

**Untersuchungen zur Regulation  
Motilitäts-assoziiierter Gene in  
*Helicobacter pylori***

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

Würzburg

vorgelegt von

Eike Niehus

aus Goslar

Würzburg, 2004

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Außer dem Titel Diplom-Biologe (Univ.) habe ich bisher keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den..... Eike Niehus .....

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum .....

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kreft .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 <i>Helicobacter pylori</i></b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Physiologie und Morphologie.....	5
1.1.2 Genetische Eigenschaften.....	7
1.1.3 Pathogenität.....	9
1.1.4 Virulenzfaktoren.....	11
1.1.5 Epidemiologie und Übertragung .....	15
<b>1.2 Bakterielle Motilität</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Molekulare Mechanismen der Chemotaxis.....	17
1.2.2 Struktur und Funktion des Flagellenapparates .....	19
1.2.3 Transkriptionelle Regulation des Flagellenaufbaus .....	24
<b>1.3 Genomweite Untersuchung bakterieller Transkription mittels DNA-Microarrays</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1 Geräte</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2 Chemikalien</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3 Enzyme und Kits</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4 Standards</b> .....	<b>31</b>
<b>2.5 Bakterien</b> .....	<b>32</b>
2.5.1 Anzucht auf festen Medien .....	33
2.5.2 Anzucht in Flüssigmedium .....	33
2.5.3 Einfrierkulturen.....	34
<b>2.6 Plasmide</b> .....	<b>35</b>
<b>2.7 Oligonukleotide</b> .....	<b>35</b>
<b>2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren</b> .....	<b>39</b>
2.8.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen .....	39
2.8.2 Reinigung von Nukleinsäuren .....	39
2.8.2.1 Extraktion von bakterieller DNA .....	39
2.8.2.2 Extraktion von bakterieller RNA .....	40
2.8.2.3 Aufreinigung von DNA.....	41
2.8.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	41

## Inhaltsverzeichnis

---

2.8.3.1	Standard-PCR.....	41
2.8.3.2	Plasmidspezifische PCR direkt aus Zellmaterial .....	42
2.8.3.3	inverse PCR.....	42
2.8.3.4	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR, semi-quantitativ).....	42
2.8.4	Sequenzierung von DNA .....	43
2.8.5	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	44
2.8.6	Glätten von DNA-Fragmenten .....	44
2.8.7	Alkalische-Phosphatase-Behandlung .....	44
2.8.8	Ligation .....	44
2.8.9	Transformation von DNA .....	45
2.8.10	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	46
2.8.10.1	Plasmid Mini-Präparation (nach Birnboim & Doly, 1979).....	46
2.8.10.2	Plasmid Midi-Präparation .....	47
2.8.11	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle .....	47
2.8.12	Agarosegelelektrophorese .....	47
2.8.12.1	Standard-Agarosegelelektrophorese.....	47
2.8.12.2	Denaturierende Agarosegelelektrophorese.....	48
2.8.13	Markierung von DNA mit Digoxigenin .....	49
2.8.14	Northern Blot-Hybridisierung.....	49
2.8.15	<i>in vitro</i> -Transkription .....	50
<b>2.9</b>	<b>Messung der Luziferase-Aktivität.....</b>	<b>51</b>
<b>2.10</b>	<b>Proteinmethoden.....</b>	<b>52</b>
2.10.1	Proteinbestimmungen.....	52
2.10.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) .....	52
2.10.3	Immunoblot-Hybridisierung (Western Blot) .....	53
2.10.4	Überexpression und Aufreinigung von Proteinen.....	55
2.10.5	Herstellung polyklonaler Kaninchenantisera .....	55
2.10.6	Präparation membranständiger extrazellulärer Proteine von <i>Helicobacter pylori</i> (Flagellenpräparation) .....	56
<b>2.11</b>	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>56</b>
<b>2.12</b>	<b>Arbeiten mit DNA-Microarrays .....</b>	<b>56</b>
2.12.1	<i>Helicobacter pylori</i> -PCR-Produkt-DNA-Microarray .....	56
2.12.2	<i>H. pylori</i> -Oligonukleotid-DNA-Microarray .....	59
2.12.3	Markierung von cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	60
2.12.4	Vorbehandlung und Hybridisierung von DNA-Microarrays .....	61
2.12.5	Einscannen und Bioinformatische Analyse der Microarray-Daten .....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur <i>in vitro</i>-Transkription der <i>H. pylori</i>-Flagellengene .</b>	<b>63</b>
3.1.1	Konstruktion von <i>flaA-lux</i> - und <i>flaB-lux</i> -Reportergenmutanten .....	64
3.1.2	Messung der Promotoraktivitäten von <i>flaA</i> und <i>flaB</i> während des Wachstums in nährstofflimitierter Kultur .....	66

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.3	Bestimmung der <i>flaA</i> - und <i>flaB</i> -Transkriptmengen in Abhängigkeit der Wachstumsphase von <i>H. pylori</i> .....	68
<b>3.2</b>	<b>Herstellung eines <i>H. pylori</i>-PCR-Produkt DNA-Microarrays</b> .....	<b>71</b>
3.2.1	Herstellung der Sonden .....	71
3.2.2	Aufbringen der PCR-Produkte auf Glasoberflächen .....	73
3.2.3	Validierung und Qualitätskontrolle .....	74
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zum Transkriptionsprofil unterschiedlicher Regulatoren des <i>H. pylori</i>-Flagellensystems</b> .....	<b>77</b>
3.3.1	Untersuchungen zum FliA/FlgM-System .....	78
3.3.1.1	Microarray-Untersuchungen der <i>flaA</i> - und <i>flgM</i> -Mutanten.....	78
3.3.1.2	Überprüfung der <i>flaA</i> - und <i>flgM</i> -Microarray-Ergebnisse .....	82
3.3.1.3	Vergleich der Oligonukleotid- und PCR-Produkt-Microarray-Hybridisierungen anhand des FliA/FlgM-Systems.....	84
3.3.2	Untersuchungen zum RpoN-Regulon .....	85
3.3.2.1	Microarray-Untersuchungen der <i>rpoN</i> -Mutante .....	86
3.3.2.2	Überprüfung der <i>rpoN</i> -Microarray-Ergebnisse .....	90
3.3.2.3	Vergleich Oligonukleotid- und PCR-Produkt-Microarray-Hybridisierung anhand der Experimente mit <i>rpoN</i> -Mutanten .....	92
3.3.2.4	Microarray-Untersuchungen zu den <i>flgR</i> - und <i>flgS</i> -Mutanten .....	93
3.3.3	Untersuchungen zu den frühen Regulatoren FlhA und FlhF .....	97
3.3.3.1	Microarray-Untersuchungen der <i>flhA</i> -Mutante .....	98
3.3.3.2	Microarray-Untersuchungen einer <i>flhA/flgM</i> -Mutante .....	101
3.3.3.3	Microarray-Untersuchungen der <i>flhF</i> - und der <i>flhF/flgM</i> -Mutanten.....	103
3.3.3.4	Überprüfung der <i>flhA</i> - und <i>flhF</i> -Microarray-Ergebnisse.....	104
3.3.4	Zusammenfassung der Microarray-Analysen für alle Regulatoren des Flagellensystems .....	107
<b>3.4</b>	<b>Konstruktion und Charakterisierung isogener Mutanten in unterschiedlichen Genen des <i>H. pylori</i>-Flagellensystems</b> .....	<b>109</b>
3.4.1	Basalkörper L-Ring Protein FlgH .....	109
3.4.2	RpoN-abhängige Gene HP1076 und HP1233 ( <i>flgJ</i> -Homolog).....	111
3.4.3	Hakenprotein-Homolog FlgE2.....	113
<b>3.5</b>	<b>Überexpression und Reinigung von <i>H. pylori</i>-FlgE2 in <i>E. coli</i></b> .....	<b>117</b>
3.5.1	Konstruktion des Überexpressionsplasmids .....	118
3.5.2	Überexpression des FlgE2-CBD Fusionsproteins.....	118
3.5.3	Aufreinigung des rekombinanten FlgE2.....	119
<b>3.6</b>	<b>Herstellung von spezifischen Antiseren gegen rekombinantes <i>H. pylori</i> FlgE2</b> .....	<b>121</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>123</b>
<b>4.1</b>	<b>Wachstumsphasen-abhängige und differenzielle Transkription der beiden Flagellengene in <i>H. pylori</i></b> .....	<b>124</b>
4.1.1	Das <i>lux</i> -System im Vergleich mit weiteren Reporter-gen-Systemen für <i>H. pylori</i> .....	127

<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der globalen transkriptionellen Kontrolle der Gene des <i>H. pylori</i>-Flagellensystems durch unterschiedliche Regulatoren ..128</b>	<b>128</b>
4.2.1	Der alternative $\sigma$ -Faktor FliA ( $\sigma^{28}$ ) kontrolliert zusammen mit dem Anti- $\sigma$ -Faktor FlgM die Expression der Klasse 3-Flagellengene in <i>H. pylori</i> .....	130
4.2.2	Das RpoN-Regulon in <i>Helicobacter pylori</i> besteht zum Großteil aus Flagellen-assoziierten Genen .....	133
4.2.3	Das RpoN-assoziierte Zwei-Komponenten-System FlgR/HP0244 (FlgS) kontrolliert denselben Satz an Genen wie RpoN .....	138
4.2.4	FlhA ist ein übergeordneter Regulator der Transkription der Klasse 2- und 3-Flagellengene .....	141
4.2.5	FlhF fungiert als weiterer früher Regulator der Klasse 2- und 3-Flagellengene .....	144
4.2.6	FlgM vermittelt die transkriptionelle Repression der Klasse 3-Flagellengene in den <i>flhA</i> - und <i>flhF</i> -Mutanten und der Klasse 2-Flagellengene in <i>flhA</i> -Mutanten .....	146
4.2.7	Modell der transkriptionellen Regulation der Gene des Flagellensystems in <i>H. pylori</i> .....	150
<b>4.3</b>	<b>Nutzung der Microarray-Technologie für genomweite Transkriptionsuntersuchungen in <i>H. pylori</i> und anderen Bakterien.....</b>	<b>154</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>158</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>175</b>
<b>6.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>175</b>
<b>6.2</b>	<b>Elektronischer Anhang.....</b>	<b>176</b>
6.2.1	Nicht auf dem <i>H. pylori</i> -PCR-Produkt-Microarray vorhandenen PCR-Produkte (Datei: Anhang 6 2 1.pdf) .....	176
6.2.2	Gesamtliste der Microarray-Ergebnisse (Datei: Anhang 6 2 2.pdf).....	176
6.2.3	Stammspezifisch regulierte Gene <i>flhA</i> (Datei: Anhang 6 2 3.pdf).....	176
6.2.4	Stammspezifisch regulierte Gene <i>flhF</i> (Datei: Anhang 6 2 4.pdf) .....	176
<b>6.3</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>177</b>
<b>6.4</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>178</b>

## Zusammenfassung

*Helicobacter pylori* ist ein an seine ökologische Nische hochgradig angepasstes Bakterium, das den Magen von mehr als 50% der Weltbevölkerung chronisch besiedelt. Bei 10 bis 20% der Infizierten können schwerere Krankheitsverläufe von Magengeschwüren bis hin zu Karzinomen auftreten. Die Chemotaxis-gesteuerte Motilität von *H. pylori*, vermittelt durch ein Bündel von 2-8 polaren Flagellen, ist für die Besiedelung und persistente Infektion des Wirtes essenziell. Während strukturelle Aspekte des Flagellenapparates für *H. pylori* bereits intensiv untersucht wurden, gab es zu Beginn dieser Arbeit zur transkriptionellen Regulation der Flagellenbiogenese nur unvollständige Informationen. Einhergehend mit einer generellen Armut an regulatorischen Elementen in *H. pylori* gab es Hinweise auf eine von den bekannten hierarchischen Systemen anderer Bakterien abweichende Regulation der Flagellenbiogenese. Mehr als 40 Komponenten des Flagellen- und Chemotaxissystems konnten mit Hilfe der beiden sequenzierten *H. pylori*-Genome identifiziert werden, wobei die Gene einzeln oder in kleinen transkriptionellen Einheiten über das gesamte Genom verteilt angeordnet sind. Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Organisation und Vernetzung der transkriptionellen Regulation der Flagellenbiogenese und mögliche Querverbindungen zu anderen zellulären Funktionen in *H. pylori* umfassend charakterisiert werden.

*H. pylori* verfügt über zwei unterschiedliche Flagellinogene, *flaA* und *flaB*, deren Transkription von den beiden alternativen Sigma-Faktoren  $\sigma^{28}$  und  $\sigma^{54}$  kontrolliert wird. Um die transkriptionelle Regulation der beiden Gene in zwei unterschiedlichen Flagellenregulons zu untersuchen, wurde die Genexpression von *flaA* und *flaB* abhängig von der Wachstumsphase analysiert. Mit *flaA*- und *flaB*-Promotorfusionen wurde hier erstmalig ein sensitives, Biolumineszenz-basiertes Reportersystem für Expressionsstudien in *H. pylori* etabliert und genutzt. Die Transkriptmengen der beiden Flagellinogene wurden weiterhin direkt mittels Northern Blot-Hybridisierungen und RT-PCR bestätigt. Es ergab sich eine Wachstumsphasen-abhängige, differentielle Regulation, bei der in Übereinstimmung mit der strukturellen Anordnung der Flagelline im Filament und der Zugehörigkeit der Gene zu zwei Regulationsklassen, das Verhältnis der *flaA*- zur *flaB*-Expression im Verlauf der Wachstumskurve stark anstieg.

Um genomweite Analysen durchführen zu können, wurde in dieser Arbeit zunächst eine Plattform zur Untersuchung von *H. pylori* mit DNA-Microarrays etabliert. Hierzu

wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin ein PCR-Produkt-Microarray mit 1590 *H. pylori*-spezifischen Sonden entwickelt und produziert. Zusätzlich wurde ein industriell gefertigter, Oligonukleotid-basierter, *H. pylori*-Microarray erstmalig verwendet und validiert. Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden verschiedene zentrale Regulatoren der *H. pylori*-Flagellenbiogenese zum ersten Mal auf genomweiter Ebene untersucht. Hierzu zählten die beiden alternativen Sigma-Faktoren FliA und RpoN, der Anti- $\sigma^{28}$ -Faktor FlgM, das RpoN-spezifische Zwei-Komponenten-System FlgS/FlgR und die Flagellen-Basal-körperkomponenten FlhA und FlhF. Bis auf die *fliA*- und *flgM*-Mutanten, die, in Übereinstimmung mit ihrer antagonistischen Funktion, Stummelflagellen bzw. eine leicht erhöhte Flagellenzahl aufwiesen, bewirkten die Mutationen in allen anderen untersuchten Genen einen flagellenlosen unbeweglichen Phänotyp. Die Klassen 2 und 3 des *H. pylori*-Flagellenregulons konnten durch die Analysen des FliA- und des RpoN-Regulons neu definiert und um zehn neue Gene ergänzt werden. Für FlhA und FlhF konnte eine Funktion als übergeordnete Regulatoren der Klassen 2 und 3 des Flagellenregulons gezeigt werden. Des Weiteren wurden 24 Gene einer neuen regulatorischen Zwischenklasse zugeordnet. Diese Gene werden von mehr als einem Promotor kontrolliert und umfassen Flagellen- sowie Nicht-Flagellengene. Durch globale Untersuchungen von Doppelmutanten wurde die komplexe Einbindung des Anti- $\sigma$ -Faktors FlgM in die FlhA- und FlhF-vermittelte transkriptionelle Rückkopplung nachgewiesen.

Basierend auf den Ergebnissen der Arbeit konnte ein neues Modell der Regulation der Flagellenbiogenese für *H. pylori* entwickelt werden. Es beinhaltet drei regulatorische Genklassen mit einer intermediären Klasse, die von den drei *H. pylori*- $\sigma$ -Faktoren  $\sigma^{80}$ ,  $\sigma^{54}$  und  $\sigma^{28}$  zusammen mit den assoziierten Regulatoren FlgS/FlgR und FlgM kontrolliert werden. FlgM vermittelt als Anti- $\sigma^{28}$ -Faktor die transkriptionelle Rückkopplung auf die Klasse 3- und, im Zusammenspiel mit FlhA, auch auf die Klasse 2-Flagellengene. FlhF kontrolliert die Expression der Klasse 2-Flagellengene durch einen FlgM-unabhängigen, bislang ungeklärten Mechanismus. Die  $\sigma^{80}$ -abhängigen Klasse 1-Flagellengene werden, anders als bei vielen anderen Bakterien, mit Stoffwechselgenen koreguliert und beinhalten auch die Flagellomotor- und Chemotaxisgene. Dies spiegelt die Anpassung von *H. pylori* an seine spezifische ökologische Nische wieder, mit der Notwendigkeit, während der gesamten Infektion die Motilität aufrecht zu erhalten.



## Summary

The gastric human pathogen *Helicobacter pylori* is a fastidious bacterium, chronically colonizing the stomach of more than half of the world population, leading to severe diseases in some individuals such as ulcers or gastric cancer. *H. pylori* flagella-driven motility has been shown to be essential for the initial colonization of the human gastric mucosa and for the long-term persistence of the infection. The 2-8 flagella are arranged at one pole of the bacterium and covered by a membranous sheath. While many structural components of the flagellar apparatus had been characterized intensively so far, the detailed mechanisms of transcriptional regulation of flagellar biogenesis in this organism remained to be elucidated. The *H. pylori* flagellar and chemotaxis system comprises more than forty genes. In contrast to the highly ordered gene organization in other organisms, they are scattered along the genome. Consistent with a species-specific scarcity of transcriptional regulatory factors, equivalents of flagellar master regulators of other bacteria seem to be lacking in *H. pylori*. The aim of this study was to comprehensively characterize the network of transcriptional regulation of flagellar biogenesis with possible links to other cell functions in *H. pylori*.

*H. pylori* possesses two different flagellin genes, *flaA* and *flaB*, the transcription of the corresponding genes is controlled by  $\sigma^{28}$  and  $\sigma^{54}$  promoters respectively. To characterize the specific transcriptional regulation of these flagellar genes, which belong to two different regulons, transcript levels were monitored throughout the growth curve of *H. pylori*. A bioluminescence-based reporter gene system was successfully established in *H. pylori* for the first time. It was utilized to measure the activity of the newly constructed *flaA*- and *flaB*-promoter fusions. Furthermore growth-phase dependent transcript levels of the two flagellin genes were confirmed by Northern blot hybridizations and RT-PCR analysis. The results revealed a growth-phase dependent differential transcriptional control of *flaA* and *flaB* in *H. pylori*. In agreement with the structural succession of FlaB and FlaA in the filament, as well as the affiliation of the genes to different flagellar regulons, *flaA* to *flaB* expression ratio was strongly increasing with the progression of the growth curve.

An *H. pylori* microarray working platform was established to be able to perform genome-wide analyses on this organism. A custom made PCR-product microarray with 1590 *H. pylori* specific probes was developed and constructed in cooperation

with the Max-Planck-Institute for Infection Biology in Berlin. In addition, a commercially available *H. pylori*-specific oligonucleotide based microarray system was utilized for the first time and validated. By using the microarray technology, a set of different key regulators of the *H. pylori* flagellar system was analysed on a genome-wide scale for the first time. They are comprising the alternative sigma factors FliA and RpoN, the anti- $\sigma$ -factor FlgM, the RpoN specific two component system FlgS/R and the components of the flagellar basal body, FlhA and FlhF. While the *fliA* mutant revealed a phenotype with truncated flagella, the *flgM* mutant had a slightly enhanced number of flagella, correlating with their antagonistic function. Mutations in all other regulators lead to loss of flagella and motility. Based on the microarray analyses of the FliA and RpoN regulons, the flagellar regulatory classes 2 and 3 could be newly defined and enlarged by ten additional genes. The microarray studies on early flagellar components revealed a role for FlhA and FlhF as functional equivalents to master regulators. They are governing the transcription of flagellar regulatory classes 2 and 3 and a newly defined intermediate regulon. The latter comprised 24 flagellar and non-flagellar genes controlled by more than one promoter. Furthermore, studies on double mutants of the early regulators with the flagellar anti-sigma factor FlgM provided evidence for the complex regulatory interconnection of this factor with the determined flagellar feedback regulation of FlhA and FlhF.

Based on the results of this study, a revised model of regulation pathways of flagellar biogenesis in *H. pylori* could be constructed. It is composed of three regulatory classes of flagellar genes and one intermediate class, governed by the three *H. pylori* specific sigma factors  $\sigma^{80}$ ,  $\sigma^{54}$  and  $\sigma^{28}$  and the associated regulators FlgS/R and FlgM. The transcriptional feedback regulation on class 3 genes is mediated by the anti-sigma factor FlgM, which is also involved in FlhA-dependent transcriptional control of class 2 flagellar genes. FlhF-dependent transcriptional control on class 2 genes is independent from FlgM. In contrast to other organisms, flagellar class 1 genes in *H. pylori* include flagellar motor and chemotaxis components and are coregulated with housekeeping genes. This coincides with the specific ecological adaptation of *H. pylori* to its niche and the necessity for the pathogen to be continuously motile to maintain a persistent infection.

# 1 Einleitung

## 1.1 *Helicobacter pylori*

Die erstmalige *in vitro* Kultivierung und Beschreibung des Magenbakteriums *Helicobacter pylori* durch die Australier Warren und Marshall (Warren & Marshall, 1983), leitete einem Paradigmenwechsel in der gastroenterologischen Medizin ein. In den darauf folgenden Jahren wurde die Besiedelung des zuvor als steril charakterisierten menschlichen Magens durch *H. pylori* nachgewiesen und das optimal angepasste Bakterium als Auslöser für unterschiedliche Erkrankungen des Magens und Zwölffingerdarms identifiziert. Inzwischen ist bekannt, dass über die Hälfte der erwachsenen Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist (Suerbaum & Michetti, 2002). Bei allen Infizierten entwickelt sich eine chronische Gastritis (Magen-schleimhautentzündung), die bei 10-20% der Infizierten zu einem schwereren klinischen Krankheitsbild führt (vgl. 1.1.3). Das auch 20 Jahre nach der Erstbeschreibung anhaltende starke mikrobiologische und klinische Interesse an dem Bakterium spiegelt sich in der ständig steigenden Zahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen wieder (Marshall, 2001). Im Folgenden werden einige der Erkenntnisse der intensiven Forschung zu Pathogenität, Verbreitung und molekulargenetischen Eigenschaften von *H. pylori* dargestellt. Im Mittelpunkt steht die Flagellen-basierte Motilität, die den Kontext der in dieser Arbeit bearbeiteten Fragestellungen bildet.

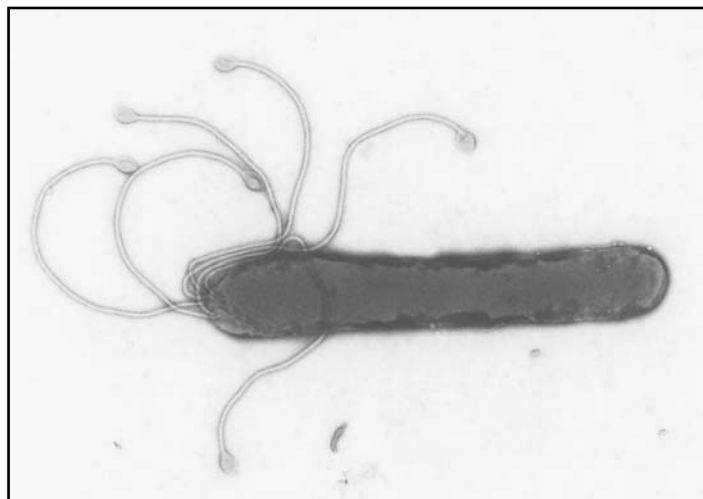
### 1.1.1 Physiologie und Morphologie

*H. pylori* ist ein Gram-negatives ca. 0,5 x 3-5 µm langes Bakterium, dessen Name (helicos, griechisch: die Windung) von seiner spiralförmigen Morphologie mit 1-3 Windungen abgeleitet wurde. Bei einigen Isolaten oder abhängig von der Wachstumsphase in *in vitro* Kultur sind aber auch gerade oder leicht gekrümmte Formen zu beobachten. Phylogenetisch wird *H. pylori* mit weiteren *Helicobacter* Spezies, sowie eng verwandten Arten wie *Campylobacter spp.* und *Wolinella spp.* den ε-Proteobakterien zugeordnet (Goodwin *et al.*, 1989). Der hoch bewegliche Organismus ist polar begeißelt und besitzt 2-8 Flagellen. Sie sind von einer Membranhülle ummantelt ('Flagellenhülle'), die mit der Zellmembran verbunden ist

und eine ähnliche molekulare Zusammensetzung aufweist (Geis *et al.*, 1993). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen weisen die Flagellen meist terminale Verdickungen auf (vgl. Abb. 1; O' Rourke & Bode, 2001). Der Flagellenmembran wird eine Schutzfunktion für das Filament vor Dissoziation in dem sauren Milieu des Magenlumens zugewiesen. Die spiralförmige Form des Bakteriums in Kombination mit dem polaren Flagellenbündel führt zu einer schraubenförmigen Bewegung, die zur besseren Fortbewegung in der viskösen Schleimschicht der gastrischen Mukosa (Magenschleimhaut) beitragen könnte. Die Anzucht von *H. pylori* erfolgt i. d. R. auf komplexen Medien unter Zugabe von 5–10% Pferde- oder Schafsblut in einer mikroaeroben Atmosphäre (2-5% O<sub>2</sub>, 5-10% CO<sub>2</sub>, 0-10% H<sub>2</sub>; Andersen & Wadstrom, 2001). In älteren Kulturen oder unter ungünstigen Kulturbedingungen werden gehäuft kokkoide Formen beobachtet, die auch *in vivo* in humanen Biopsien nachgewiesen werden konnten (Chan *et al.*, 1994). Die Frage, ob es sich dabei um lebensfähige und infektiöse Dauerformen von *H. pylori* handelt, wird kontrovers diskutiert. Einige Analysen leiten aus einem nicht nachweisbaren Membranpotential, verändertem Proteinstoffmuster und Abbauprozessen der ribosomalen RNA bei den kokkoiden Formen einen Übergang zum Zelltod ab (Kusters *et al.*, 1997; Monstein & Jonasson, 2001). Andererseits wurde für *in vitro* nicht kultivierbare kokkoide Formen eine erfolgreiche Infektion von Mäusen und Wiederanzucht von *H. pylori* aus dem Magen nachgewiesen (Cellini *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997).

Stoffwechselfysiologisch ist *H. pylori* den chemoorganischen Mikroorganismen zuzuordnen. Als wichtige Energiequelle kann Glukose über den Entner-Doudoroff-Weg und Pentosephosphatweg abgebaut werden, während Mehrfachzucker nicht transportiert und degradiert werden können, wie experimentelle Arbeiten und Ableitung aus den Genomsequenzen gezeigt haben (Mendz *et al.*, 1993, 1994; Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Doig *et al.*, 1999). Auch die Enzyme für einen verzweigten Tricarbonsäurezyklus, entsprechend dem von *E. coli* unter anaeroben Bedingungen, sind vorhanden (Mendz & Hazell, 1993). *H. pylori* verfügt über eine relativ einfach aufgebaute Elektronentransportkette, die sowohl für die aerobe Atmung mit Sauerstoff als auch anaerob mit Fumarat als terminalen Elektronen-Akzeptor benutzt werden kann (Kelly, 2001). Auch die Fähigkeit, molekularen Wasserstoff als Substrat für die Respiration zu nutzen, wurde kürzlich für *H. pylori* beschrieben (Olson & Maier, 2002). Eine wichtige Stickstoffquelle scheint Harnstoff

zu sein, der mit dem für *H. pylori* charakteristischen und in großer Menge vorhandenen Enzym Urease verfügbar gemacht wird (Williams *et al.*, 1996) (vgl.1.1.3). Auch Aminosäuren können mittels verschiedener Amidasen verwertet werden (Stark *et al.*, 1997). Wahrscheinlich als Anpassung an seine ökologische Nische im menschlichen Magen, ist *H. pylori* für eine große Anzahl an Aminosäuren auxotroph (Nedenskov, 1994; Reynolds & Penn, 1994).



**Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori* N6.** Zu erkennen sind die polar angeordneten Flagellen mit Flagellen-hülle und terminalen Membranverdickungen.

TEM-Aufnahme zur Verfügung gestellt von Shin-Ichi Aizawa.

### 1.1.2 Genetische Eigenschaften

Ein enormer Vorteil für die Studien von *H. pylori* ist die Verfügbarkeit der kompletten Genomsequenzen von zwei unabhängigen Patientenisolaten des Bakteriums (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Die im Vergleich zu ubiquitären Mikroorganismen geringen Genomgrößen von weniger als 1,7 Megabasen ist ein weiteres Indiz für die evolutionäre Anpassung an den Menschen als Wirt. Mit der Veröffentlichung der zweiten Sequenz, basierend auf dem amerikanischen Isolat J99 (Alm *et al.*, 1999) wurde u. a. die schon zuvor beschriebene starke intraspezifische genetische Variabilität des Bakteriums bestätigt. Während der durchschnittliche G+C Gehalt der beiden Stämme mit 39% annähernd identisch ist, unterscheiden sich die Genome in anderen Beziehungen substantiell. So besitzt jedes Isolat 6-7% stammspezifische Gene und nur 85% der codierenden Sequenzen in beiden Chromosomen besitzen dieselbe Organisation in Bezug auf ihre Nachbargene (Alm *et al.*, 1999). Des Weiteren gibt es große Unterschiede in der Nukleinsäuresequenz, so dass zwischen den zwei Genomen kein einziges Genpaar orthologer Gene zu 100% identisch ist, und nur 0,6% der orthologen Gene eine DNA-Identität von > 98% aufweisen. Hierbei

liegt die durchschnittlichen Nukleotid-Identität für alle orthologen Gene bei 92,6% (Doig *et al.*, 1999). Bei den Unterschieden handelt es sich aber zumeist um `stille` Mutationen in den dritten Basen der Aminosäurecodons, und die Aminosäuresequenzen sind deutlich konservierter. Mit unterschiedlichen molekular-genetischen Methoden, wie z. B. Gensequenzierungen (Kansau *et al.*, 1996; Achtman *et al.*, 1999), `DNA fingerprinting` (Majewski & Goodwin, 1988; Akopyanz *et al.*, 1992; Go *et al.*, 1996) oder MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis; Go *et al.*, 1996; Hazell *et al.*, 1997), wurden schon zuvor ungewöhnlich große Unterschiede in den Genomen von verschiedenen *H. pylori*-Stämmen beschrieben. Als Ursachen hierfür wurden u. a. erhöhte Mutationshäufigkeiten, unvollständige DNA-Reparatur-systeme und eine starke Rekombinationshäufigkeit beschrieben (Marshall *et al.*, 1998; Suerbaum *et al.*, 1998a). Mittels der DNA-Microarray-Technologie wurden ebenfalls Studien mit unterschiedlichen klinischen *H. pylori*-Isolaten durchgeführt, die die genetische Diversität des Organismus bestätigten (Salama *et al.*, 2000). Daraus resultiert eine panmiktische (nicht-klonale) Populationsstruktur von *H. pylori* (Salaun *et al.*, 1998; Suerbaum *et al.*, 1998b; Achtman *et al.*, 1999). Die genetische Variabilität beruht neben Mutationen und intragenomischen Umlagerungen auf der Aufnahme und Integration von Fremd-DNA, dem sog. `horizontalen Gentransfer`. Bewiesen ist die DNA-Aufnahme von anderen *H. pylori*-Stämmen während einer schon vorhandenen Infektion (Kersulyte *et al.*, 1999; Falush *et al.*, 2001). Bereiche signifikant unterschiedlichen G+C Gehalts im Genom, wie beispielsweise die *cag*-Pathogenitätsinsel (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999), legen auch horizontalen Gentransfer aus anderen Quellen nahe. Mechanismen zur DNA-Aufnahme sind zum einen die natürliche Kompetenz des Bakteriums (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990; Haas *et al.*, 1993; Tsuda *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993). Auch die Fähigkeit zur Konjugation von *H. pylori* wird diskutiert, bislang wurde sie nur *in vitro* beschrieben (Heuermann & Haas, 1998; Kuipers *et al.*, 1998).

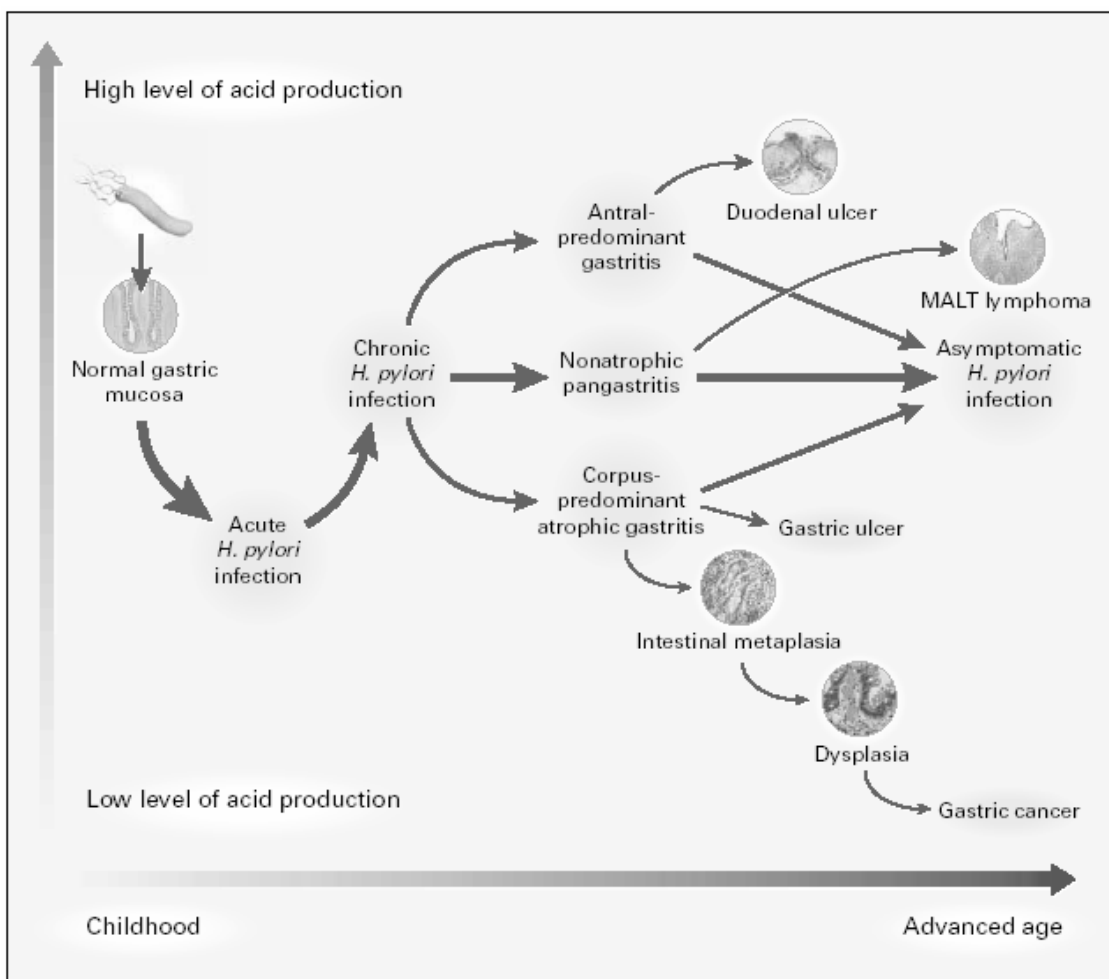
Eine weitere wichtige Eigenschaft, die aus den Genomsequenzen von *H. pylori* abgeleitet werden kann, ist ein Mangel an potenziellen transkriptionellen Regulatoren im Vergleich zu den meisten anderen gram-negativen Mikroorganismen. So gibt es nur drei Sigma-Faktoren der RNA Polymerase, den konstitutiven `Housekeeping`-Faktor RpoD ( $\sigma^{80}$ ) und die beiden alternativen Sigma-Faktoren RpoN ( $\sigma^{54}$ ) und FliA ( $\sigma^{28}$ ). Die konservierten, in die bakterielle Stress-Antwort involvierten Sigma-Faktoren

RpoS ( $\sigma^s$ ) und RpoH ( $\sigma^{32}$ ) fehlen. Von der wichtigen bakteriellen Klasse der Zwei-Komponenten-Regulations-Systeme zur Genregulation in Antwort auf Umweltreize, finden sich lediglich vier Paare von Histidinkinase und `Response Regulator` und zwei `Response-Regulatoren` ohne zugehörige Sensor kinase in den Genomen von *H. pylori* (Beier & Frank, 2000). Im Vergleich dazu besitzt *E. coli* etwa 30 Zwei-Komponenten-Systeme (Mizuno, 1997). Aufgrund der relativen Armut an transkriptionellen Regulatoren wird diskutiert, ob in *H. pylori* verstärkt alternative Mechanismen zur koordinierten Regulation der Genexpression genutzt werden. So besitzt *H. pylori* bspw. eine ungewöhnlich große Anzahl an Nukleinsäure-Restriktions- und Modifikationssystemen, die eine Rolle bei der Genregulation spielen könnten (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2000; Vitkute *et al.*, 2001). Eine andere Auffälligkeit ist eine Häufung von homopolymeren Sequenzen im Genom (Saunders *et al.*, 1998), die zu Leserasterverschiebungen und dadurch zu An- oder Abschaltungen von Genen führen könnten, sog. `slipped strand mispairing`. Dies wurde bereits für einige *H. pylori*-Gene gezeigt, wie LPS-Gene (Appelmelk *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999), ein äußeres Membranprotein (Peck *et al.*, 1999) oder *fliP*, ein Gen welches für eine Komponente des flagellären Exportapparates kodiert (vgl. 1.2.2), und dessen Abschaltung einen flagellenlosen Phänotyp bewirkt (Josenhans *et al.*, 2000). Ein weiterer möglicher alternativer Mechanismus der Genregulation ist die Kontrolle der Transkription in Abhängigkeit von der DNA-Topologie (`supercoiling`), für die ein Einfluß auf die Expression von *H. pylori*-Flagellengen gen gezeigt werden konnte (Suerbaum *et al.*, 1998a; Ye *et al.*, 2004). Ein direkter Nachweis der Involvierung dieser möglichen alternativen Regulationsmechanismen in die koordinierte Genregulation steht allerdings bislang noch aus.

### 1.1.3 Pathogenität

Eine *H. pylori*-Infektion, die in den allermeisten Fällen in der frühen Kindheit erworben wird, führt nach einer kurzen akuten Infektion zu einer chronischen gastrischen Infektion, die in 80-90% der Fälle ohne schwerere Krankheitsbilder verläuft (Suerbaum & Michetti, 2002). Bei den restlichen 10-20% der Infizierten kann es zu schwerwiegenderen Komplikationen in Folge der Besiedelung der Magenschleimhaut (Mukosa, Lamina propria) bis hin zur Entstehung eines Magenkarzinoms in 0,1-4% der Fälle führen (Uemura *et al.*, 2001). In diesem

Zusammenhang wurde *H. pylori* 1994 von der Weltgesundheitsbehörde WHO als Karzinogen erster Klasse eingestuft (Dixon & Ectors, 1995). Die Infektion durch *H. pylori* ist ohne Therapie in nahezu allen Fällen chronisch, obwohl der menschliche Körper mit einer starken lokalen und systemischen Immunantwort reagiert (Rathbone *et al.*, 1986), die auch zum serologischen Nachweis von *H. pylori* genutzt werden kann. Der klinische Verlauf einer schweren *H. pylori* Infektion ist in hohem Maße abhängig sowohl von bakteriellen Faktoren wie auch von individuell verschiedenen Voraussetzungen des Patienten (Blaser & Berg, 2001; Nogueira *et al.*, 2001; vgl. Abb. 2).



**Abb. 2. Verlauf einer *H. pylori*-Infektion (aus Suerbaum & Michetti, 2002).** In der Regel wird *H. pylori* in der frühen Kindheit erworben. Eine akute *H. pylori* Infektion verursacht eine vorübergehende Hypochlorhydrie (Anstieg des pH-Wertes im Magen) und wird kaum diagnostiziert. In fast allen Infizierten Personen entwickelt sich eine chronische Gastritis, die in 80-90% der Fälle asymptomatisch verläuft. Der weitere klinische Verlauf variiert in Abhängigkeit von Bakterien- und Wirtsfaktoren. Patienten mit einer höheren Säureproduktion entwickeln eher eine antrale Gastritis, die eine Prädisposition für Duodenumgeschwüre nach sich zieht. Patienten mit niedrigem Säurehaushalt bekommen eher eine Gastritis im Magencorpus, die eine höhere Prädisposition zur Entwicklung von Magengeschwüren nach sich zieht und in wenigen Fällen zu einem Magenkarzinom führen kann. Eine *H. pylori*-Infektion induziert in der Magenschleimhaut die Bildung von MALT (mucosa associated



lymphoid tissue). Hieraus hervorgehende maligne Lymphome sind eine weitere seltene Komplikation einer *H. pylori*-Infektion.

Bei der Mehrheit der mit *H. pylori* infizierten Personen ist die Infektion innerhalb des Magens im Bereich des Antrums lokalisiert. Dies scheint einherzugehen mit einer erhöhten Säureproduktion im Magen und kann den häufigsten Typ des symptomatischen klinischen Verlaufs nach sich ziehen, das *Ulcus duodeni* (Zwölffingerdarm-Geschwür). Eine Corpus-predominante Gastritis führt dagegen eher zu Magengeschwüren (*Ulcerata ventriculi*) und in einigen Fällen zu einem Magenkarzinom. Das Risiko, aufgrund einer *H. pylori*- Infektion Geschwüre im Magen oder Duodenum zu entwickeln, scheint regional unterschiedlich zu sein und reicht von 3% in den USA bis zu 25% in Japan (Schlemper *et al.*, 1996; Feldman, 2001). Im Zuge der körpereigenen Immunantwort kann es, ausgelöst durch *H. pylori*, zur Einwanderung von B-Lymphozyten in die Mukosa kommen, wodurch eine Ansammlung von lymphatischem Gewebe in der Magenschleimhaut (MALT) und in diesem Zuge die Entwicklung bösartiger MALT-Lymphome auftreten kann. Das Auftreten von MALT-Lymphomen geht zu 72-98% einher mit einer *H. pylori*-Gastritis (Siewert & Stein, 1998; de Manzoni *et al.*, 2001).

Es stehen heutzutage wirksame Therapien zur kompletten Eradikation des Pathogens verfügbar. Hierzu zählen vor allem erfolgreich angewandte sog. `Tripel-Therapien` aus einem Protonenpumpenhemmer in Kombination mit zwei unterschiedlichen Antibiotika (Übersicht siehe Suerbaum & Michetti, 2002). Aufgrund steigender Antibiotikaresistenzen unter *H. pylori*-Isolaten (Houben *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2002), sind aber auch andere Strategien zur Bekämpfung einer Infektion vonnöten, wie die Entwicklung von speziellen Vakzinen (Suerbaum & Josenhans, 1999; Prinz *et al.*, 2003). Hier sind bereits Erfolge in Tierversuchen zu verzeichnen (Marchetti *et al.*, 1995; Dubois *et al.*, 1998; Marchetti *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999), die erfolgreiche Anwendung im Menschen ist bislang aber noch nicht gelungen (Michetti *et al.*, 1999).

### 1.1.4 Virulenzfaktoren

Bakterielle Virulenzfaktoren können definiert werden als einzelne Faktoren oder Merkmale, die für die Wirtsschädigung durch den Organismus unabdingbar sind, und deren Verlust zu einer signifikanten Herabsetzung der Pathogenität des Bakteriums beitragen (Salyers & Whitt, 1994). Hierzu zählen also Effektoren, die direkt das

Wirtsgewebe oder Immunsystem schädigen, sowie auch indirekte Komponenten, die für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Infektion und dem Überleben im Wirt unabdingbar sind. Für *H. pylori* sind in den Jahren seit der Entdeckung und ersten Charakterisierung eine Reihe solcher Faktoren beschrieben und detailliert molekulargenetisch analysiert worden (Übersichtsartikel siehe Suerbaum & Josenhans, 1999; Prinz *et al.*, 2003).

**Urease.** Das Enzym Urease wird von *H. pylori* in großen Mengen gebildet, und kann bis zu 15% der gesamten zellulären Proteine ausmachen (Mobley *et al.*, 1995). Das funktionelle Holoenzym besteht aus je sechs Untereinheiten der Proteine UreA und UreB sowie zwei Nickelatomen, die für die Aktivität notwendig sind. Das Enzym ist in der Lage, die Spaltung von Harnstoff in Kohlendioxid und Ammonium zu katalysieren. Eine *H. pylori* spezifische Eigenschaft ist, dass die Urease nicht nur zytoplasmatisch, sondern auch außerhalb der Zelle gelöst und membrangebunden nachgewiesen werden kann. Außerdem gibt es spezielle Harnstoff-Kanäle, gebildet aus dem Protein Urel, die in der inneren Membran liegen und durch die bei niedrigen pH (< 6,5) Harnstoff in die Zelle transportiert wird (Weeks *et al.*, 2000). Die von der Urease abgespaltenen Ammoniumionen können nach außen diffundieren und so den externen pH-Wert erhöhen, wodurch ein kurzfristiges Überleben des Bakteriums im sauren Milieu der Magenflüssigkeit ermöglicht wird. In verschiedenen Arbeiten wurde die Urease *in vivo* als essenziell für die Kolonisation des Wirts nachgewiesen (Eaton & Krakowka, 1994; Tsuda *et al.*, 1994; Kavermann *et al.*, 2003). Auch durch die Hemmung der Säuresekretion in den Wirtstieren konnte die Fähigkeit der Urease-negativen Mutanten zur Kolonisation nicht wieder hergestellt werden, so dass *in vivo* noch andere Funktionen des Enzyms neben der Pufferung des Mediums eine Rolle spielen müssen. Eine Möglichkeit ist hier die Nutzung von Harnstoff als Stickstoffquelle. Der Urease wurde des Weiteren eine direkte zytotoxische Rolle gegenüber gastrischen Epithelzellen nachgewiesen (Smoot *et al.*, 1990), wahrscheinlich durch die Bildung von Ammoniumhydroxid aus den freigesetzten Ammoniumionen und Wasser.

**Motilität und Flagellen.** Ein weiterer essenzieller Faktor für die Kolonisierung der Mukosa *in vivo* ist die Flagellen-getriebene Motilität von *H. pylori* (Eaton *et al.*, 1996; Porwollik *et al.*, 1999; Kavermann *et al.*, 2003). Dabei spielt die Beweglichkeit sowohl bei der initialen Kolonisierung als auch bei der Persistenz in der Magenschleimhaut

beim Entgegenwirken von Abstoßungsprozessen eine Rolle. Die für *H. pylori* spezifische Membranhülle (vgl.1.2.2) dient wahrscheinlich dem Schutz des säurelabilen Filaments vor dem niedrigen pH-Wert im Magenmilieu (Josenhans & Suerbaum, 2001).

Einige Beispiele für weitere tier- und pflanzenpathogene Bakterien, für die Flagellenvermittelte Motilität als notwendiger Kolonisierungsfaktor *in vivo* nachgewiesen wurde, sind *Campylobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bartonella bacilliformis*, *Azospirillum brasilense* oder *Vibrio anguillarum* (Morooka *et al.*, 1985; Drake & Montie, 1988; Scherer *et al.*, 1993; O'Toole *et al.*, 1996; VandeBroek *et al.*, 1998; Übersichtsartikel siehe Ottemann & Miller, 1997; Josenhans & Suerbaum, 2001). Flagellen wurden ebenfalls als Virulenzfaktor im Sinne der Vermittlung von Adhäsion an infizierte Zellen beschrieben, wie es z.B. bei *Salmonella* gezeigt wurde (Allen-Vercoe & Woodward, 1999) und auch für *H. pylori* diskutiert wurde (Foyne *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang könnte auch die Flagellenhülle mit speziellen Membranproteinen eine Rolle spielen. Kürzlich wurde mit dem 'Toll like Rezeptor 5' (TLR5) ein Rezeptor charakterisiert, der bei Säugetieren eine angeborene Immunantwort auf Kontakt mit bakteriellem Flagellin vermittelt (Hayashi *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu wurde für die beiden *H. pylori*-Flagelline FlaA und FlaB gezeigt, dass sie kaum die Fähigkeit haben, diesen Rezeptor spezifisch zu stimulieren (Lee *et al.*, 2003). Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine spezielle Anpassung des Bakteriums an die chronische Persistenz im Wirt.

**Adhärenz.** Ein weiterer wichtiger Faktor, der zur Pathogenität von *H. pylori* und zur Persistenz im Magen beiträgt, ist die Fähigkeit des Bakteriums, spezifisch an Magenepithelzellen zu binden. In histologischen Schnitten infizierter Magenepithelzellen und an *in vitro* infizierten Zelllinien wurde schon länger die Adhärenz des Bakteriums und zum Teil die Ausbildung von speziellen Adhäsionsplattformen ('adhesion pedestals') durch die Zellen beobachtet (Hessey *et al.*, 1990; Clyne & Drumm, 1993; Dytoc *et al.*, 1993; Noach *et al.*, 1994). Mittlerweile wurden einige molekulare Mechanismen und Faktoren der *H. pylori*-Adhäsion aufgeklärt. Die Bindung des Bakteriums an die Epithelzelle erfolgt mit Hilfe von Adhäsinen, einer diversen Gruppe, die Proteine, Glykokonjugate und Lipide umfasst (Gerhard *et al.*, 2001; Testerman *et al.*, 2001). Das am besten charakterisierte Adhesin ist BabA, ein Mitglied der großen Gruppe von über 30 *H. pylori*-spezifischen

äußeren Membranproteinen (Alm *et al.*, 2000), welches an fukosyliertes Lewis<sup>b</sup>-Blutgruppenantigen auf den Zellen bindet (Ilver *et al.*, 1998). Die klinische Relevanz des Proteins wurde u. a. durch das gehäufte Auftreten von *babA2* (kodierendes Gen für BabA) -positiven *H. pylori*-Stämmen in Patienten mit Geschwüren und Magenkrebs nachgewiesen (Gerhard *et al.*, 1999). Beispiele für andere Adhäsine aus derselben Familie sind SabA (Mahdavi *et al.*, 2002) und die Lipoproteine AlpAB (Odenbreit *et al.*, 1999), bei denen die Bindungsmechanismen z. T. aufgeklärt sind.

**VacA Zytotoxin.** Bereits einige Jahre nach der Erstbeschreibung des Organismus wurde beobachtet, dass Zellüberstände von *H. pylori in vitro*-Kulturen eine massive degenerative Vakuolisierung in verschiedenen Tumor-Zelllinien auslösten (Leunk *et al.*, 1988). Dieses Phänomen kann mit der Anwesenheit des vakuolisierenden Zytotoxins VacA erklärt werden (Montecucco *et al.*, 2001). Das Protein bildet nach Sekretion und Prozessierung außerhalb des Bakteriums hexa- oder heptamere Strukturen, die durch eine Konformationsänderung bei Exposition gegenüber Säure als aktives Toxin wirksam werden (de Bernard *et al.*, 1995). Als solches können sie als Poren in Epithelzellmembranen inserieren, durch die Bikarbonat und organische Anionen aus der Zelle gelangen (Szabo *et al.*, 1999), wo sie von *H. pylori* als Nährstoffe genutzt werden könnten. VacA kann auch in die mitochondriale Membran inserieren und durch Cytochrom C-Efflux die Apoptose der Zelle induzieren (Galmiche *et al.*, 2000). Das für VacA kodierende Gen zeichnet sich durch eine hohe Sequenzvariabilität in unterschiedlichen Stämmen aus, wobei einige *vacA*-Varianten z. T. mit schwereren Krankheitsbildern assoziiert zu sein scheinen (Atherton *et al.*, 1997). Die genaue Rolle von VacA in der Pathogenese von *H. pylori* ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Es wurde aber gezeigt, dass VacA-negative Mutanten im Tiermodell einen Selektionsnachteil gegenüber dem Wildtyp aufweisen (Salama *et al.*, 2001).

**Cag-Pathogenitätsinsel.** Ein 37 Kilobasen großer Bereich der *H. pylori*-Genomsequenzen erfüllt wesentliche Eigenschaften einer sog. bakteriellen Pathogenitätsinsel. Hierzu gehören ein abweichender G+C-Gehalt und terminale repetitive Sequenzen (Hacker *et al.*, 1997). Es handelt sich dabei um die *cag*-Pathogenitätsinsel (Censini *et al.*, 1996). Namensgebend war dabei das Gen *cagA* (cytotoxin-associated gene A), für dessen Anwesenheit ursprünglich zusammen mit der von *vacA* (s.o.) eine positive Korrelation mit einem schwereren Krankheitsverlauf

einer *H. pylori*-Infektion gefunden wurde (Covacci *et al.*, 1993). Für westliche Länder wurde gezeigt, dass ca. 70% aller *H. pylori*-Stämme *cagA*-positiv sind, während mehr als 90% der Stämme aus Patienten mit Magen- oder Duodenalgeschwüren das *cagA*-Gen besitzen (Tummuru *et al.*, 1993). Neben dem Markergen *cagA* befinden sich Gene für ein Typ IV-Sekretionssystem auf der *cag*-Pathogenitätsinsel (Akopyants *et al.*, 1998; Odenbreit *et al.*, 2000). Mit diesem Typ IV-Transportsystem kann das 120 kDa Protein CagA in die Magenepithelzelle eingeschleust werden (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000). CagA wird in der Wirtszelle spezifisch phosphoryliert (Stein *et al.*, 2002) und bindet an und aktiviert die SHP-2 Tyrosinphosphatase (Higashi *et al.*, 2002). Einige Effekte, wie die Induktion der IL-8 Sekretion in der Wirtszelle scheinen unabhängig von einer CagA-Translokation durch das Typ IV-Sekretionssystem stattzufinden (Fischer *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2002). Ob dabei Strukturen des Transportapparates selbst oder noch unbekannte sezernierte Substrate eine Rolle spielen, wird zu Zeit diskutiert.

Weitere Virulenzfaktoren, auf die hier nicht detailliert eingegangen wird, beinhalten Mechanismen der molekularen Mimikry und der Immunmodulation durch *H. pylori* (Appelmek *et al.*, 1998). Auch die Möglichkeit der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase (SOD) könnten die Fitness und Überlebensfähigkeit des Bakteriums im Wirt erhöhen. Das gleiche gilt für Komponenten der allgemeinen bakteriellen Hitzeschockantwort, die ebenfalls in *H. pylori* identifiziert werden konnten (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999).

### **1.1.5 Epidemiologie und Übertragung**

*H. pylori* besiedelt chronisch die Magenschleimhaut von mehr als der Hälfte der Weltbevölkerung, wobei die Prävalenz weltweit und innerhalb sozialer Schichten eines Landes enorm schwankt (Woodward *et al.*, 2000; Feldman *et al.*, 2001). So sind ca. 80% der erwachsenen Bevölkerung der sog. Entwicklungsländer mit *H. pylori* infiziert, während der Anteil in den Industriestaaten bei 20-50% liegt (Suerbaum & Michetti, 2002). Die Infektion wird in den allermeisten Fällen in der frühen Kindheit erworben, wobei Lebensumstände und hygienischer Standard eine wichtige Rolle bei der Übertragung spielen (Mitchell *et al.*, 1992). So wurde eine umgekehrte Korrelation zwischen sozio-ökonomischem Status und Prävalenz von *H. pylori*-Infektionen in der Kindheit nachgewiesen (Malaty & Graham, 1994). Der genaue

Übertragungsweg ist nach wie vor umstritten. Die Aufnahme erfolgt aber durch orale Aufnahme der Bakterien, und enger Kontakt innerhalb von Familien begünstigt die Infektion (Rothenbacher *et al.*, 1999; Miyaji *et al.*, 2000). In der frühen Kindheit scheinen im Vergleich zu erwachsenen Personen auch Spontanheilungen von einer *H. pylori*-Infektion häufiger aufzutreten (Redlinger *et al.*, 1999; Tindberg *et al.*, 1999). Ein signifikantes natürliches Reservoir für *H. pylori* wurde bislang trotz intensiver Forschung nicht eindeutig nachgewiesen. Das reduzierte Genom und die anspruchsvolle Lebensweise in Anpassung an die ökologische Nische machen ein Überleben in anderen Habitaten eher unwahrscheinlich. Die enge Bindung an den Menschen als Wirt von *H. pylori* zeigt auch eine kürzlich erschienene Studie, in der anhand von Populationsstrukturen heutzutage auftretender *H. pylori*-Isolate von Patienten aus unterschiedlichen Kontinenten menschliche Migrationsbewegungen innerhalb von mehr als 12000 Jahren bis zur Gegenwart nachvollzogen werden konnten (Falush *et al.*, 2003).

### 1.2 Bakterielle Motilität

Beweglichkeit ist eine biologische Eigenschaft, die vor allem bei heterotrophen Organismen in verschiedensten Entwicklungsformen ubiquitär verbreitet ist. Auch viele Prokaryoten sind in der Lage, sich durch gerichtete Bewegung (`Taxis`) fortzubewegen. Das dient vor allem dem Zweck, günstige ökologische Nischen zu erreichen, um optimale Energie- oder Nährstoffversorgung zu gewährleisten oder ungünstigen Umweltbedingungen auszuweichen. Abhängig von unterschiedlichen Stimuli gibt es eine Reihe von verschiedenen Bezeichnungen für die Taxis, wie Chemotaxis (auf lösliche Substanzen), Aerotaxis (Sauerstoff), Osmotaxis (Osmolarität), Phototaxis (Licht), Thermotaxis (Temperatur) oder Galvanotaxis (Spannung) u. a. (Lengeler & Postma, 1999). Hierbei wird der äußere Reiz durch spezielle Rezeptoren in die Zelle weitergeleitet und katalysiert dort eine Veränderung der Bewegung (vgl.1.2.1). Bakterielle Motilität beruht bei den meisten untersuchten Arten auf der Anwesenheit von Flagellen, die eine Fortbewegung in flüssigem Medium vermitteln. Es gibt hier aber auch andere Arten der aktiven Fortbewegung von Bakterien wie z.B. auf feuchten Flächen die ungleichmäßige `twitching motility` bei *P. aeruginosa* oder *Myxococcus xanthus*, die mit Hilfe von Typ IV-Pili vermittelt wird, oder die gleitende (`gliding motility`) bei *M. xanthus*, deren Mechanismus noch

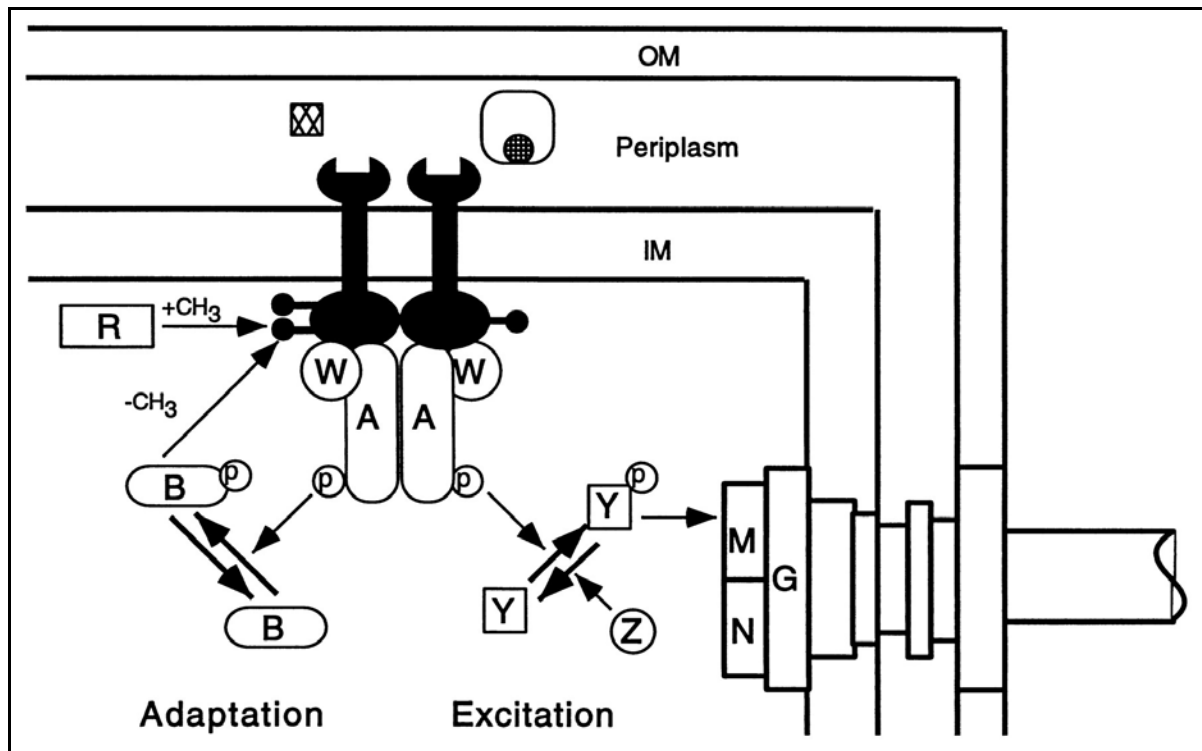
unklar ist (Bradley, 1980; Merz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Harshey, 2003). Einige fakultativ intrazelluläre Bakterien, wie z.B. *Listeria monocytogenes* machen sich Wirtsproteine wie Aktin zur eigenen Fortbewegung im Zytoplasma der Wirtszelle zu Nutze (Sanders & Theriot, 1996; Dramsi & Cossart, 1998).

Ist bei pathogenen Bakterien die Motilität essenziell für die Besiedelung des Wirtes und die Aufrechterhaltung der Infektion durch das Entgegenwirken von Ausscheidungs- und anderen Abwehrmechanismen, so wird sie, wie bei *H. pylori*, zu dessen Virulenzfaktoren gerechnet (vgl. 1.1.4). Die wichtige Stellung der Beweglichkeit für viele Bakterien spiegelt sich auch in dem großen energetischen Aufwand wieder, der für Aufbau und Unterhalt des Systems nötig sind. Für das hier ausführlicher behandelte Flagellensystem und die damit eng zusammenhängende Chemotaxis wurde beispielsweise für Salmonellen berechnet, dass sie ca. 5% ihrer Stoffwechselenergie für die Motilität aufwenden (Wilson & Beveridge, 1993).

### 1.2.1 Molekulare Mechanismen der Chemotaxis

Die Regulation der Chemotaxis wird seit vielen Jahren untersucht und ist am intensivsten für die Modellorganismen *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium erforscht (Boyd & Simon, 1982; Amsler & Matsumura, 1995; Macnab, 1995; Manson *et al.*, 1998; Aizawa, 2000). Flagellen-vermittelte bakterielle Bewegung wird bestimmt von einer Aufeinanderfolge von Schwimmen in einer Richtung und zufälligem Taumeln zur Richtungsänderung. Hierbei beruht das gerade Schwimmen auf einer Rotation der Flagellen entgegen dem Uhrzeigersinn (counterclockwise, CCW) und das Taumeln auf Drehung im Uhrzeigersinn (clockwise, CW). Die Frequenz des Taumelns wird bestimmt durch die Komponenten der chemotaktischen Signalübertragung, die Reize wahrnehmen und auf den Flagellenmotor übertragen können (vgl. Abb. 1). An der Spitze der Kaskade stehen die Rezeptoren (transducer; methyl accepting chemotaxis proteins, MCPs). Diese sind i. d. R. membranständig und verfügen über drei Domänen, eine Transmembrandomäne mit zwei  $\alpha$ -Helices, die dazwischenliegende periplasmatische Rezeptordomäne und eine große cytoplasmatische Domäne, die sich aus einem Teil mit vier bis fünf methylierbaren Glutamatresten und einem Signalweiterleitungsbereich zusammensetzt. Im Modell bilden die Rezeptoren als Dimer einen temporären Komplex mit dem Protein CheW und der Histidin-spezifischen Autokinase CheA.

CheA hat Kinaseaktivität für CheY, welches im phosphoryliertem Zustand mit der Flagellenmotor-Komponente FliM interagieren kann, und so das Taumeln induziert. Die von der Kinase CheA aktivierte Methylesterase CheB ist in den Prozess der Adaptation an das chemotaktische Signal involviert. Eine Übersicht des Zusammenspiels von Reizweiterleitung und Anpassung bei der chemotaktischen Signalübertragung ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3.** Die chemotaktische Signalübertragung (aus Manson *et al.*, 1998). Die membranständigen Chemorezeptoren (schwarz) bilden als Dimer einen ternären Komplex mit je zwei CheA (A) und CheW (W) Proteinen und stimulieren die Autokinase Aktivität von CheA (A). CheA-P kann die Phosphatgruppe auf CheY (Y) übertragen. CheY-P interagiert mit FliM (M), einer Komponente des Flagellenmotors und induziert die Rotationsänderung des Motors in den Uhrzeigersinn (clockwise, CW). CheY-P wird dephosphoryliert durch CheZ (Z). CheR (R) ist eine konstitutiv aktive Methyltransferase, die Glutamatkomponenten der cytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren methyliert. Die Methylesterase CheB (B) wird durch Phosphorylierung von CheA-P aktiviert und entfernt die Methylreste von den Rezeptoren. Bei der Reizübertragung (Excitation) binden einige Lockstoffe (gestreiftes Quadrat) direkt an die periplasmatischen Domänen der Rezeptoren, andere (gestreifter Kreis) interagieren im Komplex mit Substrat-Bindeproteinen mit den Rezeptoren. Die Bindung von Lockstoffen inhibiert die Autokinaseaktivität von CheA und führt so nicht zu einer Rotationsumkehr des Flagellenmotors durch CheY-P. Bei der Anpassung (Adaptation) an den chemotaktischen Reiz wird durch die herabgesetzte Autokinaseaktivität von CheA auch CheB in geringerem Maße phosphoryliert, was eine geringere Demethylierung der Rezeptoren zur Folge hat. Dies führt zur stärkeren Methylierung der cytoplasmatischen Rezeptordomänen, was die Kinaseaktivität von CheA steigert und somit die Reizweiterleitungskaskade und die Rotationsänderung der Flagellen induziert. Abkürzungen: OM, äußere Membran; IM, innere Membran; G, FliG; N, FliN; P, Phosphat; CH<sub>3</sub>, Methylreste.

Für *H. pylori* können in den beiden Genomen von 26695 und J99 etwa zehn Gene dem Chemotaxis-System zugeordnet werden (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999;



Josenhans & Suerbaum, 2000; Spohn & Scarlato, 2001). Darunter fallen drei MCPs, die Ähnlichkeit zu MCPs in den Enterobakterien haben, wie auch Orthologe zu den Genen *cheA*, *cheY* und *cheW*. Zusätzlich gibt es Gene, die für ein CheAY-Fusionsprotein kodieren, sowie drei Kopien von *cheV*, einem Homolog zu einem *Bacillus subtilis*-Gen, welches für ein Protein mit einer CheW- und CheY-Domäne kodiert. Interessanterweise konnten keine Gene mit Homologien zu den Proteinen der chemotaktischen Adaptation bei *E. coli*, *cheB* und *cheR*, identifiziert werden. Für *H. pylori* wurde bislang positive Chemotaxis auf Harnstoff, Natriumbikarbonat und Natriumchlorid beschrieben (Mizote *et al.*, 1997), wobei die Chemotaxis in viskösem Medium, wie es auch im natürlichen Habitat, der Magenschleimhaut, zu finden ist, z.T. deutlich erhöht war (Nakamura *et al.*, 1998). Keine Beeinträchtigung der Chemotaxis *in vitro* konnte nach Mutation der MCP-Gene *tlpA* und *tlpC* festgestellt werden, wohl aber eine schlechtere Kolonisierung im Mausmodell, was auf eine Rolle bei der Infektion schließen lässt (Andermann *et al.*, 2002). Funktionelle Untersuchungen zu den *cheV*-Genen haben eine Beeinträchtigung des Schwärmverhaltens bei *cheV1*-Mutation, nicht aber für die Gene *cheV 2* und *3* ergeben (Pittman *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte die essenzielle Rolle von CheY und CheAY *in vitro* für die Chemotaxis und *in vivo* für die Kolonisierung im Mausmodell nachgewiesen werden (Beier *et al.*, 1997; Foynes *et al.*, 2000). Mit einem *in vivo*-Modell für *Helicobacter spp.*, das Manipulation und Probenahme im Magen von betäubten Mäusen erlaubt (Schreiber *et al.*, 1999) sind nun auch sehr detaillierte Untersuchungen zur Chemotaxis von *H. pylori in vivo* möglich. Kürzlich haben Arbeiten in diesem Modell zum Ergebnis geführt, dass sich *H. pylori* am pH-Gradienten im Magenschleim orientieren kann (Schreiber *et al.*, 2004).

