden, die eine 98,4%ige Homologie zu einer Transposase aus dem *H. pylori*-Stamm J99 aufwies (JHP0826, *tnpB*). Daran schloss sich das Gen HP0548 an, dem jedoch die ersten 398 Bp fehlten. Zwischen diesem partiell vorhandenem Gen und der Glutamylracemase HP0549 lag ein weiteres, komplettes transposables Element, das den Genen JHP0827 (*tnpA*) und JHP0826 (*tnpB*) entsprach.

Die Sequenzierung der ES-PCR offenbarte im zweiten Stamm, zusätzlich zu den bereits durch die Microarray-Hybridisierung als verloren ausgewiesenen Genen (HP0530-0548) auch den Verlust der Gene HP0528 und HP0529. Die Sequenzierung zeigte, dass auch das Gen HP0527 etwa zur Hälfte deletiert war. Die ersten 2718 Bp am 3'-Ende des Gens (Leserahmen auf dem Minusstrang) waren vorhanden, die weiteren 3 Kb am 5'-Ende des Gens waren deletiert. Die sich im LSU-Stamm direkt anschließende Sequenz war identisch zu der Sequenz des ersten Stammes und zeigte die Homologie zu der Transposase JHP826. Im zweiten Stamm fehlten dem Gen jedoch die ersten 190 Basen, die Transposase war ebenso wie das Gen HP0527 partiell deletiert. Die Sequenzen des Gens HP0527 beider Stämme des

Paars ergaben das gleiche Allel. Im ersten Stamm war es jedoch nicht möglich die Basenabfolge bis zu der Stelle im Gen zu bestimmen, an der im zweiten Stamm das Gen endet, da sich diese Region durch immer wiederkehrende Sequenzabfolgen auszeichnet und keine sinnvollen Primerbindungsstellen vorhanden waren. Daher blieb offen, ob es im Bereich, in dem die Deletion des Gens HP0527 im zweiten Stamm beginnt, zu einer Rekombination gekommen ist (s. Abbildung 14).

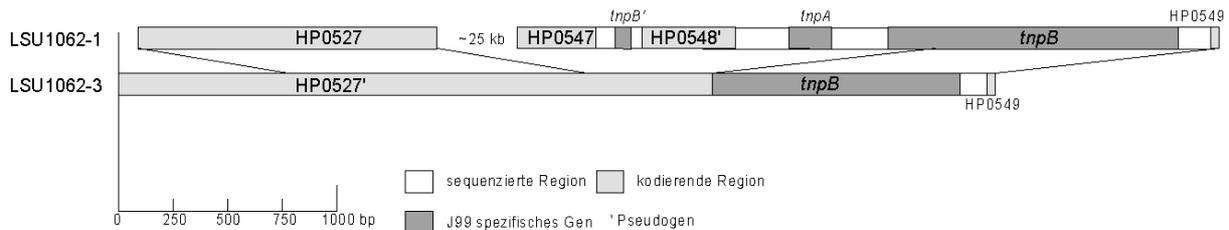


Abbildung 14: partieller Verlust der *cag*-Pathogenitätsinsel in Stammpaar LSU1062.

Im späteren Stamm fehlten die Gene HP0528-0548, das Gen HP0527 war nur zur Hälfte vorhanden, direkt daran schloss sich eine Transposase an, die auch im früheren Stamm vertreten war und direkt am 3'-Ende der Insel lokalisiert war. Dem späteren Stamm fehlten ca. 27 Kb.

Das Vorkommen von transposablen Elementen in der 3'-Region der *cag*-Pathogenitätsinsel wurde bereits beschrieben (Kersulyte *et al.*, 2000), jedoch nicht der Ausschnitt eines Teils der *cag*-Pathogenitätsinsel mitsamt eines Teils der transposablen Elemente. Die PCR-Analyse der 3'-Region der *cag*-Pathogenitätsinsel des Mittelstamms LSU1062-2 zeigte ein gleichlanges PCR-Fragment wie es in Stamm LSU1062-1 gefunden wurde.

Des weiteren ergab die Microarray-Hybridisierung, dass drei Insertionselemente (IS-Elemente) aus dem Genom des zweiten Stamms ausgeschnitten worden waren. Die beiden 26695-spezifischen IS-Elemente HP0413/0414 und HP1007/1008 sind identische Duplikationen. Das J99-spezifische IS-Element JHP0826/0827 weist eine hohe Sequenzhomologie zu den beiden anderen auf.

Die ES-PCR und die anschließende Sequenzierung offenbarte in allen drei Fällen, das jeweils beide Gene des IS-Elements in beiden Stämmen nicht an den Loci im Genom vorhanden waren, die für die sequenzierten Stämme annotiert waren. Da IS-Elemente mobile genetische Abschnitte darstellen, die auch an anderer Stelle im Genom integriert sein konnten, wurde die Anwesenheit der Gene mit einer Southern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen (s. Abbildung 15). Die mit *EcoRI* verdaute DNA der beiden LSU1062 Stämme wurde mit einer HP0414/1008-spezifischen Sonde

hybridisiert, die an alle drei IS-Elemente binden konnte. Auf dem Blot waren vier Banden sichtbar, an denen die Sonde an die verdaute DNA des ersten Stamms binden konnte. An die DNA des zweiten Stamms konnte die Sonde jedoch nicht binden, es sind keine IS-Elemente nachweisbar.

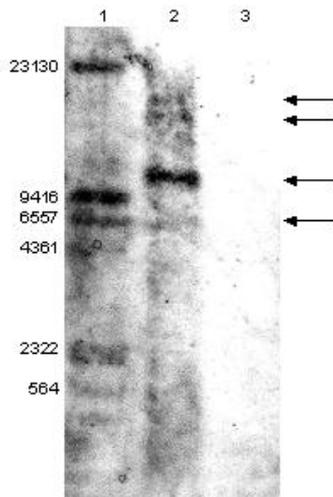


Abbildung 15: Southern-Blot von LSU1062 mit einer IS-Element-spezifischen Sonde

Die IS-Element-spezifische Sonde (HP0414/1008) band nur an den Stamm LSU1062-1, es wurden vier Banden sichtbar. Im späteren Stamm LSU1062-3 waren keine IS-Elemente nachweisbar.

Spur 1: Marker

Spur 2: LSU1062-1

Spur 3: LSU1062-3

Das hypothetische Gen HP0427 wurde in der Microarray-Analyse nur im ersten Stamm gefunden. Dieses Gen liegt in der sog. Plastizitätsregion und wird einerseits von einem ribosomalen 23S5S-Genkluster und andererseits von vielen stammspezifischen Genen umgeben. Da die genetische Zusammensetzung der Plastizitätsregion in den LSU-Stämmen nicht bekannt ist, war es nicht möglich, eine ES-PCR durchzuführen.

Im Paar LSU1040 zeigte das Ergebnis der Microarray-Analyse die Gene HP0903/0904 im zweiten Stamm als verloren an. Die ES-PCR zeigte deutliche Unterschiede in der Länge der PCR-Produkte. Das PCR-Produkt des ersten Stamms LSU1040-1 war etwa 650 Bp kleiner als die Referenz aus 26695 und das Produkt des zweiten Stammes LSU1040-6 war nochmals um etwa 1000 Bp kürzer als das des ersten Stammes.

Die Sequenzierung ergab für den ersten Stamm, dass die Gene HP0902 und HP0904 vollständig vorhanden waren und dass dem Gen HP0903 die ersten 663 Bp am 5'-Ende fehlten (Leserahmen auf dem Minusstrang), die für das kürzere PCR-Produkt bezogen auf den Referenzstamm 26695 verantwortlich waren.

Im zweiten Stamm war ebenfalls das Gen HP0902 vorhanden und die Sequenz war mit der des ersten Stammes identisch. Dem Gen HP0903 fehlten jedoch die ersten

893 Bp des Gens. Im Bereich des Gens, der in beiden Stämmen vorhanden war, konnten keine Unterschiede in der Sequenz ausgemacht werden. Dem Gen HP0904 fehlten 815 Bp am 3'-Ende (Leserahmen auf dem Minusstrang). Der in beiden Stämmen vorhandene Abschnitt des Gens beinhaltete eine Rekombination von 607 Bp Länge (s. Abbildung 16). Durch die partielle Deletion war die Acetatkinase HP0903 in beiden Stämmen nicht funktional. Die PCR-Analyse der Mittelstämme zeigte, dass sich der partielle Verlust der beiden Gene auch in den Stämmen LSU1040-3 und LSU1040-5 nachweisen ließ.

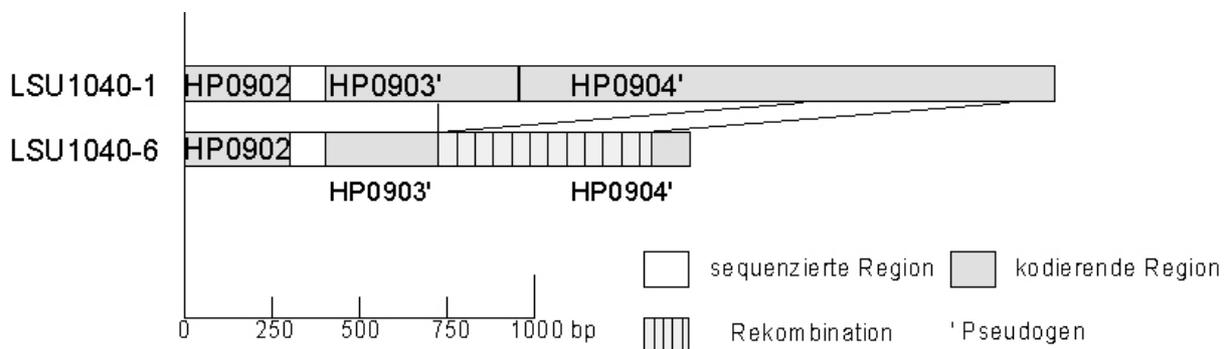


Abbildung 16: Verlust der Gene HP0903/0904 in Stammpaar LSU1040

Das Gen HP0903 war im früheren Stamm etwa zur Hälfte deletiert, das Gen HP0904 war vollständig vorhanden. Der spätere Stamm besaß eine noch größere Deletion im Gen HP0903 und diesem Stamm fehlte zusätzlich die Hälfte des Gens HP0904. Insgesamt betrug die Deletion in diesem Bereich etwa 1 Kb. Die in beiden Stämmen vorhandene Sequenz des Gens HP0904 trug ein Rekombinationsereignis.

Der zweite Stamm des Paares LSU1014 hat nach Auswertung der Microarray-Hybridisierung ein 15 Gene umfassendes DNA-Fragment im Bereich der Plastizitätsregion aufgenommen. Da sich diese Region in den LSU-Stämmen von den bekannten Stämmen unterscheidet, war eine ES-PCR nicht möglich. Daher wurden selektiv einige der Gene mit direkter PCR nachgewiesen, die Primerbindungsstellen lagen innerhalb des jeweiligen Gens. Die PCR für die ausgesuchten Gene HP0995, HP0996, JHP0933 und JHP0934 zeigten positive Ergebnisse ausschließlich für den Stamm LSU1014-6, der Stamm LSU1014-1 war PCR-negativ für alle diese Gene. Es konnte davon ausgegangen werden, dass dieses DNA-Fragment in den zweiten Stamm importiert worden war.

Das Paar LSU1016 hat nach Auswertung der Microarray-Hybridisierung ein Restriktions-Modifikations-System (RM-System), die Gene HP1351/1352 (*HpyAIV*), aufgenommen. Die ES-PCR zeigte ein etwas kürzeres PCR-Produkt (ca. 100 Bp) für

den ersten Stamm gegenüber dem zweiten Stamm und der 26695-Referenz. Die Sequenzierung ergab für den zweiten Stamm, dass er das RM-System trug.

Der erste Stamm trug nur 444 Bp am 3'-Ende des Gens HP1351 (Leserahmen auf dem Minusstrang). Die Sequenzen der beiden Stämme wichen voneinander ab, die Homologie betrug 96,4%. An diesen gemeinsamen Genabschnitt fügte sich im ersten Stamm dann eine Sequenz an (insgesamt 930 Bp), die keine Homologie zu bekannten *H. pylori*-Sequenzen besaß. Dieser nicht bekannte Sequenzabschnitt enthielt einen möglichen offenen Leserahmen von 735 Bp (245 Aminosäuren), der auf Aminosäurebasis schwache Homologien zu zwei in den Datenbanken (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) abgelegten Genen aufwies. Dies waren zum einen die 'S-layer homology domain' aus *Bacillus anthracis* (20% identische Aminosäuren) und zum anderen eine vermeintliche Inosin-Guanosin Kinase (*gsk*) aus *Yersinia enterocolitica* (17,1% identische Aminosäuren). Der GC-Gehalt dieses möglichen offenen Leserahmens betrug 30%. Auf diesen unbekanntem Abschnitt folgten dann 150 Bp des 5'-Endes des Gens HP1352, die identisch mit dem zweiten Stamm waren. Das analysierte Fragment des ersten Stammes war insgesamt 140 Bp kürzer und wurde durch ein funktionierendes RM-System ersetzt (s. Abbildung 17). Die PCR-Analyse der Mittelstämme konnte zeigen, dass das RM-System in allen Mittelstämmen vorhanden war, die PCR-Produktlänge der Mittelstämme war identisch mit dem des Stammes LSU1016-5.

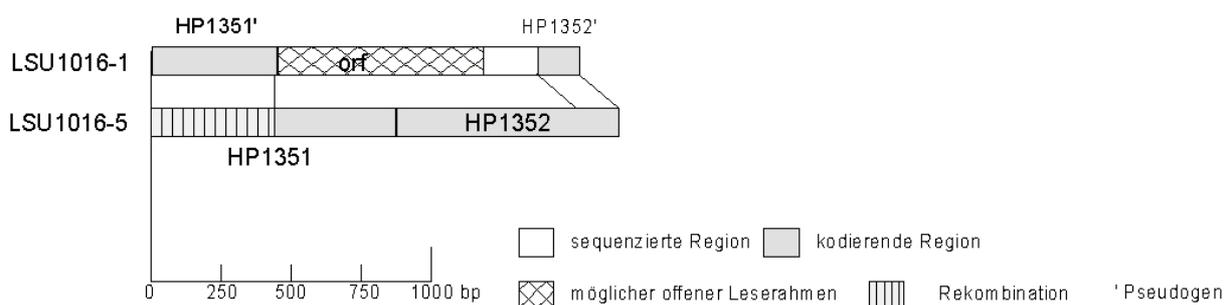


Abbildung 17: Aufnahme des RM-Systems *HpyAIV* in Stammpaar LSU1016

Der frühere Stamm trug einen möglichen offenen Leserahmen unbekannter Herkunft und Funktion, stark gekürzte Gene HP1351 und HP1352 flankierten diesen Bereich, im späteren Stamm war das RM-System *HpyAIV* vollständig und die unbekannte Sequenz nicht vorhanden.

Auch bei den NQ-Stammpaaren konzentrierten sich die meisten Veränderungen in einem Stammpaar. Das schon in den vorangegangenen Analysen auffällige Paar NQ315/1712 (RAPD-PCR, Sequenzanalyse von zehn Genfragmenten) unterschied

sich bei der Microarray-Hybridisierung an fünf Genorten. Dabei fehlte dem drei Jahre später isolierten Stamm die komplette *cag*-Pathogenitätsinsel. Die ES-PCR (HP0519-0549) ergab nur für den zweiten Stamm ein PCR-Produkt. Die Sequenzierung zeigte, dass die Insel ausgeschnitten war und die Gene HP0519 und HP0549 nun direkte Nachbarn im Genom waren. Ist die *cag*-Pathogenitätsinsel anwesend, gibt es am Anfang und am Ende der Insel einen 31 Basenpaar-Repeat. Ein Repeat liegt im intragenischen Bereich direkt neben dem Gen HP0519 und der zweite am 5'-Ende innerhalb des Gens HP0549. Die *cag*⁻-Stämme tragen nur noch einen dieser Repeats (Akopyants *et al.*, 1998a). Im Fall des NQ-Paares besaß der erste Stamm NQ315 beide Repeats, während der zweite Stamm NQ1712 nur noch einen Repeat aufwies. Die Pathogenitätsinsel wurde an genau dieser Stelle ausgeschnitten. Die beiden Repeats im ersten Stamm unterschieden sich in einer Base, daher konnte bestimmt werden, dass der Repeat, der sich direkt an das Gen HP0519 anschloss, erhalten geblieben war und der Repeat, der sich im Gen HP0549 befand ausgeschnitten wurde. Die beiderseits flankierenden Sequenzen, die in beiden Stämmen vorkamen, waren identisch. Es gab keinen Hinweis auf ein *cag*⁻-Fragment, das durch Rekombination zum Verlust geführt haben könnte (s. Abbildung 18).

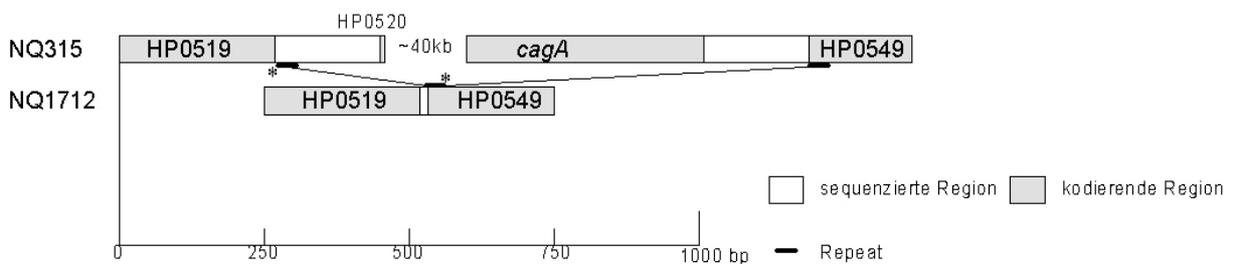


Abbildung 18: Verlust der *cag*-Pathogenitätsinsel in Stammpaar NQ315/1712

Die komplette *cag*-Pathogenitätsinsel war an einer 31 Bp Repeat-Sequenz im Stamm NQ315 aus dem Genom ausgeschnitten worden, so dass im Stamm NQ1712 die Gene HP0519 und HP0549 direkt nebeneinander lagen.

Bei zwei weiteren Unterschieden in dem Paar NQ315/1712 handelte es sich, wie schon bei dem LSU1062-Paar, um die beiden IS-Elemente HP0413/0414 und HP1007/1008. Wiederum konnten beide IS-Elemente durch Sequenzierung nicht an den in 26695 annotierten Plätzen gefunden werden. Unabhängig davon wurde jedoch ein Rekombinationsereignis von 570 Bp Länge zwischen den Genen HP0412 und HP0415 nachgewiesen, die in beiden Stämmen des Paares direkte Nachbarn auf dem Chromosom waren. Auch hier konnte durch eine Southern-Blot-

Hybridisierung festgestellt werden, dass im ersten Stamm IS-Elemente vorhanden waren, die im zweiten Stamm ausgeschnitten waren.

Zwei weitere zusammenhängende Gene wurden in diesem NQ-Paar durch die Analyse der Microarray-Hybridisierung im späteren Stamm als aufgenommen bewertet. Die Gene HP1561/1562 kodieren jeweils für ein mögliches Eisenbindeprotein (*ceuE*). Beide Gene weisen im Stamm 26695 eine DNA-Homologie von mehr als 90% auf. Die ES-PCR resultierte im ersten Stamm in einem wesentlich kürzeren PCR-Fragment, während das PCR-Produkt des zweiten Stamms ebenso groß war wie das Referenzprodukt aus 26695. Die Sequenzierung des PCR-Produkts des ersten Stammes ergab, dass nur eins der beiden Gene anwesend war. Aufgrund der hohen Homologie der beiden Gene konnte aber nicht bestimmt werden, welches Gen an- bzw. abwesend war. Im zweiten Stamm waren beide Gene vorhanden. An beiden Seiten der Deletion wichen die Allele voneinander ab. Es ist zu einer Rekombination gekommen, die zu einem Einfügen des zweiten Gens geführt hatte. Die Microarray-Analyse hatte beide Gene als aufgenommen detektiert, da das Gen im zweiten Stamm doppelt vorlag und somit auch die zweifache Menge an DNA vorhanden war, die zu einer vermehrten Bindung der DNA des zweiten Stammes gegenüber dem ersten Stamm an den Microarray führte (s. Abbildung 19).

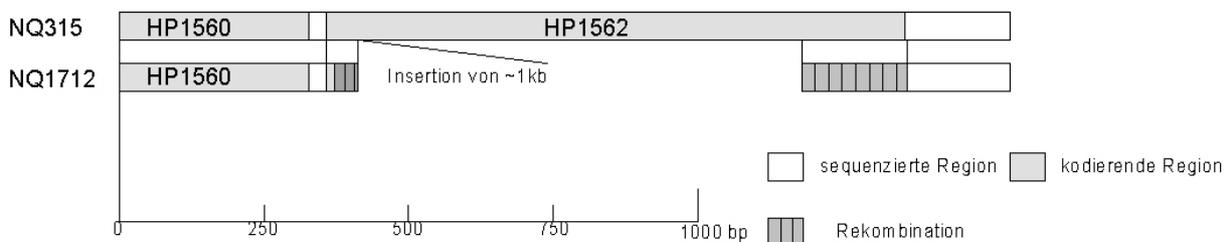


Abbildung 19: Aufnahme eines Gens in Stammpaar NQ315/1712

Das Gen für ein mögliches Eisenbindeprotein (*ceuE*) war in den späteren Stamm integriert worden, an beiden Schnittstellen kam es zu Basenunterschieden in den Bereichen, die in beiden Stämmen vorhanden waren.

Das hypothetische Gen HP1566 wurde im Stammpaar NQ315/1712 in der Microarray-Analyse als verloren bewertet. Die ES-PCR ließ keinen Unterschied zwischen den beiden Stämmen NQ315 und NQ1712 erkennen. Beide PCR-Produkte waren genauso lang wie das der Referenz. Die Sequenzierung zeigte jedoch ein Rekombinationsereignis von 274 Bp Länge innerhalb des Gens, das von 120 Bp einerseits und mehr als 200 Bp andererseits flankiert wurde. Die Rekombination

führte dazu, dass die Homologie des NQ315-Allels von 95,7% zu der auf dem Array befindlichen 26695-DNA auf 92,1% beim NQ1712-Allel herabgesenkt wurde. Die NQ1712-DNA konnte nicht mehr so gut an die 26695-DNA binden wie die des Stammes NQ315 und wurde folglich als verloren detektiert (s. Abbildung 20).

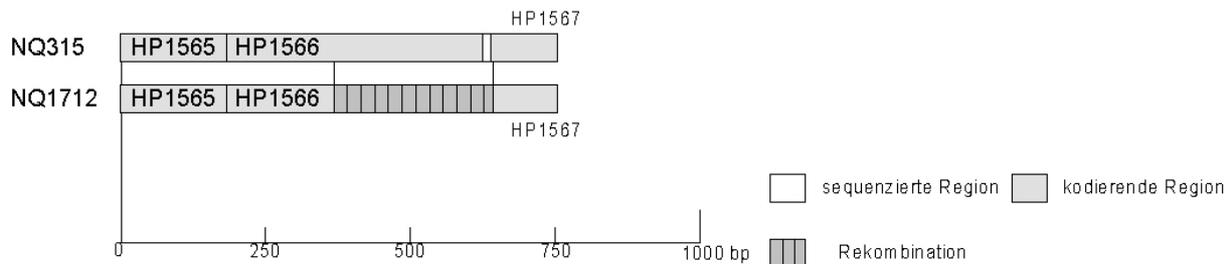


Abbildung 20: Rekombination innerhalb des Gens HP1566 in Stammpaar NQ315/1712

Die Homologie des später isolierten Stamms NQ1712 zu der auf dem Microarray befindlichen DNA aus *H. pylori* 26695 wurde durch das Rekombinationsereignis reduziert und hybridisierte schwächer an den Microarray als die DNA des Stamms NQ315.

Einen ähnlich gelagerten Fall stellt das Gen HP0780 im NQ-Paar 352/1701 dar. Die Microarray-Analyse wies dieses hypothetische Gen als verloren aus, während bei der ES-PCR keine Längenunterschiede der PCR-Produkte ausgemacht werden konnten. Die Sequenz der beiden PCR-Produkte bestätigte, dass das Gen in beiden Stämmen vorhanden war, jedoch war es zu einer Rekombination gekommen, die sich über das gesamte sequenzierte Fragment erstreckte. Die Homologie des HP0780-Gens der NQ352-DNA zu der auf dem Microarray befindlichen DNA betrug 95,2%, die von NQ1701 nur 91,9%. Wie schon zuvor kam es durch die Rekombination zu einer Verminderung der Sequenzhomologie im späteren Stamm.