### 1.2.2 Struktur und Funktion des Flagellenapparates

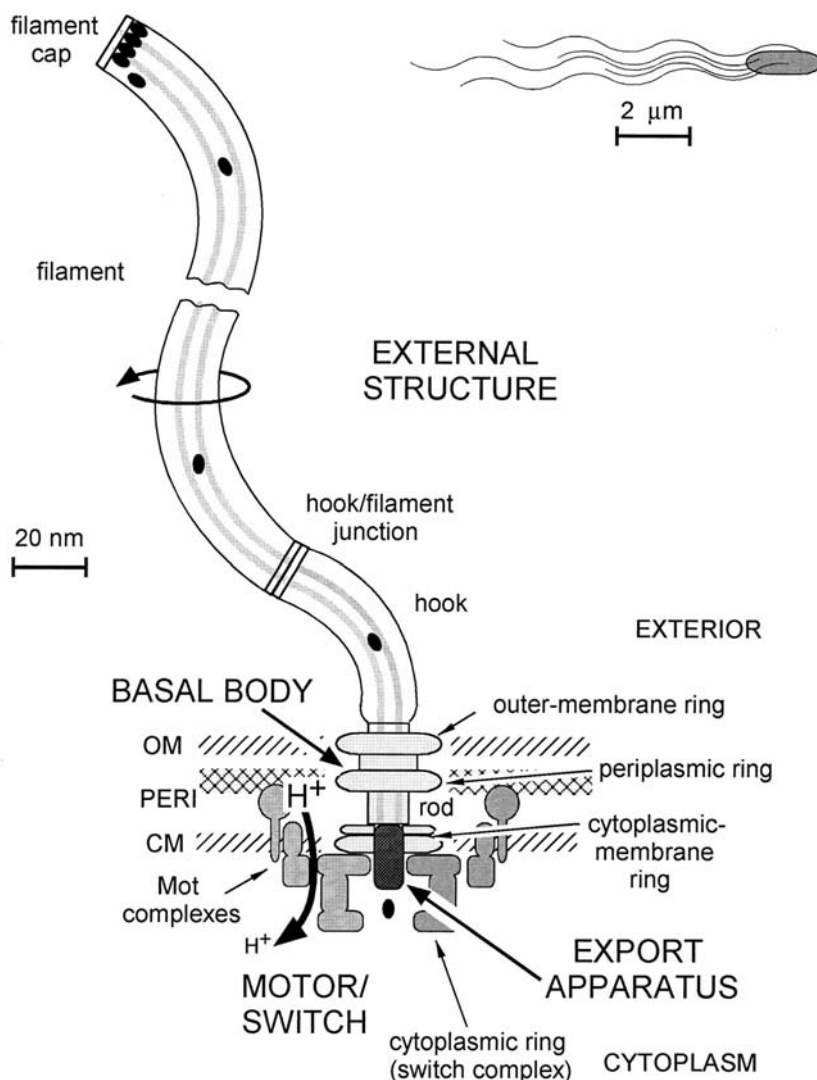
Der bakterielle Flagellenapparat stellt für den Organismus einen Motor mit Antrieb dar, dem das Prinzip der Schiffsschraube ähnelt. Die Struktur der Flagellen scheint innerhalb der Eubakterien sehr konserviert zu sein, unterscheidet sich dabei sowohl deutlich von der der Archebakterien, als auch grundsätzlich von der der größeren und komplexeren eukaryotischen Mikrotubuli-Flagellen (Übersichtsartikel zum bakteriellen Flagellenaufbau und Funktion siehe Aizawa, 1996; Macnab, 1996; Aizawa, 2000; Bardy *et al.*, 2003; Macnab, 2003). Die hier behandelte eubakterielle Flagelle lässt sich, ausgehend von dem gut untersuchten enterobakteriellen System,

in vier Grundstrukturen aufteilen: (i) das externe Filament mit dem Flagellenhaken, (ii) den Basalkörper zur Verankerung in der Zellhülle, (iii) den Flagellenmotor und (iv) einen Export-Apparat zum Aufbau der Flagelle (vgl. Abb. 4).

Der Basalkörper ist eine heterologe Struktur, bestehend aus einem integralen Ring in der Zytoplasmamembran (MS-Ring) und einem Stab, der den periplasmatischen Raum und die zwei ringförmigen Strukturen im Periplasma und der äußeren Membran (P- und L-Ring) durchdringt. Bei *B. subtilis* als Beispiel für einen grampositiven Organismus fehlen die beiden äußeren Ringe. Der Flagellenmotor dient dem Antrieb der Flagelle über den Basalkörper und wird, da er in Abhängigkeit des Chemotaxis-Systems (siehe 1.2.1) die Rotationsrichtung ändern kann, als `Motor/Switch` bezeichnet. Der Motor setzt sich aus `Stator` und `Rotor` zusammen, wobei ersterer aus den Proteinen MotA und MotB in der Zytoplasmamembran und am Peptidoglykan verankert ist. Der Rotor bildet mit dem `Switch` den C-Ring und ist nicht-kovalent mit dem MS-Ring verbunden. Eine weitere Struktur aus ca. sieben verschiedenen Untereinheiten ist eingebettet in C- und MS-Ring, der eigentliche Exportapparat. Dieser stellt ein sog. Typ III-Sekretions-System (TTSS; Übersichtsartikel siehe Blocker *et al.*, 2003) dar, welches ohne abtrennbares Signalpeptid die Komponenten des Hakens, Filaments und Teilen des Basalkörpers aus der Zelle exportiert, und damit den Aufbau des Flagellums steuert. Teile des Motors und des Basalkörpers besitzen Signalpeptide und werden durch den allgemeinen Sec-abhängigen Transportmechanismus aus der Zelle geschleust (Übersicht siehe Murphy & Beckwith, 1996). Ein Hauptunterschied der Flagellen von Archebakterien im Vergleich zum beschriebenen System besteht darin, dass alle Strukturkomponenten Signalpeptide besitzen und das Flagellum kein TTSS darstellt (Jarrell *et al.*, 1996). Der Flagellenhaken besteht aus nur einer Untereinheit (FlgE) und kann nur mit einem Hilfsprotein (FlgD) zusammengesetzt werden (Homma *et al.*, 1984b). Im Gegensatz zu dem variableren Filament hat der Haken eine sehr definierte Länge von 55 +/- 6 nm, determiniert mit Hilfe der Proteine FliK und FliB (Hirano *et al.*, 1994; Makishima *et al.*, 2001). Der Haken dient als flexibler Übergang vom Basalkörper zum steiferen Filament.

Die größte und am meisten exponierte Struktur der Flagellen ist das Filament. Es ist durch zwei kurze Kupplungsstrukturen, den `HAPs` (hook associated proteins) mit dem Haken verbunden und wird durch eine pentamere Struktur, die Kappe (FliD), die

auch für das Zusammensetzen des Filaments unabdingbar ist (Ikeda *et al.*, 1996), nach außen begrenzt. Das Filament besteht aus einer einzigen Untereinheit, dem Flagellin. Charakteristisch für das Protein, dessen Größe in verschiedenen Bakterien von ca. 20-60 kDa variieren kann und von dem in einigen Organismen auch mehrere Typen mit relativ hoher Homologie untereinander auftreten können, ist seine Primärstruktur. Es hat zwei hoch konservierte terminale alpha-helikale Domänen, die im Filament miteinander interagieren und eine variable mittlere Region, die im fertigen Filament nach außen zeigt. Auf der exponierten variablen mittleren Region basieren z.B. auch die unterschiedlichen Serovare von *Salmonella sp.*. Während sich das Flagellin *in vitro* unter geeigneten Bedingungen von selbst zu Filamentstrukturen zusammenlagert, werden *in vivo* die Untereinheiten als Monomere sezerniert, wenn die Flagellenkappe (FliD) nicht den Aufbau unterstützt (Homma *et al.*, 1984a). Das Chaperon FliS agiert dabei als Flagellin-spezifisches Hilfsprotein beim Export (Auvray *et al.*, 2001).



**Abb. 4. Flagellenaufbau bei Enterobakterien** (aus Manson *et al.*, 1998). Die Struktur kann in vier Elemente aufgegliedert werden: das äußere Filament mit Haken (weiß), der Basalkörper (hellgrau) mit Ringen und Stab zur Verankerung in der Zellohülle, der Motor/Switch Komplex (dunkel-grau) und der Exportapparat. Der Antrieb erfolgt durch Protonenfluß entlang der Komponenten des Motor/Switch-Komplexes. Substrate des Typ III-Sekretionssystems (Exportapparat) wie hier die Flagellinkomponenten (ovale Kugeln) werden durch den Exportkanal geschleust und in die wachsende Struktur eingebaut. Bei *H. pylori* ist das Filament aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten (FlaA und FlaB) aufgebaut, und von einer mit der äußeren Membran verbundenen Hülle umgeben. Abkürzungen: OM, äußere Membran; PERI, Periplasma; CM, Zytoplasmamembran.

Das Filament setzt sich aus  $5\frac{1}{2}$  Flagellinuntereinheiten pro Windungsebene zusammen, die ein helikal gewundenes Filament mit ca. 20 nm Durchmesser bilden (Namba *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 1995). Die Länge des Filaments variiert stark und liegt bei den Enterobakterien zwischen 5 und 8  $\mu\text{m}$ . Auch die Anzahl und Anordnung der Flagellen ist unterschiedlich je nach Bakterium und kann unter anderem unipolar, bipolar oder über die Oberfläche verteilt (peritrich) sein. Die Rotation des Flagellenmotors erfolgt nicht ATP-getrieben wie bei Eukaryoten, sondern durch einen Protonengradienten (proton motive force), oder, wie bei marinen *Vibrio sp.* und einigen alkalophilen *Bacillus sp.*, durch einen  $\text{Na}^+$ -Gradienten (Glagolev & Skulachev, 1978; Imae *et al.*, 1986). Der genaue Mechanismus der Umwandlung des Gradientenpotentials in mechanische Rotationsenergie ist bisher noch nicht bekannt, der Fluß von ca. 1200 Protonen wird für eine volle Umdrehung des Flagellums benötigt (Macnab, 1996).

*H. pylori* besitzt 3-8 Flagellen, die zusammen an einem Pol des Bakteriums lokalisiert sind (unipolar polytrich). Eine besondere Eigenschaft im Vergleich zu den meisten anderen flagellentragenden Bakterien ist das Vorhandensein einer Flagellenhülle, die mit der äußeren Membran verbunden und für die charakteristische terminale Verdickung der Flagellen verantwortlich ist. Die genaue Zusammensetzung ist bislang nicht aufgeklärt, sie ähnelt aber biochemisch der äußeren Membran (Geis *et al.*, 1993). Als einzige Flagellenhüllen-spezifische Komponente wurde bislang das Lipoprotein HpaA beschrieben (Jones *et al.*, 1997), in anderen Studien wurde das Protein aber auch auf weiteren Bereichen der Bakterienoberfläche (Lundstrom *et al.*, 2001) oder im Cytoplasma (O'Toole *et al.*, 1995) lokalisiert. Als Funktion der Hülle wird der Schutz des Filaments vor dem sauren Magenmilieu diskutiert (Geis *et al.*, 1993). Beispiele für weitere Bakterien mit Flagellenhülle sind *Vibrio sp.* (Follet & Gordon, 1963) oder *Bdellovibrio bacteriovorus* (Seidler & Starr, 1968). Das Filament von *H. pylori* ist heteropolymer aus den beiden Flagellinuntereinheiten FlaA und FlaB aufgebaut (Suerbaum *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1995a; Josenhans *et al.*, 1999). Die beiden Flagelline haben eine ähnliche Größe von 53 kDa (FlaA) und 54 kDa (FlaB), teilen aber nur ca. 50% homologe Aminosäuren. Interessanterweise stehen die beiden Flagellingene unter der transkriptionellen Kontrolle zweier unterschiedlicher alternativer Sigma-Faktoren (siehe 1.2.3). Untersuchungen haben

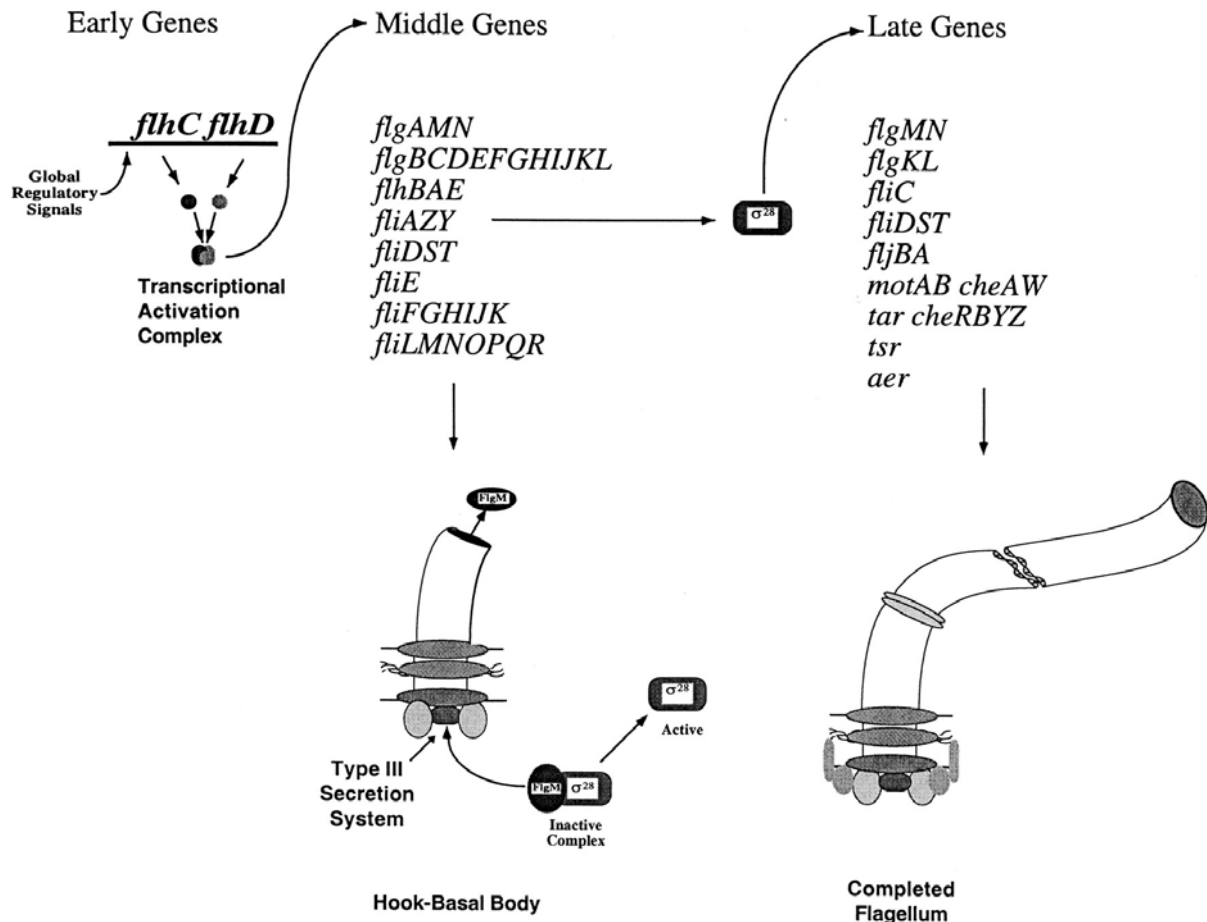
eine differentielle Lokalisation im Filament gezeigt, mit FlaB als stöchiometrisch untergeordneter, proximaler Komponente und FlaA als mengenmäßig größerer, distaler Komponente (Kostrzynska *et al.*, 1991). Andere Arbeiten deuten darauf hin, dass die Expression der beiden Flagelline und damit evtl. auch deren Anordnung im Filament variieren kann (Josenhans *et al.*, 1995b). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, dass die physiko-chemischen Eigenschaften der Flagellen in Abhängigkeit der Zusammensetzung aus den beiden Filamentuntereinheiten verändert werden können. Dies könnte der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen dienen, wie beispielsweise der Viskosität des Mediums. Des Weiteren wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass die Flagellinuntereinheiten in *H. pylori* posttranslational glykosyliert werden (Josenhans *et al.*, 2002a; Schirm *et al.*, 2003). Die biologische Funktion dieser Glykosylierung ist allerdings noch weitgehend unklar, andere polar begeißelte Bakterien zeigen jedoch ähnliche Mechanismen (Power & Jennings, 2003).

Im Rahmen der Erforschung des Virulenzfaktors Motilität wurden bereits eine Reihe weiterer struktureller Gene des Flagellensystems von *H. pylori* charakterisiert. Hierzu gehören das Hakenprotein FlgE (O'Toole *et al.*, 1994b), das Flagellenkappen-Protein FliD (Kim *et al.*, 1999), die Komponenten des Exportapparates FlhA, FlhB, FliQ und die ATPase Flil (Jenks *et al.*, 1997; Schmitz *et al.*, 1997; Foynes *et al.*, 1999; Porwollik *et al.*, 1999), sowie das Basalkörper-MS-Ring-Protein FliF, das Motor/Switch-Protein FliG und das Flagellin-Chaperon FliS (Allan *et al.*, 2000). Mutationen in den Genen, die für diese Proteine kodieren, führten allesamt zu einem flagellenlosen Phänotyp, womit ihre Funktion als Komponenten des Flagellensystems in *H. pylori* bestätigt werden konnte. Insgesamt konnten für *H. pylori* ca. 40 Gene aufgrund ihrer Homologien zu dem Enterobakteriensystem als Komponenten des Flagellensystems identifiziert werden. Wenige Komponenten scheinen nicht vorhanden zu sein, wie einige Chaperone und die Muraminidase FlgJ, außerdem gibt es einige Homologe aus anderen Organismen, die in *E. coli* oder *Salmonella* nicht bekannt sind (Josenhans & Suerbaum, 2000). Zu den letzteren gehört auch das in dieser Arbeit untersuchte FlhF, welches in *Pseudomonas sp.* in Zusammenhang mit Anzahl und Polarität der Flagellen gebracht wird (Dasgupta *et al.*, 2000; Pandza *et al.*, 2000). Insgesamt sind der Aufbau und die Struktur der Flagellen von *H. pylori* im Vergleich zu anderen gram-negativen Bakterien sehr konserviert.

### 1.2.3 Transkriptionelle Regulation des Flagellenaufbaus

In dem umfassend untersuchten Flagellensystemen von *E. coli* und *Salmonella* ist die Regulation der Expression der Flagellengene eng mit dem sequenziellen Aufbau der Flagellenstruktur gekoppelt (Macnab, 1996; Aizawa, 2000; Chilcott & Hughes, 2000; Aldridge & Hughes, 2002). Dies geschieht in einem hierarchischen System transkriptioneller Kontrolle mit verschiedenen Kontrollpunkten. So wird gewährleistet, dass Komponenten erst synthetisiert werden, wenn vorhergehende Strukturen fertiggestellt sind und nicht unnötig Energie zur Synthese verbraucht wird. Beispielsweise werden Filamentkomponenten erst gebildet, wenn der Basalkörper/Haken-Komplex fertiggestellt ist. Die Transkription der Komponenten des Flagellensystems wird kontrolliert von den übergeordneten transkriptionellen Aktivatoren FlhCD ('Master Regulators'). Diese stellen bei den Enterobakterien auch die Verbindung der Motilität zu anderen zellulären Funktionen dar. Die Gene *flhCD* (Klasse 1/ frühe Gene) werden in Abhängigkeit von Umweltreizen, wie Temperatur, Osmolarität oder pH (Li *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1993; Soutourina & Bertin, 2003), von globalen Regulatoren wie H-NS, cAMP-CAP-Komplex und Zellzyklus-abhängig exprimiert (Yokota & Gots, 1970; Bertin *et al.*, 1994; Pruss & Matsumura, 1997; Soutourina *et al.*, 1999). FlhCD bilden dabei einen multimeren Aktivator-Komplex und steuern  $\sigma^{70}$ -abhängig die Expression der mittleren Flagellengene, welche für den Basalkörper/Haken-Komplex kodieren (Claret & Hughes, 2002). Außerdem wird die Expression der antagonistischen Regulatoren FliA ( $\sigma^{28}$ ) und FlgM (Anti- $\sigma^{28}$  Faktor) induziert. FlgM inaktiviert FliA durch Bindung bis zur Fertigstellung des Basalkörper/Haken-Komplexes und wird dann durch das flagelläre Typ III-Sekretionssystem aus der Zelle exportiert. Der nun aktive  $\sigma^{28}$ -Faktor induziert die Transkription der späten Flagellengene mit Filament, Motor- und Chemotaxiskomponenten, was zur Fertigstellung des Flagellenapparates führt. Ohne die Expression der 'Master-Regulatoren' FlhCD werden also keine mittleren Flagellengene transkribiert und ein unvollständiger Basalkörper/Haken verhindert über nicht sekretiertes FlgM die Expression der späten,  $\sigma^{28}$ -abhängigen Gene (schematische Darstellung, siehe Abb. 5).

## Einleitung



**Abb. 5. Transkriptionelle Hierarchie und Flagellenaufbau in Enterobakterien (aus Chilcott & Hughes, 2000).** Das Flagellen- und Chemotaxisregulon setzt sich aus ca. 50 Genen zusammen, die in drei Klassen eingeteilt werden: frühe (Klasse 1), mittlere (Klasse 2) und späte (Klasse 3) Gene. Die frühen Gene kodieren für die übergeordneten transkriptionellen Regulatoren FlhCD, die als Heteromultimer die  $\sigma^{70}$ -abhängige Transkription der Klasse 2-Promotoren der mittleren Flagellengene positiv regulieren. Diese kodieren für Komponenten des Basalkörper/Haken-Komplexes (HBB), sowie für die antagonistischen Regulatoren FliA ( $\sigma^{28}$ ) und FlgM (Anti- $\sigma^{28}$ ). FliA steuert spezifisch die Transkription der späten Gene und wird von FlgM inaktiviert. Nach Fertigstellung des HBB wird FlgM durch das Typ III-Sekretionssystem aus der Zelle sekretiert. Der nun aktive  $\sigma^{28}$ -Faktor aktiviert die Expression der späten Gene, zu denen außer Filamentkomponenten auch Motor- und Chemotaxis-Gene gehören. Eine Reihe von Genen wie *flgK*, *flgL*, *flgN*, *flgM*, *fliD*, *fliS* und *fliT* werden sowohl in Klasse 2- wie in Klasse 3-Operons exprimiert.

Ein wichtiger Unterschied zwischen dem enterobakteriellen Flagellensystem und dem von *H. pylori* ist, dass die Flagellen einmal peritrich und einmal polar angeordnet sind. Mittlerweile sind auch einige andere Bakterien mit polaren Flagellensystemen näher charakterisiert worden, die in ihrer Regulation von dem *E. coli*/*Salmonella*-System abweichen, insbesondere durch die Involvierung eines weiteren alternativen Sigma-Faktors, RpoN ( $\sigma^{54}$ ). Hierzu zählen *Caulobacter crescentus* (Wu & Newton, 1997; Anderson & Guber, 2000; Jenal, 2000), *Vibrio sp.* (Kim & McCarter, 2000; McCarter, 2001; Prouty *et al.*, 2001) und *Pseudomonas spp.* (Dasgupta *et al.*, 2003). Für alle diese Bakterien werden Flagellen-Regulons mit vier hierarchischen Klassen

vorgeschlagen. Alle haben Äquivalente zu `Master-Regulatoren` an der Spitze der Hierarchie, wobei bei *C. crescentus* der Zell-Zyklus gesteuerte  $\sigma^{73}$ -Aktivator CtrA diese Rolle übernimmt, bei *Vibrio sp.* mit FlaK/FlrA und FlaM und bei *Pseudomonas sp.* mit FleQ jeweils  $\sigma^{54}$  spezifische Aktivatoren übergeordnet die Transkription der Flagellengene steuern. Die späten Flagellengene werden bei *Vibrio sp.* und Pseudomonaden wie bei den Enterobakterien über das FliA/FlgM-System aus  $\sigma^{28}$  und Anti-Sigma-Faktor gesteuert, während deren Expression bei *Caulobacter*  $\sigma^{54}$ -abhängig ist, und  $\sigma^{28}$  hier keine Rolle spielt. Bei allen beschriebenen Organismen, inklusive *E. coli* und *Salmonella*, sind die ca. 50 Flagellen- und Chemotaxis-Gene in einigen wenigen Transkriptionseinheiten im Genom zusammengefasst.

Ein Hauptunterschied des *H. pylori*-Flagellensystems im Vergleich zu den oben genannten bislang charakterisierten ist die Abwesenheit eines übergeordneten Regulators. So konnten keine homologen Gene zu *flhCD* aus *Salmonella/E. coli* in den *H. pylori*-Genomen identifiziert werden und der  $\sigma^{54}$ -spezifische Aktivator FlgR scheint nur die Expression einer kleinen Gruppe mittlerer Flagellengene zu kontrollieren (Spohn & Scarlato, 1999). Des Weiteren scheint der regulatorische Kontrollpunkt des fertiggestellten Basalkörper/Haken-Komplexes als Voraussetzung der Expression der späten Flagellengene nicht analog zu den anderen Systemen zu existieren, da die Mutation des Hakengens *flgE1* in *H. pylori* zwar einen flagellenlosen Phänotyp bewirkt, aber keinen Einfluss auf die Expression des späten Flagellins FlaA hat (O'Toole *et al.*, 1994b). Ein weiterer Unterschied ist, dass die für die koordinierte Expression der Flagellengene typische Organisation in wenigen Operons für *H. pylori* nicht zutrifft. Die Flagellengene liegen hier monocistronisch oder in kleinen Transkriptionseinheiten über das gesamte Genom verteilt vor. Außerdem werden vor allem frühe Flagellengene in Operons zusammen mit essenziellen `Housekeeping`-Genen exprimiert (Beier *et al.*, 1997; Porwollik *et al.*, 1999; Spohn & Scarlato, 1999; Josenhans & Suerbaum, 2000). Auch diese Tatsache scheint *H. pylori*-spezifisch zu sein und spricht gegen einen übergeordneten Regulator wie in anderen peritrichen oder polaren Flagellensystemen. Wie in *Salmonella/E. coli* gibt es einen Flagellen-assoziierten alternativen Sigma-Faktor FliA, und auch ein Anti-Sigma-Faktor FlgM wurde kürzlich für *H. pylori* identifiziert und funktionell charakterisiert (Colland *et al.*, 2001; Josenhans *et al.*, 2002a). Der alternative Sigma-Faktor  $\sigma^{54}$ , zusammen mit seinem positiven Regulator FlgR, wurde



in *H. pylori* bislang ausschließlich dem Flagellensystem zugeordnet (Spohn & Scarlato, 1999). Für die zytoplasmatische Histidinkinase HP0244 (FlgS/AtoS) wurde nachgewiesen, dass sie spezifisch den  $\sigma^{54}$ -Aktivator FlgR phosphoryliert (Beier & Frank, 2000).

Einige strukturelle Gene des Flagellensystems wurden in *H. pylori* bereits durch funktionelle Untersuchungen definierten Regulons zugeordnet. Die beiden Flagellingene werden voneinander unabhängig unter der Kontrolle eines  $\sigma^{54}$ - (*flaB*) und  $\sigma^{28}$ - (*flaA*) Promotors transkribiert (Suerbaum *et al.*, 1993). Insgesamt wurden bislang sieben Gene in fünf Operons als  $\sigma^{54}$ - bzw. FlgR-abhängig charakterisiert (Spohn & Scarlato, 1999) und vier Gene in zwei Transkriptionseinheiten als FliA-abhängig. Hierzu gehören das Gen für das Flagellin FlaA (Suerbaum *et al.*, 1993), sowie ein Operon mit dem Flagellenkappenprotein FliD (Kim *et al.*, 1999). Eine Reihe von offensichtlichen Unterschieden existiert in dem *H. pylori*-Flagellensystem also sowohl zu dem enterobakteriellen Flagellenregulon, wie auch zu den polaren Flagellensystemen von *Caulobacter crescentus*, *Vibrio sp.* und *Pseudomonas sp.*. Die daraus resultierende unterschiedliche Regulation des Flagellenaufbaus in *H. pylori* ist bislang nur unzureichend charakterisiert.

### **1.3 Genomweite Untersuchung bakterieller Transkription mittels DNA-Microarrays**

Seit einigen Jahren steht mit der DNA-Microarray-Technologie für die Aufdeckung von bakteriellen transkriptionellen Regulationsnetzwerken ein neuer, globaler Ansatz zur Verfügung, dessen Nutzen und Tücken in der Wissenschaft weiterhin kontrovers diskutiert werden (Lockhart & Winzeler, 2000; Magasanik, 2000; Fryer *et al.*, 2002; Conway & Schoolnik, 2003). Die ständig wachsende Zahl an erfolgreichen Veröffentlichungen und Studien in diesem Gebiet zeigen, dass die Methode wertvolle Ergebnisse zur Biologie verschiedener Organismen liefert, die mit anderen Methoden gar nicht, nur bedingt oder nur mit ungleich höherem Aufwand zu erreichen wären. Dabei kristallisiert sich immer mehr heraus, dass bei Gesamtgenom-Microarray-Experimenten, wie auch bei anderen Methoden, ein überschaubarer und durchdachter Versuchsaufbau mit angemessener Statistik und bioinformatischer Auswertung ausschlaggebend für die Qualität und Verwendbarkeit der Ergebnisse ist (Lee *et al.*, 2000; Nadon & Shoemaker, 2002; Rhodius *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2002;

Yang & Speed, 2002). Für Transkriptomuntersuchungen ist die reproduzierbare und schnelle Aufarbeitung der RNA ausschlaggebend, um Degradation bakterieller RNA mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von nur ca. 1 min (Kushner, 1996) zu vermeiden. Voraussetzung für sämtliche Microarray-Analysen ist die Kenntnis der Genomsequenz des zu untersuchenden Bakteriums.

Eine relativ große Anzahl von Veröffentlichungen zu globalen transkriptionellen Untersuchungen wurden bereits für Modellorganismen wie *E. coli* (Zimmer *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* (Fawcett *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002; Eymann *et al.*, 2002) oder *Caulobacter crescentus* (Laub *et al.*, 2000) durchgeführt. Auch für die Gruppe der pathogenen Bakterien und den Interaktionen mit ihren Wirtsorganismen ist die Technik bereits ausgiebig genutzt worden (Rappuoli, 2000; Kato-Maeda *et al.*, 2001; Schoolnik, 2002). Hierzu gehören z. B. pathogene *E. coli* (Richmond *et al.*, 1999; Arfin *et al.*, 2000; DeLisa *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 2002) *Mycobacterium tuberculosis* (Wilson *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2002; Kaushal *et al.*, 2002), *Vibrio cholerae* (Merrell *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002) oder *Borrelia burgdorferi* (Revel *et al.*, 2002). Auch für *H. pylori* wurden im Verlauf dieser Arbeit eine Reihe von globalen Untersuchungen mit Hilfe von DNA-Arrays durchgeführt, wobei sich die DNA-Sonden aus den Gensequenzen der beiden veröffentlichten Genome zusammensetzten. Auf diese Arbeiten wird in der Diskussion im Zusammenhang mit den hier erzielten Ergebnissen näher eingegangen (s. 4.3).

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

*H. pylori* ist mit einer Prävalenz von mehr als 50% der Weltbevölkerung und als Ursache eines komplizierteren klinischen Verlaufs der chronischen Infektion bei 10-20% der Infizierten ein bedeutendes pathogenes Bakterium der heutigen Zeit. Die flagellenvermittelte Motilität wurde in unterschiedlichen Ansätzen als essenzieller Faktor für die Besiedelung und Persistenz in der ökologischen Nische im Wirt nachgewiesen. Während die Struktur des Flagellenapparates im Vergleich zu anderen Organismen sehr konserviert zu sein scheint, treten bei den möglichen Mechanismen der Regulation des Flagellenaufbaus deutliche Unterschiede zu bekannten Systemen zutage. Diese Mechanismen sind für *H. pylori* bislang nur unzureichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war, die Regulation des Flagellensystems und mögliche Verbindungen zu anderen zellulären Funktionen näher zu untersuchen. Hierzu sollte unter anderem die Microarray-Technologie zur Untersuchung der globalen Effekte von Mutationen in einzelnen Genen des Flagellensystems genutzt werden.

Hierzu mußte zunächst eine Plattform für die Experimente mit einem *H. pylori*-spezifischen Microarray-System geschaffen werden. Basierend auf den Genomen der beiden sequenzierten *H. pylori*-Stämme 26695 und J99 sollte in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin (MMIIB) ein gebrauchsfertiger PCR-Produkt-Microarray entwickelt werden. Parallel dazu sollte ein industriell gefertigter Oligonukleotid-basierter *H. pylori*-Microarray zur Etablierung der Microarray-Untersuchungen mit *H. pylori* genutzt werden.

Um eine differenzielle Regulation durch die beiden in die Flagellenregulation involvierten alternativen Sigmafaktoren  $\sigma^{54}$  und  $\sigma^{28}$  näher zu untersuchen, sollten Reportergermutanten in zwei Referenzgenen (*flaA* und *flaB*) für die beiden Regulons hergestellt und untersucht werden. Diese Untersuchungen dienten auch dazu, die Verwendbarkeit verschiedener Reportergensysteme in *H. pylori* für Gene unterschiedlicher transkriptioneller Aktivität und die Eignung von Reportergenen als Kontrollmethode für globale Transkriptionsuntersuchungen zu prüfen.

Basierend auf diesen Untersuchungen sollten Microarray-Experimente mit Mutanten in den beiden alternativen Sigmafaktoren, sowie funktionell assoziierten Proteinen durchgeführt werden, um Besonderheiten des transkriptionellen Regulationsnetzwerks flagellenassoziierter Gene in *H. pylori* zu charakterisieren und mögliche übergeordnete Regulatoren und Rückkopplungsmechanismen zu identifizieren.

Analoge Experimente mit potenziellen Regulatoren aus der frühen Klasse der Flagellengene sollten durchgeführt werden, um ein möglichst umfassendes Modell der transkriptionellen Regulation des Flagellensystems in *H. pylori* erstellen zu können und mögliche Verbindungen der Flagellenregulation zu anderen Zellfunktionen aufzuklären.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Anaerobentöpfe	Oxoid, Wesel
Brutschränke	KB 500 (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammern	BioRad, München; Biometra, Göttingen
Fluoreszenz-Scanner	GMS 418 confocal laser scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
Filme	Hyperfilm™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Gel-Dokumentationssystem	MidiDoc (Herolab, Wiesloch)
Hybridisierungskammern für Microarrays	CMT hybridization chambers (Corning, NY, USA)
Luminometer	MTP-Reader (Hamamatsu, Japan)
Mikroskop	Olympus BX40 (Olympus, Hamburg)
Microarray-Spotter	GMS 417 Arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
pH-Meter	(Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim)
Pipettierroboter	RoboAmp 4200 (MWG-Biotech AG, Ebersberg)
Schüttelinkubatoren	EB SM30, Aufsatz TH30 (Hartenstein GmbH, Würzburg)
Semidry-Blotter	Keutz, Reiskirchen
Sequenzierapparatur	ABI Prism Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Spannungsgeräte	BioRad, München
Speed Vac	SC110A (Savant, New York, USA)
Spektralphotometer	GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
	Multiscan® Ex (Thermo Labsystems, Finland)
Thermocycler	T3 (Biometra, Göttingen)
Ultraschall-Sonifikator	Sonifier Cell Disruptor B15, Branson G. (Heinemann, Schwäbisch Gmünd)
UV Crosslinker	Stratalinker 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande)
Vortexer	REAX control (Heidolph, Kehlheim)
Waagen	Feinwaage Scaltech SB50 (Hartenstein, Würzburg)
Zentrifugen	5417R (Eppendorf, Hamburg)
	Biofuge <i>Fresco</i> (Heraeus, Hanau)
	RC-5B (Sorvall, Hanau)
	Sigma 3K20 (Sigma, Steinheim)
	Optima™ TLI-100-Ultrazentrifuge (Beckman, München)

## 2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom höchsten käuflichen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Sigma (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

Ampuwa ddH<sub>2</sub>O wurde von Fresenius Kabi (Bad Homburg) bezogen.

## 2.3 Enzyme und Kits

### Enzyme:

DNA-Polymerasen	Invitrogen, Karlsruhe; Amersham Pharmacia, Freiburg; Boehringer, Mannheim
DNaseI, RNase frei	Roche, Mannheim
alkalische Phosphatase CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lysozym	Sigma, Steinheim
Proteinkinase K	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen, Karlsruhe; NEB, Bad Schwalbach
Reverse Transkriptase SuperScriptII RNaseH <sup>-</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
RNaseA	Sigma, Steinheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim; NEB, Bad Schwalbach
T7-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

### Kits:

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
DIG-DNA labeling Kit	Roche, Mannheim

## 2.4 Standards

### DNA-Längenstandards:

1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
1 Kb DNA Ladder	NEB, Bad Schwalbach

### RNA-Längenstandards:

RNA Ladder (0,5 – 9 kb)	NEB, Bad Schwalbach
RNA molecular weight marker I, digoxigenin-labeled (0,3 – 6,9 kb)	Roche, Mannheim

Molekulargewicht-Standard:

Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa) NEB, Bad Schwalbach

Bench Mark Prestained Protein Ladder (10-190 kDa) Invitrogen, Karlsruhe

## 2.5 Bakterien

Tab. 1 Verwendete *Helicobacter pylori*-Stämme.

<i>Helicobacter pylori</i> -Stamm	Genotyp	Referenz (sofern nicht anders erwähnt: Niehus <i>et al.</i> , 2004)
<i>H. pylori</i> N6	<i>H. pylori</i> Wildtyp	Ferrero <i>et al.</i> , 1992
<i>H. pylori</i> 88-3887	motile Variante des <i>H. pylori</i> 26695 Wildtyps	Josenhans <i>et al.</i> , 2000
HpN6 <i>flaA-luxAB</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flaA::luxAB</i> ; homologe Rekombination mit pSUS1601	diese Arbeit; Niehus <i>et al.</i> , 2002
HpN6 <i>flgE2</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flgE2::aphA3'</i> -III (Km <sup>R</sup> ); homologe Rekombination mit pSUS1603	diese Arbeit
Hp88-3887 <i>flgE2</i>	<i>H. pylori</i> 88-3887 <i>flgE2::aphA3'</i> -III; homologe Rekombination mit pSUS1603	diese Arbeit
HpN6 <i>flgE2/flgM</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flgE2::aphA3'</i> -III <i>flgM::Cm<sup>R</sup></i> ; homologe Rekombination mit pJC306	Josenhans, unveröffentlicht
HpN6 <i>flgH</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flgH::aphA3'</i> -III; homologe Rekombination mit pSUS1611	diese Arbeit
HpN6 <i>flaB-lux</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flaB::luxAB</i> ; homologe Rekombination mit pSUS1609	diese Arbeit; Niehus <i>et al.</i> , 2002
HpN6 <i>fliA</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>fliA::aphA3'</i> -III	Josenhans <i>et al.</i> , 2002a
HpN6 <i>flgM</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flgM::Cm<sup>R</sup></i>	Josenhans <i>et al.</i> , 2002a
HpN6 <i>rpoN</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>rpoN::aphA3'</i> -III	
88-3887 <i>rpoN</i>	<i>H. pylori</i> 88-3887 <i>rpoN::aphA'</i> -III	
HpN6 <i>flgR</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flgR::aphA3'</i> -III	
HpN6 HP0244	<i>H. pylori</i> N6 HP0244::aphA3'-III	
HpN6 <i>flhA</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flhA::aphA3'</i> -III	
88-3887 <i>flhA</i>	<i>H. pylori</i> 88-3887 <i>flhA::aphA3'</i> -III	
HpN6 <i>flhA/flgM</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flhA::aphA3'</i> -III <i>flgM::Cm<sup>R</sup></i>	
HpN6 <i>flhF</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flhF::aphA3'</i> -III	
88-3887 <i>flhF</i>	<i>H. pylori</i> 88-3887 <i>flhF::aphA3'</i> -III	
HpN6 <i>flhA/flgM</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>flhF::aphA3'</i> -III/ <i>flgM::Cm<sup>R</sup></i>	

**Abkürzungen:** Cm<sup>R</sup>, Chloramphenicol-Resistenzkassette; Km<sup>R</sup> (*aphA3'*-III), Kanamycin-Resistenzkassette; *luxAB*, Gene für die Luziferase-Untereinheiten A und B aus *Vibrio harveyi*.

**Tab. 2** Verwendete *Escherichia coli*-Stämme.

<i>Escherichia coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> MC1061	F <sup>-</sup> , <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7696 <i>galE15 galK16</i> $\Delta$ ( <i>lac</i> )X74 <i>rpsL</i> ( <i>Strr</i> ) <i>hsdR2</i> ( <i>rKmK+</i> ) <i>mcrA mcrB1</i>	Casadaban & Cohen, 1980
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1, recA1, hsdR17, \Delta(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>thi-1, supE44, gyrA96, relA1</i></i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> ER2566	F <sup>-</sup> , $\lambda$ , <i>fhuA2</i> [lon], <i>ompT lacZ::T7</i> genel <i>gal sulA11</i> $\Delta$ ( <i>mcrC-mrr</i> )11::IS10 R ( <i>mcr-73::miniTn10</i> )2 R( <i>zgb-210::Tn10</i> ) 1 (TetS) <i>endA1</i> [dcm]	New England Biolabs, Bad Schwalbach
Eco90	<i>E. coli</i> ER2566 mit pSUS1622 ( <i>flgE2</i> Überexpressionsplasmid)	diese Arbeit

### 2.5.1 Anzucht auf festen Medien

***Helicobacter pylori*.** Die als Einfrierkultur (-80°C) vorliegenden *H. pylori*-Stämme wurden auf Eis angetaut, 50  $\mu$ l bis 100  $\mu$ l der Kultur entnommen und auf einer Blutagarplatte (Columbia Agar Base 2, 10% Pferdeblut, beides Oxoid) mit Zusatz von Amphotericin B [4 mg/l], Vancomycin [10 mg/l], Trimethoprim [5 mg/l] und Polymyxin B [2500 U/l] verteilt. Die Agarplatten wurden anschließend bei 37°C für 48 Stunden in einem Anaerobiertopf unter mikroaerophilen Bedingungen (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) mit einem befeuchteten Anaerocult-Beutel (Merck, Darmstadt) angezchtet. Die angewachsenen Bakterien wurden im Folgenden alle zwei Tage auf eine frische Agarplatte überimpft. Hierzu wurde mit einer Impföse ( $\varnothing$  5mm) etwa drei Zentimeter über die bewachsene Platte gestreift und das dadurch gewonnene Bakterienmaterial auf die neue Agarplatte verteilt.

***Escherichia coli.*** *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Platten angezchtet. Die Kultur erfolgte aerob in einem Inkubator bei 37°C über Nacht. Für die Selektion von rekombinanten Klonen wurden, wenn nicht anders erwähnt, Antibiotika und Zusätze in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin 100-200 mg/l, Chloramphenicol 10 mg/l, Kanamycin 20 mg/l, IPTG, X-Gal.

### 2.5.2 Anzucht in Flüssigmedium

***Helicobacter pylori.*** Ausgangsmaterial für eine *H. pylori*-Flüssigkultur waren Bakterien, die für 20-24 Stunden auf einer Blutagarplatte gewachsen waren. Diese wurden mit einem sterilen Wattetupfer in 5 ml Kulturmedium eingerieben. Als Kulturmedium wurden Brain-Heart-Infusion Medium (BHI) mit den Zusätzen wie bei



den Blutagarplatten (vgl. 2.5.1) und 10% hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Gibco BRL) verwendet. Mit einem Photometer (GeneQuant pro, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde die O.D.<sub>600</sub> bestimmt. Dabei entspricht eine O.D.<sub>600</sub> von eins ca.  $3 \times 10^8$  *H. pylori*-Zellen. Die Start-O.D.<sub>600</sub> der Kultur wurde ausgehend von der Messung auf 0,04-0,07 eingestellt und überprüft. Als Verdoppelungszeit der O.D.<sub>600</sub> konnte etwa ein Zeitraum von fünf Stunden angesetzt werden, bei einer lag-Phase von ca. 4-5 h. Die Kultivierung erfolgte in sterilen Erlenmeyerkolben in einem Anaerobtopf in mikroaerophiler Atmosphäre (Anaerocult-Beutel; Merck, Darmstadt) bei 37°C in einem Schüttelinkubator. Hierbei waren die Erlenmeyerkolben luftdurchlässig mit steriler Alufolie abgedeckt. Das Kulturvolumen war nicht höher als 40% der maximalen Füllmenge des Erlenmeyerkolbens.

***Escherichia coli***. Die Flüssigkultur von *E. coli* wurde in LB-Medium durchgeführt. Für die Anzucht größerer Mengen (50-100 ml) wurden die Bakterien von einer halben Agarplatte in 5 ml Medium aufgenommen und 100 µl dieser Suspension in die Hauptkultur überführt. Die Kultur wurde 12-16 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert.

### 2.5.3 Einfrierkulturen

***Helicobacter pylori***. Kulturen von *H. pylori* wurden ausschließlich bei –80°C eingefroren. Dazu wurde nach zwei Tagen Inkubation der Bakterienrasen von der Hälfte der Blutagarplatte mit einem Wattetupfer abgenommen und in das bereits aliquotierte Einfriermedium (0,5 ml; BHI, 10% Pferdeserum, 25% Glycerin) eingerieben. Die Einfrierkultur wurde umgehend bei –80°C eingefroren und nicht häufiger als dreimal aufgetaut.

***Escherichia coli***. Kulturen von *E. coli* wurden kurzfristig bei –20°C (LB Medium, 50% Glycerin) oder für längere Lagerung bei –80°C (LB Medium, 25% Glycerin) eingefroren. Hierzu wurden 20-30 ml einer ca. 16 h in LB-Medium gewachsenen Kultur abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium aufgenommen.

## 2.6 Plasmide

Tab. 3 In der Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Vektor	Antibiotikaresistenz, Bemerkung	Referenz
	pUC18	Ap <sup>R</sup> , Rep <sub>Ec</sub> , high-copy-Klonierungsvektor	Messing & Vieira, 1982
	pTwin1	Ap <sup>R</sup> , Rep <sub>Ec</sub> , Klonierung und Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> ; Fusion mit Chitinbindedomäne	NEB
	pHel2	Cm <sup>R</sup> , Rep <sub>Ec</sub> , Rep <sub>Hp</sub> , multi-copy-Shuttlevektor für <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i>	Heuermann & Haas, 1998
	pILL570	Sp <sup>R</sup> , Rep <sub>Ec</sub>	Labigne <i>et al.</i> , 1991
pILL600	pBR322	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; Quelle der Km <sup>R</sup> -Kassette ( <i>aphA3'</i> -III)	Labigne-Roussel <i>et al.</i> , 1988
pCJ110	pUC18	Ap <sup>R</sup> ; enthält HP0472 Gen aus <i>H. pylori</i> 26695	Josenhans, unveröffentlicht
pSUS78	pUC18	Km <sup>R</sup> ; <i>H. pylori flaB::gfp</i> Reporterfusion	Josenhans <i>et al.</i> , 1998
pSUS128	pUC18	Km <sup>R</sup> ; <i>H. pylori flaA::gfp</i> Reporterfusion	Josenhans <i>et al.</i> , 1998
pSUS1601	pUC18	Km <sup>R</sup> ; <i>H. pylori flaA::luxAB</i> Reporterfusion	diese Arbeit; Niehus <i>et al.</i> , 2002
pSUS1602	pILL570	Sp <sup>R</sup> ; enthält <i>flgD/flgE2</i> Fragment aus <i>H. pylori</i> N6	diese Arbeit
pSUS1603	pILL570	Sp <sup>R</sup> , Km <sup>r</sup> ; <i>H. pylori</i> N6 <i>flgE2::aphA3'</i> -III	diese Arbeit
pSUS1604	pUC18	Ap <sup>R</sup> ; enthält <i>flgH</i> Fragment aus <i>H. pylori</i> N6	diese Arbeit
pSUS1609	pUC18	Km <sup>R</sup> ; <i>H. pylori flaB::luxAB</i> Reporterfusion	diese Arbeit; Niehus <i>et al.</i> , 2002
pSUS1611	pUC18	Ap <sup>R</sup> ; Km <sup>r</sup> ; <i>H. pylori</i> N6 <i>flgH::aphA3'</i> -III	diese Arbeit
pSUS1622	pTWIN1	Ap <sup>R</sup> ; enthält <i>H. pylori</i> 26695 <i>flgE2</i>	diese Arbeit

**Abkürzungen:** Ap<sup>R</sup>, Ampicillin-Resistenzkassette; Cm<sup>R</sup>, Chloramphenicol-Resistenzkassette; Km<sup>R</sup> (*aphA3'*-III), Kanamycin-Resistenzkassette; *luxAB*, Gene für die Luziferase-Untereinheiten A und B aus *Vibrio harveyi*; Rep<sub>Ec</sub>, Rep<sub>Hp</sub>, Replikationsinitiationssequenz für *E. coli* bzw. *H. pylori*; Sp<sup>R</sup>, Spectinomycin-Resistenzkassette;

## 2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Die für die RT-PCR verwendeten Primer sind mit Reaktionsbedingungen in Tab. 4 aufgeführt, die für Standard-PCR und Klonierungen benutzten Oligonukleotide sind in Tab. 5 dargestellt.

**Tab. 4 Die für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide** (folgende Seiten). In den ersten beiden Spalten sind die Referenznummer der *H. pylori* 26695 TIGR-Datenbank-Annotation (<http://www.tigr.org/tigrscripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=ghp>) und die Genbezeichnung angegeben. Im Folgenden sind jeweils der + und – Strang Primer mit Sequenz eingetragen. Nicht homologe Sequenzbereiche sind durch kleine Buchstaben angezeigt, Restriktionsschnittstellen für mit diesen Primern in anderen Experimenten durchgeführte Klonierungen sind unterstrichen. Die letzten vier Spalten enthalten Informationen zu Anlagerungstemperatur, Elongationszeit PCR-Zyklusanzahl und Länge des PCR-Produkts.

## Material & Methoden

TIGR Nummer	Gen Bezeichnung	Primer Name	Sequenz (5'→3')	Anlagerungstemperatur [°C]	Elongation [sec.]	Anzahl PCR-Zyklen	Produktlänge [Bp]	Referenz (soweit nicht anders vermerkt: diese Arbeit; Niehus et al., 2004)
HP16S	rDNA	HP16s IHP16s II	GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC TGGCAATCAGCGTCAGGTAATG	55	60	16	521	
HP0099	<i>tlpA</i>	HP0099_RT1 HP0099_RT2	AATGAGAACGCTTCAAGAGGTT CTTTCAAATCAGGGCTTGC	55	60	25	746	
HP0115	<i>flaB</i>	HPflaB-n1 HPflaB-n2	ATCGCTGATAGCTTAAGGAGTC GGATCTTGTCCAATTGCGTGC	58	80	25	1177	
HP0166	<i>ompR</i>	HP0166_RT1 HP0166_RT2	ACAGAGATGATGTATTGCGG AAAGCACTAGATTATGGGGC	53	60	19	383	
HP0244	<i>atoS</i>	HP244-4s HP0245_RT2	aaaagatctGAAAGAAGAAGCCTTA TCAG AACCCCTTGTATCCTAAAGC	50	60	28	218	
HP0295	<i>flgL</i>	HP295_RT1 HP295_RT2	AGATCAAGGCATTGATGTGG TATCGTTATCGCCGATGAG	53	60	25	528	
HP0392	<i>cheA</i>	HPcheA_RT1 HPcheA_RT2	TGTTCAATAAATCCCTCGC GATAGCCAAAGTGAGAGGG	51	60	28	648	
HP0410	<i>hpaA2</i>	HP0410_RT1 HP0410_RT3	AGCAGCACAATAATACGGG ACTCTTTCAATCACAGCCT	53	60	23	457	
HP0472	<i>omp11</i>	HP0472_2 HP0472_5	ATCAGCAAGGTCGCTATGG GAATAGTAGCGGATAAGCCC	55	60	23	442	
HP0492	<i>hpaA3</i>	HP0492_RT1 HP0492_RT2	TAAGTATAGGTCATTGCCTG AAATGTTAGTGGCTTTAGGG	53	60	23	574	
HP0601	<i>flaA</i>	HPflaA-4 HpflaA-9	ATTGATGCTTTAGCGTC CAAGCGTTATGTCTGGTC	49	60	16	651	Suerbaum et al., 1998a
HP0679	<i>wbpB</i>	HP0679_RT1 HP0679_RT2	ACCTTGTCTTTAACGCTTCC ATATTCATGATAGCGTGGGG	53	60	23	520	
HP0703	<i>flgR</i>	HP0703_RT1 HPflgR-4	ATGCGTAAAAGCCTGGAGC tatgaattcTTGGTGCGATAGATGG ATTC	55	60	23	306	
HP0714	<i>rpoN</i>	HPrpoN-3s HP0714_RT1	taagaatccCACGATGATTCCATTA TCCA CCAAAACGCTTTAGATAACCCC	46	45	30	588	
HP0751	<i>flaG2</i>	HP0751_1HP 0751_2	TTCCACATCTCACACAAGC TCACCTTATCCCATTAGCG	55	60	23	246	
HP0752	<i>fliD</i>	HP0752_1HP 0752_2	TTACAGGCGATGCGTTGAGT AATCGCTTTCTTGGGTGGTG	55	60	23	720	
HP0753	<i>fliS</i>	HP0753_1 HP0753_2	TACCAGCATAACCGAGTGAG CTCTAGCCACATTCAACACC	55	60	23	307	
HP0754	<i>fliT</i>	HP0754_RT1 HP0754_RT2	TCAGATGAACTCGCCTAAC ATTCAATGCTTTGGGCTATC	53	60	23	172	
HP0797	<i>hpaA</i>	HP0797_RT1 HP0797_RT2	CCTTCCATTTTATCCAAACC AAAATGCCTTTTAGGTGCG	53	60	23	430	

## Material & Methoden

HP0815	<i>motA</i>	HP0815_RT2 HP0815_RT3	TAGGCTTGGTATTGGCGG TCCCTGTAACAGTAGCCG	50	60	30	560	
HP0869	<i>hypA</i>	HP0869_RT1 HP0869_RT2	AATAACATTCTTGCTGTGGCCG TTTCTTCTTTAATCGCTC	51	30	21	283	
HP0869 HP0870	<i>hypA</i> – <i>flgE1</i>	HP0869_RT1 HP0870_RT1	AATAACATTCTTGCTGTGGC CTAGTAATGTGGATTTGAGC	51	60	25	486	
HP0870	<i>flgE1</i>	HPflgE1 HPflgE2	CTCAAGTCAAACATCATCG CTTGCCGTCTAAATAAGC	47	90	30	818	
HP0906	<i>hyp.</i>	HP0906_RT1 HP0906_RT2	GAGCCATTCAAAGAGCAGG GATTTTCATCGCACTGGCTGCG	50	60	23	419	
HP0907	<i>flgD</i>	HPflgD3 HP907_RT2	<u>attagatct</u> TGACGCTTCTAAAGGA GTG AAGCGGTTTTTGTATCCGG	50	60	23	350	
HP0908	<i>flgE2</i>	HP908_RT1 HPflgD2	GATAATTCCTAACCCGC <u>tatagatct</u> GCTGGTAAGTCAAATCT TGG	50	60	23	214	
HP1028	<i>hyp.</i>	HP1028_RT1 HP1028_RT2	AAAAATATAGGGAAGAGCCG AATCGCTTAAAAACACCACG	51	60	20	317	
HP1032 HP1033	<i>fliA</i> – <i>hyp.</i>	HP1032_RT2 HP1033_RT2	AGGGATTTGCTCTCTTTTCGC TTTGAAGTATTTGGGGTAGG	53	60	27	947	
HP1034	<i>flhG</i>	HP1034_RT1 HP1034_RT2	TAGATGTGATTTTTGGGGTG AAAACAAATCGTTAGGGGCT	53	60	23	653	
HP1034 HP1035	<i>flhG</i> – <i>flhF</i>	HP1034_RT2 HP1035_RT1	AAAACAAATCGTTAGGGGCT GACAATTATCGGCATTGGGG	53	60	23	1258	
HP1051	<i>hyp.</i>	HP1051_1HP 1051_2	AAAATGTAAAACGGCGTGTTCC AAAAGGCTTTTCGCTTAATCC	50	60	21	499	
HP1052	<i>envA</i>	HP1052_1HP 1052_2	AAGAAGTGTATTTGCCCATC ATTAAGAAGACTAGACGCTCC	50	60	21	400	
HP1067	<i>cheY</i>	HpcheY_RT1 HpcheY_RT2	GATAGCTCAACTATGAGGAG TTCTTTCAAACCTTGGGGGG	51	60	25	321	
HP1119	<i>flgK</i>	HP1119_1 HP1119_2	CAACATTACCCGCACTATCG GACATTGATGAAGCGAGCCT	55	60	23	857	
HP1120	<i>hyp.</i>	HP1120_1 HP1120_2	TAATCGCAAGTGTGCATGGGG AAGCTCGCTAAACACACCGA	55	60	23	299	
HP1122	<i>flgM</i>	HP FM6 HP FM11	<u>aaaggatcc</u> GAAATCCTTGTAATCC ATGCTTATCCCCAATAAATCC <u>ataggatcc</u> CTTGCTGTAATGGAAT GAATATC	53	60	20	243	Josenhans et al., 2002a
HP1154	<i>hyp.</i>	HP1154_RT1 HP1154_RT2	GAGCATATTAACGAAGTGCG TAAATAGCCTCTATGCCTTGC	55	60	23	481	
HP1154 HP1155	<i>hyp.</i> – <i>murG</i>	HP1154_RT1 HP1155_RT2	GAGCATATTAACGAAGTGCG TTGTTTGGTGAGTTTGGGAG	53	60	25	532	
HP1233	<i>flgJ</i>	HP1233_RT1 HP1233_RT2	TCCAACAGAAAATCTCCCC TGTAAGCGTTTTGGTAGCG	51	60	21	305	
HP1432	<i>hyp.</i>	HP1432_RT1 HP1432_RT2	AACAACAGCAACAACAGGC TTGTTGGTTTTGTTGTTGGC	51	60	20	197	
HP1440	<i>hyp.</i>	HP1440_RT1 HP1440_RT2	AAGAAACATCAAGCGAAAGG AAGTGTATTTTAGCGATGGG	53	60	23	453	
HP1559	<i>flgB</i>	HP1559_RT1 HP1559_RT2	TTGAAAGCGTTTTGGCGAAG AATTAGCCCTTAAGCGTTGG	51	60	23	371	

## Material & Methoden

**Tab. 5 Oligonukleotide für PCR-Klonierungen und Sequenzierungen.** Es ist jeweils der Primernamen, die Sequenz und wenn vorhanden die durch den Primer eingefügte Restriktionsschnittstelle angegeben. Bereiche, die mit der *H. pylori* 26695-Gensequenz nicht homolog sind, sind mit Kleinbuchstaben angezeigt, Schnittstellen sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Name	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Zweck/Referenz
HPflgD1	tata <u>gatct</u> AATGAAAACCAAGAAACGACG	<i>Bgl</i> II	PCR-Klonierung <i>flgE2</i> ; diese Arbeit
HPflgD2	tata <u>gatct</u> GCTGGTAAGTCAAATCTTGG	<i>Bgl</i> II	
HPflgH1	tata <u>gatct</u> GTAACCTTCTCTAACCTTCATGG	<i>Bgl</i> II	PCR-Klonierung <i>flgH</i> ; diese Arbeit
HPflgH2	tata <u>gatct</u> TTAACATACTCCATGCTATCG	<i>Bgl</i> II	
HPflgH3	aa <u>ggatcc</u> ACCAAATCCAGCAATAACACG	<i>Bam</i> HI	
HPflgH4	tat <u>ggatcc</u> ACAATGATTGTGATCAAATCG	<i>Bam</i> HI	
HP1076_1_	tat <u>gagtct</u> GGCGATGTTGAAACAAGCGA	<i>Bgl</i> II	PCR-Klonierung von HP1076; diese Arbeit
BgIII			
HP1076_2_	tat <u>gagtct</u> TTGGCATGAAGGCTTTAGGG	<i>Bgl</i> II	
BgIII			
HP1076_3_	at <u>ggatcc</u> TGCAAGACTTGTAACGCTC	<i>Bam</i> HI	
BamHI			
HP1076_3_	aa <u>ggatcc</u> ATTGGAAAATGTGGGCGAG	<i>Bam</i> HI	
BamHI			
HP1232_1_	att <u>gagtct</u> AGATCTCAAGCATTTAAGCCAC	<i>Bgl</i> II	PCR-Klonierung von HP1233; diese Arbeit
BgIII	TTTC		
HP1233_2_	tat <u>gagtct</u> TGTAAGCGTTTTGGTAGCG	<i>Bgl</i> III	
BgIII			
HP1233_3_	aaa <u>ggatcc</u> GAGATTTTCTGTTGGAGC	<i>Bam</i> HI	
BamHI			
HP1233_4_	aa <u>ggatcc</u> AACCGATAAATGGTTTGAC	<i>Bam</i> HI	
BamHI			
km1	CTGCTAAGGTATATAAGCTGGTGGG		Nachweis der <i>aphA3'</i> -III-Kassette (Km <sup>R</sup> ); Suerbaum <i>et al.</i> , 1993
km2	CATACTGTTCTTCCCCGATATCCTC		
Flag1	TCGTCATCCTTGTAATCCAT		Nachweis des 'Flag-Taq'; diese Arbeit
HPflaANotI1	atatatat <u>cgggccgc</u> CTCAAACCTTCCTGACT	<i>Not</i> I	PCR-Reporter-gen-Klonierung <i>pflaA-luxAB</i> und <i>pflaB-luxAB</i> ; diese Arbeit; Niehus <i>et al.</i> , 2002
HPflaBNotI	atatatat <u>cgggccgc</u> CAATAGACGCTTTAAC	<i>Not</i> I	
gfpNotI2	atatatat <u>cgggccgc</u> CATGGCATGGATGAAC	<i>Not</i> I	
TATAC			
VHluxA1	AAGCCACAACCTTCAGACG		PCR, Sequenzierung; Überprüfung Reporter-gen-Klonierungen <i>luxAB</i> ; diese Arbeit; Niehus <i>et al.</i> , 2002
VHluxB2	TTGCGATTGAGTGTTGTGG		
HPflaA-3	ACAGGCGCGTTAATCACG		PCR, Sequenzierung <i>flaA</i> ; Suerbaum <i>et al.</i> , 1993
HPflaA-4	ATTGATGCTCTTAGCGTC		
HPflaA-5	ttaa <u>gatc</u> TAAAAGCAAGGATGCCTTTGG	<i>Bgl</i> II	
HPflaA-9	CAAGCGTTATTGTCTGGTC		
HPflaA-10	TCATCCATAGCCTTATCCGC		
HpflaB7	GTTTATACCTATTAATGAATG		PCR, Sequenzierungen <i>flaB</i> ; Suerbaum <i>et al.</i> , 1998b
HpflaB10	TAATGTCTCTAGCGTCCG		
pUC18/M13-forward	GTTTTCCCAGTCACGACG		PCR, Sequenzierung; Überprüfung Klonierungen in pUC18
pUC18/M13-reverse	TCACACAGGAAACAGCTATGAC		

## Material & Methoden

HP908_NdeI	tatatacatATGAACGACACCTTATTAACG	NdeI	PCR-Klonierung <i>flgE2</i> in den pTWIN1 Überexpressionsvektor; diese Arbeit
HP908_SapI	tatatagctcttcgctcttctgcaTTTTTCAAGCTA ATGGCTTC	SapI	
Ins1_fw	GACTCACTATAGGGAGAC		Amplifikation der internen Standards für die PCR-Produkt Microarrays (interne Standards Ins1, Ins2, Ins3, Ins5: <i>Saccharomyces</i> -Gene CHS1, CHS2, GAS1, und FKS1; Guckenberger <i>et al.</i> , 2002).
Ins1_rev	AGCATTTAGGTGACACTATAG		
Ins2_fw	CTAAGCTTTTTCCGCGGCCGCCCGGCATCTCCT		
Ins2_rev	CGTTGATAGAGACTCGAGTTGTCAATTCAA		
Ins3_fw	TATCAGGGCCAAGCGGCCGCTACCCAGGGACC		
Ins3_rev	TCAGGAGACATTCTCGAGGACC		
Ins5_fw	CTTTCAAAGTTAGCGGCCGCTGCTGCTTTTTT		Universalprimer für die Reamplifikation der PCR-Produkte für die DNA-Microarrays mit 5'-Aminogruppen.
Ins5_rev	ACAAGCCTCCGTCTCGAGTTGGTGGTAATT		
HPadap1	GCATGCATCTTGCTCTTCCATG		
HPadap2	CGTAGCTCAGTTGCTCTTCGTTA		

## 2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.8.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Andere Gebrauchsgegenstände wurden kurz vor Gebrauch mit vergälltem Ethanol (70% [v/v]) gespült, hitzelabile Lösungen wurden durch Einwegfilter (Porengröße 0,2 µm, Nalge Nunc International, NY, USA) sterilfiltriert.

Alle für den Umgang mit RNA benötigten Lösungen wurden doppelt autoklaviert und z. T. mit DEPC behandelt. Geräte, sowie der Arbeitsplatz wurden mit 70%igem [v/v] Ethanol abgewischt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden zudem bei allen Arbeiten im Zusammenhang mit RNA Einweghandschuhe getragen. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

### 2.8.2 Reinigung von Nukleinsäuren

#### 2.8.2.1 Extraktion von bakterieller DNA

Für die Isolierung kleinerer Mengen DNA aus *H. pylori* wurde das DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierzu wurde etwa 1/8 des Zellmaterials einer ca. 48 h bewachsenen Agarplatte in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und bei 11000 Upm abzentrifugiert. Aus dem Zellpellet wurde entsprechend den Herstellerangaben die genomische DNA extrahiert und abschließend in 200 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.8.2.2 Extraktion von bakterieller RNA

Für die Extraktion bakterieller RNA wurden die Bakterien in Flüssigkultur bis zu der gewünschten optischen Dichte angezogen. Die Zellernte erfolgte durch zügiges Aliquotieren der Zellkultur in 2 ml Reaktionsgefäße und Zentrifugation für 30 Sekunden bei 4°C und 13000 Upm (Eppendorf Zentrifuge 5417R). Anschließend wurde der zellfreie Überstand dekantiert und das Zellpellet in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Der Zellaufschluß erfolgte in Reaktionsgefäßen mit RNase-freien Glaskugeln (FastRNAtubes-Blue; Qbiogene, Illkirchen, Frankreich) unter Zuhilfenahme eines `bead beater`-Schüttlers (FP120, Savant, New York, USA). Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) nach einem angepassten Protokoll durchgeführt. Hierzu wurden ca.  $12 \times 10^8$  (ca.  $2 \times 2$  ml O.D.<sub>600</sub>=1) eingefrorener Bakterien in 850 µl RTL+β-ME Puffer resuspendiert und in den Zellaufschluß-Reaktionsgefäßen in dem `bead beater`-Schüttler aufgeschlossen (45 sec., Stufe 6,5). Nach anschließender Zentrifugation für zwei Minuten bei 4°C und 13000 Upm, wurde der Überstand (ca. 700 µl) mit 500 µl Ethanol (reinst, 96% [v/v]) versetzt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll (Qiagen, Hilden) unter Elution der RNA in 2x 44 µl RNase-freiem Wasser. Hiernach folgte DNaseI Behandlung (1 h, 37°C) unter Zugabe von 10 µl 10x DNaseI Puffer sowie 2 µl DNaseI (RNase frei, 10 U/µl, Roche), die durch eine PCR mit den Primern HPflaA4 und HPflaAPV4 überprüft wurde. Bei einer positiven PCR-Reaktion wurde die DNaseI Behandlung wiederholt, bis die Überprüfungs-PCR negativ war.

Je zwei Präparationen aus demselben Zellmaterial wurden vereinigt, nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 2 x 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde die RNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.8.12.1) beurteilt und die Konzentration und Reinheit photometrisch bei den Wellenlängen 260nm und 280nm bestimmt (RNA-Programm; GeneQuant pro, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

10x DNaseI Puffer:    1 M Na-Acetat  
                              50 mM MgSO<sub>4</sub>  
                              pH 5

### 2.8.2.3 Aufreinigung von DNA

Zur Entfernung von einzelnen Nukleotiden, Oligonukleotiden, Enzymen und Puffer aus Restriktions- und PCR-Ansätzen wurde der QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Sollten einzelne DNA-Banden von anderen separiert werden, wurden diese nach einer Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.8.12.1) aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem oben genannten Kit aufgereinigt.

### 2.8.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 2.8.3.1 Standard-PCR

Die Reaktionsbedingungen für verschiedene PCRs wurden entsprechend der Herstellervorgaben für die verwendete Polymerase, die eingesetzten Primer und der zu amplifizierenden DNA-Matrize (template) angepasst. Die Templatekonzentration für chromosomale DNA lag i. d. R. in der Größenordnung von 10 ng pro 100 µl Reaktionsvolumen, die Primerkonzentrationen bei 1-2 pmol/µl. Die Schmelztemperaturen für die beiden Primer wurden nach der Formel  $[2x(A+T)+4x(G+C)]-5$  berechnet. Als Hybridisierungstemperatur (‘Annealing’) wurde zunächst ein Wert 1-2°C unterhalb des Schmelzpunktes des weniger affinen Primers gewählt. Für die Länge der Polymerisationsphase (‘Elongation’) wurde eine Minute pro 1 kB des angestrebten Produktes angesetzt. Als Beispiel sei hier eine Standard-PCR mit der Pharmacia-*Taq*-DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgeführt. In einem PCR-Reaktionsgefäß werden auf Eis die folgenden Komponenten zusammengefügt:

10 × PCR buffer (incl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
1,25 mM dNTPs	8 µl
Primer 1 (5 µM)	1 µl
Primer 2 (5 µM)	1 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 45 µl
DNA -Matrize (z. B. 1-10 ng Plasmid)	5 µl

#### Reaktionsbedingungen:

5 min 94°C	initiale Denaturierung	
1 min 94°C	Denaturierung	} 30 Zyklen
1 min 55°C	Annealing	
1 min 72°C	Elongation	
3 min 72°C	Elongation	



Die Stringenz der PCR wurde durch Erhöhung der Annealing-Temperatur bzw. Verkürzung der Annealing-Zeit erhöht.