Auch in dem Stammpaar NQ366/1790 konnte die Auswertung der Microarray-Hybridisierung die Aufnahme eines Gens im Stamm NQ1790 feststellen. Die ES-PCR des hypothetischen Gens HP0765 führte zu einem um etwa 1,2 Kb kürzeren Fragment in den beiden NQ-Stämmen bezogen auf die Referenz. Die Sequenzierung resultierte in identischen Sequenzen für die beiden NQ-Stämme, jedoch konnten diese nicht der 26695-Referenz-Sequenz zugeordnet werden. Der sequenzierte Bereich der NQ-Stämme startete im Gen HP0764, die Homologie zu diesem Gen brach aber nach wenigen Basen ab. Die folgende Sequenz von 1150 Bp konnte keiner Sequenz in den beiden sequenzierten *H. pylori*-Stämmen 26695 und J99 zugeordnet werden. Dem unbekanntem DNA-Abschnitt schloss sich das Gen HP0767 an. Das unbekannte Fragment beinhaltete ein Pseudogen (HP0766), das nur auf

Aminosäure-Ebene 30% positive Aminosäuren zu dem annotierten Gen aus 26695 besaß. Eine weitaus höhere Homologie (91%) wies die Sequenz zu einem nicht näher beschriebenen 612 Bp-Fragment auf, dass durch eine genomische Subtraktion im *H. pylori*-Stamm J166 gefunden worden war (Akopyants *et al.*, 1998b). Es ließ sich ebenfalls ein möglicher offener Leserahmen finden, der 1103 Bp (371 Aminosäuren) lang war und das gesamte unbekannte Fragment überspannte (s. Abbildung 21). Die Abfolge der Aminosäuren passte jedoch zu keinem in den Datenbanken abgelegten Protein und enthielt auch keine vorhersagbaren funktionalen Domänen (untersucht mit www.ebi.ac.uk/ppsearch). Das Gen HP0765 war in beiden Stämmen nicht vorzufinden, auch eine direkte PCR des Gens ergab kein PCR-Produkt.

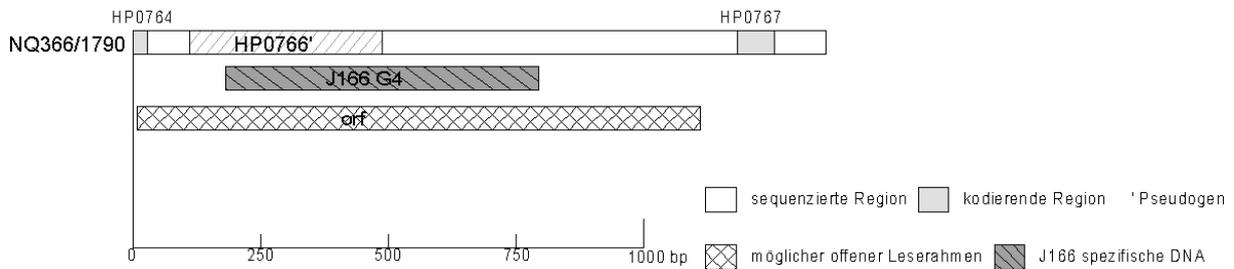


Abbildung 21: Unbekannte Sequenz in Stammpaar NQ366/1790

Beide Stämme waren identisch, trugen jedoch eine unbekannte Sequenz, die bereits im *H. pylori*-Stamm J166 nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise beinhaltet sie einen *H. pylori*-spezifischen offenen Leserahmen eines unbekanntes Gens.

Von den insgesamt 17 Unterschieden in der genetischen Ausstattung, die durch die Auswertung der Microarray-Hybridisierung festgestellt wurden, konnten sechs Ereignisse durch ES-PCR und anschließender Sequenzierung bestätigt und zwei aufgeklärt werden (Veränderung der Sequenzhomologie zu der auf dem Microarray befindlichen DNA). Der Verlust von drei IS-Elementen konnte im Fall des LSU1062-Paars durch einen Southern-Blot aufgeklärt werden. Fünf genomische Veränderungen konnten nicht erklärt werden, die in der Microarray-Analyse alle als aufgenommen bewertet worden waren.

Bei den LSU Stämmen hatten alle Stämme, die in der Sequenzanalyse eine Rekombination trugen, auch ihre genetische Ausstattung verändert, während die Stämme mit Punktmutationen keine bestätigten Veränderungen ihrer Genausstattung

Ergebnisse

aufwiesen. Einzig das Paar LSU1016 hatte ein Gen aufgenommen, obwohl es in der Sequenzanalyse unauffällig geblieben war.

Bei den NQ-Stämmen kann es als annähernd sicher gelten, dass das Paar NQ267/1624 nicht miteinander verwandt ist, jedoch einige Gene miteinander ausgetauscht hatte, da sich in der vorherigen Sequenzanalyse nicht alle Gene unterschieden. Weitere Genaufnahmen und Verluste konnten nur für NQ315/1712 bestätigt werden, das zuvor mit einer Rekombination aufgefallen war, während das Paar NQ352/1701 keine Veränderungen in der Microarray-Analyse aufzeigte, obwohl es zu mehrfachen Rekombinationsereignissen gekommen war und sich auch Unterschiede im RAPD-Muster gezeigt hatten (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenstellung der Sequenzanalysen und der Microarray-Analyse

Stamm	Sequenzanalyse		Microarray-Analyse		ES-PCR	
	SNP	MNP	Aufnahme	Verlust	Aufnahme	Verlust
LSU1040		2		1		1
LSU1062		2		5		4
LSU1014		1	1		1	
LSU1010	1					
LSU1037	1		1		0	
LSU2003	1					
LSU1016			1		1	
LSU1013						
LSU1021						
LSU1027						
LSU1054						
LSU1067						
LSU1074						
LSU3001						
NQ267/1624		8	27	32	-	-
NQ352/1701		5		1		0
NQ315/1712		1	3	2	1	1
NQ331/1832		1	1		0	
NQ367/1671		1				
NQ366/1790			1		0	
NQ372/1886						
NQ392/1707						

SNP = einzelner Nukleotidpolymorphismus, Punktmutation, MNP = multipler Nukleotidpolymorphismus

Der Microarray stellt eine gute Möglichkeit dar, alle Gene eines Organismus auf ihre Anwesenheit in einem Stamm zu überprüfen. Letztlich müssen die erhaltenen Ergebnisse jedoch mit einer weiteren Methode evaluiert werden, da es z.B. durch Rekombinationen zu falschpositiven oder -negativen Resultaten kommen kann.

4.1.5.3 Auswertung der Rekombinationsereignisse

Die bei den Analysen der Microarray-Hybridisierungen festgestellten Rekombinationsereignisse, die zum Einfügen oder Entfernen genetischen Materials führten, waren in einigen Fällen mit ausreichend identischer Sequenz zwischen den beiden Stämmen eines Paares flankiert, um die Länge des Importes mit einiger Sicherheit bestimmen zu können. Die gemessenen Importlängen entsprachen denen, die schon in der Sequenzanalyse der 'housekeeping' und virulenzassoziierten Gene dieser Stammpaare festgestellt wurden (s. Tabelle 8). Die Länge der Rekombinationen war vergleichbar kurz, unabhängig davon, ob nur ein Allel durch ein anderes ausgetauscht wurde, oder ob das Ereignis zum Verlust oder hinzufügen von Genen führte. Der kürzeste gemessene Abstand einer beginnenden Rekombination zu einer tatsächlichen Deletion, die zum Verlust eines Gens führte, betrug nur 25 Bp (NQ315/1712, HP1561).

Tabelle 8: Länge der durch ES-PCR festgestellten Rekombinationsereignisse

Stammpaar	Gen	Rekombinationslänge [Bp]	identische, flankierende 5'-/3'-Bereiche [Bp]
LSU1040-1/-6	HP0903/0904	607	723/110
LSU1016-1/-6	HP1351	1364	21/150
NQ315/1712	HP0412/0415	570	410/184
	HP1561	1028	358/182
	HP1566	274	121/378
NQ352/1701	HP0780	902	15/0

4.2 Analyse von DNA-Import und Rekombination in *H. pylori* mit einem 'in vitro'-Transformationsmodell

Die Länge, der bei der Sequenzierung von zehn Genfragmenten gefundenen Rekombinationen bei sequenziellen Isolaten aus Patienten, war im Vergleich zu anderen Bakterien außergewöhnlich kurz. Die Ursache für diese kurzen Importlängen ist nicht bekannt.

Um mögliche Ursachen für diese kurzen Importe auszumachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein '*in vitro*'-Transformationsmodell entwickelt, das die Transformation von DNA in die Zelle und die Rekombination von DNA in das Chromosom nachweisen konnte. Anhand dieses Modells konnte sowohl die Transformations-effizienz, als auch die Rekombinationslänge importierter DNA bestimmt werden.

Bei diesem Modell wurde die natürliche Kompetenz von *H. pylori* ausgenutzt. Ein Rezipientenstamm wurde in einer Flüssigkultur angezogen. Der Kultur wurde Donor-DNA, die einen Antibiotikaresistenzmarker (Rifampicin oder Streptomycin) trug, zugegeben. Der Rezipientenstamm wurde mit der Donor-DNA inkubiert und anschließend wurde eine definierte Zellzahl sowohl auf dem Resistenzmarker entsprechenden antibiotikahaltigen Blutagarplatten (Selektivplatten) als auch auf 'normalen' Blutagarplatten kultiviert (Viabilitätskontrolle). Durch die definierte Zellzahl pro Agarplatte konnte auf den Selektivplatten die Transformationseffizienz und die Spontanmutationsrate (Kontrollansatz, dem keine resistenzvermittelnde DNA zugegeben worden war) bestimmt werden. Die einzelnen Transformanten der Selektivplatten wurden expandiert und die Sequenz der resistenzverleihenden Gene untersucht (s. Abbildung 22).

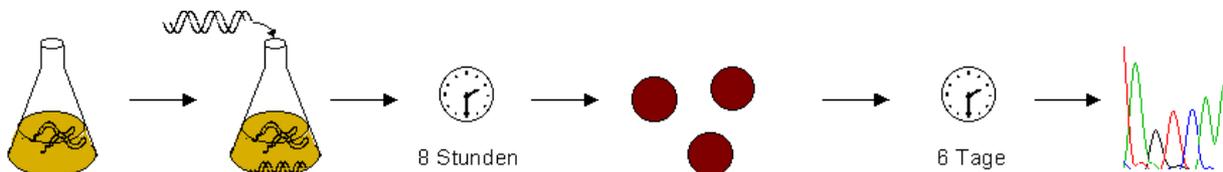


Abbildung 22: Experimenteller Aufbau des '*in vitro*'-Transformationsmodells

Ein Rezipientenstamm wuchs in Flüssigmedium an, bei einer Zelldichte von 3×10^8 Zellen/ml wurde $1 \mu\text{g}$ DNA/ml zugegeben, die einen Antibiotika-Resistenzmarker trug, und für weitere acht Stunden inkubiert. Definierte Zellzahlen wurden anschließend auf Selektiv- und Blutplatten ausplattiert und die gewachsenen Kolonien nach sechstägiger Anzucht zur Bestimmung der Transformationseffizienz ausgezählt. Die Klone wurden einzeln expandiert, die DNA isoliert und die resistenzverleihenden Gene sequenziert. Anhand der Sequenzanalyse konnte der Import von Donor-DNA in den Rezipientenstamm bestimmt werden.

Die Stämme 26695 und J99 wurden als Rezipientenstämmen ausgesucht, da von diesen Stämmen die kompletten Genomsequenzen bekannt waren.

Als DNA-Donoren wurden Stämme verschiedener geografischer Herkunft verwendet, um zu überprüfen, ob es Unterschiede bei der Transformation und der Rekombination zwischen den einzelnen Stämmen gibt.

4.2.1 Herstellung von DNA-Donoren für das Transformationsmodell durch Spontanmutation in Antibiotikaresistenz-verleihenden Genen

Einige Antibiotikaresistenzen werden durch Punktmutationen in bestimmten Genen vermittelt. Als selektiver Marker für das Transformationsmodell wurden zwei bereits beschriebene Antibiotikaresistenzen genutzt. Resistenz gegen Rifampicin kann durch verschiedene Punktmutationen im *rpoB*-Gen (HP1198, β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase) vermittelt werden (Heep *et al.*, 1999, 2000a und b). Streptomycin-Resistenz wird durch Punktmutationen im *rpsL*-Gen (HP1197, 30S ribosomales Protein S12) ausgeprägt, die ebenfalls an verschiedenen Stellen im Gen vorkommen können (Torii *et al.*, 2003).

Die *H. pylori*-Stämme, die Donor-DNA für das *in vitro*-Transformationsmodell lieferten, wurden aus unterschiedlichen geographischen Regionen (Europa, Asien, Afrika) ausgewählt. Die Stämme wurden auf Selektivplatten, die entweder Rifampicin oder Streptomycin enthielten, angezüchtet. Die gewachsenen Kolonien dieser Stämme wurden von den Selektivplatten isoliert, am entsprechenden Genlokus sequenziert und die Punktmutation bestimmt. Die gefundenen Punktmutationen und die daraus resultierenden Antibiotikaresistenz-verleihenden Veränderungen der Aminosäuresequenz wurden in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Rifampicin- und Streptomycin-resistente Mutanten verschiedener *H. pylori*-Stämme

Stamm	geografische Gruppe	Punktmutation	Aminosäure
26695-R1	Europa	1757 (T→C)	586 (I→T)
J99-R3	Afrika	445 (G→T)	149 (V→F)
N6-R1	Europa	1589 (A→T)	530 (D→V)
RE7006-R1	Asien	2102 (G→A)	701 (R→H)
RE8030-R1	Asien	1588 (G→A)	530 (D→N)
NZ609-R1	Asien	1628 (G→A)	543 (R→H)
26695-S1	Europa	128 (A→G)	43 (K→R)
J99-S5	Afrika	128 (A→G)	43 (K→R)
N6-S1	Europa	263 (A→G)	88 (K→R)

-R1 = Rifampicin-Resistenz; -S1, -S5 = Streptomycin-Resistenz

4.2.2 Analyse der Flüssigkultur-*in vitro*-Transformation von Wildtyp-Rezipientenstämmen mit Antibiotikaresistenz-vermittelnder Donor-DNA

4.2.2.1 Transformation von Wildtyp-Rezipientenstämmen bei Zugabe von genomischer DNA

Nach Kultivierung der mit Donor-DNA transformierten Rezipientenstämmen auf Selektivplatten wurde die Transformationseffizienz durch Auszählung der erhaltenen Kolonien bestimmt. Die Transformationsrate wurde durch den Quotienten aus der Anzahl der erhaltenen Kolonien und der Anzahl der ausplattierten Zellen bestimmt. Die Spontanmutationsrate wurde aus der Zahl der Spontanmutanten des Kontrollansatzes (ohne DNA-Zugabe) und der Zahl der ausplattierten Bakterienzellen auf den Selektivplatten bestimmt.

Bei Zugabe von N6-R1-DNA (europäischer Stamm) zu dem Rezipientenstamm J99 konnte in drei unabhängigen Experimenten eine Transformationseffizienz von durchschnittlich 7×10^{-4} erreicht werden. Die Effizienz der einzelnen Experimente variierte zwischen 5×10^{-4} und $8,3 \times 10^{-4}$ (s. Tabelle 10). Die Rate der Spontanmutanten lag in jedem dieser Experimente mehr als zwei logarithmische Stufen niedriger ($\approx 4,2 \times 10^{-7}$). Durch die geringe Varianz zwischen den Experimenten konnte davon ausgegangen werden, dass der Unterschied zwischen den mit Donor-DNA gewachsenen Ansätzen und den Ansätzen ohne Zugabe von DNA auf transformationsvermittelter Resistenz gegen das Antibiotikum beruhte. Auch der Rezipientenstamm 26695 zeigte bei Kultivierung mit N6-R1 Donor-DNA diesen deutlichen Unterschied zwischen der Anzahl der Transformanten (5×10^{-4}) und den Spontanmutanten ($2,8 \times 10^{-6}$).

Die Kultivierung der beiden Rezipientenstämmen J99 und 26695 unter Zugabe von Streptomycinresistenz-vermittelnder N6-S1 DNA zeigte ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen der Spontanmutationsrate und der Anzahl der resistenten Bakterienkolonien bei DNA-Zugabe. Die Transformationseffizienz war in beiden Experimenten mit den unterschiedlichen Rezipientenstämmen niedriger als bei den vergleichbaren Experimenten mit Rifampicinresistenz-vermittelnder N6-R1 Donor-DNA. Die Transformationseffizienz des Stamms J99 betrug $1,4 \times 10^{-5}$ bei einer Spontanmutationsrate von weniger als 1×10^{-6} , beim Stamm 26695 lag die Transformationsrate bei 5×10^{-6} und die Spontanrate bei weniger als 1×10^{-8} (s. Tabelle 10).

Die Auswahl des Resistenzmarkers (Rifampicin oder Streptomycin) hatte keinen Einfluss auf die Transformationsrate, beide Resistenzen wurden mit einer vergleichbaren Frequenz übertragen.

Wurde der Rezipientenstamm J99 mit Donor-DNA kultiviert, die aus einem antibiotikaresistenten J99-Stamm isoliert worden war (J99-R3, J99-S5), so konnte ebenfalls die schon in den vorangegangenen Versuchen beobachtete Erhöhung der Anzahl der durch DNA-Zugabe resistenten Bakterien gegenüber den Spontanmutanten festgestellt werden. Der Unterschied betrug eine log-Stufe beim Ansatz mit Rifampicinresistenz-vermittelnder DNA und zwei log-Stufen bei Streptomycinresistenz-vermittelnder DNA. Das gleiche Experiment mit dem Rezipientenstamm 26695 führte ebenso zu einer höheren Anzahl von Transformanten gegenüber der Spontanmutationsrate. Diese fielen jedoch nicht so hoch aus wie beim Stamm J99. Die Transformationsrate war bei Kultivierung mit Donor-DNA aus dem Stamm 26695-R1 nur etwa vierfach und bei Kultivierung mit 26695-S1 DNA um eine log-Stufe erhöht (s. Tabelle 11).

Die Rezipientenstämme zeigten keinen Unterschied der Transformationseffizienz zwischen homologer DNA, die nur eine resistenzverleihende Punktmutation trug und resistenzvermittelnder DNA aus einem anderen *H. pylori* -Stamm, der ein anderes Allel trug (s. Tabelle 10).

Versuchsansätze mit Rifampicinresistenz-vermittelnder, genomischer DNA aus asiatischen Stämmen (RE-Stämme, NZ-Stamm) führten jedoch zu einem anderen Ergebnis. Mit J99 als Rezipientenstamm lagen die Transformationseffizienzen deutlich niedriger bei 1×10^{-6} (NZ609-R1) bzw. 2×10^{-6} (RE7006-R1) und $2,5 \times 10^{-6}$ (RE8030-R1). Die Spontanmutationsrate war mit den zuvor in anderen Stämmen festgestellten Werten vergleichbar ($3,3 \times 10^{-7}$ (NZ609-R1), 1×10^{-7} (RE7006-R1), $7,7 \times 10^{-6}$ (RE8030-R1)). In einem zweiten, unabhängigen Experiment konnten die Werte für die Kultivierung mit DNA aus dem Stamm RE7006-R1 bestätigt werden. Der Rezipientenstamm 26695 zeigte ebenfalls mit Donor-DNA dieser drei Stämme eine kaum von der Spontanmutationsrate zu unterscheidende Transformationsrate (s. Tabelle 10).

Beide Rezipientenstämme zeigten eine deutlich verminderte Transformationseffizienz mit genomischer DNA aus den drei verwendeten asiatischen Stämmen gegenüber der Transformation mit dem europäischen Stamm N6 (N6-R1, N6-S1). Es gibt

Ergebnisse

möglicherweise eine Transformationsbarriere, die eine effektive Transformation verhindert.

Tabelle 10: Transformation von WT-Stämmen mit Rifampicinresistenz-vermittelnder Donor-DNA

Rezipient	Donor	Anzahl der Experimente	Transformationsfrequenz	Spontanrate
J99	N6-R1	3	7×10^{-4} (5×10^{-4} - $8,3 \times 10^{-4}$)	$4,2 \times 10^{-7}$ ($9,1 \times 10^{-6}$ - 1×10^{-8})
J99	26695-R1	1	2×10^{-4}	$2,8 \times 10^{-6}$
J99	RE7006-R1	2	$1,6 \times 10^{-6}$ ($1,2 \times 10^{-6}$ - 2×10^{-6})	1×10^{-7}
J99	RE8030-R1	1	$2,5 \times 10^{-6}$	$7,7 \times 10^{-6}$
J99	NZ609-R1	1	1×10^{-6}	$3,3 \times 10^{-7}$
J99	J99-R3	1	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-7}$
26695	N6-R1	1	5×10^{-4}	$2,8 \times 10^{-6}$
26695	RE7006-R1	1	1×10^{-6}	$5,6 \times 10^{-6}$
26695	RE8030-R1	1	$1,3 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$
26695	NZ609-R1	2	$1,5 \times 10^{-6}$ ($1,5 \times 10^{-6}$ - $1,3 \times 10^{-7}$)	$2,9 \times 10^{-7}$ ($2,5 \times 10^{-7}$ - 3×10^{-7})
26695	26695-R1	2	$8,7 \times 10^{-6}$ ($8,3 \times 10^{-6}$ - $9,1 \times 10^{-6}$)	$3,3 \times 10^{-7}$

Tabelle 11: Transformation von WT-Stämmen mit Streptomycinresistenz-vermittelnder Donor-DNA

Rezipient	Donor	Anzahl der Experimente	Transformationsfrequenz	Spontanrate
J99	N6-S1	1	$1,4 \times 10^{-5}$	$< 1 \times 10^{-6}$
J99	26695-S1	1	$1,3 \times 10^{-4}$	5×10^{-6}
J99	J99-S5	1	3×10^{-5}	5×10^{-7}
26695	N6-S1	1	5×10^{-6}	$< 1 \times 10^{-8}$
26695	26695-S1	1	1×10^{-7}	$< 1 \times 10^{-8}$

4.2.2.2 Transformation von Wildtyp-Rezipientenstamm J99 bei Zugabe eines PCR-Produkts

Für die Transformation aller bisher beschriebenen Experimente wurde genomische DNA verwendet. Um zu überprüfen, ob die verminderte Aufnahme von DNA aus asiatischen Stämmen an den Unterschieden innerhalb des *rpoB*-Allels oder anderen

Faktoren lag, wurde aus einem der asiatischen Stämme (RE7006-R1) ein PCR-Produkt (Teil des *rpoB*-Gens) amplifiziert und als DNA-Donor eingesetzt.

Bei Zugabe des 2,1 Kb langen PCR-Produkts des *rpoB*-Gens aus dem Stamm RE7006-R1 konnte eine Transformationseffizienz beim Rezipientenstamm J99 von $1,7 \times 10^{-4}$ erzielt werden (s. Tabelle 12). Dieses Ergebnis war vergleichbar mit den Transformationseffizienzen, die bei Verwendung von genomischer DNA aus dem Stamm N6-R1 erzielt wurden. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass trotz der verminderten Zugabe von PCR-Produkt gegenüber der genomischen DNA zehnmal mehr 'Ziel-DNA' zur Rekombination mit dem *rpoB*-Gen zur Verfügung stand als bei Zugabe der genomischen DNA. Dennoch unterscheidet sich die Transformationseffizienz des PCR-Produktes um das 100fache von der des Versuchsansatzes mit genomischer DNA aus dem Stamm, aus dem das PCR-Produkt amplifiziert wurde.

Durch die Verwendung eines PCR-Produktes aus einem asiatischen Stamm konnte die scheinbare Transformationsbarriere der genomischen DNA des gleichen Stammes aufgehoben werden.

Tabelle 12: Transformation von *H. pylori* J99 mit Rifampicinresistenz-vermittelnder genomischer Donor-DNA und einem *rpoB*-PCR-Produkt

Rezipient	Donor	Anzahl der Experimente	Transformationsfrequenz	Spontanrate
J99	RE7006-R1	2	$1,6 \times 10^{-6}$ ($1,2 \times 10^{-6}$ - 2×10^{-6})	1×10^{-7}
J99	RE7006-R1-PCR	1	$1,7 \times 10^{-4}$	-

4.2.2.3 Untersuchung der Rekombinationslänge der importierten DNA-Fragmente in Wildtypstämme

Durch die Bestimmung der Transformationseffizienzen war davon auszugehen, dass die auf den Selektivplatten gewachsenen Kolonien (Transformanten) DNA aufgenommen hatten, die zu einer Ausbildung der Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum geführt haben. Um die Größe der importierten DNA-Fragmente in dem *in vitro*-Transformationsmodell zu bestimmen, wurden die resistenzverleihenden Gene der Transformanten sequenziert. Die Heterogenität der *rpoB*- und *rpsL*-Allele der einzelnen *H. pylori*-Stämme erlaubte es, den Anfang und das Ende der importierten DNA der Donor-Stämme von der Gensequenz in den

Rezipientenstämmen auf wenige Basen genau zu unterscheiden. Die Homologien der einzelnen Donor-Stämme in dem untersuchten Fragment des *rpoB*-Gens variierten zwischen 94,3% bis 95% zum Rezipientenstamm J99 und 95% bis 97,1% zum Stamm 26695, was etwa einem Unterschied von 100 Basenpaaren innerhalb der untersuchten Sequenz ausmachte (s. Tabelle 13).

Die Homologien der *rpsL*-Allele zwischen den beiden Rezipientenstämmen betrug 96%, das Allel des Stammes N6 hatte eine Homologie von 97,5% zu J99 und 97% zu dem Allel in 26695.