Die Reinigung von PCR-Produkten für den Einsatz in nachfolgende Reaktionen (Phosphorylierung, Sequenzierung, Klonierung) erfolgte über QIAquick Spin Säulchen (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

### **2.8.3.2 Plasmidspezifische PCR direkt aus Zellmaterial**

Lag ein Plasmid, basierend auf einem `high copy vector`, in *E. coli* vor, konnten Sequenzabschnitte des Plasmids ohne weitere Aufarbeitung der DNA direkt amplifiziert werden. Hierzu wurde eine Standard PCR durchgeführt, bei der statt Zugabe der gereinigten DNA Zellmaterial einer Einzelkolonie mit einem Zahnstocher in das Reaktionsgefäß eingerieben wurde.

### **2.8.3.3 inverse PCR**

Die inverse PCR dient der Einführung von Restriktionsschnittstellen und der Deletion von Sequenzabschnitten eines in einen Vektor klonierten Gens. Die Oligonukleotide wurden hierbei so gewählt, dass sie auf Plus- und Minus-Strang des Plasmids einander gegenläufig positioniert sind, Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende enthalten und mit ihren 5'-Enden die zu deletierende Sequenz eingrenzen. Für die PCR wurde ein Enzymmix verwendet, der sich durch eine `proof-reading`-Aktivität auszeichnet und für die Synthese langer PCR-Fragmente optimiert ist (Expand high fidelity PCR system, Roche). Die PCR Bedingungen wurden nach Herstellerangaben gewählt. Das gewünschte Fragment wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (vgl. 2.8.12.1), mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (vgl. 2.8.5) und stand dann für Klonierungen zur Verfügung.

### **2.8.3.4 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR, semi-quantitativ)**

Um Transkriptmengen einzelner Gene in der Bakterienzelle beurteilen zu können, wurde u.a. die reverse Transkriptase PCR eingesetzt. Diese Methode unterteilt sich in zwei Reaktionen, eine reverse Transkription von RNA in cDNA und eine Amplifikation der cDNA mittels einer PCR. Im Gegensatz zu quantitativen Varianten wie kompetitiver RT-PCR oder `Lightcycler`-RT-PCR, ist die hier angewandte

Methode nur semi-quantitativ auswertbar, d. h. es konnten nur Tendenzen in der Veränderung der Transkriptmenge abgelesen werden. Die cDNA-Synthese wurde mit einem Hexamer-Primer-Mix durchgeführt, die nachfolgende PCR mit Gen-spezifischen Primern. Für jede RNA-Präparation wurde zusätzlich eine cDNA-Negativkontrolle ohne Enzym durchgeführt, um in der nachfolgenden PCR mögliche DNA-Kontaminationen zu detektieren.

### cDNA-Synthese:

`Random Primers` (100 ng/µl, Invitrogen)	3 µl
Gesamt-RNA	2 µg
ddH <sub>2</sub> O	ad 11 µl
10 min, 65°C (Denaturieren)	
10 min, RT (Primer-Anlagerung)	
5x RT-Puffer (Invitrogen)	4 µl
0,1 M DTT (Invitrogen)	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
RNaseOut (Invitrogen)	1 µl
SuperScript II (200 U, Invitrogen)	1 µl
<u>oder</u>	
ddH <sub>2</sub> O (Negativkontrolle)	2 µl
2 h, 42°C (reverse Transkription)	
15 min, 70°C (Inaktivierung des Enzyms)	
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Von der cDNA wurde jeweils 2,5 µl in einer 25 µl Standard-PCR eingesetzt. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde für jedes Primerpaar individuell bestimmt (vgl. Tab. 4).

### **2.8.4 Sequenzierung von DNA**

Für die Sequenzierung wurden 100 ng PCR-amplifizierter DNA bzw. 400 ng Plasmid-DNA und 10 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 8 µl in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Sequenzierreaktion wurde im DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie auf einem ABI-Sequencer durchgeführt und basierte auf der Kettenabbruch-Methode (Sanger 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden aus dem ABI-Big-Dye Kit nach Herstellerangaben.

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des frei erhältlichen Programms Chromas 1.45 (<http://www.technehsium.com.au/chromas.html>) visualisiert und mit den Programmen EditSeq, MapDraw und MegAlign aus der *Lasergene*-Sequenzanalyse-Software (Dnastar, Madison Wisconsin, USA) ausgewertet.

### **2.8.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Je nach Verwendungszweck wird eine bestimmte Menge gereinigter DNA mit den gewünschten Restriktionsenzymen und dem vom jew. Hersteller vorgesehenen Puffer bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Die Menge an Enzymlösung, die dem Ansatz zugegeben wird, sollte 10% [v/v] der Ansatzgröße nicht überschreiten, da sonst die Sequenzspezifität der Restriktionsendonuklease stark herabgesetzt werden kann (sog. Sternaktivität). Bei Mehrfachrestriktionen mit Enzymen verschiedener Hersteller wurde i. d. R. der `One-Phor-All-Buffer Plus` (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) als Reaktionspuffer verwendet.

### **2.8.6 Glätten von DNA-Fragmenten**

Für einige Ligationen war es notwendig, bei DNA-Fragmenten mit überhängenden `klebrigen` Enden (`sticky ends`) diese mit entsprechenden dNTPs aufzufüllen und so in glatte Enden (`blunt ends`) umzuwandeln. Zum Auffüllen von 5'-überhängenden Enden wurde die gewünschte Menge DNA in einem Reaktionsansatz mit 1 x `One-Phor-All-Buffer Plus` (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 1mM dNTPs und 1-2 U/µg DNA Klenow-Enzym (Roche, Mannheim) gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Abschließend erfolgte eine 10minütige Inaktivierung des Klenow-Enzyms bei 75°C und eine Aufreinigung des Fragments.

### **2.8.7 Alkalische-Phosphatase-Behandlung**

Wurde ein Vektor für eine Klonierung mit nur einer Restriktionsendonuklease geschnitten, wurden zur Vermeidung von Selbstligationen die freien Enden dephosphoryliert. Dies erfolgte mit CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) unter Bedingungen nach Herstellerangaben.

### **2.8.8 Ligation**

Die vorbereitete Vektor- und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von ca. 1:3 eingesetzt, mit 1,5 µl Units T4-DNA-Ligase und 2 µl 10x Ligationpuffer versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 16°C für mindestens 16 h durchgeführt. Der Ligationansatz wurde danach in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (vgl. 2.8.9). Alternativ wurde mit dem `Quick Ligation Kit`

(NEB, Bad Schwalbach) gearbeitet, mit dem die Ligation nicht über Nacht, sondern in 5-10 min bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnte.

### 2.8.9 Transformation von DNA

***Helicobacter pylori***. Aufgrund der natürlichen Kompetenz von *H. pylori* ist eine Vorbereitung der Zellen zur Aufnahme von DNA nicht notwendig. Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden Bakterien einer Übernachtskultur auf einer im Durchmesser ca. 3 cm großen Fläche einer frischen Blutagarplatte ausgestrichen und 2 h bei 37°C in mikroaerober Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden ca. 200 ng Plasmid-DNA auf den Bakterienrasen gegeben. Die Zellen wurden 24 h bei 37°C in mikroaerober Atmosphäre inkubiert und anschließend auf einer selektiven Blutagarplatte ausplattiert. Nach 4-8 Tagen konnten Einzelkolonien isoliert und überimpft werden. Die erfolgreiche Transformation wurde im Folgenden durch Extraktion genomischer DNA (vgl. 2.8.2.1), PCR und anschließender Sequenzierung überprüft.

***Escherichia coli***. Zu 150 µl angetauten kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 1-2 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz (vgl. 2.8.8) gegeben. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis gestellt und danach für 2 min bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

**Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**. 50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft. Die anfängliche O.D.<sub>600</sub> sollte ca. 0,1 sein (O.D.<sub>600</sub> von 1 entspricht  $\sim 2\text{-}3 \times 10^8$  Bakterien/ml). Die Kultur wurde bei 37°C für etwa 4 h inkubiert, wobei eine O.D.<sub>600</sub> von 0,6 nicht überschritten werden sollte. Anschließend wurden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt und danach für 10 min bei 4500 xg und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml eiskalter TFB I-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 4500 xg und 4°C wurde das Pellet in 2 ml eiskalter TFB II-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und in Aliquots von 150 µl sofort bei -80°C eingefroren und gelagert.

## Material & Methoden

---

<u>TFB I-Lösung:</u>	RbCl	100 mM
	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerin	15% [v/v]
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
<u>TFB II-Lösung:</u>	MOPS pH 7.0	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15% [v/v]
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> , pH 7.0	

### 2.8.10 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### 2.8.10.1 Plasmid Mini-Präparation (nach Birnboim & Doly, 1979)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden 1,4 ml einer frisch gewachsenen Flüssigkultur für 5 min bei 11000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl Lösung 1 aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter Lösung 2 wurde der Ansatz durch Invertieren gemischt, maximal 5 min bei RT inkubiert und 150 µl eiskalter Lösung 3 zugegeben. Nach Durchmischen wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gevortext und 2 min bei 11000 Upm zentrifugiert. Die DNA-haltige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen, mit zwei Volumen Ethanol (reinst, 96% [v/v]) gefällt und 15 min bei 12000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die präzipitierte DNA mit 500 µl Ethanol (reinst, 70% [v/v]) gewaschen. Das DNA-Pellet wurde anschließend 5-10 min unter Vakuum getrocknet, in 30-50 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8.0) mit 10 µg/ml RNase aufgenommen und 10 min bei 37°C inkubiert. 1-2 µl isolierter DNA wurde anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (vgl. 2.8.5) und durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft (vgl. 2.8.12.1).

<u>Lösung 1:</u>	Glukose	50 mM
	Tris-HCl, pH 8.0	25 mM
	EDTA	10 mM
	Lysozym	100 mg/ml
<u>Lösung 2:</u>	NaOH	0,2 N
	SDS	1% [w/v]
<u>Lösung 3:</u>	Kaliumacetat	5 M
	Essigsäure	1,8 M

### **2.8.10.2 Plasmid Midi-Präparation**

Zur Präparation größerer Mengen reiner DNA aus *E. coli* für Klonierungen oder Sequenzierungen wurde der QIAGEN Plasmid-Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA wird hierbei über Silicagel-Anionenaustauschersäulen aufgereinigt und ist von größerer Reinheit als die nach der klassischen Plasmid Mini-Präparation gewonnene DNA. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll, wobei als Ausgangsmaterial für `high-copy-Plasmide` 30-50 ml und für `low-copy-Plasmide` 100 ml Übernachtskultur dienten.

### **2.8.11 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle**

Die Nukleinsäure-Konzentrationen in Lösungen wurden photometrisch (GeneQuant pro, Pharmacia Biotech, Heidelberg) durch Messen der Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten ermittelt. Für eine O.D.<sub>260</sub> von 1 wurde für doppelsträngige DNA die Konzentration von 50 µg/ml, für RNA von 40 µg/ml zugrundegelegt; die Reinheit der Nukleinsäuren ließ sich aus dem Verhältnis der O.D.<sub>260</sub> zur O.D.<sub>280</sub> abschätzen. Bei reinen DNA- bzw. RNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989). Werte zwischen 1,8 und 2,1 wurden toleriert.

### **2.8.12 Agarosegelelektrophorese**

#### **2.8.12.1 Standard-Agarosegelelektrophorese**

DNA-Moleküle wurden ihrem Molekulargewicht nach mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) aufgetrennt. Zur Herstellung eines 0,8-1,5%igen Agarose-Gels wurde 0,8-1,5 g Agarose auf 100 ml 1 x TAE-Puffer gegeben und unter Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 54°C wurde die Lösung in einen horizontalen Gel-Schlitten gegossen. Zur Ausbildung von Geltaschen wurde zuvor ein Kamm in den Schlitten platziert. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm wieder entfernt, der Schlitten in eine Gel-Kammer gegeben und mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 µl 10x DNA-Probenpuffer versetzt. Ein DNA-Längenstandard wurde aufgetragen und die Elektrophorese bei 80 Volt für kleine, bei 120 Volt für große Gele gestartet. Nach 1 bis 1,5 h wurden die Agarose-Gele in einem 2%igem Ethidiumbromid-Bad für ca. 20 min gefärbt. Die durch den interkalierenden Farbstoff

Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren konnten anschließend durch Fluoreszenzanregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden.

<u>1 x TAE-Puffer:</u>	Tris-Acetat	0,04 M
	EDTA, pH 8.0	1 mM
<u>10x DNA-Probenpuffer:</u>	Bromphenolblau	0,4% [w/v]
	EDTA pH 8.0	0,5 M
	SDS	0,1% [w/v]
	Glycerol	67,75% [v/v]

**Präparative Agarose-Gele.** Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen (vgl. 2.8.12.1) wurden präparative Agarose-Gele verwendet. Dazu wurde 0,8% [w/v] NA-Agarose (Amersham Pharmacia, Freiburg) in 1 x TAE-Puffer gelöst und aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde 4% [v/v] Ethidiumbromid zugegeben, die Lösung in einen Gel-Schlitten gegossen und weiter wie oben beschrieben fortgeführt, jedoch der Färbeschritt ausgelassen. Die sofortige Zugabe von Ethidiumbromid zur Agarose-Lösung ermöglicht eine genauere Visualisierung der DNA-Banden gegenüber einem nachträglichen Färben des Gels. Dies ist von Vorteil für die exakte Isolierung des gewünschten DNA-Fragments.

### 2.8.12.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

RNA-Proben, mit denen eine Hybridisierung durchgeführt werden sollte, wurden unter denaturierenden Bedingungen in Agarosegelen aufgetrennt. Hierbei soll die Anwesenheit von Formaldehyd in den Proben, dem Agarosegel und in dem Laufpuffer das Auftreten von Sekundärstrukturen verhindern und so einen denaturierten Zustand der RNA während der Elektrophorese aufrechterhalten.

Für ein 1%iges Gel wurde 100 mg Agarose in 88 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> autoklaviert und in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Nun wurden 1,8 ml Formaldehyd (37%, [v/v]; 0,24 M Endkonzentration) und 3 ml 10x Laufpuffer dazugegeben und das Gel in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Die RNA-Proben und der RNA-Längenstandard wurden mit 5x Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 65°C denaturiert, auf Eis gestellt und anschließend aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Laufpuffer mit 0,22 M Formaldehyd bei 80 V, bis die Lauffront das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Nach Abbruch der Elektrophorese wurde der Längenstandard abgetrennt und nach 30minütiger Inkubation im Ethidiumbromidbad dokumentiert. Der Rest des Gels

wurde zur partiellen Hydrolyse der RNA für 5 min in NaOH-Lösung (50 mM) inkubiert und anschließend zur Neutralisation 5 Minuten in Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) gegeben. Nun konnte das Gel einem Vakuumblot (vgl. 2.8.14) unterzogen werden.

<u>10 x Laufpuffer:</u>	MOPS	41,8 g
	Na-Acetat	4,1 g
	Na <sub>2</sub> EDTA	3,7 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml
	pH 7,0, autoklavieren und dunkel lagern	
<u>5 x RNA-Auftragspuffer:</u>	Bromphenolblau-Lösung	16 µl
	0,5 M EDTA	80 µl
	Formaldehyd (37%, [v/v])	720 µl
	Glycerin (86%, [v/v])	2,3 ml
	Formamid (deionisiert)	3,1 ml
	10x Laufpuffer	4 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 10 ml

### 2.8.13 Markierung von DNA mit Digoxigenin

Die Markierung von DNA mit Digoxigenin zur späteren Immundetektion auf einem Northern Blot (vgl. 2.8.14) erfolgte durch eine Standard-PCR (vgl. 2.8.3.1) unter Zugabe von Digoxigenin-markierten dUTP (alkali labile; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg). Eine 50 µl PCR-Reaktion enthielt 1 µl dNTP-Mix (1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,7 mM dTTP) und 3,5 µl Dig-11-dUTP (1 mM). Bei jeder Reaktion wurde eine Kontrolle ohne Zugabe von Dig-11-dUTP durchgeführt. Aufgrund der in die DNA eingebundenen Digoxigenin-Moleküle läuft das PCR-Produkt in der Agarose-Gel-Elektrophorese (vgl. 2.8.12.1) langsamer als die Kontroll-DNA. Die markierte DNA wurde nun mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und konnte anschließend als Sonde in einer Northern Blot-Hybridisierung (vgl. 2.8.14) eingesetzt werden.

### 2.8.14 Northern Blot-Hybridisierung

Der Transfer von RNA auf eine Membran wurde basierend auf der Methode von Alwine et al. (1977) durchgeführt. Gesamt-RNA-Präparationen wurden zunächst einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese und partieller Hydrolyse unterzogen (vgl. 2.8.12.2). Bei einem unmarkierten RNA-Längenstandard wurde dieser abgetrennt und mit einem Lineal in der Photodokumentation festgehalten, ein Digoxigenin markierter RNA-Größenstandard wurde mit der RNA auf die Membran übertragen. Der Nukleinsäuretransfer von dem Agarosegel auf die positiv geladene



Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) wurde mit einer Vakuumbiot-Apparatur (Keutz, Reiskirchen) durchgeführt. Der Transfer erfolgte für 1-2 h bei 0,3 kPa mit 6 x SSC als Transferpuffer, der das Gel ständig bedecken musste. Anschließend wurde die Membran kurz in 2 x SSC, 0,1% SDS gelegt und danach die RNA in einem UV-Crosslinker (Stratagene) an der Membran fixiert (45 sec, 1200 Joule). Die Membran konnte nun direkt für die Hybridisierung eingesetzt werden, oder bei 4°C in Plastikfolie verpackt gelagert.

Die Hybridisierungs-, Wasch- und Detektionsschritte wurden unter stringenten Bedingungen nach Herstellerangaben des Dig-DNA detection kits (Roche) unter Verwendung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden hergestellt. Es wurde gezeigt, dass als Hybridisierungspuffer ohne Qualitätsverlust alternativ zu einem 50%-Formamidpuffer ein SDS-Puffer (Monod-Puffer) verwendet werden konnte.

<u>20 x SSC-Puffer:</u>	NaCl	175,3 g (3 M)
	Na <sub>3</sub> Citrat	100,5 g (300 mM)
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml
	pH 7,0	
<u>Monod-Puffer:</u>	SDS	7%
(nach Boehringer, Ingelheim)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2)	0,5 M
	EDTA	1 mM

### 2.8.15 *in vitro*-Transkription

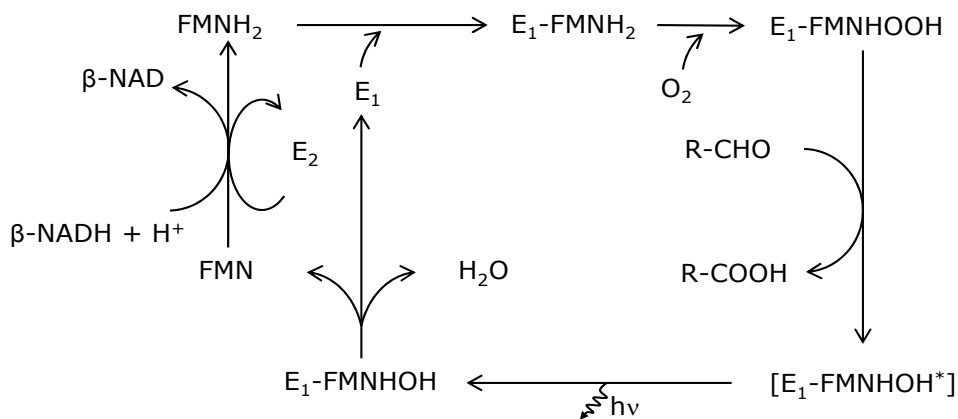
Zur Herstellung von internen Standards für die Kontrolle der Effizienz der Fluoreszenzmarkierung von cDNA für die Microarray-Hybridisierungen wurden *in vitro*-Transkripte von unterschiedlichen *Saccharomyces*-Genen hergestellt, die keine Homologien zu *H. pylori*-Genen aufwiesen. Dies wurde mit Plasmiden durchgeführt, bei denen die entsprechenden Gene hinter einen T7-Polymerase-Promotor kloniert wurden waren (Guckenberger *et al.*, 2002). Die Plasmide mußten vor der Reaktion linearisiert werden, da keine bakteriellen Terminatorstrukturen existieren und sog. `Runoff-Transkripte` entstehen würden.

<u><i>in vitro</i>-Transkription:</u>	20 µl 5 x T7 buffer (Invitrogen)
	20 µl linearisiertes Plasmid (4 µg)
	30 µl 0,1 M DTT
	4 µl NTPs (10 mM, Invitrogen)
	0,8 µl T7-Polymerase (50 U/µl, Invitrogen)
	30 min, 37°C

Der Ansatz wurde aufgereinigt und DNaseI-behandelt, analog zum RNA-Extraktions-Protokoll (vgl. 2.8.2.2).

## 2.9 Messung der Luziferase-Aktivität

Die Biolumineszenz in Bakterien wird durch die Oxidation eines reduzierten Riboflavinmononukleotids (FMNH<sub>2</sub>) und einer langkettigen Fettsäure mit Aldehydgruppe (Tetradekanal) durch die Emission von blau-grünen Licht (490nm) hervorgerufen. Katalysiert wird die Reaktion durch das Enzym Luziferase, eine Oxidoreduktase regeneriert das FMNH<sub>2</sub> (siehe Abb. 6; Meighen, 1991; Blouin *et al.*, 1996). Für das Reportersystem müssen die Gene für die Luziferase-Untereinheiten, *luxAB* fusioniert mit einem geeigneten Promotor in das rekombinante Bakterium transformiert werden. Während das Flavinnukleotid vom Organismus stammt, wird das Substrat exogen hinzugefügt, um die Reaktion zu starten und die Biolumineszenz mit einem Luminometer quantifizieren zu können.



**Abb. 6.** Vereinfachtes Schema der biochemischen Reaktion der Erzeugung von Biolumineszenz durch das LuxAB-System (aus Blouin *et al.*, 1996). E<sub>1</sub> ist die Luziferase aus den Untereinheiten LuxAB, E<sub>2</sub> eine Oxidoreduktase, hν emittiertes Licht (490 nm).

Messungen der Aktivität von bakterieller Luziferase als Reporter für Promotoraktivitäten wurden in nicht-transparenten Mikrotiterplatten in einem Photometer ('Hamamatsu MTP reader', Hamamatsu Photonics, Japan) durchgeführt. Hierzu wurden die *H. pylori*-Stämme mit den *luxAB*-Genfusionen in Flüssigmedium angezogen (vgl. 2.5.2) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wachstumskurve Proben genommen. Für jede Probe wurde die O.D.<sub>600</sub> bestimmt und die Zellen auf eine O.D. von 0,1 eingestellt. 10 µl dieser Bakteriensuspension (ca. 3 x 10<sup>5</sup> Bakterien) wurden mit 30 µl Reaktionspuffer in der Mikrotiterplatte vermischt und

direkt vor der Messung 10 µl des Substrates (n-Decyl-Aldehyd, 1:20000 in Reaktionspuffer, Sigma, Steinheim) zugegeben. Die Messung erfolgte im Luminometer unter Lichtabschluß (MTP reader CAA software, Hamamatsu). Alle Messungen wurden jeweils dreifach mit zwei Zellproben durchgeführt. Die Photonenanzahl erfolgte in einem Zwei-Sekunden-Intervall 2, 5 und 10 min nach Initiieren der Reaktion, wobei die 10 min-Messung als stabilster Wert für die Auswertung verwendet wurde. Angegeben wurden die Werte in `relative light units` (RLU).

Reaktionspuffer: Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5 50 mM  
2-Mercaptoethanol 50 mM  
BSA 2% [w/v]

## 2.10 Proteinmethoden

### 2.10.1 Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden nach Bradford mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die photometrischen Messungen wurden je nach Menge der Proben mit einem Multiscan<sup>®</sup> EX-Photometer (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) oder mit einem `GeneQuant Pro`-Photometer (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

### 2.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)

Analytische SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht i. d. R. in Mini-Gelkammern von Bio-Rad mit Gelen der Größe 100 x 50 x 1 mm durchgeführt. Zur Herstellung der SDS-PAA-Gele wurde zunächst das Trenngel (7-12%) bis ca. 0,5-1 cm unter den späteren Rand der Taschen gegossen und mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren und Entfernen des ddH<sub>2</sub>O wurde das Sammelgel (5%) gegossen und der Kamm eingesteckt. War das Gel vollständig polymerisiert, wurde das Gel in die Laufkammer eingespannt und der Kamm entfernt.

Die Proben wurden währenddessen in 5 x Probenpuffer aufgenommen, denaturiert (3 min, 100°C) und auf Eis abgekühlt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte der Lauf bei 80-110 V. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel entweder für eine

## Material & Methoden

Western Blot-Hybridisierung eingesetzt (vgl. 2.10.3), oder mit `Simply Blue™ SafeStain` (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben gefärbt und nach Inkubation in `Packing Solution` in Cellophan getrocknet.

Zusammensetzung von Trenngelen unterschiedlicher Konzentrationen, Endvol. 10 ml (reicht für zwei Minigele); Mengenangaben in ml:

	7%	10%	12%
30% Acrylamid-Mix (Roth)	2,3	3,3	4
4 x Trennpuffer	2,5	2,5	2,5
ddH <sub>2</sub> O	5,2	4,2	3,5
10% [w/v] Ammonium Persulfat (APS)	0,08	0,08	0,08
TEMED	0,02	0,02	0,02

Zusammensetzung des Sammelgels:

	5%
30% Acrylamid-Mix (Roth)	0,85
4 x Sammelpuffer	1,25
ddH <sub>2</sub> O	2,9
10% [w/v] APS	0,08
TEMED	0,02

<u>4 x Trennpuffer:</u>	Tris	182 g (1,5 M)
	SDS	4 g (0,4% [w/v])
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml; pH 8,8
<u>4 x Sammelpuffer:</u>	Tris	60 g (0,5 M)
	SDS	4 g (0,4% [w/v])
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml; pH 6,8
<u>10 x Laufpuffer:</u>	Tris	30 g (0,25 M)
	Glycin	141 g (1,88 M)
	SDS	10 g (1% [w/v])
	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml; pH 8,6
<u>5 x Probenpuffer:</u>	Tris-HCl pH 6,8	50 mM
	SDS	2% [w/v]
	2-Mercaptoethanol	5% [v/v]
	Bromphenolblau	0,005 % [w/v]
	Glycerol	10 % [v/v]
<u>Packing Solution:</u>	EtOH	50%
	Glycerol	3%

### 2.10.3 Immunoblot-Hybridisierung (Western Blot)

**Übertragung von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran.** Zum Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein halbtrockenes Verfahren angewendet (`semi dry blot`). Hierzu wurden in einer graphitbeschichteten Kammer

(Keutz) auf die Anodenplatte 2 Bögen Filterpapier und eine Nitrozellulosemembran (auf Gelgröße zugeschnitten; Schleicher & Schuell) in Towbin-Puffer getränkt übereinander gelegt. Darauf wurde das SDS-PAGE-Gel (vgl. 2.10.2) luftblasenfrei gelegt und mit drei Lagen mit Towbin-Puffer getränktem Filterpapier überdeckt. Der Transfer erfolgte durch Anlegen eines Stromes von  $1 \text{ mA/cm}^2$  (140 mA für zwei Minigele). Der erfolgreiche Transfer wurde durch proteinspezifische Anfärbung der Membran mit PonceauS-Lösung bestätigt.

Towbin-Puffer:

Tris	1,52 g (25 mM)
Glycin	7,2 g (192 mM)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 400 ml
Methanol	+100 ml
Lagerung bei 4°C	

**Immunodetektion.** Für die Immunodetektion spezifischer Proteine wurden zunächst folgende Schritte durchgeführt:

- Waschen der Membran mit TBST, 10 min RT
- Abblocken unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in 5% Skim Milk (SM) in TBST, 45 min RT
- Inkubation mit dem primären AK in 5% SM in TBST, ü. N. 4°C oder 2-3 h RT
- Waschen in TBST, 3x 15 min RT

Die Detektion wurde entweder mit einer Farbreaktion durchgeführt, wozu ein mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet wurde, oder mittels einer Chemilumineszenzreaktion mit dem `Chemiluminescent detection kit` (Pierce, IL, USA) unter Verwendung eines mit Peroxidase (POX) gekoppelten Zweitantikörpers.

### Alkalische Phosphatase Reaktion:

- Inkubation mit dem sekundären AK (1:5000) in 5% SM in TBST, 1-2 h RT
- Waschen in TBST, 3x 15 min RT
- Inkubation mit AP-Substrat, 5-10 min RT
- Abstoppen der Reaktion mit ddH<sub>2</sub>O

### Chemilumineszenz Detektion:

- Inkubation mit dem sekundären AK (1:100000) in 5% SM in TBST, 1 h RT
- Waschen in TBST, 3x 15 min RT
- Inkubation mit Chemilumineszenz-Substrat (1:1, Pierce), 5 min RT
- Exposition des Blots auf einem Röntgenfilm, 20 sec und 5 min

Nach Entfernen der Antikörper mit dem `Restore<sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer` (Pierce) konnte der Blot bis zu einer erneuten Hybridisierung bei -20°C gelagert werden.

<u>TBST:</u>	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	0,2 M
	Tween 20	0,1%
	pH 8,2	

<u>AP-Substrat:</u>	4-Chloro-1-Naphtol in 5 ml Methanol	15 mg
	TBS	25 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µl
	frisch ansetzen	

### 2.10.4 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

Die rekombinante Expression von *H. pylori*-Proteinen in *E. coli* und die Aufreinigung über eine Chitinmatrix wurde mit dem IMPACT<sup>TM</sup> Protein Purification System (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Main) laut Herstellerangaben durchgeführt. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte unter folgenden Bedingungen: Aufnahme der Bakterien in 100 mM Tris-HCl pH 6,8, Ultraschall 5 x 30 sec, Stufe 2/ ca. 40 Watt. Um das überexprimierte Protein nach der Aufreinigung über die Chitinmatrix in einen geeigneten Puffer für die Kaninchenimmunisierung zu überführen, wurde es mit Hilfe von Proteinkonzentrationssäulen mit 30 kDa oder 10 kDa Ausschlußvolumen (PALL FILTRON, Microseps) mehrfach mit 100 mM Tris-HCl pH 6,8 umgepuffert und abschließend in 1 ml des Puffers aufgenommen.

### 2.10.5 Herstellung polyklonaler Kaninchenantisera

Polyklonale Kaninchenantisera wurden ausgehend von überexprimierten und aufgereinigtem Protein durch die Firma Eurogentec (Eurogentec Biologics Department, Seraing, Belgien) hergestellt. Vor der Immunisierung wurden die Präimmunsere von fünf Kaninchen mittels Western Blot (vgl. 2.10.3) auf Kreuzreaktionen mit *H. pylori*-Proteinen getestet. Die zwei Kaninchen, welche die geringsten Kreuzreaktionen aufwiesen, wurden für die Immunisierung ausgewählt.

### **2.10.6 Präparation membranständiger extrazellulärer Proteine von *Helicobacter pylori* (Flagellenpräparation)**

Für das mechanische Abscheren von extrazellulären membranständigen hochmolekularen Strukturen (u. a. Flagellen) wurden abgeerntete Bakterien ( $1/2$  Blutagarplatte, ca. 2-3 Tage gewachsen) in 1 ml 0,9%iger NaCl aufgenommen und auf Eis etwa 20mal durch eine kleine Kanüle ( $26^{3/8}$  gauge) gezogen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Bakteriensediment zur Herstellung von Gesamtzelllysaten in 1 ml 0,9%igen NaCl resuspendiert. Der Überstand mit dem abgescherten Material wurde 30 min bei 22000 x g und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 10 µl 0,9%iger NaCl aufgenommen.

### **2.11 Elektronenmikroskopie**

Für alle Versuche wurden Mikroskope in der Abteilung für Elektronenmikroskopie von Prof. Dr. G. Krohne, Biozentrum Würzburg, verwendet.

**Präparate für Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM).** Zellen auf der Oberfläche von Formvar-beschichteten und kohlenstoff bedampften Gold- bzw. Kupfernetzchen ('Grids') wurden mit einem Tropfen 1%iger Phosphorwolframsäure (pH 7.0) 1 min lang negativ kontrastiert. Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier an der Unterseite des Grids abgesaugt und das Präparat bei RT getrocknet.

### **2.12 Arbeiten mit DNA-Microarrays**

Alle Arbeiten mit DNA-Microarrays wurden möglichst staubfrei und mit Einweghandschuhen durchgeführt. Alle Puffer und Lösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Nach Applikation der Fluoreszenzproben wurden die Inkubationsgefäße mit Aluminiumfolie vor Lichteinstrahlung geschützt.

#### **2.12.1 *Helicobacter pylori*-PCR-Produkt-DNA-Microarray**

Die Herstellung der PCR-Produkt basierten DNA-Microarrays erfolgte ausgehend von 1655 *H. pylori*-spezifischen PCR-Produkten, die am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin (MPIIB) entwickelt und initial synthetisiert wurden. Im

Anschluss wurden diese PCR-Produkte unserer Arbeitsgruppe für die Reamplifikation zur Verfügung gestellt.

Zugrunde gelegt für die Entwicklung der PCR-Produkte am MPIIB wurde die komplette Genomsequenz des Stammes *H. pylori* 26695, sowie die Sequenzen der als stammspezifisch beschriebenen Gene aus *H. pylori* J99 (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Das bioinformatische Primerdesign erfolgte mithilfe der Software `PrimeArray`, die speziell für die Berechnung von geeigneten Primerpaaren für die genomweite Amplifikation von PCR-Produkten für DNA-Microarrays entwickelt worden war (Raddatz *et al.*, 2001). Die Parameter wurden dabei so gewählt, dass nach Möglichkeit die gesamte kodierende Sequenz des jeweiligen Gens durch die PCR mit den neu entwickelten Primerpaaren amplifiziert wurde. An das 5'-Ende beiden genspezifischen Primer eines Primerpaares wurde jeweils eine Universalsequenz angefügt (5'-TTGCTCTTCATG-3' bzw. 5'-TTGCTCTTCGTTA-3'). Dadurch wurden alle genspezifischen PCR-Produkte in einer ersten spezifischen PCR-Amplifikation beidseitig mit universellen flankierenden Sequenzen versehen. Durch die Verwendung von Universalprimern, spezifisch für die flankierenden Sequenzen, konnten in den nachfolgenden PCR-Durchgängen alle genspezifischen PCR-Produkte unter standardisierten Bedingungen mit nur einem Primerpaar amplifiziert werden. Die Universalprimer HPadap1 und HPadap2 verfügten zusätzlich über 5'-Aminogruppen, die der späteren kovalenten Bindung der PCR-Produkte an die beschichteten Glasoberflächen der Microarrays dienen.

Amplifikation der PCR-Produkte. Um eine ausreichende Menge DNA zur Herstellung der Microarrays zu gewinnen, wurden ausgehend von den genspezifischen PCR-Produkten mit universellen flankierenden Sequenzen jeweils mehrere Reamplifikationen mit den Universalprimern HPadap1 und HPadap2 durchgeführt. Um Pipettierungenauigkeiten und Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Reamplifikationen in 96well-Mikrotiterplatten mit individuell verschließbaren Reaktionsgefäßen durchgeführt und ein Pipettierautomat mit Thermocycler verwendet (RoboAmp 4200, MWG Biotech AG, Ebersberg; vgl. Abb. 7). Nach jeder Amplifikationsrunde wurden sämtliche PCR Produkte einer Agarose-Gel-Elektrophorese unterzogen, die der Qualitäts- und Quantitätskontrolle diente. In der Regel wurden zwei Reaktionen von 100 µl vereinigt und auf 35 µl reduziert. Nach Zugabe von 35 µl zweifach konzentrierten Puffer (QMT Spotting Solution 2, Quantifoil



GmbH, Jena) sollten sie eine Konzentration von mindestens 100 ng/μl DNA aufweisen und wurden in 96well-Mikrotiterplatten bei -20°C gelagert.



**Abb. 7. Pipettierroboter und Microarray-Spotter.** Links dargestellt ist ein Ausschnitt des für die Reamplifikationen verwendeten Pipettierautomaten `RoboAmp 4200P` (MWG Biotech AG). Zu erkennen sind u. a. der automatische Deckelöffner (hinten links), die gekühlte Position für Reaktionsgefäße (links), die vier Pipettier-positionen, eine kühlbar (Mitte, z. T. mit Mikrotiterplatten besetzt) und der 96-well Thermocycler (hinten rechts, z. T. verdeckt). Auf der rechten Seite der zum Aufbringen der PCR-Produkte verwendete `GMS 417 Arrayer` (Affymetrix). Hinten rechts der 4-Nadel-Kopf für die Applikation der gelösten PCR-Produkte. Vorne drei Stellplätze für Mikrotiterplatten und dahinter die Positionen für 42 Glasobjektträger.

Standard-PCR-Programm für die Reamplifikation:

5 min	95°C	} 35 Zyklen
25 sec	95°C	
25 sec	50°C	
3 min	72°C	
10 min	72°C	

**Aufbringen der PCR-Produkte auf beschichtete Objektträger ('Slides Spotten')**

Die PCR-Produkte standen nun zur Verfügung, um auf eine geeignete Glasoberfläche aufgebracht und gebunden zu werden. Hierzu wurden staubfreie mit Epoxy-Gruppen versehende Glasobjektträger ('Slides') verwendet (QMT Epoxy Coated Slides, Quantifoil, Jena). Das Aufbringen erfolgte mechanisch mit einem 4-Nadel Microarray Spotter (GMS 417, Affymetrix) bei ca. 22°C und 65% Luftfeuchtigkeit. Hierbei wurden DNA-Bereiche (Spots) von ca. 150 -200 μM Durchmesser in einem Abstand von ca. 400 μM auf der Glasoberfläche generiert. Alle PCR Produkte wurden doppelt und in möglichst großen räumlichen Abstand zueinander auf dem Microarray platziert. Die fertigen Slides wurden mit einer Gravurnadel nummeriert und zur kovalenten Bindung der DNA für eine Stunde bei

60°C inkubiert. Anschließend wurden die Microarrays bis zur Hybridisierung (vgl. 2.12.4) trocken, staubfrei und lichtgeschützt gelagert.

**Qualitätskontrolle.** Zur Beurteilung von Quantität und Form der aufgetragenen DNA auf den Microarrays konnte ein unspezifisches Anfärben von Nucleinsäuren mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO-61 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) durchgeführt werden. Die Inkubation der Microarrays wurde in Glasgefäßen mit Objektträgerhalterung durchgeführt, die auch für die Microarray-Hybridisierung (vgl. 2.12.4) verwendet wurden. Das Puffervolumen betrug jeweils 200-250 ml, die Schritte wurden nach Möglichkeit auf einem Schüttler durchgeführt.

Vorbehandlung:

ddH <sub>2</sub> O, 0,1% SDS	2 x 5 min, RT
ddH <sub>2</sub> O	1 min, RT
ddH <sub>2</sub> O	3 min, 95°C
ddH <sub>2</sub> O	1 min, RT

Färben & Waschen:

Färbelösung	5 min, RT in 50 ml Falconröhrchen, Alufolie
Waschlösung	2 x 3 min, RT
ddH <sub>2</sub> O	3 x 1 min, RT

Trocknen durch Zentrifugation (1600 Upm, 4min, RT)  
Einlesen in Fluoreszenzscanner im Cy5-Kanal

<u>Färbelösung:</u>	ddH <sub>2</sub> O	44,5 ml
	100 x TE-Puffer	0,5 ml
	95% [v/v] EtOH	5,0 ml
	SYTO-65 (5mM in DMSO)	10,0 µl

Lagerung dunkel, RT bis zu 2 Monate  
2-5 Tage vor Gebrauch herstellen

<u>Waschlösung:</u>	ddH <sub>2</sub> O	100 ml
	Tween 20	100 µl

### 2.12.2 *H. pylori*-Oligonukleotid-DNA-Microarray

Alternativ zu den selbst gefertigten PCR-Produkt Microarrays wurden auch industriell hergestellte *H. pylori* Microarrays verwendet (MWG *H. pylori* Array, MWG Biotech AG, Ebersberg; [http://www.mwg-biotech.de/html/d\\_arrays/d\\_catalog\\_heli\\_pylori.shtml](http://www.mwg-biotech.de/html/d_arrays/d_catalog_heli_pylori.shtml)). Diese basieren auf 1877 spezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von je 50 Nucleotiden, auf Epoxy-beschichtete Glasoberflächen kovalent gebunden vorliegen. Nach Herstellerangaben wurden alle Oligonukleotide *in silico* auf

Selbstkomplementarität getestet und sind in nicht mehr als 15 Nukleotiden homolog zu anderen Genen.

### 2.12.3 Markierung von cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um eine kompetitive Microarray-Hybridisierung zum Vergleich von zwei Gesamt-RNA-Präparationen aus Wildtyp und isogener Mutante durchzuführen, wurde die RNA in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei erfolgte für jede Probe der direkte Einbau eines an dCTP gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5-dCTP oder Cy3-dCTP, Amersham Pharmacia, Freiburg). Als Ausgangsmaterial dienten 15-50 µg Gesamt-RNA (vgl. 2.8.2.2). Die Markierung erfolgte nach dem folgenden Protokoll (MWG Biotech AG, modifiziert), nach Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe wurde möglichst lichtgeschützt gearbeitet.

#### cDNA Synthese und Fluoreszenz-Markierung:

Vereinigen von: 17,5 µl RNA (15-50 µg)  
2,5 µl Random-Primer-Mix (3 µg/µl, Invitrogen)  
10 min, 65°C (Denaturieren)  
10 min, RT (Primer-Anlagerung)

Hinzufügen von: 8 µl 5x SuperScript buffer (Invitrogen)  
4 µl 0,1 M DTT  
4 µl dNTPs (5mM dA, dT, dGTP; 2mM dCTP)  
2 µl Cy5- or Cy3-dCTP (0.5mM, Amersham Pharmacia)  
1 µl RNaseOut (RNase Inhibitor, Invitrogen)  
1 µl Superscript II (200 U, Invitrogen)  
2 h, 42°C (cDNA Synthese)

alkalische Lyse: 10 µl 1M NaOH; 10 min 65°C  
10 µl 1N HCl (Neutralisation)

- Aufreinigung mit dem Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen)
- Elution in je 70 µl ddH<sub>2</sub>O, Vereinigen der Proben und Eindampfen
- Lagerung dunkel und bei -20°C bis zur Hybridisierung

Die erfolgreiche Markierung der cDNA wurde anhand einer intensiven Färbung der Proben nach der Aufreinigung der Markierungsreaktionen beurteilt. Die Färbung beruht auf den inkorporierten Cy3- (rosa Färbung) oder Cy5-dCTPs (blaue Färbung). Zusätzlich wurden exemplarisch je 1 µl des Eluats elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Typhoon<sup>®</sup> 9200-Imager (Amersham Pharmacia, Freiburg) in den Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe eingelesen und die Markierungseffizienz anhand des Bandenmusters der hervorstechenden Transkripte bewertet.

#### 2.12.4 Vorbehandlung und Hybridisierung von DNA-Microarrays

Vor der Hybridisierung wurden die Microarrays in verschiedenen Waschschrritten gereinigt und unspezifische Bindungsstellen abgeblockt. Bei den *H. pylori*-PCR-Produkt-DNA-Microarrays wurde zusätzlich die doppelsträngige DNA denaturiert. Das initiale Waschen und Blockieren erfolgte für die zwei Microarraytypen jeweils nach Herstellerangaben (Quantifoil, MWG Biotech AG). Die Slides wurden in 50 ml-Röhrchen mit einer Tischentrifuge (Sigma 3K20, Sigma, Steinheim) bei maximal 1800 Upm für 4 min bei RT getrocknet. Vor der Hybridisierung wurden die fluoreszenzmarkierten Proben (vgl. 2.12.3) in 30 µl (PCR-Produkt) bzw. 16 µl (Oligonukleotid Slides) Hybridisierungspuffer resuspendiert, für 3 min bei 94°C denaturiert und kurz auf Eis gestellt. Die Applikation auf den Microarray erfolgte luftblasenfrei auf die DNA-Sonden, der Bereich wurde mit einem staubfreien Objektträger abgedeckt und der Microarray in einer Hybridisierungskammer (Corning, USA) für mindestens 16 h einer feuchten Hybridisierung unterzogen. Die Hybridisierungstemperatur wurde hierbei für die PCR-Produkt-Microarrays etwas höher gewählt (50°C) als für die Oligonukleotid-Microarrays (42°C). Die abschließenden Waschschrritte wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei bei den PCR-Produkt-Microarrays zur Erhöhung der Stringenz zusätzlich zwei Waschschrritte mit 0,1 x SSC für 5 min durchgeführt wurden. Nach dem Trocknen konnten die Microarrays weiter ausgewertet werden.

<u>Hybridisierungspuffer (MWG Biotech AG):</u>	Formamid	50%
	SSC	6 x
	SDS	0,5%
	NaPhosphat, pH 8	50 mM
	Denhardts Reagenz	5 x

#### 2.12.5 Einscannen und Bioinformatische Analyse der Microarray-Daten

Die hybridisierten und gewaschenen Microarrays wurden mit einem konfokalen Epifluoreszenz-Laserscanner (Affymetrix 418 Array Scanner, Affymetrix, CA, USA) eingelesen. Dieser hat eine Auflösung von 10 µm und verfügt über einen 532nm- (Cy3) und einen 635nm- (Cy5) Laser. Um sowohl schwache als auch starke Hybridisierungssignale zu detektieren, wurden beide Kanäle bei sechs

unterschiedlichen Laserintensitäten eingescannt, wobei 12 verschiedene 16 Bit TIFF Dateien generiert wurden.

Die primäre Analyse der Bilder erfolgte mit dem Programm ImaGene™ 5.5 (BioDiscovery, USA) unter Verwendung der folgenden Parameter: Segmentation Method Fixed Circle; Signal Low 0,65; Signal High 0,95; Background Low 0,05; Background High 0,95; Background Buffer 3,0; Background Width 3,0; Empty Spots Threshold 3,0. Die so erzeugten Rohdatensätze mit Signal- und Hintergrundintensitäten für die einzelnen Gene wurden direkt in das Programm MAVI 2.3 (MWG Biotech AG, Ebersberg) eingespeist. Hier erfolgte die Normalisierung der Daten mittels einer Lowess-Normalisierung für kompetitive Hybridisierungen (Yang *et al.*, 2002) unter Berücksichtigung der Sättigung für jeden einzelnen DNA-Bereich (`Spot`) in den sechs verschiedenen Laserintensitäten. Die hierbei erzeugten Quotienten der Signalintensitäten (`Ratios`) und absoluten Signalintensitäten von DNA und Hintergrund wurden in MS Excel 2000 weiter analysiert. Clusteranalysen von Sätzen zusammenhängender Experimente wurden mit dem Programm Expressionist™ (Genedata, Schweiz) nach Angaben der Programmentwickler durchgeführt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur *in vitro*-Transkription der *H. pylori*-Flagelline

Das Filament von *H. pylori* ist aus den beiden Flagellinuntereinheiten FlaA und FlaB aufgebaut, die in einem stöchiometrischen Verhältnis von ca. 10 zu 1 auftreten (Kostrzynska *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1995b). Daher wird FlaA oft als das Haupt- und FlaB als das Nebenflagellin bezeichnet, FlaB ist häufig im proximalen und FlaA im distalen Anteil des Filaments lokalisiert (Kostrzynska *et al.*, 1991). Die Gene der beiden Flagelline liegen auf unterschiedlichen Loci auf dem Chromosom und stehen unter der Kontrolle der zwei unterschiedlichen alternativen Sigmafaktoren  $\sigma^{28}$  und  $\sigma^{54}$  (Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993). Eine Mutation in dem *flaB*-Gen zeigt in *Helicobacter*-Spezies keinen erkennbar veränderten Flagellenphänotyp, während eine Mutation in *flaA* zur Ausbildung von Stummelflagellen führt, die nur FlaB enthalten (Suerbaum *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1995a; Josenhans *et al.*, 1999). *In vitro* ist die Beweglichkeit der *flaB*-Mutanten leicht und die der *flaA*-Mutanten deutlich eingeschränkt, während *in vivo* in einem gnotobiotischen Ferkelmodell für *H. pylori* und in einem *Helicobacter mustelae*-Frettchen Modell gezeigt wurde, dass beide Flagelline für die Kolonisation notwendig sind (Eaton *et al.*, 1996; Andrutis *et al.*, 1997). Die Zugehörigkeit zu unterschiedlichen transkriptionellen Regulons und die stark voneinander abweichenden Aminosäuresequenzen der beiden Flagellinuntereinheiten (Suerbaum *et al.*, 1993), haben zur Hypothese geführt, *flaA* und *flaB* könnten in Abhängigkeit äußerer Faktoren, z. B. der Viskosität des Mediums, unterschiedlich exprimiert werden und durch unterschiedliche Zusammensetzung die physiko-chemischen Eigenschaften des Filaments, wie Flexibilität und Steifheit verändern (Josenhans *et al.*, 1995b). Außerdem deutet die unterschiedliche Lokalisation von FlaB (proximal) und FlaA (distal) im Filament (Kostrzynska *et al.*, 1991) auch auf eine temporal unterschiedliche Expression der beiden Flagelline hin. In dieser Arbeit sollte der Einfluß der Wachstumsphase auf die Expression der Flagelline näher untersucht werden. Dies wurde zum einen direkt durchgeführt, durch Bestimmung der Transkriptmengen während des Wachstums in statischer Kultur mittels Northern Blot und RT PCR-Analysen. Des Weiteren wurde ein für *H. pylori* bis dahin noch nicht

verwendetes Reportergensystem, basierend auf dem Luziferin-Luziferase-System von *Vibrio harveyi* eingesetzt (vgl. 2.9).

Zur Untersuchung der Genregulation in *H. pylori* wurden bislang bereits verschiedene Reportersysteme genutzt, bei denen die promotorlose kodierende Sequenz für ein Protein, welches einfach zu detektieren ist, hinter den analysierten Promotor fusioniert wird. Hierzu gehören *xyIE* (Karita *et al.*, 1996), *cat*, *gfp* (Josenhans *et al.*, 1998; Niehus *et al.*, 2002) und *lacZ* (de Vries *et al.*, 2001). Ein großer Vorteil des hier verwendeten *luxAB*-Systems ist die höhere Sensitivität im Vergleich zu anderen Reportersystemen, weiterhin ist kein Zellaufschluß nötig, so dass die Messung ohne Zeitverzögerung nach der Probenahme möglich ist (Meighen, 1991; Forsberg *et al.*, 1994). Desweiteren ist die Stabilität der Luziferase bei 37°C in anderen Organismen relativ gering (Escher *et al.*, 1989), wodurch die Gefahr der Akkumulation heruntergesetzt wird, und auch negative Regulationsereignisse verfolgt werden können.

### 3.1.1 Konstruktion von *flaA-lux*- und *flaB-lux*-Reportergenmutanten

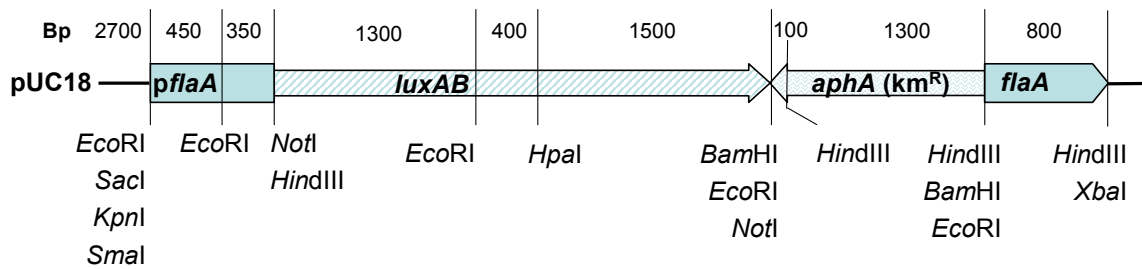
Die *flaA-luxAB*- und *flaB-luxAB*-Mutanten wurden ausgehend von im Labor vorhandenen *gfp*-Reporterfusionen hergestellt (Josenhans *et al.*, 1998; Niehus *et al.*, 2002). Hierzu wurde mit den Plasmiden pSUS81 (*flaA-gfp*) und pSUS128 (*flaB-gfp*) eine inverse PCR mit den Primerpaaren HpFlaA\_NotI1 und *gfp*\_NotI2 bzw. HpFlaB\_NotI1 und *gfp*\_NotI2 durchgeführt, wodurch PCR-Fragmente der Größen 5,7 kB und 5,6 kB mit terminalen *NotI*-Schnittstellen synthetisiert wurden. Nach der Elution der Banden aus einem Agarosegel und Restriktion mit *NotI* wurden sie jeweils mit dem ebenfalls *NotI*-verdauten 3,2 kB *Vibrio harveyi-luxAB*-Fragment aus dem Plasmid MiniTn5 $\alpha$  (de Lorenzo *et al.*, 1990; Heuner *et al.*, 1999) in einem Ligationsansatz fusioniert. Die entstandenen Plasmide pSUS1601 und pSUS1609 (siehe Abb. 8A) sowie pSUS1607 und pSUS1610, bei denen die *luxAB*-Kassette jeweils gegen die Promotorausrichtung orientiert sind, wurden durch Restriktionen mit den Restriktionsendonukleasen *HpaI*, *HindIII*, *EcoRI*, *HpaI*+*XbaI* überprüft und kartiert. Anschließend wurden die Plasmide für funktionelle Untersuchungen in den Stamm *H. pylori* N6 transformiert und die *lux*-Fusionen durch homologe Rekombination in die Gene *flaA* und *flaB* im Chromosom inseriert. Die Überprüfung der erfolgreichen Rekombination erfolgte basierend auf Präparationen



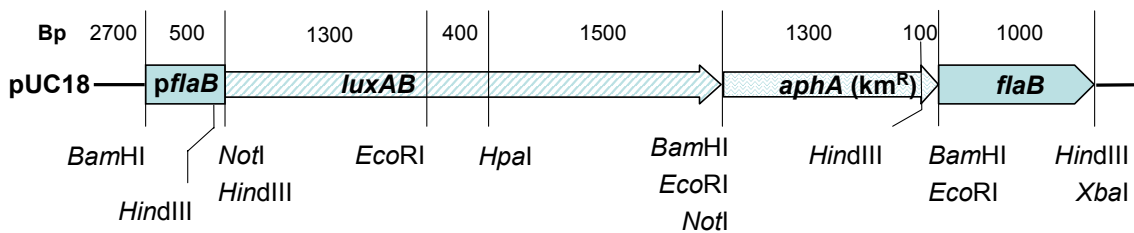
chromosomaler DNA der isogenen Mutanten (BAC5, BAC16; siehe Abb. 8B). Durch Sequenzierung der PCR-Produkte mit den Oligonukleotiden HPflaA5, 9 und 10 (BAC5, HpN6 *flaA-lux*) und HPflaB7 und VHluxA1 (BAC16, HpN6 *flaB-lux*), wurde die Integrität der beiden Promotorsequenzen und die korrekte Insertion der rekombinanten DNA-Bereiche im Genom bestätigt. Wie auch die *H. pylori*-Mutanten mit den *cat*- und *gfp*-Reporterfusionen, wiesen auch die Flagellin-Luziferase-Reportergenmutanten erwartungsgemäß einen Phänotyp mit scheinbar unveränderter Flagellenmorphologie (*flaB-lux*) oder mit Stummelflagellen (*flaA-lux*) auf. Abgesehen vom Flagellenphänotyp wiesen beide Mutanten dieselbe Morphologie wie der Wildtyp auf und zeigten keine erkennbaren Veränderungen der Zellform durch die Luziferase-Expression.

**A**

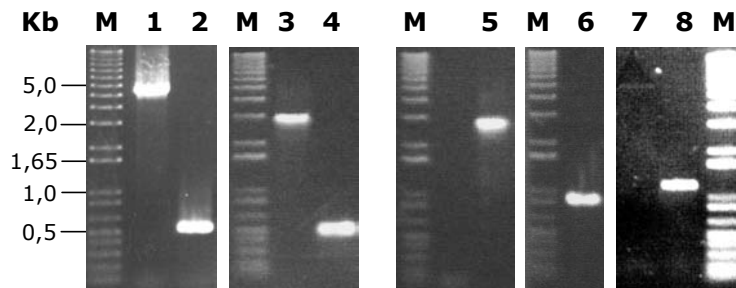
pSUS 1601 (8,9 kb)



pSUS 1609 (8,8 kb)



**B**

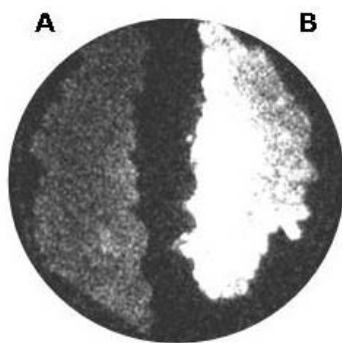


**Abb. 8. A) Schematische Darstellung der Plasmide mit den *flaA-luxAB*- und *flaB-luxAB*-Reporterengenkonstrukten.** Die Fragmentlängen sind oberhalb in Basenpaaren angegeben, die Genorientierung ist durch die Pfeilrichtung angezeigt.

**B) PCR Überprüfung der homologen Rekombination mit genomischer DNA aus BAC5 (*flaA-lux*) und BAC16 (*flaB-lux*).**

Spur M:	DNA-Größenstandard (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen)	
Spur 1:	BAC5 ( <i>flaA-lux</i> )	Primer: HPflaA-3+4
Spur 2:	HpN6 Wildtyp	Primer: HPflaA-3+4
Spur 3:	BAC5 ( <i>flaA-lux</i> )	Primer: HPflaA-4 + VHluxB2
Spur 4:	BAC5 ( <i>flaA-lux</i> )	Primer: HPflaA-3 + VHluxA1
Spur 5:	BAC16 ( <i>flaB-lux</i> )	Primer: HPflaB-7 + VHluxA1
Spur 6:	BAC16 ( <i>flaB-lux</i> )	Primer: HPflaB-10 + VHluxB2
Spur 7:	BAC16 ( <i>flaB-lux</i> )	Primer: HPflaB-10 + HPflaB-7
Spur 8:	HpN6 Wildtyp	Primer: HPflaB-10 + HPflaB-7

In einem Vorversuch wurde die Funktionalität der rekombinanten *V. harveyi*-Luziferase in *H. pylori* anhand einer Übernachtkultur der hergestellten Mutanten und des Wildtyps auf einer Blutagarplatte getestet. Hierzu wurde die Platte mit den Bakterienausstrichen mit Substratverdünnung besprüht und anschließend in dem Luminometer dem Photonendetektor exponiert (siehe Abb. 9). Die *flaA-lux*-Reportermutante zeigte eine deutlich stärkere Lumineszenz als die *flaB-lux*-Mutante, während für den Wildtyp und die beiden Mutanten mit der *luxAB*-Kassette in gegenläufiger Orientierung (ohne Abbildung) keinerlei Lichtemission zu detektieren war.



**Abb. 9. Biolumineszenzbestimmung von *H. pylori*-Kulturen auf einer Blutagarplatte.** Die Platte wurde nach Inkubation bei 37°C und Wachstum über Nacht mit Substrat (n-Decyl-Aldehyd, 1:20000 in Reaktionspuffer) bestäubt. Exposition im Luminometer (Hamamatsu MTP reader) für 2 min bei höchster Sensitivität.

**A) BAC16 (HpN6 *flaB-luxAB*)**

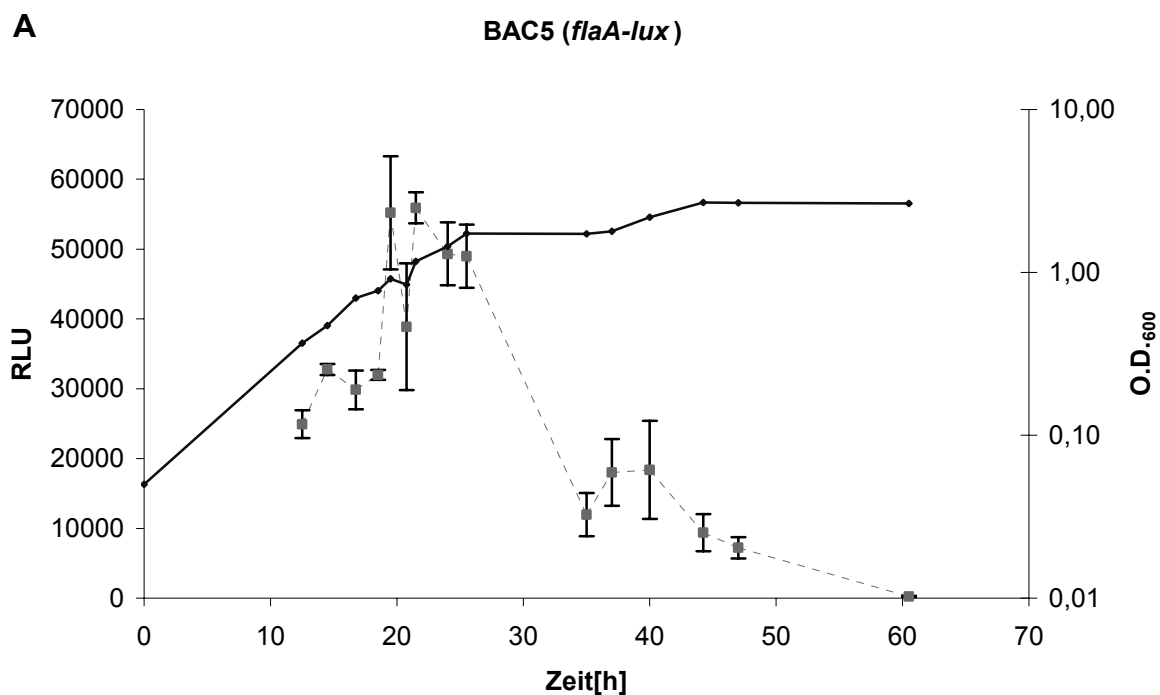
**B) BAC5 (HpN6 *flaA-luxAB*)**

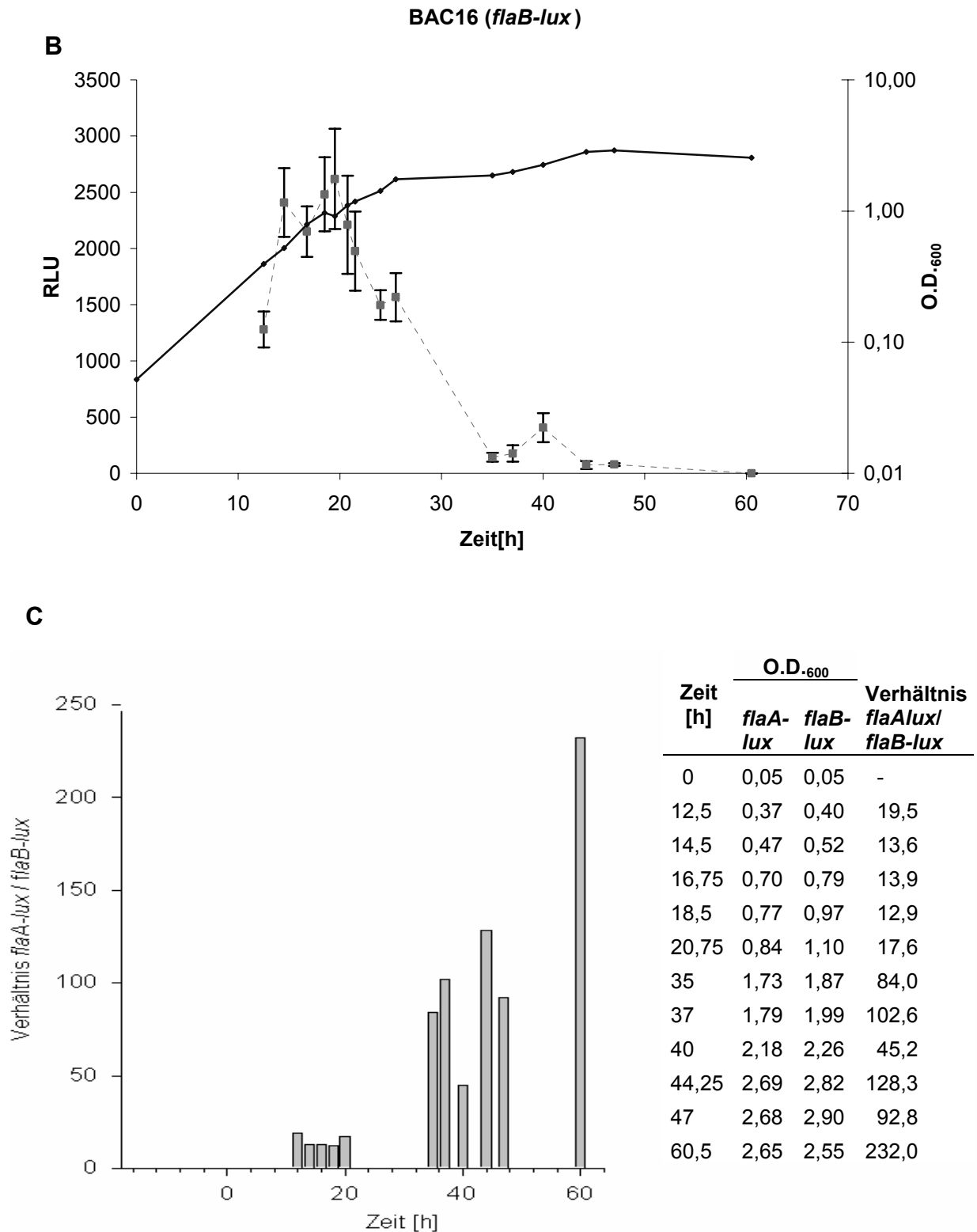
### 3.1.2 Messung der Promotoraktivitäten von *flaA* und *flaB* während des Wachstums in nährstofflimitierter Kultur

Die Messung der Aktivität der rekombinanten Luziferase unter der Kontrolle der Flagellinpromotoren in *H. pylori* erfolgte nach Anzucht der isogenen Mutanten in flüssiger, nährstofflimitierter Kultur. Bei jedem Probenahmezeitpunkt wurde die O.D.<sub>600</sub> gemessen und die relative Photonenemission im Luminometer bestimmt. Für beide Reporterengenmutanten wurden unabhängige Wachstumskurven an fünf verschiedenen Tagen mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. In den

Diagrammen sind für beide Mutanten die Werte von zwei an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Wachstumskurven zusammengefasst (siehe Abb. 10). Der Verlauf der Luziferase-Expression ähnelt sich für die beiden Mutanten mit einem Anstieg in der frühen bis mittleren exponentiellen Wachstumsphase und einem deutlichen Abfall der Lumineszenz zur späten exponentiellen und stationären Phase. Dabei liegt der Zeitpunkt des Rückgangs der Promotoraktivität bei *flaB* etwas früher in der exponentiellen Phase als für *flaA*. Bestätigt wurden durch die *lux*-Reporter-genexperimente Ergebnisse früherer Arbeiten, nach denen die Expression des  $\sigma^{28}$ -kontrollierten Flagellins FlaA mehr als zehnfach höher war, als die von dem RpoN abhängigen FlaB (Kostrzynska *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1998). Eine deutlicher Anstieg der Werte von ca. 20 zu 1 auf über 100 zu 1 ist bei dem Auftrag der Verhältnisse der Lumineszenz von BAC5 (*flaA-lux*) und BAC16 (*flaB-lux*) über die fortschreitende Wachstumskurve zu erkennen (siehe Abb. 10 C).

**Abb. 10. Wachstumsphasen-abhängige Expression der Luziferase unter Kontrolle des *flaA*- (A) und *flaB*- (B) Promotors.** Die Werte setzen sich aus jeweils zwei unabhängigen Wachstumskurven und drei parallel durchgeführten Lumineszenzbestimmungen für jede Probe zusammen. Angegeben sind die Zelldichte O.D.<sub>600</sub> (Rauten, durchgehende Linie) und die Lumineszenz (Quadrate, gestrichelte Linie) in RLU ('Relative Light Units') für die jeweiligen Probenahmepunkte. **C)** Verhältnisse der Wachstumsphasen-abhängigen Expression von *flaA-lux* zu *flaB-lux*. Die Werte für die Verhältnisse, bezogen auf die optische Dichte und die Zeit, sind in Tabellenform dargestellt.





### 3.1.3 Bestimmung der *flaA*- und *flaB*-Transkriptmengen in Abhängigkeit der Wachstumsphase von *H. pylori*

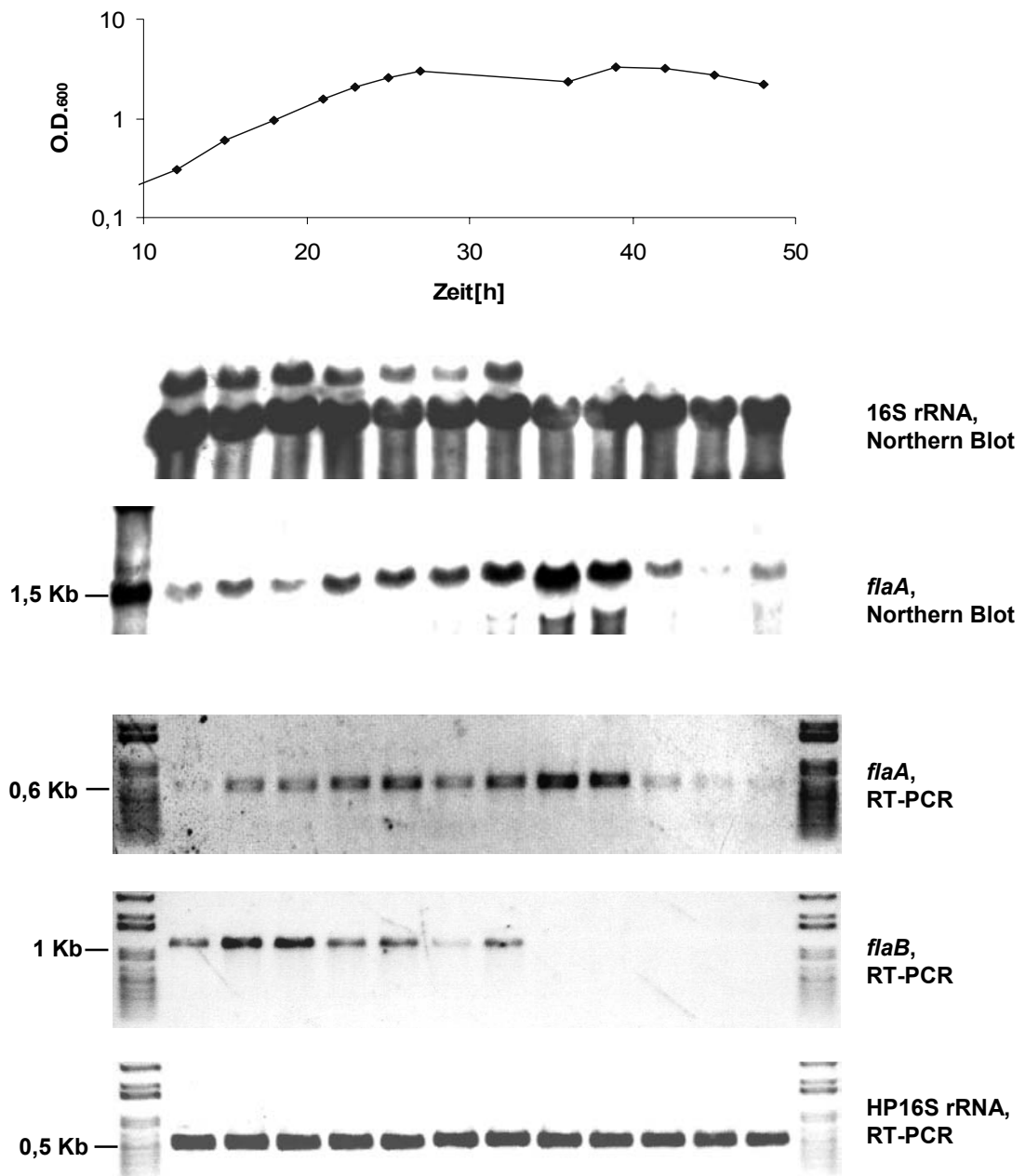
Zur Beurteilung und Überprüfung der *lux*-Reporter-Experimente wurden die Expressionsprofile mit anderen Methoden zur Bestimmung der Genexpression

verglichen. Als Methoden des direkten mRNA-Nachweises wurden hier Northern Blot-Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten Sonden, sowie semi-quantitative RT-PCR mit Abschätzung der Transkriptmengen nach Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Es wurden zwei unabhängige Wachstumskurven an verschiedenen Tagen mit anschließender RNA-Extraktion für 11 bzw. 12 Zeitpunkte aus den verschiedenen Phasen der Wachstumskurve durchgeführt.

In Abb. 11 dargestellt ist eine der Wachstumskurven mit Transkriptmengenbestimmungen für die beiden Flagellengene und 16S rRNA zur Kontrolle der Gesamt-RNA-Mengen. Für *flaA* und 16S rRNA wurden sowohl eine Northern Blot-Hybridisierung als auch eine RT-PCR durchgeführt. Die Digoxigenin-markierten Sonden wurden durch eine Markierungs-PCR ausgehend von genomischer *H. pylori* N6-DNA mit den Oligonukleotiden HP16S1 und Hp16S2 (16S rRNA) und HPflaA-3 und HPflaA-4 (*flaA*) hergestellt. Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt, für die Northern Blots 10 µg (*flaA*) bzw. 2 µg (16S rRNA). Man erkennt eine sehr gute Korrelation der relativen Transkriptmengen für die unterschiedlichen Zeitpunkte von *flaA* beim Vergleich der Northern Blot-Hybridisierung mit der semi-quantitativen RT-PCR (siehe Abb. 11). Für *flaB* konnte trotz Auftrags von bis zu 50 µg Gesamt-RNA, dem Einsatz unterschiedlicher Primerkombinationen für die Sondenherstellung sowie unterschiedlicher Gelkonzentration und Laufzeit kein spezifisches Signal für die Northern Blot Hybridisierung erhalten werden. Daher erfolgte hier der mRNA-Nachweis nur mit Hilfe der RT-PCR. Der Vergleich der Verteilung der Transkriptmengen zwischen den beiden Flagellengen ergibt ein deutlich differenzierteres Ergebnis als die Expressionsstudien mit den *lux*-Reportergermutanten (vgl. 3.1.2). Für *flaB* zeigt sich ein Maximum an relativer mRNA-Menge in der frühen exponentiellen Wachstumsphase, während das *flaA*-Transkript ein Maximum in der späten logarithmischen Phase im Übergang zur stationären Phase aufweist. Aussagen über die Mengenverhältnisse der beiden Transkripte zueinander können basierend auf den Abbildungen der RT-PCR-Ergebnisse nicht getroffen werden, da die die Zyklenzahl für die PCRs verschieden ist. Für *flaB* wurde mit 25 Zyklen eine deutlich höhere notwendige Anzahl von Amplifikationszyklen als für *flaA* (16 Zyklen; vgl. Tab. 4) verwendet, um ähnlich starke Intensitäten im Agarosegel zu erhalten. Daher kann hier auf eine erheblich geringere Menge an Transkript in der Zelle geschlossen

## Ergebnisse

werden als für *flaA*. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Reporter-Gen-Experimente überein.



**Abb. 11. Bestimmung von relativen Transkriptmengen während der Wachstumskurve in nährstofflimitierter Flüssigkultur von *H. pylori* N6.** Dargestellt ist die Wachstumskurve mit den Probenahmezeitpunkten und der entsprechenden optischen Dichte. Darunter abgebildet Northern Blots und RT-PCRs mit RNA-Präparationen aus den Proben in der Reihenfolge entsprechend der fortschreitenden Wachstumskurve. Das jeweils detektierte Gen und die angewandte Methode sind rechts neben den Abbildungen angegeben. Für die Herstellung der Dig-Sonden für die Northern Blots und für die RT-PCRs wurden die Primer HP16S1 + 2 (16S rRNA) und HPflaA-4 + 9 (*flaA*) und HPflaB-n1 + n2 (*flaB*) verwendet.

### **3.2 Herstellung eines *H. pylori*-PCR-Produkt DNA-Microarrays**

Reporter-genuntersuchungen mit unterschiedlichen Genfusionen haben sich nur bedingt als geeignet zur Charakterisierung von transkriptioneller Regulation in *H. pylori* erwiesen. Sie sind mit hohem experimentellem Aufwand verbunden und lassen sich vor allem für die Charakterisierung von Einzelgenen, aber nur begrenzt zur Untersuchung globaler Regulationsnetze einsetzen. Um einen globalen Ansatz zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation der Gene des *H. pylori*-Flagellensystems zu erhalten, und um eine Plattform für weitere Arbeiten der Arbeitsgruppe, wie z. B. Genomvergleiche unterschiedlicher *H. pylori*-Stämme zu erstellen, sollte ein spezifischer Gesamtgenom-DNA-Microarray hergestellt werden und das Arbeiten mit dem System etabliert werden. Hierbei wurden PCR-Produkte, spezifisch für die Gene der beiden vollständig sequenzierten *H. pylori*-Stämme 26695 und J99 (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999), als Hybridisierungssonden auf eine geeignete Glasoberfläche aufgebracht. Die Verwendung von PCR-Produkten, die sich nach Möglichkeit über das jeweils gesamte Gen erstrecken, diente dabei auch dem Vergleich mit dem der Arbeitsgruppe ebenfalls zur Verfügung stehenden Microarray-System der Firma MWG Biotech AG, welches auf 50mer-Oligonukleotiden (ein Oligonukleotid pro Gen) als Sonden basiert. Die Herstellung der PCR-Produkt Microarrays erfolgte in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin (MPIIB).

#### **3.2.1 Herstellung der Sonden**

Am MPIIB wurden 1655 *H. pylori* 26695- und J99-spezifische PCR-Fragmente mit universellen Sequenzen an beiden Enden generiert (vgl. 2.12.1) und unserer Arbeitsgruppe für die Reamplifikationen zur Verfügung gestellt. Diese erfolgten automatisiert mit dem `RoboAmp 4200P` Pipettierautomaten (MWG Biotech AG; siehe Abb. 7) und der dazugehörigen Software unter Anwendung einer Standard-PCR-Reaktion mit einem universellen Primerpaar mit 5'-Aminomodifikationen (vgl. 2.12.1). Hierzu wurde im `96-well`-Format zunächst mit allen Genen eine 50 µl-PCR-Reaktion durchgeführt und per Agarosegel-Elektrophorese überprüft und hieraus jeweils 1:25 und 1:500 Verdünnungen in ddH<sub>2</sub>O als Vorlage für die folgenden Amplifikationen hergestellt. Diese setzten sich aus je zwei 100 µl PCR-Reaktionen zusammen und dienten dazu, eine ausreichende Menge von ca. 100 ng/µl DNA pro

PCR-Produkt für die Herstellung der Microarrays zu gewinnen. Hiernach wurden erneut alle PCR-Produkte durch eine Agarosegel-Elektrophorese mit dem Ergebnis überprüft, dass nach der automatisierten Reamplifikation ca. 90% der 1655 PCR-Fragmente in korrekter Größe und ausreichender Menge vorlagen. Nicht erfolgreiche PCR-Reaktionen ließen sich in folgende Gruppen einteilen: Reaktionen ohne PCR-Produkt, mit Doppel- oder Mehrfachbanden, undifferenzierten Banden (‘smear’) und extrem schwachen Banden. Diese Ausfälle wurden nach Möglichkeit durch manuelle Durchführung entsprechender PCR-Reaktionen unter modifizierten Reaktionsbedingungen aufgefüllt. Zur Optimierung der automatisierten Reaktion wurden bspw. die Konzentration der Matrize, die Zeiten für Anlagerung, Elongation und Denaturierung oder die Zyklenzahl bei der PCR variiert. Auf diese Weise konnte die Zahl der erfolgreich reamplifizierten PCR-Produkte auf 96% (1590 PCR-Produkte) gesteigert werden (Liste der nicht vorhandenen Produkte, siehe 6.2.1). Zusätzlich wurden von zwei 96-well-Platten mehrere Kopien angefertigt, um Vorversuche durchführen zu können, wie bspw. eine geeignete Glasoberfläche für die Microarray-Herstellung zu ermitteln oder die Notwendigkeit einer Aufreinigung der PCR-Reaktionen zu testen.

Um nachzuprüfen, ob Restkomponenten aus der PCR-Reaktion in den Sondenansätzen, wie bspw. Oligonukleotide, freie Nukleotide, Salze oder Protein sich negativ auf die Eigenschaften des Microarrays auswirken würden, wurde ein Vorversuch zur Aufreinigung durchgeführt. Hierzu wurden zwölf zufällig ausgewählte PCR-Fragmente in 6 x 100 µl Reaktionen reamplifiziert, vereinigt und in drei Ansätze aufgeteilt. Hiervon wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichen PCR-Produkt-Aufreinigungsmethoden gereinigt (Qiagen PCR Purification; Millipore DNA Purifikation), und anschließend auf eine DNA-Konzentration entsprechend dem unaufgereinigten Ansatz eingestellt. Die drei Ansätze wurden jeweils in zehnfacher Kopie nach Herstellerangaben auf Microarray-Glasobjektträger aufgebracht (CMT GAPS slides, Corning, USA; Auftragspuffer: 3 x SSC). Ausgehend von *H. pylori*-Gesamt-RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen aus zwei verschiedenen Wachstumskurven wurden vier unabhängige kompetitive Hybridisierungen durchgeführt (ohne Abbildung). Von den zwölf Genen wurden zwei nicht exprimiert, bei den restlichen zehn erbrachte der Vergleich sowohl der Hybridisierungssignale als auch der Verhältnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen den



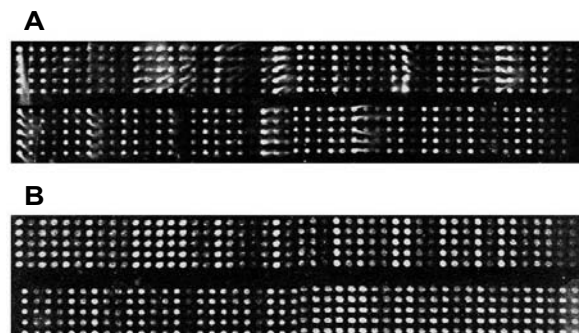
aufgereinigten und unaufgereinigten DNA-Sonden. Für die Herstellung der Gesamtgenom-Microarrays bestand aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche also nicht die Notwendigkeit, die PCR-Produkte vor der Applikation auf die Glasoberflächen aufzureinigen.

### 3.2.2 Aufbringen der PCR-Produkte auf Glasoberflächen

Die Universalprimer für die Reamplifikation (siehe 3.2.1) waren so modifiziert, dass an den entstandenen PCR-Fragmenten jeweils terminale Aminogruppen angefügt waren, um eine bessere Bindung an eine geeignete Glasoberfläche zu vermitteln. In einem nächsten Schritt sollte nun eine Oberfläche bestimmt werden, die für die einzelnen PCR-Sonden gleichmäßige Hybridisierungssignale bei einer möglichst niedrigen unspezifischen Hintergrundfluoreszenz liefert. Hierzu wurden zwei gebräuchliche Typen von Glasoberflächen zum Vergleich ausgewählt, eine mit Aldehydgruppen beschichtete Oberfläche (CMT GAPS, Corning, USA) und eine mit Epoxy-Gruppen versehene (Quantifoil, Jena). Mit 96 PCR-Produkten wurden zunächst jeweils fünf Probe-Microarrays auf beiden Oberflächen hergestellt und mit Fluoreszenz-markierten cDNA-Sonden unter gleichen Bedingungen hybridisiert (siehe Abb. 12). Die besten Ergebnisse wurden dabei mit den Epoxy-beschichteten Glasobjektträgern erzielt, welche in der Folge für die Herstellung der Gesamtgenom-Microarrays verwendet wurden. Hierbei war vor allem die Gleichmäßigkeit der Spot-Morphologie ausschlaggebend, die evtl. durch die Verwendung der von derselben Herstellerfirma bezogenen optimierten `Spotting Solution` bedingt war. Bei den Aldehyd-beschichteten-Glasoberflächen traten dagegen eher unterschiedliche Spot-Morphologien und teilweise sog. `Kometenschweife` auf. Eine repräsentative Hybridisierung ist in Abb. 12 dargestellt, man erkennt hier das Auftreten von gleichmäßigeren Signalen unter den Versuchsbedingungen mit den Epoxy-Slides.

**Abb. 12. Vergleich von Microarray-Glasobjektträgern.** Zur Ermittlung einer geeigneten Oberfläche zur Microarray-Herstellung wurden dieselben PCR-Produkte auf zwei unterschiedlich beschichtete Slides aufgebracht und unter vergleichbaren Bedingungen hybridisiert. Abgebildet ist eine solche Hybridisierung.

- A)** Superaldehyd-Slide (CMT-GAPS; Corning, USA)
- B)** Epoxy-beschichteter Slide (Quantifoil, Jena)

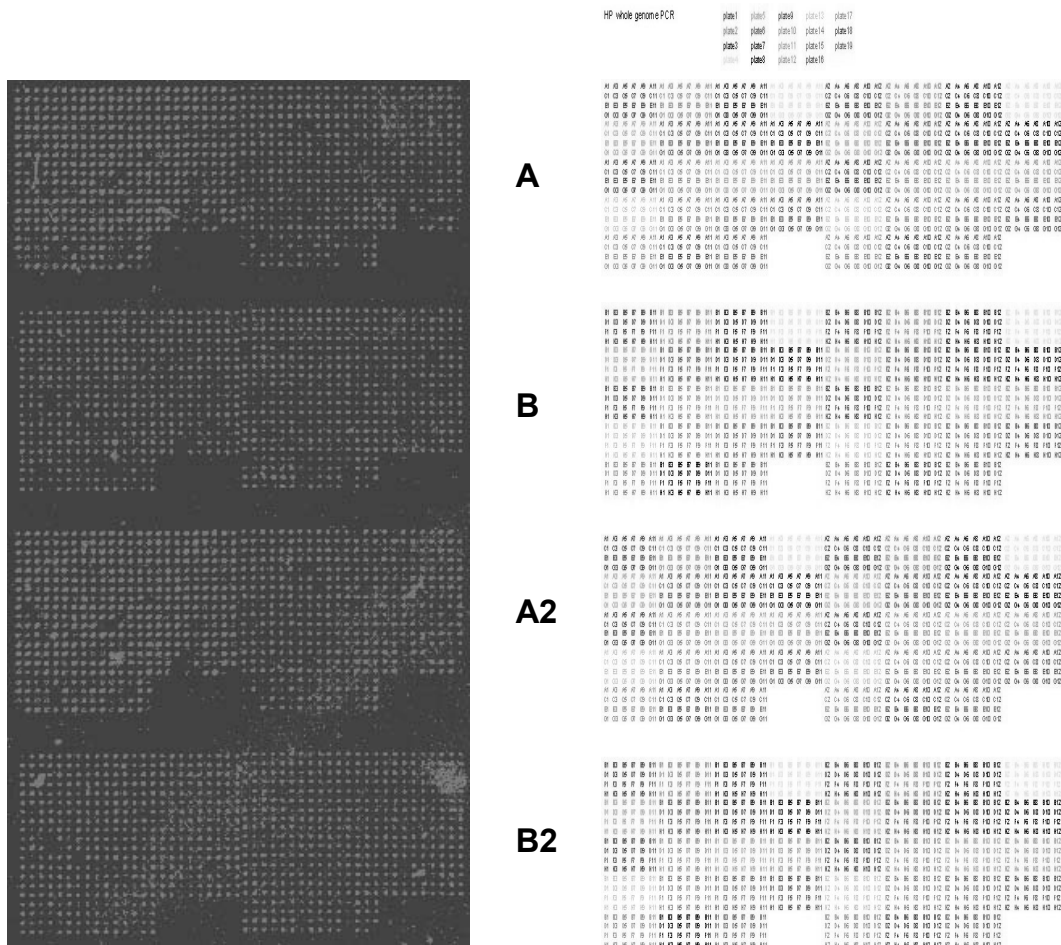


Das Aufbringen der Gesamtgenom-Microarrays auf die speziellen Objektträger erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe eines `4-Nadel-Microarray-Spotters` (`GMS 417`, Affymetrix). Hierbei wurden alle PCR-Fragmente doppelt und in möglichst großen räumlichen Abstand zueinander auf dem Microarray platziert um auch bei möglichen lokal begrenzten Verunreinigungen zumindest ein auswertbares Signal nach der Hybridisierung zu erhalten.

### **3.2.3 Validierung und Qualitätskontrolle**

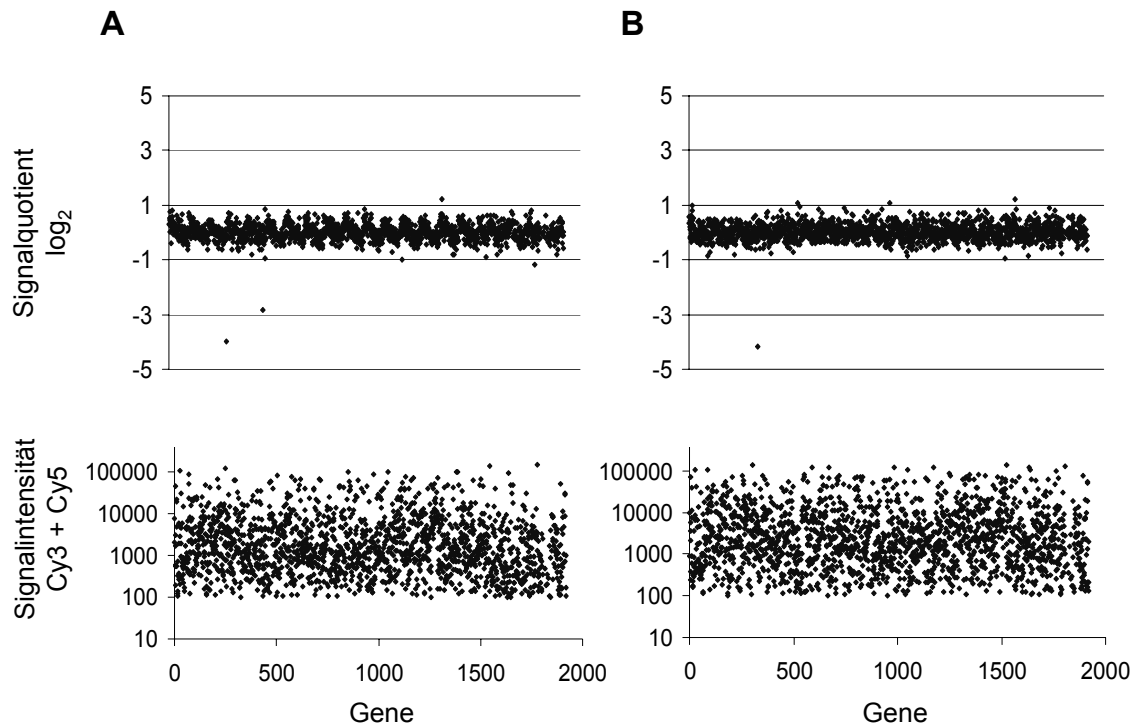
Die Validierung der Hybridisierungsergebnisse der Oligonukleotid- und der PCR-Produkt-Microarrays erfolgte zum einen durch Überprüfung der Ergebnisse mittels alternativer Methoden der Transkriptmengenbestimmung wie Northern Blot-Hybridisierungen und semi-quantitativen RT-PCRs. Generell waren dabei die Übereinstimmungen sehr gut, insbesondere konnten fast alle Gene, die durch die Microarray-Analysen als mehr als zweifach reguliert ermittelt wurden durch alternative Methoden bestätigt werden (vgl. 3.3). Schwach exprimierte Gene, wie beispielsweise Gene im *fliD*-Operon (vgl. 3.3.1) oder das Gen HP0906 (vgl. 3.3.2, 3.4.3), konnten mit der sensitiveren Methode der RT-PCR als signifikant unterschiedlich in der Transkriptmenge zwischen Wildtyp und Mutante ermittelt werden. Demgegenüber wurden sie durch die Microarray-Experimente bei den verwendeten RNA-Mengen bis zu 50 µg als nicht-reguliert determiniert. Somit konnten schwach exprimierte regulierte Gene unter der Detektionsgrenze der Microarrays liegen. Eine weitere Validierung der Ergebnisse der Microarray-Hybridisierungen erfolgte durch die Analyse von verschiedenen, funktionell in Verbindung stehenden Regulatoren, die einen sich überschneidenden Satz an Genen kontrollieren. Bei dem antagonistischen FliA/FlgM-System gab es eine Kontrolle der Ergebnisse dadurch, dass ein Satz an Genen gegenläufig reguliert wurde. Die Untersuchung dieses Systems wurde bei den ersten Experimenten mit den Oligonukleotid-Microarrays (MWG-Biotech AG) zur Validierung dieses zuvor noch nicht experimentell genutzten Systems zugrunde gelegt (Josenhans *et al.*, 2002a; vgl. 3.3.1). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde auch die Qualität der ersten selbst hergestellten PCR-Produkt-Microarrays anhand des FliA/FlgM-Systems erfolgreich überprüft. Das zweite biologische System, das mit beiden Microarray-Typen untersucht wurde, ist das RpoN-Regulon. Hier kontrollieren die Proteine RpoN, FlgR und HP0244 die Transkription identischer Gene durch unterschiedliche

regulatorische Mechanismen und machen dadurch die Ergebnisse der Transkriptom-Untersuchungen mit den PCR-Produkt-Microarrays untereinander vergleichbar und überprüfbar (siehe 3.3.2).



**Abb. 13. Aufbau des *H. pylori*-PCR-Produkt-Microarrays.** Links ist in roter Färbung eine unspezifische Anfärbung der DNA mit dem Fluoreszenz-Farbstoff SYTO-61 (Molecular Probes, USA) zu sehen. Rechts daneben eine schematische Abbildung der PCR-Produkt-Verteilung auf dem Microarray nach dem Spotten. Die Arrays A2 und B2 sind Replikate von A und B. Die unterschiedlichen Farben repräsentierten die 19 96-well Mikrotiterplatten in denen die Sonden vorliegen. Aufgrund des Arbeitens mit einem 4-Nadel Spotter sind die PCR-Produkte je einer Platte in vier Bereiche in den beiden unterschiedlichen Arrays aufgeteilt.

Um die DNA-Menge, sowie die Größe und die Form der Spots beurteilen zu können, wurden von einigen Chargen selbst hergestellter PCR-Produkt-Microarrays einzelne Microarrays mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO-61 angefärbt, der unspezifisch an Nukleinsäuren bindet (vgl. 2.12.1). In Abb. 13 ist ein Bild der Fluoreszenzsignale nach Anfärben eines Microarrays mit dem Farbstoff mit dem schematischen Aufbau des PCR-Produkt-Microarrays abgebildet. Die DNA-Spots sind als rote Kreise zu Erkennen, schwarze Bereiche sind Wasserkontrollen, nicht bespottete Bereiche oder Proben mit nicht erfolgreich amplifizierten PCR-Produkten.



**Abb. 14. Experimentelle Streuung der Signalquotienten nach kompetitiver Hybridisierung**  
**Hybridisierung der *H. pylori* Oligonukleotid-Microarrays.** Abgebildet ist für jede Gensonde (1877 *H. pylori*-spezifische Oligonukleotide; MWB Biotech AG) der  $\log_2$  des Signalquotienten und darunter die Summe der Intensitäten der Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale. **A)** Aufteilen einer RNA-Präparation: je 25  $\mu\text{g}$  derselben RNA-Präparation von *H. pylori* N6 Zellen O.D.<sub>600</sub> ca. 1,0 wurden mit Cy3 bzw. Cy5 markiert und kompetitiv hybridisiert. **B)** Kompetitive Hybridisierung basierend auf RNA-Präparationen aus *H. pylori* N6 Wildtyp O.D.<sub>600</sub> ca. 1,0 aus zwei unabhängigen biologischen Experimenten.

Mit den Oligonukleotid-Microarrays (MWG Biotech AG) wurden zur Überprüfung der experimentellen Streuung eines Einzelexperimentes verschiedene Kontroll-experimente durchgeführt. Hierzu wurde zum einen eine *H. pylori* N6 RNA-Präparation zweigeteilt, mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und kompetitiv hybridisiert. In einem zweiten Experiment wurde RNA aus zwei unterschiedlichen biologischen Experimenten bei derselben optischen Dichte miteinander verglichen. Der Auftrag aller Hybridisierungssignale der 1877 *H. pylori*-spezifischen Gene mit einer absoluten Signalintensität  $>100$  ist als  $\log_2$  des Signalquotienten und Signalintensität der Cy3 und Cy5 Fluoreszenzwerte in Abb. 14 dargestellt. Bei beiden Experimenten lagen die Gene bei einem Konfidenzintervall von  $>99,5\%$  innerhalb der Grenzen 1 (Signalquotient = 2) und -1 (Signalquotient = 0,5), die bei der Mehrzahl der veröffentlichten Microarray-Untersuchungen als konservativer Grenzwert für transkriptionelle Regulation etabliert ist. Mehr als 98,5% der Gene lagen innerhalb der Grenzen von 0,75 (Signalquotient ca. 1,7) und -0,75 (Signalquotient ca. 0,6). Die Tatsache, dass bei diesen Experimenten eine geringe

Zahl an 4 bzw. 5 Genen außerhalb des Grenzwertes einer mehr als zweifachen Regulation liegt, bestätigt die Notwendigkeit von mindestens zwei bis drei Wiederholungen der Microarray-Experimente. Dies wurde bereits in früheren statistischen Untersuchungen als unabdingbar beschrieben (Lee *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit durch wechselseitige Kontrolle der regulierten Gene bei Experimenten mit funktionell verwandten Regulatoren (siehe oben) die Gefahr einer nicht korrekten Klassifizierung aufgrund methodischer Variabilität reduziert.

### **3.3 Untersuchungen zum Transkriptionsprofil unterschiedlicher Regulatoren des *H. pylori*-Flagellensystems**

Ein Hauptziel dieser Arbeit war, die Regulation der Flagellenbiosynthese bei *H. pylori* mit den Unterschieden und Gemeinsamkeiten zu anderen bekannten Systemen näher zu charakterisieren, und eine mögliche Einbindung in globale Regulationsnetzwerke zu untersuchen. Hierzu sollte die Technik der DNA-Microarray-Hybridisierung genutzt werden, die die Untersuchung des Einflusses spezifischer Veränderungen auf die Transkription sowohl bekannter Gene des Flagellensystems als auch aller weiteren offenen Leserahmen des *H. pylori* Genoms ermöglicht. Zur experimentellen Absicherung wurden zwei unterschiedliche Microarray-Systeme genutzt, wobei das industriell gefertigte Oligonukleotid-basierte System nahezu 100% der Gene der beiden sequenzierten Stämme abdeckt (MWG Biotech AG, Ebersberg), und die selbst hergestellten PCR-Produkt-Microarrays 96% dieser Gene repräsentieren (vgl. 3.2). Die durch die Microarray-Experimente ermittelten regulierten Gene wurden nach Möglichkeit durch die alternativen Methoden der Northern Blot-Hybridisierung und der semi-quantitativer RT-PCR, sowie z. T. auf Proteinebene durch Western Blots überprüft. Die Funktion wichtiger Regulatoren des Flagellensystems wurde dabei durch Inaktivierung der entsprechenden Gene und Vergleich der Transkriptionsprofile mit dem Wildtyp ermittelt. Zur Etablierung der Methode der Microarray-Hybridisierungen für *H. pylori* und zur Validierung der zum ersten Mal genutzten *H. pylori* Gesamtgenom-DNA-Microarrays, wurde für die ersten Untersuchungen das antagonistische FliA/FlgM-System mit einem relativ kleinen zu erwartenden Satz an regulierten Genen gewählt. Im weiteren Verlauf wurden sukzessive die Regulatoren von funktionell früheren Flagellengenen charakterisiert, um die Aufklärung des Regulationsnetzwerks zu

vervollständigen und eine mögliche Verbindung mit anderen Funktionen der Zelle zu untersuchen. Um sicherzustellen, dass die ermittelten Ergebnisse keine spezifischen Regulationsphänomene in nur einem Stamm darstellen, sondern für verschiedene *H. pylori*-Stämme gültig sind, wurden in einigen Fällen isogene Mutanten sowohl in HpN6 als auch in dem motilen Derivat des sequenzierten Typstammes 26695, Hp88-3887 (Josenhans *et al.*, 2000) untersucht und miteinander verglichen.

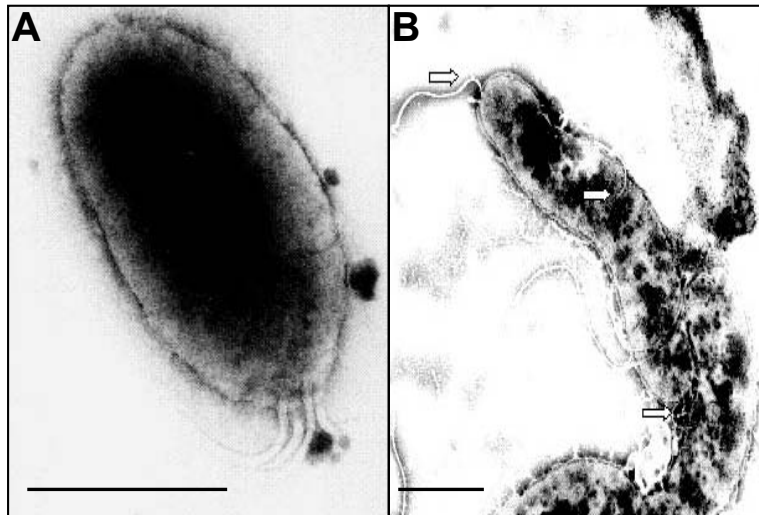
### 3.3.1 Untersuchungen zum FliA/FlgM-System

In den Enterobakterien kontrolliert der alternative Sigma-Faktor  $\sigma^{28}$  (FliA) zusammen mit seinem spezifischen Antagonisten, dem Anti-Sigma-Faktor FlgM, die späten (Klasse 3) Flagellengene (Aizawa, 1996; Macnab, 1996; Chilcott & Hughes, 2000). Diese Genklasse setzt sich aus ca. 20 Genen zusammen, die für die Struktur- und Hilfsproteine des Flagellenfilaments, sowie für Flagellenmotor- und Chemotaxis-komponenten kodieren (Chilcott & Hughes, 2000). Für *H. pylori* waren zu Beginn dieser Arbeit das Hauptflagellin *flaA* und das *fliDST* Operon als  $\sigma^{28}$ -kontrollierte Gene beschrieben worden (Leying *et al.*, 1992; Haas *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1999). Bis zu Beginn dieser Arbeit wurde aufgrund fehlender homologer Sequenzbereiche in den beiden sequenzierten Genomen angenommen, dass ein FliA-Antagonist in *H. pylori* nicht existiert (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Die funktionelle Charakterisierung des durch verschiedene experimentelle Ansätze identifizierten *H. pylori*-FlgM (Colland *et al.*, 2001; Josenhans *et al.*, 2002a) sollte ebenfalls durch die hier durchgeführten Microarray-Analysen vervollständigt werden.

#### 3.3.1.1 Microarray-Untersuchungen der *fliA*- und *flgM*-Mutanten

Die isogenen *H. pylori* N6-Mutanten der Gene für den alternativen Sigma-Faktor FliA und den neu beschriebenen Anti-Sigma-Faktor FlgM wurden von C. Josenhans hergestellt und charakterisiert (Josenhans *et al.*, 2002a) und in dieser Arbeit durch die Microarray-Analysen weiter untersucht. Während die *fliA*-Mutante einen Bewegungs-defizienten Phänotyp mit Stummelflagellen aufwies, der sich nicht vom Phänotyp einer *flaA*-Mutante unterschied, wurden in der *flgM*-Mutante Flagellen ähnlich dem polar begeißelten Wildtyp beobachtet (siehe Abb. 15). Es traten in erhöhter Anzahl Bakterien mit bipolaren oder in der Mitte der Zelle lokalisierten Flagellen auf. Das FlaA-Protein war in der *fliA*-Mutante nicht nachzuweisen, in der *flgM*-Mutante in etwa derselben Menge wie im Wildtyp. Demgegenüber traten die

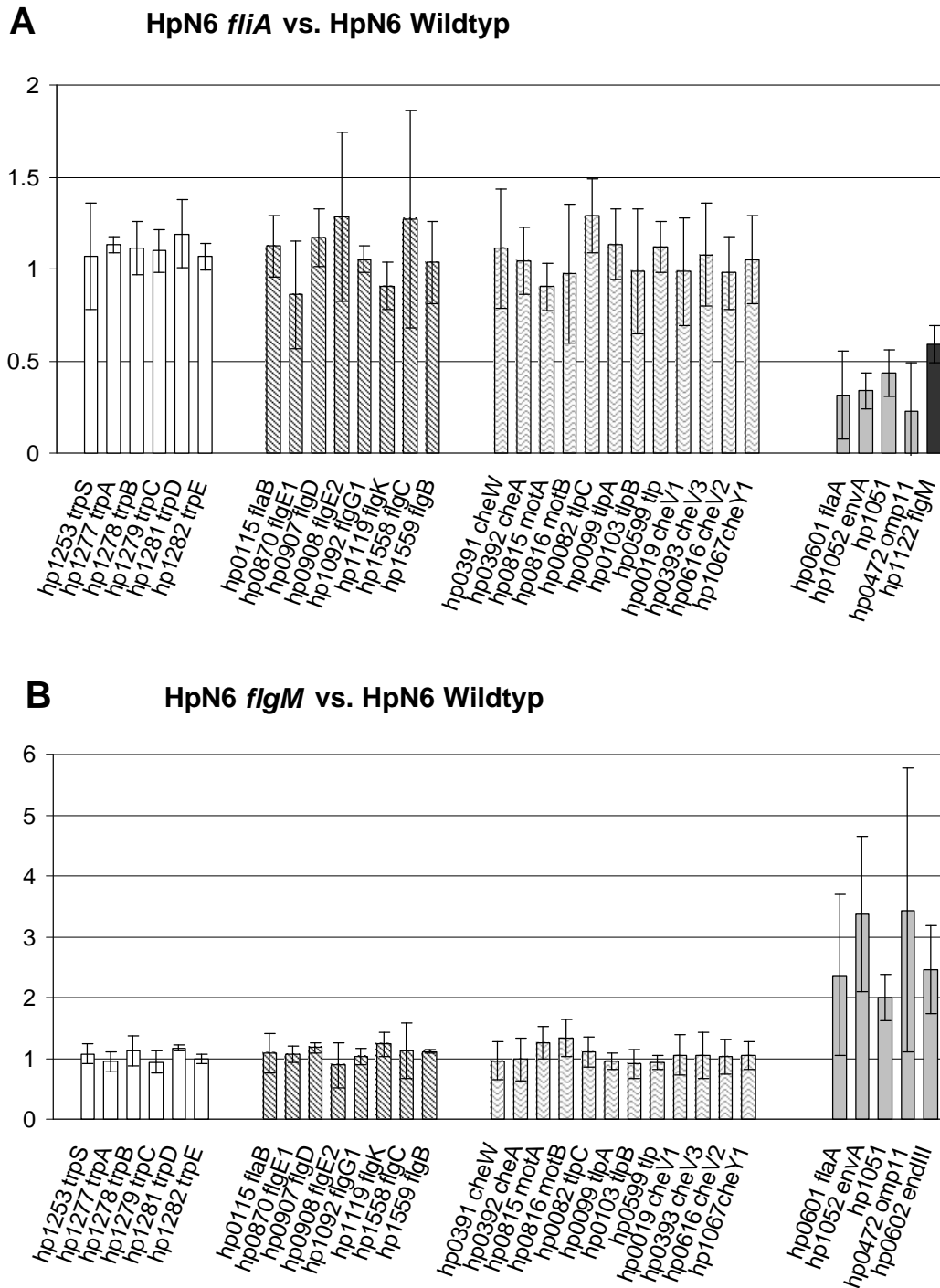
$\sigma^{54}$ -kontrollierten Flagellenproteine FlaB und FlgE1 in beiden Mutanten in vergleichbarer Menge zum Wildtyp auf.



**Abb. 15. Phänotypische Charakterisierung von *H. pylori fliA* und *flgM*.** TEM-Aufnahmen: **A)** *fliA*-Mutante mit Stummelflagellen **B)** *flgM*-Mutante mit 2 bzw. 5 Flagellen an beiden Polen des Bakteriums und einem lateral angeordneten Flagellum (weiße Pfeile). (Vergleichende Aufnahme eines *H. pylori*-Wildtyps siehe Einleitung, Abb. 1).

Balken repräsentieren 0,5 $\mu$ m.  
TEM-Aufnahmen von C. Josenhans.

Für beide Mutanten wurden jeweils vier unabhängige Hybridisierungen mit *H. pylori*-Oligonukleotid-Microarrays (MWG Biotech) durchgeführt, die aufgrund der gegenläufigen Funktion von FliA und FlgM direkt miteinander verglichen werden konnten. Die Experimente setzten sich aus je zwei biologischen Experimenten und einem 'Dye Switch' zusammen. Das heißt, die RNA aus dem Wildtyp und der Mutante wurde bei den Experimenten jeweils mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen, Cy3 und Cy5, markiert um eventuelle Hybridisierungsunterschiede aufgrund eines unterschiedlichen Einbaus der beiden Farbstoffe durch die reverse Transkriptase zu kompensieren. Um reproduzierbare Ergebnisse bei vergleichbaren Wachstumsbedingungen zu erhalten, wurden für die Gewinnung von Zellmaterial Flüssigkulturen unter gleichen Bedingungen für Wildtyp und Mutante angezogen. Dies wurde auch für alle folgenden Microarray-Analysen so durchgeführt. Ausgehend von den Reporterexperimenten und den Transkriptmengen-Bestimmungen während der Wachstumsphasen (vgl. 3.1), wurde als Zeitpunkt der Probenahme die mittlere exponentielle Phase (O.D.<sub>600</sub> = 1,0) gewählt, um mögliche Einflüsse auf die Expression später und früherer Flagellengene abzudecken. Für die Markierungsreaktionen und nachfolgenden Hybridisierungen wurden 50 bzw. 25  $\mu$ g Gesamt-RNA-Präparationen aus Wildtyp und Mutante verwendet.



**Abb. 16. Ergebnisse der Microarray Hybridisierungen mit der HpN6 *fliA*- und *flgM*-Mutante.** Aufgetragen sind ausgewählte Signalquotienten der kompetitiven cDNA Hybridisierungen von *fliA*-Mutante (A) und *flgM*-Mutante (B) mit dem Wildtyp. Die Ergebnisse setzen sich pro Mutante aus vier unabhängigen Hybridisierungen zusammen, ausgewählte Gene sind als Säulen mit Standardabweichungen gegen die Quotienten der normalisierten Intensitäten der Fluoreszenzsignale ('ratios') von Mutante zu Wildtyp aufgetragen. Für beide Mutanten sind die von den untersuchten Regulatoren abhängigen Gene mit einem Signalquotienten >2 oder < 0,5 aufgetragen (graue Säulen). Des Weiteren sind zum Vergleich einige ausgewählte Kontrollgruppen aufgetragen, deren Transkription von der Mutation nicht beeinflusst wird. Hierzu gehören 'Housekeeping'-Gene der Tryptophan-Biosynthese (weiße Säulen), einige für *H. pylori* beschriebene  $s^{54}$ -abhängige Gene (schräg gestrichelt) und in *Salmonella* als  $s^{28}$ -abhängig beschriebene Motor- und Chemotaxisgene (wellenförmig gestrichelt).



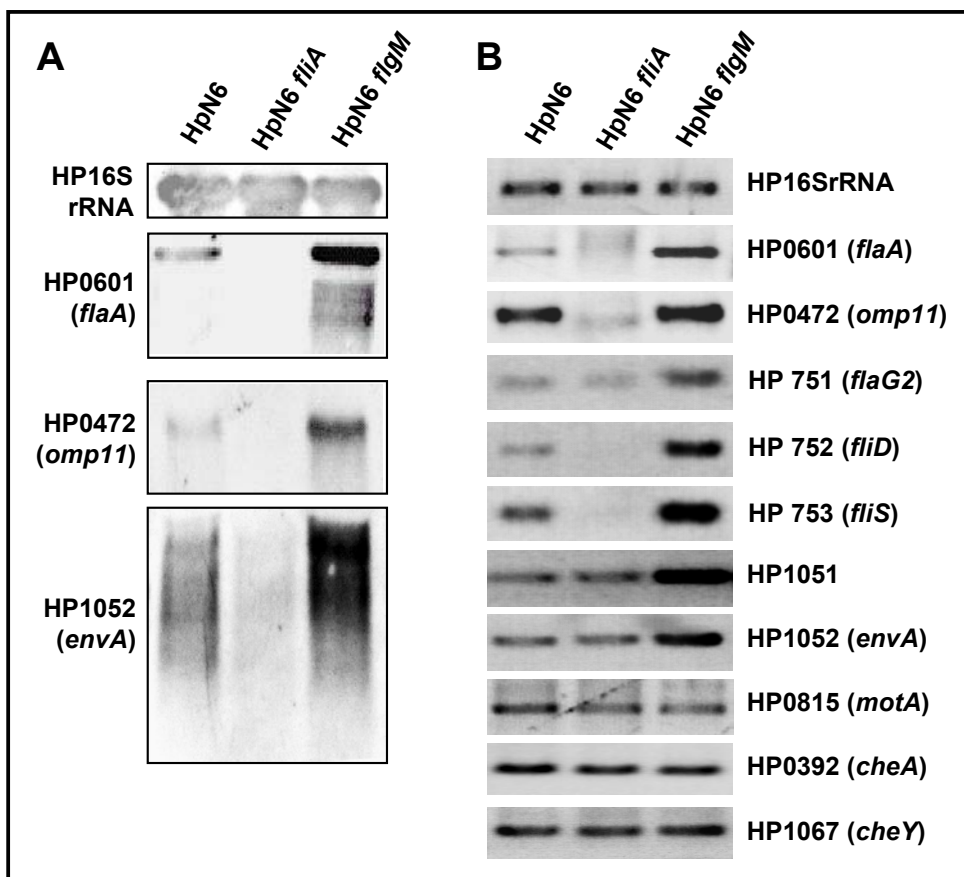
In der Abb. 16 sind ausgewählte Ergebnisse der Microarray-Hybridisierungen mit den HpN6 *fliA*- und *flgM*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt (sämtliche Ergebnisse der *fliA*- und *flgM*-Microarray-Experimente siehe 6.2.2). Zur Bestimmung des Quotienten der Hybridisierungssignale zwischen den markierten cDNA-Präparationen aus Mutante und Wildtyp für die einzelnen Gensonden wurden die Mittelwerte der normalisierten Signalintensitäten über den linearen Fluoreszenzbereich zugrunde gelegt (vgl. 2.12.5). Regulierte Gene mit einem Signalquotienten  $>2$  oder  $<0,5$  sind neben drei Gruppen von Kontrollgenen mit unveränderter Transkriptmenge aufgetragen, die sich aus Genen der Tryptophan-Biosynthese,  $\sigma^{54}$ -abhängigen Flagellengenen und einigen in *Salmonella* FliA-abhängigen Motor- und Chemotaxisgenen zusammensetzen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Arbeiten wurde durch die Microarray-Experimente das Hauptflagellin *fliA* als  $\sigma^{28}$ -abhängig bestimmt. Zusätzlich ist die Transkription des Gens in der *flgM*-Mutante signifikant erhöht, einhergehend mit der antagonistischen Funktion von FlgM und FliA in anderen Organismen. In derselben Weise wie *fliA* wurden drei weitere Gene in zwei Operons reguliert, die bislang in keinem anderen Organismus als FliA/FlgM-abhängig beschrieben wurden. Hierzu zählen das Gen eines zur Gruppe der 'Hops' (*H. pylori* specific outer membrane proteins) gehörigen Proteins, des putativen Membranproteins HP0472 (Omp11), sowie die Gene HP1051 und HP1052, die zusammen ein Operon bilden, wie durch RT-PCR bestätigt wurde (ohne Abbildung). HP1052 als erstes Gen in dem Operon ist als kodierende Sequenz für EnvA (UDP-Acyl-Acetylglykosamin-Deacetylase) annotiert, einem Enzym der Lipopolysaccharidsynthese, für das eine essenzielle Funktion in *E. coli* nachgewiesen wurde (Beall & Lutkenhaus, 1987). HP1051 zeigt schwache Sequenzähnlichkeiten zu einer Glykopeptid-Endopeptidase aus *B. subtilis*. Es gab keinen Hinweis auf Gene, die von FliA negativ und von FlgM positiv reguliert wurden. Das Gen für den Anti-Sigma-Faktor FlgM war in der *fliA*-Mutante deutlich, aber nicht über dem Grenzwert von 2 herunterreguliert (Signalquotient  $1,8 \pm 0,1$ ; siehe Abb. 16; Tab. 6; Tab. 9). In Übereinstimmung damit wurde vor dem Gen zusätzlich zu einem potenziellen  $\sigma^{54}$ -Promotor (Colland *et al.*, 2001) eine konservierte  $\sigma^{28}$ -Promotorsequenz identifiziert. Zusätzlich zu den von FliA/FlgM antagonistisch regulierten Genen ist das Gen HP0602 (*endIII*) in der *flgM*-Mutante signifikant hochreguliert, aber nicht

entsprechend in der *fliA*-Mutante dereguliert. HP0602 kodiert für eine Glykosylase (3-Methyladenin-DNA-Glykosylase), die in die Reparatur von DNA-Basenaustauschen involviert ist (O'Rourke *et al.*, 2000). Das Gen liegt in gleicher Leserichtung 774 Bp `downstream` von *flaA*. Da für *flaA* ein putativer Rho-unabhängiger Terminator der Transkription beschrieben wurde (Leying *et al.*, 1992), ist die Bildung eines vollständig  $\sigma^{28}$ -abhängigen Operons zusammen mit HP0602 allerdings eher unwahrscheinlich.

### 3.3.1.2 Überprüfung der *fliA*- und *flgM*-Microarray-Ergebnisse

Um die Ergebnisse der Microarray-Analysen zu verifizieren und die Klasse der von FliA und FlgM kontrollierten Gene mit alternativen Methoden zu überprüfen, wurden Northern Blot-Hybridisierungen und semi-quantitative RT-PCRs durchgeführt. Einige Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt.



**Abb. 17. Überprüfung ausgewählter *fliA*- und *flgM*-Microarray-Ergebnisse.** **A)** Northern Blot-Hybridisierungen mit Dig-markierten Sonden für 16S rRNA, *flaA*, *omp11* und *envA*, wie links neben den einzelnen Blots mit dem Gennamen gekennzeichnet. Gesamt-RNA-Präparationen aus Wildtyp und Mutante wurden wie über den Spuren angezeigt aufgetragen. Die Ergebnisse bestätigen die durch die Microarrays ermittelte antagonistische Regulation für *flaA*, *omp11* und HP1051 (*envA*)/HP1051. **B)** Semi-quantitative RT-PCRs mit cDNA aus HpN6 Wildtyp, *fliA*- und *flgM*-Mutante (oben). Die jeweils detektierten Gene sind rechts angegeben.

Zunächst wurden die Microarray-Ergebnisse für die Gene *flaA*, *omp11* und HP1052 (*envA*)/HP1051 hinsichtlich ihrer gegenläufigen Regulation in den *fliA*- und *flgM*-Mutanten überprüft. Durch die Northern Blot-Analysen konnten die Microarray-Ergebnisse für die drei Operons bestätigt werden, mit einer deutlich herabgesetzten Transkriptmenge oder keinem nachweisbaren Transkript in der *fliA*-Mutante und einem höheren mRNA-Gehalt in *flgM*. Für das *envA*/HP1051-Operon konnte kein klar differenziertes Transkript nachgewiesen werden, möglicherweise ein Hinweis auf eine hohe mRNA-Instabilität. Eine erhöhte Transkriptmenge in der *flgM*-Mutante und eine deutliche Verminderung in der *fliA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ist jedoch klar erkennbar (Abb. 17). Sowohl im Northern Blot, als auch in den RT-PCRs ist für *envA*/HP1051 im Gegensatz zu *flaA* und *omp11* spezifische mRNA auch noch in der *fliA*-Mutante nachzuweisen. Dies lässt auf einen zusätzlichen Promotor schließen. Ein Operon, welches in früheren Arbeiten als FliA-abhängig beschrieben wurde, in den hier durchgeführten Microarray-Analysen aber nicht unter den regulierten Genen gefunden wurde, ist das HP0751-53 Operon (*flaG2*, *fliD*, *fliS*; Kim *et al.*, 1999). Mit der sensitiveren Methode der RT-PCR, mit der eine sehr niedrige Kopienzahl an mRNA aufgrund des Amplifikationsschrittes nachgewiesen werden kann, konnte deutlich eine Regulation der drei Gene in den Mutanten analog zu *flaA* nachgewiesen werden (Abb. 17). Zumindest für das erste Gen des Operons, HP0751 (*flaG1*) konnte in der *fliA*-Mutante noch mRNA nachgewiesen werden. Dies geht einher mit einer konservierten  $\sigma^{54}$ -Promotorsequenz, die vor dem *flaG1*-Gen identifiziert wurde (Josenhans *et al.*, 2002a). Für drei Flagellenmotor- und Chemotaxisgene, die bei Enterobakterien zu den späten  $\sigma^{28}$ -Genen gehören (Aizawa, 1996; Macnab, 1996; Chilcott & Hughes, 2000), konnte weder in den Microarray-Analysen noch mittels RT-PCR eine Zugehörigkeit zum FliA/FlgM-System nachgewiesen werden. Diese Gene wurden bei *H. pylori* im Gegensatz zu *Salmonella* aufgrund ihrer Anordnung im Genom zusammen mit unterschiedlichen `Housekeeping`-Genen in  $\sigma^{80}$ -kontrollierte Operons eingeordnet (Josenhans & Suerbaum, 2000; Spohn & Scarlato, 2001). Eine genauere Analyse der stromaufwärts gelegenen Sequenzbereiche vor den beiden neuen FliA/FlgM-abhängigen Operons ergab in einer Entfernung von weniger als 100 Nukleotiden zum Startkodon der jeweiligen Gene stark konservierte Sequenzen für  $\sigma^{28}$ -Promotoren (Abb. 18).

## Ergebnisse

```

HP0601 (flaA)      : CAAAGCCCTTTAAAATTTC--AAACTTTAACCGATTATAGTTCCAAC-47
HP0751 (flaG)      : CGCACGCAATTAAACCAAATCGTTTTTATTGCCGATATTGGCTAAAGA-58
HP1052 (envA)      : ATAAAAATATTAAAATAATCACTAAAAATGACCGATATACTAGACATA-11
HP0472 (omp11)     : GATAAAAAATTAAAACCTTTTAGAAAAATAACCGATCTTAGGGTGTAA-26
HP1122 (flgM)     : CAAAATCCATTAACTTTTTTTCTTTTTTGGCGATACTTGCTGTAAT- 3
ECO28              : -----TAAANNNNNNNNNNNNNNNNNGCGATAA-----
                a           TaAA           cCGAT
  
```

**Abb. 18. Sequenzvergleich von *H. pylori*-Promotorsequenzen von Operons unter der Kontrolle des FliA/FlgM-Systems.** Der *E. coli*  $\sigma^{28}$ -Konsensus-Promotor (ECO28) ist zum Vergleich mit angegeben. Auch vor den durch die Microarrays ermittelten Operons HP1052 (*envA*)/HP1051 und HP0472 (*omp11*) konnten konservierte Promotorsequenzen ermittelt werden. Der Abstand von der letzten angezeigten Base bis zum ATG-Startkodon ist hinter den Sequenzen angegeben.

### 3.3.1.3 Vergleich der Oligonukleotid- und PCR-Produkt-Microarray-Hybridisierungen anhand des FliA/FlgM-Systems

Zusätzlich zu den acht Experimenten, die mit den kommerziell erhältlichen Oligonukleotid-Microarrays durchgeführt wurden (siehe 3.3.1.1), wurde pro Mutante zum Vergleich eine Hybridisierung mit einem PCR-Produkt-Microarray (Eigenproduktion) durchgeführt. Diese Anzahl reicht nicht für eine statistische Auswertung der Ergebnisse aus, ein bedingter Vergleich ist aber für diejenigen Gene möglich, die in der *fliA*-Mutante herunter- und gleichzeitig in der *flgM*-Mutante hochreguliert sind (Tab. 6). Für die Oligonukleotid-Microarrays sind hier noch einmal die Ergebnisse der antagonistisch regulierten Gene aus Abb. 16 in Tabellenform dargestellt. Sämtliche Gene wurden auch in dem *fliA*-PCR-Microarray als herunterreguliert im Vergleich zum Wildtyp ermittelt, zum Teil mit deutlich höheren Signalquotienten. Die entsprechenden *flgM*-Werte haben dieselbe Tendenz wie in den Oligoarray-Experimenten, liegen jedoch bis auf HP1051 außerhalb des gewählten Grenzwertes von  $<0,5$ . Interessanterweise wird das *fliD*-Operon (HP0751-53) in beiden Mutanten mit den PCR-Produkt-Microarrays wie auch durch die RT-PCR (siehe Abb. 17) als antagonistisch reguliert ermittelt. Zusätzlich zeigen die Gene HP0679 (*wbpB*), HP1432 (*hpn*) und der hypothetische Leserahmen HP1391 eine gegensätzliche Regulation in den *fliA*- und *flgM*-Mutanten nach den PCR-Produkt-Microarray-Hybridisierungen. Aufgrund dieser Ergebnisse zeichnet sich eine höhere Sensitivität der PCR-Produkt-Microarrays ab, wahrscheinlich aufgrund des längeren Hybridisierungsbereichs der Gen-umfassenden PCR-Sonden gegenüber den 50mer Sonden der Oligonukleotid-Microarrays. Auf der anderen Seite gibt es bei den PCR-Produkt Microarray-Experimenten eine große Anzahl von Genen, die nur in einer der

beiden Mutanten über oder unter dem Grenzwert für den Signalquotienten liegen (vgl. 6.2.2) und bei denen es sich sehr wahrscheinlich um falsch-positive Signale handelt. Somit sinkt die Spezifität der PCR-Produkt- gegenüber den Oligonukleotid-Microarrays.

TIGR Nr.	Gen Name	Oligonukleotid Microarrays				PCR-Produkt Microarrays			
		HpN6 <i>fliA</i> (n=4)		HpN6 <i>flgM</i> (n=4)		HpN6 <i>fliA</i> (n=1)		HpN6 <i>flgM</i> (n=1)	
		+	±	+	±	+	±	+	±
HP0472	<i>omp11</i>	3,7	3,6	0,3	0,2	264	71	0,6	0,03
HP0601	<i>flaA</i>	3,0	1,5	0,4	0,1	16,2	2,6	0,6	0,1
HP0602	<i>endIII</i>	1,6	0,3	0,4	0,1	1,6	0,1	0,6	0,1
HP1052	<i>envA</i>	2,7	0,4	0,3	0,1	7,3	0,6	0,7	0,01
HP1051	<i>hyp.</i>	2,2	0,5	0,5	0,1	2,5	0,0	0,5	0,1
HP1122	<i>flgM</i>	1,8	0,2	N.D.		2,5	0,5	N.D.	
HP0751	<i>flaG2</i>	1,2	0,3	0,8	0,2	4,4	0,3	0,4	0,06
HP0752	<i>fliD</i>	1,5	0,5	0,8	0,1	1,4	0,1	0,5	0,03
HP0753	<i>fliS</i>	1,4	0,5	0,9	0,1	2,3	0,4	0,4	0,04
HP0679	<i>wbpB</i>	1,0	0,1	1,0	0,2	2,3	0,2	0,5	0,04
HP1432	<i>hpn</i>	1,4	1,1	1,8	0,9	2,1	0,2	0,3	0,01
HP1391	<i>hyp.</i>	1,1	0,1	0,9	0,1	2,1	0,2	0,4	0,04

**Tab. 6 Untersuchungen des FliA/FlgM-Systems mit Oligonukleotid- und PCR-Produkt-Microarrays.** Dargestellt sind ausgewählte Gene in den unterschiedlichen Mutanten und den 2 Microarray-Systemen. Die Quotienten der Signalintensitäten von Wildtyp zu Mutante sind jeweils mit der Standard-abweichung ( $\pm$ ) aus  $n$  Experimenten oder den zwei Spot-Replikaten der PCR-Produkt-Microarrays angegeben. Grüne und orange Unterlegung zeigt Quotienten außerhalb der Grenzwerte  $< 0,5$  und  $> 2$  an. TIGR Nr.: Gen-Bezeichnung in *H. pylori* 26695; hyp.: hypothetischer Lese-rahmen; N.D.: keine Bestimmung möglich. Der obere Teil der Tabelle (HP0472-HP1122) zeigt Gene, die durch die Experimente mit den Oligonukleotid-Microarrays als dem FliA/FlgM-System zugehörig ermittelt wurden (vgl. 3.3.1.1). Der untere Teil der Tabelle (HP0751-HP1391) listet zusätzliche Gene auf, die nach den PCR-Produkt-Microarray-Experimenten durch FliA/FlgM antagonistisch reguliert sind.

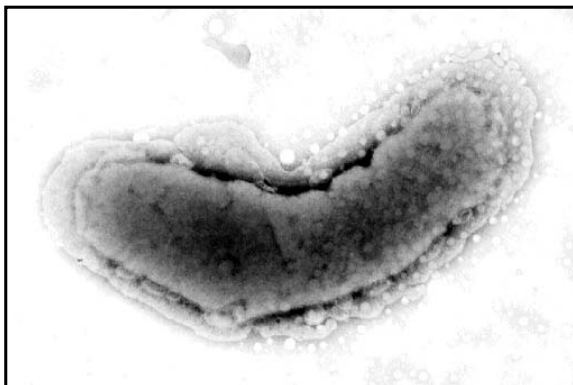
### 3.3.2 Untersuchungen zum RpoN-Regulon

Nach der Charakterisierung der späten Flagellengene unter Kontrolle des FliA/FlgM-Systems wurden nun der Einfluß des in *H. pylori* Flagellen-assoziierten alternativen Sigma-Faktors RpoN und der funktionell zugehörigen Regulatoren FlgR und HP0244 auf die globale Transkription in *H. pylori* näher untersucht. Während RpoN bei der Regulation der Flagellenbiosynthese in Enterobakterien keine Rolle spielt (Macnab, 1996; Chilcott & Hughes, 2000), wurde ein Einfluß auf das Flagellensystem durch  $\sigma^{54}$ -Faktoren mit transkriptionellen Aktivatoren und assoziierten Sensor-kinasen für eine Reihe polar begeißelter Bakterien beschrieben. Hierzu gehören z. B. *C. crescentus*, *Pseudomonas* spp. oder *Vibrio* spp. (Jenal, 2000; Prouty *et al.*, 2001;

Dasgupta *et al.*, 2002). Für *H. pylori* wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit einige Flagellengene dem RpoN-Regulon zugeordnet (Suerbaum *et al.*, 1993; Spohn & Scarlato, 1999; Josenhans & Suerbaum, 2000; Spohn & Scarlato, 2001). Um zu überprüfen, ob zusätzliche Gene unter der Kontrolle von RpoN stehen, und ob das Regulon auch nicht-flagellenassoziierte Gene beinhaltet, wurden Transkriptom-Untersuchungen mit PCR-Produkt- und Oligonukleotid-Gesamtgenom-Microarrays durchgeführt. Zur Kontrolle der Ergebnisse für RpoN wurden auch der  $\sigma^{54}$ -Aktivator FlgR und die für diesen Faktor spezifische Histidinkinase FlgS (HP0244) in die Untersuchungen einbezogen. Als Zeitpunkt der Probenahme für die RNA-Präparationen wurden dabei mit der frühen exponentiellen Wachstumsphase (O.D.<sub>600</sub>=0,35 bzw 0,7) etwas frühere Zeitpunkte gewählt als für die Untersuchung des FliA/FlgM-Systems (O.D.<sub>600</sub>=1,0).

### 3.3.2.1 Microarray-Untersuchungen der *rpoN*-Mutante

Die Experimente wurden mit *rpoN*-Mutanten der Stämme *H. pylori* N6 und Hp88-3887 durchgeführt (Herstellung C. Josenhans; Niehus *et al.*, 2004). Die initiale Charakterisierung der Mutanten erbrachte übereinstimmende Ergebnisse mit Beschreibungen einer *rpoN*-Mutation in einem anderen *H. pylori* Stamm (Fujinaga *et al.*, 2001) und in dem eng verwandten Genus *Campylobacter* (Jagannathan *et al.*, 2001). Die Mutante wurde jeweils als flagellenlos und nicht beweglich beschrieben (vgl. Abb. 19). In einer *rpoN*-Mutante in *C. jejuni* war die Expression der beiden Flagelline FlaA und FlaB, die wie in *H. pylori* von  $\sigma^{28}$ - und  $\sigma^{54}$ -Promotoren kontrolliert werden, vollständig blockiert (Jagannathan *et al.*, 2001). Auch in den entsprechenden *H. pylori*-Mutanten konnten durch Western Blot-Hybridisierungen weder FlaA und FlaB noch das  $\sigma^{54}$ -abhängige Hakenprotein FlgE1 nachgewiesen werden.



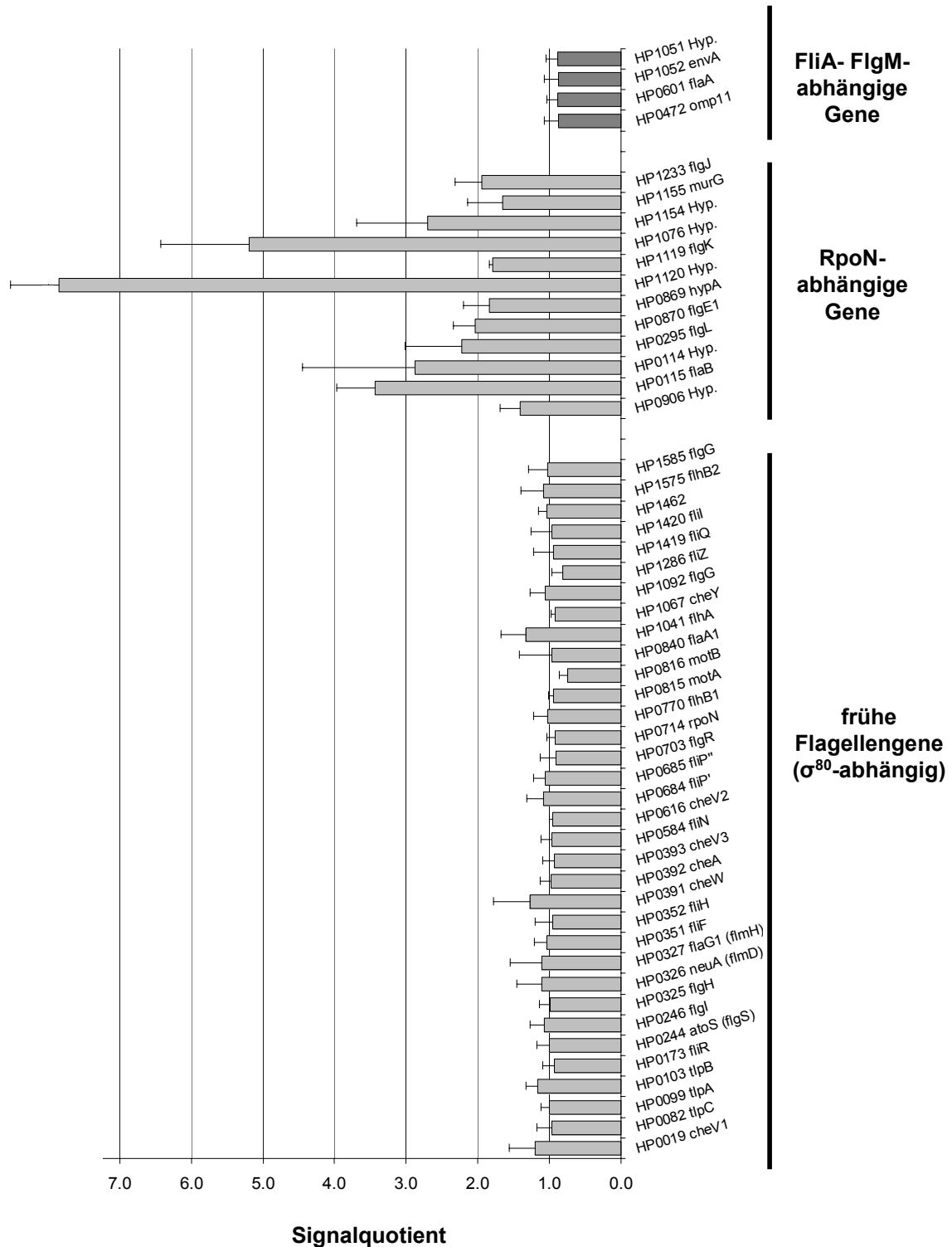
**Abb. 19. Phänotypische Charakterisierung der *rpoN*-Mutante.** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *H. pylori* N6 *rpoN*-Mutante. Das Bakterium ist nicht mehr zur Ausbildung von Flagellen oder Flagellenhaken befähigt.

TEM-Aufnahme von C. Josenhans.