Tabelle 13: Sequenzhomologien der untersuchten Genfragmente zwischen Rezipienten- und Donorstämmen

Stamm	<i>rpoB</i> Sequenzhomologie zu		<i>rpsL</i> Sequenzhomologie zu	
	J99	26695	J99	26695
J99		95%		96%
26695	95%			
N6	94,8%	96,2%	97,5%	97%
RE7006	94,5%	97,1%		
RE8030	94,3%	96,7%		
NZ609	94,9%	96,9%		

Es wurden jeweils mehr als 1600 Basenpaare der beiden resistenzverleihenden Gene sequenziert (*rpoB*: 1663, *rpsL*: 1634). Die Sequenz jedes Isolats wurde mit dem Ausgangsstamm und dem DNA-Donorstamm verglichen.

Die Sequenzierungen zeigten, dass in den Transformanten DNA-Sequenzen der Donor-DNA wiedergefunden werden konnten, die für die jeweilige Resistenzausbildung verantwortlich waren. Die verminderte Transformationsrate bei Transformation mit Donor-DNA aus asiatischen Stämmen (RE-Stämme, NZ-Stamm) führte bei der Sequenzierung der auf den Selektivplatten gewachsenen vermeintlichen Transformanten dazu, dass sich einige als Spontanmutanten herausstellten, die keine DNA des Donors aufgenommen hatten. Für die Donor-DNA RE7006-R1 konnte kein tatsächlich transformierter Stamm isoliert werden. Bei den Stämmen RE8030-R1 und NZ609-R1 lag die Anzahl der Spontanmutanten auf den Selektivplatten in Kultur mit J99 bei über 50%, beim Rezipientenstamm 26695 konnte für keinen der asiatischen Stämme eine resistenzvermittelnde DNA-Übertragung festgestellt werden.

Ergebnisse

Die Verwendung eines PCR-Produkts des Stamms RE7006-R1 als Donor-DNA führte zu Rekombinationsereignissen, die eine Rifampicinresistenz vermittelten. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit Ergebnissen, die mit genomischer Donor-DNA anderer *H. pylori*-Stämme erzielt werden konnten (s. Tabelle 14).

Die durchschnittliche Länge der importierten DNA, die komplett innerhalb des Fragments lag, variierte zwischen 320 Bp (J99 transformiert mit DNA aus 26695-R1) und 706 Bp (J99 transformiert mit einem 2,1 Kb langen *rpoB*-PCR-Produkt aus RE7006-R1). Bezogen auf alle Rekombinationsereignisse, einschließlich der Importe, die sich über den Rand des Fragments hinweg fortsetzten, waren Durchschnittswerte von 577 Bp (J99 transformiert mit N6-R1 DNA) bis 1387 Bp (J99 transformiert mit 26695-S5 DNA) zu verzeichnen (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Länge der importierten DNA in WT-Stämme

Rezipient	Donor	Anzahl der Stämme	Länge ¹ der importierten DNA innerhalb des Fragments [Bp]	Länge aller importierter DNA [Bp]
J99	N6-R1	50	322 (1-1365) n=52	577
J99	26695-R1	15	320 (1-1156) n=17	593
J99	RE7006-R1	35	-	-
J99	RE7006-R1-PCR	20	706 (16-1648) n=31	706
J99	RE8030-R1	7	550 (121-934) n=4	844
J99	NZ609-R1	13	492 (41-1193) n=6	886
26695	N6-R1	21	499 (145-793) n=6	950
26695	RE7006-R1	18	-	-
26695	RE8030-R1	20	-	-
26695	NZ609-R1	26	-	-
J99	N6-S1	12	827 n=1	1134
J99	26695-S1	30	768 (178-1043) n=6	1387
26695	N6-S1	8	330 (289-371) n=2	754

¹= Mittelwert, n= Anzahl der Fragmente

Diese Ergebnisse zeigten, dass die zuvor in sequenziellen Isolaten *in vivo* festgestellten kurzen Importlängen in einem *in vitro*-Modell bestätigt werden konnten (s. 4.1).

Die Länge der importierten DNA in dem *in vitro*-Transformationsmodell variierte von sehr kurzen Fragmenten von nur wenigen Basenpaaren Länge, die nur eine unterschiedliche Base trugen, bis hin zu Rekombinationen, die länger waren als das sequenzierte Fragment. Die Rekombinationsereignisse beschränkten sich dabei nicht nur auf Fragmente, die zu einer Resistenzvermittlung führten, sondern waren z.T. in mehreren kleinen Stücken über das gesamte Fragment verteilt (s. Abbildung 23A). Einige Importe waren nur durch einige wenige unterschiedliche Basen zwischen Rezipient und Donor voneinander getrennt.

Ein Experiment mit Donor-DNA unterschiedlicher Qualität zeigte, dass die Länge der angebotenen DNA-Fragmente Auswirkungen auf die Rekombination haben kann. In zwei unabhängigen Experimenten mit dem Rezipientenstamm J99, transformiert mit N6-R1 DNA, stieg bei Einsatz von degradiertes, niedermolekularer N6-R1 DNA die Zahl der bestimmbarer Fragmente, die innerhalb des sequenzierten Bereichs abschlossen, deutlich an (35 zu 6 Fragmente bei jeweils 20 untersuchten Stämmen) verglichen mit dem gleichen Ansatz mit hochmolekularer DNA (Abbildung 23A). Die durchschnittliche Länge der Fragmente veränderte sich hingegen nicht (330 Bp bei niedermolekularer DNA zu 322 Bp bei hochmolekularer DNA; s. Abbildung 23B).

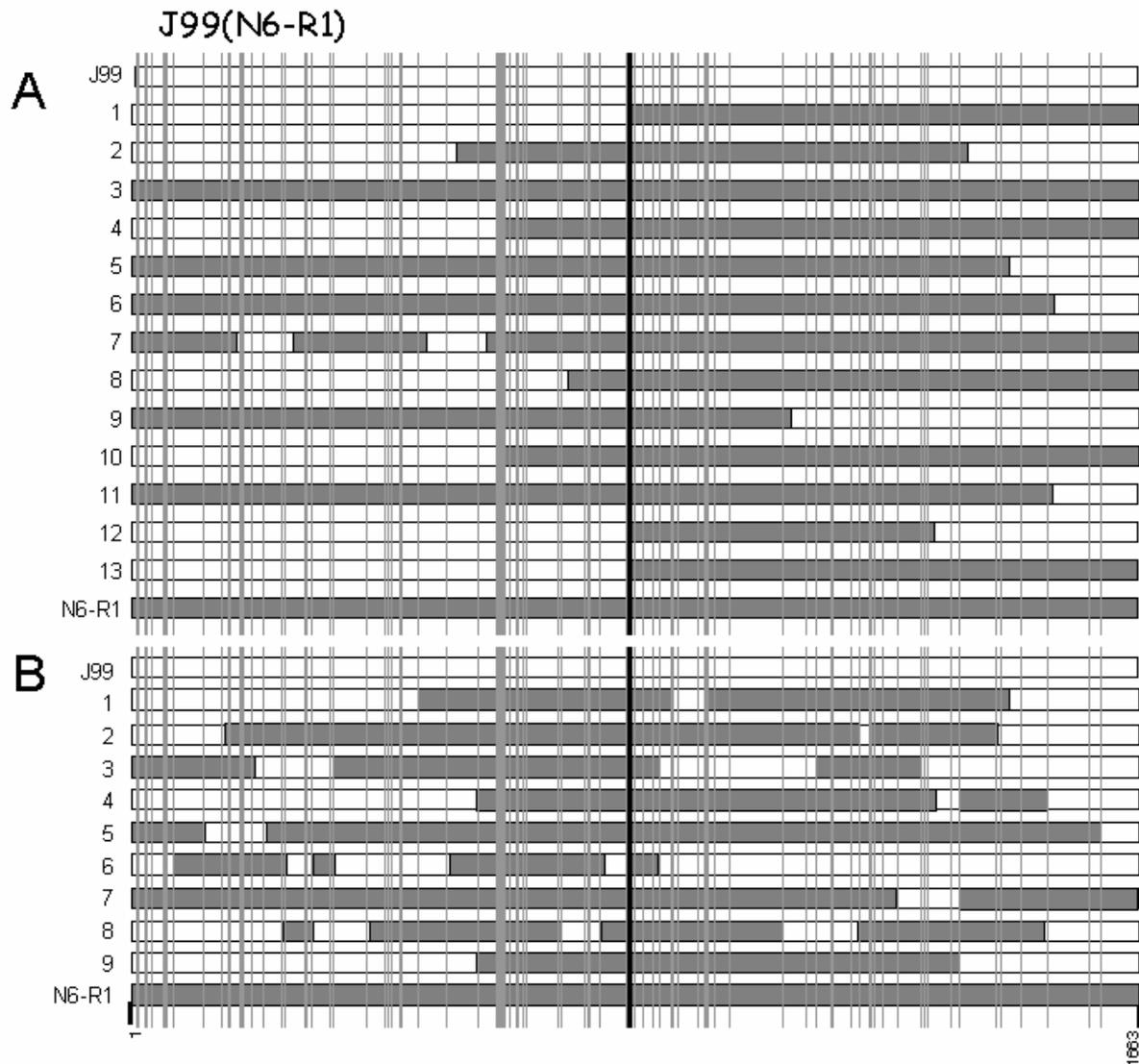


Abbildung 23: Sequenzanalyse der importierten DNA-Fragmente, Stamm J99 transformiert mit N6-R1-DNA

Die importierten Fragmente variierten in ihrer Länge und Lage. **(A) hochmolekulare DNA:** Die Stämme 1-13 zeigen die gefundenen Importe. Alle Stämme tragen ein Rekombinationsereignis im Bereich der resistenzverleihenden Punktmutation des Stammes N6-R1. In einigen Stämmen gibt es mehrere kurze Importe (Stamm 7), in anderen reicht der Import über das gesamte sequenzierte Fragment und darüber hinaus (Stamm 3). **(B) niedermolekulare DNA:** Ist die DNA bereits bei Zugabe in kleine Fragmente geschnitten, kommt es zu vielen kleinen Importen. Die durchschnittliche Länge der Importe änderte sich jedoch nicht. Helle Balken= J99-spezifische DNA, dunkle Balken= N6-R1-spezifische DNA, helle Striche= Basenunterschiede zwischen J99 und N6, dunkler Strich= resistenzvermittelnde Punktmutation

4.2.3 Analysen des *in vitro*-Transformationsmodells mit *H. pylori* 'knock out'-Mutanten im Nukleotidexcisions-Reparatur-Mechanismus (NER)

Die Mechanismen der DNA-Aufnahme, Reparatur und Rekombination sind in *H. pylori* bislang weitgehend unbekannt. Die meisten Reparatur- und Rekombinationsmechanismen sind im Vergleich zu *E. coli* nur rudimentär vorhanden oder fehlen ganz. Es konnten in den beiden komplett sequenzierten *H. pylori*-

Genomen weder Gene für einen SOS-Reparatur-Mechanismus, noch ein kompletter 'Mismatch'- und 'Methyl-Directed'-Reparatur Mechanismus gefunden werden (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Ein in *H. pylori* komplett annotiertes 'System' stellt der DNA-Reparaturmechanismus *uvrABCD* dar, der in *E. coli* UV-Licht induzierte DNA-Schäden beheben kann und als Nukleotid-Excisions-Reparatur-Mechanismus (NER) bezeichnet wird (van Houten, 1990). Der NER-Mechanismus erkennt Basenfehlpaarungen und schneidet eine kleine Anzahl Basen aus, die dann durch die DNA-Polymerase I wieder ersetzt werden. Die Funktionalität des NER-Mechanismus wurde in *H. pylori* noch nicht experimentell bestätigt.

Um zu überprüfen, ob längere DNA-Stücke in die Zellen transportiert wurden, in das Genom rekombinierten und anschließend durch den NER-Mechanismus wieder teilweise entfernt wurden, was eine mögliche Erklärung für die kurzen DNA-Importe und die beobachteten Allelmosaiken wäre, wurden in den *H. pylori*-Stämmen 26695 und J99 die Gene *uvrA* (HP0705, DNA-bindendes Protein, ATPase) und *uvrD* (HP1478, Helicase II) durch Einfügen einer Kanamycinresistenz-Kassette ausgeschaltet und mit diesen Mutanten analog zu den Wildtyp-Stämmen Flüssigkultur-Transformationen durchgeführt. Die Versuche wurden nur mit rifampicinresistenten DNA-Donorstämmen durchgeführt.

4.2.3.1 Transformation von *uvrA*⁻- und *uvrD*⁻-Mutanten der Rezipientenstämmen mit genomischer DNA und einem *rpoB*-PCR-Produkt

Die J99*uvrA*⁻-Mutante zeigte verglichen mit dem Wildtyp eine deutlich reduzierte Anzahl von Kolonien auf den Selektivplatten nach Transformation mit verschiedenen Donorstämmen. In zwei unabhängigen Versuchen mit N6-R1 als Donor-DNA lag die Transformationsrate bei durchschnittlich $1,2 \times 10^{-7}$, ein Wert der etwa der Spontanmutationsrate des Wildtyps entsprach. Die Spontanmutationsrate war in den Mutanten jedoch ebenfalls niedriger, so dass sie in den Versuchen unterhalb der Messgrenze von 1×10^{-8} lag. Auch in allen anderen Versuchen mit den schon zuvor verwendeten Donor-DNAs bestätigte sich die deutlich niedrigere Transformationseffizienz verglichen mit den Wildtyp-Rezipientenstämmen (s. Tabelle 10 und Tabelle 15). Auch die Verwendung des *rpoB*-PCR-Produkts aus RE7006-R1 zeigte keine Veränderung der Transformationseffizienz, wie sie in den analogen Experimenten mit J99 beobachtet werden konnte.

Die *uvrA*⁻-Mutante im Rezipientenstamm 26695 zeigte Transformationsraten, die denen der gleichen Mutante im Stamm J99 glichen.

Die *uvrD*⁻-Mutante im Rezipientenstamm 26695 zeigte ebenfalls eine deutliche Absenkung in der Zahl der erhaltenen Transformanten bezogen auf den Wildtyp, die Transformationseffizienz lag jedoch geringfügig höher als bei den *uvrA*⁻-Mutanten (s. Tabelle 15).

Das Ausschalten einiger Gene des NER-Mechanismus führte zu einer starken Abnahme der Transformierbarkeit der Rezipientenstämme. Dies deutet auf eine Beteiligung dieses Mechanismus an der Rekombination importierter DNA in das Chromosom hin. Beide verwendeten Mutanten (*uvrA*⁻ und *uvrD*⁻) zeigten ein vergleichbares Ergebnis, das die Funktionalität des NER-Mechanismus in *H. pylori* nahe legt. Ein in *E. coli* beschriebener hyperrekombinanter Phänotyp einer *uvrD*⁻-Mutante konnte in *H. pylori* nicht beobachtet werden.

Tabelle 15: Transformation von *uvrA*⁻- und *uvrD*⁻-Mutanten mit Rifampicinresistenz-vermittelnder Donor-DNA

Rezipient	Donor	Anzahl der Experimente	Transformationsfrequenz	Spontanrate
J99 <i>uvrA</i> ⁻	N6-R1	2	$1,2 \times 10^{-7}$ (1×10^{-7} - $1,4 \times 10^{-7}$)	$< 1 \times 10^{-8}$
J99 <i>uvrA</i> ⁻	26695-R1	1	$3,3 \times 10^{-7}$	$< 1 \times 10^{-8}$
J99 <i>uvrA</i> ⁻	RE7006-R1	1	$1,3 \times 10^{-7}$	5×10^{-7}
J99 <i>uvrA</i> ⁻	RE7006-R1 PCR	1	5×10^{-7}	$< 1 \times 10^{-8}$
J99 <i>uvrA</i> ⁻	RE8030-R1	1	5×10^{-6}	$1,4 \times 10^{-7}$
J99 <i>uvrA</i> ⁻	NZ609-R1	1	1×10^{-7}	$3,3 \times 10^{-7}$
26695 <i>uvrA</i> ⁻	N6-R1	1	5×10^{-7}	$< 1 \times 10^{-8}$
26695 <i>uvrA</i> ⁻	RE8030-R1	1	$3,3 \times 10^{-7}$	$< 1 \times 10^{-8}$
26695 <i>uvrA</i> ⁻	NZ609-R1	1	9×10^{-6}	$< 1 \times 10^{-8}$
26695 <i>uvrD</i> ⁻	N6-R1	1	$2,9 \times 10^{-6}$	-
26695 <i>uvrD</i> ⁻	J99-R3	1	$7,7 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-7}$
26695 <i>uvrD</i> ⁻	NZ609-R1	1	$6,7 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-7}$

4.2.3.2 Rekombinationslänge der importierten DNA in *uvrA*⁻- und *uvrD*⁻- Mutanten der Rezipientenstämmen

Die Länge der importierten DNA-Fragmente bei der *uvrA*⁻-Mutante des Stamms J99 entsprach den bereits gemessenen Werten des J99-Wildtyp (320-706 Bp), mit einer Ausnahme. Die Länge der genau bestimmbaren Fragmente nach Zugabe von 26695-R1 DNA zu J99*uvrA*⁻ betrug nur 49 Basenpaare und war damit um ein zehnfaches kleiner als die Werte der übrigen Ansätze. Auch die Länge der insgesamt importierten DNA war mit einer Durchschnittslänge von 444 Bp nur halb so groß wie die der Ansätze mit anderer Donor-DNA (833-892 Bp; s. Tabelle 16).

Die Transformation des Rezipientenstamms 26695*uvrA*⁻ führte mit keiner der verwendeten Donor-DNAs zu einem feststellbaren DNA-Import. Alle untersuchten, auf den Transformationsplatten gewachsenen Kolonien, trugen eine spontan entstandene Mutation. Da die Transformation des Wildtypstammes bereits nicht gelang, war dieses Ergebnis nicht unerwartet.

Die *uvrD*⁻-Mutante des Rezipientenstamms 26695 konnte nur mit N6-R1 Donor-DNA erfolgreich transformiert werden. Die Transformation mit genomischer DNA aus dem asiatischen Stamm NZ609-R1 führte wie schon bei der *uvrA*⁻-Mutante zu keinem feststellbaren DNA-Import. Die Transformation mit N6-R1 hingegen zeigte vergleichbare Importlängen wie sie bereits im Wildtyp festzustellen waren (s. Tabelle 16).

Obwohl die Transformationseffizienzen der beiden Mutanten des NER-Mechanismus weit hinter denen der Wildtypstämmen zurückblieben, hatte dies keinen Einfluss auf die Länge der in das Chromosom rekombinierten DNA-Fragmente.

Ergebnisse

Tabelle 16: Länge der importierten DNA in *uvrA*⁻- und *uvrD*⁻-Mutanten

Rezipient	Donor	Anzahl der Stämme	Länge ¹ der importierten DNA innerhalb des Fragments [Bp]	Länge aller importierter DNA [Bp]
J99 <i>uvrA</i> ⁻	N6-R1	19	565 n=1	1388
J99 <i>uvrA</i> ⁻	26695-R1	5	49 (1-180) n=5	444
J99 <i>uvrA</i> ⁻	RE7006-R1	3	-	-
J99 <i>uvrA</i> ⁻	RE7006-R1 PCR	10	892 (193-1237) n=12	892
J99 <i>uvrA</i> ⁻	RE8030-R1	0	-	-
J99 <i>uvrA</i> ⁻	NZ609-R1	16	655 (205-1129) n=3	833
26695 <i>uvrA</i> ⁻	N6-R1	20	-	-
26695 <i>uvrA</i> ⁻	RE8030-R1	20	-	-
26695 <i>uvrA</i> ⁻	NZ609-R1	20	-	-
26695 <i>uvrD</i> ⁻	N6-R1	12	410 (33-592) n=6	860
26695 <i>uvrD</i> ⁻	NZ609-R1	20	-	-

¹= Mittelwert, n= Anzahl der Fragmente

4.2.4 Mutagenese durch UV-Bestrahlung der Stämme J99 und J99*uvrA*⁻

Die Funktionalität der annotierten Gene des NER-Mechanismus ist in *H. pylori* noch nicht experimentell untersucht worden. Die Induktion von mutagen wirkendem UV-Licht sollte Aufschluss über mögliche Reparatur-Defizite der *uvrA*⁻-Mutante geben, die für Mutanten dieses Gens in *E. coli* beschrieben wurden (Kiyosawa *et al.*, 2001).

Die Rezipientenstämme J99 und J99*uvrA*⁻ wurden wie in den bisherigen Experimenten angezogen. Anschließend wurden die Stämme UV-Licht (360nm) ausgesetzt und weiter kultiviert, bevor sie auf Selektivplatten mit Rifampicin ausplattiert wurden. Die Wachstumsraten der beiden Stämme J99 und J99*uvrA*⁻ waren vergleichbar. Bei der *uvrA*⁻-Mutante wurde kein Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtypstamm festgestellt. Die Mutationsrate des Wildtyps war trotz UV-Bestrahlung vergleichbar mit der Spontanmutationsrate der Experimente ohne Mutagenese (s. Tabelle 10).

Die *uvrA*⁻-Mutante zeigte jedoch eine erhöhte Mutationsrate. In vielen Experimenten ohne Mutagenese lag sie so niedrig, dass sie in J99*uvrA*⁻ nicht gemessen werden konnte ($<1 \times 10^{-8}$, s. Tabelle 15). Nach der Mutagenese war sie um den Faktor 50 erhöht (s. Tabelle 17). Die durch die UV-Bestrahlung ausgelösten Schäden konnten nicht kompensiert werden, waren allerdings auch nicht so stark, dass es zum Absterben der Bakterien führte.

Die *uvrA*⁻-Mutante in *H. pylori* konnte, ähnlich wie für *E. coli* beschrieben, die UV-induzierten Schäden der DNA nicht reparieren, was zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der Mutationen im Genom führte.

Tabelle 17: Spontanmutationsrate nach UV-Bestrahlung

Rezipient	Anzahl der Experimente	Mutationsrate nach UV-Bestrahlung	Spontanmutationsrate
J99	2	$2,5 \times 10^{-7}$	2×10^{-7}
J99 <i>uvrA</i> ⁻	2	2×10^{-6}	1×10^{-8}

4.2.5 Transformation der Wildtyp-Rezipientenstämme mit einzelsträngiger DNA

Der DNA-Aufnahmemechanismus von *H. pylori* ist noch weitgehend unbekannt. Wichtige Gene von Aufnahmemechanismen, die in anderen natürlich kompetenten Spezies bekannt sind, konnten noch nicht identifiziert werden (z.B. ein DNA-bindende Protein an der Zelloberfläche). Es gibt Hinweise auf einen Typ IV-Sekretionsmechanismus bei *H. pylori*, der doppelsträngige DNA bindet, aber nur einen Strang durch die Membran transportiert (Hofreuter *et al.*, 2001). Daher wurde dem *in vitro*-Transformationsmodell einzelsträngige, genomische DNA zugeben, die zuvor aufgekocht und auf Eis abgekühlt worden war, um zu überprüfen, ob diese DNA-Form von *H. pylori* in die Zelle transportiert werden kann.

Die Transformationseffizienz mit den beiden Wildtypstämmen 26695 und J99 lag jeweils weit unterhalb der zuvor mit doppelsträngiger DNA gemessenen Werte (s. Tabelle 12) und im Fall des Stamms 26695 konnte praktisch kein Unterschied zur Spontanmutationsrate festgestellt werden (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Transformation von WT-Stämmen mit denaturierter DNA

Rezipient	Donor	Anzahl der Experimente	Transformationsfrequenz	Spontanrate
J99	N6-R1ss	2	$3,2 \times 10^{-6}$	$7,7 \times 10^{-6}$
26695	N6-R1ss	2	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$

ss = einzelsträngige DNA

Die einzelsträngige DNA war entweder nicht ausreichend stabil und wurde im Flüssigkultur-Medium abgebaut, oder konnte nicht aufgenommen bzw. nicht in das Genom integriert werden. Es konnten keine Transformanten isoliert werden.

4.3 Analyse einer experimentellen *H. pylori*-Infektion und Etablierung eines neuen Tiermodells in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

4.3.1 Erstes Infektionsmodell: Etablierung einer persistierenden Infektion von Rhesusaffen mit klinischen *H. pylori*-Isolaten

In Zusammenarbeit mit dem deutschen Primatenzentrum in Göttingen (DPZ) wurde ein experimentelles *H. pylori*-Tiermodell in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) entwickelt (Mätz-Rensing *et al.*, 2001). Der Rhesusaffe stellt ein sog. 'close to human'-Tiermodell dar, da er dem Menschen physiologisch nahe steht und bezüglich der menschlichen *H. pylori*-Infektion vergleichbare Krankheitssymptome entwickelt. Zudem eignet sich der Rhesusaffe durch seine lange Lebenserwartung gut für Longitudinalstudien.

Das Tiermodell umfasste insgesamt vier männliche Rhesusaffen von denen drei Tiere experimentell infiziert wurden (Tier-Nr. 7743, 8156, 9050). Ein weiterer Rhesusaffe diente als Kontrolle und wurde nicht infiziert. Die aus Indien stammenden Rhesusaffen stellen einen natürlichen Wirt für *H. pylori* dar (Dubois *et al.*, 1994). Durch die Voruntersuchung wurde eine Infektion mit sog. 'large gastrointestinal spiral organisms' (LGIS) festgestellt. Aus diesem Grund wurden die zum Infektionszeitpunkt drei- bis vierjährigen Tiere einer Antibiotika-Therapie unterzogen. Trotz der Therapie waren die Tiere jedoch fortwährend mit LGIS infiziert, die nicht kultiviert werden konnten.