Die Microarray-Hybridisierungen basierten auf einer Reihe von Flüssigkulturexperimenten mit den *H. pylori*-Wildstämmen und *rpoN*-Mutanten. Es wurden vier Hybridisierungen mit Zellen aus zwei unterschiedlichen biologischen Experimenten für HpN6 *rpoN* und drei Hybridisierungen mit Zellen aus zwei biologischen Experimenten für Hp88-3887 *rpoN* durchgeführt. Der Vergleich des Wachstumsverhaltens der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in nährstofflimitierter Kultur erbrachte dabei keine signifikanten Unterschiede in den Verdopplungszeiten. Zum Vergleich der Ergebnisse der Hybridisierungen mit den zwei verschiedenen Microarray-Systemen wurden zusätzliche Experimente mit den Oligonukleotid-Arrays durchgeführt. Drei Microarray-Hybridisierungen wurden wie bei den vorangegangenen Experimenten mit markierten cDNAs aus Zellen der frühen exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt (O.D.<sub>600</sub> ca. 0,35). Um auch die Wachstumsphasen-abhängige Veränderung der Transkription von  $\sigma^{54}$ -kontrollierten Genen zu berücksichtigen, wurden drei weitere Experimente mit HpN6 *rpoN*-Mutanten bei einer höheren O.D.<sub>600</sub> von 0,7 und 1,0 durchgeführt (siehe 3.3.2.3). Die Ergebnisse für alle Gene aus den Microarray-Hybridisierungen für die Experimente zum RpoN-Regulon sind in 6.2.2 aufgelistet, ausgewählte Ergebnisse sind in Abb. 20, Tab. 7, Tab. 8 und Tab. 9 dargestellt.

Das Diagramm in Abb. 20 zeigt die Gruppe der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Gene (Zusammensetzung siehe unten) mit den Signalquotienten von HpN6-Wildtyp zur *rpoN*-Mutante im Vergleich zu anderen Flagellengenen. Die große Anzahl der flagellenassoziierten Gene, die aufgrund von Informationen aus den *H. pylori*-Genomsequenzen der Kontrolle des Grundstoffwechsel-assoziierten ('House-keeping')  $\sigma^{80}$ -Faktors zugeordnet worden waren (Spohn & Scarlato, 2001), sind in ihrer Transkription durch die Mutation in *rpoN* nicht signifikant beeinträchtigt. Ebenso ist kein Einfluß auf die  $\sigma^{28}$ -abhängigen späten Flagellengene zu ermitteln, die einen Signalquotienten von ca. 1 aufweisen. Dies bestätigt eine der Besonderheiten des *H. pylori*-Flagellensystems, nach dem Mutationen in den mittleren Flagellengenen, durch die das Typ III-Sekretionssystem nicht funktionsfähig zusammengesetzt werden kann, keine negative 'Feedback'-Regulation auf die Expression später Flagellengene hat (O'Toole *et al.*, 1994b).

## Ergebnisse



**Abb. 20. Auswirkungen der Mutation von *rpoN* auf die Expression verschiedener Gene des Flagellensystems.** Dargestellt sind in der Transkriptmenge bei HpN6 *rpoN* und Wildtyp unveränderte FliA/FlgM-abhängige (oben) und frühe Flagellengene (unten), sowie Gene unter RpoN Kontrolle, die z. T. durch die Microarray-Experimente ermittelt wurden (Mitte). Die Gene sind als Säulen gegen den Signalquotienten der Flureszenzsignale aus Wildtyp und Mutante aufgetragen. Die Daten errechnen sich aus n=4 Experimenten.

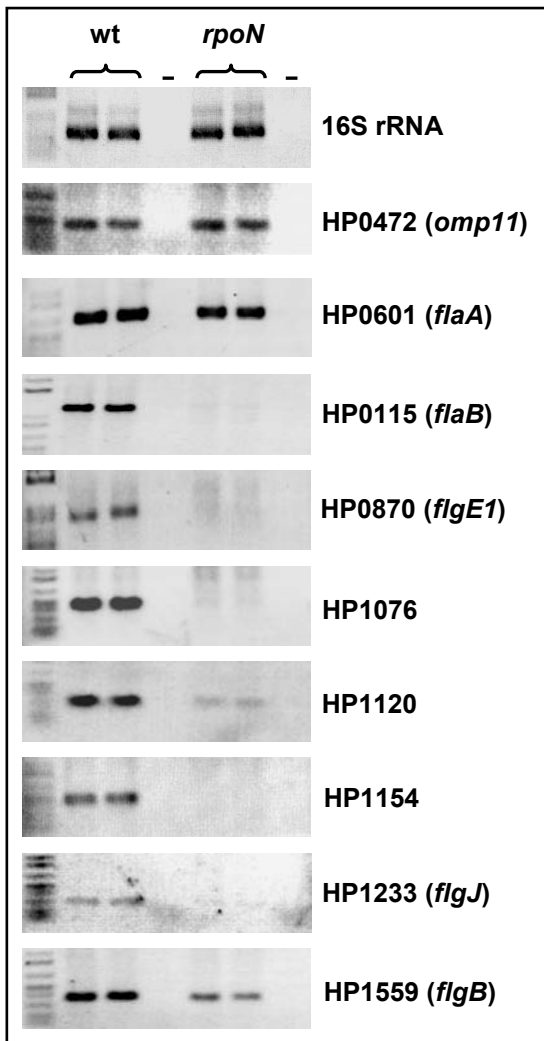


Durch die Microarray-Analysen mit den *rpoN*-Mutanten in zwei unterschiedlichen *H. pylori*-Stämmen und den Vergleich mit den Experimenten mit den Regulatoren FlgR und FlgS (siehe 3.3.2.4), konnte eine spezifische  $\sigma^{54}$ -abhängige Gengruppe identifiziert werden (siehe Abb. 20, Tab. 7). Hierbei konnte eine Reihe von Genen durch die Microarray-Analysen bestätigt werden, die in vorangegangenen Arbeiten als RpoN-FlgR reguliert beschrieben wurden (O'Toole *et al.*, 1994b; Spohn & Scarlato, 1999; Suerbaum *et al.*, 2003). Hierzu zählen die Gene *flaB* (HP0115; Flagellin B), *flgE1* (HP0870; Flagellenhaken), *flgL* (HP0295; Flagellenhaken-assoziiertes Protein HAP3) und HP1120/*flgK* (HP1119; Flagellenhaken-assoziiertes Protein HAP1). Die Gene HP0869, HP1076, HP1154/HP1155 und HP1233 wurden als bislang in keinem anderen Organismus als RpoN-abhängig beschriebene Gene dem Regulon zugeordnet. HP0869 (*hypA*) kodiert für ein Nickel-bindendes Protein, welches in die Reifung und Aktivierung von Urease und Hydrogenasen in *H. pylori* involviert ist (Mehta *et al.*, 2003). Durch eine RT-PCR mit den Primern HP0869\_RT1 und HP0870\_RT1 konnte in dieser Arbeit ein Kotranskript von *hypA* mit dem Flagellenhaken-Gen *flgE1* nachgewiesen werden. Auch für HP1154/1155 wurde durch RT-PCR Analysen die transkriptionelle Organisation in einem Operon bestätigt. HP1155 (*murG*) kodiert für eine Glycosyltransferase (Undekaprenyl-PP-MurNac-Pentapeptid-UDPGlcNac-GlcNac-Transferase) und katalysiert einen Schritt der Mureinbiosynthese bei der Peptidoglykansynthese. HP1154 ist als erstes Gen des Operons als hypothetischer Leserahmen annotiert und weist nur schwache Aminosäureähnlichkeiten zu UDP-Glukoronyl-Transferasen auf (9% Identität, 17% Ähnlichkeit). Für das Gen wurde in einer umfangreichen *H. pylori* Protein-Interaktionsdatenbank (Hybrigenics PimRider™; <http://pim.hybrigenics.com/pimrider>; Rain *et al.*, 2001) eine schwache Interaktion mit dem Flagellin FlaA beschrieben (PBS=D 0,01), die eine Verbindung zum Flagellensystem impliziert. Zwei zusätzliche neu ermittelte  $\sigma^{54}$ -abhängige Gene sind die bislang nicht annotierten Leserahmen HP1076 und HP1233. Für HP1076 konnten keine Homologien zu bekannten Proteinen anderer Organismen ermittelt werden, für das Protein wurde jedoch eine signifikante Proteininteraktion mit dem Flagellin-Chaperon FliS beschrieben (PBS=A 1e-50; Hybrigenics PimRider™), was wiederum auf eine Verbindung zum Flagellensystem schließen lässt. Die Sequenz von HP1233 weist Aminosäureähnlichkeiten (22% Ähnlichkeit, 10% Identität) zu der Muraminidase FlgJ auf (Niehus *et al.*, 2004), einem für die Flagellenbiosynthese in *Salmonella*

essenziellen Faktor (Nambu *et al.*, 1999). Erste funktionelle Experimente zur Funktion der beiden Proteine in der Arbeitsgruppe von C. Josenhans haben bereits weitere Hinweise auf eine Zugehörigkeit zum Flagellensystem von *H. pylori* erbracht (vgl. 3.4.2).

### 3.3.2.2 Überprüfung der *rpoN*-Microarray-Ergebnisse

Die Überprüfung der RpoN-abhängigen Gene erfolgte mit semi-quantitativer RT-PCR. Dafür wurden, wie bei den Experimenten mit den übrigen hier untersuchten Mutanten, die für die Microarray-Experimente verwendeten RNA-Präparationen zugrunde gelegt und in vielen Fällen zusätzliche RNA aus weiteren biologischen Wachstumsexperimenten. Auf diese Weise wurden für jedes überprüfte Gen mindestens zwei Bestätigungsexperimente aus unabhängigen biologischen Experimenten durchgeführt. Die in Abb. 21 abgebildeten RT-PCRs wurden mit cDNA aus Zellen des HpN6-Wildtyps und der entsprechenden *rpoN*-Mutante durchgeführt. Die für den *H. pylori*-Stamm 88-3887 durchgeführten Experimente zu den abgebildeten Genen bestätigten die Ergebnisse (ohne Abbildung). Sämtliche durch die Microarray-Analysen dem RpoN-Regulon zugewiesenen Gene konnten durch die RT-PCRs als  $\sigma^{54}$ -reguliert bestätigt werden (siehe Abb. 21). Demgegenüber konnte für eine Reihe von Genen bestätigt werden, dass die Transkriptmenge in der *rpoN*-Mutante gegenüber dem Wildtyp unverändert ist. Hierzu gehören die  $\sigma^{28}$ -abhängigen Gene *flaA* und *omp11*, wie auch die Gene der Regulatoren des Flagellensystems, HP0244 (*atoS/flgS*), HP0703 (*flgR*), HP 0714 (*rpoN*), HP1032 (*fliA*) und HP1122 (*flgM*) (vgl. Tab. 9). Die Gene des *flgBC*-Operons, HP1559/HP1558, die für Komponenten des Flagellenstabs kodieren wurden in früheren Arbeiten durch Primer Extension-Experimente als FlgR-abhängig transkribiert ermittelt und haben einen konservierten  $\sigma^{54}$ -Promotor (Spohn & Scarlato, 1999). Die RT-PCR-Experimente zeigen eine deutlich herabgesetzte, aber nicht vollständig blockierte Transkription dieser Gene in der *rpoN*-Mutante (siehe Abb. 21), was auf einen zusätzlichen funktionalen Promotor hindeutet. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Microarray-Experimente, die für HP1559 und HP1558 eine herabgesetzte Transkriptmenge in den *rpoN*-Mutanten zeigten, wobei die Signalquotienten aber unterhalb des hier zugrunde gelegten Grenzwertes von 2 lagen (siehe Tab. 8).



**Abb. 21. Überprüfung der Microarray-Ergebnisse mit der *rpoN*-Mutante mit semi-quantitativer RT-PCR.** Rechts neben den Gelbildern sind die detektierten Gene benannt. Aufgetragen sind jeweils PCRs, basierend auf cDNA von Zellen einer O.D.<sub>600</sub> von 0,35. Es sind, wie über den Spuren bezeichnet, jeweils zwei unabhängige RNA-Präparationen von HpN6-Wildtyp (wt) und *rpoN*-Mutante mit Negativkontrolle (-) ohne reverse Transkriptase aufgetragen.

Die durch die Microarray-Analysen ermittelten bekannten und neuen RpoN-abhängigen Gene konnten mit den RT-PCRs bestätigt werden. HP1559 (*flgB*) scheint zusätzlich von einem  $\sigma^{54}$ -unabhängigen Promotor kontrolliert zu werden. Als Kontrolle sind die  $\sigma^{28}$ -abhängigen Gene *omp11* und *flaA* sowie 16S rRNA abgebildet.

Ein scheinbarer Widerspruch ergab sich aus der Tatsache, dass die als  $\sigma^{54}$ -kontrolliert beschriebenen Gene HP0907 (*flgD*) und HP0908 (*flgE2*) (Spohn & Scarlato, 1999) nicht unter den durch die Microarray-Analysen ermittelten Genen des RpoN-Regulons eingeordnet werden konnten. Genauere Analysen des Operons ergaben, dass lediglich HP0906 ausschließlich  $\sigma^{54}$ -abhängig ist, während *flgD/E2* ein weiteres Kotranskript bildet welches von mindestens einem zusätzlichen Promotor kontrolliert wird (siehe 3.4.3, Abb. 29).

Vor allen neu ermittelten RpoN-abhängigen Genen und Operons konnten bei einer Analyse der innerhalb von 100 Bp vor den Genen gelegenen Sequenzbereichen Bereiche mit großer Homologie zu einem  $\sigma^{54}$ -Konsensus-Promotor identifiziert werden (siehe Abb. 22).

## Ergebnisse

```
HP0115 : CAAAGAGTTGGAACACCCTTTGCTTACTAAAATCAA-22
HP0295 : GCTTATTTTGGAACTACTTTAGCTTGTGTTAAAAAA-14
HP0367 : GTGTTTTTGAAGATAGAGTTTGCTTATCTTATCTTTAA-25
HP0870 : AGCTATTTAGGAACAACACTTTTGCTTATTTTGCATAGA-28
HP1076 : TCATAAAAAAGGAACGAAAAATGCTTGTGAATGATCAAT-19
HP1120 : TAAAAAATGGCATAGTATTTGCTTGAATACGGCTGAA-21
HP1154 : GTTGGATTTGGAACGCCTTTTGCTTTTACGCTTTTAA-56
HP1233 : TCTCATTAGGGAATGGATTTTGCTTAAACATTAGCGTAA-22
Konsensus:          GGaa      tttGctT      a
```

**Abb. 22. Sequenzvergleich verschiedener *H. pylori*  $\sigma^{54}$ -Promotoren.** In der Abbildung sind bereits funktionell charakterisierte  $\sigma^{54}$ -Promotoren (HP0115, HP0295, HP0870, HP1120; Spohn & Scarlato, 1999) mit Sequenzbereichen vor neu ermittelten Operons des RpoN-Regulons gleichgesetzt. Man erkennt zwischen allen Sequenzen einen hohen Konservierungsgrad. Die Zahl am Ende der Sequenz zeigt jeweils den Abstand zum Startkodon des entsprechenden Gens an.

### 3.3.2.3 Vergleich Oligonukleotid- und PCR-Produkt-Microarray-Hybridisierung anhand der Experimente mit *rpoN*-Mutanten

Der Vergleich der mit den beiden unterschiedlichen Microarray-Systemen durchgeführten Experimente mit der HpN6 *rpoN*-Mutante und dem Wildtyp ist für die regulierten Gene unter RpoN-Kontrolle in Tab. 7 dargestellt. Mit den Oligonukleotid-Microarrays wurden zusätzliche Experimente mit Zellen aus der mittleren Phase des exponentiellen Wachstums durchgeführt (O.D.<sub>600</sub> von 0,7 bzw 1,0). Der Vergleich der Werte ergab eine tendenzielle Abnahme der Signalquotienten für die Gene des RpoN-Regulons mit zunehmender O.D.<sub>600</sub> der Zellkultur. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Hauptteil der Microarray-Experimente mit RNA-Präparationen aus Zellen einer O.D.<sub>600</sub> von 0,35 bzw. 0,7 durchgeführt.

Der Vergleich der Experimente mit Oligonukleotid- und PCR-Produkt-Microarrays mit Zellen aus der frühen exponentiellen Phase (O.D.<sub>600</sub>=0,35), zeigte eine gute Korrelation der Ergebnisse zwischen den beiden verschiedenen Systemen. Wie bei den entsprechenden Versuchen mit dem FliA/FlgM-System (vgl. 3.3.1.3), zeigte sich hier eine höhere Spezifität der PCR-Produkt-Microarrays in Bezug auf die Detektion der regulierten Gene. Das Flagellin *flaB* wurde bei den hier durchgeführten Experimenten mit den Oligonukleotid-Microarrays im Gegensatz zu den PCR-Arrays nicht als dem RpoN-Regulon zugehörig ermittelt (siehe Diskussion). Bis auf das Flagellenhaken-Gen HP0870 (*flgE1*) waren die Signalquotienten zwischen Wildtyp und Mutante für die regulierten Gene durch die Bestimmung mit den PCR-Produkt-Microarrays durchweg höher als durch die Oligonukleotid-Microarray-Experimente bestimmt (siehe Tab. 7).

		Microarray-System :			Oligo		PCR		
		O.D. <sub>600</sub> :			0,35	0,7	1,0	0,35	
TIGR Nr. Name, Funktion		HpN6 wt / <i>rpoN</i> (n=3)		HpN6 wt / <i>rpoN</i> (n=1)		HpN6 wt / <i>rpoN</i> (n=2)		HpN6 wt / <i>rpoN</i> (n=4)	
			+			+		+	
HP0115	Flagellin B ( <i>flaB</i> )	1,1	0,4	0,8	1,3	0,4	3,4	0,5	
HP0114	Hypothetischer ORF	2,7	0,7	0,9	1,3	0,1	2,9	1,6	
HP0295	Flagellenhaken-assoziiertes-Protein HAP3 ( <i>flgL</i> )	1,8	0,8	1,2	1,5	0,1	2,2	0,8	
HP0870	Flagellenhaken-Protein ( <i>flgE1</i> )	8,6	2,0	5,3	2,1	0,8	2,0	0,3	
HP0869	Hydrogenase Expressions-/Reifungs-Protein ( <i>hypA</i> )	1,6	0,5	1,2	1,4	0,1	1,8	0,4	
HP0906	Hypothetischer ORF	1,2	0,1	1,1	1,0	0,0	1,4	0,3	
HP1120	Hypothetischer ORF / Operon mit <i>flgK</i>	3,0	1,0	3,2	2,6	0,3	7,9	0,7	
HP1119	Flagellenhaken-assoziiertes-Protein HAP1 ( <i>flgK</i> )	1,6	0,5	1,5	1,5	0,2	1,8	0,0	
HP1076	Hypothetischer ORF	3,4	1,1	2,9	1,9	0,0	5,2	1,2	
HP1154	Hypothetischer ORF / Operon mit <i>murG</i>	1,7	0,1	1,8	1,6	0,0	2,7	1,0	
HP1155	Transferase, Peptidoglykansynthese ( <i>murG</i> )	1,8	0,5	2,1	2,0	0,1	1,7	0,5	
HP1233	Hypothetischer ORF, <i>flgJ</i> -Ortholog	1,5	0,5	1,4	1,4	0,0	2,0	0,4	

**Tab. 7 Vergleich der Microarray-Hybridisierungen mit der *rpoN*-Mutante zwischen Oligonukleotid- und PCR-Produkt Microarrays.** Die Bezeichnung der einzelnen Gene in *H. pylori* 26695 (TIGR Nr.), Genname und Funktion, sowie die in den Experimenten überprüfte Mutanten und Wildtyp-Stämme sind oberhalb der Tabelle angegeben. Aufgelistet sind unterschiedliche, durch PCR-Produkt-Microarray-Hybridisierungen und RT-PCR ermittelte  $\sigma^{54}$ -abhängige Gene (siehe 3.3.2.1 und 3.3.2.2) mit Signalquotienten mit Standardabweichung ( $\pm$ ) aus *n* Wiederholungen der verschiedenen Experimente mit der *rpoN*-Mutante. Verglichen werden die Werte von Oligonukleotid- (Oligo) und PCR-Produkt basierten (PCR) Microarray-Hybridisierungen, sowie Experimente mit Bakterien in unterschiedlichen Phasen des exponentiellen Wachstums (Flüssigkultur O.D.<sub>600</sub>=0,35, 0,7, 1,0). Signalquotienten >1,8 sind orange unterlegt.

### 3.3.2.4 Microarray-Untersuchungen zu den *flgR*- und *flgS*-Mutanten

Um die Ergebnisse der Microarray-Untersuchungen mit der *rpoN*-Mutante und die dadurch ermittelten RpoN-abhängigen Gene zu überprüfen, wurden in einem nächsten Schritt die Transkriptionsprofile der Gene durch entsprechende Versuche mit *flgR*- und *flgS*-Mutanten bestimmt.

Die Aktivität des  $\sigma^{54}$ -Holoenzym ist gekoppelt an die Bindung eines spezifischen transkriptionellen Aktivators über eine ca. 70-150 Bp `upstream` vom Promotor gelegene Aktivatorsequenz (Thöny & Hennecke, 1989; Xu & Hoover, 2001). FlgR gehört zur Familie der NtrC-ähnlichen Proteine und ist der Aktivator von RpoN in *H.*

*pylori*. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien konnte für FlgR gezeigt werden, dass es RpoN unabhängig von einer Aktivierungssequenz stimuliert (Brahmachary *et al.*, 2004). Durch Untersuchungen einer isogenen *H. pylori* G27 *flgR*-Mutante und ihrer Auswirkung auf die Expression unterschiedlicher Flagellengene wurde bereits ein Teil des RpoN-Regulons auf transkriptioneller Ebene charakterisiert (Spohn & Scarlato, 1999). FlgR stellt weiterhin den `Response Regulator` eines Zwei-Komponenten-Systems dar und wird spezifisch von der Histidinkinase FlgS (HP0244/*AtoS*) phosphoryliert (Beier & Frank, 2000). Die Sensor kinase FlgS kodiert für ein 381 Aminosäuren großes Protein, welches vermutlich rein zytoplasmatisch vorliegt und Ähnlichkeiten zu *E. coli* NtrB aufweist. Da für FlgS, anders als bei vielen anderen Sensor kinasen, keine Transmembrandomäne identifiziert werden konnte, wird spekuliert, dass ein zusätzliches Rezeptorprotein mit Transmembrandomäne mit HP0244 interagieren könnte und so in die Signalweiterleitung involviert ist (Beier & Frank, 2000). Spezifische Signale, die zur Autophosphorylierung der Histidinkinase FlgS führen, sind bislang nicht bekannt. Die für die hier durchgeführten Experimente verwendeten Mutanten in *H. pylori* N6 wurden von F. Ye (*flgR*) und C. Josenhans (*flgS*) hergestellt und charakterisiert, die *flgR*-Microarray-Untersuchungen wurden von F. Ye durchgeführt. Beide Mutanten zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *rpoN*-Mutanten und sind flagellenlos und unbeweglich, wie schon in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Spohn & Scarlato, 1999; Beier & Frank, 2000).

**Tab. 8 Ausgewählte Ergebnisse der Microarray-Experimente zum RpoN-Regulon** (folgende Seite). Die Bezeichnung der einzelnen Gene in *H. pylori* 26695 (TIGR Nr.), Name der Gene und Funktion, sowie die in den Experimenten überprüften Mutanten- und Wildtyp-Stämme sind oberhalb der Tabelle angegeben. Für die aufgelisteten Gene sind jeweils die Signalquotienten mit Standardabweichung ( $\pm$ ) aus *n* Wiederholungen der verschiedenen Experimente mit *rpoN*, *flgR* und HP0244 angegeben. Signalquotienten  $>1,8$  sind orange unterlegt. Es sind  $\sigma^{54}$ -abhängige Gene (HP0115-HP0906), teilweise  $\sigma^{54}$ -abhängige Gene (HP0908-0366), Gene mit postulierten zweiten  $\sigma^{54}$ -Promotor (HP0751-HP1122), bekannte Regulatoren des RpoN-Regulons (HP0703-HP0244) und weitere in einer Mutante signifikant in der Transkriptmenge veränderte Gene (HP1035-HP1028) abgebildet, Erklärungen siehe Text.

## Ergebnisse

TIGR Nr.	Name, Funktion	HpN6 wt / <i>rpoN</i> (n=4)		Hp88-3887 wt / <i>rpoN</i> (n=2)		HpN6 wt / <i>flgR</i> (n=2)		HpN6 wt / <i>flgS</i> (n=4)	
			+		+		+		+
HP0115	Flagellin B ( <i>flaB</i> )	3,4	0,5	2,6	0,0	2,6	0,3	5,6	2,3
HP0114	Hypothetischer ORF	2,9	1,6	2,4	0,4	1,1	0,0	2,2	0,4
HP0295	Flagellenhaken-assoziiertes-Protein HAP3 ( <i>flgL</i> )	2,2	0,8	3,2	0,8	5,8	0,4	72	74
HP0870	Flagellenhaken-Protein ( <i>flgE1</i> )	2,0	0,3	1,7	0,1	1,9	0,0	2,8	0,3
HP0869	Hydrogenase Expressions-/Reifungs-Protein ( <i>hypA</i> )	1,8	0,4	1,6	0,1	1,7	0,0	2,8	0,4
HP1120	Hypothetischer ORF / Operon mit <i>flgK</i>	7,9	0,7	5,2	1,5	3,5	0,3	111	127
HP1119	Flagellenhaken-assoziiertes-Protein HAP1 ( <i>flgK</i> )	1,8	0,0	1,7	0,1	2,1	0,0	8,2	6,1
HP1076	Hypothetischer ORF	5,2	1,2	2,9	1,1	1,9	0,2	12	8,6
HP1154	Hypothetischer ORF / Operon mit <i>murG</i>	2,7	1,0	1,1	0,0	3,0	0,1	4,8	1,8
HP1155	Transferase, Peptidoglykansynthese ( <i>murG</i> )	1,7	0,5	1,7	0,2	3,5	0,2	4,2	1,7
HP1233	Hypothetischer ORF, <i>flgJ</i> -Ortholog	2,0	0,4	2,4	0,5	1,7	0,2	3,9	2,3
HP0906	Hypothetischer ORF	1,4	0,3	2,0	0,2	1,5	0,1	2,3	0,0
HP0908	Flagellenhaken-Protein-Paralog ( <i>flgE2</i> )	1,3	0,2	1,1	0,0	1,0	0,0	1,3	0,0
HP0907	Flagellenhaken-Chaperon ( <i>flgD</i> )	1,1	0,0	1,5	0,3	1,4	0,0	2,2	0,7
HP1559	Flagellenstab-Protein ( <i>flgB</i> )	1,6	0,3	1,7	0,1	2,3	0,1	2,3	0,7
HP1558	Flagellenstab-Protein ( <i>flgC</i> )	1,4	0,3	1,3	0,2	1,7	0,1	1,6	0,4
HP1557	Basalkörper-Protein ( <i>fliE</i> )	1,0	0,1	1,1	0,2	1,5	0,0	1,3	0,3
HP0367	Hypothetischer ORF	1,2	0,4	1,4	0,3	2,7	0,2	3,5	1,4
HP0366	Polysaccharid-Biosynthese-Protein C	1,4	0,4	0,8	0,0	1,1	0,0	3,8	2,1
HP0751	<i>flaG2</i>	0,8	0,2	0,6	0,1	1,6	0,1	0,7	0,1
HP0752	Flagellenkappen-Protein HAP2 ( <i>fliD</i> )	0,8	0,0	0,6	0,0	1,0	0,1	0,8	0,2
HP0753	Filament-Chaperon ( <i>fliS</i> )	0,9	0,2	0,7	0,1	1,2	0,1	0,8	0,1
HP1122	Anti-sigma28-Faktor ( <i>flgM</i> )	0,9	0,1	0,9	0,1	1,3	0,1	0,8	0,1
HP0703	Response Regulator ( <i>flgR</i> )	0,9	0,2	1,1	0,0	1,5	0,1	0,9	0,0
HP0714	RNA Polymerase $\sigma^{54}$ -Faktor ( <i>rpoN</i> )	0,9	0,1	0,8	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
HP0244	FlgR-spezifische Histidinkinase ( <i>flgS</i> )	1,0	0,2	0,9	0,0	1,1	0,0	1,1	0,0
HP1035	<i>flhF</i>	0,9	0,3	1,2	0,1	1,5	0,1	0,8	0,1
HP1034	ATP-Binde-Protein ( <i>ylxH</i> ) / ( <i>flhG</i> )	0,9	0,3	1,0	0,1	2,4	0,1	0,8	0,1
HP1033	Hypothetischer ORF	1,0	0,2	1,0	0,1	1,6	0,1	0,9	0,0
HP1032	Alternativer Sigma-Faktor28 ( <i>fliA</i> )	1,1	0,3	0,9	0,2	1,7	0,0	0,9	0,1
HP1031	Flagellenmotor-Komponente ( <i>fliM</i> )	1,1	0,4	1,0	0,0	1,7	0,0	0,9	0,1
HP1030	( <i>fliY</i> )	0,9	0,3	0,9	0,1	2,0	0,0	0,9	0,3
HP1029	Hypothetischer ORF	1,0	0,3	1,1	0,1	2,3	0,1	1,1	0,2
HP1028	Hypothetischer ORF	0,9	0,1	0,8	0,0	1,9	0,0	1,1	0,2

In der Tab. 8 sind ausgewählte Ergebnisse der Microarray-Analysen der *rpoN*-, *flgR*- und *flgS*-Mutanten einander gegenübergestellt. Die Experimente wurden basierend auf Zellen einer O.D.<sub>600</sub> von 0,7 und zwei biologischen Experimenten für HP0244 durchgeführt und erfolgten mit Zellen einer O.D.<sub>600</sub> von 0,35 und einem biologischen Experiment für FlgR. Die Transkriptionsprofile beider Mutanten wurden mit Hilfe von Analysen mit PCR-Produkt-Microarrays bestimmt und zeigten eine große

Übereinstimmung mit den für *rpoN* erzielten Ergebnissen (vgl. 3.3.2.1). Alle Gene, die in den vorangegangenen Experimenten als RpoN-abhängig bestimmt wurden, zeigten dieselbe Regulation auch in den *flgR*- und *flgS*-Mutanten. Diese Ergebnisse wurden z. T. auch durch RT-PCR Analysen bestätigt (ohne Abbildung; siehe Abb. 29). Als zusätzliche Gene unter der Kontrolle von FlgS und FlgR wurde ein Operon mit den Genen HP0367 und HP0366 ermittelt. Das erste Gen kodiert für ein Protein ohne bekannte Funktion, HP0366 für ein Protein mit Homologien zu dem Sporenhüllen-Polysaccharid-Biosynthese-Protein C aus *Methanococcus jannaschii* (34,9% Identität, 57,1% Ähnlichkeit), das möglicherweise in die Flagellin-Glykosylierung involviert ist (Josenhans *et al.*, 2002b). Eine konservierte  $\sigma^{54}$ -Promotorsequenz konnte vor HP0367, dem ersten Gen des putativen Operons identifiziert werden (siehe Abb. 22). Interessanterweise war in der *flgS*-Mutante die Transkription des  $\sigma^{28}$ -abhängigen *flaA* signifikant hochreguliert (Signalquotient=0,4; siehe Tab. 9). Dies bestätigt Ergebnisse von Spohn und Scarlato, die in einer *flgR*-Mutante eine ca. zweifach höhere *flaA*-Transkription beobachtet hatten und daraus eine Repressorfunktion von FlgR für *flaA* ableiten (Spohn & Scarlato, 1999). Unter den hier gewählten Bedingungen konnte ein Effekt von FlgR auf die *flaA*-Transkription allerdings weder mit den Microarray-Analysen noch mit RT-PCR-Untersuchungen nachgewiesen werden. Eine Rolle der Wachstumsphase ist bei diesen unterschiedlichen Ergebnissen jedoch möglich, da die hier durchgeführten Experimente mit *flgS* (O.D.<sub>600</sub>=0,7) und Experimente mit *flgR*-Mutanten von Spohn und Scarlato (O.D.<sub>600</sub>=1,0) mit Bakterien aus einer späteren Phase des exponentiellen Wachstums durchgeführt wurden als hier für die *flgR*-Mutanten verwendet wurde (O.D.<sub>600</sub>=0,35).

Ein auffälliger Unterschied des hier ermittelten Transkriptom von *flgR*-Mutanten im Vergleich zu dem von *rpoN* und *flgS*, ist die negative Regulation des Operons HP1035-HP1028, welches die Gene für den Sigma-Faktor FliA (HP1032) und FlhF/FlhG (HP1035/HP1034) beinhaltet (siehe Tab. 8). Ein Einfluss auf die von FliA-regulierten späten Flagellengene (siehe 3.3.1) oder die von FlhF kontrollierten Gene (siehe 3.3.3.3) konnte aber in der *flgR*-Mutante nicht beobachtet werden.



### 3.3.3 Untersuchungen zu den frühen Regulatoren FlhA und FlhF

Die Charakterisierung der späten und mittleren Flagellengene durch die Untersuchung der FliA/FlgM-Systems und des RpoN-Regulons lieferte abgegrenzte, von diesen Regulatoren abhängige Gengruppen. Diese setzen sich, bis auf wenige Ausnahmen, aus Flagellensystem-assoziierten Genen zusammen (vgl. 3.3.1 und 3.3.2). Auswirkungen der Transkription der einen auf die andere Gruppe in Form von Rückkopplungs-Regulation fanden unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen nicht statt. In vielen anderen Bakterien mit Flagellensystemen gibt es übergeordnete Regulatoren der koordinierten Expression der Gene des Flagellensystems, die über globale Signale der Zellregulation gesteuert werden, wie z. B. FlhCD in *Salmonella*, CtrA in *C. crescentus* oder FlaK/FlrA und FlaM in *Vibrio spp.* (Chilcott & Hughes, 2000; Jenal, 2000; Prouty *et al.*, 2001; Aldridge & Hughes, 2002). In *H. pylori* gibt es bislang keine Hinweise auf solche übergeordneten Regulatoren (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Um mögliche Querverbindungen des Flagellensystems zu anderen zellulären Funktionen und Regulationsnetzwerken zu untersuchen und mögliche Effekte auf die Transkription anderer Flagellengene zu charakterisieren, wurden nun solche Gene mit der Microarray-Technologie untersucht, die am Beginn der Flagellenbiosynthese stehen. Hierzu wurde zum einen das Gen *flhA* ausgewählt, welches für eine Komponente des Flagellensekretionsapparates kodiert. Für *flhA/flbA*-Mutanten wurde bereits in früheren Arbeiten ein negativer Effekt auf die Transkription der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Flagellengene *flaB* und *flgE1* sowie des  $\sigma^{28}$ -abhängigen Hauptflagellings *flaA* nachgewiesen (Schmitz *et al.*, 1997). Mit der Möglichkeit der globalen Microarray-Untersuchungen wurde die *flhA*-Mutante im Hinblick auf zusätzliche regulierte Gene untersucht.

Ein weiteres Protein, dessen Funktion in der globalen Regulation für *H. pylori* untersucht wurde, ist FlhF. Dieser Faktor gehört zu der Familie der SRP- (Signal Recognition Particle) Proteine, die in den gerichteten Transport von Proteinen zur Zellmembran involviert sind (Keenan *et al.*, 2001). FlhF kommt in den peritrich begeißelten Enterobakterien nicht vor, für *Pseudomonas spp.* wurde ein Zusammenhang des Proteins mit polarer Ausrichtung und Flagellenzahl festgestellt (Dasgupta *et al.*, 2000; Pandza *et al.*, 2000).

### 3.3.3.1 Microarray-Untersuchungen der *flhA*-Mutante

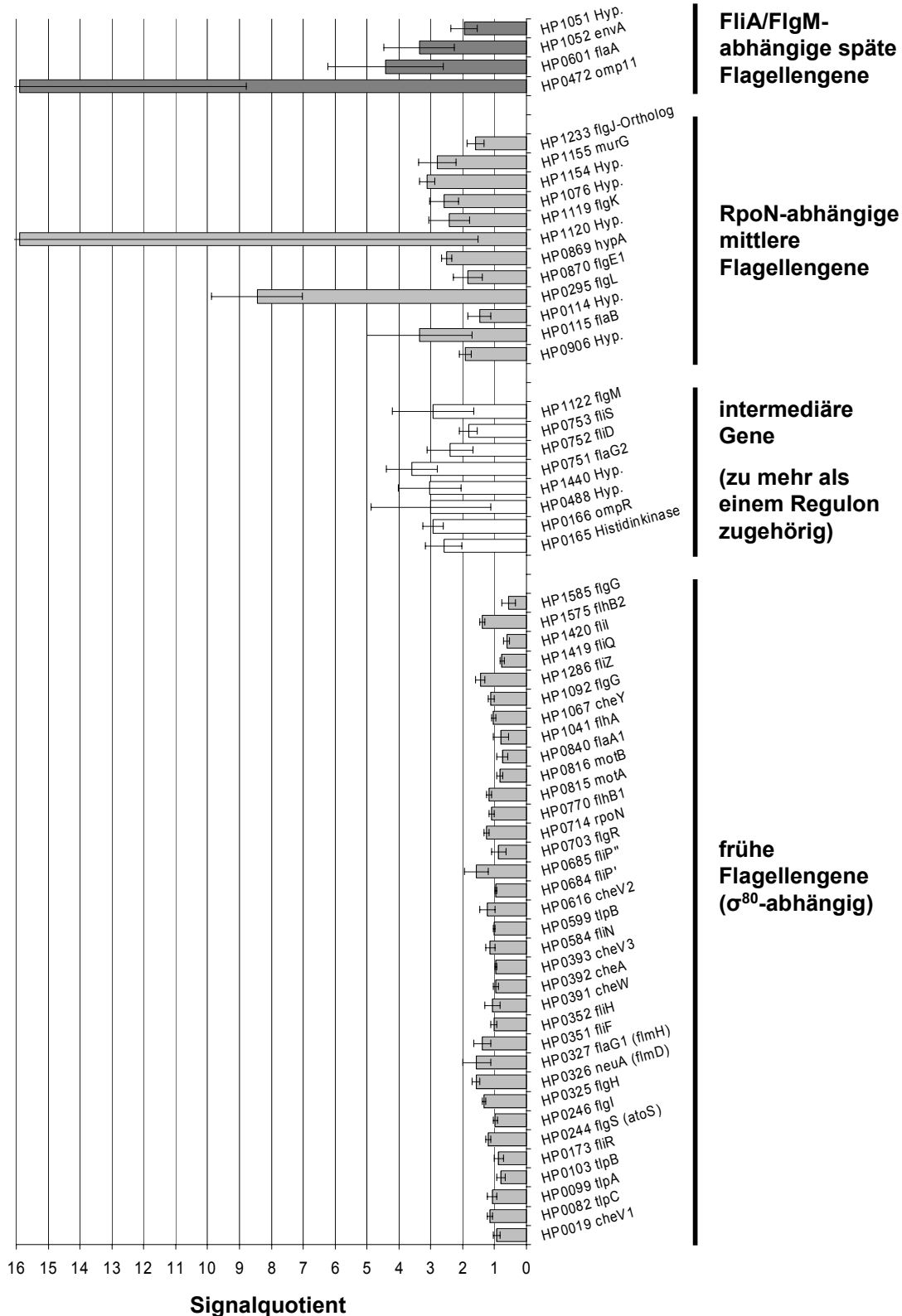
Für die Untersuchungen einer *flhA*-Mutation auf die globale Transkription von *H. pylori* wurde die bereits beschriebene HpN6 *flhA*-Mutante verwendet (Schmitz *et al.*, 1997), sowie eine entsprechende Mutante in *H. pylori* 88-3887 (Niehus *et al.*, 2004). Mit diesen Mutanten wurden ausgehend von Zellen aus Flüssigkultur einer O.D.<sub>600</sub> von 0,7 drei bzw. vier Hybridisierungen aus jeweils zwei biologischen Experimenten durchgeführt. Ausgewählte Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 23 als Diagramm der HpN6 *flhA*-Experimente und in Tab. 9 im Vergleich zu den Experimenten mit den übrigen Mutanten dargestellt. Bezüglich der Auswirkungen der *flhA*-Mutation auf die Expression der mittleren und späten Flagellengene ergab sich für die beiden überprüften Stämme ein übereinstimmendes Ergebnis (vgl. Abb. 23). Die durch die Untersuchung des FliA/FlgM-Systems charakterisierten  $\sigma^{80}$ -abhängigen späten Flagellengene (siehe 3.3.1) waren in den Mutanten sämtlich herunterreguliert. Dasselbe galt für die bei den Untersuchungen zum RpoN-Regulon ermittelten Gene (siehe 3.3.2), wobei die Signalquotienten einiger Gene nicht unter den Grenzwert der Microarray-Analysen von >2 fielen, aber durch die RT-PCR Untersuchungen als mehr als zweifach reguliert nachgewiesen werden konnten (siehe Tab. 9). In Übereinstimmung mit den früheren Beschreibungen der herabgesetzten Transkriptmenge für *flaA*, *flaB* und *flgE1* in der HpN6 *flhA*-Mutante (Schmitz *et al.*, 1997), konnte hier also gezeigt werden, dass eine Mutation in *flhA* die Hemmung der Expression der gesamten Klasse 2- und 3-Gene in *H. pylori* N6 und 88-3887 zur Folge hat. Zusätzlich dazu waren in beiden Mutanten die Gene HP0751-HP0753 (*flaG1*, *fliD*, *fliS*) und HP1122 (*flgM*) herunterreguliert. Für beide Operons konnten konservierte  $\sigma^{28}$ - und  $\sigma^{54}$ -Promotoren identifiziert werden (Josenhans *et al.*, 2002a). Dabei konnte für *flgM* eine immer noch vorhandene Basaltranskription in den *flhA*-Mutanten durch RT-PCR-Untersuchungen nachgewiesen werden (siehe Abb. 25A). Zusätzliche Gene, die in den HpN6 und HP88-3887 *flhA*-Mutanten in ihrer Transkriptmenge stark reprimiert waren, sind die Gene für das Zwei-Komponenten Signal-Transduktionssystem HP0166 (*ompR*)/HP0165, sowie die Gene HP0367, HP0488 und HP1440, alle mit bislang unbekannter Funktion. Die Regulation von HP0166 und HP1440 in den *flhA*-Mutanten wurde per RT-PCR bestätigt (siehe Tab. 9). Ein zum Großteil unterschiedlicher Satz von Zielgenen des Zwei-Komponenten-Systems HP0166/HP0165 in *H. pylori* wurde in zwei Arbeiten beschrieben (Dietz *et*

*al.*, 2002; Forsyth *et al.*, 2002), wobei z. T. eine negative Regulationswirkung durch Phosphorylierung nachgewiesen wurde. Keines dieser Gene wurde unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen als in den *flhA*-Mutanten reguliert ermittelt. Desweiteren gab es keinen Hinweis auf Gene, die in den *flhA*-Mutanten in beiden *H. pylori*-Stämmen signifikant erhöhte Transkriptmengen aufweisen.

Die zusätzlich zu den Klasse 2- und 3-Flagellengenen regulierten Gene in der *flhA*-Mutante, die nicht in eines dieser Regulons eingeordnet werden konnten, da sie durch mehr als einen Promotor kontrolliert werden wurden in eine neue Zwischenklasse der Flagellengene eingeordnet (intermediäre Gene, siehe Abb. 23, Tab. 9).

Neben den oben beschriebenen Genen, die in den *flhA*-Mutanten in beiden untersuchten *H. pylori*-Stämmen übereinstimmend reguliert waren, gab es eine Reihe von Genen, die entweder in der einen oder in der anderen Mutante hoch- oder herabreguliert waren. Diese Gene beinhalten unterschiedliche funktionelle Gruppen wie Gene des Energiestoffwechsels, des Polymertransports oder unbekannter Funktion (siehe 6.2.3). Da für diese Arbeit hauptsächlich die Gene von Interesse waren, die ein konserviertes Transkriptionsprofil über stammspezifische Grenzen hinweg aufweisen, um generelle Mechanismen aufzuklären, wird hier nicht weiter auf diese Gene eingegangen. Eine Ausnahme sind die zwei paralogen Proteine HP0410 und HP0492, die für putative Flagellenhüllen-assoziierte Proteine kodieren und aufgrund ihrer stammspezifisch differenziellen Regulation in den *flhA*-Mutanten mittels RT-PCR näher charakterisiert wurden (siehe Tab. 9 und Abb. 26).

## Ergebnisse



**Abb. 23. Expression ausgewählter Gene des Flagellensystems nach einer *flhA*-Mutation.** Die Gene sind als Säulen gegen den Signalquotienten der Fluoreszenzsignale aus Wildtyp und Mutante aufgetragen. Die Daten errechnen sich aus  $n=4$  Experimenten. Dargestellt sind die in ihrer Transkriptmenge zwischen HpN6 *flhA* und Wildtyp unveränderten  $\sigma^{80}$ -abhängigen Flagellengene sowie mittlere und späte Flagellengene unter der Kontrolle von FlhA. FlhA-abhängige Gene, die keinem der einzelnen Regulons zugeordnet werden können werden als 'intermediäre Gene' bezeichnet.

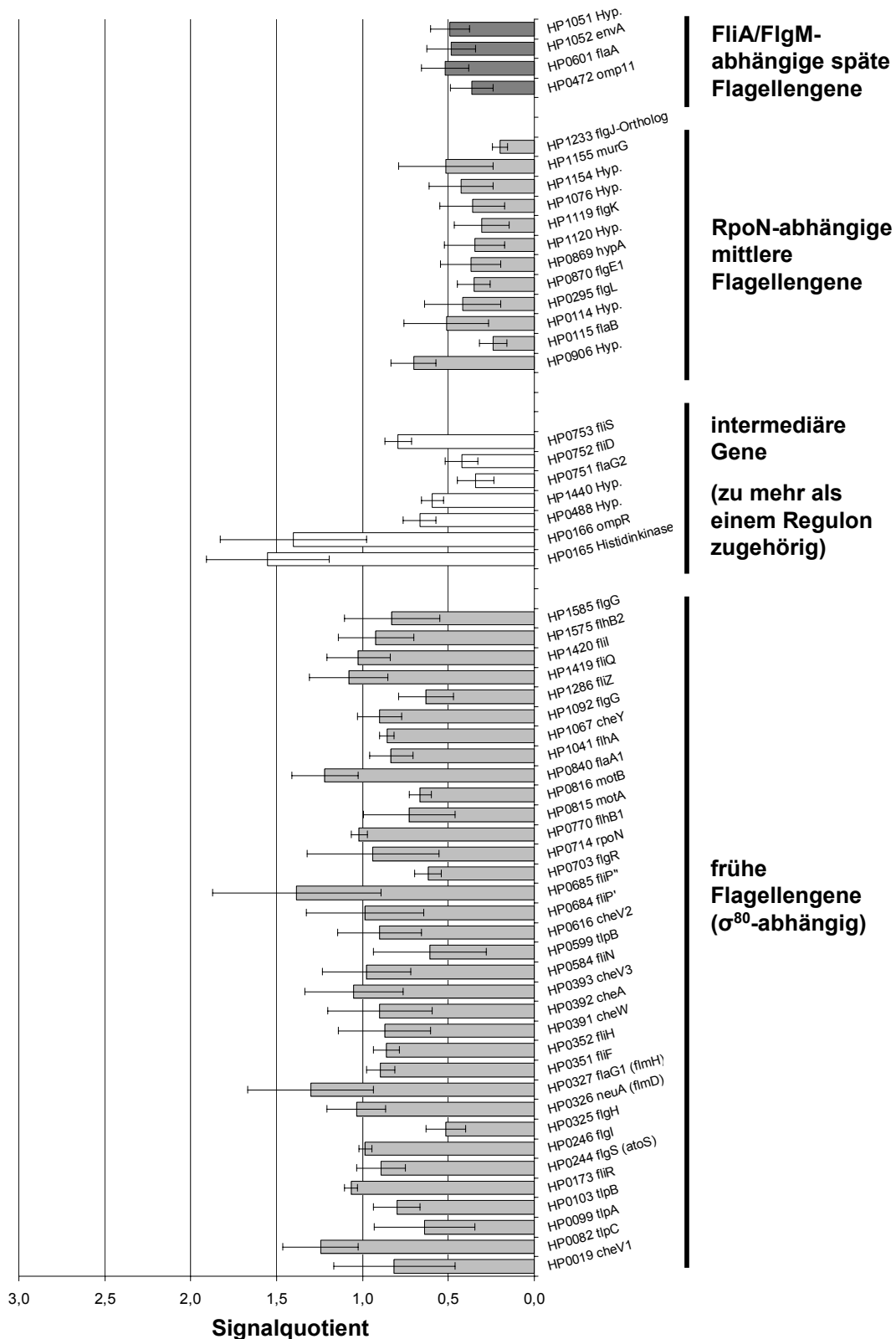
### 3.3.3.2 Microarray-Untersuchungen einer *flhA/flgM*-Mutante

Als nächster Schritt wurde die negative Rückkopplung und ihre Mechanismen näher untersucht, die durch die Inaktivierung von *flhA* auf die Transkription der späten und mittleren Flagellengene und der intermediären Gene bewirkt wurde (siehe 3.3.3.1). Ein mögliches Protein, das eine Rolle in einer solchen `Feedback`-Regulation spielen könnte, ist der FliA-spezifische Anti-Sigma-Faktor FlgM. Trotz Repression der Transkription in der *flhA*-Mutante konnte eine Basaltranskription des Gens HP1122 nachgewiesen werden (siehe Abb. 25A). Die Expression von FlgM in den *flhA*-Mutanten wurde mittlerweile auch durch Western Blot-Analysen nachgewiesen (C. Josenhans, unveröffentlicht). Um den Effekt der zusätzlichen Inaktivierung von *flgM* in einer *flhA*-Mutante zu untersuchen, wurde eine HpN6-Doppelmutante in den beiden Genen hergestellt.

Die Untersuchung der HpN6 *flhA/flgM*-Mutante erfolgte mittels fünf PCR-Produkt-Microarray-Hybridisierungen ausgehend von Zellen der Doppelmutante (O.D.<sub>600</sub>=0,7) aus drei verschiedenen biologischen Experimenten. In Bezug auf die Expression der unterschiedlichen Klassen der Flagellengene bewirkte die zusätzliche Inaktivierung von *flgM* in der *flhA*-Mutante eine Wiederherstellung, bzw. eine Erhöhung der Transkription im Vergleich zum Wildtyp, nicht nur für die  $\sigma^{28}$ -abhängigen Flagellengene, sondern auch für die Gene des RpoN-Regulons (siehe Abb. 24; Tab. 9). Zusätzlich zu den Genen der  $\sigma^{54}$ - und  $\sigma^{28}$ -abhängigen Klassen 2 und 3 sind auch Gene der neu definierten Zwischenklasse in der *flhA/flgM*-Doppelmutante im Vergleich zur *flhA*-Mutante invers reguliert (siehe Tab. 9). Hierzu gehören sowohl die Gene HP0751-53 (*flaG1*, *fliD*, *fliS*) und HP1122 (*flgM*), als auch HP0367/HP0366 und HP1440, deren Transkriptionsänderung zum Großteil auch mit semi-quantitativer RT-PCR bestätigt wurde (siehe Abb. 24, Tab. 9).

Als weitere nicht-Flagellen-assoziierte Gene, die in der Doppelmutante hochreguliert sind, wurde unter anderem ein großer zusammenhängender Genbereich mit ribosomalen Proteinen detektiert. Wenige Gene wurden aufgrund der Microarray-Experimente als dereguliert in der Doppelmutante ermittelt, von denen der Großteil zu den in der HpN6 *flhA*-Mutante stammspezifisch negativ regulierten Genen zählt (vgl. 6.2.2, 6.2.3).

## Ergebnisse



**Abb. 24. Wiederherstellung der Expression der späten und mittleren Flagellengene durch Mutation von *flgM* in einer *flhA*-Mutante.** Die Gene sind als Säulen gegen den Signalquotienten der Fluoreszenzsignale aus Wildtyp und Mutante aufgetragen. Die Daten errechnen sich aus  $n=5$  Experimenten. Die Transkription der  $\sigma^{28}$ -abhängigen,  $\sigma^{54}$ -abhängigen und intermediären Gene ist im Vergleich zu den *flhA*-Einzelmutanten wiederhergestellt bzw. erhöht (vgl. Abb. 23).  $\sigma^{80}$ -abhängige frühe Flagellengene sind weitgehend unverändert in ihrer Transkription.

### 3.3.3.3 Microarray-Untersuchungen der *flhF*- und der *flhF/flgM*-Mutanten

Das zweite als zu den frühen Flagellengenen gehörend klassifizierte Gen, welches in dieser Arbeit mit Hilfe der Transkriptom-Analyse analog zu *flhA* auf globale Regulation untersucht wurde, ist HP1035 (*flhF*). Dieses Gen kodiert für ein Protein der SRP-Familie. Die für *H. pylori* zum ersten Mal beschriebene nicht-polare Inaktivierung von *flhF* (durchgeführt von C. Josenhans), bewirkte einen flagellenlosen Phänotyp, wobei in sehr wenigen Fällen das Auftreten ungewöhnlich kurzer und z. T. lateral lokalisierter Flagellen beobachtet wurde (Niehus *et al.*, 2004). Die Experimente mit den *flhF*-Mutanten in den zwei *H. pylori*-Stämmen N6 und 88-3887 und in der zusätzlich konstruierten nicht-polaren HpN6 *flhF/flgM*-Doppelmutante wurden in analoger Weise wie für *flhA*-Mutanten durchgeführt (vgl. 3.3.3.1 und 3.3.3.2.). Dabei wurden für die Hp88-3887 *flhF*-Mutante zwei Hybridisierungen basierend auf einem biologischen Experiment durchgeführt, für die HpN6 *flhF/flgM*-Doppelmutante drei Microarray-Hybridisierungen mit RNA-Präparationen aus zwei unterschiedlichen biologischen Experimenten. Die Analysen der unterschiedlichen Experimente ergaben für die *flhF*-Mutanten in Bezug auf die Klasse 2- und 3- sowie die in die Zwischenklasse eingeordneten Flagellengene ein fast überlappendes Transkriptionsprofil mit einer signifikanten Erniedrigung der Transkriptmenge für die Gene der Regulons. Für viele dieser Gene in den beiden Mutanten wurde die durch die Microarray-Hybridisierungen ermittelte Regulation durch mehrere RT-PCR-Analysen bestätigt (siehe Tab. 9). Der auffälligste Unterschied in der Zusammensetzung der von FlhF und FlhA abhängigen Flagellengene ist die signifikante Repression des HP1035-HP1028-Genbereichs in den *flhF*-Mutanten im Vergleich zu den *flhA*-Mutanten. Dieses Operon beinhaltet als erstes Gen *flhF* und mit HP1032 (*fliA*) einen Regulator der späten Flagellengene. Um einen polaren Effekt der Insertion einer Antibiotikaresistenz-Genkassette in dem *flhF*-Gen auf die anderen Gene des HP1035 Operons auszuschließen, wurde eine apolare Km<sup>R</sup>-Kassette für die Inaktivierung von *flhF* verwendet (Niehus *et al.*, 2004). Neben der Kontrolle der oben beschriebenen Klassen an Flagellengenen scheint FlhF also positiv in die Regulation des eigenen Operons involviert zu sein. Wie für *flhA* traten auch bei den Experimenten mit *flhF*-Mutanten in *H. pylori* N6 und HP88-3887 eine Reihe von stammspezifisch regulierten Genen auf (siehe 6.2.4).

Um wie für FlhA auch hier eine mögliche Rolle von FlgM bei der Regulation der FlhF-abhängigen Gene zu untersuchen, wurden ebenfalls vergleichende Microarray-Analysen mit Doppelmutanten durchgeführt. Hier konnte im Unterschied zur *flhA/flgM*-Mutante ein Effekt der zusätzlichen Inaktivierung von FlgM in der *flhF* Mutante nur auf die  $\sigma^{28}$ -abhängigen Flagellengene beobachtet werden (siehe Tab. 9). Die Regulation der mittleren,  $\sigma^{54}$ -abhängigen Flagellengene muss im Fall von FlhF also auf einem anderen Mechanismus beruhen als bei FlhA, wo der Anti-Sigma-Faktor FlgM nach den hier erzielten Ergebnissen ebenfalls eine essenzielle Rolle innehat (siehe 3.3.3.2). Eine weiterer Effekt, der in der *flhF/flgM*-Doppelmutante auftrat, ist die Wiederherstellung der Transkription eines Teils des in der *flhF*-Mutante transkriptionell reprimierten HP1035-Operons ab dem Gen HP1032 (*fliA*) (siehe Tab. 9). Dieser Effekt konnte auch durch RT-PCR-Analysen für ausgewählte Gene des Operons bestätigt werden (siehe Abb. 25B). Vier  $\sigma^{80}$ -abhängige Flagellengene (*tlpB*, *flgS*, *flgH*, *cheV2*) wiesen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Mutanten eine erhöhte Transkriptmenge in den *flhF/flgM*-Mutanten auf (vgl. Tab. 9).

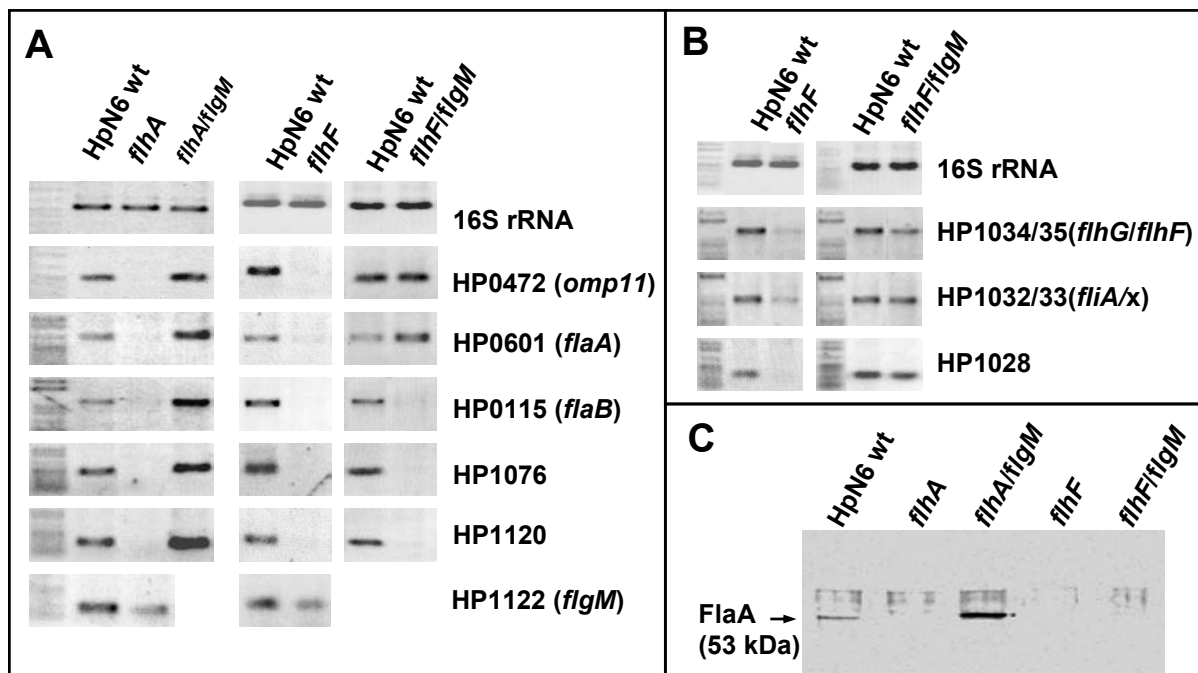
Zusätzlich zu den oben genannten Genen aus Flagellenregulons war eine Reihe von nicht-Flagellen-assoziierten Genen in den *flhF/flgM*-Mutanten hochreguliert. Hierzu zählten wie bei *flhA/flgM* größtenteils ribosomale Gencluster (siehe 6.2.2). Zusätzliche deregulierte Gene in den *flhF/flgM*-Doppelmutanten umfassen u. a. Ureasegene und einzelne Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel, sowie Zielgene des in die Zwischenklasse gruppierten Zwei-Komponenten-Systems HP0165/HP0166 (vgl. Tab. 9, 6.2.2, Dietz *et al.*, 2002; Forsyth *et al.*, 2002).

#### **3.3.3.4 Überprüfung der *flhA*- und *flhF*-Microarray-Ergebnisse**

Die Überprüfung der Charakterisierung der Flagellengenregulation durch die frühen, regulatorisch aktiven Komponenten des *H. pylori*-Flagellensystems, FlhA und FlhF erfolgte mittels RT-PCR-Untersuchungen und Western Blot-Analysen (siehe Abb. 25). Für die hier untersuchten repräsentativen Gene aus den verschiedenen Genklassen konnten mittels RT-PCR die durch die Microarray-Analysen ermittelte Regulation und unterschiedliche Rückkopplungs-Kontrolle bei *flhA*- und *flhF*-Mutanten durch FlgM bestätigt werden (siehe Abb. 25A). Entscheidend ist hierbei auch der Nachweis, dass sowohl in der *flhA*-, wie auch in der *flhF*-Mutante immer noch *flgM*-Transkript gebildet wird, welches zu einem aktiven Repressorprotein

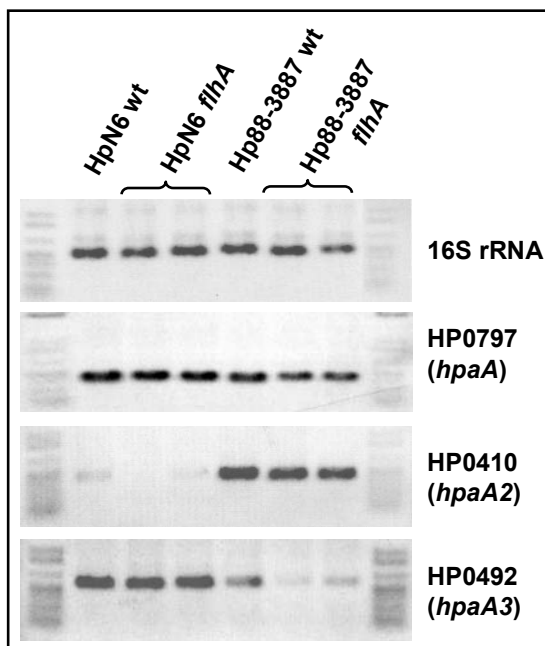


translatiert wird (Nachweis mittels Western Blot von C. Josenhans, unpubliziert). Die RT-PCR-Untersuchungen zur Expression des HP1035 Operons in den *flhF*- und *flhF/flgM*-Doppelmutanten bestätigen die Ergebnisse der Microarray-Analysen (siehe Abb. 25B). Die Transkription aller überprüften Gene des Operons ist in der HpN6 *flhF*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert. Demgegenüber steigt die Transkriptmenge für die im 3'-Bereich des Operons lokalisierten Gene, HP1032 (*fliA*)/HP1033 und HP1028 in der *flhF/flgM*-Doppelmutante nahezu auf Wildtypniveau an. Demgegenüber ist das *flhF/flhG*-Transkript gegenüber der *flhF*-Mutante erhöht, gleichzeitig aber gegenüber der Menge im Wildtyp heruntersgesetzt. Die Western-Blot Analyse für das durch FliA exprimierte Flagellin FlaA zeigt eine höhere Menge an FlaA in der *flhA/flgM*-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp und allen anderen abgebildeten Mutanten, in denen gar kein Flagellin nachgewiesen werden kann (siehe Abb. 25C). In *flhF/flgM* ist im Vergleich dazu *flaA*-Transkript ebenfalls in erhöhtem Maße vorhanden, das Protein kann aber nicht gebildet werden.



**Abb. 25. Charakterisierung der *H. pylori flhA*-, *flhF*-, *flhA/flgM*- und *flhF/flgM*-Mutanten. A)** Ausgewählte semi-quantitative RT-PCRs mit den verschiedenen Mutanten für unterschiedliche Gene. Sowohl  $\sigma^{28}$ -abhängige Gene (*flaA*, *omp11*) als auch  $\sigma^{54}$ -abhängige Gene (*flaB*, HP1076, HP1120) sind in den *flhA*- und *flhF*-Mutanten nicht exprimiert, *flgM*-Transkript ist nicht völlig unterdrückt. Während in den *flhA/flgM*-Doppelmutanten sowohl für  $\sigma^{28}$ - als auch  $\sigma^{54}$ -Gene wieder mRNA nachzuweisen ist, ist in den *flhF/flgM*-Doppelmutanten lediglich die Transkription der  $\sigma^{28}$ -Gene wiederhergestellt. **B)** Semi-quantitative RT-PCRs mit *flhF* und *flhF/flgM* zur Transkription des HP1035 (*flhF*) bis HP1028-Operons. Transkripte der Gene können in der Doppelmutante im Vergleich zur *flhF*-Einzelmutante wieder nachgewiesen werden. **C)** Western Blot-Entwicklung (Gesamtzelllysate der Einzel- und Doppelmutanten) mit  $\alpha$ -FlaA Antiserum. FlaA-Protein kann in der *flhA/flgM*-Doppelmutante im Gegensatz zu den anderen Mutanten nachgewiesen werden.

HpaA gehört zu der Gruppe der *H. pylori*-spezifischen Adhäsine und wird aufgrund der Fähigkeit N-Acetyl-Neuraminyl-( $\alpha$ -2,3)-Lactose zu binden, auch als NLBH (neuraminyl-lactose-binding-hemagglutinin) bezeichnet (Evans & Evans, 2000). Zunächst wurde das Gen HP0797 als *hpaA* beschrieben (Evans *et al.*, 1988), mittlerweile sind die Gene HP0410 und HP0495 als Homologe identifiziert worden. Die Lokalisation von HpaA wurde in unterschiedlichen Arbeiten kontrovers als Flagellen-assoziiert (Jones *et al.*, 1997), zytoplasmatisch (O'Toole *et al.*, 1995), oder als an der gesamten Bakterienoberfläche auftretend charakterisiert (Lundstrom *et al.*, 2001). Die zwei HpaA-Paraloge, HP0410 und HP0495, befanden sich nach den *flhA*-Microarray-Untersuchungen unter den stammspezifisch regulierten Genen (vgl. 3.3.3.1) und wurden daher näher untersucht. Die Abb. 26 zeigt die Bestätigung dieser stammspezifisch differentiellen Regulation der *hpaA*-Expression in unterschiedlichen *flhA*-Mutanten durch semi-quantitative RT-PCR. Während die Transkriptmenge für HP0797 in *H. pylori* N6 und Hp88-3887 ähnlich ist, kann für die beiden Paraloge HP0410 und HP0492 eine stammspezifisch unterschiedliche Transkription nachgewiesen werden. Dabei ist auch die Menge an spezifischem Transkript für die beiden HpaA-Paraloge in den zwei *H. pylori*-Stämmen jeweils sehr verschieden, wobei HP0410 in *H. pylori* 88-3887 stärker transkribiert zu werden scheint und HP0492 in HpN6 eine höhere Transkriptmenge aufweist (siehe Abb. 26).



**Abb. 26. Stammspezifische Transkription von *hpaA*-Paralogen in *H. pylori* N6 und 88-3887.** Dargestellt sind RT-PCRs mit cDNA-Präparationen aus *H. pylori* N6 und 88-3887 Wildtyp und den entsprechenden *flhA*-Mutanten, wie über den Spuren beschriftet. Diese Proben wurden jeweils mit Primern, spezifisch für die rechts angezeigten Gene, amplifiziert. Während HP0797 (*hpaA*) in beiden Stämmen und Mutanten ähnlich stark transkribiert werden, werden HP0410 (*hpaA2*) und HP0492 (*hpaA3*) in den zwei Stämmen FlhA-abhängig differentiell exprimiert.

Um eine mögliche funktionelle Erklärung für die beobachtete stammspezifisch differenziell regulierte Transkription der *hpaA*-Paraloge zu erhalten, wurden die Promotoreregionen vor den Genen HP0410 und HP0492 in einer Reihe unterschiedlicher *H. pylori*-Stämme, inklusive N6 und 26695, sequenziert (C. Josenhans, unveröffentlicht). Obwohl in den untersuchten Sequenzbereichen eine stammspezifische Variation in den Nukleinsäuresequenzen bei den unterschiedlichen Stämmen gezeigt wurde, konnten keine spezifischen  $\sigma^{54}$ - oder  $\sigma^{28}$ -Promotoren ermittelt werden, die die *flhA*-abhängige Regulation erklären könnten.

### **3.3.4 Zusammenfassung der Microarray-Analysen für alle Regulatoren des Flagellensystems**

In der Tab. 9 sind ausgewählte Ergebnisse der hier durchgeführten Microarray-Untersuchungen zu den Genen des antagonistischen FliA/FlgM-Systems, des RpoN-Regulons und zu den von den frühen Flagellenproteinen FlhA und FlhF kontrollierten Genen zusammengefasst. Die Gene des *H. pylori*-Flagellenapparats sind je nach ihrer Abhängigkeit von den unterschiedlichen Regulatoren in verschiedene Klassen eingeteilt. Unter der Klasse 1 werden die Gene zusammengefasst, die bereits als Angehörige von  $\sigma^{80}$ -abhängigen Operons vorgeschlagen wurden (Spohn & Scarlato, 2001) und die bei den hier durchgeführten Microarray-Hybridisierungen in ihrer Transkription durch die Inaktivierung der verschiedenen Regulatoren nicht signifikant verändert wurden. Die Klasse 2 setzt sich aus Genen zusammen, die eindeutig dem RpoN-Regulon zugeordnet werden konnten (siehe 3.3.2). Die Klasse 3 setzt sich aus ausschließlich  $\sigma^{28}$ -abhängigen Genen zusammen (vgl. 3.3.1). Unter der Zwischenklasse der Flagellengene ('intermediäre Gene') wurden alle Gene zusammengefasst, die nicht konsistent einem einzelnen Regulon zugeordnet werden konnten und wahrscheinlich von mindestens zwei unterschiedlichen Promotoren kontrolliert werden. Außerdem sind die in der *flhA*-Mutante stammspezifisch regulierten Gene für die unterschiedlichen HpaA-Paralogen mit den Signalquotienten für die unterschiedlichen Mutanten angegeben.