Anschließend wurden die Affen experimentell mit zwei klinischen *H. pylori*-Isolaten (BO417, BO418) infiziert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von drei Jahren untersucht, um unter definierten Bedingungen die Kolonisierung und den genetischen Austausch zwischen den Stämmen beobachten zu können. Zu

verschiedenen Zeitpunkten wurden die Affen endoskopiert und aus unterschiedlichen Regionen des Magens Biopsiematerial gewonnen (Kardia, Fundus, Antrum). Im ersten Jahr der Infektion wurde die Infektion mikrobiologisch (Reisolierung von *H. pylori*-Isolaten aus Magenbiopsien) und immunologisch (Bestimmung von verschiedenen Infektionsmarkern im Blut) untersucht (eigene Diplomarbeit, 2000). Weitere mikrobiologische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit fortgeführt.

4.3.1.1 Gewinnung von Reisolaten aus Magenbiopsiematerial

Die Magenbiopsien wurden direkt nach ihrer Entnahme in Brucella-Bouillon in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt (durchgeführt am DPZ). Aus den Einfrierkulturen wurden anschließend Bakterien auf Blutagarplatten angezüchtet und *H. pylori*-Reinkulturen isoliert.

Zwei Wochen und 10 Monate nach Infektion konnten aus allen infizierten Tieren Isolate gewonnen werden, während dies nach fünf Monaten nur aus Tier-Nr. 8156 gelang. Auch nach 18 Monaten gelang die Isolation von *H. pylori*-Stämmen aus allen drei Tieren, aus den Biopsien der Zwei-Jahres-Untersuchung jedoch nur aus den Tieren 7743 und 9050. Nach drei Jahren konnte nur ein Stamm aus dem Tier 8156 isoliert werden (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Reisolate aus experimentell infizierten Rhesusaffen

Isolationszeitpunkt	Tier-Nr. 7743	Tier-Nr. 8156	Tier-Nr. 9050
2wpi	I10	I3, 4, 5, 7	I8, 9
5mpi		H9	
10mpi	H20, 21, 27, 29	H22, 23, 24, 28, 30	H25, H31
18mpi	MM3, 4	MM10, 13	MM16, 17, 18
24mpi	MM22		MM26
36mpi		MM30	

wpi = Wochen nach Infektion, mpi = Monate nach Infektion

4.3.1.2 Analyse der Reisolate aus Rhesusaffen mittels RAPD-PCR

Wie schon bei den sequenziellen Isolaten aus Menschen gezeigt werden konnte, besitzt jeder *H. pylori*-Stamm sein eigenes Bandenmuster bei der RAPD-PCR. So zeigten die beiden Infektionsstämme BO417 und BO418 mit den verwendeten Primern (s. 4.1.1) ebenfalls unterschiedliche Bandenmuster. Anhand dieses Musters

konnte die Abstammung der Reisolatate den jeweiligen Infektionsstämmen zugeordnet werden.

Zwei Wochen nach der experimentellen Infektion konnten aus den Tieren 7743 und 9050 nur Stämme isoliert werden, die dem Bandenmuster des Infektionsstamms BO417 entsprachen, das Tier 8156 hatte zu diesem Zeitpunkt eine Mischinfektion beider Stämme. Alle reisolierten Stämme ab dem Fünf-Monatswert zeigten mit den verwendeten RAPD-Primern nur noch Bandenmuster, die dem Infektionsstamm BO417 entsprachen. Der zweite Stamm BO418 konnte nicht mehr nachgewiesen werden (s. Abbildung 24). Es konnten auch keine Veränderungen im Bandenmuster festgestellt werden, die auf eine Veränderung in der genetischen Ausstattung (Aufnahme oder Verlust von Genen) oder Rekombinationen mit dem zweiten Infektionsstamm oder den LGIS hindeuteten.

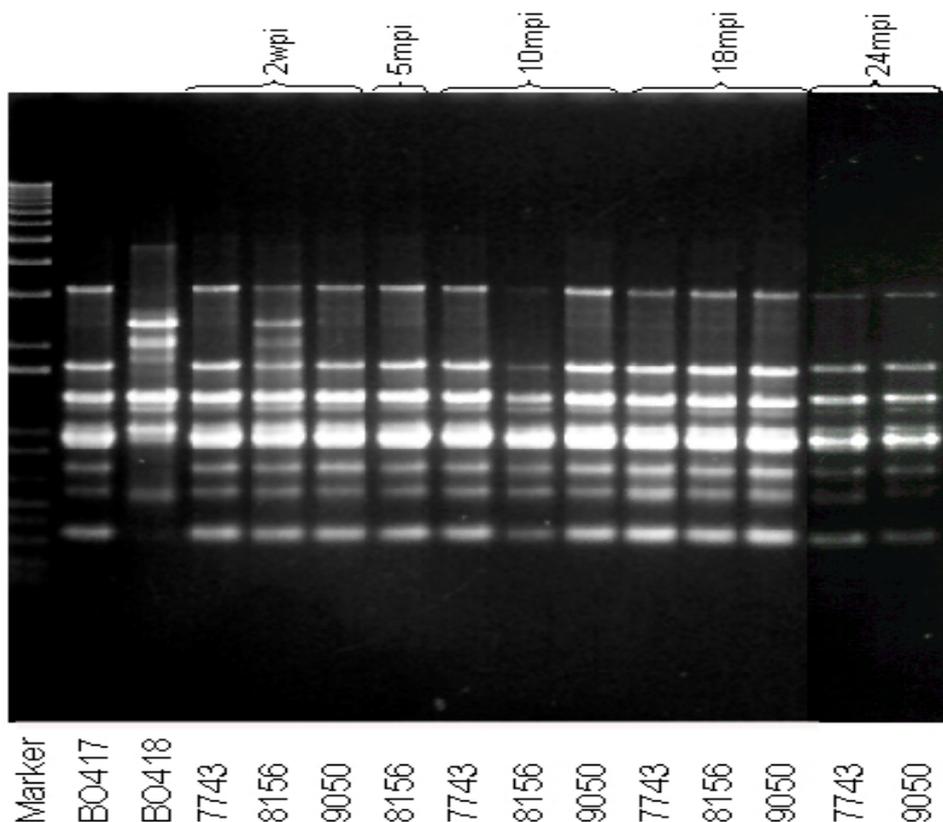


Abbildung 24: RAPD-PCR der Reisolatate aus Rhesusaffen mit Primer AP1254

Die Infektionsstämme BO417 und BO418 zeigten ein deutlich voneinander abweichendes Bandenmuster. Mit Ausnahme des Isolats in Tier 8156 zwei Wochen nach Infektion, indem die Bandenmuster beider Infektionsstämme vorhanden waren (Mischinfektion), entsprachen alle weiteren Reisolatate ausschließlich dem Bandenmuster des Stammes BO417. Es gab keinen Hinweis auf Rekombination oder Reorganisation der DNA in den Isolaten. BO417, BO418 = Infektionsstämme; 7743, 8156, 9050 = Tiernummern; wpi = Wochen nach Infektion; mpi = Monate nach Infektion

4.3.1.3 Sequenzierung der Reisolat aus Rhesusaffen

Alle Reisolat wurden durch eine partielle Sequenzierung der 16S rDNA identifiziert. Die Infektionsstämme unterscheiden sich in diesem Gen, daher konnten die Isolate eindeutig zugeordnet werden. Wiederum entsprachen ab dem 5-Monatswert alle Isolate dem Stamm BO417. Von einigen ausgewählten Reisolat (MM13, 22, 30), die zu unterschiedlichen Zeiten aus verschiedenen Tieren isoliert worden waren (s. Tabelle 19), wurden die selben Genfragmente sequenziert, wie schon für die sequenziellen Isolate aus Menschen. Die erhaltenen Sequenzen der drei Reisolat waren in allen Genen untereinander identisch. Sie zeigten keine Unterschiede zum Infektionsstamm BO417. Es kam in den untersuchten Sequenzen nicht zu Rekombinationsereignissen mit dem zweiten Infektionsstamm BO418, trotz zumindest zeitweiliger Co-Kolonisierung. Es konnte ebenfalls keine Interspezies-Rekombination mit den LGIS gefunden werden.

4.3.1.4 Microarray-Analyse des Drei-Jahres-Isolats MM30 und des Infektionsstamms BO417

Es wurde, analog zu den Stammpaaren der sequentiellen Isolate aus Menschen (s. 4.1.5), eine Microarray-Hybridisierung durchgeführt, bei der DNA des Drei-Jahres-Isolats MM30 aus Tier 8156 und DNA des Infektionsstamms BO417 kompetitiv gebunden wurden. Die Auswertung der Hybridisierung zeigte keine Unterschiede dieser zwei Stämme hinsichtlich ihrer genetischen Ausstattung. Da davon ausgegangen werden konnte, dass der zweite Infektionsstamm verdrängt worden war, konnten keine neuen Gene aufgenommen worden sein. Ein Verlust (z.B. der *cag*-Pathogenitätsinsel) war ebenfalls nicht nachzuweisen.

Der nach drei Jahren isolierte Stamm besaß die gleiche genetische Ausstattung wie der ursprüngliche Infektionsstamm BO417.

4.3.2 Zweites Infektionsmodell: Superinfektion einer bestehenden *H. pylori*-Infektion mit vier neuen *H. pylori*-Stämmen

Nach Ablauf der ersten drei Jahre und einer erfolgreich etablierten, persistierenden Kolonisierung mit *H. pylori* wurden die Rhesusaffen mit insgesamt vier neuen *H. pylori*-Stämmen superinfiziert. Durch die Superinfektion sollte eine Koinfektion simuliert werden, wie sie auch für den Menschen angenommen wird. Durch die Verwendung mehrerer Stämme sollte herausgefunden werden, ob sich verschiedene

Stämme etablieren können und ob es Unterschiede in der Häufigkeit von genetischem Austausch aus den verschiedenen Stämmen gibt. Der Versuchszeitraum wurde auf ein Jahr beschränkt.

Die neuen Infektionsstämme stammten aus unterschiedlichen Regionen. Der Stamm CC28c wurde in Afrika isoliert, der Stamm RE7006 stammte aus Asien, der Stamm MM1303 wurde am DPZ aus einem natürlich infizierten Rhesusaffen isoliert und der Stamm BO238 war ein klinisches Isolat aus Bochum, das keine *cag*-Pathogenitätsinsel besaß.

4.3.2.1 Reisolation von *H. pylori* aus Magenbiopsiematerial

Die Reisolierung der Stämme wurde analog zur ersten Infektion durchgeführt. Wieder war es nicht möglich, zu jedem Zeitpunkt Isolate aus jedem Tier zu erhalten. Drei Tage nach der Superinfektion konnten nur aus Tier 8156 Stämme isoliert werden, nach einer, zwei und fünf Wochen gelang dies aus allen Tieren. Zu allen späteren Zeitpunkten war eine Anzucht von Isolaten aus Tier 7743 nicht mehr möglich, während eine erneute Isolation von Stämmen aus Tier 9050 nach 12 Monaten gelang. Aus Tier 8156 konnten auch zu allem späteren Zeitpunkten Isolate kultiviert werden (s. Tabelle 20).

4.3.2.2 Analyse der Reisolate mittels RAPD-PCR in den ersten fünf Wochen nach Superinfektion

Die erhaltenen Reisolate wurden wiederum mittels RAPD-PCR (nur Primer AP1254, alle Isolate bis 5 wpi) untersucht. Die vier neuen Infektionsstämme unterschieden sich deutlich in ihrem Bandenmuster untereinander und auch zu den 'alten' Infektionsstämmen BO417 und BO418.

Zu allen Untersuchungszeitpunkten, an denen aus Tier 7743 Isolate kultiviert werden konnten (1-5wpi), entsprach das RAPD-Muster dem des afrikanischen Stammes CC28c. Aus Tier 8156 konnten nach drei Tagen ebenfalls zwei Isolate des CC28c-Stammes reisoliert werden, nach einer Woche zeigte sich in den RAPD-Mustern eine Mischinfektion zwischen den Stämmen CC28c und MM1303. Die Isolate, die nach einer, zwei und fünf Wochen nach Infektion reisoliert werden konnten, zeigten nur noch ein MM1303-RAPD-Muster. Die Isolate aus Tier 9050 zeigen das gleiche Bild wie bei Tier 8156. Nach einer Woche kann eine Mischinfektion der beiden Stämme

konstatiert werden, zu den späteren Zeitpunkten war nur noch der Stamm MM1303 zu isolieren.

4.3.2.3 Sequenzierung des *ureI*-Gens der Reisolat der Superinfektion

Die Analyse der sequenziellen Isolate aus Menschen hat gezeigt, dass das am häufigsten von Rekombination oder Mutation betroffene Gen das *ureI*-Gen war (s. Tabelle 4). Daher wurde dieses Gen von allen Isolaten der Superinfektion und den Infektionsstämmen (alt und neu) sequenziert. Alle Infektionsstämme trugen ein eigenes Allel dieses Gens, so konnten die Reisolat den Infektionsstämmen eindeutig zugeordnet und eventuell auftretende Rekombinationsereignisse festgestellt werden.

In Tier 7743 wurde das Ergebnis der RAPD-PCR bestätigt und alle erhaltenen Sequenzen entsprachen der CC28c-Sequenz. In den Tieren 8156 und 9050 gab es drei Stämme, die eine Woche nach der Infektion isoliert worden waren, die in der RAPD-Analyse ein CC28c-Badenmuster aufwiesen, die Sequenzierung ergab jedoch eine MM1303-spezifische Sequenz. Möglicherweise ist es zwischen den Stämmen zu einer Rekombination gekommen, die aber in späteren Isolaten nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Isolate aller weiteren Untersuchungszeitpunkte (bis 5 wpi) bestätigten in beiden Tieren die RAPD-Analyse. Am letzten Untersuchungszeitpunkt, ein Jahr nach der Superinfektion, konnte erstmals nach 51 Wochen wieder ein CC28c-Isolat aus Tier 8156 isoliert werden. Zudem zeigte sich eine bestehende Mischinfektion mit dem Stamm MM1303. Die beiden Stämme wurden aus unterschiedlichen Regionen des Magens isoliert, CC28c aus dem Kardial-Bereich und MM1303 aus dem Antrum. Im Tier 9050 konnte auch nach einem Jahr nur Reisolat des Stamms MM1303 isoliert werden (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnis der *ureI*-Sequenzierung der Reisolatate nach Superinfektion

Isolationszeitpunkt	Tier-Nr. 7743	Tier-Nr. 8156	Tier-Nr. 9050
3dpi		CC28c (2)	
1wpi	CC28c (1)	(CC28c), MM1303 (2)	(CC28c), MM1303 (2)
2wpi	CC28c (2)	MM1303 (2)	MM1303 (7)
5wpi	CC28c (1)	MM1303 (2)	MM1303 (2)
4mpi		MM1303 (2)	
8mpi		MM1303 (5)	
12mpi		CC28c (1), MM1303 (4)	MM1303 (5)

dpi = Tage nach Infektion, wpi = Wochen nach Infektion, mpi = Monate nach Infektion, (x) = Anzahl der Isolate

Aus vielen Biopsien wurden mehrere Einzelkolonien angezüchtet (sog. 'single colony picks', insgesamt 107 Stämme), diese waren jedoch in beiden Analysen immer miteinander identisch. Es war nicht möglich aus einer Biopsie zwei unterschiedliche Stämme zu isolieren.

Keine der erhaltenen *ureI*-Sequenzen wies eine Rekombination oder Punktmutation auf. Alle Sequenzen waren identisch mit einem der Infektionsstämme. Insgesamt konnte zu keinem Zeitpunkt ein Stamm isoliert werden, der dem RE7006- oder BO238-Stamm entsprach, beide Stämme konnten sich nicht im Magen der Affen etablieren. Auch war von dem im ersten Ansatz etablierten Stamm BO417 kein Isolat zu bekommen, er wurde von den neuen Stämmen verdrängt. Nur zwei Stämme waren in der Lage den Magen zu kolonisieren, der afrikanische Stamm CC28c und der Stamm MM1303, der vormals aus einem anderen Rhesusaffen isoliert werden konnte. In einem Tier (9050) hat sich dieser in einer anfänglichen Mischinfektion durchgesetzt und, wie schon in der ersten Infektionsstudie beobachtet, den zweiten Stamm verdrängt. Der Stamm MM1303 hatte vermutlich den Anpassungsvorteil bereits an den Wirt Rhesusaffe adaptiert zu sein. In Tier 8156 tauchte der Stamm CC28c nach langer Zeit (51 Wochen), in der er nicht kultiviert werden konnte, wieder auf.

Wie schon im ersten Infektionsmodell war eine Reisolierung aus Biopsiematerial nicht zu allen Zeitpunkten möglich. Nach einer anfänglichen Etablierungsphase wurde es schwer Reisolatate nach vier bis acht Monaten zu erhalten. 10 Monate nach der Infektion wuchs die Zahl der Reisolatate jedoch wieder an.

4.4 Untersuchungen an weiteren Vertretern der Gattung *Helicobacter*

4.4.1 Analyse von zehn Genfragmenten aus *Helicobacter nemestrinae*

Aus einem Schweinsaffen (*Macaca nemestrinae*) wurde 1991 ein *Helicobacter*-Stamm isoliert, der als neue Spezies *Helicobacter nemestrinae* definiert wurde (Bronsdon *et al.*, 1991). Das Bakterium war phänotypisch nicht von *H. pylori* zu unterscheiden, zeigte jedoch bei DNA-DNA-Hybridisierungen und im GC-Gehalt deutliche Abweichungen (24% gegenüber 35-41%). Aufgrund der Unterschiede der 16S rDNA konnte dieses Isolat eindeutig als neue Spezies definiert werden (Sly *et al.*, 1993), die den nächsten Verwandten von *H. pylori* darstellte. Es gab jedoch nur ein Isolat, das folglich als Typstamm (ATCC49396) bezeichnet wurde.

Im Rahmen der Analyse der Stammsammlung wurden von diesem Stamm die zehn schon in den vorangegangenen Analysen untersuchten Gene sequenziert (s. Tabelle 2). Für alle Genfragmente konnten mit den *H. pylori*-spezifischen Primern problemlos PCR-Produkte hergestellt werden. Die erhaltenen Sequenzen waren den *H. pylori*-Sequenzen sehr ähnlich. Ein Vergleich mit in der Datenbank abgelegten Sequenzen verschiedener *H. pylori*-Stämme und den Sequenzen der Spezies *Helicobacter mustelae* und *Helicobacter felis* zeigte, dass diese beiden Spezies deutliche Unterschiede in ihrer Sequenz der virulenzassoziierten Flagellin-Gene *flaA* und *flaB* aufwiesen und sich deshalb in einem Verwandtschafts-Stammbaum ('neighbor-joining tree') klar abtrennen ließen (s. Abbildung 25A+B). Die *H. nemestrinae*-Sequenzen dieser Gene reihten sich jedoch bei den *H. pylori*-Sequenzen mit ein, so dass bei diesen Genen ein Spezies-Unterschied nicht festgestellt werden konnte.

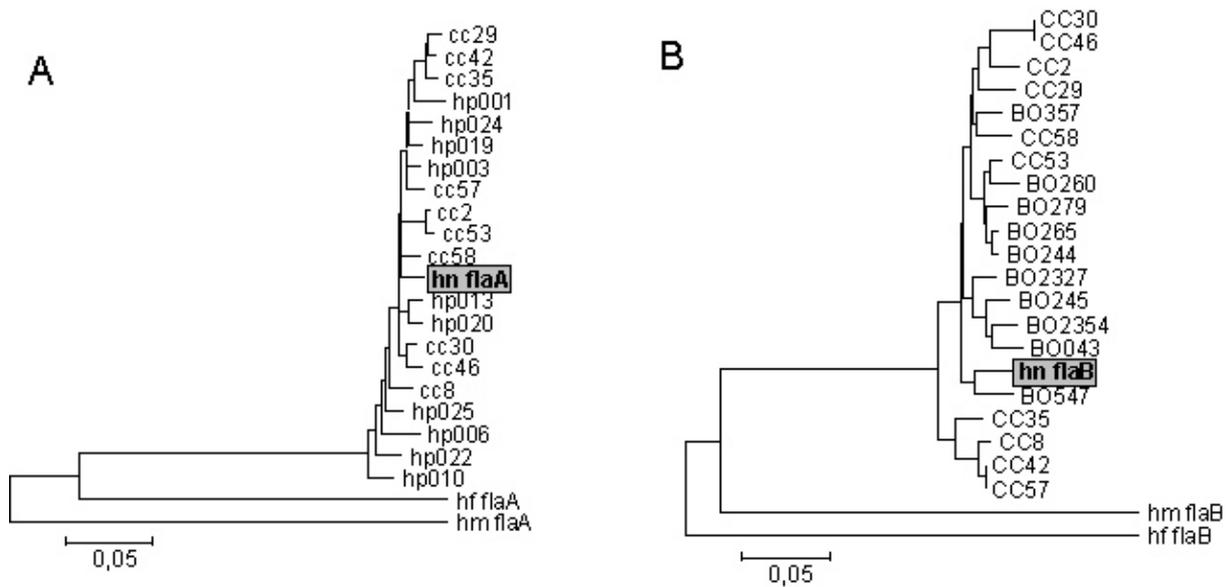


Abbildung 25: Verwandtschafts-Bäume der *H. nemestrinae*-Flagellingene mit anderen *H. pylori*-Stämmen und anderen *Helicobacter* Spezies

Die *H. nemestrinae*-Sequenzen (grau unterlegt) gruppieren sich zusammen mit den *H. pylori*-Sequenzen, während die *H. felis* und *H. mustelae*-Sequenzen einen deutlichen 'Abstand' hatten. **(A) flaA-Sequenzen, (B) flaB-Sequenzen.** hn = *H. nemestrinae*, hf = *H. felis*, hm = *H. mustelae*

Auch die 'housekeeping' Gene zeigten eine zu nahe Verwandtschaft, als das es sich bei *H. nemestrinae* um eine eigene Spezies handeln konnte (s. Abbildung 26). Die Sequenzen der einzelnen Gene stellten eigene Allele dar, wie sie für unterschiedliche *H. pylori*-Stämme üblich sind. Die Allele passten zu keinem bis dahin sequenzierten *H. pylori*-Stamm, so dass eine Kreuzkontamination mit DNA eines anderen Stamms aus der Stammsammlung des Labors ausgeschlossen werden konnte. Der GC-Gehalt der Sequenzen variierte zwischen 38,6% und 49,6% und entsprachen demnach nicht den für *H. nemestrinae* beschriebenen 24%.

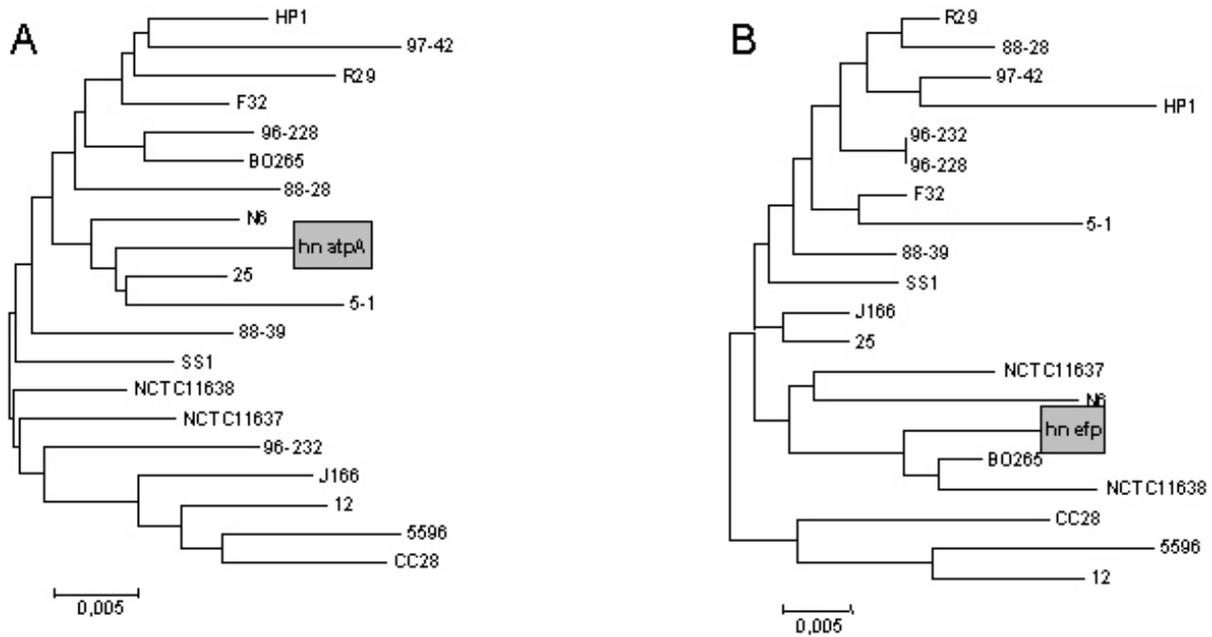


Abbildung 26: Verwandtschafts-Bäume der *H. nemestrinae*-Gene *atpA* und *efp* mit anderen *H. pylori*-Stämmen

Die *H. nemestrinae*-Sequenzen (grau unterlegt) der Gene *atpA* und *efp* zeigten ein hohes Maß an Ähnlichkeit, waren aber zu keinem *H. pylori*-Stamm identisch. **(A) *atpA*-Sequenzen, (B) *efp*-Sequenzen.** hn = *H. nemestrinae*

Der verwendete *H. nemestrinae*-Stamm stammte direkt aus der Stammsammlung der ATCC (American Type Culture Collection). Analysen an einem weiteren Isolat dieses Stammes, das direkt aus der ersten Charge von 1991 stammte, die bei der ATCC-Stammsammlung abgelegt worden war, zeigten dieselben Resultate. Eine partielle 16S rDNA-Sequenzierung ergab diverse Abweichungen zu der Sequenz, die in der Datenbank für *H. nemestrinae* abgelegt war, und war identisch mit der partiellen Sequenz des Stammes MM1303, der ursprünglich aus einem Rhesusaffen isoliert wurde.