# Ergebnisse

TIGR Nr.	Gen Name	HpN6 wt / flIA (n=4)	HpN6 wt / flgM (n=4)	HpN6 wt / rpoN (n=4)	Hp88-3887 wt / rpoN (n=3)	HpN6 wt / flgR (n=2)	HpN6 wt / HP244 (n=4)	HpN6 wt / flhA (n=4)	Hp88-3887 wt / flhA (n=3)	HpN6 wt / flhF (n=4)	Hp88-3887 wt / flhF (n=2)	HpN6 wt / flhA/flgM (n=5)	HpN6 wt / flhR/flgM (n=3)
Klasse 3	HP0472 <i>omp11</i>	3,7	0,3	0,9	0,9	1,2	0,7	1,6	7,9	12	21	0,4	1,0
	HP0601 <i>flaA</i>	3,0	0,4	0,9	0,7	1,1	0,4	4,4	2,2	4,3	14	0,5	0,6
	HP1052 <i>envA</i>	2,7	0,3	0,9	0,8	1,2	0,8	3,4	2,2	2,0	2,0	0,5	0,7
	HP1051 <i>Hyp.</i>	2,2	0,5	0,9	0,6	1,4	0,8	2,0	2,6	1,9	2,2	0,5	0,8
Intermediäre Klasse/ Zwischenklasse	HP0751 <i>flaG2</i>	1,2	0,8	0,9	0,6	1,6	0,7	3,6	3,9	2,7	2,9	0,4	0,4
	HP0752 <i>fliD</i>	1,5	0,8	0,9	0,6	1,0	0,8	2,4	1,2	1,6	1,9	0,4	0,4
	HP0753 <i>fliS</i>	1,4	0,9	0,9	0,7	1,2	0,8	3,3	2,3	4,2	1,2	0,8	0,9
	HP0754 <i>fliT</i>	1,2	0,5	1,1	0,8	1,2	0,9	1,3	1,1	1,1	1,0	0,8	0,9
	HP1122 <i>flgM</i>	1,8	N.D.	0,9	0,9	1,3	0,8	2,9	2,3	1,8	3,4	N.D.	N.D.
	HP1035 <i>flhF</i>	1,6	0,3	0,9	1,2	1,5	0,8	1,4	1,6	1,7	2,6	1,4	2,0
	HP1034 <i>ylxH (flhG)</i>	1,1	0,2	1,0	1,0	2,4	0,8	1,2	1,7	6,0	15	1,0	2,2
	HP1033 <i>Hyp.</i>	1,0	0,2	1,0	1,0	1,6	0,9	1,2	1,4	1,6	1,4	1,0	2,1
	HP1032 <i>fliA</i>	1,6	0,6	1,1	0,9	1,7	0,9	1,2	1,5	1,9	2,0	0,9	1,5
	HP1031 <i>fliM</i>	1,6	0,5	1,1	1,0	1,7	0,9	1,2	1,4	2,9	2,1	1,0	1,3
	HP1030 <i>fliY</i>	1,0	0,2	1,0	0,9	2,0	0,9	1,3	1,5	2,8	4,2	2,4	1,8
	HP1029 <i>Hyp.</i>	1,2	0,2	1,0	1,1	2,3	0,9	1,4	2,2	2,6	7,5	2,0	1,4
	HP1028 <i>Hyp.</i>	1,0	0,1	0,9	0,8	1,9	0,1	1,5	1,9	2,5	4,7	0,5	1,8
	HP1559 <i>flgB</i>	1,0	0,2	1,6	1,7	2,3	0,7	1,4	0,6	1,6	1,3	0,6	3,9
	HP1558 <i>flgC</i>	0,8	0,2	1,4	1,3	1,7	1,6	1,1	0,7	1,3	1,2	0,6	1,9
	HP1557 <i>fliE</i>	1,0	0,1	0,9	1,1	1,5	1,3	1,1	0,3	0,8	0,9	1,1	2,2
	HP0166 <i>ompR</i>	1,3	0,3	0,9	1,0	1,0	0,0	2,9	1,5	1,6	1,1	1,4	1,9
	HP0165 <i>Histidinkinase</i>	1,4	0,3	0,8	1,3	1,1	0,0	2,6	2,1	1,3	1,2	1,6	1,8
	HP0367 <i>Hyp.</i>	0,8	0,2	1,2	1,4	2,7	3,5	1,5	2,1	2,0	3,3	0,7	4,0
	HP0366 <i>Hyp.</i>	0,8	0,1	0,9	1,5	1,1	0,1	1,5	1,2	1,4	1,4	0,0	0,5
HP0488 <i>Hyp.</i>	1,1	0,1	1,0	1,0	1,1	0,1	3,0	1,8	4,0	3,9	0,5	0,7	
HP1440 <i>Hyp.</i>	1,3	0,1	0,9	0,7	1,9	0,1	3,0	1,0	1,1	2,8	5,6	0,6	
HP0908 <i>flgE2</i>	0,8	0,2	1,4	1,1	1,0	0,1	1,1	0,9	1,0	1,0	0,9	1,3	
HP0907 <i>flgD</i>	0,9	0,1	1,2	1,5	1,4	0,1	1,1	0,7	0,7	1,0	1,0	1,6	
Klasse 2	HP0906 <i>Hyp.</i>	1,1	0,1	1,5	2,0	1,5	2,3	1,9	1,2	1,3	1,3	0,7	N.D.
	HP0115 <i>flaB</i>	0,9	0,1	3,4	5,5	2,6	5,6	3,4	2,5	2,8	2,4	0,2	9,4
	HP0114 <i>Hyp.</i>	0,9	0,1	2,9	1,4	2,4	2,2	1,5	1,4	1,4	1,4	0,6	2,9
	HP0295 <i>flgL</i>	1,0	0,1	2,2	3,2	5,8	7,2	8,4	5,0	5,6	6,3	1,6	10,4
	HP0870 <i>flgE1</i>	1,1	0,2	2,1	1,7	1,9	2,8	1,8	1,5	2,3	2,2	0,2	4,5
	HP0869 <i>hypA</i>	1,2	0,2	2,0	3,6	1,7	2,8	2,5	1,7	1,4	1,8	0,3	5,0
	HP1120 <i>Hyp.</i>	1,0	0,4	8,7	3,3	5,2	1,5	16	2,1	8,0	2,0	0,0	3,5
	HP1119 <i>flgK</i>	1,1	0,1	1,9	1,4	2,1	2,1	8,2	2,4	2,2	1,8	0,2	1,7
	HP1076 <i>Hyp.</i>	1,0	0,2	5,6	1,4	2,9	1,1	12	8,6	1,6	2,0	0,8	10,6
	HP1154 <i>Hyp.</i>	1,0	0,2	2,7	0,8	1,1	0,0	3,1	0,2	1,3	3,0	0,3	5,4
	HP1155 <i>murG</i>	1,3	0,2	1,7	0,4	1,7	0,2	4,2	1,7	2,8	2,0	0,5	6,5
	HP1233 <i>flgJ-Paralog</i>	1,3	0,6	2,2	0,7	2,4	0,5	3,9	2,3	1,6	1,4	0,3	4,1
putative Klasse 1-Flagellengene	HP0019 <i>cheV1</i>	1,0	0,1	1,2	1,6	0,9	1,2	0,9	1,2	0,6	1,2	0,9	0,7
	HP0082 <i>tlpC</i>	0,8	0,1	1,0	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0	0,9	0,9	0,0	1,2
	HP0099 <i>tlpA</i>	0,9	0,0	1,1	0,8	0,9	0,0	1,1	1,1	1,7	0,9	0,3	1,1
	HP0103 <i>tlpB</i>	1,0	0,2	1,2	0,9	1,0	0,2	0,8	0,8	1,1	1,0	0,2	0,4
	HP0173 <i>fliR</i>	1,1	0,2	1,0	0,9	0,9	0,1	1,0	0,9	0,8	0,9	0,1	1,1
	HP0244 <i>flgS (atoS)</i>	1,2	0,1	1,0	1,0	1,1	0,0	1,2	1,0	1,0	1,1	0,1	0,5
	HP0246 <i>flgI</i>	1,0	0,1	1,1	1,2	1,1	0,0	1,0	1,0	1,0	1,2	0,2	1,1
	HP0325 <i>flgH</i>	0,8	0,1	1,0	1,1	1,1	0,2	1,3	1,0	0,9	1,3	0,2	0,4
	HP0326 <i>neuA (flmD)</i>	1,1	0,1	1,1	1,0	1,1	0,1	1,6	0,8	1,3	1,3	0,0	1,3
	HP0327 <i>flaG1 (flmH)</i>	1,7	0,7	1,2	1,1	1,5	0,1	1,6	0,4	0,9	1,5	0,1	1,3
	HP0351 <i>fliF</i>	1,2	0,1	1,3	1,3	0,8	0,0	1,4	0,3	0,8	1,0	0,2	0,9
	HP0352 <i>fliH</i>	1,2	0,1	1,0	1,0	1,2	0,1	1,0	0,2	1,0	1,2	0,2	0,9
	HP0391 <i>cheW</i>	0,9	0,1	1,3	0,8	1,0	0,1	1,2	0,1	1,4	0,7	0,2	1,2
	HP0392 <i>cheA</i>	0,9	0,0	1,1	1,1	0,9	0,1	1,0	0,2	1,0	1,2	0,1	1,1
	HP0393 <i>cheV3</i>	0,9	0,2	1,0	1,0	1,1	0,1	1,0	0,0	1,2	0,2	0,8	1,6
	HP0584 <i>fliN</i>	0,9	0,4	0,7	0,9	1,0	0,1	1,1	0,1	1,1	1,2	0,3	0,9
	HP0599 <i>tlpB</i>	0,9	0,1	N.D.	N.D.	0,9	0,1	1,4	0,0	1,6	0,3	0,8	0,9
	HP0616 <i>cheV2</i>	1,0	0,1	1,1	0,9	1,2	0,1	1,2	0,2	0,9	1,2	0,2	0,5
	HP0684 <i>fliP'</i>	N.D.	N.D.	1,2	1,0	1,0	0,1	1,2	0,0	1,0	0,7	0,1	1,1
	HP0685 <i>fliP''</i>	0,9	0,1	1,1	0,9	1,3	0,2	1,6	0,4	1,5	1,4	0,3	1,4
	HP0703 <i>flgR</i>	0,8	0,1	0,9	1,1	1,5	0,2	0,9	0,2	1,4	1,0	0,3	0,6
	HP0714 <i>rpoN</i>	1,0	0,2	1,0	0,8	1,0	0,1	1,3	0,1	1,1	0,8	0,1	0,9
	HP0770 <i>flhB1</i>	1,0	0,2	1,0	0,9	1,1	0,1	1,1	0,1	1,1	0,9	0,0	1,0
	HP0815 <i>motA</i>	1,1	0,2	1,0	0,7	1,2	0,1	1,2	0,1	1,4	1,5	0,3	1,4
	HP0816 <i>motB</i>	1,0	0,5	0,8	0,8	1,1	0,1	0,8	0,1	N.D.	1,4	0,4	1,3
	HP0840 <i>flaA1</i>	1,2	0,2	1,0	0,9	0,9	0,1	0,8	0,2	0,8	1,4	0,5	1,2
	HP1041 <i>flhA</i>	0,9	0,1	1,4	0,8	1,1	0,1	1,0	0,3	0,8	1,2	0,5	0,8
	HP1067 <i>cheY</i>	0,9	0,1	1,0	0,9	0,9	0,1	1,0	0,1	1,0	0,4	0,9	0,9
	HP1092 <i>flgG</i>	0,9	0,0	1,1	0,8	1,1	0,1	1,0	0,2	1,2	1,2	0,2	0,9
	HP1286 <i>fliZ</i>	1,0	0,1	0,9	1,1	1,0	0,1	1,2	0,2	1,4	1,5	0,3	1,5
HP1419 <i>fliQ</i>	1,0	0,1	0,9	1,0	1,1	0,0	1,0	0,2	0,8	0,9	0,1	1,3	
HP1420 <i>fliI</i>	1,1	0,2	0,9	1,0	1,1	0,1	0,8	0,1	0,9	1,5	0,2	1,1	
HP1462 <i>Hyp.</i>	0,9	0,1	1,0	1,1	1,0	0,0	1,0	0,1	1,0	1,0	0,0	1,0	
HP1575 <i>flhB2</i>	0,9	0,1	1,0	0,9	1,5	0,2	1,4	0,1	0,9	1,6	0,4	1,0	
HP1585 <i>flgG</i>	0,9	0,2	1,1	0,9	1,0	0,1	0,6	0,2	0,8	0,8	0,2	0,9	
HP0410 <i>hpaA2</i>	0,9	0,1	0,7	0,9	1,0	0,1	1,0	0,2	2,1	1,0	0,0	1,6	
HP0492 <i>hpaA3</i>	0,8	0,2	1,0	1,6	0,9	0,2	1,2	0,3	1,4	3,2	0,3	1,3	
HP0797 <i>hpaA</i>	0,9	0,1	1,0	0,9	0,8	0,1	1,3	0,3	1,5	0,5	0,2	1,3	

**Tab. 9 Ausgewählte Ergebnisse der DNA-Microarray-Hybridisierungen und RT-PCR mit unterschiedlichen *H. pylori*-Stämmen und Mutanten in verschiedenen Regulatoren des Flagellensystems.** Experimente mit *n* Wiederholungen und Standardabweichung ( $\pm$ ) sind oberhalb der Tabelle angegeben. Experimente mit den *fliA*- und *flgM*-Mutanten wurden mit Oligonukleotid-Microarrays durchgeführt, alle anderen mit PCR-Produkt-Microarrays. Die Bezeichnung für die Lokalisation der einzelnen Gene in *H. pylori* 26695 (TIGR Nr.) und der Gename sind oberhalb der Tabelle angegeben. Auf der linken Seite ist durch farbliche Unterscheidung die Unterteilung der Gene in die regulatorischen Gengruppen 1, 2 und 3 sowie einer Zwischengruppe mit der Kontrolle der Gene durch mehrere Sigma-Faktoren, dargestellt. Durch Umrahmung sind die Werte in einzelnen Klassen mit den dazugehörigen Experimenten hervorgehoben. Die Hoch- oder Herunterregulation von einzelnen Genen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp ist durch rote bzw. grüne Unterlegung der Felder hervorgehoben.

N.D., kein Wert vorhanden; \* Ergebnis der Regulation (Microarray) im Vergleich zum Wildtyp durch RT-PCR bestätigt; ° Ergebnis: keine Regulation (Microarray) durch RT-PCR bestätigt

### **3.4 Konstruktion und Charakterisierung isogener Mutanten in unterschiedlichen Genen des *H. pylori*-Flagellensystems**

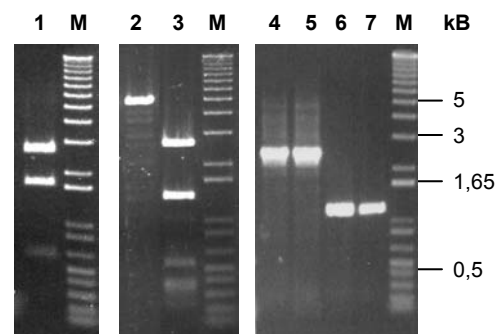
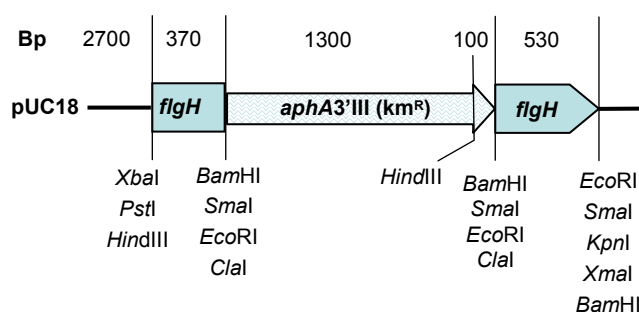
Um die Funktion von weiteren putativen Genen des Flagellensystems näher zu untersuchen, wurden isogene Mutanten durch Insertion von Antibiotika-Markern in einzelnen Gene hergestellt und die Auswirkungen auf den Flagellenphänotyp und Expression anderer Gene untersucht. Aufgrund des gut untersuchten Flagellensystems der Enterobakterien (Macnab, 1996; Aizawa, 2000), konnten für *H. pylori* aufgrund signifikanter Aminosäurehomologien bereits eine große Zahl an Genprodukten strukturellen oder funktionellen Untereinheiten der Flagellen zugeordnet werden (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Josenhans & Suerbaum, 2001; Spohn & Scarlato, 2001). Durch Experimente bestätigt ist die Zugehörigkeit zum Flagellensystem nur für einen kleinen Teil dieser Gene. In dieser Arbeit wurden sowohl einige der bislang nicht charakterisierten, jedoch aufgrund von Sequenzhomologien als Flagellensystem-assoziiert annotierten Gene untersucht, sowie auch Gene, die durch die hier durchgeführten Transkriptom-Analysen als Angehörige der verschiedenen Flagellenregulons ermittelt wurden (vgl. 3.3). Aus allen bekannten Synthesestadien der Flagellen wurde, soweit nicht schon vorhanden, mindestens eine Mutante für die Ergänzung einer flagellenspezifischen Mutantenbank von *H. pylori* hergestellt.

#### **3.4.1 Basalkörper L-Ring Protein FlgH**

Das Gen *flgH* kodiert in *Salmonella* für die Proteinuntereinheit, die als Multimer zusammen mit dem P-Ring für die Verankerung der Flagelle in der äußeren Membran verantwortlich ist (Macnab, 1996). Dabei sind FlgH zusammen mit FlgI (P-

Ring-Untereinheit) die einzigen außerhalb der Zellmembran lokalisierten Flagellenstrukturproteine, die durch den Sec-abhängigen Proteintransport mittels Signalpeptid und nicht über den Typ III-Flagellensekretionsapparat exportiert werden. Für *Salmonella* wurde weiterhin gezeigt, dass FlgH über eine spezielle Aminosäuresequenz, die Lipobox, zu einem Lipoprotein prozessiert wird und erst dann voll funktionsfähig ist (Schoenhals & Macnab, 1996; Dailey & Macnab, 2002). Eine solche Lipobox (Sequenz: L-X-G/A- ↓C) konnte in der Sequenz von HP0325 (*H. pylori* FlgH) nicht identifiziert werden. FlgH wurde für eine Mutagenese ausgewählt, da es zu einer Klasse von Genen gehört, die funktionell an der Basalkörperbildung beteiligt sind. Zur Herstellung einer Insertionsmutante von *flgH* wurde zunächst mit den Primern HPflgH1 und -2 aus chromosomaler *H. pylori* 26695-DNA ein 1,3 Kb PCR-Fragment amplifiziert und nach *Bgl*II-Verdau das entstandene 1,1 kB-Fragment in einen mit *Bam*HI-geschnittenen pUC18-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid (pSUS1605) wurde nach einer inversen PCR mit den Oligonukleotiden HPflgH3 und -4 mit dem Enzym *Bam*HI verdaut, dephosphoryliert und mit der *Bam*HI-geschnittenen *aphA*-3'-III-Kassette (Km<sup>R</sup>) ligiert, was in dem Plasmid pSUS1611 resultierte (siehe Abb. 27). Hierdurch wurde eine 154 Bp-Deletion in *flgH* erzeugt, in die die Kanamycin-Resistenzkassette inseriert wurde. Durch eine Sequenzierung des Plasmids mit den pUC18-spezifischen Primern M13fw und -rev wurde die korrekte Insertion der Kanamycin-Kassette bestätigt.

pSUS1611 (5 kB)



**Abb. 27. Schematische Darstellung des Plasmids pSUS1611.** Das Plasmid wurde in *H. pylori* N6 transformiert, wo der entsprechende Bereich durch homologe Rekombination mit dem *flgH*-Gen (HP0325) in das Genom integriert wurde. Rechts dargestellt einige Restriktionen zur Überprüfung des Plasmids (Spur 1-3) und PCRs zur Überprüfung der *H. pylori* N6 *flgH*-Mutanten (BAC15, Spur 4-7) mit den Primern HPflgH1 + 2.

Spur M: 1Kb DNA ladder (NEB)

Spur 1: *Hind*III / *Kpn*I

Spur 2: *Kpn*I

Spur 3: *Eco*RI / *Xba*I

Spur 4: BAC15.1

Spur 5: BAC15.2

Spur 6: HpN6

Spur 7: Hp88-3887

Das Plasmid wurde in *H. pylori* N6 transformiert und die *flgH*-Insertionsmutanten (BAC15) auf Blutplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin selektiert. Die Überprüfung der einzelnen Klone erfolgte durch eine PCR mit den Primern HPflgH1 und -2 (siehe Abb. 27). Die lichtmikroskopische Analyse der Mutanten zeigte im Gegensatz zu den motilen *H. pylori*-Wildtyp-Zellen keinerlei Beweglichkeit. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, bei denen für die *flgH*-Insertionsmutanten ein flagellenloser Phänotyp nachgewiesen wurde.

### 3.4.2 RpoN-abhängige Gene HP1076 und HP1233 (*flgJ*-Homolog)

Die Gene HP1076 und HP1233 wurden durch die Microarray-Experimente als zum RpoN-Regulon gehörig charakterisiert (vgl. 3.3.2). Ein theoretischer Bezug zum *H. pylori*-Flagellensystem konnte anschließend für beide Gene hergestellt werden. HP1076 zeigt starke Proteininteraktionen von mit dem Flagellen-assoziierten Chaperon FliS (PBS=A 1e-50; Hybrigenics PimRider™). HP1233 weist Aminosäureähnlichkeiten (22% Ähnlichkeit, 10% Identität) zu der in *Salmonella* für die Flagellenbiosynthese essenziellen Muraminidase FlgJ auf (vgl. 3.3.2.1; Nambu *et al.*, 1999). Ein FlgJ-Homolog konnte für *H. pylori* bis dahin noch nicht identifiziert werden. Um die phänotypischen Auswirkungen einer Inaktivierung dieser Gene in *H. pylori* zu untersuchen, wurden jeweils Insertionsmutanten hergestellt und charakterisiert. Hierzu wurde für beide Gene dieselbe Klonierungsstrategie wie für die Inaktivierung von *flgH* angewandt (siehe 3.4.1).

Für HP1076 wurde zunächst ein 430 Bp-Fragment aus *H. pylori* 26695-DNA mit den Primern HP1076-1-BgIII und HP1076-2-BgIII amplifiziert, aufgereinigt und *BgIII*-behandelt und in einen *BamHI*-geschnittenen pUC18-Vektor ligiert. Bei der anschließenden inversen PCR mit HP1076-3-BamHI und HP1076-4-BamHI wurde ein 217 Bp-Fragment aus dem Gen deletiert und eine *BamHI*-geschnittene Kanamycin-Resistenzkassette (*aphA3'*-III) inseriert. Das entstandene Plasmid pSUS1627 wurde durch Restriktionen mit den Endonukleasen *EcoRI* (Linearisierung: ca. 4,35 kB-Fragment) und *BamHI* (1,4 kB- und 2,95 kB-Fragmente), sowie eine PCR und anschließende Sequenzierung mit den pUC18-spezifischen Primern M13fw und M13rev überprüft (ohne Abbildung). Anschließend wurden durch natürliche Transformation und homologe Rekombination mit pSUS1627 die HP1076-Gene der *H. pylori*-Stämme N6 und 88-3887 inaktiviert. Die erfolgreiche Rekombination mit

dem Plasmid wurde mit Präparationen genomischer DNA aus den Mutanten durch PCR mit den Oligonukleotiden HP1076-1-BglII und HP1076-1-BglII und anschließende Sequenzierung mit denselben Primern bestätigt.

Für die Klonierung von HP1233 erfolge die initiale PCR mit den Primern HP1233-1-BglII und HP1233-2-BglII und *H. pylori* 26695-DNA und lieferte das zu erwartende 970 Bp große Fragment, welches in den *Bam*HI-linearisierten pUC18-Vektor ligiert wurde. Die inverse PCR zur Deletion eines ca. 200 Bp-Fragments und zur *Bam*HI-vermittelten Insertion der Kanamycin-Kassette erfolgte mit den Primern HP1233-3-BamHI und HP1233-4-BamHI. Das entstandene Plasmid pSUS1631 wurde durch Restriktionen mit den Endonukleasen *Bam*HI (1,4 kB- und 3,45 kB-Fragment) und *Hind*III (1,65 kB- und 3,2 kB-Fragmente), sowie eine PCR und anschließende Sequenzierung mit den pUC18-spezifischen Primern M13fw und -rev überprüft (ohne Abbildung). Anschließend wurden durch natürliche Transformation und homologe Rekombination mit dem entsprechenden Bereich von pSUS1627 die HP1233-Gene der *H. pylori*-Stämme N6 und 88-3887 inaktiviert. Die erfolgreiche Rekombination mit dem Plasmid wurde mit Präparationen genomischer DNA aus den Mutanten durch PCR und anschließende Sequenzierung mit den Oligonukleotiden HP1233-1-BglII und HP1233-2-BglII bestätigt.

Durch lichtmikroskopische Studien zur Beweglichkeit der Mutanten im Vergleich zu den *H. pylori*-Wildtypen konnte keine eindeutige Verminderung der Motilität durch die Inaktivierung von HP1076 oder HP1233 beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden auch durch Untersuchungen der Mutanten in Agar-Motilitätsassays bestätigt, bei denen die Schwärmhöfe von Mutanten und Wildtypen keine signifikanten Unterschiede in der Größe zeigten. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der HP1076-Mutanten zeigten in Übereinstimmung mit den Beweglichkeitstests keine auffälligen Veränderungen in Anzahl oder Lokalisation der Flagellen verglichen mit den Wildtypen. Es wurde aber eine erhöhte Anzahl von Flagellen ohne Hülle und frei vorliegende Flagellenhüllen beobachtet, als dies bei Bakterien ohne Mutation der Fall war (ohne Abbildung). Dieselbe Beobachtung konnte auch für die HP1233-Mutanten gemacht werden. Hier zeigte sich zusätzlich eine geringe Zahl an Bakterien mit polaren Ausstülpungen der Zellmembran anstelle von intakten Flagellen.

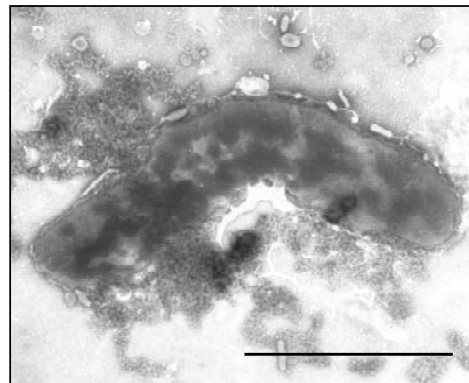


### 3.4.3 Hakenprotein-Homolog FlgE2

Der Flagellenhaken ist die Struktur, die den Basalkörper über die HAP-Proteine (hook adaptor proteins) mit dem Flagellenfilament verbindet (Homma *et al.*, 1984b; Macnab, 2003). Der Haken besteht aus einem Homopolymer der Untereinheit FlgE, die bei den meisten Spezies eine Länge von ca. 400 Aminosäuren hat und bei *H. pylori* mit 718 Aminosäuren im Vergleich fast doppelt so groß ist (Aizawa, 2000). Auch die komplette Hakenstruktur (FlgE-Polymer) selbst ist mit ca. 70 nm Länge etwas größer als die von Enterobakterien mit 55 nm (O'Toole *et al.*, 1994b; Macnab, 1996; Makishima *et al.*, 2001). Ein Paradigma der Regulation des Flagellenaufbaus bei Enterobakterien und anderen Spezies ist der Rückkopplungspunkt für die Expression der späten Flagellengene durch die Fertigstellung des Basalkörper/Haken-Komplexes und dem folgenden Export des Anti- $\sigma^{28}$ -Faktors FlgM (Macnab, 1996; Aizawa, 2000; Chilcott & Hughes, 2000). Für *H. pylori* wurden Flagellenhaken isoliert, die aus ca. 78 kDa großen FlgE1-Proteinuntereinheiten aufgebaut waren (O'Toole *et al.*, 1994b). Mutanten in *flgE1* sind unbeweglich und flagellenlos, exprimieren aber das späte Flagellin FlaA in gleicher Menge wie der Wildtyp (O'Toole *et al.*, 1994b).

**Abb. 28. Phänotypische Charakterisierung der *flgE2*-Mutante.** TEM-Aufnahme einer *H. pylori* N6-*flgE2*-Mutante. Das Bakterium weist einen flagellenlosen Phänotyp auf.

Der Balken repräsentiert 0,5  $\mu\text{m}$ .  
TEM-Aufnahme von C. Josenhans.



Eine weitere Besonderheit von *H. pylori* wie auch anderer  $\epsilon$ -Proteobakterien, wie z. B. *C. jejuni*, *W. succinogenes* oder *H. hepaticus*, ist die Existenz eines zweiten Hakengen-Paralogs, *flgE2*, dessen Funktion bislang nicht untersucht wurde (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Parkhill *et al.*, 2000; Baar *et al.*, 2003; Suerbaum *et al.*, 2003). Bei *H. pylori* ist FlgE2 (HP0908) mit einer vorhergesagten Größe von ca. 67 kDa (606 Aminosäuren) etwas kleiner als FlgE1 und unterscheidet sich deutlich in der Proteinsequenz (20% Identität, 37% Ähnlichkeit). Das Gen *flgE2* liegt in einem Operon mit *flgD* (HP0907), welches in *Salmonella* für ein FlgE-spezifisches

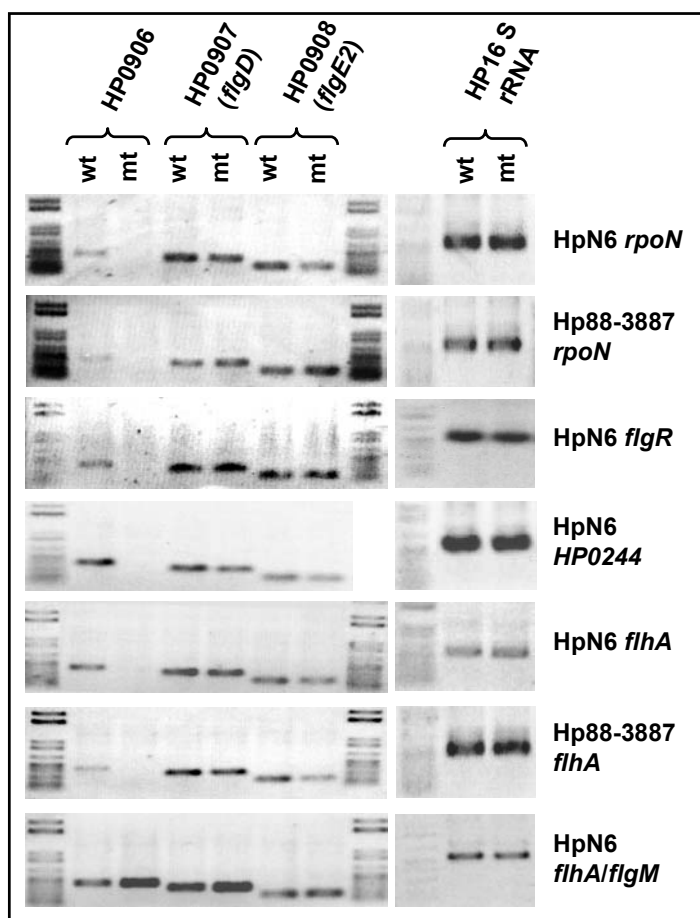
Chaperon kodiert, das für den Aufbau des Flagellenhakens unerlässlich ist (Macnab, 2003). Ein weiteres Gen mit funktionellem  $\sigma^{54}$ -Promotor, HP0906, ein offener Leserahmen ohne signifikante Homologien zu bekannten Genen, wurde als erstes Gen des Operons postuliert (Spohn & Scarlato, 1999, vgl. Abb. 30). Um die Besonderheiten im *H. pylori*-Flagellensystem und die Funktion des Hakenprotein-Paralogs FlgE2 näher zu untersuchen, wurde hier eine isogene *flgE2*-Insertionsmutante konstruiert und charakterisiert.

Mit den Primern HPflgD1 und -2 wurde mit *H. pylori* 26695-DNA ein ca. 1,6 kB langes, einen Teil von *flgD* und *flgE2* (HP0907/HP0908) umfassendes PCR-Fragment mit *Bam*HI-Schnittstellen generiert und in einen *Bam*HI-geschnittenen pLL570-Vektor kloniert (pSUS1602). In eine in *flgE2* gelegene natürliche *Eco*RI-Schnittstelle wurde in Transkriptionsrichtung eine Kanamycin-Kassette inseriert und dadurch FlgE2 inaktiviert. Mit dem entstandenen Plasmid pSUS1603 wurde in den *H. pylori*-Stämmen N6 und 88-3887 das *flgE2*-Gen ausgeschaltet. Die Überprüfung erfolgte mittels PCR mit den Primern HP0908\_NdeI und HPflgD2, bzw. HPflgD2 und km1 und Sequenzierung mit denselben Oligonukleotiden.

Die phänotypische Charakterisierung der Mutanten wurde mittels licht- und elektronenmikroskopischer Analyse durchgeführt. Es konnte eine funktionelle Verbindung von FlgE2 zum Flagellensystem nachgewiesen werden, da die *flgE2*-Mutanten unbeweglich waren und in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Ausbildung von Flagellen beobachtet wurde (vgl. Abb. 28).

Bei den Microarray-Analysen der Regulatoren des  $\sigma^{54}$ -Regulons, RpoN, FlgR und FlgS wurde kein signifikanter Einfluss auf die Expression der Gene *flgD* und *flgE2* festgestellt (siehe 3.3.2). Dies stand in scheinbarem Widerspruch zu früheren Untersuchungen, nach denen keine Aktivität des  $\sigma^{54}$ -Promotors vor HP0906, dem ersten Gen des putativen Operons (HP0906-HP0908) in einer *flgR*-Mutante vorhanden war (Spohn & Scarlato, 1999). Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurden vergleichende RT-PCRs mit cDNA aus verschiedenen Mutanten und Wildtypen sowie drei spezifischen Primerpaaren für jeweils eines der Gene HP0906, *flgD* und *flgE2* durchgeführt (siehe Abb. 29). Da die Zyklenzahl und die übrigen Bedingungen bei der PCR für die drei Reaktionen identisch waren (siehe Tab. 4), können hier bedingt auch Aussagen zur Transkriptmenge der einzelnen Gene gemacht werden. In den Mutanten der Gene für RpoN, FlgR, FlgS und FlhA ist kein

Transkript für HP0906 im Vergleich zum Wildtyp nachzuweisen, was die von Spohn und Scarlato gezeigte Zugehörigkeit zum  $\sigma^{54}$ -Regulon bestätigt (Spohn & Scarlato, 1999). Hierfür spricht auch das Auftreten einer spezifischen RT-PCR-Bande in der *flhA/flgM*-Doppelmutante, für die in den vorangegangenen Microarray-Experimenten eine erhöhte Transkription der Klasse 2-Gene nachgewiesen worden war (vgl. 3.3.3). Im Gegensatz dazu waren in allen Mutanten Transkripte der Gene *flgD* und *flgE2* nachzuweisen, die folglich von einem  $\sigma^{54}$ -unabhängigen Promotor kontrolliert werden. Da in den *flhA*-Mutanten auch die  $\sigma^{28}$ -abhängigen Klasse 3-Gene reprimiert sind (vgl. 3.3.3), nicht aber *flgD/E2*, ist ein  $\sigma^{80}$ -`Housekeeping`-Promotor für HP0907/HP0908 wahrscheinlich. In einer bioinformatischen Arbeit von Vanet *et al.* (2000) ist eine für *H. pylori* spezifische Konsensus-Sequenz für  $\sigma^{80}$ -Promotoren abgeleitet worden. In einem Bereich von 25-59 Nukleotiden vor dem *flgD*-Startkodon konnte hier eine solche Sequenz identifiziert und als potenzieller zweiter Promotor in dem Gencluster vorgeschlagen werden (siehe Abb. 30).

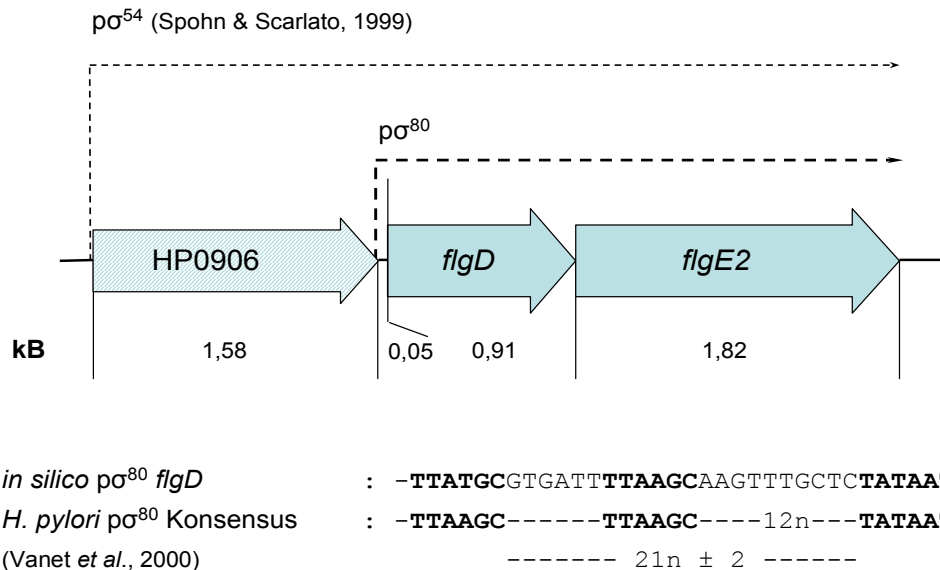


**Abb. 29. RT-PCR-Analyse zur Expression der Gene HP0906, HP0907 (*flgD*) und HP0908 (*flgE2*) in unterschiedlichen Mutanten.** Abgebildet sind Experimente mit RNA-Präparationen verschiedener isogener Mutanten in den Stämmen *H. pylori* N6 (HpN6) und *H. pylori* 88-3887 (Hp88-3887). Die Primerkombinationen HP0906\_RT1 und -2 (HP0906), HPflgD3 und HP0907\_RT2 (*flgD*), HP0908\_RT1 und HPflgD2 (*flgE2*), sowie HP16S1 und 2 (HP16S rRNA) wurden zur Amplifikation von cDNA aus Wildtyp (wt) und Mutante (mt) benutzt.

Die cDNA für die RT-PCRs wurde für die *rpoN*- und *flgR*-Mutanten aus Zellen einer O.D.<sub>600</sub> von 0,35 und für HP0244, *flhA*- und *flhA/flgM*-Mutanten aus Zellen einer O.D.<sub>600</sub> von 0,7 hergestellt. Für den Wildtyp wurden Zellen mit dementsprechender O.D.<sub>600</sub> verwendet.

Das Ergebnis, dass in einigen Mutanten die Transkriptmenge für *flgD/E2* im Vergleich zum Wildtyp etwas herabgesetzt ist, während sie in der *flhA/flgM*-

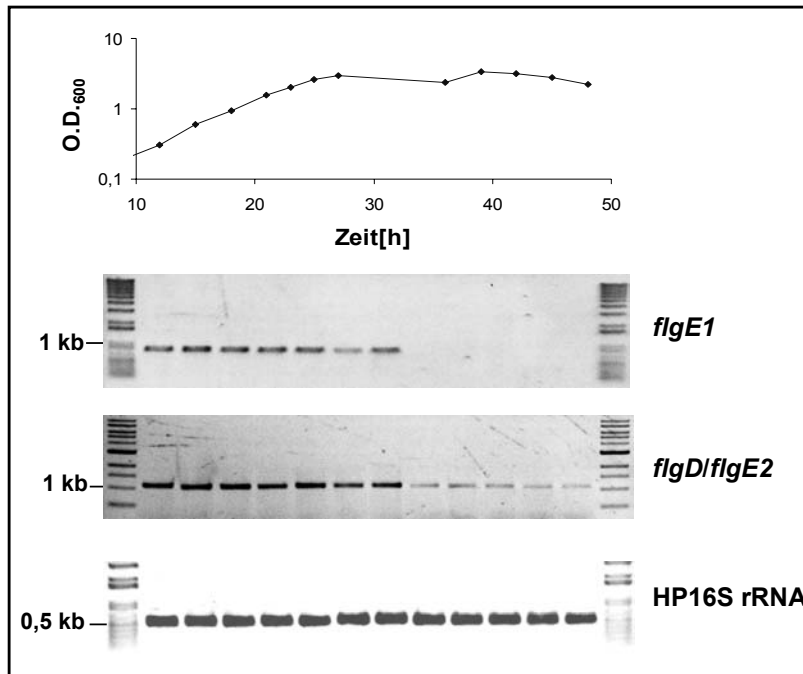
Doppelmutante erhöht ist, spricht für eine partielle positive Kokontrolle durch den HP0906- $\sigma^{54}$ -Promotor (siehe Abb. 29 und Abb. 30). Da in nahezu allen Experimenten durch die RT-PCR für den Wildtyp eine kleinere Transkriptmenge für HP0906 als für das nachfolgende *flgD* bei gleichen PCR-Bedingungen bestimmt wurde (siehe Abb. 29), kann weiterhin geschlossen werden, dass unter den gewählten Bedingungen der  $\sigma^{54}$ -Promotor eine schwächere Aktivität aufweist als der putative  $\sigma^{80}$ -Promotor der beiden nachfolgenden Gene.



**Abb. 30. Operonstruktur von HP0906-HP0908 (*flgE2*).** Nach den RT-PCR-Ergebnissen existieren mindestens zwei unabhängige Transkripte von HP0906 und *flgD/E2* (siehe Text). Zusätzlich zu dem funktionell bestätigten  $\sigma^{54}$ -Promotor vor HP0906 (Spohn & Scarlato, 1999) wurde hier ein potenzieller  $\sigma^{80}$ -Housekeeping-Promotor 59-25 Nukleotide vor dem *flgD*-Startcodon identifiziert. Er hat eine fast 100%ige Übereinstimmung mit der beschriebenen *H. pylori*-Konsensus-Sequenz: TTAAGC-21n±2-TATAAT, inclusive einer TTAAGC Wiederholungssequenz (Vanet *et al.*, 2000).

In einem weiteren RT-PCR-Experiment wurde die Transkription des Gens *flgE1* mit der von *flgD/flgE2* während des Wachstums von *H. pylori* N6 in nährstofflimitierter Kultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen (siehe Abb. 31). Für *flgE1* wurde in früheren Arbeiten nachgewiesen und bei den Microarray-Analysen dieser Arbeit bestätigt, dass es ausschließlich unter der Kontrolle des RpoN-Regulons steht (Spohn & Scarlato, 1999; siehe 3.3.2). Diese Tatsache wurde auch durch dieses Wachstumsphasen-Experiment bestätigt, da *flgE1* ein annähernd identisches Transkriptionsprofil zeigt wie das  $\sigma^{54}$ -abhängige *flaB* (vgl. Abb. 11 und Abb. 31). Für die Transkription der Gene *flgD* und *flgE2* zeigt sich über den Verlauf des exponentiellen Wachstums des Bakteriums eine ähnliche relative Transkription wie für *flgE1*. Während für die  $\sigma^{54}$ -abhängigen Klasse 2-Gene *flaB* und *flgE1* keinerlei

Transkription mehr in der stationären Phase nachweisbar ist, wird das *flgD/flgE2*-Operon auch in dieser späten Wachstumsphase, wenn auch schwächer, weiter transkribiert. Auch diese Tatsache legt die Anwesenheit eines zusätzlichen Promotors zu dem beschriebenen  $\sigma^{54}$ -Promotor nahe.



**Abb. 31. RT-PCRs mit Proben der Wachstumskurve von *H. pylori* N6 (vgl. Abb. 11).** Dargestellt ist die Wachstumskurve mit den Probenahmezeitpunkten (Rauten). Darunter abgebildet RT-PCRs mit cDNA-Präparationen aus den Proben in der Reihenfolge entsprechender fortschreitender Wachstumskurve. Rechts neben den Abbildungen sind die detektierten Gene angegeben

### 3.5 Überexpression und Reinigung von *H. pylori*-FlgE2 in *E. coli*

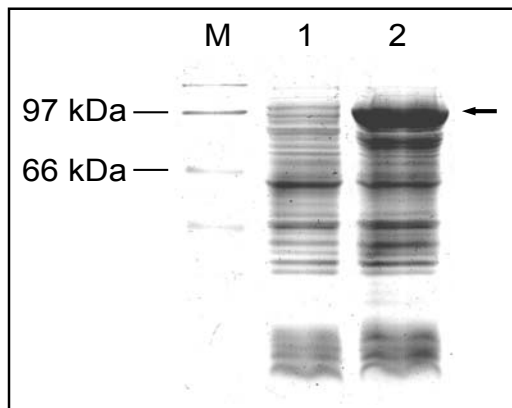
Die vorhergegangenen Experimente zu dem Hakenprotein-Homolog FlgE2 in *H. pylori* hatten gezeigt, dass die Mutation und Inaktivierung des Gens einen flagellenlosen unbeweglichen Phänotyp zur Folge hatte, wobei die genaue Rolle von FlgE2 immer noch unklar war (siehe 3.4.3). Daher sollten in den nächsten Schritten weitere funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, die zur Aufklärung der Lokalisation des Proteins in dem Bakterium und einer möglichen Assoziation mit dem Flagellum beitragen. Hierzu wurden zunächst spezifische Antikörper gegen FlgE2 benötigt, um das Protein gezielt nachweisen zu können. Um eine ausreichende Menge an aufgereinigtem Protein zu gewinnen, wurde das IMPACT™-System (Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) der Firma NEB gewählt. Mit diesem System können rekombinante Proteine über eine Chitinmatrix aufgereinigt und anschließend in hoher Reinheit mit der nativen Aminosäuresequenz ohne Durchführung einer Proteasespaltung gewonnen werden.

### 3.5.1 Konstruktion des Überexpressionsplasmids

Die Konstruktion eines Plasmids für die Überexpression von FlgE2 erfolgte nach Herstellerangaben für eine C-terminale Fusion des Zielproteins mit der Inteinsequenz (*Mxe-GyrA*) und Chitinbindedomäne. Hierzu wurde zunächst der Vektor pTWIN1 mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *SapI* zu einem 6,75 kB großen Fragment linearisiert und aufgereinigt. Mit einem Enzymmix mit Korrekturlese-Aktivität (‘proof reading’, Expand High Fidelity PCR System, Roche) wurde das vollständige *flgE2*-Gen (1818 Bp) aus Hp 26695-DNA mit den Primern HP0908\_ SapI und HP0908\_ NdeI amplifiziert und mit den Nukleasen *NdeI* und *SapI* entsprechend der terminal generierten Schnittstellen behandelt und aufgereinigt. Das aus den beiden DNA-Fragmenten hergestellte Plasmid pSUS1622 wurde durch Restriktionen mit *EcoRI* (linearisiert: 8,6 kB) und *XbaI* und *SpeI* (Vektor: 6,75 kB; Insert: 1,81 kB) überprüft. Durch eine PCR mit den Primern *Mxe\_Intein\_rev* und HP0908\_RT1 und Sequenzierungen mit denselben Oligonukleotiden wurde die Übereinstimmung der entsprechenden Plasmid-Sequenz mit dem *flgE2*-Gen im Wildtyp bestätigt.

### 3.5.2 Überexpression des FlgE2-CBD Fusionsproteins

Für die Überexpression des Proteins FlgE2 mit Hilfe von pSUS1622 wurde das Plasmid zunächst in den *E. coli* Stamm ER2566 transformiert (‘Eco90’). In der Abb. 32 ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel mit Gesamtzelllysaten aus Eco90-Zellproben einer Wachstumskurve bei 37°C vor und nach Induktion der Überexpression durch Zugabe von 0,3 mM IPTG abgebildet. Bei einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa für FlgE2 und 28 kDa für die Inteinsequenz *Mxe-GyrA* und der Chitinbindedomäne (CBD) des pTWIN1-Vektors wäre bei erfolgreicher Expression ein Fusionsprotein von ca. 95 kDa zu erwarten. Zwei Stunden nach der Zugabe des Induktors ist im Gesamtzelllysate eine deutliche Bande in dieser Größe zu erkennen, die vor der Zugabe von IPTG nicht vorhanden war. Aufgrund dieses Experiments mußten die Induktionsbedingungen nicht weiter modifiziert werden.



**Abb. 32. Expression des FlgE2-Fusionsproteins nach Induktion der Expression.** Abgebildet ist ein 12%iges Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel; GZL (Gesamtzellysat).

Spur M: Broad Range Marker (2-212 kDa; NEB)  
 Spur 1: GZL Eco90 vor Induktion, Auftrag ca. 7 µg Protein

Spur 2: GZL Eco90, 2 h nach Induktion mit 0,3 mM IPTG, ca. 10 µg Protein

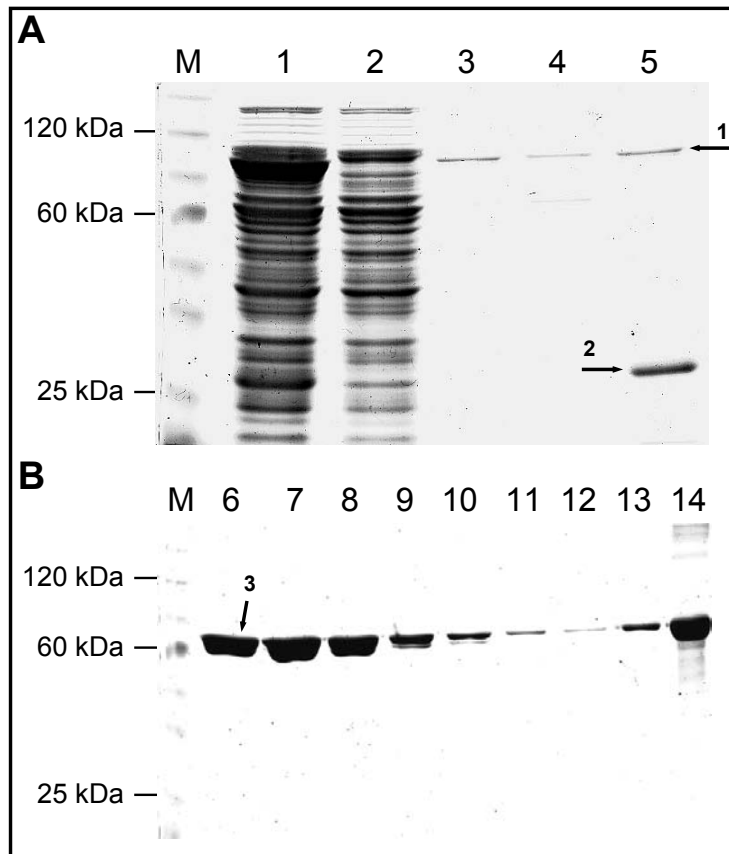
Die ca. 95 kDa große Bande des FlgE2-Mxe-GyrA-CBD-Fusionsproteins nach Induktion ist in Spur 2 deutlich zu erkennen (Pfeil).

Um effektiv an die Chitingruppen der Aufreinigungsmatrix binden zu können, müssen die Chitinbindedomänen frei verfügbar vorliegen und das Protein im Aufschlusspuffer gut löslich sein. Zur Bestimmung der Löslichkeit wurden Eco90-Zellen mit dem exprimierten Fusionsprotein einem Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung unterzogen und lösliche von unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation getrennt (ohne Abb.). Verglichen mit der Menge der anderen Proteine in der löslichen Fraktion war die Konzentration des Fusionsproteins ausreichend hoch, um das hier gewählte Protokoll des Zellaufschlusses unter nativen Bedingungen (siehe 2.10.4) für die nachfolgende Aufreinigung beizubehalten.

### 3.5.3 Aufreinigung des rekombinanten FlgE2

Um Kaninchenantiseren herstellen lassen zu können, die möglichst spezifisch *H. pylori*-FlgE2-Protein binden, wurde zunächst das überexprimierte FlgE2-Mxe-GyrA-CBD-Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden Zellen aus einer 500 ml Eco90-Kultur aufgeschlossen und die löslichen Proteine auf eine Säule mit einer Chitinmatrix gegeben. Die Aufreinigung wurde bei 4°C nach Herstellerangaben durchgeführt, die Abspaltung der Inteindomäne erfolgte über Nacht durch Zugabe von DTT.

In Abb. 33A sind Proben einiger wichtiger Fraktionen der Aufreinigung und Abspaltung von FlgE2 abgebildet. Die Elution des gereinigten FlgE2 erfolgte in 10 x 2 ml-Aliquots (siehe Abb. 33B). Neben der dominanten Bande der erwarteten Größe von ca. 67 kDa war nach Auftrennung der Elutionsfraktionen in der SDS-PAGE auch eine etwas schneller laufende Bande zu detektieren (Spuren 9,10). Wahrscheinlich handelte es sich hierbei um eine leicht prozessierte Form des überexprimierten FlgE2.



**Abb. 33. A) Fraktionen der Aufreinigung von FlgE2 über die Chitinmatrix.** 12%iges SDS-PAGE-Gel.

Spur M: Protein Ladder (Invitrogen)  
 Spur1: Eco90, lösliche Frkt.  
 Spur2: Durchfluss  
 Spur3: Waschen  
 Spur 4: Zugabe DTT/ Initiation der Abspaltung  
 Spur 5: Chitinmatrix nach der Abspaltung von FlgE2

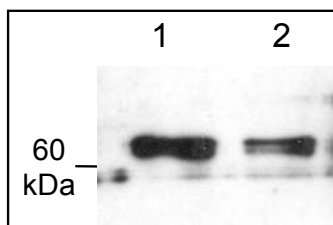
**B) Elution des überexprimierten FlgE2 aus der Chitinmatrix.** (aus 500ml Flüssigkultur)

Spur 6-14: Elutionsfraktion 1-7 nach Spaltung über Nacht  
 Spur 13: 100 ng BSA  
 Spur 14: 1 µg BSA

Pfeil 1: FlgE2-Mxe-GyrA-CBD (ca. 95 kDa)  
 Pfeil 2: Mxe GyrA-CBD (ca. 28 kDa)  
 Pfeil 3: FlgE2 (ca. 67 kDa)

Auftrag je 10 µl pro Elutionsfraktion (ca. 2 ml Gesamtvolumen/Frkt.).

In einem weiteren Versuch wurde ermittelt, ob das so gewonnene FlgE2 mit dem gegen native *H. pylori* Flagellen gerichteten Antikörper AK179 (Leying *et al.*, 1992) detektiert werden kann. Es wurde eine deutliche Reaktion beobachtet, wobei beide beschriebenen eluierten Banden in Immunoblot detektierbar sind (Abb. 34). Eine Entwicklung desselben Western-Blots mit dem *H. pylori* FlaA-spezifischen Antikörper  $\alpha$ -FlaA (Josenhans *et al.*, 2000) ergab keinerlei Reaktion mit dem gereinigten Protein (ohne Abbildung).



**Abb. 34. Rekombinantes FlgE2 reagiert mit dem Anti-Flagellenantikörper AK179.** Western Blot AK179 1:10000,  $\alpha$ -rabbit-POX 1:100000 (Chemilumineszenz-Substrat).

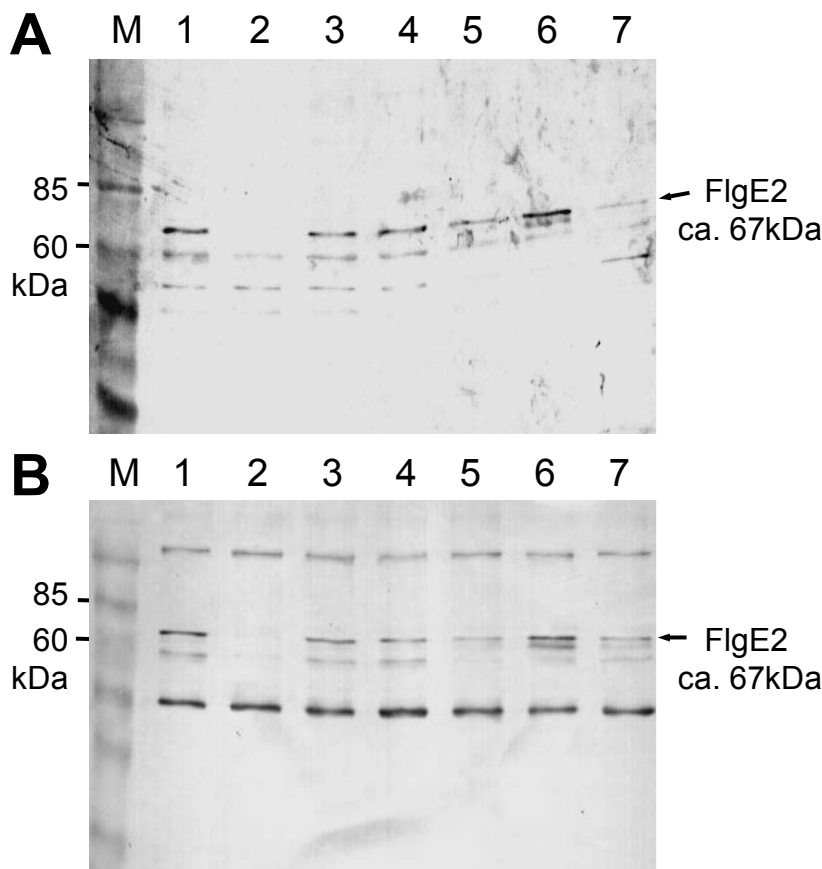
Spur 1: Elutionsfraktion 4  
 Spur 2: Elutionsfraktion 5  
 Auftrag je 10 µl

Nach Induktion der Überexpression wurden ca. 200 µg gereinigtes FlgE2 aus 200 ml Kulturvolumen Eco90 gewonnen. Für die Immunisierung wurde das Protein anschließend in 80 µg-Aliquots aufgeteilt und für den Versand getrocknet.



### 3.6 Herstellung von spezifischen Antisera gegen rekombinantes *H. pylori* FlgE2

Die Herstellung von polyklonalen FlgE2-Antisera mit dem überexprimierten und gereinigten Protein (siehe 3.5) wurde von der Firma EuroGentec durch Immunisierung von Kaninchen mittels intradermaler Injektion durchgeführt. Es wurden Seren von zwei Kaninchen ausgewählt, die einen möglichst geringen Hintergrund gegen *H. pylori*-Proteine erzeugten und keine Banden in der Größe von FlgE2 aufwiesen. In der Abb. 35 sind Western Blot-Entwicklungen mit den beiden parallel hergestellten Antisera (HPE2/2499 und HPE2/2599) abgebildet.



**Abb. 35. Western Blot-Entwicklungen mit HPE2-Antisera.** Gesamtzelllysate wurden auf zwei Blots mit den beiden hergestellten Kaninchenantisera HPE2/2499 (A) und HPE2/2500 (B) entwickelt. Verdünnung je 1:2000. Zweiter Antikörper:  $\alpha$ -rabbit-AP 1:5000 (NBT-BCIP-Substrat).

Spur M: Prestained Protein Ladder (Invitrogen)  
 Spur 1: HpN6  
 Spur 2: HpN6 *flgE2*  
 Spur 3: HpN6 *rpoN*  
 Spur 4: HpN6 *rpoN*  
 Spur 5: HpN6 *flhA*  
 Spur 6: HpN6 *flhA/flgM*  
 Spur 7: HpN6 *flhF*

Alle Proben: Zellen aus Flüssigkultur O.D.<sub>600</sub>=0,7. Resuspendiert in 500  $\mu$ l PBS, Auftrag je 5  $\mu$ l Gesamtzelllysat (2-3  $\mu$ g Protein).

Überprüft wurde die immunologische Reaktion mit Gesamtzelllysaten unterschiedlicher *H. pylori* N6-Mutanten in Genen des Flagellensystems. Sowohl für HPE2/2499 wie auch für HPE2/2500 läßt sich neben mehreren unspezifischen Banden spezifisch eine Bande in der erwarteten Größe von ca. 67 kDa detektieren (siehe Abb. 35, Pfeile). In den *flgE2*-Mutanten wird FlgE2 nicht exprimiert (Spur 1).

Im Gegensatz zu dem Hakenprotein FlgE1, welches in einer *rpoN*-Mutante nicht exprimiert wird (Fujinaga *et al.*, 2001, eigene Ergebnisse), ist FlgE2 hier deutlich nachweisbar (Spuren 3,4). Dies korreliert gut mit den transkriptionellen Ergebnissen aus den Microarray- und RT-PCR Experimenten (vgl.3.3.2 und 3.4.3). In den *flhA*- und *flhF*-Mutanten ist eine geringere Proteinmenge vorhanden (Spur 5,7), während demgegenüber in der *flhA/flgM*-Doppelmutante mehr FlgE2 nachzuweisen ist (Spur 6).

Da bei den beiden hier hergestellten Antiseren HPE2/2499 und HPE2/2500 neben der spezifischen FlgE2-Bande mehrere unspezifische Banden durch Kreuzreaktionen mit *H. pylori*-Proteinen auftreten, können zurzeit mit den Seren keine Experimente zur mikroskopischen Lokalisation von FlgE2 an den intakten Bakterien durchgeführt werden. Für zukünftige Arbeiten ist geplant, die Serumfraktion, welche spezifisch mit FlgE2 reagiert, mit Hilfe des überexprimierten Proteins aufzureinigen. Mit Hilfe des gereinigten Antiserums sollen dann Lokalisation und Funktion des Proteins genauer untersucht werden.

## 4 Diskussion

Die durch Chemotaxis gesteuerte Flagellen-vermittelte Beweglichkeit ist bei vielen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien ein essenzieller Faktor der Pathogenese dieser Organismen (vgl. 1.2; Josenhans *et al.*, 2002a). Für *H. pylori* und andere gastrische *Helicobacter*-Arten wurde in einer Reihe von unterschiedlichen Versuchsansätzen gezeigt, dass Mutationen in nahezu allen Genen des Flagellenapparates und der Chemotaxismaschinerie die Fähigkeit des Bakteriums zur Besiedelung des Magens des Wirtes aufheben (Eaton *et al.*, 1996; Andrutis *et al.*, 1997; Josenhans *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Foyne *et al.*, 2000; Ottemann & Lowenthal, 2002; Kavermann *et al.*, 2003). Entscheidend ist hierbei auch, dass vermutlich mehr als 80% der *H. pylori*-Zellen bei einer Infektion frei im Magenschleim persistieren und dabei durch Bewegung aktiv der Abschlüpfung in das Magenlumen entgegenwirken müssen, während nur ein kleiner Teil der Bakterien adhärent an den Magenepithelzellen vorliegt (Yoshiyama & Nakazawa, 2000; Testerman *et al.*, 2001). Somit ist für *H. pylori* die Flagellen-vermittelte Motilität während des gesamten Zeitraumes der persistenten Kolonisation notwendig, und nicht wie bei vielen anderen Organismen nur für die initiale Kolonisierung und Etablierung einer Infektion (Josenhans *et al.*, 2002a). Obwohl über die Rolle der Motilität bei der Pathogenese von *H. pylori* bereits seit vielen Jahren intensive Untersuchungen durchgeführt wurden, ist das transkriptionelle Netzwerk, welches die koordinierte Expression der Flagellensystem-assoziierten Gene steuert, bislang nur unvollständig charakterisiert. Bei anderen gram-negativen Mikroorganismen haben Untersuchungen ergeben, dass übergeordnete transkriptionelle Regulatoren die Expression der mehr als 50 Flagellen- und Chemotaxisgene in Abhängigkeit von globalen Signalen wie Zellzyklus oder metabolischem Status in der Zelle überwachen (vgl. 1.2.3). Für *H. pylori* konnten bislang weder durch Sequenzanalysen noch durch experimentelle Arbeiten Hinweise auf solche übergeordneten Regulatoren des Flagellensystems ermittelt werden. Im Vergleich mit Genomen anderer Organismen, bei denen die Flagellengene in wenigen Regionen zu großen Operons zusammengefasst vorliegen ('Gencluster'), sind die entsprechenden Gene bei *H. pylori* einzeln oder in kleinen Transkriptionseinheiten über das gesamte Genom verteilt (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). All dies scheint ein Hinweis auf eine, im Vergleich zu vielen anderen

Bakterien, in *H. pylori* unterschiedlich koordinierte Regulation der Expression der Flagellengene zu sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch die Anwendung verschiedener Methoden, wie unter anderem der DNA-Microarray-Technologie, die Struktur des Regulationsnetzwerkes der Flagellenbiosynthese für *H. pylori* besser zu charakterisieren und mögliche Hinweise auf Verbindungen zu anderen Funktionen und Systemen der Zelle zu untersuchen.

#### **4.1 Wachstumsphasen-abhängige und differenzielle Transkription der beiden Flagellengene in *H. pylori***

Eine Besonderheit von *H. pylori* ist die Fähigkeit des Bakteriums, sich im hochviskösen Milieu der aus Polysacchariden (Muzinen) und Glykoproteinen bestehenden Mukusschicht der Magenschleimhaut zu bewegen und dort zu persistieren. So wurde unter anderem gezeigt, dass *H. pylori in vitro* mit ansteigender Viskosität des Mediums deutlich länger und besser beweglich ist als *E. coli* (Hazell *et al.*, 1986). Seit längerem wird in diesem Zusammenhang die Möglichkeit diskutiert, dass *H. pylori* in Abhängigkeit von der Viskosität des Mediums die Zusammensetzung des Flagellenfilaments aus den beiden heterologen Flagellinuntereinheiten FlaA und FlaB variieren könnte, um so die physikalischen Eigenschaften des Filaments an eine wechselnde Umgebung anzupassen. Diese Annahme beruht unter anderem auf der Tatsache, dass *flaA* und *flaB* von zwei unterschiedlichen alternativen Sigma-Faktoren,  $\sigma^{28}$  und  $\sigma^{54}$ , kontrolliert werden. Beobachtungen aus früheren Arbeiten deuten auf ein sich veränderndes Verhältnis der transkriptionellen Aktivitäten von *flaA* und *flaB* während der verschiedenen Wachstumsphasen von *H. pylori* hin (Josenhans *et al.*, 1995b). Auch der Grad der Beweglichkeit des Bakteriums ändert sich abhängig von der Wachstumsphase in nährstofflimitierter Kultur (eigene Beobachtungen; Worku *et al.*, 1999). Um den Zusammenhang der Wachstumsphasenabhängigkeit der Transkription der beiden *H. pylori*-Flagellengene, stellvertretend für die Klasse 2 und 3-Flagellenregulons, näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche Methoden angewandt. Zum einen wurden die *flaA*- und *flaB*-Transkripte direkt durch Northern Blot-Hybridisierungen und RT-PCRs mit Proben aus unterschiedlichen Wachstumsphasen in nährstofflimitierter Kultur nachgewiesen.

Andererseits wurden die Promotoraktivitäten der Gene mit Hilfe von Luziferase-Reporter-Experimenten bestimmt.

Mit den hier konstruierten *luxAB*-Fusionen mit den Promotoren von *flaA* und *flaB* konnte die stabile Expression einer rekombinanten Luziferase in *H. pylori* erstmalig erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei wurde eine deutlich stärkere Luziferaseaktivität bei der Fusion mit dem *flaA*-spezifischen  $\sigma^{28}$ -Promotor im Vergleich zum  $\sigma^{54}$ -*flaB*-Promotor ermittelt. Dies stimmt mit einer Reihe früherer Arbeiten überein, nach denen die Expression von FlaA in *Helicobacter* mindestens zehnfach höher als die von FlaB ist (Kostrzynska *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1995a; Josenhans *et al.*, 1999). In der Folge wurde die Expression der Luziferase unter Kontrolle der Promotoren der beiden Flagelline in *H. pylori* während des Wachstums in nährstofflimitierter Flüssigkultur bestimmt. Als Ergebnis ergaben sich maximale Promotoraktivitäten, abgeleitet aus der höchsten Luziferaseaktivität, in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase, wobei die relative Aktivität des  $\sigma^{54}$ -*flaB*-Promotors früher abnimmt als die des  $\sigma^{28}$ -*flaA*-Promotors. Auch bei der Betrachtung der durch Northern Blot und RT-PCR bestimmten Transkriptmengen zeigt sich ein deutlicher Unterschied für das Verhältnis von *flaA*- zu *flaB*-Transkript während der unterschiedlichen Wachstumsphasen. Das *flaB*-Genprodukt lässt sich übereinstimmend mit der höchsten Luziferaseaktivität der *flaB-luxAB*-Fusion in der frühen bis mittleren log-Phase maximal nachweisen, während die grösste Menge an *flaA*-Transkript später als die höchste Luziferaseaktivität der *flaA-luxAB*-Fusion, beim Übergang der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase von *H. pylori* auftritt. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die Hypothese, dass die *flaA*-mRNA eine höhere posttranskriptionelle Stabilität aufweist als *flaB* und in der Zelle akkumuliert, während das *flaB*-Transkript schneller degradiert wird. Während die durchschnittliche mRNA-Halbwertszeit in Prokaryoten nur wenige Minuten beträgt, wurde für einige Transkripte, die durch Sekundärstrukturen stabilisiert werden, wesentlich höhere Halbwertszeiten beschrieben (Kushner, 1996; Rauhut & Klug, 1999; Bernstein *et al.*, 2002). Auch im Hinblick auf die geringe Anzahl an potenziellen Regulatoren, die in *H. pylori* identifiziert werden konnten (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Scarlato *et al.*, 2001), scheint die Einbindung der RNA-Stabilität als zusätzliches regulatorisches Element plausibel. Potenzielle Komponenten eines RNA-prozessierenden 'Degradosoms' konnten für *H. pylori* identifiziert werden (Scarlato *et al.*, 2001). Für

das *H. pylori* Urease-Operon konnte eine pH-abhängige Regulation der mRNA-Stabilität experimentell nachgewiesen werden (Akada *et al.*, 2000). Eine ausschließliche Regulation des *flaA*-Gens durch mRNA-Stabilität ist jedoch unwahrscheinlich, da neue Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe u. a. gezeigt haben, dass der *flaA*- $\sigma^{28}$ -Promotor in Abhängigkeit von der DNA-Topologie und der Wachstumsphase differenziell transkribiert wird (Ye *et al.*, 2004). In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurden mit Hilfe der DNA-Microarray-Technologie globale Veränderungen der Genexpression in *H. pylori* während des Wachstums in einer Flüssigkultur analysiert (Thompson *et al.*, 2003). Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine differenzielle Expression der beiden Flagellengene mit einer maximalen Transkriptmenge für *flaB* (sowie anderer Klasse 2-Flagellengene) nach 12-18 h Wachstum und nachfolgender Abnahme des Transkriptes bei gleichzeitigem Anstieg der *flaA*-Transkriptmenge bis in die späte exponentielle und übergehende stationäre Wachstumsphase.

Die zeitlich koordinierte Expression der Flagellengene wurde bereits ausführlich für die Modellorganismen *S. enterica* Serovar Typhimurium und *C. crescentus* mittels Reporteranalysen sowie Transkriptom- und Proteomvergleichen untersucht (Laub *et al.*, 2000; Grunenfelder *et al.*, 2001; Kalir *et al.*, 2001). Hier zeigte sich jeweils die aufeinanderfolgende Expression der Vertreter der einzelnen Klassen von Flagellengenen. Auch innerhalb der einzelnen Klassen konnte z. T. die chronologisch geordnete Aufeinanderfolge der Genexpression während des Zellzyklus mit der Funktion des entsprechenden Proteins in der Abfolge der Biogenese des Flagellenapparates in Zusammenhang gebracht werden (Kalir *et al.*, 2001). Die hier bestimmten Verläufe der *flaA*- und *flaB*-Transkriptmengen während des Wachstums in nährstofflimitierter Kultur basieren vermutlich ebenfalls auf einer zeitlich versetzt gesteuerten Expression der Flagellenregulons. So gehört *flaB* mit einem Transkriptmaximum im exponentiellen Wachstum zu den mittleren Flagellengenen, während *flaA* mit einer maximalen mRNA-Menge beim Übergang der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase zu den späten Flagellengenen gehört (Spohn & Scarlato, 1999; Josenhans & Suerbaum, 2000). Dies entspricht auch der strukturellen Aufeinanderfolge von FlaB (proximal) und FlaA (distal) im Filament (Kostrzynska *et al.*, 1991).

#### 4.1.1 Das *lux*-System im Vergleich mit weiteren Reporter-Systemen für *H. pylori*

Neben der Nutzung zur Untersuchung der Flagellinexpression wurde die hier erstmals für *H. pylori* angewandte Biolumineszenz-basierte Reporter-Gen-Analyse mit anderen in dem Organismus verwendeten Systemen zur Messung von Promotoraktivitäten verglichen. Für *H. pylori* wurden in früheren Arbeiten bereits *xylE*- und *lacZ*-Fusionen zur Untersuchung von *cagA*- und Ureasegen-Expression verwendet (Karita *et al.*, 1996; de Vries *et al.*, 2001; van Vliet *et al.*, 2001), sowie *gfp*- und *cat*-Fusionen zur Studie der Flagellinexpression (siehe unten). Für das *xylE*-System wurde eine hohe Sensitivität bei nahezu keiner messbaren Hintergrundaktivität in *H. pylori* beschrieben. Dabei wurde die als Reportersignal für die Promotoraktivität bestimmte Enzymaktivität als sehr stabil charakterisiert (Karita *et al.*, 1996), was eine Akkumulation des Signals über den Verlauf der Messungen bewirken könnte. Die Transposon-vermittelte Fusion von *H. pylori* Genen mit dem Reporter-Gen *lacZ* wurde als geeignetes Instrument zur Identifizierung von Stress-regulierten Genen durch eine leicht durchzuführende blau-weiß Selektion der Mutanten beschrieben (de Vries *et al.*, 2001). Die Fusion mit dem in *H. pylori* sehr stark transkribierten Promotor des *ureA*-Gens führte allerdings nur zu geringen messbaren Reporter-Gen-Aktivitäten (van Vliet *et al.*, 2001). Daher scheint das System für die Untersuchung von schwächer exprimierten Genen in *H. pylori* nur bedingt geeignet zu sein.

Zum aussagekräftigen Vergleich unterschiedlicher Systeme ist es notwendig, die Versuchsbedingungen möglichst ähnlich zu wählen und die Aktivität derselben Promotoren in dem Organismus zu untersuchen. Von C. Josenhans wurden bereits Expressionsstudien mit den *H. pylori*-Flagellin-Genen mit *cat*- (Chloramphenicol-Acetyltransferase) und *gfp*- (grün fluoreszierendes Protein) Reporter-Genen durchgeführt. Da diese zum Teil unterschiedliche Ergebnisse lieferten, wurden zum Vergleich mit einem dritten System die Experimente mit den *lux*-Fusionen durchgeführt (Josenhans *et al.*, 1998; Niehus *et al.*, 2002). Für alle drei Systeme wurden unterschiedliche Sensitivitäten für die Detektion der Promotoraktivitäten bestimmt. Die relativ höchsten Signale wurden hier mit der durch Luziferase erzeugten Biolumineszenz gemessen. Hier stand eine maximale Aktivität der *flaA-lux* Fusionen von ca. 50000-60000 RLU (Relative Light Units) einer nicht detektierbaren Photonenemission bei den Negativkontrollen gegenüber. Bei den

*flaA-cat* Promotorfusionen betragen die Maximalwerte ca. 10000 pg/ $\mu$ g lösliche Proteine gegenüber 50-100 pg/ $\mu$ g in den Negativkontrollen. Bei den *gfp*-Messungen wurden maximal 15 Fluoreszenzeinheiten/ $\mu$ g lösliche Proteine für *flaA* und 0,25 für die Negativkontrollen bestimmt. Außerdem steigt die Hintergrundfluoreszenz bei *H. pylori* besonders in den späten Wachstumsphasen an und kann so die Meßergebnisse verfälschen (Josenhans *et al.*, 1998). Übereinstimmend wurde durch alle drei Reporter-gen-Systeme eine vielfach höhere Aktivität des *flaA*-Promotors im Vergleich zu dem von *flaB* bestimmt, wobei das Verhältnis im Verlauf der Wachstumskurve anstieg und die Verhältnisse bei den *lux*-Fusionen generell am höchsten waren (Niehus *et al.*, 2002). Zusätzlich zur höchsten Sensitivität zeichnete sich das Luziferase-System durch die größte zeitliche Dynamik gegenüber den beiden anderen Reporter-genen aus. So spiegelte sich nur in den Biolumineszenzmessungen der deutliche Rückgang der Promotoraktivitäten in der stationären Wachstumsphase wieder, wie er auch in den Northern Blot-Hybridisierungen und RT-PCRs gezeigt wurde. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich eine höhere Stabilität und Signalakkumulation von GFP und CAT.

Aufgrund der genannten Vorteile, kombiniert mit der Möglichkeit einer Echtzeitmessung ohne Zellaufschluß und weitere Aufarbeitung, kann die bakterielle Luziferase als ein für *H. pylori* geeignetes System zur Reporter-genanalyse angesehen werden. Bakterielle Biolumineszenz wurde erfolgreich als Reportersystem auch in anderen Spezies wie *Pseudomonas*, *Streptomyces* oder *Legionella* (Schauer *et al.*, 1988; Burlage *et al.*, 1990; Heuner *et al.*, 1997) verwendet.

## **4.2 Charakterisierung der globalen transkriptionellen Kontrolle der Gene des *H. pylori*-Flagellensystems durch unterschiedliche Regulatoren**

Durch die zuvor durchgeführten Reporter-genexperimente konnte nur die Transkription einzelner Gene mit hohem experimentellem Aufwand bewertet werden. Außerdem handelt es sich um eine indirekte Methode der Bestimmung von Promotoraktivitäten und aufgrund der Eigendynamik der Reporter-genprodukte in dem Bakterium können Probleme bei der Übertragbarkeit auf das untersuchte System nicht völlig ausgeschlossen werden. Daher sollte nun mit einer umfassenderen und



direkteren Methode versucht werden, die übergeordneten transkriptionellen Kontrollmechanismen im *H. pylori*-Flagellensystem näher zu charakterisieren.

Während zu Beginn dieser Arbeit bei einer kleinen Zahl von Modellorganismen (*E. coli*/*Salmonella*, *C. crescentus*) die transkriptionelle Kontrolle der Flagellenbiosynthese durch langjährige Untersuchungen zu einem Großteil entschlüsselt waren (Macnab, 1996; Wu & Newton, 1997; Aizawa, 2000; Anderson & Gober, 2000; Chilcott & Hughes, 2000; Jenal, 2000), standen für *H. pylori* nur begrenzte Informationen zu wenigen Bereichen der Genregulation im Zusammenhang mit dem Flagellensystem zur Verfügung. Potenzielle Gene für übergeordnete Regulatoren des Flagellensystems wie FlhCD in *Salmonella* (Claret & Hughes, 2002) konnten in *H. pylori* nicht identifiziert werden (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Neben dem Flagellin *flaB* und dem Gen für das Flagellenhaken-Protein *flgE1* (Suerbaum *et al.*, 1993; Eaton & Krakowka, 1994) waren bereits einige weitere  $\sigma^{54}$ -abhängige Flagellengene durch Inaktivierung des positiven Regulators FlgR in *H. pylori* charakterisiert worden (Spohn & Scarlato, 1999). Als  $\sigma^{28}$ -abhängig waren bis dahin nur das Flagellin *flaA* und das *fliD*-Operon beschrieben worden (Leying *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999). Untersuchungen der Komponenten des Flagellen-Sekretionsapparates *flhA*, *fliI* und *fliQ* hatten gezeigt, dass die Mutation jedes dieser Gene eine Repression von FlaA, FlaB und FlgE1 bewirkt, also Gene sowohl mit  $\sigma^{28}$ - als auch  $\sigma^{54}$ -Promotoren reprimiert werden (Schmitz *et al.*, 1997; Porwollik *et al.*, 1999). Des Weiteren war als wichtige spezifische Eigenschaft beschrieben worden, dass in *H. pylori*, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Organismen, durch einen unvollständigen Basalkörper/Haken-Komplex (HBB) keine `Feedback`-Inhibition der Expression der späten Flagellengene stattfindet (Hughes *et al.*, 1993; O'Toole *et al.*, 1994b; Karlinsey *et al.*, 2000b). Dies wurde nach Analyse der vollständigen Genomsequenzen zunächst damit erklärt, dass für *H. pylori* kein negativer Regulator FlgM zu dem für die Expression der späten Flagellengene zuständigen alternativen Sigma-Faktors FliA annotiert werden konnte (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein funktioneller Anti-Sigma-Faktor FlgM mit verkürztem N-Terminus auch in *H. pylori* durch unterschiedliche Versuchsansätze in unserer und einer weiteren Arbeitsgruppe identifiziert (Colland *et al.*, 2001; Josenhans *et al.*, 2002a).

In der hier durchgeführten Arbeit konnte die DNA-Microarray-Technologie erfolgreich auf *H. pylori* angewendet werden, um erstmalig die umfangreiche Charakterisierung des Flagellenregulons durch die Analyse von Regulatoren unterschiedlicher Klassen von Flagellengenen durchzuführen. Hierbei wurde insbesondere eine Reihe von antagonistischen und synergistischen Regulatoren in die Untersuchungen einbezogen, um die Ergebnisse zusätzlich abzusichern.

#### **4.2.1 Der alternative $\sigma$ -Faktor FliA ( $\sigma^{28}$ ) kontrolliert zusammen mit dem Anti- $\sigma$ -Faktor FlgM die Expression der Klasse 3-Flagellengene in *H. pylori***

Im Flagellensystem von *Salmonella* nimmt die Kontrolle der späten Flagellengene, die Gene des Flagellenfilaments und des Motor- und Chemotaxisapparats beinhalten, eine wichtige Rolle in der Regulationshierarchie ein. Der Anti-Sigma-Faktor FlgM inhibiert hier durch die Bindung an der Flagellen-spezifischen Sigma-Faktor FliA ( $\sigma^{28}$ ) dessen Interaktion mit dem RNA-Polymerase-Holoenzym und der  $\sigma^{28}$ -Promotorsequenz der späten Flagellengene (Burgess & Anthony, 2001; Chadsey & Hughes, 2001). Erst mit Fertigstellung des HBB durch Expression der frühen und mittleren Flagellengene wird FlgM als Exportsubstrat durch diesen Typ III-Sekretionsapparat aus der Zelle sezerniert. Hierdurch wird  $\sigma^{28}$  freigesetzt, und die Klasse 3-Flagellengene können transkribiert werden (Chilcott & Hughes, 2000; Karlinsey *et al.*, 2000a). Während die Kontrolle einiger Klasse 3-Flagellengene durch FliA für *H. pylori* seit längerem beschrieben ist (Leying *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999), wurde ein funktioneller Anti-Sigma-Faktor FlgM erst im Verlauf dieser Arbeit identifiziert (Colland *et al.*, 2001; Josenhans *et al.*, 2002a). Trotz eines um ca. 20 Aminosäuren verkürzten N-Terminus kann das *H. pylori*-FlgM den Flagellen-Anti-Sigma-Faktor in *Salmonella* funktionell komplementieren (Josenhans *et al.*, 2002a). Zur Charakterisierung der späten Flagellengene in *H. pylori* wurden in dieser Arbeit erstmalig genomweite Microarray-Untersuchungen mit Mutanten in den Regulatorgenen *fliA* und *flgM* durchgeführt. Die Transkriptom-Untersuchungen mit den zwei antagonistischen Regulatoren erfolgten unter anderem zur Etablierung und Evaluierung der Transkriptanalyse in *H. pylori* mit Hilfe von Gesamtgenom-DNA-Microarrays. Ausschlaggebend hierfür war neben der Vorkenntnis einiger  $\sigma^{28}$ -kontrollierter Gene (siehe 4.2) auch die Tatsache der zu erwartenden gegenläufigen Kontrolle über das Klasse 3-Regulon und die daraus resultierende Möglichkeit einer wechselseitigen Überprüfung der Ergebnisse.

Bei einem kleinen Satz an Genen mit konservierten  $\sigma^{28}$ -Promotoren konnte die antagonistische Kontrolle durch FliA und FlgM durch die Microarray-Analysen in dieser Arbeit bestätigt werden (Josenhans *et al.*, 2002a). Für das bereits als FliA-kontrolliert beschriebene *flaA*-Gen und das *fliD*-Operon (Leying *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999) konnte hier zusätzlich die negative Regulation durch FlgM bestätigt werden. Das schwach exprimierte *fliD*-Operon wurde dabei nur mittels der sensitiveren PCR-Produkt-Microarrays und durch die RT-PCR-Analysen als FliA/FlgM-kontrolliert ermittelt. Die nachweisbare Resttranskription des Operons in der *fliA*-Mutante und ein neu identifizierter putativer  $\sigma^{54}$ -Promotor deuten auf die Zugehörigkeit des *fliD*-Operons sowohl zur Klasse 2 als auch zur Klasse 3-Flagellenregulon in *H. pylori* hin. Auch in *Salmonella* und *C. jejuni* gehört das *fliD*-Operon zu den Klassen 2 und 3 der Flagellengene (Chilcott & Hughes, 2000; Wösten *et al.*, 2004). Ein zusätzliches Gen, welches in *Salmonella*, *P. aeruginosa* und *C. jejuni* diesen beiden Regulationsklassen zugeordnet wurde, ist *flgM* (Gillen & Hughes, 1993; Dasgupta *et al.*, 2003; Wösten *et al.*, 2004). Übereinstimmend damit wurde auch bei den hier durchgeführten Versuchen in *H. pylori* eine deutliche, aber nicht vollständige transkriptionelle Repression von *flgM* in der *fliA*-Mutante ermittelt. Vor dem Gen konnten konservierte  $\sigma^{54}$ - und  $\sigma^{28}$ -Promotoren ermittelt werden (Colland *et al.*, 2001; Josenhans *et al.*, 2002a). Die Analysen der frühen Regulatoren FlhA und FlhF ergaben deutliche Hinweise auf die Kontrolle von *flgM* durch alle drei für *H. pylori* beschriebenen Sigma-Faktoren (vgl. 4.2.6, Abb. 37).

Bislang in keinem anderen Organismus als FliA/FlgM-abhängig beschrieben wurde das Operon HP1052 (*envA*)/HP1051. Es wird in *H. pylori* analog zu *flaA* durch FliA/FlgM-kontrolliert, ist aber im Gegensatz dazu in der *fliA*-Mutante noch als Transkript nachweisbar. Somit muß es noch von einem anderen als dem  $\sigma^{28}$ -Promotor kontrolliert werden. EnvA ist in *E. coli* in die Lipid A-Synthese involviert und wurde in diesem Bakterium als essenzielles Protein beschrieben (Normark, 1970; Beall & Lutkenhaus, 1987; Young *et al.*, 1995). Auf eine essenzielle Funktion von EnvA mit einer konstitutiven Basaltranskription in *H. pylori* deuten weitere Experimente, bei denen eine Inaktivierung des *envA*-Gens durch Insertion einer Antibiotikaresistenz-Kassette nicht möglich war (C. Josenhans, pers. Mitteilung). Da die Flagellen von *H. pylori* von einer LPS-haltigen Membran (Flagellenhülle) umgeben werden, deren Zusammensetzung der äußeren Zellmembran ähnelt (Geis *et al.*, 1993), liegt es nahe, dass EnvA an der Synthese dieser Struktur beteiligt ist.

Das zweite Gen des Operons, HP1051, zeigt Homologien zu Glykopeptid-Endopeptidasen und könnte evt. ebenfalls in die Zusammensetzung der äußeren Flagellenstruktur involviert sein. Die Zugehörigkeit des Operons zu den späten Klasse 3-Flagellengenen deutet ebenfalls auf eine Funktion der Genprodukte als Komponenten des Flagellensystems hin, die eine Rolle bei den chronologisch letzten Schritten der Flagellenbiogenese spielen, der Synthese des Filaments und der Flagellenhülle.

Das letzte der hier neu ermittelten FliA/FlgM-abhängigen Gene ist HP0472 (*omp11*), welches für ein *H. pylori*-spezifisches äußeres Membranprotein kodiert. Wie bei *flaA* ist für dieses Gen weder durch Northern Blot-Analysen noch durch RT-PCRs ein spezifisches Transkript in den *fliA*-Mutanten nachzuweisen. Daher kann es zusammen mit *flaA* als ausschließlich  $\sigma^{28}$ -kontrolliert zu den Klasse 3 Flagellengenen gruppiert werden (siehe Abb. 37). Funktionell ist eine Einbindung in die Struktur der Flagellenhülle und eine mögliche Wirkung als Flagellen-spezifisches Adhesin naheliegend, eine Hypothese, die zurzeit experimentell überprüft wird. Erste Untersuchungen durch die Herstellung von isogenen Mutanten in *omp11* zeigten keine auffälligen Veränderungen im Phänotyp, der Morphologie oder der Motilität.

Ein weiteres Ergebnis der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigte einen zusätzlichen wichtigen Unterschied in *H. pylori* zu anderen bekannten Flagellenregulons. Bei allen untersuchten Bakterien mit einem Flagellensystem-spezifischen alternativen Sigma-Faktor FliA, wie *Salmonella*, *Pseudomonas spp.* oder *Vibrio spp.*, gehören Flagellenmotor- und Chemotaxisgene zu den Klasse 3- bzw. Klasse 4-Regulons der späten Flagellengene (Eisenbach, 1996; Chilcott & Hughes, 2000; McCarter, 2001; Prouty *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2003). Für *H. pylori* wurde schon zuvor durch *in silico*-Sequenzvergleiche und durch transkriptionelle Analysen die Einbindung einiger dieser Gene in Transkriptionseinheiten zusammen mit Grundstoffwechsel-Genen beschrieben (Beier *et al.*, 1997; Porwollik *et al.*, 1999; Josenhans & Suerbaum, 2000; Spohn & Scarlato, 2001). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inaktivierung der späten Regulatoren FliA und FlgM tatsächlich keinen Einfluß auf die Transkription der gesamten Motor- und Chemotaxisgene in *H. pylori* hatte. Da diese Gene auch nicht von der Mutation von Komponenten des RpoN-Regulons in ihrer Transkription beeinflusst werden (siehe unten), wurden sie der  $\sigma^{80}$ -abhängigen, mit 'Housekeeping'-Genen koregulierten

Klasse 1 der Flagellengene zugeordnet. Interessanterweise werden also die Gene des Flagellenmotors und des Chemotaxis-Systems, die ohne ein intaktes Flagellensystem wahrscheinlich ohne Funktion sind, in diesem Organismus unabhängig von den übrigen Komponenten des Flagellenapparates transkribiert.

Mit den Microarray-Analysen der *fliA*- und *flgM*-Mutanten und die Überprüfung der Ergebnisse durch alternative Methoden konnte in dieser Arbeit diese neue Technologie für *H. pylori* erfolgreich angewendet werden. Das Klasse 3-Regulon unter Kontrolle des antagonistischen FliA/FlgM-Systems konnte hierdurch detailliert charakterisiert werden. Während die Gene *flaA* und HP0472 (*omp11*) unter ausschließlicher Kontrolle dieser Regulatoren stehen, konnten das *fliD*-Operon, HP1122 (*flgM*) und HP1052 (*envA*)/HP1051 in eine neu definierte regulatorische `Zwischenklasse` von Genen eingeordnet werden, die unter der Kontrolle von  $\sigma^{28}$  und einem oder mehreren zusätzlichen Sigma-Faktoren stehen (vgl. Abb. 37). Weder Motor- und Chemotaxisgene und eine Reihe weiterer Klasse 1-Gene noch die mittleren Flagellengene des RpoN-Regulons werden unter den hier gewählten Bedingungen in ihrer Transkription durch die Inaktivierung von FliA oder FlgM wesentlich beeinträchtigt. In *C. jejuni* wurde im Gegensatz dazu ein deutlicher aktivierender Effekt einer *fliA*-Mutation auf die Expression der Klasse 2-Gene unter RpoN-Kontrolle beschrieben (Carrillo *et al.*, 2004). Der Mechanismus, durch den FliA in diesem Organismus direkt oder indirekt reprimierend auf das RpoN-Regulon wirkt, ist allerdings noch nicht aufgeklärt worden. Auch sind die Ergebnisse nur bedingt mit den hier durchgeführten Arbeiten vergleichbar, da in dieser Arbeit die Zellanzucht von *C. jejuni* unter wenig definierten Bedingungen auf festem Medium und nicht in Flüssigkultur erfolgte. Daher können unterschiedliche Wachstumsbedingungen zwischen Mutante und Wildtyp, die sich von den in dieser Arbeit gewählten deutlich unterscheiden, als Ursache für einen Teil der Regulationsereignisse nicht ausgeschlossen werden.

### **4.2.2 Das RpoN-Regulon in *Helicobacter pylori* besteht zum Großteil aus Flagellen-assoziierten Genen**

Der nächste Schritt der Charakterisierung des Flagellenregulons in *H. pylori* war die Ermittlung der Gene unter Kontrolle des alternativen Sigma-Faktors RpoN ( $\sigma^{54}$ ). Während  $\sigma^{54}$  bei der Regulationskaskade der Enterobakterien keine Rolle spielt, wurde seine zentrale Bedeutung in den polaren Flagellensystemen von *C.*

*Crescentus*, *Vibrio spp.*, *Pseudomonas spp.* und *C. jejuni* nachgewiesen (Wu & Newton, 1997; Jagannathan *et al.*, 2001; McCarter, 2001; Prouty *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2003; Hendrixson & DiRita, 2003; Wösten *et al.*, 2004). Bei allen diesen Organismen werden die mittleren, und bei *C. crescentus*, bei dem FliA/FlgM nicht involviert sind, zusätzlich die späten Flagellengene  $\sigma^{54}$ -abhängig transkribiert. Aufgrund der Wachstumsphasen-abhängigen differenziellen Regulation, die durch die Reporterexperimente gezeigt worden war (siehe 4.1), und unterstützt durch Microarray-Vorversuche mit Zellen aus verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase, wurden für die Experimente Zellen aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Um auch eventuelle stammspezifische Unterschiede, bedingt durch die große genetische Variabilität verschiedener *H. pylori*-Isolate (Suerbaum, 2000) abzudecken, wurden die Experimente in zwei unterschiedlichen Stämmen durchgeführt.

Es konnte ein Satz von Genen ermittelt werden, der in den *rpoN*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp negativ reguliert ist, auf den RpoN also einen aktivierenden Einfluss hat. Hierzu gehörten zum einen bereits beschriebene Klasse 2-Gene, die hauptsächlich für definierte Bereiche der Flagellenstruktur kodieren (vgl. Abb. 4, Abb. 5), wie *flaB*, *flgK*, *flgE1*, HP0906 und HP1120/HP1119 (*flgL*) (Suerbaum *et al.*, 1993; Eaton & Krakowka, 1994; Spohn & Scarlato, 1999; Josenhans & Suerbaum, 2000; Fujinaga *et al.*, 2001). Für vier Gene in zwei Operons wurde gezeigt, dass sie einer komplexeren Regulation unterliegen als zuvor angenommen, und zusätzlich zu dem  $\sigma^{54}$ -abhängigen- noch mindestens ein weiteres Transkript gebildet wird. Hierzu zählen die Gene für zwei Strukturkomponenten des proximalen Flagellenhakens, FlgB und FlgC (HP1559/HP1558), sowie die Gene HP0907/HP0908, die für das Flagellenhaken-Chaperon Ortholog FlgD (Hirano *et al.*, 2003) und für FlgE2, ein homologes Protein des Hakenproteins FlgE1, kodieren (O'Toole *et al.*, 1994b). Alle diese Gene wurden bereits zuvor in *H. pylori* als Angehörige des RpoN-Regulons beschrieben (Spohn & Scarlato, 1999). Diese Gene stehen auch in den anderen gut untersuchten Organismen mit polaren Flagellen unter  $\sigma^{54}$ -Kontrolle bzw. gehören zu den Klasse 2-Flagellengenen in *Salmonella* (Macnab, 1996). Für FlgE2 konnte hier die Verbindung zum *H. pylori*-Flagellensystem gezeigt werden, indem das Gen inaktiviert wurde, was einen flagellenlosen Phänotyp zur Folge hatte. Auch wurde gezeigt, dass überexprimiertes FlgE2 von einem gegen native *H. pylori*-Flagellen gerichteten Antiserum spezifisch detektiert wird. Das Gen HP0114, welches in

gleicher Leserichtung ca. 80 Bp `downstream` von *flaB* beginnt, wurde durch die Microarray-Analysen ebenfalls als RpoN-abhängig charakterisiert. Wahrscheinlich wird es teilweise mit dem Flagellin koreguliert. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde für HP0114 eine Funktion bei der Glykosylierung von Flagellin in *H. pylori* nachgewiesen (Schirm *et al.*, 2003). Somit könnte es für das Bakterium sinnvoll sein, die Expression dieses Gens mit der Flagellinexpression zu synchronisieren.

Zusätzlich zu der Bestätigung bekannter RpoN-abhängiger Gene konnten durch die hier durchgeführten Analysen fünf weitere Gene mit konservierten  $\sigma^{54}$ -Promotorsequenzen ermittelt werden, die bislang in keinem anderen Organismus als RpoN-abhängig beschrieben sind oder dem Flagellensystem zugeordnet wurden. Hierzu zählen die drei hypothetischen Gene HP1076, HP1154 und HP1233, sowie die Gene mit funktionell bekannten Orthologen in anderen Organismen, HP1155 (*murG*) und HP0869 (*hypA*). Das Gen HP1155 (*murG*) kodiert für eine potenzielle Glykosyltransferase der Peptidoglykan-Biosynthese und könnte somit eine mögliche Funktion bei der Verankerung der Flagellen haben. In *E. coli* bewirkt die Mutation von *murG* signifikante Veränderungen der Zellform und schließlich die Lyse der Zelle (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1991). HP1154 bildet das erste Gen im Operon mit *murG*. Eine schwache Proteininteraktion mit dem Flagellin FlaA (PBS=D 0,01; Hybrigenics PimRider<sup>TM</sup>, Rain *et al.*, 2001), könnte auf die Einbindung von HP1154 in die Biosynthese des *H. pylori*-Flagellenapparates hindeuten. Starke Interaktionen mit dem Flagellinchaperon FliS werden in derselben Datenbank für das Protein HP1076 beschrieben (PBS=A 1e-50). Erste Experimente mit einer isogenen Mutante deuten aufgrund von Variationen des Flagellenphänotyps, insbesondere Instabilität der Flagellenhülle, auf einen funktionellen Zusammenhang mit dem Flagellensystem hin. Für ein weiteres hypothetisches  $\sigma^{54}$ -abhängiges Protein, HP1233, ergaben sich nach genaueren Sequenzanalysen Aminosäureähnlichkeiten zu der Flagellensystem-assoziierten Muraminidase FlgJ aus *S. typhimurium*. Während für *Salmonella* die essenzielle Funktion dieses Proteins bei der Ausbildung des Flagellenstabs durch partielle Hydrolyse des Peptidoglykans gezeigt wurde (Nambu *et al.*, 1999), konnte für *H. pylori* bislang kein orthologes Gen identifiziert werden (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Erste funktionelle Analysen in *H. pylori* zeigten bei Inaktivierung des Gens deutliche Veränderungen der Flagellenmorphologie, bspw. weniger oder verkürzte Flagellen, die auf einen Zusammenhang von HP1233 mit dem Flagellensystem hindeuten. Weitere funktionelle Analysen, wie die Bestimmung einer

möglichen Muraminidase-Aktivität, könnte die Funktion dieses Proteins in Zukunft näher charakterisieren. Das einzige RpoN-abhängige Gen, welches für ein annotiertes Protein mit einer Funktion außerhalb des Flagellensystems kodiert, ist *hypA* (HP0869), von dem hier mittels RT-PCR gezeigt wurde, dass es mit dem Flagellenhaken-Gen *flgE1* ein Kotranskript bildet. Für das Nickel-bindende Protein HypA wurde gezeigt, dass es in *H. pylori* für die Reifung der funktionsfähigen Hydrogenase- und Urease-Proteinkomplexe notwendig ist (Mehta *et al.*, 2003). Somit stellt das Gen in *H. pylori* eine Verbindung der für Persistenz und Virulenz des Organismus wichtigen Faktoren Motilität, Urease- und Hydrogenase-Expression dar (Eaton & Krakowka, 1994; Tsuda *et al.*, 1994; Olson & Maier, 2002; Kavermann *et al.*, 2003). Die  $\sigma^{54}$ -Abhängigkeit von *hypA* könnte daher auch den negativen Effekt von Mutationen in *flhA* auf die Urease-Aktivität in *H. pylori* erklären (McGee *et al.*, 2002), da, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, unter anderem das gesamte RpoN-Regulon in *flhA*-Mutanten reprimiert ist (vgl.4.2.4).

RpoN stellt also einen für das Flagellensystem zentralen positiven Regulator dar, der die Transkription von mindestens 16 unterschiedlichen Genen komplett oder zusätzlich zu einem anderen Promotor kontrolliert. Das Gen *hypA* scheint dabei als einziges nicht direkt in die Flagellen-Biogenese eingebunden zu sein und stellt eine Verbindung zu den Virulenzfaktoren Urease und Hydrogenase dar. Für alle übrigen Gene konnte ein Bezug zum Flagellensystem hergestellt werden, wobei sie zum Großteil für den Aufbau der mittleren Flagellenstruktur zuständig zu sein scheinen. Das  $\sigma^{54}$ -kontrollierte Klasse 2-Flagellenregulon in *H. pylori* ist somit deutlich kleiner im Vergleich zu anderen Organismen, wie *C. crescentus*, *Vibrio spp.* oder *Pseudomonas spp.*, bei denen zusätzlich zu den mittleren Flagellengenen auch die Gene der frühen Basalkörperstruktur durch RpoN und entsprechende Aktivatoren transkriptionell kontrolliert werden (Wu & Newton, 1997; McCarter, 2001; Prouty *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2003). Eine ähnliche Anzahl und Zusammensetzung der Gene des RpoN-Regulons wie bei *H. pylori* scheint dagegen im phylogenetisch eng verwandten Bakterium *C. jejuni* zu existieren (Hendrixson & DiRita, 2003; Carrillo *et al.*, 2004; Wösten *et al.*, 2004). Allerdings wurden hier bislang nur einzelne Gene mit identifizierten  $\sigma^{54}$ -Promotoren untersucht, und nicht, wie in dieser Arbeit, ein globaler Ansatz zur Charakterisierung des gesamten RpoN-Regulons durchgeführt.



Durch Arbeiten in *Salmonella* und *C. crescentus* wurde während des Zellzyklus eine zeitliche Staffelung der Expression einzelner Gene innerhalb der unterschiedlichen Flagellengruppen, einhergehend mit ihrer strukturellen Aufeinanderfolge im Flagellenapparat, beschrieben (Laub *et al.*, 2000; Kalir *et al.*, 2001). In dieser Arbeit lieferten die vergleichenden Transkriptomanalysen erste Hinweise auf eine Wachstumsphasen-abhängige differenzielle Regulation von Genen innerhalb des *H. pylori* RpoN-Regulons. Um diese zeitlich engen Regulationsereignisse des Zellzyklus innerhalb eines Regulons genauer zu untersuchen, wäre eine Synchronisation des Zellzyklus der Bakterien notwendig. Aufgrund des anspruchsvollen Wachstums und der langen Verdopplungszeiten von *H. pylori* konnte eine solche Synchronisation bislang jedoch noch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Reproduzierbarkeit vieler Ergebnisse mit RNA-Präparationen derselben Wachstumsphase bei unterschiedlichen biologischen Experimenten durch Microarray-Analysen, Reporter-Experimente und Northern Blots oder RT-PCRs, weist auf eine Synchronisation des Zellzyklus der Bakterien auch beim Wachstum in nährstofflimitierter Flüssigkultur hin. Voraussetzung dafür ist die hier praktizierte Verwendung definierter Vorkulturen. Die synchronisierte, zeitlich gestaffelte Expression von Flagellengenen innerhalb einzelner Regulons bei dem Wachstum in nährstofflimitierter Kultur ohne gezielte Synchronisation wurde bereits für *E. coli* beschrieben (Kalir *et al.*, 2001). Der Mechanismus dieser Autosynchronisation der Bakterien ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Als eine mögliche Erklärung des Phänomens wird aber die Kommunikation durch Signalmoleküle innerhalb der Bakterienkultur diskutiert.

Zusätzlich zu der Charakterisierung der Gene unter der Kontrolle des alternativen Sigma-Faktors RpoN in *H. pylori* lieferten die Transkriptomanalysen mit den *rpoN*-Mutanten ein weiteres interessantes Ergebnis. Übereinstimmend mit früheren Ergebnissen der Untersuchung des Hakenproteins FlgE1 (O'Toole *et al.*, 1994a), konnte keine negative 'Feedback'-Regulation der Klasse 2-Gene auf die zuvor ermittelten späten Flagellengene des Klasse 3-Regulons festgestellt werden. Dies steht im Kontrast zur Regulationskaskade der Flagellenbiosynthese in Enterobakterien und anderen Organismen mit flagellenspezifischem  $\sigma^{28}$ -Faktor. Dort blockiert ein unvollständiger Basalkörper/Haken-Komplex durch die Hemmung des Exports von FlgM die Transkription der späten Flagellengene (Karlinsky *et al.*,

2000a). Für *H. pylori* scheint daher ein alternativer Mechanismus der Inaktivierung des Anti-Sigma-Faktors FlgM zu existieren, als der Export durch das Typ III-Flagellen-Sekretionssystem. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass ein orthologes Protein zu dem FlgM spezifischen Exportchaperon FlgN aus *Salmonella* in *H. pylori* nicht identifiziert werden konnte (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Untersuchungen zum Mechanismus der FlgM-Inaktivierung werden derzeit in der Arbeitsgruppe von C. Josenhans durchgeführt. Während das *flaA*-Transkript wie zuvor beschrieben in der *rpoN*-Mutante in äquivalenten Mengen zum Wildtyp vorhanden war, war in Proteinextrakten der Mutanten FlaA, genau wie FlaB und FlgE, nicht mehr nachweisbar. Die fehlende Ausbildung der mittleren Flagellenstruktur mit dem Basalkörper/Haken-Komplex durch die *rpoN*-Mutation scheint also eine posttranskriptionelle Rückkopplung auf die FlaA-Expression zu bewirken. Dies könnte durch eine Destabilisierung des *flaA*-Transkripts erreicht werden, durch die Induktion einer schnellen Proteolyse des FlaA-Proteins im Zytoplasma der Zelle, oder einer direkten Störung der Translation von *flaA*.

#### **4.2.3 Das RpoN-assoziierte Zwei-Komponenten-System FlgR/HP0244 (FlgS) kontrolliert denselben Satz an Genen wie RpoN**

Ein bei einer großen Zahl unterschiedlicher Bakterien konservierter regulatorischer Mechanismus ist die Aktivierung des  $\sigma^{54}$ -Holoenzym durch einen spezifischen Aktivator. Der alternative Sigma-Faktor RpoN bindet im Komplex mit dem RNA-Polymerase-Holoenzym an die konservierten -12 und -24 Bereiche des  $\sigma^{54}$ -Promotors. Dort liegen die Proteine als geschlossener Komplex inaktiv gebunden vor, bis er von einem spezifischen Regulator (‘EBP’, enhancer binding protein), der vor dem Promotor gelegene Aktivierungssequenzen erkennt, aktiviert wird und die Transkription initiiert (Buck *et al.*, 2000; Xu & Hoover, 2001). Für *H. pylori* wurde ein ‘Response-Regulator’ der NtrC-Familie (nitrogen regulatory protein C; Porter *et al.*, 1995), das Protein FlgR, als RpoN-spezifischer Aktivator identifiziert (Spohn & Scarlato, 1999). Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien konnte kürzlich für FlgR gezeigt werden, dass es RpoN unabhängig von einer Aktivierungssequenz stimuliert (Brahmachary *et al.*, 2004). Als zugehörige Histidinkinase, die FlgR spezifisch phosphoryliert, wurde das Protein FlgS (HP0244) ermittelt (Beier & Frank, 2000). Diese Sensor kinase scheint zytoplasmatisch vorzuliegen, da keine Transmembrandomäne aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden kann. Bislang sind noch

keine spezifischen Signale identifiziert worden, die zur Autokinaseaktivität von FlgS führen, und damit die Transkription des RpoN-Regulons aktivieren. Zur Kontrolle der Ergebnisse zum RpoN-Regulon und um die Möglichkeit zu überprüfen, ob FlgR oder FlgS unabhängig von RpoN die Transkription weiterer Gene steuern, wurden auch mit Mutanten der Gene dieser beiden Regulatoren genomweite Microarray-Analysen durchgeführt.

Für alle bei den vorhergehenden Untersuchungen dieser Arbeit ermittelten  $\sigma^{54}$ -abhängigen Gene konnte auch in den *flgR*- und *flgS*-Mutanten eine Repression nachgewiesen werden. Somit konnten sowohl die Zugehörigkeit der zuvor ermittelten Gene zum RpoN-Regulon verifiziert werden, als auch die Funktion des Zwei-Komponenten-Systems FlgS/FlgR als positiver Regulator von RpoN bestätigt werden. Die Deckungsgleichheit der regulierten Gene zeigt weiterhin, dass FlgR im Zusammenspiel mit FlgS unter den gewählten Bedingungen der einzige positive Regulator von RpoN ist. Demgegenüber sind in den Flagellenregulons von anderen untersuchten Organismen jeweils zwei  $\sigma^{54}$ -Aktivatoren in die Regulationshierarchie eingebunden. In *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *Pseudomonas spp.* steuern die übergeordneten Aktivatoren FlaK, FlaR und FleQ, zusammen mit  $\sigma^{54}$ , die Expression der frühen Flagellengene inklusive der Zwei-Komponenten-Systeme FlaLM, FlrBC oder FleSR, die sich jeweils aus einer Sensorkinase mit dazu-gehörigem NtrC-Homolog zusammensetzen (McCarter, 2001; Prouty *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2003). Diese Zwei-Komponenten-Systeme induzieren dann die Expression der Gene, die für die Fertigstellung des Basalkörper/Haken-Komplexes nötig sind. Hierdurch wird das RpoN-Regulon bei diesen Bakterien in zwei hierarchische Klassen unterteilt. Bei *C. crescentus* gibt es eine ähnliche regulatorische Hierarchie, wobei hier der übergeordnete Aktivator CtrA mit dem 'Housekeeping'-Faktor  $\sigma^{73}$  die Transkription der Klasse 2-Flagellengene steuert, die die Gene für das  $\sigma^{54}$ -spezifische Zwei-Komponenten-System FlbDE beinhalten (Wu & Newton, 1997; Osteras & Jenal, 2000). Die offensichtliche Abwesenheit eines solchen übergeordneten Aktivators ist ein wesentlicher Unterschied des *H. pylori*-Flagellensystems im Vergleich zu denen der oben genannten Organismen.

Zusätzlich zu den Genen des RpoN-Regulons konnte ein negativer Effekt der Mutation in *flgR* und *flgS* auf die Transkriptmenge einer kleinen Zahl an Genen nachgewiesen werden, deren Transkription in den *rpoN*-Mutanten im Vergleich zum

Wildtyp nicht beeinträchtigt ist. In den *flgR*-Mutanten waren die Transkriptmengen eines längeren Sequenzbereichs (HP1035-HP1028) signifikant erniedrigt. Dieser beinhaltet unter anderem die Gene einiger Regulatoren des Flagellensystems, *flhF*, *flhG* und *fliA*. Interessanterweise war dadurch aber nicht die Transkription der von diesen Regulatoren abhängigen Gene betroffen (vgl. 4.2.1 und 4.2.4), so dass noch eine ausreichende Basaltranskription für eine dem Wildtyp vergleichbare Funktion der Proteine stattzufinden scheint. Das stimmt überein mit der Anwesenheit eines putativen  $\sigma^{80}$ -`Housekeeping`-Promotors vor dem Operon (Spohn & Scarlato, 2001). Ca. 150 Bp `upstream` von *fliA* (HP1032) konnte bei einer erneuten Analyse der Sequenz eine zusätzliche konservierte  $\sigma^{54}$ -Promotorsequenz identifiziert werden, die für den Einfluß auf die Transkription des Operons durch den  $\sigma^{54}$ -assoziierten Regulator FlgR verantwortlich sein könnte. Ein weiteres Gen, welches durch die *flgR*-Analysen, nicht aber in Untersuchungen der *rpoN*-Mutanten als negativ reguliert ermittelt wurde, ist der hypothetische Leserahmen HP0367. Vor diesem Gen konnte ebenfalls ein konservierter  $\sigma^{54}$ -Promotor lokalisiert werden. Auch bei den Experimenten mit dem inaktivierten *flgS* wurde HP0367 zusammen mit dem in derselben Leserichtung nachfolgendem Gen HP0366 (`spore coat biosynthesis protein C`) als reguliert ermittelt. Die konservierten  $\sigma^{54}$ -Promotorsequenzen der Gene, für die ein Einfluß der RpoN-assoziierten Proteine FlgR und FlgS, nicht aber von RpoN selber nachgewiesen werden konnte, deuten auf eine teilweise Zugehörigkeit zum RpoN-Regulon hin. Da noch zusätzliche regulatorische Faktoren in die Steuerung der Transkription der Operons eingebunden zu sein scheinen, erfolgte eine Gruppierung zu den `Zwischenklasse`-Genen (vgl. Abb. 37).

Im Gegensatz zu den *rpoN*- und *flgR*-Mutanten wurde in der *flgS*-Mutante eine deutlich erhöhte mRNA-Menge für *flaA* nachgewiesen. Von Spohn und Scarlato wurde eine gesteigerte *flaA*-Transkription in den Experimenten mit der *flgR*-Mutante für *H. pylori* beschrieben (Spohn & Scarlato, 1999). Diese Transkriptionsanalysen wurden basierend auf Zellen aus einer späteren Phase des exponentiellen Wachstums durchgeführt als es bei den hier ermittelten *flgR*-Resultaten der Fall war. Da auch die hier durchgeführten Experimente mit den *flgS*-Mutanten basierend auf Zellen aus einem etwas späteren Zeitpunkt im exponentiellen Wachstum durchgeführt wurden als bei den *flgR*- und *rpoN*-Mutanten, ist eine gegenläufige Regulation von *flaA* mit Genen des RpoN-Regulons in Abhängigkeit von der Wachstums-

phase wahrscheinlich. Die Mechanismen einer solchen Regulation sollen bei verschiedenen Wachstumsphasen in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden.

#### **4.2.4 FlhA ist ein übergeordneter Regulator der Transkription der Klasse 2- und 3-Flagellengene**

Nachdem es durch die Microarray-Analysen zu den Regulatoren der mittleren und späten Flagellengene in *H. pylori* keinen Hinweis auf eine `Feedback`-Regulation durch Proteine der einen Klasse auf die Genexpression der anderen Klasse gab, wurden weitere mögliche Kandidaten für eine koordinierte Kontrolle der verschiedenen Flagellenregulons und Einfluss auf nicht-flagelläre Gene untersucht.

Ein Protein, für das ein Einfluss auf die Transkription von einigen  $\sigma^{54}$ - und  $\sigma^{28}$ -abhängigen Flagellengenen in *H. pylori* gezeigt werden konnte, ist die Komponente FlhA des Flagellen-Sekretionsapparates. Das Protein gehört zur konservierten sog. FHIEP-Familie (flagellar/Hr/invasion proteins export pore) von Exportproteinen, die in die Typ III-Sekretion und den Flagellenaufbau bei unterschiedlichen Bakterien involviert sind (Macnab, 2003). Für die Enterobakterien wurde gezeigt, dass FlhA membranständig mit dem Basalkörper MS-Ring (FliF) assoziiert ist und über eine zytoplasmatische Domäne mit der ATPase FliI und anderen löslichen Komponenten des Exportapparates interagiert und dadurch eine zentrale Stellung bei der Typ III-Sekretion von Flagellenkomponenten einnimmt (Macnab, 2003). In einer in dieser Arbeit weiter untersuchten *H. pylori* N6 *flhA*-Mutante wurde bereits in früheren Arbeiten eine Repression der Expression der Klasse 2- und 3-Flagellengene FlaB, FlgE1 und FlaA beschrieben (Schmitz *et al.*, 1997). Auch wird die Virulenz von *H. pylori* durch die Inaktivierung von *flhA* herabgesetzt, wahrscheinlich bedingt durch den flagellenlosen, unbeweglichen Phänotyp. So ist die Fähigkeit, *in vitro* an humane gastrische Epithelzellen zu binden, im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt, genau wie die Kolonisationsrate in einem Mausmodell (Clyne *et al.*, 2000; McGee *et al.*, 2002). Außerdem wurde ein deutlicher Effekt einer *flhA*-Mutation auf die Aktivität des Virulenzfaktors Urease in dem Bakterium beschrieben, der zum Teil stamm-spezifisch zwischen Aktivierung und Repression wechselt (McGee *et al.*, 2002). Dieser Effekt kann möglicherweise indirekt mit der hier gezeigten Repression der Klasse 2-Gene in einer *flhA*-Mutante erklärt werden (siehe unten). Das Produkt des  $\sigma^{54}$ -abhängigen Gens HP0869 (vgl. 4.2.2) ist als Hydrogenase HypA essenziell für die Reifung und Aktivität des Urease-Enzymkomplexes (Mehta *et al.*, 2003), und

könnte so die Verbindung zwischen FlhA und der Regulation der Urease-Aktivität vermitteln. Auch bei einer Reihe weiterer humanpathogener Bakterien wird die Verbindung der FlhA-Expression zur Virulenz des Organismus beschrieben. So wird in *C. coli* und in *P. aeruginosa* *in vitro* eine deutlich geringere Invasivität in Epithelzellen nach Mutation des *flhA*-Gens, auch nach Aufzentrifugieren der Bakterien beobachtet (Park *et al.*, 2000; Fleiszig *et al.*, 2001). In dem peritrich begeißelten, uropathogenen Bakterium *Proteus mirabilis* wurde in einer *flhA*-Mutante neben dem negativen Effekt auf die Ausbildung von Flagellen auch eine direkte inhibierende Auswirkung auf die Virulenz nachgewiesen, da unter anderem die Expression des Gens *hpmA* blockiert war, welches für ein toxisches Hämolysin kodiert (Gygi *et al.*, 1995). Für *Yersinia enterocolitica* und *Bacillus thuringiensis* wurde die Anwesenheit von funktionellem FlhA als notwendig für die Sekretion von Virulenzfaktoren nachgewiesen (Young *et al.*, 1999; Ghelardi *et al.*, 2002).

Durch eine globale Analyse des von FlhA abhängigen Transkriptionsprofils in zwei verschiedenen *H. pylori*-Stämmen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression sämtlicher Klasse 2- und 3-Flagellengene, sowie einiger zusätzlicher Gene von diesem Faktor abhängt. Unabhängig von dem hier untersuchten *H. pylori*-Isolat war die Transkriptmenge sämtlicher zuvor bestimmter Klasse 2- und 3-Flagellengene in den *flhA*-Mutanten signifikant reprimiert. Da Klasse 2 und 3-Gene von FlhA kontrolliert werden, waren auch solche Gene deutlich reprimiert, für die sowohl  $\sigma^{54}$ - als auch  $\sigma^{28}$ -Promotoren postuliert wurden. Hierzu gehören die Gene *flgM* und HP0751-53 (*flid*-Operon), die in den vorhergehenden Experimenten mit Mutanten in Klasse 2 oder Klasse 3-Regulatoren nur partiell in ihrer Transkription beeinträchtigt waren. Eine niedrige Basal-Transkription von *flgM* in den *flhA*-Mutanten konnte durch RT-PCR Untersuchungen nachgewiesen werden und deutet auf die zusätzliche Anwesenheit eines  $\sigma^{80}$ -Promotors hin. Inzwischen konnte FlgM auch als Protein in den *flhA*-Mutanten nachgewiesen werden (C. Josenhans, unveröffentlicht).

Übereinstimmend mit den in dieser Arbeit beobachteten Effekten einer Inaktivierung von *flhA* in *H. pylori* wurde durch genomweite Microarray-Analysen kürzlich auch für das phylogenetisch nahestehende Bakterium *C. jejuni* die Repression der Klasse 2- und 3-Flagellengene durch Mutation des *flhA*-Gens beschrieben (Carrillo *et al.*, 2004). Somit kontrolliert FlhA die Expression der mittleren und späten Flagellengene

bei diesen beiden Organismen, für die im Gegensatz zu anderen gut untersuchten Bakterien bislang keine Regulatoren an der Spitze einer Hierarchie der Flagellenbiosynthese identifiziert werden konnten (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Parkhill *et al.*, 2000).

Zusätzlich zu den Klasse 2 und 3-Flagellengenenen wurde auch einige zusätzliche Gene als von FlhA, und teilweise von FlhF (siehe 4.2.5), kontrolliert ermittelt, die in die intermediäre Klasse von Genen im derzeitigen Arbeitsmodell eingeordnet wurden (siehe Abb. 37). Hierzu gehören die Gene unbekannter Funktion HP0488 und HP1440. Für HP0488 wurde eine Proteininteraktion mit FlgE1 und FlgB beschrieben (PBS=B 1 e-6; PBS=D 0,04; Hybrigenics PimRider™), die ein Hinweis auf eine Einbindung des Proteins in die Flagellenbiogenese sein könnte. Des Weiteren sind die Gene für das Zwei-Komponenten-System HP0166/HP0165 in der *flhA*-Mutante reprimiert. Das durch dieses Zwei-Komponenten-System kontrollierte Regulon wurde in zwei kürzlich erschienenen Arbeiten durch verschiedene globale Ansätze mittels Transkriptom-Analysen mit einer HP0165-Mutante (Forsyth *et al.*, 2002) und durch genomweite Selektion der spezifisch von dem `Response-Regulator` HP0166 erkannter Promotorsequenzen (Dietz *et al.*, 2002). Die hierbei ermittelten Zielgene des Zwei-Komponenten-Systems wiesen allerdings in den beiden Arbeiten nur geringe Überschneidungen auf, evtl. aufgrund von stammspezifischen Unterschieden der untersuchten *H. pylori*-Isolate (Dietz *et al.*, 2002; Forsyth *et al.*, 2002). Die durch diese Arbeiten als von dem Zwei-Komponenten-System abhängig beschriebenen Gene wurden hier nicht als FlhA-reguliert ermittelt. Säureeinwirkung wurde kürzlich als ein mögliches aktivierendes Signal von HP0165 beschrieben (Pflock *et al.*, 2004), die unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen nicht erfolgt. Daher ist dieses Zwei-Komponenten-System unter den hier gewählten Bedingungen möglicherweise nicht oder nur in geringem Maße aktiv. Bei den entsprechenden Signalen *in vivo* könnte der regulatorische Einfluß von FlhA auf die Transkription der Gene aber eine weitere Verbindung des Flagellensystems zu anderen Zellfunktionen darstellen. Durch kompetitive Experimente mit dem Wildtyp wurde ausserdem gezeigt, dass Mutanten in HP0166/0165 *in vivo* einen Kolonisationsdefekt aufweisen (Panthel *et al.*, 2003).

Eine weitere Gruppe, deren Transkriptmenge bei den Experimenten in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp verändert war, umfasst Gene, die nur in einem der beiden

untersuchten *H. pylori*-Stämmen als FlhA-abhängig ermittelt wurden. Hierbei handelt es sich neben Genen unbekannter Funktion vor allem um Stoffwechselgene und Gene des Polymertransports. Für zwei potenziell flagellenassoziierte Gene aus dieser Gruppe konnte die stammspezifische Regulation durch weitere Methoden bestätigt werden. Dabei handelt es sich um zwei paraloge Gene des in der Flagellenhülle enthaltenden fibrillären Hämagglutinins HpaA (Evans *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1995). Um einen möglichen Hinweis auf den Mechanismus dieser stammspezifisch unterschiedlichen Transkription der HpaA-Paraloge zu erhalten, wurden daraufhin die potenziellen Promotorsequenzen der Gene in den hier untersuchten und einigen zusätzlichen *H. pylori*-Stämmen analysiert. Die Sequenzierung der nicht-kodierenden `upstream`-Sequenzen der drei HpaA-Paraloge HP0410, HP0492 und HP0797 in 6 verschiedenen *H. pylori*-Isolaten erbrachten zwar eine Variabilität der Sequenzbereiche, aber keinen eindeutigen Hinweis auf verschiedene regulatorische Elemente oder veränderte Promotoren (C. Josenhans, unveröffentlicht).

#### **4.2.5 FlhF fungiert als weiterer früher Regulator der Klasse 2- und 3-Flagellengene**

Das zweite Protein aus der Reihe der frühen Flagellengene, dessen genomweiter Einfluß auf die Genregulation in *H. pylori* untersucht wurde, ist FlhF (HP1035). Dieses Protein gehört zur ubiquitären Familie der `signal recognition particle` (SRP), die in den gerichteten Transport zu membrangebundenen Translokationsapparaten von Proteinen in Pro- und Eukaryonten involviert sind (Keenan *et al.*, 2001). Bei Bakterien ist das am weitesten verbreitete Mitglied dieser Gruppe das in die Zellteilung involvierte Protein Ffh, das mit dem SRP-Rezeptor FtsY interagiert (Park *et al.*, 2002). Diese beiden Proteine besitzen eine GTPase-Aktivität, und zeichnen sich durch ein charakteristisches GTP-Bindemotif, das NG-Modul aus (Keenan *et al.*, 2001). Dieses Motif findet sich auch bei *H. pylori*-FlhF sowie dem `downstream` gelegenen GTP-Bindeprotein YlxH (HP1034), einem Protein homolog zu FleN aus *Pseudomonas spp.* (z. B. *P. putida*: 32% Identität/60% Ähnlichkeit) bzw. FlhG aus *V. parahaemolyticus* (38%/58%). Für FlhF und FleN wurde in *Pseudomonas* eine Funktion bei der Kontrolle von Anzahl und Polarität der Flagellen beschrieben (Dasgupta *et al.*, 2000; Pandza *et al.*, 2000). Während auch in anderen Bakterien mit polarer Flagellenanordnung wie *C. jejuni* oder *Vibrio spp.* FlhF- und FleN-Homologe



identifiziert wurden, sind diese Proteine bei den peritrich begeißelten Enterobakterien nicht vorhanden. Bei *P. putida* führt die Inaktivierung von *flhF* zu einer zufälligen lateralen Verteilung und einer höheren Anzahl an Flagellen im Vergleich zu den polaren Flagellen beim Wildtyp (Pandza *et al.*, 2000). Demgegenüber wurde eine *flhF*-Mutante in *Bacillus subtilis* als nicht mehr beweglich und flagellenlos beschrieben (Carpenter *et al.*, 1992). Die hier untersuchten *flhF*-Mutanten in *H. pylori* N6 und 88-3887 waren unbeweglich und fast ohne Ausnahme flagellenlos. Wenige Bakterien zeigten auch ein oder zwei kurze Flagellen, die wie bei der *Pseudomonas*-Mutante lateral inseriert waren. Da erste Experimente mit den *flhF*-Mutanten in *H. pylori* einen deutlichen negativen Effekt auf die Transkriptmenge der Klasse 2- und 3-Flagelligene *flaA* und *flaB* zeigten, schien FlhF ein weiterer geeigneter Kandidat in Hinblick auf eine übergeordnete Regulation der Expression der Flagellengene zu sein.

Die *flhF*-Mutanten verhalten sich in ihrem globalen Transkriptionsprofil sehr ähnlich wie die *flhA*-Mutanten. Genau wie bei diesen sind sämtliche Klasse 2 und 3 Flagellengene reprimiert, einschließlich der Gene der intermediären Klasse. Der einzige auffällige Unterschied im Bezug auf die Expression der Flagellengene war eine transkriptionelle negative Autoregulation des *flhF*-Operons (HP1035-HP1028) in der *flhF*-, nicht aber in der *flhA*-Mutante. Ein polarer Effekt der Insertionsmutation in *flhF* auf die `downstream`-Gene konnte dabei durch die Verwendung einer apolaren Resistenzkassette ausgeschlossen werden. Außerdem zeigte die teilweise Wiederherstellung der Transkription des Operons in der *flhF/flgM*-Doppelmutante (siehe 4.2.6), dass die Repression regulatorisch bedingt ist und kein Artefakt der Mutagenese. Da das *flhF*-Operon auch das Gen *fliA* (HP1032) beinhaltet, besteht die Möglichkeit, dass die heruntergesetzte Transkriptmenge der Klasse 3-Gene teilweise durch die Repression des Gens für  $\sigma^{28}$  bedingt wird. Demgegenüber sind die Gene, die für Regulatoren der Klasse 2 kodieren, *rpoN*, *flgR* und HP0244, in den *flhF*-Mutanten genau wie in den *flhA*-Mutanten in ihrer Transkription zum Wildtyp nicht verändert. Die zusätzlichen, stammspezifisch regulierten Gene in den *flhF*-Mutanten beinhalten, wie auch bei den *flhA*-Mutanten, unterschiedliche Genfamilien, und wurden aufgrund einer fehlenden Kontrolle einer allgemeinen Bedeutung für die Spezies vorerst nicht weiter bearbeitet.

Das GTP-bindende Protein FlhF kann also zusammen mit FlhA funktionell als übergeordneter Regulationsfaktor der mittleren und späten Flagellengene in *H. pylori* bezeichnet werden. Der teilweise beobachtete Phänotyp mit verkürzten lateral inserierten Flagellen deutet wie bei den Pseudomonaden auf eine Funktion bei der polaren Lokalisation der Flagellen hin. Dafür spricht, neben der Zugehörigkeit zur SRP-Familie der Translokationsproteine, dass FlhF bislang ausschließlich bei Organismen mit polarem Flagellenapparat identifiziert werden konnte. Ein wichtiger Unterschied zu *P. putida* ist, dass bei diesem Organismus durch eine Inaktivierung von *flhF* die Expression der Flagellengene nicht beeinträchtigt ist, sondern sogar eine größere Anzahl an Flagellen ausgebildet wird (Pandza *et al.*, 2000). Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch eine nähere Untersuchung des FleN-Homologs HP1034 (YlxH/FlhG) in *H. pylori*, das in den *flhF*-Mutanten noch exprimiert wird. Bei *P. aeruginosa* agiert dieses Protein als Anti-Aktivator und inhibiert FleQ, den übergeordneten  $\sigma^{54}$ -Aktivator der Expression der Flagellengene (Dasgupta & Ramphal, 2001).

#### **4.2.6 FlgM vermittelt die transkriptionelle Repression der Klasse 3-Flagellengene in den *flhA*- und *flhF*-Mutanten und der Klasse 2-Flagellengene in *flhA*-Mutanten**

Als nächster Schritt wurde der Mechanismus näher untersucht, durch welchen die Flagellensystem-Komponenten FlhA und FlhF die Transkription der Klasse 2 und 3 Flagellengene und zusätzlicher Gene steuern. Bei beiden Proteinen gibt es keine Sequenzhinweise auf DNA-Bindedomänen. Daher scheint ein indirekter Mechanismus der Genregulation unter Einbeziehung weiterer Faktoren wahrscheinlicher als eine direkte transkriptionelle Regulation durch die beiden Proteine. In *Salmonella* stellt der Anti-Sigma-Faktor FlgM den entscheidenden Faktor beim Umschalten der Transkription der Klasse 2 auf die Klasse 3 Flagellengene dar (Chilcott & Hughes, 2000; Karlinsey *et al.*, 2000a). Um auch in *H. pylori* eine mögliche Rolle von FlgM in einer `Feedback`-Regulation durch die frühen Komponenten des Sekretionsapparates zu prüfen, wurden Doppelmutanten in dem Genen *flgM* sowie *flhA* oder *flhF* hergestellt. Der Phänotyp dieser Mutanten ist erwartungsgemäß nach wie vor flagellenlos und unbeweglich, da die frühen strukturellen Komponenten FlhA und FlhF weiterhin nicht vorhanden sind.

Im Rahmen der Untersuchungen der *flhA/flgM*-Mutanten ergaben die globalen Transkriptanalysen nicht nur eine Wiederherstellung, sondern in den meisten Fällen eine erhöhte Transkriptmenge vieler Gene, die in der *flhA*-Mutante reprimiert sind. Interessanterweise umfassen diese hochregulierten Gene nicht nur späte Flagellengene mit  $\sigma^{28}$ -Promotor, sondern auch sämtliche Klasse 2-Gene unter RpoN-Kontrolle. Auch die meisten Gene der Zwischenklasse unter der Kontrolle von mehreren Promotoren zeigten eine signifikant erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 36 und Abb. 37). Während im Gegensatz zur *flhA*-Einzelmutante große Mengen an FlaA-Flagellin in den *flhA/flgM*-Mutanten gebildet wird und sich im Zytoplasma anreichern, konnte FlaB nicht nachgewiesen werden, obwohl auch hier die mRNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. In *flgM*-Einzelmutanten wird FlaB in äquivalenter Menge wie im Wildtyp gebildet (Josenhans *et al.*, 2002a). Die Translation von *flaB* und möglicherweise weiterer Klasse 2-Transkripte ist also von der Anwesenheit von FlhA abhängig. Möglicherweise ist die Proteinexpression der Klasse 2-Transkripte an das Vorhandensein eines funktionellen Typ III-Sekretionssystems oder des kompletten Basalkörpers gekoppelt. Für *C. crescentus* wurde eine translationale 'Feedback'-Kontrolle auf die Flagellinexpression als Antwort auf eine Mutation im Basalkörper-Haken-Komplex nachgewiesen (Anderson & Newton, 1997). Die Klasse 4-Flagellengene *fliJ* und *fliL* werden in den entsprechenden Mutanten von Genen einer früheren Klasse zwar weiterhin transkribiert, die Proteine werden aber nicht mehr gebildet. Als Mechanismus, zumindest für *fliJ*, wird eine Verdeckung der Ribosomenbindestelle durch RNA-Sekundärstrukturen diskutiert, die bei funktionellem Basalkörper/Haken-Komplex aufgelöst wird. Durch Sequenzdeletionen im 5'-Nichttranslatierten Bereich des Gens konnte die Proteinexpression von *fliJ* in den HBB-Mutanten wiederhergestellt werden.

In Bezug auf das Transkriptionsprofil konnte durch die Experimente also gezeigt werden, dass in Abwesenheit des *flhA*-Genprodukts der Anti-Sigma-Faktor FlgM eine Repression der Transkription sowohl der  $\sigma^{28}$ - als auch der  $\sigma^{54}$ -abhängigen Gene vermittelt. FlgM inhibiert durch Bindung im Zytoplasma den alternativen Sigma-Faktor FliA und kann nicht durch Sekretion oder durch einen anderen an einen kompletten Exportapparat gekoppelten Prozess inaktiviert werden, um FliA freizusetzen. Als Folge davon können die FliA-abhängigen Transkripte nicht gebildet werden. Die Inaktivierung von FlgM durch Sekretion, analog zu dem System in *Salmonella*, ist für

*H. pylori* allerdings aufgrund der Anwesenheit der Flagellenhülle unklar, und wird zurzeit weiter untersucht. Durch die Transkriptom-Analysen mit den *rpoN*-Mutanten (siehe 4.2.2) und durch die Untersuchung des Hakenproteins FlgE1 (O'Toole *et al.*, 1994b) wurde gezeigt, dass die exportdefizienten Mutanten ohne funktionellen Basalkörper/Haken-Komplex keine negative `Feedback`-Regulation auf  $\sigma^{28}$ -abhängige Gene ausüben. FlgM wird also inaktiviert, dies geschieht jedoch unabhängig von der Transkription von flagellären Klasse 2-Genen. Schwieriger zu erklären ist die Reversion des negativen Effekts der *flhA*-Mutation auf die  $\sigma^{54}$ -abhängigen Klasse 2-Gene und die Zwischenklasse-Gene durch eine zusätzliche *flgM*-Inaktivierung. Da eine *flgM*-Mutation alleine keinen deutlichen Effekt auf die Transkriptmenge dieser Gene hat (siehe 4.2.1 und Abb. 36), scheint FlgM nur in Abwesenheit von FlhA die Transkription dieser Gene zu blockieren. Mechanismen dieser FlgM-vermittelten Kontrolle sind bislang noch nicht identifiziert worden. Die bisherigen Ergebnisse sprechen jedoch für eine direkte Proteininteraktion zwischen FlhA und FlgM. Eine Interaktion von FlgM mit einem der Regulatoren des RpoN-Regulons wurde bislang nicht beschrieben, obwohl alle dazugehörigen Faktoren in einer globalen Proteininteraktionsstudie untersucht wurden (Hybrigenics PimRider<sup>TM</sup>; Rain *et al.*, 2001). Für *Salmonella* wurden mit FliT und FliZ zwei Regulatoren beschrieben, die in Abhängigkeit von FlgM die Genexpression von Klasse 2-Genen reprimieren bzw. aktivieren (Kutsukake *et al.*, 1999). Putative Gene für diese Faktoren konnten mit HP0754 (*fliT*) und HP1286 (*fliZ*) in unserer Arbeitsgruppe auch für *H. pylori* identifiziert werden (Niehus *et al.*, 2004). Die Beteiligung der Proteine an der Regulation der Flagellenbiosynthese soll nun auch für diesen Organismus geprüft werden.