Da es nicht möglich war, einen *H. nemestrinae*-Stamm zu erhalten, und auch die in den Stammsammlungen abgelegten Stämme nicht den ursprünglichen Beschreibungen entsprachen, muss der einzig verfügbare Stamm als ein Stamm der Spezies *H. pylori* bezeichnet werden und, solange es keine weiteren Isolate gibt, die den Kriterien dieser Spezies entsprechen, die Speziesbezeichnung *Helicobacter nemestrinae* aufgehoben werden (Suerbaum *et al.*, 2002).

4.4.2 Analyse von zehn Genfragmenten aus *Helicobacter acinonychis*

Eine weitere nahe verwandte Spezies zu *H. pylori* ist *Helicobacter acinonychis*. Diese Spezies wurde zuerst aus den Mägen von Geparden (*Acinonyx jubatus*) isoliert, die

an einer aktiven Gastritis litten (Eaton *et al.*, 1993) und zunächst als *Helicobacter acinonyx* bezeichnet. Die spätere Namenskorrektur wurde aufgrund eines fehlerhaft verwendeten taxonomischen Terminus durchgeführt. In der Folgezeit konnten aus anderen Großkatzen (Tiger, Löwe) weitere Isolate dieser Spezies isoliert werden, u.a. aus mehreren Großkatzen des russischen Staatszirkus und Zootieren aus Regensburg (Schröder *et al.*, 1998; s.), die für die Analysen zur Verfügung standen.

Wie schon für *H. nemestrinae* wurden auch für den *H. acinonychis*-Typstamm (ATCC51101) und von zwei Isolaten aus Zoo-Tigern (T1, T2) die bereits für andere Analysen benutzten zehn Gene sequenziert (s. Tabelle 2). Im Gegensatz zu *H. nemestrinae* konnte mit den *H. pylori*-spezifischen Primern nicht für jedes Gen ein PCR-Produkt amplifiziert werden, bei einigen Genen (*flaB*, *ureI*) waren die Sequenzunterschiede so groß, dass neue Primer entworfen werden mussten. Das *vacA*-Gen war mittels PCR-Amplifikation nicht nachweisbar. Die partielle 16S-Sequenz des Typstamms zeigte einige wenige Doppelpeaks, die auf zwei Kopien des Gens hindeuten, ähnlich wie bei *H. pylori*, mit dem Unterschied, dass sie in *H. acinonychis* nicht identisch waren.

Die Sequenzierung der Gene *flaA*, *mutY*, *ppa* und *yphC* ergaben gleiche Allele für alle drei untersuchten *H. acinonychis*-Stämme, in zwei Genen (*efp*, *trpC*) waren die Tigerstämme untereinander ebenfalls identisch und unterschieden sich vom Typstamm nur durch je einen Basenaustausch. Im Gen *atpA* entsprach die Sequenz des Tigerstamms T2 dem des Typstamms, während sich der Stamm T1 in einer Base unterschied. Das Fragment des *ureI*-Gens weicht in beiden Tigerstämmen von dem Typstamm ab, Stamm T1 trug eine Veränderung und Stamm T2 zwei weitere. Einzig das Gen *flaB* zeigte zwei unterschiedliche Allele, die sich über die gesamte Sequenz ausdehnten (97,5% Homologie). Von diesem Gen wurden auch die Sequenzen einiger Stämme aus dem russischen Staatszirkus (6 Stämme) untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass sich auch diese Stämme auf die zwei zuvor gefundenen Allele beschränkten und sich die Allele in den Isolaten des russ. Staatszirkus in ein Löwen- und ein Tigerallel aufspalten ließ (Allel 1: ATCC51101, T1, Sheena, Sheba, Mac; Allel 2: T2, Bombay A, B, India).

Die Sequenzierungen legten dar, dass die *H. acinonychis*-Stämme trotz ihres sehr unterschiedlichen Ursprungs und unterschiedlicher Großkatzen-Arten, aus denen sie isoliert wurden, untereinander sehr nahe verwandt sind. Möglicherweise besteht kein

vergleichbarer Anpassungsdruck an den Wirt wie es bei *H. pylori* im Menschen zu beobachten ist.

Einzig das virulenzassoziierte Gen *vacA* konnte nicht mit PCR-Methoden amplifiziert werden, daher wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt, die mit einer *H. pylori*-spezifischen *vacA*-Sonde durchgeführt wurde. Die Hybridisierung zeigte eine deutliche Bande in der Positivkontrolle des *H. pylori*-Stamms 26695. Die *H. acinonychis*-Stämme ATCC51101 und die beiden Zoo-Tigerisolate T1 und T2, sowie die Löwen-Isolate aus Sheena, Sheba und Mac zeigten gemeinsam eine wesentlich schwächere Bande als die Positivkontrolle. Diese Bande hybridisierte an einer anderen Stelle an der Blot-Membran, was auf Unterschiede im Restriktionssmuster (*EcoRI*) hinwies. Untersuchungen von Dr. Bodo Linz am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie in Berlin zeigten, dass diese *H. acinonychis*-Stämme ein *vacA*-Pseudogen tragen, das nicht funktional ist. In den Tigerisolaten aus dem russischen Staatszirkus (Bombay A, B und India) hingegen war diese Bande nicht auszumachen (s. Abbildung 27).

Wie schon bei den *flaB*-Sequenzen zeigten sowohl die Tigerisolate als auch die Löwenisolate aus dem Zirkus jeweils ein einheitliches Bild, die Tigerisolate aus dem Zoo, die unterschiedliche *flaB*-Allele besaßen, konnten beide eine *vacA*-spezifische Bande vorweisen.

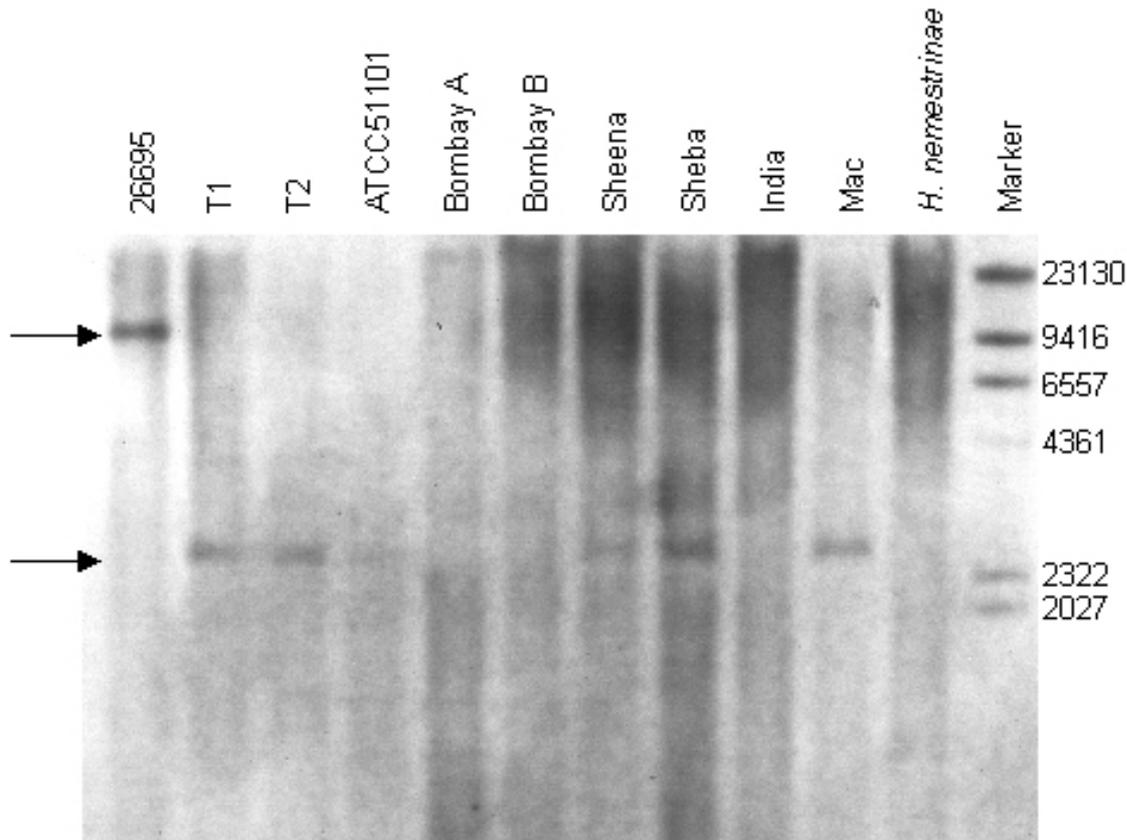


Abbildung 27: Southern-Blot der *H. acinonychis*-Stämme mit einer *H. pylori*-spezifischen *vacA*-Sonde

Neben der Positivkontrolle zeigen auch die Tigerisolate T1 und T2, der Geparden-Typstamm ATCC51101 und die Löwen-Isolate Sheena, Sheba und Mac aus dem russischen Staatszirkus eine schwache Bande (siehe Pfeile). Einzig die Tigerisolate aus dem russischen Staatszirkus Bombay A, B und India zeigten diese Bande nicht.

Die *cag*-Pathogenitätsinsel ist exklusiv für *H. pylori* beschrieben. Da *H. acinonychis* als sehr nah mit *H. pylori* verwandt zu bezeichnen ist, wurde eine empty-site-PCR der *cag*-Pathogenitätsinsel durchgeführt. Diese PCR erzeugte für alle *H. acinonychis*-Stämme ein PCR-Produkt. Daraus konnte gefolgert werden, dass zum einen die *cag*-Pathogenitätsinsel in *H. acinonychis* nicht vorhanden war, und zum anderen, dass die in *H. pylori* die Insel flankierenden Gene (HP0519, HP0549) auch in den *H. acinonychis*-Isolaten direkt nebeneinander lagen.

5 Diskussion

Die Hälfte der menschlichen Bevölkerung ist mit *Helicobacter pylori* infiziert (Suerbaum und Michetti, 2002), wobei es deutliche Unterschiede zwischen Industrieländern und Entwicklungsländern gibt, deren Bevölkerung z.T. bis zu 100% mit *H. pylori* infiziert ist (Frenck und Clemens, 2003). Alle Infizierten entwickeln eine chronische Gastritis. Bei etwa 10-15% des mit *H. pylori* infizierten Bevölkerungsteils führt die Infektion zu unterschiedlichen Folgeerkrankungen (Ulzera, Magenkarzinom). Während des Infektionszeitraums, der mehrere Jahrzehnte umfassen kann, passt sich *H. pylori* an die individuellen Gegebenheiten in seinem Wirt an, indem das Bakterium genetisches Material aus seinem Genom ausschneidet, oder mittels seiner natürlichen Kompetenz von anderen, transient vorhandenen, *H. pylori*-Stämmen aufnimmt und in das Genom integriert. Dieser Vorgang wird als bakterielle Mikroevolution bezeichnet, da er über einen relativ kurzen Zeitraum und in einer definierten Umgebung abläuft.

In dieser Arbeit wurden einige Aspekte der bakteriellen 'Mikroevolution' von *H. pylori* während einer persistierenden Infektion untersucht, die wichtige Aufschlüsse über die Gesamtevolution und die Ausprägung der für dieses Bakterium charakteristischen Alleldiversität liefern.

5.1 Genetische und genomische Veränderungen während einer persistierenden Infektion mit *H. pylori*

In der Regel erfolgt die Infektion mit *H. pylori* bereits in der Kindheit und persistiert fortan (van der Ende *et al.*, 1996). Zumeist erfolgt diese Erstinfektion über die Eltern. Untersuchungen von Familien haben gezeigt, dass die *H. pylori*-Stämme einzelner Familienmitglieder viel näher miteinander verwandt sind als unabhängige Isolate fremder Patienten (Bamford *et al.*, 1993; Suerbaum *et al.*, 1998; Roma-Giannikou *et al.*, 2003). Meistens ist ein Patient mit nur einem Stamm stabil infiziert (Miehlke *et al.*, 1999), in wenigen Ausnahmen können aber auch mehrere Stämme nebeneinander koexistieren (Jorgensen *et al.*, 1996; Kersulyte *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurden die sequenziellen Isolate von 26 Patienten untersucht. Von den Patienten wurden mit einem definierten Zeitintervall *H. pylori*-Stämme isoliert. Die Stammpaare stammten aus zwei unterschiedlichen Kulturkreisen und die Zeitspanne zwischen den Isolaten eines Paares betrug mindestens drei Monate und

höchstens vier Jahre. Um die Häufigkeit, Länge und Art der genetischen Veränderungen zu analysieren wurde zunächst eine Fingerprint-Methode (RAPD-PCR) verwendet, um die Verwandtschaft der Stammpaare zueinander herauszufinden. Im folgenden wurden detailliertere Analysen auf der Ebene der DNA-Sequenz (Sequenzvergleich von 10 ausgesuchten Genfragmenten) und auf der chromosomalen Ebene (Hybridisierung an einen PCR-Produkt-Microarray) durchgeführt, um Rekombinationen im Einzelnen und die Plastizität des Gesamt-Genoms bestimmen zu können.

Kuipers *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass sich die sequenziellen Isolate von 13 Patienten nach sieben bis zehn Jahren in ihrem RAPD-PCR-Muster unterschieden, während elf der Paare die gleichen Allele in ausgewählten Genen trugen. Die RAPD-Analyse der beiden in dieser Arbeit untersuchten Kollektive mit sequenziellen Isolaten (LSU und NQ) zeigte in nur acht von 26 untersuchten Paaren Unterschiede im Bandenmuster, der zeitliche Abstand betrug jedoch nur maximal vier Jahre. Die Sequenzierung von zehn Genen, darunter sieben 'housekeeping'-Gene und drei virulenzassoziierte Gene, offenbarte in der Hälfte der Paare die gleichen Allele innerhalb eines Paares für alle untersuchten Gene. In zehn Paaren gab es insgesamt drei nicht synonyme Punktmutationen und 13 Rekombinationsereignisse. Dabei war festzustellen, dass die virulenzassoziierten Gene nicht häufiger von Rekombinationen betroffen waren als die 'housekeeping'-Gene. Drei Paare unterschieden sich so stark, dass von unabhängigen Stämmen ausgegangen werden muss. Eins dieser nicht verwandten Paare hat über die Zeit mehrere DNA-Fragmente ausgetauscht, da zwei der untersuchten Gene (*mutY*, *ppa*) in beiden Stämmen identisch waren. Alle drei Paare mit nicht verwandten Isolaten stammten aus Kolumbien. Das eher als Entwicklungsland zu bezeichnende Kolumbien weist eine höhere Durchseuchung mit *H. pylori* auf als die USA (LSU-Kollektiv), daher sind die Patienten einem potentiell höheren Infektionsrisiko ausgesetzt, sich mehrfach zu infizieren und zumindest transiente Mehrfachinfektionen zu tragen.

Die durchschnittliche Länge der rekombinierten DNA-Fragmente, der hier untersuchten Stammpaare, betrug nur 417 Basenpaare (Falush *et al.*, 2001). Eine derart kurze DNA-Importlänge konnte in bakteriellen Spezies bislang noch nicht nachgewiesen werden. Die kürzesten bis dahin belegten Rekombinationslängen betrugen 2000 Basenpaare in *Streptococcus pneumoniae* (Guild *et al.*, 1968) und 5100 Basenpaare in *Neisseria meningitidis* (Linz *et al.*, 2000). Importe mit der bei

H. pylori festgestellten Länge waren bislang nur in der eukaryontischen Gattung *Drosophila* beschrieben worden (Betran et al., 1997; Hilliker et al., 1994).

Tabelle 21: Länge der Rekombinationslänge in einigen Bakterien- und Drosophila-Spezies

Species	Mittel [Bp]	Median [Bp]
<i>H. pylori</i>	417	
<i>N. meningitidis</i>		5100
<i>S. pneumoniae</i>	6000	
<i>B. subtilis</i>		10.000
<i>E. coli</i>		14.000
<i>D. subobscura</i>	122	
<i>D. melanogaster</i>	352	

Durch die Berechnungen eines mathematischen Modells (entwickelt von Dr. Daniel Falush am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin) konnte zudem die Rekombinationsfrequenz bestimmt werden. Basierend auf den Sequenzdaten konnte extrapoliert werden, dass *H. pylori* innerhalb von 40-2200 Jahren etwa die Hälfte seines Genoms durch importierte DNA austauscht. Verglichen mit anderen prokaryontischen Spezies ist diese evolutionäre Zeitspanne extrem kurz, *Escherichia coli* bräuchte für einen Austausch des halben Genoms etwa 10-100 Millionen Jahre (Laurence und Ochman, 1997), und bei *Yersinia pestis* konnte in den letzten 1500 Jahren gar keine Rekombination festgestellt werden (Achtman et al., 1999b). Das mathematische Modell berechnete das minimale Alter von *H. pylori* auf 2500 bis 11000 Jahre, vermutlich begleitet *H. pylori* den Menschen jedoch schon wesentlich länger. *H. pylori*-Isolate von unterschiedlichen menschlichen Populationen aus vielen Regionen der Erde legen nahe, dass zum einen die Diversität und zum anderen die kürzerfristige Klonalität von *H. pylori* die menschlichen Völkerbewegungen widerspiegeln kann und das Bakterium den modernen Menschen schon in seiner frühesten Entwicklung besiedelt hat und mit ihm gemeinsam auf 'Weltreise' ging (Falush et al., 2003).

Die Veränderungen im Genom eines etablierten Stamms erzeugen eine Vielzahl von verschiedenen Varianten eines Stamms innerhalb eines Wirtes (Covacci und Rappuoli, 1998), die, sollten die Veränderungen zu einem Anpassungsvorteil führen,

andere Varianten verdrängen. Die Anpassung an den Wirt ist ein fließender Zustand. Durch die Untersuchung von sequenziellen Isolaten des sequenzierten Stamms J99 konnte gezeigt werden, dass sowohl die Ausgangspopulation, aus der J99 isoliert wurde, heterogen war, als auch die Stämme, die sechs Jahre später aus dem selben Patienten isoliert wurden (Israel *et al.*, 2001).

Dies konnte anhand einiger sequenzieller Isolate aus dem kolumbianischen NQ-Stammkollektiv nachvollzogen werden. Die Gesamt-DNA Isolation einer Magenbiopsie zeigte in zwei Fällen ein einheitliches Bild. Die Sequenzen eines Gens, an dem die beiden zeitlich getrennten Isolate eines Patienten auseinander gehalten werden konnten, entsprachen alle dem Allel des später isolierten Stammes. Innerhalb von drei Jahren wurde das Allel des zuerst isolierten Stamms völlig verdrängt, zumindest in der Region in der die Biopsieentnahme erfolgte. In einem weiteren Fall war dieser Prozess noch im Gange, die erhaltenen Allele wichen voneinander ab. Eine erste sehr kurze Rekombination hatte sich, wie schon in den beiden Fällen zuvor, in allen untersuchten Klonen etabliert und ein zweiter, vermutlich jüngerer Import, konnte in nur wenigen Stämmen nachgewiesen werden. Hier war der Selektionsprozess vermutlich noch nicht abgeschlossen. Ob sich die zweite Rekombination durchsetzt oder wieder verschwindet, konnte nicht bestimmt werden.

Im Gegensatz zur Sequenzierung einzelner Gene erlaubte es die Microarray-Technik, alle Gene eines Genoms auf ihre Anwesenheit hin in einem Stamm zu untersuchen. Salama *et al.* (2000) konnten so die starke Diversität in der Genausstattung unabhängiger *H. pylori*-Stämme nachweisen, die sich schon im Vergleich der beiden komplett sequenzierten Stämme gezeigt hatte. Alle untersuchten Stämme wiesen ein eigenes 'Gen-Portfolio' auf, kein Stamm entsprach einem anderen. Die Anzahl der stammspezifischen Gene lag bei 12-18%. Die Microarray-Analysen von mehreren neuen Isolaten des Patienten, aus dem der sequenzierte Stamm J99 gewonnen wurde, zeigten ebenfalls Unterschiede in ihrer Genausstattung (Israel *et al.*, 2001). Neue Isolate, die aus einer Biopsie stammten, die sechs Jahre nach dem ursprünglichen J99-Stamm entnommen worden war, hatten gegenüber dem ursprünglichen J99 mehrere Gene verloren (z.B. einige Gene in der Plastizitätsregion) und sogar einige 26695-spezifische Gene aufgenommen.

Die Microarray-Analyse der sequenziellen Isolate der beiden Kollektive LSU und NQ zeigten ebenfalls Unterschiede zwischen den Stämmen einiger Paare. In einem Paar konnte der Verlust der kompletten *cag*-Pathogenitätsinsel nachgewiesen werden, die an einem bereits beschriebenen 31 Basenpaar-Repeat ausgeschnitten wurde, der in *cag*⁺-Stämmen zweimal und in *cag*⁻-Stämmen nur einmal zu finden ist (Akopyants *et al.*, 1998a). Björkholm *et al.* (2001a) berichten von zwei gleichzeitig isolierten Subklonen aus einem Patienten, die sich in dem Vorhandensein der *cag*-Pathogenitätsinsel unterschieden und bei dem der *cag*⁻-Stamm nur einen der Repeats aufwies.

Anhand des sequenziellen Stammpaars konnte dieser Vorgang erstmals in einem Zeitabstand von drei Jahren *in vivo* nachgewiesen werden. Es konnten keine Hinweise auf eine Rekombination mit einem *cag*⁻-Allel gefunden werden. Durch einen Basenunterschied in den beiden Repeats des *cag*⁺-Stamms konnte bestimmt werden, dass der Repeat im Gen HP0549 erhalten geblieben war. Dies wurde von Björkholm *et al.* (2001a) nicht untersucht. Bei einem weiteren Paar wurde nur ein Teil der *cag*-Pathogenitätsinsel ausgeschnitten. Wie auch im *H. pylori*-Stamm HP1 (Salama *et al.*, 2000) fehlten die Gene HP0528-0548 im später isolierten Stamm. Wie schon von Kersulyte *et al.* (2000) beschrieben, war der 3'-Bereich des früheren Stammes, der die komplette *cag*-Pathogenitätsinsel trug, durch IS-Elemente (IS605) von dem nächsten Gen im Genom getrennt. Dem späteren Stamm fehlten große Teile dieser IS-Elemente, insgesamt konnten bei einer Southern Blot-Hybridisierung keine IS605-Homologe mehr in dem späteren Stamm nachgewiesen werden. Die 5'-Region des Ausschnitts lag im Gen HP0527, das sich durch lange wiederkehrende Basenabfolgen auszeichnet (Rohde *et al.*, 2003). Da zumindest am 3'-Ende keine Rekombination feststellbar war, bleibt der Mechanismus des Verlustes des genetischen Materials offen.

H. pylori-Stämme verfügen über eine große Anzahl von Restriktions-Modifikationssystemen vom Typ II (Vitkute *et al.*, 2001), deren Zusammensetzung und Funktion bei verschiedenen Stämmen eine hohe Diversität aufweisen kann (Xu *et al.*, 2000). Viele dieser RM-Systeme besitzen phasenvariable Sequenzen, die dem Bakterium ein schnelles An- und Ausschalten der Gene erlauben. Interessanterweise sind die meisten RM-Systeme, die in beiden sequenzierten *H. pylori*-Stämmen vorhanden sind, ausgeschaltet (Lin *et al.*, 2001).

Bei den sequenziellen Isolaten ist in einem Fall das RM-System *HpyIVA* (HP1351/1352) aufgenommen worden, das im früher isolierten Stamm des Paares nur als Pseudogen vorhanden war und einen offenen Leserahmen unbekannter Funktion enthielt. Der Einbau des RM-Systems ist auf ein Rekombinationsereignis zurückzuführen und wurde nicht wie von Takata *et al.* (2002) beschrieben durch beiderseits flankierende Repeats hervorgerufen. Der Leserahmen im früher isolierten Stamm enthielt keine bekannte funktionelle Domäne, so dass eine Funktion dieses vermutlichen offenen Leserahmens unbekannt bleibt.

Ein weiterer hypothetischer offener Leserahmen, der im Stammpaar NQ366/1790 gefunden wurde, zeigte gar keine Homologien zu bekannten Proteinen. Der GC-Gehalt lag bei 41% und könnte daher ein *H. pylori*-stammspezifisches Gen darstellen, das nicht in den beiden sequenzierten Stämmen 26695 und J99 zu finden ist. Ein Teil dieses Gens wurde bereits von Akopyants *et al.* (1998b) durch eine genomische Subtraktion in einem weiteren *H. pylori*-Stamm (J166) gefunden. Das dort erhaltene Fragment enthielt allerdings nicht den gesamten Leserahmen und wurde folglich nicht als solcher erkannt. Das Vorhandensein des möglichen offenen Leserahmens in zwei unabhängigen Stämmen unterstützt die Annahme, dass es sich um ein bis dahin unbekanntes, *H. pylori*-spezifisches Gen handeln könnte.

Mehrere weitere Aufnahmen und Verluste von Genen konnten bestimmt werden, die alle durch Rekombination entstanden waren. Die Rekombinationen, die von ausreichend identischer Sequenz in beiden Stämmen eines Paares flankiert waren, um ihre Länge zu bestimmen, waren ebenso kurz, wie schon in den zehn zuvor sequenzierten Genfragmenten. Es machte keinen Unterschied, ob eine Rekombination nur zu einem Austausch eines Allels führte, oder zur Aufnahme bzw. eines Verlusts von genetischen Materials beitrug. Die kürzeste Distanz zwischen dem Anfang eines Rekombinationsereignisses und dem Beginn eines Ausschnitts von DNA betrug lediglich 25 Basenpaare.

Die Microarray-Analyse zeigte eine Korrelation zwischen der Aufnahme bzw. dem Verlust von genetischem Material und den Rekombinationsereignissen in den zehn sequenzierten Genfragmenten. Alle LSU-Stämme, bei denen Rekombinationen festgestellt wurden, hatten auch ihre genetische Ausstattung verändert. Die Paare, die sich nur in einem einzelnen Nukleotidpolymorphismus unterschieden, hatten eine unveränderte Genausstattung. Einzig das Paar LSU1016 hatte ein Gen

aufgenommen, obwohl in der Sequenzanalyse keine Veränderungen festgestellt werden konnten. Bei den NQ-Stämmen ist diese Korrelation nicht zu finden. Zwar sind die Stammpaare, die keine Unterschiede in der Sequenzierung der zehn Genfragmente aufwiesen, auch in der Microarray-Analyse unauffällig, aber die genetische Ausstattung des Stammpaars NQ352/1701 war ebenfalls unverändert, obwohl die Hälfte der untersuchten Genfragmente Rekombinationsereignisse aufwiesen.

Dies zeigt, dass Rekombinationen nicht nur die Ursache für die hohe Alleldiversität sein können, sondern auch das hohe Maß an Gendiversität hervorrufen können. Die festgestellten Rekombinationen in den Sequenzen ausgewählter Gene waren alle auf homologe Rekombination mit anderen *H. pylori*-Allelen zurückzuführen.

Dennoch zeigten die Microarray-Analysen, dass sich die Genausstattungen der isogenen Stammpaare untereinander wesentlich weniger stark unterschieden, als dies bei der hohen Rekombinationsfrequenz zu vermuten gewesen wäre. Ein transient kolonisierender Stamm, der dem etablierten Stamm als Donor für neues genetisches Material dienen kann, unterscheidet sich in seiner genetischen Ausstattung in durchschnittlich 12-18% seiner Gene. Die meisten Rekombinationen betreffen somit Gene, die in beiden Stämmen vorhanden sind. Durch die sehr kurzen Rekombinationslängen erstreckt sich ein DNA-Import häufig nicht über mehrere Gene. Daher werden unbekannte Gene aus dem Donor-Stamm möglicherweise nicht oder mit nur einer geringen Frequenz rekombiniert, da der etablierte Stamm keine homologen Bereiche zur Rekombination besitzt.

5.2 DNA-Import und Rekombination in *H. pylori*, untersucht anhand eines neuen '*in vitro*'-Transformationsmodells

Die in den Analysen der sequenziellen Isolate gefundenen Rekombinationen waren außerordentlich kurz und spiegelten die hohe Frequenz des genetischen Austauschs wieder (Falush *et al.*, 2001). Durch die Etablierung eines *in vitro*-Modells konnten die Auswirkungen verschiedener Faktoren auf die Rekombination genetischen Materials untersucht werden.

In vielen natürlich kompetenten Spezies gibt es sog. Aufnahmesequenzen in der genomischen DNA-Sequenz, die es dem Bakterium ermöglichen, schon vor dem Transport in die Zelle zwischen fremder und spezieeigener DNA zu unterscheiden (Smith *et al.*, 1999). Derartige Sequenzen konnten in *H. pylori* jedoch nicht gefunden

werden (Saunders *et al.*, 1999). Dies könnte ein Grund für die ungewöhnlich hohe Anzahl von Restriktions-Modifikations-Systemen in *H. pylori* sein. Die RM-Systeme dienen zum Schutz des Genoms vor ungewolltem Einbau fremder DNA (Aras *et al.*, 2002). Ando *et al.* (2000) beschreiben eine durch RM-Systeme hervorgerufene Transformations-Barriere gegenüber Plasmid-DNA aus *E. coli* in *H. pylori*. Heuermann und Haas (1998) zeigten, dass auch *H. pylori*-spezifische Plasmide unterschiedliche Transformationseffizienzen aufwiesen, die auf die Methylierung der DNA zurückzuführen war. Die Transformation mit genomischer DNA schien aber dieser Barriere nicht zu unterliegen (Israel *et al.*, 2000). Wird die Plasmid-DNA jedoch mit den Methylasen des *H. pylori*-Rezipientenstamms stammspezifisch methyliert, kann diese Barriere ebenfalls überwunden werden (Donahue *et al.*, 2000).

5.2.1 *In vitro*-Transformation von Wildtyp-Stämmen

Die Analysen des in dieser Arbeit neu entwickelten *in vitro*-Transformationsmodells wurden sowohl mit genomischer DNA als auch mit einem PCR-Produkt durchgeführt. Die beiden Rezipienten-Stämme J99 und 26695 zeigten eine vergleichbar hohe Transformationsrate, wenn sie mit genomischer DNA des europäischen Stamms N6 oder mit rezipienten-eigener DNA transformiert wurden, die einen Resistenzmarker trug. Dies bestätigte sich bei zwei unterschiedlichen Antibiotikaresistenzmarkern (Rifampicin, Streptomycin). Die Transformationsraten waren dabei mit den bei Plasmiden beschriebenen Transformationsraten vergleichbar (Ando *et al.*, 2000). Wurden die Ausgangsstämme jedoch mit DNA aus asiatischen Stämmen transformiert, sank die Transformationsrate um den Faktor 100. Der Stamm 26695 konnte gar nicht mehr transformiert werden. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass es doch eine Transformationsbarriere bei einer Transformation mit genomischer DNA gibt und hierbei die Stämme aus dem asiatischen Raum Besonderheiten aufwiesen. Eine Transformation mit einem PCR-Produkt, das aus einem dieser asiatischen Stämme amplifiziert wurde, konnte diese Barriere wieder aufheben. Das PCR-Produkt bestand zu 100% aus 'Zielgen-DNA', während dieses 'Ziel'-Gen gerade 1% der genomischen DNA ausmachte. Die eingesetzte Konzentration des PCR-Produkts (10fach erhöht gegenüber genomischer DNA) sollte nicht für die Überwindung der Transformationsbarriere verantwortlich gemacht werden können, da die Transformationsrate um das 100fache anstieg und mit der Rate aus dem europäischen Stamm N6 vergleichbar war. Diese durch PCR generierte DNA ist im Gegensatz zur genomischen DNA nicht methyliert und sollte

daher eher durch die Restriktionsenzyme der Rezipientenstämmen abgebaut werden. Da die Methylierung der einzige Unterschied zwischen dem PCR-Produkt und der genomischen DNA darstellte, spielt dieser Faktor bei der DNA-Aufnahme vermutlich eine wichtige Rolle. Die Homologien der Basensequenz der resistenzverleihenden Gene der einzelnen Donor-Stämme zu den Rezipientenstämmen unterscheiden sich nicht (s. Tabelle 13), so dass dieser Faktor nicht für die niedrigere Effizienz der Transformation der Rezipientenstämmen mit genomischer DNA aus asiatischen Stämmen verantwortlich gemacht werden konnte. Das Methylierungsmuster der asiatischen Stämme ist nicht bekannt, scheint sich jedoch von den europäischen und afrikanischen Stämmen so stark zu unterscheiden, dass es zur Ausbildung dieser Barriere kam.

Die Länge der transformierten und in das Genom eingebauten Donor-DNA wurde durch Sequenzierung der resistenzverleihenden Gene bestimmt. Da sowohl die Donor- als auch die Rezipientensequenz bekannt war und sich die Allele der Stämme unterschieden, konnten die Größen der importierten Fragmente genau bestimmt werden. Die durchschnittliche Größe der importierten DNA war dabei vergleichbar mit den in den vorangegangenen Analysen festgestellten kurzen Importlängen (Falush *et al.*, 2002). Somit konnten die *in vivo* gefundenen Resultate bei sequentiellen Isolaten mit dem neu entwickelten *in vitro*-Transformationsmodell bestätigt werden. In den sequenzierten Fragmenten konnte der Import von mehreren kleinen DNA-Fragmenten bestimmt werden, die z.T. sehr dicht beieinander lagen und nicht immer für die Resistenzausbildung verantwortlich waren. Die homologen flankierenden Bereiche waren außerordentlich kurz, teilweise trennten die Importe nur wenige Basen voneinander. Möglicherweise reichte die Homologie innerhalb des importierten Fragments aus, um die Rekombination zu veranlassen.

Eine wichtige Rolle schien auch die Qualität der genomischen DNA zu spielen. Ein Experiment mit niedermolekularer genomischer DNA führte zum verstärkten Einbau kleinerer Fragmente, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Transformationseffizienz.

5.2.2 *In vitro*-Transformation mit Einzelstrang-DNA

Der Mechanismus der DNA-Bindung an die Bakterienoberfläche und der Transport in die *H. pylori*-Zelle konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. Es konnten verschiedene Proteine eines Typ IV-Transporters gefunden werden, die durch Gene kodiert werden, die außerhalb der *cag*-Pathogenitätsinsel liegen. Typ IV-Transporter

transportieren in vielen Bakterien Effektormoleküle aus der Zelle heraus (Christie und Vogel, 2000; Burns, 2003). Die gefundenen Gene deuten auf eine Ähnlichkeit mit dem DNA-translozierenden Transporter von *Agrobacterium tumefaciens* hin (Hofreuter *et al.*, 2001), der jedoch dort die DNA aus der Zelle heraus- und nicht hineintransportiert. Zudem konnte in *H. pylori* noch kein Protein bestimmt werden, das DNA an der Außenseite des Bakteriums bindet, um sie dann über die Membran in die Zelle zu transportieren, wie beispielsweise das *comE*-Gen in *Neisseria gonorrhoeae* (Hahn *et al.*, 1993; Chen und Gotschlich, 2001) oder in *Bacillus subtilis* (Inamine und Dubnau, 1995). Der vorgeschlagene Aufnahmemechanismus würde in Anlehnung an den *A. tumefaciens*-Mechanismus nur einen DNA-Strang durch die Membran transportieren (Smeets und Kusters, 2002). Die importierte DNA läge innerhalb der Zelle als Einzelstrang vor und die in großer Zahl vorhandenen Restriktionsenzyme könnten die einzelsträngige, aufgenommene DNA nicht angreifen.

Untersuchungen an *Pseudomonas stutzeri* zeigten, dass ein DNA-Transporter, der doppelsträngige DNA bindet, aber nur einen Strang durch die Membran schleust, auch Einzelstrang-DNA binden und transportieren kann (Meier *et al.*, 2002).

Der Einsatz von einzelsträngiger DNA in dem *in vitro*-Transformationsmodell führte zu keiner Transformation. Dies kann zum einen mit der Instabilität der Einzelstrang-DNA und ein damit verbundener Abbau der DNA im Flüssigmedium erklärt werden. Zum anderen ist der Mechanismus den *H. pylori* zur DNA-Aufnahme benutzt möglicherweise nicht in der Lage, einzelsträngige DNA zu binden und zu transportieren.

5.2.3 *In vitro*-Transformation von *H. pylori*-'knock out' Mutanten im NER-Reparatursystem

H. pylori ist verglichen mit *E. coli* nur rudimentär mit Systemen zur DNA-Reparatur und Rekombination ausgestattet. Es gibt weder ein SOS-Reparatur-System, noch ein 'Mismatch'-Reparatur-System (Tomb *et al.*, 1997). Das vorhandene *mutS*-Gen in *H. pylori* ist einer nicht an der 'Methyl-directed Mismatch Repair' beteiligten Unterfamilie zugeordnet und hat keinen Einfluss auf die Mutationsfrequenz (Björkholm *et al.*, 2001b). Einzig das 'Nucleotide-Excision-Repair'-System (NER), bestehend aus den Genen *uvrABCD*, und der Rekombination-Reparatur-Mechanismus, bestehend aus der Rekombinase RecA, konnte gefunden werden (Wang *et al.*, 1999). Mutanten, bei

denen das *recA*-Gen inaktiviert wurde, zeigten eine erhöhte Mutationsrate und waren sensitiver gegenüber DNA-schädigenden Agenzien (Thompson und Blaser, 1995).

Die importierten DNA-Fragmente in dem in dieser Arbeit neu entwickelten *in vitro*-Transformationsmodell führten zu einem Allelmosaik aus den Allelen des Rezipienten und des Donors. Um der Hypothese nachzugehen, ob eventuell längere DNA-Stränge in die Zelle transportiert und in das Genom rekombiniert wurden, aus denen anschließend Teilbereiche durch das NER-System wieder ausgeschnitten wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit *H. pylori*-'knock out'-Mutanten der Gene *uvrA* (DNA-bindendes Protein) und *uvrD* (Helicase II) hergestellt. Das NER-System erkennt Basenfehlpaarungen wie sie bei unterschiedlichen Allelen vorkommen und schneidet diese aus dem Genom aus und ergänzt sie durch die Polymerase-I-Aktivität wieder. UvrA erkennt diese Fehlpaarungen und bildet dabei den initialen DNA-bindenden Komplex. Ohne UvrA kann dieser nicht gebildet werden und der gesamte Mechanismus funktioniert nicht. UvrD ist eine Helicase, der mehrere Funktionen zugeschrieben werden. Einerseits kontrolliert sie die Rekombinase RecA und verhindert, dass Fragmente mit zu geringer Homologie rekombiniert werden (Petranovic *et al.*, 2001), andererseits entwindet sie die DNA, löst den *uvrBC*₂-Komplex von der DNA und vermittelt die Bindung der Polymerase I (van Houten, 1990). Das Ausgeschalten des *uvrD*-Gens in *E. coli* führt zu einem hyperrekombinierenden Phänotyp (Arthur und Lloyd, 1980), der NER-Mechanismus funktioniert, wenngleich mit niedrigerer Effizienz (Crowley und Hanawald, 2001).

Die Funktionalität der Gene *uvrA* und *uvrD* ist in *H. pylori* noch nicht experimentell bewiesen worden. In *E. coli* führt eine Deletion des *uvrA*-Gens zu einer erhöhten UV-Sensibilität (Kiyosawa *et al.*, 2001).

Die beiden *H. pylori*-Mutanten des NER-Systems (*uvrA*⁻ und *uvrD*⁻) zeigten eine stark verminderte Transformationseffizienz, die um das 100fache hinter den Wildtyp-Effizienzen zurückblieb. Die Länge der importierten und eingebauten Donor-DNA-Fragmente zeigte keinen Unterschied zu den Importlängen, die zuvor bei den beiden Wildtyp-Stämmen festgestellt werden konnten. Die ursprüngliche Hypothese bestätigte sich damit nicht. Das NER-System ist insofern nicht an der Rekombination beteiligt, dass es 'Lücken' in längere, bereits rekombinierte Fragmente schneidet, das schließlich zu den beobachteten Genotyp mit Allelmosaiken führt. Jedoch ist eine Beteiligung an einer anderen Stelle in dem ganzen Prozess der Rekombination nicht

abzustreiten, da sich sowohl die *uvrA*⁻- als auch die *uvrD*⁻-Mutante wesentlich schlechter transformieren ließ. Der in *E. coli* beobachtete Phänotyp der Hyper-Rekombination einer *uvrD*⁻-Mutante konnte in *H. pylori* nicht bestätigt werden. Beide Mutanten wiesen die gleiche Transformationsbarriere gegenüber den asiatischen Stämmen auf, wie sie schon bei den entsprechenden Wildtyp-Stämmen beobachtet werden konnten.

Die in *E. coli* bereits beschriebene erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht konnte hingegen bestätigt werden. Die *uvrA*⁻-Mutante des Stammes J99 konnte bei einer sublethalen Dosis die entstandenen Schäden nicht beheben und zeigte eine etwa 50fach erhöhte Mutationsrate gegenüber dem Wildtyp.

5.3 Experimentelle *H. pylori*-Infektion und Etablierung eines neuen Tiermodells in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

Tiermodelle leisten einen wichtigen Beitrag in der Erforschung der Pathogenese von *H. pylori*. In verschiedenen Tiermodellen werden die Interaktionen des Bakteriums mit dem Wirt und die jeweiligen durch die Kolonisierung hervorgerufenen Veränderungen sowohl seitens des Wirtes, als auch seitens des Bakteriums studiert. Die meisten Tiermodelle nutzen Mäuse oder Wüstenrennmäuse ('mongolian gerbils'), die zwar mit einer großen Anzahl von Tieren durchgeführt werden können, jedoch den Nachteil besitzen, dem Krankheitsbild des Menschen nicht zu entsprechen und keine Longitudinalstudien zu ermöglichen (Lee *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 1998).

Die experimentelle *H. pylori*-Infektion der Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), erstmals von Euler *et al.* 1990 beschrieben, eignet sich als Tiermodell, da die Rhesusaffen einen natürlichen Wirt für *H. pylori* darstellen. Dies begünstigt die Infektion mit humanen, pathogenen Stämmen. Rhesusaffen stellen ein sog. 'close-to-human'-Tiermodell dar, da sie in vielerlei Hinsicht der menschlichen Physiologie ähneln. Die Affen entwickeln eine Gastritis, die der humanen Gastritis sehr ähnlich ist und die Anatomie des Gastrointestinaltrakts ist gleich beschaffen (Natelson *et al.*, 1977; Dubois, 1999). Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist, dass durch die lange Lebensspanne der Makaken (ca. 35 Jahre) Longitudinalstudien ermöglicht werden. Den Tieren kann, wie beim Menschen, Biopsiematerial entnommen werden, ohne ihnen größeren Schaden zuzuführen. Ein Nachteil des Modells ist jedoch, dass durch die hohen Anschaffungs- und Unterhaltskosten Versuche nur mit relativ kleinen Tierzahlen durchgeführt werden können im Vergleich zu Nagetiermodellen. Das in

Zusammenarbeit mit dem Deutschen Primatenzentrum entwickelte Tiermodell umfasst nur drei experimentell infizierte Tiere. Dennoch können die Ergebnisse leichter mit der humanen Situation in Relation gesetzt werden und liefern wertvolle Informationen über die Krankheitsentstehung und Entwicklung der Infektion.

In dem hier etablierten experimentellen Rhesusaffen-Modell für *H. pylori*-Infektionen konnte, im Gegensatz zu früheren Berichten (Dubois *et al.*, 1996), erstmals gezeigt werden, dass eine Infektion mit humanpathogenen *H. pylori*-Stämmen über einen Zeitraum von drei Jahren persistieren kann und die Affen über den ganzen Zeitraum Krankheitssymptome einer chronisch aktiven Gastritis entwickeln (Mätz-Rensing *et al.*, 2001). Durch die gleichzeitige Infektion mit zwei klinischen *H. pylori*-Stämmen in einem ersten experimentellen Ansatz konnten Untersuchungen über die Kolonisierung und Co-Existenz der beiden Stämme zeigen, dass nur ein Stamm in der Lage war, die Affen persistent zu kolonisieren. Der zweite Stamm war durch die Mensch-Tier-Passage entweder nicht ausreichend an den Wirt angepasst oder wurde von dem anderen Stamm zu schnell überwachsen und verdrängt. Es konnte kein DNA-Transfer zwischen den beiden Infektionsstämmen innerhalb des dreijährigen Untersuchungszeitraums festgestellt werden. Die Zeitspanne der Co-Kolonisierung von zumindest zwei Wochen war zu kurz, um sich in durch die durchgeführten Analysen (RAPD-Analyse, Sequenzierung von ca. 0,3% des Genoms, Microarray-Analyse) feststellbaren Veränderungen niederzuschlagen. Die Affen waren während der gesamten experimentellen Phase mit sog. 'large gastrointestinal spiral organisms' (LGIS) infiziert, deren elektronenmikroskopische Morphologie an *Helicobacter heilmannii* erinnerte (s. Abbildung 28, links). Es war nicht möglich diese Organismen zu kultivieren. Auch konnte in keinem der Tiere ein Interspezies-DNA-Transfer aus diesen LGIS-Organismen festgestellt werden. Möglicherweise gab es keine ausreichenden Homologien, die eine Transformation zu Stande kommen ließen.



Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Bilder von *Helicobacter*-Isolaten aus Rhesusaffen

Links: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (8.000fache Vergrößerung) eines Gewebeschnitts mit LGIS-Organismen. **Mitte:** Rhesusmakaken (*Macaca mulatta*). **Rechts:** Transmissionselektronische Aufnahme (40.000fache Vergrößerung) einer Reinkultur eines reisolierten *H. pylori*-Stamms nach der experimentellen Infektion (aus Mätz-Rensing *et al.*, 2001).

Die Superinfektion der Rhesusaffen mit vier weiteren *H. pylori*-Stämmen sollte eine Koinfektion simulieren, die auch im Menschen zu transienten Koinfektionen führt, die dem etablierten Stamm dann als DNA-Donoren dienen. Die Superinfektion führte jedoch in dem Tiermodell zu einem Verdrängen des im ersten experimentellen Ansatzes etablierten Stamms. Der über drei Jahre hinweg persistierende Stamm konnte zu keinem Zeitpunkt nach der Superinfektion mehr isoliert werden. Zwei der neuen Stämme konnten sich in den Affen durchsetzen, in zwei der drei Makaken nur einer der beiden, und in dem dritten konnten auch ein Jahr nach der Superinfektion beide Stämme nachgewiesen werden. Unter den kolonisierenden Stämmen befand sich auch ein *H. pylori*-Isolat, das ursprünglich aus einem natürlich infizierten Rhesusaffen stammte und offenbar einen Adaptationsvorteil gegenüber den anderen Stämmen besaß. Ein asiatischer und ein *cag*⁻-Stamm wurden selbst kurzfristig (drei Tage nach Infektion) mit keiner der verwendeten Nachweismethoden gefunden. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Stämme den Affenmagen nicht kolonisieren konnten. Auch in diesem zweiten Infektionsmodell war eine Interspezies-Rekombination mit den LGIS nicht nachzuweisen.

In beiden Versuchsansätzen, dem ersten, der eine stabile *H. pylori*-Infektion etablierte und dem zweiten, der Superinfektion mit vier weiteren *H. pylori*-Stämmen, konnten die gleichen Abläufe der Besiedlung mit *H. pylori* und des Krankheitsverlaufs beobachtet werden. Nach einer anfänglichen dichten Besiedlung und einer beginnenden Gastritis nahm die Zahl der Bakterien nach wenigen Monaten stark ab. Eine Rekultivierung der Infektionsstämme war in dieser Zeit nicht möglich. Die

entzündliche Reaktion der Magenschleimhaut dauerte jedoch in allen Tieren über die gesamte Zeit an. Nach dieser Periode, etwa zehn Monate nach Infektion, wuchs die Zahl der aus den Biopsien rekultivierten Isolate wieder an.

Diese frühe Phase der Infektion könnte auch im Menschen eine wichtige Rolle in der chronischen Besiedlung und der Anpassung des *H. pylori*-Stamms an den Wirt darstellen.

5.4 Untersuchungen an weiteren Vertretern des Genus *Helicobacter*:

H. nemestrinae* und *H. acinonychis

Helicobacter nemestrinae wurde 1991 aus einem Schweinsaffen (*Macaca nemestrinae*) isoliert und aufgrund von DNA-DNA Hybridisierungen, des GC-Gehaltes des Genoms und der 16S rDNA-Sequenz als neue Spezies definiert (Bronsdon *et al.*, 1991; Sly *et al.*, 1993). Es konnten keine weiteren Isolate dieser Spezies aus Schweinsaffen oder anderen nicht-humanen Affen isoliert werden, der beschriebene Typstamm blieb der einzige.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen an zehn Genfragmenten und der Bestimmung der 16S rDNA-Sequenz des bei der American True Type Collection (ATCC) abgelegten Stammes *H. nemestrinae* ergaben, dass der als *H. nemestrinae* bezeichnete Stamm ein Isolat der Spezies *H. pylori* darstellt. Da es keinen weiteren Stamm gibt, der den Spezifikationen des von Bronsdon *et al.* (1991) beschriebenen Stamms entspricht, kann konstatiert werden, dass es die Spezies *H. nemestrinae* nicht gibt (Suerbaum *et al.*, 2002).

Der als *H. nemestrinae* bezeichnete *H. pylori*-Stamm war in seiner 16S rDNA-Sequenz am nächsten mit einem *H. pylori*-Isolat aus einem Rhesusaffen verwandt (Drazek *et al.*, 1994) und die zehn untersuchten Genfragmente waren am nächsten mit einem Isolat aus einem natürlich infizierten Rhesusaffen (isoliert am Deutschen Primatenzentrum) verwandt. Mehrere Genfragmente waren identisch (vier Gene), oder unterschieden sich nur durch Punktmutationen (drei Gene) von dem Rhesusaffenstamm. Dieses hohe Maß an Verwandtschaft kann auch bei anderen *H. pylori*-Rhesusaffenisolaten beobachtet werden. Alle untersuchten Isolate aus Rhesusaffen sind bemerkenswert klonal. Offenbar gibt es in den Makaken nicht den gleichen Selektionsdruck zur Veränderung wie er bei humanen Isolaten zum Ausdruck kommt. Die Affen haben möglicherweise keinen Kontakt zu einem

größeren Spektrum an verschiedenen *H. pylori*-Stämmen in ihrer Umwelt, die zu transienten Koinfektionen und der damit verbundenen Allelvielfalt führen.

Um die Benennung neuer Spezies des Genus *Helicobacter* besser abzusichern, wurde ein minimaler Standard festgelegt (Dewhirst *et al.*, 2000b). Dieser Standard trägt der hohen Variabilität innerhalb der Spezies *Helicobacter pylori* Rechnung und verlangt beispielsweise, dass mindestens fünf Stämme vorhanden sein müssen, die zu der neuen Spezies passen. Die alleinige Bestimmung der 16S rDNA-Sequenz reicht im Genus *Helicobacter* für die Identifikation auf Speziesebene nicht aus (Vandamme *et al.*, 2000).

Nachdem es keinen Stamm gibt, der als *H. nemestrinae* bezeichnet werden kann, ist *Helicobacter acinonychis* die Spezies, die den 'nächsten Verwandten' von *H. pylori* darstellt. *H. acinonychis* wurde 1991 zuerst aus einem Geparden isoliert (Eaton *et al.*, 1991) und in der Folgezeit auch aus anderen Großkatzen wie Tigern und Löwen (Schröder *et al.*, 1998). Die infizierten Großkatzen entwickeln eine Gastritis, die vergleichbar mit der in Menschen ist (Eaton *et al.*, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass *H. acinonychis* eine natürliche Kompetenz zur DNA-Aufnahme besitzt und es keine Interspeziesbarriere zwischen *H. acinonychis* und *H. pylori* gibt (Pot *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, ähnlich wie die *H. pylori*-Isolate aus natürlich infizierten Rhesusaffen, einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad zwischen den einzelnen *H. acinonychis*-Isolaten. Bei zehn sequenzierten Genfragmenten konnten nur in einem der untersuchten Genorte, dem Flagellin *flaB*, zwei unterschiedliche Allele festgestellt werden. Alle anderen Genorte waren identisch oder trugen Punktmutationen. Das bis dahin als exklusiv für *H. pylori* bezeichnete vakuolisierende Zytotoxin-Gen *vacA* konnte in einigen *H. acinonychis*-Stämmen durch Southern Blot-Hybridisierung nachgewiesen werden. Die Sequenzierungen (durchgeführt am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie in Berlin) zeigten jedoch, dass es sich um ein nicht funktionstüchtiges Holoenzym handelte. Die Verteilung des Gens war kongruent mit der Verteilung der unterschiedlichen *flaB*-Allele. Alle Stämme, die ein *vacA*-Gen besaßen, trugen das gleiche *flaB*-Allel.

6 Literatur

Achtman M., Azuma T., Berg D. E., Ito Y., Morelli G., Pan Z.-J., Suerbaum S., Thompson S., van der Ende A., van Doorn L. J. (1999a) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* 32:459–470

Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. (1999b). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 96:14043–14048

Akopyants N.S., Clifton S.W., Kersulyte D., Crabtree J.E., Youree B.E., Reece C.A., Bukanov N.O., Drazek E.S., Roe B.A., Berg D.E. (1998a). Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 28:37-53

Akopyants N.S., Fradkov A., Diatchenko L., Hill J.E., Siebert P.D., Lukyanov S.A., Sverdlov E.D., Berg D.E. (1998b). PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 95:13108-13113

Alm R.A., Ling L.L., Moir D.T., King B.L., Brown E.D., Doig P.C., Smith D.R., Noonan B., Guild B.C., deJonge B.L., Carmel G., Tummino P.J., Caruso A., Uria-Nickelsen M., Mills D.M., Ives C., Gibson R., Merberg D., Mills S.D., Jiang Q., Taylor D.E., Vovis G.F., Trust T.J. (1999). Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397:176-180

Alm R.A., Trust T.J. (1999). Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med* 77:834–846

Ando T., Xu Q., Torres M., Kusugami K., Israel D.A., Blaser M.J. (2000). Restriction-modification system differences in *Helicobacter pylori* are a barrier to interstrain plasmid transfer. *Mol Microbiol* 37:1052-1065

Appelmelk B.J., Simoons-Smit I., Negrini R., Moran A.P., Aspinall G.O., Forte J.G., De Vries T., Quan H., Verboom T., Maaskant J.J., Ghiara P., Kuipers E.J., Bloemena E., Tadema T.M., Townsend R.R., Tyagarajan K., Crothers J.M.Jr., Monteiro M.A., Savio A., De Graaff J. (1996). Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 64:2031-2040

Aras R.A., Small A.J., Ando T., Blaser M.J. (2002). *Helicobacter pylori* interstrain restriction-modification diversity prevents genome subversion by chromosomal DNA from competing strains. *Nucleic Acids Res* 30:5391-5397

Arthur H. M., Lloyd R. G. (1980). Hyper-recombination in *uvrD* mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 180:185–191

- Asahi B.M., Azuma T., Ito S., Ito Y., Suto H., Nagai Y., Tsubokawa M., Tohyama Y., Maeda S., Omata M., Suzuki T., Sasakawa C. (2000).** *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 191:593–602
- Atherton J.C., Peek R.M.Jr., Tham K.T., Cover T.L., Blaser M.J. (1997).** Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 112:92-99
- Bamford K.B., Bickley J., Collins J.S.A. (1993).** *Helicobacter pylori*. comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. *Gut* 34:1348-1350
- Betran E., Rozas J., Navarro A., Barbadilla A. (1997).** The estimation of the number and the length distribution of gene conversion tracts from population DNA sequence data. *Genetics* 146:89–99
- Bickle T.A., Kruger D.H. (1993).** Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev* 57:434-450
- Birkholz S., Knipp U., Nietzki C., Adamek R.J., Opferkuch W. (1993).** Immunological activity of lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* on human peripheral mononuclear blood cells in comparison to lipopolysaccharides of other intestinal bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 6:317-324
- Björkholm B., Lundin A., Sillen A., Guillemin K., Salama N., Rubio C., Gordon J.I., Falk P., Engstrand L. (2001).** Comparison of genetic divergence and fitness between two subclones of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 69:7832–7838
- Björkholm B., Sjölund M., Falk P.G., Bergi O.G., Engstrand L., Andersson D.I. (2001).** Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 98:14607-14612
- Blattner F.R., Plunkett G. 3rd, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1462
- Boren T., Falk P., Roth K.A., Larson G., Normark S. (1993).** Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262:1892-95
- Brenciaglia M.I., Fornara A.M., Scaltrito M.M., Dubini F. (2000).** *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. *Int J Antimicrob Agents* 13:237–241
- Bronsdon M.A., Goodwin C.S., Sly L.I., Chilvers T., Schoenknecht F.D. (1991).** *Helicobacter nemestrinae* sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Int J Syst Bacteriol* 41:148-153
- Burns D.L. (2003).** Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6:29-34

- Cave D.R., Vargas M.** (1989). Effect of a *Campylobacter pylori* protein on acid secretion by parietal cells. *Lancet* 187-189
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A.** (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 93:14648-14653
- Chan W.Y., Hui P.K., Leung K.M., Chow J., Kwok F., Ng C.S.** (1994). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol* 102:503-507
- Chen I., Gotschlich E.C.** (2001). ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity. *J Bacteriol* 183:3160–3168
- Christie P.J., Vogel J.P.** (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 8:354-360
- Claeys D., Faller G., Appelmeik B.J., Negrini R., Kirchner T.** (1998). The gastric H⁺,K⁺-ATPase is a major autoantigen in chronic *Helicobacter pylori* gastritis with body mucosa atrophy. *Gastroenterology* 115:340-347
- Correa P., Fontham E., Bravo J.C., Bravo L.E., Ruiz B., Zamara G., Realpe J.L., Malcom G.T., Li D., Johnson W.D., Mera R.** (2000). Chemoprevention of gastric dysplasia: Randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Nat Can Inst* 92:1881-1888
- Covacci A., Falkow S., Berg D.E., Rappuoli R.** (1997). Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol* 5:205-208
- Covacci A., Rappuoli R.** (1998). *Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasi-species. *Curr Opin Microbiol* 1:96–102
- Covacci A., Telford J.L., Del Giudice G., Parsonnet J., Rappuoli R.** (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284:1328-1333
- Cover T.L., Blaser M.J.** (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267:10570-10575
- Crabtree J.E.** (1998). Role of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. *Dig Dis Sci* 43:46S-55S
- Crowley D.J., Hanawalt P.C.** (2001). The SOS-dependent upregulation of *uvrD* is not required for efficient nucleotide excision repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 485:319–329
- Dewhirst F. E., Seymour C., Fraser G.J., Paster B.J., Fox J.G.** (1994). Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44:553–560

- Dewhirst F.E., Fox J.G., Mendes E.N., Paster B.J., Gates C.E., Kirkbride C.A., Eaton K.A.** (2000a). 'Flexispira rappini' strains represent at least 10 *Helicobacter* taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 5:1781-1787
- Dewhirst F.E., Fox J.G., On S.L.W.** (2000b). Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. *Int J Sys Evol Microbiol* 50:2231–2237
- Donahue J.P., Israel D.A., Peek R.M. Jr., Blaser M.J., Miller G.G.** (2000). Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 37:1066-1074
- Dooley C.P., Cohen H., Fitzgibbons P.L., Bauer M., Appleman M.D., Perez-Perez G.I., Blaser M.J.** (1989). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 321:1562-1566
- van Doorn L.-J., Figueiredo C., Sanna R., Blaser M.J., Quint W.G.V.** (1999). Distinct Variants of *Helicobacter pylori cagA* Are Associated with *vacA* Subtypes. *J Clin Microbiol* 37:2306–2311
- van Doorn L.-J., Figueiredo C., Megraud F., Pena S., Midolo P., de Magalhaes Queiroz D.M., Carneiro F., Vanderborght B., Pegado M.D., Sanna R., de Boer W., Schneeberger P.M., Correa P., Ng E.K., Atherton J., Blaser M.J., Quint W.G.V.** (1999b). Geographic Distribution of *vacA* Allelic Types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 116:823–830
- Drazek E.S., Dubois A., Holmes R.K.** (1994). Characterization and presumptive identification of *Helicobacter pylori* isolates from rhesus monkeys. *J Clin Microbiol* 32:1799-1804
- Dubnau D.** (1999). DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 53:217-244
- Dubois A., Fiala N., Heman-Ackah L.M., Drazek E.S., Tarnawski A., Fishbein W.N., Perez-Perez G.I., Blaser M.J.** (1994). Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. *Gastroenterology* 106:1405-1417
- Dubois A., Berg D.E., Incecik E.T., Fiala N., Heman-Ackah L.M., Perez-Perez G.I., Blaser M.J.** (1996). Transient and persistent experimental infection of non-human primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect Immun* 64:2885–2891
- Dubois A.** (1999). Host specificity of *Helicobacter pylori* Strains and Host Responses in Experimentally Challenged Nonhuman Primates. *Gastroenterology* 16: 90-96
- Dunn B.E., Phadnis S.H.** (1998). Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. *Yale J Biol Med* 71:63-73
- Eaton K.A., Radin M.J., Kramer L., Wack R., Sherding R., Krakowka S., Morgan D.R.** (1991). Gastric spiral bacilli in captive cheetahs. *Scand J Gastroenterol* 181:S38-S42

- Eaton K.A., Dewhirst F.E., Radin M.J., Fox J.G., Paster B.J., Krakowka S., Morgan D.R.** (1993). *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *Int J Syst Bacteriol* 43:99-106
- Eaton K.A., Suerbaum S., Josenhans C., Krakowka S.** (1996). Colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 64:2445-2448
- van der Ende A., Rauws E.A., Feller M., Mulder C.J., Tytgat G.N., Dankert J.** (1996). Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 111:638-647
- Euler A.R., Zurenko G.E., Moe J.B., Ulrich R.G., Yagi Y.** (1990). Evaluation of two monkey species (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease. *J Clin Microbiol* 28:2285-2290
- Evans D.J.Jr., Evans D.G., Kirkpatrick S.S., Graham D.Y.** (1991). Characterisation of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits. *Microb Pathog* 10:15-26
- Falush D., Kraft C., Taylor N.S., Correa P., Fox J.G., Achtman M., Suerbaum S.** (2001). Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci*, 98:15056–15061
- Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard J.K., Stephens M., Kidd M., Blaser M.J., Graham D.Y., Vacher S., Perez-Perez G.I., Yamaoka Y., Megraud F., Otto K., Reichard U., Katzowitsch E., Wang X., Achtman M., Suerbaum S.** (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299:1582-1585
- Feldman R.A., Deeks J.J., Evans S.J.** (1995). Multi-laboratory comparison of eight commercially available *Helicobacter pylori* serology kits. *Helicobacter pylori* Serology Study Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:428-433
- Ferrero R.L., Fox J.G.** (2001). In vivo modeling of *Helicobacter*-associated gastrointestinal diseases. 565-582. In: Mobley H.L.T., Mendz G.L., Hazell S.L. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM-Press, Washington D.C.
- Fox J.G., Batchelder M., Marini R., Yan L., Handt L., Li X., Shames B., Hayward A., Campbell J., Murphy J.C.** (1995). *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat. *Infect Immun* 63:2674-2681
- Fox J.G., Dewhirst F.E., Shen Z., Feng Y., Taylor N.S., Paster B.J., Ericson R.L., Lau C.N., Correa P., Araya J.C., Roa I.** (1998). Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* 114:755-763
- Frenck R.W. Jr., Clemens J.** (2003). *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect* 5:705-713

- Fung W.P., Papadimitriou J.M., Matz L.R.** (1979). Endoscopic, histological and ultrastructural correlations in chronic gastritis. *Am J Gastroenterol* 71:269-279
- Garner J.A., Cover T.L.** (1996). Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun* 64:4197-4203
- 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* 38:371-377
- Ghose C., Perez-Perez G.I., Dominguez-Bello M.-G., Pride D.T., Bravi C.M., Blaser M.J.** (2002). East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci* 99:15107-15111
- Go M.F., Kapur V., Graham D.Y., Musser J.M.** (1996). Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: Extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* 178:3934–3938
- Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., Peters M., Collins M.D., Sly L., McConnell W., Harper W.E.S.** (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 39:397-405
- Goodwin C.S., Armstrong J.A.** (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9:1-13
- Graham D.Y., Klein P.D., Evans D.J.Jr., Evans D.G., Alpert L.C., Opekun A.R., Boutton T.W.** (1987). *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the 13C-urea breath test. *Lancet* 1174-1177
- Graham D.Y., Hoffman J., el-Zimaity H.M., Graham D.P., Osato M.** (1997). Twice a day quadruple therapy (bismuth subsalicylate, tetracycline, metronidazole plus lansoprazole) for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 11:935-938
- Guild W.R., Cato A. Jr., Lacks S.** (1968). Transformation and DNA size: two controlling parameters the efficiency of the single strand intermediate. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 33:643–645
- Guillemin K., Salama N.R., Tompkins L.S., Falkow S.** (2002). *Cag* pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci* 99:15136-15141
- Hahn J., Inamine G., Kozlov Y., Dubnau D.** (1993). Characterization of *comE*, a late competence operon of *Bacillus subtilis* required for the binding and uptake of transforming DNA. *Mol Microbiol* 10:99–111
- Hammar M., Tyszkiewicz T., Wadstrom T., O'Toole P.W.** (1992). Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:54-58

- Handt L.K., Fox J.G., Dewhirst F.E., Fraser G.J., Paster B.J., Yan L.L., Rozmiarek H., Rufo R., Stalis I.H.** (1994) *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect Immun* 62:2367-2374
- Hazell S.L., Lee A., Brady L., Hennessy W.** (1986). *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 153:658-663
- Heep M., Beck D., Bayerdörfer E., Lehn N.** (1999). Rifampin and Rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1497–1499
- Heep M., Rieger U., Beck D., Lehn N.** (2000a). Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to Rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1075-1077
- Heep M., Odenbreit S., Beck D., Decker J., Prohaska E., Rieger U., Lehn N.** (2000b). Mutations at four distinct regions of the *rpoB* gene can reduce the susceptibility of *Helicobacter pylori* to Rifamycins. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1713-1715
- Heuermann D., Haas R.** (1998). A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol Gen Genet* 257:519–528
- Hilliker A.J., Harauz G., Reaume A.G., Gray M., Clark S.H., Chovnick A.** (1994). Meiotic gene conversion tract length distribution within the locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 137:1019–1026
- Hofreuter D., Odenbreit S., Henke G., Haas R.** (1998). Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterisation of the *comB* locus. *Mol Microbiol* 28:1027-1038
- Hofreuter D., Odenbreit S., Püls J., Schwan D., Haas R.** (2000). Genetic competence in *Helicobacter pylori*: mechanisms and biological implications. *Res Microbiol* 151:487-491
- Hofreuter D., Odenbreit S., Haas R.** (2001). Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* 41:379–391
- Houben M.H., Van Der Beek D., Hensen E.F., Craen A.J., Rauws E.A., Tytgat G.N.** (1999). A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy - the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 13:1047-1055
- van Houten B.** (1990). Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 54:18-51

- Inamine G.S., Dubnau D.** (1995). ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J Bacteriol* 177:3045–3051
- International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France: IARC, 1994
- Israel D.A., Lou A.S., Blaser M.J.** (2000). Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol Let* 188:275-280
- Israel D.A., Salama N., Krishna U., Rieger U.M., Atherton J.C., Falkow S., Peek R.M.** (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci* 98:14625–14630
- Jiang Q., Hiratsuka K., Taylor D.E.** (1996). Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol* 20:833-842
- Jorgensen M., Daskalopoulos G., Warburton V., Mitchell H.M., Hazell S.L.** (1996). Multiple strain colonization and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* infected patients: identification from sequential and multiple biopsy specimens. *J Infect Dis* 174:631–635
- Josenhans C., Labigne A., Suerbaum S.** (1995). Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* 177:3010–3020
- Josenhans C., Suerbaum S.** (2001). *Helicobacter* motility and chemotaxis. In: *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK 171-184
- Kansau I., Raymond J., Bingen E., Courcoux P., Kalach N., Bergeret M., Braimi N., Dupont C., Labigne A.** (1996). Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* 147:661-669
- Kersulyte D., Chalkauskas H., Berg D.E.** (1999). Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol* 31:31–43
- Kersulyte D., Mukhopadhyay A.K., Velapatino B., Su W., Pan Z., Garcia C., Hernandez V., Valdez Y., Mistry R.S., Gilman R.H., Yuan Y., Gao H., Alarcon T., Lopez-Brea M., Balkrish Nair G., Chowdhury A., Datta S., Shirai M., Nakazawa T., Ally R., Segal I., Wong B.J., Lam S.K., Olfat F.O., Boren T., Engstrand L., Torres O., Schneider R., Thomas J.E., Czinn S., Berg D.E.** (2000). Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol* 182:3210–3218
- Kiyosawa K., Tanaka M., Matsunaga T., Nikaido O., Yamamoto K.** (2001). Amplified UvrA protein can ameliorate the ultraviolet sensitivity of an *Escherichia coli* *recA* mutant. *Mutat Res* 487:149–156

- Kong H., Lin L.-F., Porter N., Stickel S., Byrd D., Posfai J., Roberts R.J.** (2000). Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acid Res* 28:3216-3223
- Kraft C.** (2000). Mikrobiologische und immunologische Charakterisierung von *Helicobacter*-Infektionen in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*). Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum, Göttingen
- Krakowka S., Morgan D.R., Kraft W.G., Leunk R.D.** (1987). Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect Immun* 55:2789-796
- Krienitz U.** (1906). Über das Auftreten von Spirochaeten verschiedener Form im Mageninhalt bei *Carcinoma ventriculi*. *Dtsch Med Wochenschr* 32:872
- Kuipers E.J., Israel D.A., Kusters J.G., Blaser M.J.** (1998). Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 180:2901–2905
- Kuipers E.J., Israel D.A., Kusters J.G., Gerrits M.M., Weel J., van der Ende A., van der Hulst R., Wirth H.P., Höök-Nikanne J., Thompson S.A., Blaser M.J.** (2000). Quasispecies Development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 181:273–282
- Kusters J.G., Gerrits M.M., Van Strijp J.A.G., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E.** (1997). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphogenic manifestation of cell death. *Infect Immun* 65:3672-3679
- Laheij R.J.F., van Rossum L.G.M., Jansen J.B.M.J., Straatmann H., Verbeek A.L.M.** (1999). Evaluation of treatment regiments to cure *Helicobacter pylori* infection - a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 13:857-864
- Lawrence J.G., Ochman H.** (1997). Amelioration of Bacterial Genomes: Rates of Change and Exchange. *J Mol Evol* 44:383–397
- Lee A., O'Rourke J., De Ungria M.C., Robertson B., Daskalopoulos G., Dixon M.F.** (1997). A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112:1386-1397
- Letley D.P., Atherton J.C.** (2000). Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol* 182:3278-3280
- Lin L.-F., Posfai J., Roberts R.J., Kong H.** (2001). Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 98:2740–2745
- Linz B., Schenker M., Zhu P., Achtman, M.** (2000). Frequent interspecific genetic exchange between commensal neisseriae and *Neisseria meningitides*. *Mol Microbiol* 36:1049–1058

- Lupetti P., Heuser J.E., Manetti R., Massari P., Lanzavecchia S., Bellon P.L., Dallai R., Rappuoli R., Telford J.L.** (1996). Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* 133:801-807
- Mahdavi J., Sonden B., Hurtig M., Olfat F.O., Forsberg L., Roche N., Ångstrom J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson K.-A., Altraja S., Wadstrom T., Kersulyte D., Berg D.E., Dubois A., Petersson C., Magnusson K.-E., Norberg T., Lindh F., Lundskog B.B., Arnqvist A., Hammarstrom L., Boren T.** (2003). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297:573-578
- Majewski S.I., Goodwin C.S.** (1988). Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J Infect Dis* 157:465-471
- Makristathis A., Pasching E., Schütze K., Wimmer M., Rotter M.L., Hirschl A.M.** (1998). Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 36:2772-2774
- Marchetti M., Arico B., Burroni D., Figura N., Rappuoli R., Ghiara P.** (1995). Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267:1655-1658
- Marshall B.J., Warren J.R.** (1983). Unidentified Curved Bacilli on gastric epithelium in active gastritis. *Lancet* 1273-1275
- Marshall B.J., Warren J.R.** (1984). Unidentified Curved Bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1311-1314
- Marshall B.J., Royce H., Annear D.I., Pearman J.W., Warren J.R., Armstrong J.A.** (1984). Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbio Lett* 25:83-88
- Marshall B.J., Goodwin C.S.** (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol* 37:68
- Matsumoto S., Washizuka Y., Matsumoto Y., Tawara S., Ikeda F., Yokota Y., Karita M.** (1997). Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* 46:391-397
- Mätz-Rensing K., Kunz E., Kraft C., Lorenzen D., Suerbaum S., Kaup F.J.** (2001). Experimental *Helicobacter pylori* infection of Rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Int J Med Microbiol* 291:33-43
- Mégraud F., Doermann H.P.** (1998). Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. *Gut* 43 Suppl 1:S61-65
- Meier P., Berndt C., Weger N., Wackernagel W.** (2002). Natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* by single-stranded DNA requires type IV pili, competence state and coma. *FEMS Microbiol Lett* 207:75-80

- Miehlke S., Thomas R., Guitierrez U., Graham D.Y., Go M.F.** (1999). DNA fingerprinting of single colonies of *Helicobacter pylori* from gastric cancer patients suggests infection with a single predominant strain. *J Clin Microbiol* 37:245–247
- Molinari M., Galli C., Norais N., Telford J.T., Rappuoli R., Luzioi J.P., Montecucco C.** (1997). Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J Biol Chem* 272:25339–25344
- Monstein H.J., Jonasson J.** (2001). Differential virulence-gene mRNA expression in coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun* 285:530-536
- Murray C.J.L., Lopez A.D.** (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1269-1276
- Moran A.P., Prendergast M.M., Appelmelk B.J.** (1996a). Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16:105-115
- Moran A.P., Appelmelk B.J., Aspinall G.O.** (1996b). Molecular mimicry of host structures by lipopolysaccharides of *Campylobacter* and *Helicobacter ssp.*: implications in pathogenesis. *J Endotoxin Res* 3:521-531
- Nakamura S., Yao T., Aoyagi K., Iida M., Fujishima M., Tsuneyoshi M.** (1997). *Helicobacter pylori* and primary gastric lymphoma. A histopathologic and immunohistochemical analysis of 237 patients. *Cancer* 79:3-11
- Nedenskov-Sorensen P., Buckholm G., Bovre K.** (1990). Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis* 161:365-366
- Nedrud J.G.** (1999). Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24:243-250
- Nomura A., Stemmermann G.N.** (1993). *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 8:294-303
- 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* 31:1537-1548
- 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* 287:1497-1500
- Pagliaccia C., Wang X.M., Tardy F., Telford J.L., Ruyschaert J.-M., Cabiliaux V.** (2000). Structure and interaction of VacA of *Helicobacter pylori* with a lipid membrane. *Eur J Biochem* 267:104-109
- Parsonnet J., Hansen S., Rodriguez L., Gelb A.B., Warnke R.A., Jellum E., Orentreich N., Vogelstein J.H., Friedman G.D.** (1994). *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330:1267-1271

- Petranovic M., Zahradkaa K., Zahradkaa D., Petranovic D., Nagyc B., Salaj-Sjmicica E., Petranovic D.** (2001). Genetic evidence that the elevated levels of *Escherichia coli* helicase II antagonize recombinational DNA repair. *Biochimie* 83:1041-1047
- Pot R.G., Kusters J.G., Smeets L.C., Van Tongeren W., Vandenbroucke-Grauls C.M., Bart A.** (2001). Interspecies transfer of antibiotic resistance between *Helicobacter pylori* and *Helicobacter acinonychis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2975-2976
- Radin M.J., Eaton K.A., Krakowka S., Morgan D.R., Lee A., Otto G., Fox J.G.** (1990). *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect Immun* 58:2606-2612
- Rohde M., Püls J., Buhrdorf R., Fischer W., Haas R.** (2003). A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 49:219-234
- Roma-Giannikou E., Karameris A., Balatsos B., Panayiotou J., Manika Z., Van-Vliet C., Rokkas T., Skandalis N., Kattamis C.** (2003). Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori*: a genetic analysis. *Helicobacter* 8:15-20
- Rosenow E.C., Sanford A.H.** (1915). The bacteriology of ulcer of the stomach and duodenum in man. *J Infect Dis* 17:219-226
- Sachs G., Weeks D.L., Melchers K., Scott D.R.** (2003). The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol* 65:349–369
- Salama N., Guillemin K., McDaniel T.K., Sherlock G., Tompkins L., Falkow S.** (2000). A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci* 97:14668–14673
- Salomon H.** (1896). Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Centralbl Bakt* 19:422-433
- Saunders N.J., Peden J.F., Moxon E.R.** (1999). Absence in *Helicobacter pylori* of an uptake sequence for enhancing uptake of homospecific DNA during transformation. *Microbiology* 145:3523–3528
- Schroder H.D., Ludwig C., Jakob W., Reischl U., Stolte M., Lehn N.** (1998). Chronic gastritis in tigers associated with *Helicobacter acinonyx*. *J Comp Pathol* 119:67-73
- Schutze K., Hentschel E., Hirschl A.M.** (1999). Effect of omeprazole and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the healing of duodenal ulcer: comparison with a historical control. *Hepatogastroenterology* 46:2358-2362
- Segal E.D., Falkow S., Tompkins L.S.** (1996). *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci* 93:1259–1264

- Segal E.D., Cha J., Lo J., Falkow S., Tompkins L.S.** (1999). Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 96:14559–14564
- Sisco K.L., Smith H.O.** (1979). Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci* 76:972-976
- Sly L.I., Bronsdon M.A., Bowman J.P., Holmes A., Stackebrandt E.** (1993). The phylogenetic position of *Helicobacter nemestrinae*. *Int J Syst Bacteriol* 43:386-387
- Smeets L.C., Kusters J.G.** (2002) Natural transformation in *Helicobacter pylori*: DNA transport in an unexpected way. *Trends Microbiol* 10:159-161
- Smith H.O., Gwinn M.L., Salzberg S.L.** (1999). DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res Microbiol* 150:603-616
- Solnick J.V., Schauer D.B.** (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 14:59-97
- Sörberg M., Nilsson M., Hanberger H., Nilsson L.E.** (1996). Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15:216-219
- Stanley J., Linton D., Burnens A.P., Dewhirst F.E., On S.L., Porter A., Owen R.J., Costas M.** (1994). *Helicobacter pullorum* sp. nov. - genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology* 140:3441–3449
- Steer H.W.** (1975). Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol* 28:639-646
- Stolte M., Batz C., Eidt S.** (1993). Giant fold gastritis - a special form of *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Z Gastroenterol* 31:289-293
- Suerbaum S., Maynard-Smith J., Bapumia K., Morelli G., Smith N.H., Kunstmann E., Dyrek I., Achtman M.** (1998). Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 95:12619–12624
- Suerbaum S., Kraft C., Dewhirst F.E., Fox J.G.** (2002). *Helicobacter nemestrinae* ATCC 49396T is a strain of *Helicobacter pylori* (Marshall *et al.* 1985) Goodwin *et al.* 1989, and *Helicobacter nemestrinae* Bronsdon *et al.* 1991 is therefore a junior heterotypic synonym of *Helicobacter pylori*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:437–439
- Suerbaum S., Michetti P.** (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347:1175-1186
- Takata T., Aras R., Tavakoli D., Ando T., Olivares A.Z., Blaser M.J.** (2002). Phenotypic and genotypic variation in methylases involved in type II restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 30:2444-2452

- Taylor N.S., Fox J.G., Akopyants N.S., Berg D.E., Thompson N., Shames B., Yan L., Fontham E., Janney F., Hunter F.M., Correa P.** (1995). Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 33:918–923
- Thomas J.E., Gibson G.R., Darboe M.K., Dale A., Weaver L.T.** (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1194–1195
- Thompson S.A., Blaser M.J.** (1995). Isolation of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. *Infect Immun* 63:2185–2193
- Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Klenk H.P., Gill S., Dougherty B.A., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E.F., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalak H.G., Glodek A., McKenney K., Fitzegerald L.M., Lee N., Adams M.D., Hickey E.K., Berg D.E., Gocayne J.D., Utterback T.R., Peterson J.D., Kelley J.M., Cotton M.D., Weidman J.M., Fujii C., Bowman C., Wathley L., Wallin E., Hayes W.S., Borodovsky M., Karpk P.D., Smith H.O., Fraser C.M., Venter J.C.** (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539–547
- Torii N., Nozaki T., Masutani M., Nakagama H., Sugiyama T., Saito D., Asaka M., Sugimura T., Miki K.** (2003) Spontaneous mutations in the *Helicobacter pylori* *rpsL* gene. *Mutat Res* 535:141–145
- Vandamme P., Harrington C.S., Jalava K., On S.L.W.** (2000). Misidentifying helicobacters: the *Helicobacter cinaedi* example. *J Clin Microbiol* 38:2261–2266
- Vitkute J., Stankevicius K., Tamulaitiene G., Maneliene Z., Timiskas A., Berg D.E., Janulaitis A.** (2001). Specificities of eleven different DNA methyltransferases of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* 183:443–450
- Wang G., Humayun M.Z., Taylor D.E.** (1999). Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 7:488–493
- Wang J.T., Sheu J.C., Lin J.T., Wang T.H., Wu M.S.** (1993). Direct DNA amplification and restriction pattern analysis of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer and their families. *J Infect Dis* 168:1544–1548
- Ward J.M., Fox J.G., Anver M.R., Haines D.C., George C.V., Collins M.J. Jr., Gorelick P.L., Nagashima K., Gonda M.A., Gilden R.V.** (1994). Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J Natl Cancer Inst* 86:1222–1227
- Wirth H.P., Beins M.H., Yang M., Tham K.T., Blaser M.J.** (1998). Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 66:4856–4866

Xu Q., Morgan R.D., Roberts R.J., Blaser M.J. (2000). Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. Proc Natl Acad Sci 97:9671–9676

7 Anhang

7.1 Zusammenfassung

Helicobacter pylori ist ein pathogenes Bakterium, das verantwortlich gemacht wird für verschiedene Erkrankungen des Magens und Duodenums, wie beispielsweise chronische Gastritis, peptische Ulzera und maligne Lymphome. Das Bakterium zeichnet sich durch eine hohe Rekombinationsrate aus und besitzt ein hohes Maß an genetischer Allelvielfalt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rekombinationsrate und die Länge der rekombinierten DNA-Importe anhand von sequentiellen Isolaten, die zu definierten Zeitpunkten aus dem selben Patienten isoliert wurden, untersucht. Es wurden zehn Gene, darunter sieben 'housekeeping' Gene und drei virulenzassoziierte Gene, amplifiziert und sequenziert. Die Ergebnisse zeigten eine bis dahin noch nicht für Bakterien beschriebene Fragmentlänge der DNA-Importe von durchschnittlich lediglich 417 Basenpaaren. Die Rekombinationsrate war außergewöhnlich hoch. DNA-Microarray-Analysen konnten zeigen, dass es trotz dieser hohen Rekombinationsrate nur wenige Veränderungen in der genomischen Genausstattung gab. Jedoch hing das Auftreten von Rekombinationsereignissen direkt mit Veränderungen der Genausstattung zusammen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein neues *in vitro*-Transformationsmodell entwickelt, das die *in vivo* ermittelten Resultate nachvollziehen sollte. Das Modell konnte sowohl die *in vivo* gefundene Rekombinationsrate als auch den Import von kurzen DNA-Fragmenten bestätigen, die zu einem Allelmosaik zwischen DNA-Rezipient und Donor führten. Auffällig war eine stark verminderte Transformierbarkeit mit Donor-DNA aus asiatischen *H. pylori*-Stämmen. Um eine mögliche Beteiligung des Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) Mechanismus an der Rekombination zu ermitteln, wurden zwei Gene des Mechanismus ausgeschaltet. Die Ergebnisse der NER⁻Mutanten (*uvrA*⁻, *uvrD*⁻) zeigten eine starke Verminderung der Transformierbarkeit. Diese Verminderung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Länge der rekombinierten DNA-Importe. Das Ausschalten des *uvrA*-Gens führte zudem zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber UV-Licht. Der NER-Mechanismus ist bei *H. pylori* in einer noch nicht aufgeklärten Weise an der Rekombination beteiligt.

In einem Rhesusaffen-Tiermodell wurde die initiale Besiedlung mit *H. pylori* untersucht. Die Tiere stellen einen natürlichen Wirt dar und zeigen ähnliche Krankheitssymptome wie menschliche Patienten. Die Rhesusaffen wurden experimentell mit zwei klinischen *H. pylori*-Isolaten infiziert. Die Reisolation zu bestimmten Zeitpunkten zeigte, dass sich nur einer der beiden Stämme im Affenmagen etablieren konnte und der zweite Stamm verdrängt worden war. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die persistent infizierten Affen mit vier weiteren *H. pylori*-Stämmen infiziert, um eine transiente Koinfektion zu simulieren. Diese Stämme verdrängten jedoch den bereits etablierten Stamm, und es konnte keine *in vivo*-Rekombination festgestellt werden. Dennoch ist dieses Modell das Erste, in dem eine persistierende experimentelle *H. pylori*-Infektion in Rhesusaffen über einen Zeitraum von mehr als vier Jahren nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse liefern wichtige Hinweise auf den beim Menschen meist unentdeckten Anfang der *H. pylori*-Infektion.

Die Untersuchungen an weiteren Spezies des Genus *Helicobacter* zeigten, dass die beschriebene Spezies *Helicobacter nemestrinae* keine eigene Spezies darstellt, sondern der Spezies *H. pylori* zugeordnet werden konnte. Den damit nächsten 'Verwandten' stellt die Spezies *H. acinonychis* dar, deren Stämme sich untereinander wesentlich weniger stark unterscheiden als *H. pylori*-Stämme.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern wichtige Daten zum Verständnis der Evolution und Mikroevolution innerhalb eines Wirtes von *H. pylori*, die zu besseren Strategien in der Bekämpfung dieses pathogenen Bakteriums führen können.

7.2 Summary

The human pathogen *Helicobacter pylori* colonizes the gastrointestinal tract and causes a long-term infection leading to several diseases such as gastritis, peptic ulcers and cancer. *H. pylori* is the most genetically diverse bacterial species known. Population genetic analysis has shown that the diversity is largely due to recombination between different *H. pylori* strains during mixed infection.

To analyse the recombination rate *in vivo*, sequential isolates, taken from the same patient at different timepoints, were used. Fragments of seven housekeeping genes, the two flagellin genes and the vacuolating cytotoxin gene *vacA*, were sequenced and pairwise compared to detect genetic changes that had occurred during chronic colonization. The recombination rate was unexpectedly high and the size of the

imported DNA-fragments had an average of only 417 basepairs. DNA-imports of this extraordinarily short length were never found before in other bacterial species so far. A Microarray analysis showed a high stability of the genetic content in the paired isolates. The very few differences in this genetic content were mainly driven by recombination events.

A new developed *in vitro* transformation model was able to measure the recombination frequency and the length of the imported DNA. The model confirmed the unusually high recombination frequency and the very short imported DNA fragments found *in vivo* in the sequential isolates. Interestingly, by using Asian strains as DNA donor, the recombination frequency was much lower compared to European and African strains. To answer the question whether the nucleotide-excision-repair (NER) mechanism was involved in the recombination process, knock out mutants of two key genes of the mechanism were used (*uvrA*⁻, *uvrD*⁻). The NER mutants showed a notable decrease in their transformation ability, but the length of the imported fragments was not affected. The NER mechanism seems to be involved in the recombination process, but it is still unknown in how far and in which way.

A rhesus monkey model was developed to establish an experimentally persistent *H. pylori* infection and to investigate the initial infection steps. Macaques are natural hosts of *H. pylori* and develop similar disease. Two clinical isolates were chosen for infection, but only one strain survived in the stomach of the macaques. The second strain was outcompeted by the first one. In a second trial the macaques were infected with four new strains of *H. pylori* to simulate a transient co-colonisation. Only two of the new strains survived and the formerly established strain was outcompeted by the two new strains. No recombination events could be detected. Nevertheless, this is the first time that rhesus monkeys were experimentally persistently infected for more than four years with *H. pylori*. In this model the first steps of a new *H. pylori* infection can be investigated, which is not possible in humans.

Investigations of other members of the genus *Helicobacter* showed, that the species *Helicobacter nemestrinae* was not an independent species, but represented a strain of *H. pylori*. The closest related species then was represented by *Helicobacter acinonychis*. Genetic analyses revealed a much more clonal genome between different *H. acinonychis* strains compared to *H. pylori*.

7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Amp	Ampicillin
ATCC	Amerikanische Bakterien-Stammsammlung
BHI	Brain-Heart-Infusion-Medium
Bp	Basenpaar
ca.	circa
<i>cagA</i>	Cytotoxin assoziiertes Gen A
d.h.	das heißt
DIG	Digoxygenin-Farbstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
dpi	Tage nach Infektion
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ES-PCR	Empty site- PCR
<i>H. acinonychis</i>	<i>Helicobacter acinonychis</i>
<i>H. nemestrinae</i>	<i>Helicobacter nemestrinae</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IS-Element	Insertionselement
J	Joule
Kb	Kilobasen (1 Kb = 1000 Bp)
Km	Kanamycin
LGIS	große gastrointestinale spiralige Organismen
LPS	Lipopolysaccharid
LSU	Stamm-Kollektiv aus Louisiana/USA
M	Mol
<i>M. mulatta</i>	Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)
Mb	Megabasen (1Mb = 1000 Kb)
MH	Müller-Hinton-Medium
Min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mnp	Multiplex Nukleotidpolymorphismus
mpi	Monate nach Infektion
NER	Nukleotid-Excisions-Reparatur
nm	Nanometer
NQ	Stamm-Kollektiv aus Kolumbien
OD	optische Dichte
PAI	Pathogenitätsinsel
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert
PPI	Protonenpumpeninhibitor
pSUS	Bezeichnung selbsthergestellter Plasmide
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
Rif	Rifampicin
RM	Restriktions-Modifikations-System
rpm	Umdrehungen pro Minute
Snp	Einzelner Nukleotidpolymorphismus
sog.	sogenannt
Ssb	Einzelstrangbindendes Protein
Std	Stunde
Strep	Streptomycin
Taq	Thermostabile Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
wpi	Wochen nach Infektion
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Helicobacter pylori</i>	2
Abbildung 2: Darstellung der Stoffwechselwege, der Aminosäureproduktion und des Transports von Metaboliten über die Membran	4
Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum des Genus <i>Helicobacter</i>	7
Abbildung 4: Genomische Struktur der <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel in <i>H. pylori</i>	10
Abbildung 5: Hypothetischer Aufbau eines <i>H. pylori</i> Typ IV-DNA-Transporters	16
Abbildung 6: Begleitung von <i>H. pylori</i> bei menschlichen Bevölkerungswanderungen	19
Abbildung 7: Plasmide zur Herstellung einer <i>uvrA</i> ⁻ -Mutante	44
Abbildung 8: Plasmide zur Herstellung einer <i>uvrD</i> ⁻ -Mutante	45
Abbildung 9: RAPD-PCR der LSU-Stammpaare mit Primer AP1281	49
Abbildung 10: RAPD-PCR der NQ-Stammpaare mit Primer AP1281	50
Abbildung 11: Beispiele für festgestellte Rekombinationsereignisse in den NQ- und LSU-Stammpaaren	54
Abbildung 12: Anzahl und Länge der Rekombinationsereignisse	57
Abbildung 13: Klonierung des <i>trpC</i> -Fragments aus Biopsie-DNA	59
Abbildung 14: partieller Verlust der <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel in Stammpaar LSU1062.	62
Abbildung 15: Southern-Blot von LSU1062 mit einer IS-Element-spezifischen Sonde	63
Abbildung 16: Verlust der Gene HP0903/0904 in LSU1040	64
Abbildung 17: Aufnahme des RM-Systems <i>HpyAIV</i> in LSU1016	65
Abbildung 18: Verlust der <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel in Paar NQ315/1712	66
Abbildung 19: Aufnahme eines Gens in NQ315/1712	67
Abbildung 20: Rekombination innerhalb des Gens HP1566 bei NQ315/1712	68
Abbildung 21: Unbekannte Sequenz in Stammpaar NQ366/1790	69
Abbildung 22: Experimenteller Aufbau des 'in vitro'-Transformationsmodells	72
Abbildung 23: Sequenzanalyse der importierten DNA-Fragmente, Stamm J99 transformiert mit N6-R1-DNA	81
Abbildung 24: RAPD-PCR der Reisolat aus Rhesusaffen mit Primer AP1254	89
Abbildung 25: Verwandtschafts-Bäume der <i>H. nemestrinae</i> -Flagellengene mit anderen <i>H. pylori</i> -Stämmen und anderen <i>Helicobacter</i> Spezies	95

Abbildung 26: Verwandtschafts-Bäume der <i>H. nemestrinae</i> -Gene <i>atpA</i> und <i>efp</i> mit anderen <i>H. pylori</i> -Stämmen.....	96
Abbildung 27: Southern-Blot der <i>H. acinonychis</i> -Stämme mit einer <i>H. pylori</i> -spezifischen <i>vacA</i> -Sonde	99
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Bilder von <i>Helicobacter</i> -Isolaten aus Rhesusaffen	113

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Helicobacter</i> Spezies, ihre Wirte, Lebensräume und ausgelöste Krankheiten	6
Tabelle 2: Für die Sequenzanalyse ausgewählte housekeeping und virulenzassoziierten Gene	51
Tabelle 3: Analyse der Mittelstämme aus dem LSU-Kollektiv.....	53
Tabelle 4: Vergleich der Sequenzen der Kernregionen (ohne flankierende Sequenzen) innerhalb der Stammpaare von sieben 'housekeeping' Genen und drei virulenzassoziierten Genen	55
Tabelle 5: Anzahl und Art der Basenunterschiede.....	56
Tabelle 6: Auswertung der Microarray-Daten	60
Tabelle 7: Zusammenstellung der Sequenzanalysen und der Microarray-Analyse ..	70
Tabelle 8: Länge der durch ES-PCR festgestellten Rekombinationsereignisse	71
Tabelle 9: Rifampicin- und Streptomycin-resistente Mutanten verschiedener <i>H. pylori</i> -Stämme.....	73
Tabelle 10: Transformationseffizienz in WT-Stämmen mit Rifampicinresistenz vermittelnder Donor-DNA	76
Tabelle 11: Transformationseffizienz in WT-Stämmen mit Streptomycinresistenz vermittelnde Donor-DNA	76
Tabelle 12: Transformationseffizienz in <i>H. pylori</i> J99 mit Rifampicinresistenz vermittelnder genomischer Donor-DNA und einem <i>rpoB</i> -PCR-Produkt	77
Tabelle 13: Sequenzhomologien der untersuchten Genfragmente zwischen Rezipienten- und Donorstämmen.....	78
Tabelle 14: Länge der importierten DNA in WT-Stämme	79
Tabelle 15: Transformationseffizienz in <i>uvrA</i> ⁻ - und <i>uvrD</i> ⁻ -Mutanten mit Rifampicinresistenz vermittelnder Donor-DNA	83
Tabelle 16: Länge der importierten DNA in <i>uvrA</i> ⁻ - und <i>uvrD</i> ⁻ -Mutanten.....	85
Tabelle 17: Spontanmutationsrate nach UV-Bestrahlung.....	86
Tabelle 18: Transformationseffizienz mit denaturierter DNA	87
Tabelle 19: Reisolat aus experimentell infizierten Rhesusaffen.....	88
Tabelle 20: Ergebnis der <i>ureI</i> -Sequenzierung der Reisolat nach Superinfektion....	93
Tabelle 21: Länge der Rekombinationslänge in einigen Bakterien- und Drosophila-Spezies.....	102

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Würzburg, den

Christian Kraft

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am: 10.12.1973
Geburtsort: Lippstadt
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule Pappelallee, Lippstadt
1984-1993 Gymnasium Schloß Overhagen, Lippstadt
06/1993 Abitur

Studium:

10/1994-02/2000 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit Schwerpunkt: Mikrobiologie, Immunologie und physikalische Chemie
10/1998 Diplomprüfung
12/1998-02/1999 Leonardo da Vinci-Stipendium, Auslandspraktikum am Laboratory Medicine of the County of Östergötland (LMÖ), Universitets-sjukhuset Linköping/Schweden (Prof. Dr. H.-J. Monstein)
03/1999-12/1999 Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum Göttingen, Abteilung Virologie und Immunologie (Prof. Dr. G. Hunsmann), Abteilung Veterinärmedizin und Primatenhaltung (Dr. K. Mätz-Rensing)
Titel der Arbeit: Mikrobiologische und Immunologische Charakterisierung von *Helicobacter*-Infektionen in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)
02/2000 Abschluß: Diplom

Promotion:

ab 04/2000 Promotionsstudium an der Julius-Maximilians Universität Würzburg, Institut für Hygiene und Mikrobiologie (Prof. Dr. S. Suerbaum)
Titel der Arbeit: Die Rolle von Mutation und Rekombination in der Mikroevolution von *Helicobacter pylori*

Würzburg, den

Christian Kraft

7.7 Publikationsliste

Kraft C., Stack A., Josenhans C., Niehus E., Dietrich G., Falush D., Suerbaum S. Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori* infection. In Vorbereitung.

Suerbaum S., Kraft C., Dewhirst F.E., Fox J.G. (2002). *Helicobacter nemestrinae* ATCC 49396^T is a strain of *Helicobacter pylori* (Marshall *et al.* 1985) Goodwin *et al.* 1989 and *Helicobacter nemestrinae* Bronsdon *et al.* 1991 is therefore a junior heterotypic synonym of *Helicobacter pylori*. Int J Syst Evol Microbiol 52:437-439

Falush D., Kraft C., Correa P., Taylor N.S., Fox J.G., Achtman M., Suerbaum S. (2001). Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size and minimal age. Proc Natl Acad Sci 98:15056-15061

Mätz-Rensing K., Kunz E., Kraft C., Lorenzen D., Suerbaum S., Kaup F.-J. (2001). Experimental *Helicobacter pylori* infection of Rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Int J Med Microbiol 291:33-45

Monstein H.J., Tiveljung A., Kraft CH., Borch K., Jonasson J. (2000). Profiling of bacterial flora in gastric biopsies from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis and histologically normal control individuals by temperature gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis. J Med Microbiol 49:817-822

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Sebastian Suerbaum, der die Betreuung meiner Promotion übernommen hat und die Entwicklung der Arbeit stets mit großem Interesse verfolgt hat. Durch viele nützliche Anregungen und Hinweise hat er maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Ich danke Prof. Dr. Roy Gross für die Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen, und für sein Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern Dr. Mark Achtman, Dr. Daniel Falush, Dr. Bodo Linz, Dr. James G. Fox, Dr. Nancy Taylor, Dr. Pelajo Correa und Dr. Kerstin Mätz-Rensing.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern des Heli-Labors, den 'DNA-Mädels' und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die sehr gute und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir mein Studium ermöglicht haben und auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Von ganzen Herzen möchte ich meiner Frau Anke danken, dass Du mich in der ganzen Zeit ertragen hast, für alle Geduld und Unterstützung beim Lesen der Arbeit, die Du mir gegeben hast. Danke!