Im Gegensatz zu den nahezu identischen Transkriptionsprofilen von *flhA* und *flhF* in Bezug auf die Flagellengene gibt es hier auffällige Unterschiede beim Vergleich der beiden Stämme nach einer zusätzlichen *flgM*-Mutation. Bei den *flhF/flgM*-Doppelmutanten gibt es wie bei *flhA/flgM* eine Rückkopplungs-Regulation durch FlgM auf die Klasse 3-Gene, nicht aber auf die Klasse 2- und Zwischenklasse-Gene (siehe Abb. 36). Die Repression dieser Genklassen ist also FlhF- und nicht FlgM-abhängig. Für die transkriptionelle Repression der Klasse 3-Gene ist wie bei der *flhA*-Mutante auch bei *flhF* die fehlende Inaktivierung des Anti-Sigma-Faktors FlgM durch Sekretionsblockade oder andere Mechanismen in Folge der *flhF*-Mutation eine wahrscheinliche Erklärung. Nach der zusätzlichen Mutation von *flgM* entfällt dieser

Faktor, und die  $\sigma^{28}$ -abhängigen Gene können transkribiert werden, wie die Transkriptom-Analysen belegen. Die reprimierende Auswirkung der *flhF*-Inaktivierung auf die Expression der Klasse 2- und intermediären Gene wird im Gegensatz dazu durch die zusätzliche Mutation von *flgM* nicht aufgehoben. Interessanterweise ist sogar eine erhöhte Transkriptmenge von HP0244 (*flgS*) und *rpoN* in der *flhF/flgM*-Mutante nachzuweisen. Es gibt bislang noch keinen Hinweis auf den molekularen Mechanismus der Kontrolle über die  $\sigma^{54}$ -abhängigen Gene und die Gene der Zwischenklasse durch FlhF. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zwischen der Regulation der RpoN-abhängigen Gene durch das Flagellen-assoziierte Zwei-Komponenten-System FlgS/FlgR und der Anwesenheit von FlhF. Eine gezielte Untersuchung der Vernetzung dieser Faktoren wird dadurch erschwert, dass bislang die spezifischen Signale, die zur Aktivierung des Systems führen, nicht bekannt sind.

Mutante	Klasse 1 ( $\sigma^{80}$ )	Klasse 2 ( $\sigma^{54}$ )	Klasse 3 ( $\sigma^{28}$ )	Zwischen- klasse ( $\sigma^{80}, \sigma^{54}, \sigma^{28}$ )
<i>flhA</i>	→	→	↓	→
<i>flgM</i>	→	→	↑	→
<i>rpoN</i>	→	↓	→	→
HP0244	→	↓	→	→
<i>flgR</i>	→	↓	→	→
<i>flhA</i>	→	↓	↓	↓
<i>flhF</i>	→	↓	↓	↓
<i>flhA/flgM</i>	→	↑	↑	↑
<i>flhF/flgM</i>	→	↓	↑	↓

**Abb. 36.** Schematische Darstellung der Microarray-Ergebnisse zur Kontrolle der unterschiedlichen Klassen der Flagellenge durch die untersuchten Regulatoren (vgl. Tab. 9). Die untersuchten Mutanten sind rechts angegeben. Die unterschiedlichen Klassen der Flagellengene (oben) gliedern sich in Klasse 1-Gene ( $\sigma^{80}$ -kontrolliert), Klasse 2-Gene ( $\sigma^{54}$ -kontrolliert), Klasse 3-Gene ( $\sigma^{28}$ -kontrolliert) und Zwischenklasse Gene (durch mehr als einen Sigma-Faktor kontrolliert). Die Pfeile repräsentieren die Veränderung der Transkription innerhalb der Genklassen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Blauer Pfeil – gleichbleibende Transkription; roter Pfeil – Repression; grüner Pfeil – Hochregulation.

Transkripte der Gene des in den *flhF*-Mutanten reprimierten *flhF*-Operons (HP1035-1028) sind in der *flhF/flgM*-Doppelmutante im Vergleich dazu im erhöhten Maße

vorhanden, oder sogar wieder auf Wildtypniveau angehoben. Auch dieser Effekt ist also zumindest teilweise auf eine FlgM-abhängige Regulation zurückzuführen. Vermutlich erfolgt unter den gewählten Bedingungen eine teilweise Koregulation der Gene mit den Klasse 3-Flagellengenen, vermittelt durch einen putativen  $\sigma^{28}$ -Promotor vor *flhF* mit verkürztem Bereich zwischen den beiden konservierten  $\sigma^{28}$ -Faktor-Boxen (n=14) (Niehus *et al.*, 2004). Ob auch der konservierte putative  $\sigma^{54}$ -Promotor vor dem *fliA*-Gen (HP1032) bei dieser Regulation eine Rolle spielt, sollen weitere Untersuchungen klären.

Dass evt. auch weitere Bereiche zellulärer Prozesse zusätzlich zur Expression von Genen des Flagellenregulons durch die Mutationen in *flhF/flgM* und *flhA/flgM* betroffen sind, deutet sich unter anderem durch die erhöhte Expression eines großen ribosomalen Genbereichs und die differenzielle Transkription weiterer Gene unterschiedlicher Familien an. Diese Ergebnisse müssen aber noch in mindestens einem anderen *H. pylori*-Stamm reproduziert werden, um diese regulatorischen Querverbindungen als signifikant abzusichern. Durch die Experimente mit den Doppelmutanten konnte gezeigt werden, dass FlgM in *H. pylori* eine zentrale Rolle bei der Regulation des Flagellenaufbaus einnimmt und, teilweise in Zusammenspiel mit FlhA und FlhF, die Expression der späten und mittleren Flagellengene steuert. Aufgrund vieler noch bestehender Unklarheiten über die Eigenschaften und die Inaktivierung von FlgM in *H. pylori* bleiben die Mechanismen der Regulation jedoch bislang zum Großteil hypothetisch. Die nähere Aufklärung der Eigenschaften von FlgM in diesem Organismus ist also in Zukunft von zentraler Bedeutung für das Verständnis der spezifischen Eigenschaften der Regulation des Flagellensystems in *H. pylori*.

### **4.2.7 Modell der transkriptionellen Regulation der Gene des Flagellensystems in *H. pylori***

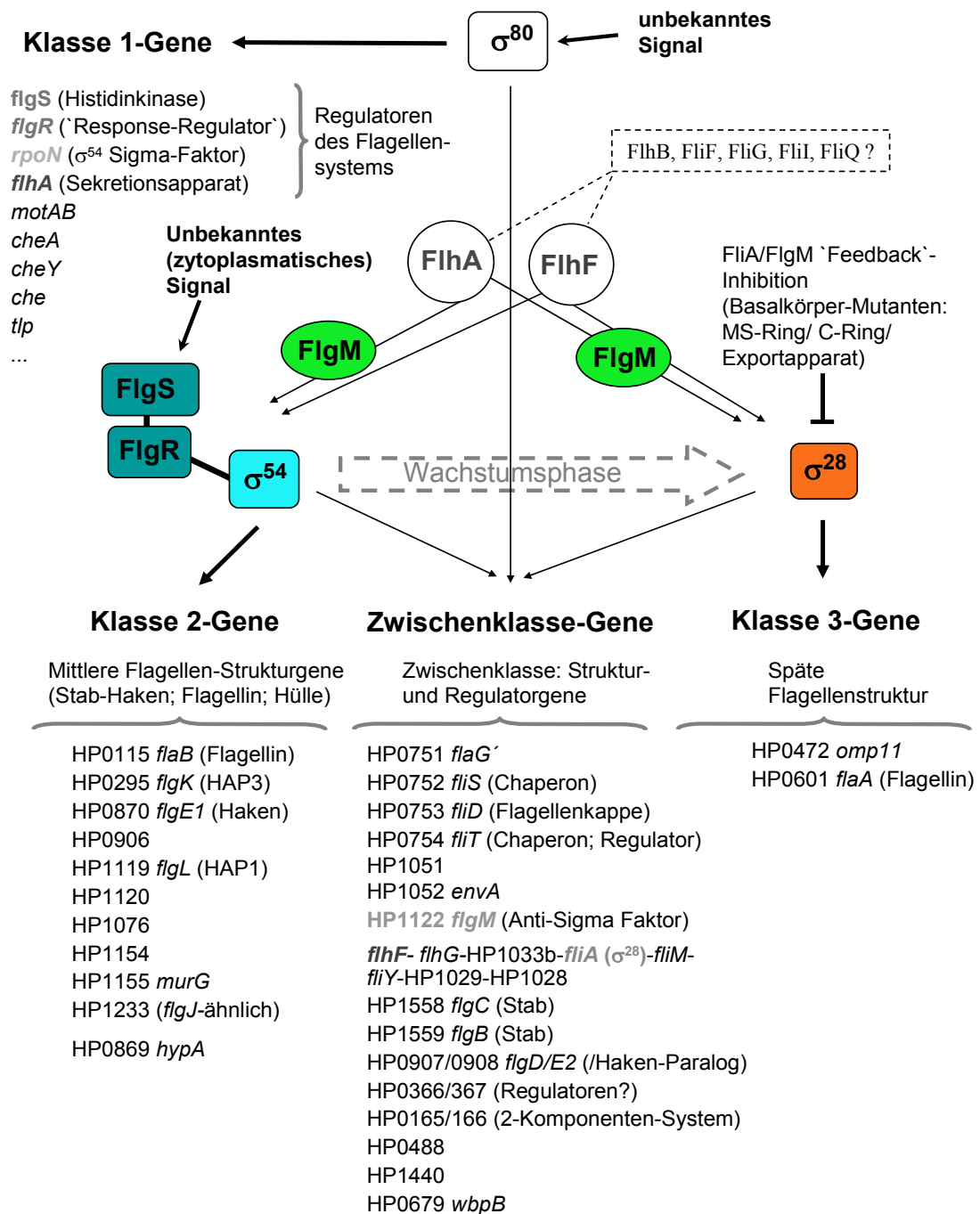
Anhand der hier durchgeführten globalen Transkriptanalysen mit unterschiedlichen Regulatoren des Flagellensystems konnten neue Aspekte der Regulation der Flagellen-Biogenese in *H. pylori* ermittelt werden. Basierend darauf wurde ein neues Modell der transkriptionellen Regulation des Flagellensystems in dem Bakterium erstellt (siehe Abb. 37). Wie bereits zuvor in anderen Arbeiten vorgeschlagen (Josenhans & Suerbaum, 2000; Spohn & Scarlato, 2001), erfolgt eine hierarchische Aufteilung der Flagellengene in drei Regulationsklassen. Durch die hier

durchgeführten Experimente konnte zusätzlich eine regulatorische Zwischenklasse mit Genen erstellt werden, die von mehr als einem Promotor kontrolliert werden, und teilweise auch Nicht-Flagellengene einschließt. Die größte Anzahl an Flagellengenen beinhalten die Klasse 1-Gene unter Kontrolle des *H. pylori*-`Housekeeping`-Sigma-Faktors  $\sigma^{80}$ . Als putative Angehörige dieser Klasse werden hier Flagellengene bezeichnet, die, indirekt bestimmt, anhand der Untersuchungen weder  $\sigma^{54}$ - oder  $\sigma^{28}$ -abhängig sind, noch aufgrund einer FlhA- oder FlhF-Abhängigkeit der Zwischenklasse zugeordnet werden konnten. Außerdem konnten für einige dieser Gene in früheren Arbeiten entweder durch funktionelle Untersuchungen (Beier *et al.*, 1997; Porwollik *et al.*, 1999), oder durch *in silico*-Promotorabgleiche (Josenhans & Suerbaum, 2000; Spohn & Scarlato, 2001), eine Kotranskription mit `Housekeeping`-Genen nachgewiesen oder vorgeschlagen werden. Alle bekannten Regulatoren des Flagellensystems scheinen durch  $\sigma^{80}$ -abhängige Promotoren exprimiert zu werden. Diese Kontrolle kann ausschließlich  $\sigma^{80}$ -gekoppelt sein, wie bei FlhA, HP0244, FlgR und RpoN, oder im Zusammenspiel mit anderen Promotoren, wie bei FlhF/FlhG (YlxH), FliA und FlgM. Aus diesem Grund kann die Klasse 1 der  $\sigma^{80}$ -abhängigen Gene, die Gene für funktionell übergeordnete Regulatoren beinhaltet, den anderen Flagellenklassen hierarchisch übergeordnet werden. Den Klasse 2-Genen unter Kontrolle von RpoN und dem Zwei-Komponenten-System FlgS/FlgR konnten fünf neue Gene hinzugefügt werden. Für die beiden Operons HP0907/HP0908 (*flgD/flgE2*) und HP1559/HP1558 (*flgB/C*), die zuvor nur den Klasse 2-Genen zugerechnet wurden (Spohn & Scarlato, 1999), wurde unter den gewählten Bedingungen ein zusätzliches  $\sigma^{54}$ -unabhängiges Transkript nachgewiesen, welches vermutlich konstitutiv durch  $\sigma^{80}$  transkribiert wird. Auch den FliA/FlgM-abhängigen Klasse 3-Genen konnten drei neue Gene hinzugefügt werden, wovon nur *omp11* zusammen mit *flaA* ausschließlich in dieses Regulon einzuordnen ist. Die Zwischenklasse-Gene setzten sich zum einen aus verschiedenen Flagellengenen zusammen, die durch Promotoren verschiedener Regulationsklassen kontrolliert werden, wie bspw. das *fliD*-Operon unter  $\sigma^{28}$ - und  $\sigma^{54}$ -Kontrolle, oder *flgM*, das durch alle drei Sigma-Faktoren transkribiert wird. Außerdem werden hier Gene, die hauptsächlich FlhA- oder FlhF-abhängig reguliert werden, der Zwischenklasse zugeordnet. Dazu gehören Faktoren, die eine weitere Verbindung des Flagellensystems zu anderen Zellfunktionen darstellen könnten, wie z. B. das Zwei-Komponenten-System HP0166 (*ompR*)/HP0165. Die Expression der Proteine der

frühen Flagellengene *flhA* und *flhF* stellt einen Kontrollpunkt der Expression der mittleren und späten Flagellengene in *H. pylori* dar. Dieser ist im Fall der Rückkopplungs-Kontrolle der Klasse 3-Gene für FlhA und FlhF an den Anti-Sigma-Faktor FlgM gekoppelt. Der Mechanismus erfolgt hier sehr wahrscheinlich durch einen nicht-vorhandenen Exportapparat, der normalerweise die Inaktivierung von FlgM vermitteln könnte. Die Kontrolle der Klasse 2- und Zwischenklasse-Gene ist im Fall von FlhA an die Anwesenheit von FlgM gekoppelt, bei FlhF ist diese Regulation unabhängig von dem Anti-Sigma-Faktor. Der genaue Mechanismus ist in beiden Fällen noch unklar.

Die Expression von Genen, die für Komponenten des proximalen Basalkörpers (MS-Ring, C-Ring, Sekretionsapparat) kodieren, wurde bereits für andere Organismen, bei denen der  $\sigma^{54}$ -Faktor in die Flagellenregulation eingebunden ist, als 'Checkpoint' für die Expression von den hierarchisch nachfolgenden Genklassen beschrieben. Hierzu gehören ausführlich untersuchte Bakterien wie *C. crescentus*, *Vibrio spp.* und *P. aeruginosa* (Anderson & Newton, 1997; Wu & Newton, 1997; McCarter, 2001; Prouty *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2003). Für alle diese Organismen wird eine in vier Klassen aufgeteilte Regulationskaskade der Flagellenregulation beschrieben. Wie bei den Enterobakterien (Aldridge & Hughes, 2002) gibt es auch bei allen diesen Bakterien durch die notwendige Fertigstellung des Basalkörper/Haken-Komplexes (HBB) einen zweiten strukturellen Kontrollpunkt der Genexpression der nachfolgenden späten Flagellengene. Ein wichtiger Unterschied der Regulation bei *H. pylori* ist das Fehlen des HBB-Kontrollpunkts, da bei Mutanten in mittleren Flagellengenen unverändert die Transkripte der Klasse 3-Gene gebildet werden (diese Arbeit; O'Toole *et al.*, 1994b). Demgegenüber scheint der Regulations-Kontrollpunkt durch den proximalen Basalkörper auch in *H. pylori* zu existieren. Dies haben unter anderem die Experimente mit den *flhA*- und *flhF*-Mutanten gezeigt. Weiterhin gibt es Arbeiten mit *H. pylori* zu einer Reihe von Mutanten in weiteren Genen des Sekretionsapparats und des proximalen Basalkörpers (*flhB*, *flilQFG*), die allesamt die Inhibition der Expression der Flagelline FlaA und FlaB sowie des Hakens FlgE1 zur Folge haben (Porwollik *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2000). Ob auch hier ein Effekt auf die Transkription sämtlicher Klasse 2 und 3 Gene wie bei den *flhA*- und *flhF*-Mutanten stattfindet, muss aber noch geklärt werden, genau wie die Mechanismen der transkriptionellen Rückkopplung.





**Abb. 37. Modell der transkriptionellen Regulation von Genen der Flagellenbiogenese in *H. pylori*.** Die Transkription der drei Klassen von Flagellengenen wird von  $\sigma^{80}$  (Klasse 1),  $\sigma^{54}$  (Klasse 2) und  $\sigma^{28}$  (Klasse 3) gesteuert. Einige Gene werden von mehreren der drei Sigma-Faktoren kontrolliert und sind in die Zwischenklasse eingeordnet. Die Klasse 1-Gene beinhalten wichtige Regulatoren des Flagellensystems und wurden in dieser Arbeit nicht detailliert untersucht (vollständige Liste siehe Tab. 9). Die Klasse 2-Gene werden von RpoN ( $\sigma^{54}$ ) zusammen mit dem spezifischen Aktivator FlgR und der dazugehörigen Histidinkinase FlgS (HP0244) kontrolliert. Die übergeordneten Regulatoren FlhA und FlhF werden für die vollständige Transkription der Klasse 2 und 3 sowie der Zwischenklasse-Gene benötigt. Der Anti- $\sigma^{28}$ -Faktor FlgM blockiert die Transkription der Klasse 3-Gene in *flhA*- und *flhF*-Mutanten. Zusätzlich vermittelt FlgM einen Transkriptionsblock der Klasse 2-Gene in der *flhA*-, nicht aber in der *flhF*-Mutante. Für weitere Komponenten des Sekretionsapparates (gestrichelter Kasten) wurde gezeigt, dass eine Mutation dieser Gene die Blockade der Expression von FlaB und FlgE1 (Klasse 2), sowie von FlaA (Klasse 3) bewirkt (Porwollik *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 2000). Dies lässt evtl. auf eine Kontrolle der Expression von mittleren und späten Flagellengenen durch einen funktionellen proximalen Basalkörper schließen (Erläuterungen siehe Text). Die Transkription der Klasse 3-Gene erreicht ihr Maximum später in der Wachstumsphase als die der Klasse 2-Gene.

Der herausragendste Unterschied des *H. pylori*-Flagellen-Regulationssystems zu denen aller anderen charakterisierten Bakterien, mit Ausnahme der eng verwandten *Campylobacter spp.*, ist die Abwesenheit eines oder mehrerer übergeordneter Regulatoren, die eine koordinierte und ökonomisch sinnvolle Expression auch der frühen Flagellengene steuern. In *H. pylori* scheint sich also die strikte hierarchische Kontrolle der Regulation der Flagellen-Biogenese, die in anderen Organismen vorhanden ist, während der Evolution so nicht etabliert zu haben. Ein Grund hierfür ist möglicherweise, dass das Bakterium während der Infektion des Wirtes ununterbrochen auf einen funktionierenden Bewegungs- und Chemotaxisapparat zur Aufrechterhaltung der Infektion angewiesen ist und Mutationen in unterschiedlichen Flagellengenenen diese Fähigkeit aufheben (Eaton *et al.*, 1996; Andrutis *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Foyne *et al.*, 2000; Ottemann & Lowenthal, 2002; Kavermann *et al.*, 2003). Da ein funktioneller Flagellenapparat und die Chemotaxis für das Bakterium also im gesamten Lebenszyklus absolut essenziell zu sein scheint, ist die Koregulation vieler Gene des Flagellensystems mit 'Housekeeping'-Genen sinnvoll. Die hier gezeigte, im Vergleich zu den meisten anderen Organismen unterschiedliche Regulation des Flagellensystems, scheint also eine Folge der spezifischen Anpassung und Genomreduktion von *H. pylori* an die sehr eingegrenzte ökologische Nische zu sein. Diese Reduktion der regulatorischen Kontrolle der Flagellenbiogenese geht mit der generellen Armut des Organismus an regulatorischen Elementen einher (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Scarlato *et al.*, 2001). Jedoch ist die hier gezeigte, immer noch vorhandene koordinierte Expression der mittleren und späten Flagellengene wahrscheinlich für einen reibungslosen Aufbau der Flagellenstruktur während des Zellzyklus unerlässlich und musste daher evolutionär aufrecht erhalten werden.

### **4.3 Nutzung der Microarray-Technologie für genomweite Transkriptionsuntersuchungen in *H. pylori* und anderen Bakterien**

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine ständig wachsende Anzahl von Arbeiten veröffentlicht, bei denen von anderen Arbeitsgruppen DNA-Micro- oder Macroarrays erfolgreich zur Untersuchung genomweiter Transkriptionsereignisse in *H. pylori* und anderen komplett sequenzierten Bakterien eingesetzt wurden (Übersichtsartikel siehe Kato-Maeda *et al.*, 2001; Schoolnik, 2002; Conway & Schoolnik, 2003). Dies unterstreicht die wichtige Stellung dieser neuen Technologie im Zusammenhang mit

bekanntem Genomsequenzen für verschiedene Mikroorganismen. Dabei kann der Großteil der bislang durchgeführten bakteriellen Microarray-Untersuchungen grob in zwei unterschiedliche Kategorien aufgeteilt werden. Zum einen wurden Experimente durchgeführt, bei denen, wie in der hier präsentierten Arbeit, Effekte der Inaktivierung einzelner Gene auf das bakterielle Transkriptom beobachtet wurden. Die zweite Kategorie umfasst Experimente, bei denen mit den Microarray-Untersuchungen die Auswirkungen von Veränderungen äußerer Faktoren und Wachstumsbedingungen auf die genomweite Transkription in Wildtyp-Bakterien untersucht wurde.

Eine sehr umfangreiche Arbeit beschreibt jeweils den genomweiten transkriptionellen Effekt der Inaktivierung sämtlicher, mehr als 30, Zwei-Komponenten-Systeme (2KS) in *E. coli* K12 (Oshima *et al.*, 2002). Neben dem Nachweis der Überschneidung einzelner Regulons unterschiedlicher 2KS und der regulatorischen Interaktion ('crosstalk'), stellte die Arbeit heraus, dass ein großer Anteil der 2KS in diesem Organismus in die Transkription von Flagellengenen involviert ist. Eine andere Arbeit über *E. coli* K12 beschreibt die zusätzliche Regulation von Nicht-Flagellengenen durch die übergeordneten enterobakteriellen Flagellensystem-Regulatoren FlhCD (Pruess *et al.*, 2003). Hierzu zählt nach dieser Arbeit sowohl die indirekte Kontrolle von FlhD auf Gene der anaeroben Atmung, vermittelt durch den Sauerstoff-abhängigen Chemotaxis-Sensor Aer, als auch die Aer-unabhängige Kontrolle über eine Reihe von Metabolismus-Genen und Komponenten der aeroben Atmung. Mit einer großen Anzahl unabhängiger Methoden, wie Reporterfusionen oder quantitativer 'Real Time PCR', konnten viele der Microarray-Ergebnisse bestätigt werden, und damit wie in vielen anderen Arbeiten die Reproduzierbarkeit der durch die globalen Analysen erzielten Ergebnisse gezeigt werden (Pruess *et al.*, 2003). Für *Salmonella* wurde mit Microarray-Untersuchungen einer *csrA*-Mutante die Kontrolle einer großen Zahl an Flagellengenen durch diesen Regulator der Expression von Invasions-assoziierten Genen beschrieben (Lawhon *et al.*, 2003). Andere umfassende genomweite Analysen mit Mutanten in Flagellensystem-assoziierten Genen wurden, wie bereits diskutiert (siehe 4.2), in *P. aeruginosa* durch die Untersuchung von *fleQ*, *fleR*, *fliA* und *rpoN* durchgeführt (Dasgupta *et al.*, 2003), oder in *C. jejuni* mit einer genomweiten Untersuchung von *flhA* (Carrillo *et al.*, 2004). Weitere Microarray-Arbeiten zu *H. pylori*, bei denen wie in dieser Arbeit gezielt ein Gen ausgeschaltet wurde und das Transkriptionsprofil mit dem des Wildtyps verglichen wurde, beinhalten Untersuchungen der Histidinkinase-Mutante HP0165 (Forsyth *et*

*al.*, 2002) und einen Nickel-abhängigen Autoregulator, NikR (Contreras *et al.*, 2003). Die Zielgene des Zwei-Komponenten-Systems HP0165/HP0166 wurden in einer anderen Arbeit mit einer globalen `Screening`-Methode, alternativ zu den Microarray-Hybridisierungen, charakterisiert (Dietz *et al.*, 2002). Hierbei wurde die Bindung von rekombinanten und phosphoryliertem HP0166 (*ompR*) an die Promotoren der Zielgene durch die Selektion der DNA-Proteinkomplexe mit einer Magnetismus-basierten Methode (`Magnetocapture`) gezeigt. Der Vergleich dieser Methode mit dem Transkriptionsprofil der HP0164-Mutante (Forsyth *et al.*, 2002), ergibt eine große Differenz in den ermittelten Zielgenen des Zwei-Komponenten-Systems, so dass weitere Experimente nötig sind, um die Effizienz und Reproduzierbarkeit der beiden unterschiedlichen Methoden zu bewerten.

Auch die Arbeiten, die die transkriptionelle Antwort von Wildtyp-Bakterien auf Umweltreize oder globale Wachstumsveränderungen mit Hilfe von Microarray-Analysen bestimmt haben, beschäftigen sich häufig direkt mit bakterieller Motilität oder zeigen anhand der Ergebnisse die Einbindung von Flagellengenen in diverse zelluläre regulatorische Prozesse. Eine umfassende kürzlich veröffentlichte Arbeit charakterisiert die Genexpression in Zusammenhang mit der `schwärmenden Motilität` von *Salmonella* und zeigte u. a. die Abschaltung vieler Flagellengene mit einsetzendem Schwärmen der Bakterien (Wang *et al.*, 2004). Ein ähnliches Ergebnis erbrachte eine Untersuchung der genomweiten Transkription bei der Biofilm-Entwicklung in *P. aeruginosa* (Whiteley *et al.*, 2001).

Ein Gebiet, welches in globalen Transkriptionsstudien mit *H. pylori* in mehreren Arbeiten untersucht wurde, ist die Abhängigkeit der Genexpression von der Ansäuerung des Mediums (Allan *et al.*, 2001; Ang *et al.*, 2001; Merrell *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2003). Diese Untersuchungen leiten sich aus der Fähigkeit des Bakteriums ab, *in vivo* zumindest zeitweise im sauren Milieu des Magens persistieren zu können. Bemerkenswerterweise wurden durch die verschiedenen Arbeiten äußerst unterschiedliche transkriptionelle Antworten des Bakteriums auf eine pH-Wert-Veränderung ermittelt, was sich wahrscheinlich u. a. auf voneinander abweichende experimentelle Ansätze zurückführen lässt. Eine der ausführlichsten Arbeiten von Merrell und Kollegen (Merrell *et al.*, 2003) hat bei Einbeziehung von verschiedenen Wachstumsphasen eine transkriptionelle Antwort bei 7% der *H. pylori*-Gene in Antwort auf eine Veränderung des pH-Werts ergeben, worunter auch eine

beachtliche Zahl von Flagellengenenen fällt. Interessanterweise sind dabei fast ausschließlich  $\sigma^{54}$ -abhängige Gene der Klasse 2 betroffen, die eine erhöhte Transkription als Reaktion auf eine Erniedrigung des pH-Wertes zeigen. Dies beinhaltet auch die durch diese Arbeit dem RpoN-Regulon neu zugeordneten Klasse 2-Gene HP1155 (*murG*)/HP1154, HP1233 (*flgJ*-Paralog), HP1076, sowie die Zwischenklasse-Gene HP0367 und HP1440. Möglicherweise liefert diese pH-abhängige Expression  $\sigma^{54}$ -abhängiger Gene einen Hinweis auf ein spezifisches Signal zur Aktivierung der Histidinkinase FlgS. Ein anderer globaler Untersuchungs-Ansatz ergab ein Umschalten der Transkription von verschiedenen `Genklustern` in Abhängigkeit von der Wachstumsphase von *H. pylori* (Thompson *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte auch die Wachstumsphasen-abhängige Transkription von *flaA* und *flaB* (und weiterer Klasse 2-Gene) nachgewiesen werden, die auch hier durch die *lux*-Reporter-Experimente ermittelt wurde (siehe. 3.1). Durch genomweite Analysen konnten diese Ergebnisse inzwischen auch durch Arbeiten von Fang Ye in unserer Arbeitsgruppe bestätigt und ausgeweitet werden. Hier konnte eine Verbindung von temporaler Genexpression zu Veränderungen im DNA-`supercoiling`-Status hergestellt werden (Ye *et al.*, 2004).

Der wachsende Einsatz der Microarray-Technologie zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen in einer Reihe unterschiedlicher Bakterien zeigt das große Potential dieser Methode. Globale regulatorische Ereignisse lassen sich mit relativ wenigen Experimenten charakterisieren, was mit anderen Methoden gar nicht oder nur mit ungleich höherem Aufwand durchführbar wäre. Eine zufriedenstellende Korrelation von Microarray- und Proteom-Ansätzen wurde in mehreren Arbeiten beschrieben (Grunenfelder *et al.*, 2001; Eymann *et al.*, 2002; Corbin *et al.*, 2003). Andererseits treten auch Probleme bei Microarray-Untersuchungen zutage, wenn unterschiedliche Ergebnisse zu ähnlichen Fragestellungen erzielt werden, wie z. B. der transkriptionellen Antwort auf sich verändernde pH-Werte in *H. pylori*. Hierdurch wird die Notwendigkeit unterstrichen, die Microarray-Ergebnisse nach Möglichkeit mit alternativen Methoden zu überprüfen und die Versuchsbedingungen möglichst scharf umgrenzt und definiert zu gestalten. Die Microarray-Technologie ist also mittlerweile eine essenzielle und wertvolle Methode zur Entschlüsselung von regulatorischen Netzwerken bei Bakterien, sollte aber durch unterstützende Analysen mit alternativen Methoden immer wieder überprüft werden.



## 5 Literaturverzeichnis

- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van der Ende, A., and van Doorn, L.J. (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* **32**: 459-470.
- Aizawa, S.I. (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* **19**: 1-5.
- Aizawa, S.-I. (2000) Flagella. In *Encyclopedia of Microbiology*. Lederberg, J. (ed). New York: Academic Press.
- Akada, J.K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M., and Nakazawa, T. (2000) Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol* **36**: 1071-1084.
- 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., and Berg, D.E. (1998) Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **28**: 37-53.
- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., and Berg, D.E. (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **20**: 5137-5142.
- Aldridge, P., and Hughes, K.T. (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **5**: 160-165.
- Allan, E., Dorrell, N., Foynes, S., Anyim, M., and Wren, B.W. (2000) Mutational Analysis of Genes Encoding the Early Flagellar Components of *Helicobacter pylori*: Evidence for Transcriptional Regulation of Flagellin A Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**: 5274-5277.
- Allan, E., Clayton, C.L., McLaren, A., Wallace, D.M., and Wren, B.W. (2001) Characterization of the low-pH responses of *Helicobacter pylori* using genomic DNA arrays. *Microbiology* **147**: 2285-2292.
- Allen-Vercocoe, E., and Woodward, M.J. (1999) The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. *J Med Microbiol* **48**: 771-780.
- Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F., and 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., Bina, J., Andrews, B.M., Doig, P., Hancock, R.E., and Trust, T.J. (2000) Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun* **68**: 4155-4168.
- Amsler, C.D., and Matsumura, P. (1995) Chemotactic Signal Transduction in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In *Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (eds). Washington D.C.: ASM Press, pp. 89-103.
- Andermann, T.M., Chen, Y.-T., and Ottemann, K.M. (2002) Two Predicted Chemoreceptors of *Helicobacter pylori* Promote Stomach Infection. *Infect. Immun.* **70**: 5877-5881.
- Andersen, L.P., and Wadstrom, T. (2001) Basic Bacteriology and Culture. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H.L., Mendz, G.L. and Hazell, S. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 27-38.
- Anderson, D., and Newton, A. (1997) Posttranscriptional regulation of *Caulobacter* flagellin genes by a late flagellum assembly checkpoint. *J. Bacteriol.* **179**: 2281-2288.
- Anderson, P.E., and Gober, J.W. (2000) FlbT, the post-transcriptional regulator of flagellin synthesis in *Caulobacter crescentus*, interacts with the 5' untranslated region of flagellin mRNA. *Mol Microbiol* **38**: 41-52.
- Andruttis, K.A., Fox, J.G., Schauer, D.B., Marini, R.P., Li, X., Yan, L., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (1997) Infection of the ferret stomach by isogenic flagellar mutant strains of *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun.* **65**: 1962-1966.
- Ang, S., Lee, C.Z., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, M.A., and Wang, J.T. (2001) Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infect Immun* **69**: 1679-1686.
- Appelmek, B.J., Shiberu, B., Trinks, C., Tapsi, N., Zheng, P.Y., Verboom, T., Maaskant, J., Hokke, C.H., Schiphorst, W.E.C.M., Blanchard, D., Simoons-Smit, I.M., van den Eijnden, D.H., and

- Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (1998) Phase Variation in *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. *Infect.Immun.* **66**: 70-76.
- Arfin, S.M., Long, A.D., Ito, E.T., Toller, L., Riehle, M.M., Paegle, E.S., and Hatfield, G.W. (2000) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem* **275**: 29672-29684.
- Arnold, C.N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R., and Siegele, D.A. (2001) Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *J Bacteriol* **183**: 2178-2186.
- Atherton, J.C., Peek, R.M., Jr., Tham, K.T., Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1997) Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **112**: 92-99.
- Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G.M., and Hughes, C. (2001) Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J Mol Biol* **308**: 221-229.
- Baar, C., Eppinger, M., Raddatz, G., Simon, J., Lanz, C., Klimmek, O., Nandakumar, R., Gross, R., Rosinus, A., Keller, H., Jagtap, P., Linke, B., Meyer, F., Lederer, H., and Schuster, S.C. (2003) Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11690-11695.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M., and Meyer, T.F. (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell.Microbiol.* **2**: 155-164.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y., and Jarrell, K.F. (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**: 295-304.
- Beall, B., and Lutkenhaus, J. (1987) Sequence analysis, transcriptional organization, and insertional mutagenesis of the *envA* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 5408-5415.
- Beier, D., Spohn, G., Rappuoli, R., and Scarlato, V. (1997) Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J.Bacteriol.* **179**: 4676-4683.
- Beier, D., and Frank, R. (2000) Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J.Bacteriol.* **182**: 2068-2076.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.H., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9697-9702.
- Bertin, P., Terao, E., Lee, E.H., Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A., and Collatz, E. (1994) The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **176**: 5537-5540.
- Birboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* **7**: 1513-1523.
- Blaser, M.J., and Berg, D.E. (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* **107**: 767-773.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3027-3030.
- Blouin, K., Walker, S., Smit, J., and Turner, R. (1996) Characterization of In Vivo Reporter Systems for Gene Expression and Biosensor Applications Based on *luxAB* Luciferase Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2013-2021.
- Boyd, A., and Simon, M. (1982) Bacterial chemotaxis. *Ann.Rev.Physiol.* **44**: 501-517.
- Bradley, D.E. (1980) A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**: 146-154.
- Brahmachary, P., Dashti, M.G., Olson, J.W., and Hoover, T.R. (2004) *Helicobacter pylori* *FlgR* Is an Enhancer-Independent Activator of sigma54-RNA Polymerase Holoenzyme. *J Bacteriol* **186**: 4535-4542.
- Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y., and Gralla, J.D. (2000) The bacterial enhancer-dependent sigma 54 (sigma N) transcription factor. *J Bacteriol* **182**: 4129-4136.
- Burgess, R.R., and Anthony, L. (2001) How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Curr Opin Microbiol* **4**: 126-131.
- Burlage, R.S., Saylor, G.S., and Larimer, F. (1990) Monitoring of naphthalene catabolism by bioluminescence with *nah-lux* transcriptional fusions. *J Bacteriol* **172**: 4749-4757.



## Literaturverzeichnis

---

- Cao, M., Kobel, P.A., Morshedi, M.M., Wu, M.F., Paddon, C., and Helmann, J.D. (2002) Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J Mol Biol* **316**: 443-457.
- Carpenter, P.B., Hanlon, D.W., and Ordal, G.W. (1992) *flhF*, a *Bacillus subtilis* flagellar gene that encodes a putative GTP- binding protein. *Mol.Microbiol.* **6**: 2705-2713.
- Carrillo, C.D., Taboada, E., Nash, J.H., Lanthier, P., Kelly, J., Lau, P., Verhulp, R., Mykytczuk, O., Sy, J., Findlay, W., Amoako, K., Gomis, S., Willson, P., Austin, J.W., Potter, A., Babiuk, L., Allan, B., and Szymanski, C.M. (2004) Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. *J Biol Chem*.
- Casadaban, M., and Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *E. coli*. *J.Mol.Biol.* **138**: 179-207.
- Cellini, L., Allocati, N., Angelucci, D., Iezzi, T., Di Campli, E., Marzio, L., and Dainelli, B. (1994) Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable *in vitro* reverts in mice. *Microbiol.Immunol.* **38**: 843-850.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**: 14648-14653.
- Chadsey, M.S., and Hughes, K.T. (2001) A multipartite interaction between *Salmonella* transcription factor sigma28 and its anti-sigma factor FlgM: implications for sigma28 holoenzyme destabilization through stepwise binding. *J Mol Biol* **306**: 915-929.
- Chan, W.-Y., Hui, P.-K., Leung, K.-M., Chow, J., Kwok, F., and Ng, C.-S. (1994) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am.J.Clin.Pathol.* **102**: 503-507.
- Chang, D.E., Smalley, D.J., and Conway, T. (2002) Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol* **45**: 289-306.
- Chilcott, G.S., and Hughes, K.T. (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.
- Claret, L., and Hughes, C. (2002) Interaction of the atypical prokaryotic transcription activator FlhD2C2 with early promoters of the flagellar gene hierarchy. *J Mol Biol* **321**: 185-199.
- Clyne, M., and Drumm, B. (1993) Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. *Infect.Immun.* **61**: 4051-4057.
- Clyne, M., O'Croinin, T., Suerbaum, S., Josenhans, C., and Drumm, B. (2000) Adherence of isogenic flagella negative mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* to primary human and ferret gastric epithelial cells. *Infect.Immun.* **1**: 1-1.
- Colland, F., Rain, J.C., Gounon, P., Labigne, A., Legrain, P., and De Reuse, H. (2001) Identification of the *Helicobacter pylori* anti-sigma28 factor. *Mol Microbiol* **41**: 477-487.
- Contreras, M., Thiberge, J.M., Mandrand-Berthelot, M.A., and Labigne, A. (2003) Characterization of the roles of NikR, a nickel-responsive pleiotropic autoregulator of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **49**: 947-963.
- Conway, T., and Schoolnik, G.K. (2003) Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol* **47**: 879-889.
- Corbin, R.W., Paliy, O., Yang, F., Shabanowitz, J., Platt, M., Lyons, C.E., Jr., Root, K., McAuliffe, J., Jordan, M.I., Kustu, S., Soupene, E., and Hunt, D.F. (2003) Toward a protein profile of *Escherichia coli*: comparison to its transcription profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9232-9237.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrone, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., and et al (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**: 5791-5795.
- Dailey, F.E., and Macnab, R.M. (2002) Effects of Lipoprotein Biogenesis Mutations on Flagellar Assembly in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **184**: 771-776.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., and Ramphal, R. (2000) *fleN*, a Gene That Regulates Flagellar Number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**: 357-364.

## Literaturverzeichnis

---

- Dasgupta, N., and Ramphal, R. (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 6636-6644.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E.H., and Ramphal, R. (2002) *fleQ*, the Gene Encoding the Major Flagellar Regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, Is sigma70 Dependent and Is Downregulated by Vfr, a Homolog of *Escherichia coli* Cyclic AMP Receptor Protein. *J. Bacteriol.* **184**: 5240-5250.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 809-824.
- de Bernard, M., Papini, E., de Filippis, V., Gottardi, E., Telford, J., Manetti, R., Fontana, A., Rappuoli, R., and Montecucco, C. (1995) Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J.Biol.Chem.* **270**: 23937-23940.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol JID - 2985120R* **172**: 6568-6572.
- de Manzoni, G., Pedrazzani, C., Di Leo, A., Bonfiglio, M., Tasselli, S., Guglielmi, A., and Cordiano, C. (2001) Metastases to the Para-aortic Lymph Nodes in Ardenocarcinoma of the Cardia. *Eur J Surg* **167**: 413-418.
- de Vries, N., Kuipers, E.J., Kramer, N.E., van Vliet, A.H.M., Bijlsma, J.J.E., Kist, M., Bereswill, S., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Kusters, J.G. (2001) Identification of Environmental Stress-Regulated Genes in *Helicobacter pylori* by a *lacZ* Reporter Gene Fusion System. *Helicobacter* **6**: 300-309.
- DeLisa, M.P., Wu, C.F., Wang, L., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (2001) DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5239-5247.
- Dietz, P., Gerlach, G., and Beier, D. (2002) Identification of target genes regulated by the two-component system HP166-HP165 of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **184**: 350-362.
- Dixon, M.F., and Ectors, N.L. (1995) The Year in *Helicobacter pylori* 1995: Gastric Cancer. *Curr.Opin.Gastroenterol.* **11 (Suppl. 1)**: 38-41.
- Doig, P., de Jonge, B.L., Alm, R.A., Brown, E.D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S.D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B.C., Moir, D.T., Vovis, G.F., and Trust, T.J. (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 675-707.
- Drake, D., and Montie, T.C. (1988) Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Gen.Microbiol.* **134**: 43-52.
- Dramsi, S., and Cossart, P. (1998) Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 137-166.
- Dubois, A., Berg, D.E., Fiala, N., Heman-Ackah, L.M., Perez-Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1998) Cure of *Helicobacter pylori* infection by omeprazole- clarithromycin- based therapy in non-human primates. *J.Gastroenterol.* **33**: 18-22.
- Dytoc, M., Gold, B., Louie, M., Huesca, M., Fedorko, L., Crowe, S., Lingwood, C., Brunton, J., and Sherman, P. (1993) Comparison of *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infect Immun.* **61**: 448-456.
- Eaton, K.A., and Krakowka, S. (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect.Immun.* **62**: 3604-3607.
- Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C., and Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect.Immun.* **64**: 2445-2448.
- Eisenbach, M. (1996) Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* **20**: 903-910.
- Escher, A., O'Kane, D.J., Lee, J., and Szalay, A.A. (1989) Bacterial luciferase alpha beta fusion protein is fully active as a monomer and highly sensitive *in vivo* to elevated temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6528-6532.
- Evans, D.G., Evans, D.J.J., Moulds, J.J., and Graham, D.Y. (1988) N-acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect.Immun.* **56**: 2896-2906.

- Evans, D.J., Jr., and Evans, D.G. (2000) *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter* **5**: 183-195.
- Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C., and Hecker, M. (2002) *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J Bacteriol* **184**: 2500-2520.
- Falush, D., Kraft, C., Correa, P., Taylor, N.S., Fox, J.G., Achtman, M., and 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.U.S.A.* **1**: 1-1.
- 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., and Suerbaum, S. (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**: 1582-1585.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., and Youngman, P. (2000) The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8063-8068.
- Feldman, M., Cryer, B., Mallat, D., and Go, M.F. (2001) Role of *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal injury and gastric prostaglandin synthesis during long term/low dose aspirin therapy: a prospective placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Am J Gastroenterol* **96**: 1751-1757.
- Feldman, R.A. (2001) Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Achtman, M. and Suerbaum, S. (eds). Wymondham: Horizon Scientific Press, pp. 29-51.
- Ferrero, R.L., Cussac, V., Courcoux, P., and Labigne, A. (1992) Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J.Bacteriol.* **174**: 4212-4217.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S., and Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* **42**: 1337-1348.
- Fisher, M.A., Plikaytis, B.B., and Shinnick, T.M. (2002) Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* **184**: 4025-4032.
- Fleiszig, S.M.J., Arora, S.K., Van, R., and Ramphal, R. (2001) FlhA, a Component of the Flagellum Assembly Apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, Plays a Role in Internalization by Corneal Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **69**: 4931-4937.
- Follet, E.A.C., and Gordon, J. (1963) An electron microscope study of *Vibrio* flagella. *J.Gen.Microbiol.* **32**: 235-239.
- Forsberg, A., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (1994) Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends.Microbiol.* **2**: 14-19.
- Forsyth, M.H., Cao, P., Garcia, P.P., Hall, J.D., and Cover, T.L. (2002) Genome-wide transcriptional profiling in a histidine kinase mutant of *Helicobacter pylori* identifies members of a regulon. *J Bacteriol* **184**: 4630-4635.
- Foynes, S., Dorrell, N., Ward, S.J., Zhang, Z.W., McColm, A.A., Farthing, M.J., and Wren, B.W. (1999) Functional analysis of the roles of FliQ and FlhB in flagellar expression in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* **174**: 33-39.
- Foynes, S., Dorrell, N., Ward, S.J., Stabler, R.A., McColm, A.A., Rycroft, A.N., and Wren, B.W. (2000) *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect.Immun.* **68**: 2016-2023.
- Fryer, R.M., Randall, J., Yoshida, T., Hsiao, L.L., Blumenstock, J., Jensen, K.E., Dimofte, T., Jensen, R.V., and Gullans, S.R. (2002) Global analysis of gene expression: methods, interpretation, and pitfalls. *Exp Nephrol* **10**: 64-74.
- Fujinaga, R., Nakazawa, T., and Shirai, M. (2001) Allelic exchange mutagenesis of *rpoN* encoding RNA-polymerase sigma54 subunit in *Helicobacter pylori*. *J Infect Chemother* **7**: 148-155.
- Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E., and Boquet, P. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *Embo J* **19**: 6361-6370.

- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H., and Opferkuch, W. (1993) Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J.Med.Microbiol.* **38**: 371-377.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M., and Prinz, C. (1999) Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12778-12783.
- Gerhard, M., Hirno, S., Wadstrom, T., and al., e. (2001) *Helicobacter pylori*, an adherant pain in the stomach. In *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Achtman, M. and Suerbaum, S. (eds). Wymondham: Horizon Scientific Press, pp. 185-206.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C.L., and Senesi, S. (2002) Requirement of *flhA* for Swarming Differentiation, Flagellin Export, and Secretion of Virulence-Associated Proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **184**: 6424-6433.
- Gillen, K.L., and Hughes, K.T. (1993) Transcription from two promoters and autoregulation contribute to the control of expression of the *Salmonella typhimurium* flagellar regulatory gene *flgM*. *J Bacteriol* **175**: 7006-7015.
- Glagolev, A.N., and Skulachev, V.P. (1978) The proton pump is a molecular engine of motile bacteria. *Nature* **272**: 280-282.
- Go, M.F., Kapur, V., Graham, D.Y., and 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., and 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.
- Grunenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Roder, D., Langen, H., and Jenal, U. (2001) Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4681-4686.
- Guckenberger, M., Kurz, S., Aepinus, C., Theiss, S., Haller, S., Leimbach, T., Panzner, U., Weber, J., Paul, H., Unkmeir, A., Frosch, M., and Dietrich, G. (2002) Analysis of the Heat Shock Response of *Neisseria meningitidis* with cDNA- and Oligonucleotide-Based DNA Microarrays. *J. Bacteriol.* **184**: 2546-2551.
- Gygi, D., Bailey, M.J., Allison, C., and Hughes, C. (1995) Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*. *Mol.Microbiol.* **15**: 761-769.
- Haas, R., Meyer, T.F., and van Putten, J.P. (1993) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol.Microbiol.* **8**: 753-760.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., and Tschäpe, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol.Microbiol.* **23**: 1089-1097.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**: 557-580.
- Harshey, R.M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**: 249-273.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.
- Hazell, S.L., Lee, A., Brady, L., and 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.
- Hazell, S.L., Andrews, R.H., Mitchell, H.M., and Daskalopoulous, G. (1997) Genetic relationship among isolates of *Helicobacter pylori*: evidence of the existence of a *Helicobacter pylori* species-complex. *FEMS Microbiol.Lett.* **150**: 27-32.
- Hendrixson, D.R., and DiRita, V.J. (2003) Transcription of sigma54-dependent but not sigma28-dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus. *Mol Microbiol* **50**: 687-702.
- Hessey, S.J., Spencer, J., Wyatt, J.I., Sobala, G., Rathbone, B.J., Axon, A.T., and Dixon, M.F. (1990) Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut.* **31**: 134-138.

- Heuermann, D., and 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.
- Heuner, K., Hacker, J., and Brand, B.C. (1997) The alternative sigma factor sigma28 of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli* *fliA* mutant. *J.Bacteriol.* **179**: 17-23.
- Heuner, K., Brand, B.C., and Hacker, J. (1999) The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiol Lett* **175**: 69-77.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2002) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14428-14433.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., and Aizawa, S. (1994) Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439-5449.
- Hirano, T., Minamino, T., Namba, K., and Macnab, R.M. (2003) Substrate Specificity Classes and the Recognition Signal for *Salmonella* Type III Flagellar Export. *J. Bacteriol.* **185**: 2485-2492.
- Homma, M., Fujita, H., Yamaguchi, S., and Iino, T. (1984a) Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *J.Bacteriol.* **159**: 1056-1059.
- Homma, M., Kutsukake, K., Iino, T., and Yamaguchi, S. (1984b) Hook-associated proteins essential for flagellar filament formation in *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **157**: 100-108.
- Houben, M.H., Van Der Beek, D., Hensen, E.F., Craen, A.J., Rauws, E.A., and 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.
- Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J., and Karlinsey, J.E. (1993) Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* **262**: 1277-1280.
- Ikeda, T., Oosawa, K., and Hotani, H. (1996) Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure. *J.Mol.Biol.* **259**: 679-686.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., and Boren, T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**: 373-377.
- Imae, Y., Matsukura, H., and Kobayashi, S. (1986) Sodium-driven flagellar motors of alkalophilic *Bacillus*. *Methods Enzymol* **125**: 582-592.
- Jagannathan, A., Constantinidou, C., and Penn, C.W. (2001) Roles of *rpoN*, *fliA*, and *flgR* in expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **183**: 2937-2942.
- Jarrell, K.F., Bayley, D.P., and Kostyukova, A.S. (1996) The archaeal flagellum: a unique motility structure. *J.Bacteriol.* **178**: 5057-5064.
- Jenal, U. (2000) Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 177-191.
- Jenks, P.J., Foynes, S., Ward, S.J., Constantinidou, C., Penn, C.W., and Wren, B.W. (1997) A flagellar-specific ATPase (FliI) is necessary for flagellar export in *Helicobacter pylori*. *FEMS.Microbiol.Lett.* **152**: 205-211.
- Jones, A., Luke, C.J., Cockayne, A., Constantinidou, C., Reynolds, D.J., and Penn, C.W. (1995) Gene cloning of a flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori*. *Gut* **37**: A63-A63.
- Jones, A., Logan, R., Foynes, S., Cockayne, A., Wren, B., and Penn, C. (1997) A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminylactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. *J. Bacteriol.* **179**: 5643-5647.
- Josenhans, C., Labigne, A., and Suerbaum, S. (1995a) 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., Labigne, A., and Suerbaum, S. (1995b) Reporter gene analyses show that expression of both *H. pylori* flagellins is dependent on the growth phase. *Gut* **37 (Suppl. 1)**: A62-A62.
- Josenhans, C., Friedrich, S., and Suerbaum, S. (1998) Green fluorescent protein as a novel marker and reporter system in *Helicobacter* sp. *FEMS Microbiol.Lett.* **161**: 263-273.
- Josenhans, C., Ferrero, R.L., Labigne, A., and Suerbaum, S. (1999) Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes from *Helicobacter felis*. *Mol.Microbiol.* **33**: 350-362.

## Literaturverzeichnis

---

- Josenhans, C., Eaton, K.A., Thevenot, T., and Suerbaum, S. (2000) Switching of flagellar motility in *Helicobacter pylori* by reversible length variation of a short homopolymeric sequence repeat in *fliP*, a gene encoding a basal body protein. *Infect.Immun.* **68**: 4598-4603.
- Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2000) Motility and chemotaxis. In *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Achtman, M. and Suerbaum, S. (eds). Wymondham: Horizon Press.
- Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2001) Motility and Chemotaxis. In *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Achtman, M. and Suerbaum, S. (eds). Wymondham: Horizon Scientific Press, pp. 171-184.
- Josenhans, C., Niehus, E., Amersbach, S., Horster, A., Betz, C., Drescher, B., Hughes, K.T., and Suerbaum, S. (2002a) Functional characterization of the antagonistic flagellar late regulators FliA and FlgM of *Helicobacter pylori* and their effects on the *H. pylori* transcriptome. *Mol Microbiol* **43**: 307-322.
- Josenhans, C., Vossebein, L., Friedrich, S., and Suerbaum, S. (2002b) The *neuA/flmD* gene cluster of *Helicobacter pylori* is involved in flagellar biosynthesis and flagellin glycosylation. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 165-172.
- Kalir, S., McClure, J., Pabbaraju, K., Southward, C., Ronen, M., Leibler, S., Surette, M.G., and Alon, U. (2001) Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**: 2080-2083.
- Kansau, I., Raymond, J., Bingen, E., Courcoux, P., Kalach, N., Bergeret, M., Braimi, N., Dupont, C., and Labigne, A. (1996) Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res.Microbiol.* **147**: 661-669.
- Karita, M., Tummuru, M.K., Wirth, H.P., and Blaser, M.J. (1996) Effect of growth phase and acid shock on *Helicobacter pylori* *cagA* expression. *Infect Immun* **64**: 4501-4507.
- Karlinsey, J.E., Lonner, J., Brown, K.L., and Hughes, K.T. (2000a) Translation/secretion coupling by type III secretion systems. *Cell* **102**: 487-497.
- Karlinsey, J.E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S.I., and Hughes, K.T. (2000b) Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol Microbiol* **37**: 1220-1231.
- Kato-Maeda, M., Gao, Q., and Small, P.M. (2001) Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol* **3**: 713-719.
- Kaushal, D., Schroeder, B.G., Tyagi, S., Yoshimatsu, T., Scott, C., Ko, C., Carpenter, L., Mehrotra, J., Manabe, Y.C., Fleischmann, R.D., and Bishai, W.R. (2002) Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8330-8335.
- Kavermann, H., Burns, B.P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K., and Haas, R. (2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* **197**: 813-822.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M., and Walter, P. (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* **70**: 755-775.
- Kelly, D.J. (2001) The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 16S-24S.
- Kersulyte, D., Chalkauskas, H., and Berg, D.E. (1999) Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol.Microbiol.* **31**: 31-43.
- Kim, J.S., Chang, J.H., Chung, S.I., and Yum, J.S. (1999) Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J Bacteriol.* **181**: 6969-6976.
- Kim, Y.K., and McCarter, L.L. (2000) Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **182**: 3693-3704.
- Kong, H., Lin, L.F., Porter, N., Stickel, S., Byrd, D., Posfai, J., and Roberts, R.J. (2000) Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Res* **28**: 3216-3223.
- Kostrzynska, M., Betts, J.D., Austin, J.W., and Trust, T.J. (1991) Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J.Bacteriol.* **173**: 937-946.
- Kuipers, E.J., Israel, D.A., Kusters, J.G., and Blaser, M.J. (1998) Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *J.Bacteriol.* **180**: 2901-2905.

- Kushner, S.R. (1996) mRNA decay. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Vol. 1. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds). Washington D.C.: ASM Press.
- Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Van-Strijp, J.A., and Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestations of cell death. *Infect.Immun.* **65**: 3672-3679.
- Kutsukake, K., Ikebe, T., and Yamamoto, S. (1999) Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. *Genes Genet Syst* **74**: 287-292.
- Labigne, A., Cussac, V., and Courcoux, P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J.Bacteriol.* **173**: 1920-1931.
- Labigne-Roussel, A., Courcoux, P., and Tompkins, L. (1988) Gene disruption and replacement as a feasible approach for mutagenesis of *Campylobacter jejuni*. *J.Bacteriol.* **170**: 1704-1708.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laub, M.T., McAdams, H.H., Feldblyum, T., Fraser, C.M., and Shapiro, L. (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**: 2144-2148.
- Lawhon, S.D., Frye, J.G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., and Altier, C. (2003) Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **48**: 1633-1645.
- Lee, C.K., Soike, K., Giannasca, P., Hill, J., Weltzin, R., Kleantous, H., Blanchard, J., and Monath, T.P. (1999) Immunization of rhesus monkeys with a mucosal prime, parenteral boost strategy protects against infection with *Helicobacter pylori*. *Vaccine* **17**: 3072-3082.
- Lee, M.L., Kuo, F.C., Whitmore, G.A., and Sklar, J. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9834-9839.
- Lee, S.K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.I., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2003) *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect* **5**: 1345-1356.
- Lengeler, J.W., and Postma, P.W. (1999) Global Regulatory Networks and Signal Transduction Pathways. In *Biology of the Prokaryotes*. Lengeler, J.W., Drews, G. and Schlegel, H.G. (eds). Stuttgart: Georg Thieme Verlag, pp. 491-523.
- Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G., and Morgan, D.R. (1988) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J.Med.Microbiol.* **26**: 93-99.
- Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., and Haas, R. (1992) Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol.Microbiol.* **6**: 2863-2874.
- Li, Z., Dumas, F., Dubreuil, D., and Jacques, M. (1993) A species-specific periplasmic flagellar protein of *Serpulina* (*Treponema*) *hyodysenteriae*. *J.Bacteriol.* **175**: 8000-8007.
- Lockhart, D.J., and Winzeler, E.A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**: 827-836.
- Lundstrom, A.M., Blom, K., Sundaeus, V., and Bolin, I. (2001) HpaA shows variable surface localization but the gene expression is similar in different *Helicobacter pylori* strains. *Microb Pathog* **31**: 243-253.
- Macnab, R. (1995) Flagellar Switch. In *Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (eds). Washington D.C.: ASM Press, pp. 181-199.
- Macnab, R.M. (1996) Flagella and Motility. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C. (ed). Washington D. C.: ASM Press, pp. 123-145.
- Macnab, R.M. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**: 77-100.
- Magasanik, B. (2000) Global regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14044-14045.
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L., and Boren, T. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578.

- Majewski, S.I., and 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.
- Makishima, S., Komoriya, K., Yamaguchi, S., and Aizawa, S.-I. (2001) Length of the Flagellar Hook and the Capacity of the Type III Export Apparatus. *Science* **291**: 2411-2413.
- Malaty, H.M., and Graham, D.Y. (1994) Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**: 742-745.
- Manson, M.D., Armitage, J.P., Hoch, J.A., and Macnab, R.M. (1998) Bacterial locomotion and signal transduction. *J Bacteriol* **180**: 1009-1022.
- Marchetti, M., Aricò, B., Burroni, D., Figura, N., Rappuoli, R., and Ghiara, P. (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* **267**: 1655-1658.
- Marchetti, M., Rossi, M., Giannelli, v., Giuliani, M.M., Pizza, M., Censini, S., Covacci, A., Massari, P., Pagliaccia, C., Manetti, R., Telford, J.L., Douce, G., Dougan, G., Rappuoli, R., and Ghiara, P. (1998) Protection against *Helicobacter pylori* infection in mice by intragastric vaccination with *H. pylori* antigens is achieved using a non-toxic mutant of *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) as adjuvant. *Vaccine* **16**: 33-37.
- Marshall, B.J. (2001) One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H.L., Mendz, G.L. and Hazell, S. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 19-24.
- Marshall, D.G., Dundon, W.G., Beesley, S.M., and Smyth, C.J. (1998) *Helicobacter pylori*--a conundrum of genetic diversity. *Microbiology* **144**: 2925-2939.
- McCarter, L.L. (2001) Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 445-462, table of contents.
- McGee, D.J., Coker, C., Testerman, T.L., Harro, J.M., Gibson, S.V., and Mobley, H.L.T. (2002) The *Helicobacter pylori* *flbA* flagellar biosynthesis and regulatory gene is required for motility and virulence and modulates urease of *H. pylori* and *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol* **51**: 958-970.
- Mehta, N., Olson, J.W., and Maier, R.J. (2003) Characterization of *Helicobacter pylori* Nickel Metabolism Accessory Proteins Needed for Maturation of both Urease and Hydrogenase. *J. Bacteriol.* **185**: 726-734.
- Meighen, E.A. (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* **55**: 123-142.
- Menz, G.L., and Hazell, S.L. (1993) Fumarate catabolism in *Helicobacter pylori*. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **31**: 325-332.
- Menz, G.L., Hazell, S.L., and Burns, B.P. (1993) Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J.Gen.Microbiol.* **139**: 3023-3028.
- Menz, G.L., Hazell, S.L., and Burns, B.P. (1994) The Entner-Doudoroff pathway in *Helicobacter pylori*. *Arch.Biochem.Biophys.* **312**: 349-356.
- Mengin-Lecreulx, D., Texier, L., Rousseau, M., and van Heijenoort, J. (1991) The *murG* Gene of *Escherichia coli* Codes for the UDP-NAcetylglucosamine: N-Acetylmuramyl-(Pentapeptide) Pyrophosphoryl-Undecaprenol N-Acetylglucosamine Transferase Involved in the Membrane Steps of Peptidoglycan Synthesis. *J Bacteriol* **173**: 4625-4636.
- Merrell, D.S., Butler, S.M., Qadri, F., Dolganov, N.A., Alam, A., Cohen, M.B., Calderwood, S.B., Schoolnik, G.K., and Camilli, A. (2002) Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature* **417**: 642-645.
- Merrell, D.S., Goodrich, M.L., Otto, G., Tompkins, L.S., and Falkow, S. (2003) pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **71**: 3529-3539.
- Merz, A.J., So, M., and Sheetz, M.P. (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**: 98-102.
- Messing, J., and Vieira, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene.* **19**: 269-276.
- Meyer, J.M., Silliman, N.P., Wang, W., Siepman, N.Y., Sugg, J.E., Morris, D., Zhang, J., Bhattacharyya, H., King, E.C., and Hopkins, R.J. (2002) Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med* **136**: 13-24.



- Michetti, P., Kreiss, C., Kotloff, K.L., Porta, N., Blanco, J.L., Bachmann, D., Herranz, M., Saldinger, P.F., Corthesy-Theulaz, I., Losonsky, G., Nichols, R., Simon, J., Stolte, M., Ackerman, S., Monath, T.P., and Blum, A.L. (1999) Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* **116**: 804-812.
- Mitchell, J.D., Mitchell, H.M., and Tobias, V. (1992) Acute *Helicobacter pylori* infection in an infant, associated with gastric ulceration and serological evidence of intra-familial transmission. *Am.J.Gastroenterol.* **87**: 382-386.
- Miyaji, H., Azuma, T., Ito, S., Abe, Y., Gejyo, F., Hashimoto, N., Sugimoto, H., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Kohli, Y., and Kuriyama, M. (2000) *Helicobacter pylori* infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. *J Gastroenterol Hepatol* **15**: 257-262.
- Mizote, T., Yoshiyama, H., and Nakazawa, T. (1997) Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect Immun.* **65**: 1519-1521.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161-168.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D., and Hausinger, R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol.Rev.* **59**: 451-480.
- Monstein, H.J., and Jonasson, J. (2001) Differential virulence-gene mRNA expression in coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 530-536.
- Montecucco, C., De Bernard, M., Papini, E., and Zoratti, M. (2001) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: cell intoxication and anion-specific channel activity. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**: 113-129.
- Morgan, D.G., Owen, C., Melanson, L.A., and DeRosier, D.J. (1995) Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices. *J.Mol.Biol.* **249**: 88-110.
- Morooka, T., Umeda, A., and Amako, K. (1985) Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *J.Gen.Microbiol.* **131**: 1973-1980.
- Murphy, C.K., and Beckwith, J. (1996) Export of proteins to the cell envelope in *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Vol. 1. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds). Washington D.C.: ASM Press.
- Nadon, R., and Shoemaker, J. (2002) Statistical issues with microarrays: processing and analysis. *Trends Genet* **18**: 265-271.
- Nakamura, H., Yoshiyama, H., Takeuchi, H., Mizote, T., Okita, K., and Nakazawa, T. (1998) Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun.* **66**: 4832-4837.
- Namba, K., Yamashita, I., and Vonderviszt, F. (1989) Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* **342**: 648-654.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R.M., and Kutsukake, K. (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 1555-1561.
- Nedenskov, P. (1994) Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**: 3450-3453.
- Nedenskov-Sorensen, P., Bukholm, G., and Bovre, K. (1990) Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J.Infect.Dis.* **161**: 365-366.
- Niehus, E., Ye, F., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2002) Growth phase-dependent and differential transcriptional control of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **148**: 3827-3837.
- Niehus, E., Gressmann, H., Ye, F., Schlapbach, R., Dehio, M., Dehio, C., Stack, A., Meyer, T.F., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2004) Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **52**: 947-961.
- Noach, L.A., Rolf, T.M., and Tytgat, G.N. (1994) Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J.Clin Pathol.* **47**: 699-704.
- Nogueira, C., Figueiredo, C., Carneiro, F., Gomes, A.T., Barreira, R., Figueira, P., Salgado, C., Belo, L., Peixoto, A., Bravo, J.C., Bravo, L.E., Realpe, J.L., Plaisier, A.P., Quint, W.G., Ruiz, B.,

- Correa, P., and van Doorn, L.J. (2001) *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol* **158**: 647-654.
- Normark, S. (1970) Genetics of a chain-forming mutant of *Escherichia coli*. Transduction and dominance of the *envA* gene mediating increased penetration to some antibacterial agents. *Genet Res* **16**: 63-78.
- O' Rourke, J., and Bode, G. (2001) Morphology and Ultrastructure. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H.L., Mendz, G.L. and Hazell, S. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 53-67.
- Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., and 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., and Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**: 1497-1500.
- Olson, J.W., and Maier, R.J. (2002) Molecular Hydrogen as an Energy Source for *Helicobacter pylori*. *Science* **298**: 1788-1790.
- O'Rourke, E.J., Chevalier, C., Boiteux, S., Labigne, A., Ielpi, L., and Radicella, J.P. (2000) A novel 3-methyladenine DNA glycosylase from *Helicobacter pylori* defines a new class within the endonuclease III family of base excision repair glycosylases. *J Biol Chem* **275**: 20077-20083.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H., and Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **46**: 281-291.
- Osteras, M., and Jenal, U. (2000) Regulatory circuits in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol* **3**: 171-176.
- O'Toole, P.W., Austin, J.W., and Trust, T.J. (1994a) Identification and molecular characterization of a major ring- forming surface protein from the gastric pathogen *Helicobacter mustelae*. *Mol.Microbiol.* **11**: 349-361.
- O'Toole, P.W., Kostrzynska, M., and Trust, T.J. (1994b) Non-motile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. *Mol.Microbiol.* **14**: 691-703.
- O'Toole, P.W., Janson, L., Doig, P., Huang, J., Kostrzynska, M., and Trust, T.J. (1995) The putative neuraminylactose-binding hemagglutinin HpaA of *Helicobacter pylori* CCUG 17874 is a lipoprotein. *J.Bacteriol.* **177**: 6049-6057.
- O'Toole, R., Milton, D.L., and Wolf Watz, H. (1996) Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Mol.Microbiol.* **19**: 625-637.
- Ottemann, K.M., and Miller, J.F. (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* **24**: 1109-1117.
- Ottemann, K.M., and Lowenthal, A.C. (2002) *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* **70**: 1984-1990.
- Pandza, S., Baetens, M., Park, C.H., Au, T., Keyhan, M., and Matin, A. (2000) The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* **36**: 414-423.
- Pantheil, K., Dietz, P., Haas, R., and Beier, D. (2003) Two-component systems of *Helicobacter pylori* contribute to virulence in a mouse infection model. *Infect Immun* **71**: 5381-5385.
- Park, S.F., Purdy, D., and Leach, S. (2000) Localized reversible frameshift mutation in the *flhA* gene confers phase variability to flagellin gene expression in *Campylobacter coli*. *J.Bacteriol.* **182**: 207-210.
- Park, S.K., Jiang, F., Dalbey, R.E., and Phillips, G.J. (2002) Functional analysis of the signal recognition particle in *Escherichia coli* by characterization of a temperature-sensitive *ffh* mutant. *J Bacteriol* **184**: 2642-2653.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H., Whitehead, S., and Barrell, B.G. (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403**: 665-668.
- Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K.D., Hundt, E., and Knapp, B. (1999) Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic.Acids.Res* **27**: 3325-3333.

## Literaturverzeichnis

---

- Pflock, M., Dietz, P., Schar, J., and Beier, D. (2004) Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* **234**: 51-61.
- Pittman, M.S., Goodwin, M., and Kelly, D.J. (2001) Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation. *Microbiology* **147**: 2493-2504.
- Porter, S.C., North, A.K., and Kustu, S. (1995) Mechanism of Transcriptional Activation by NtrC. In *wo-Component Signal Transduction*. Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (eds). Washington D.C.: ASM Press, pp. 147-158.
- Porwollik, S., Noonan, B., and O'Toole, P.W. (1999) Molecular characterization of a flagellar export locus of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **67**: 2060-2070.
- Power, P.M., and Jennings, M.P. (2003) The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **218**: 211-222.
- Prinz, C., Hafsi, N., and Volland, P. (2003) *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol* **11**: 134-138.
- Prouty, M.G., Correa, N.E., and Klose, K.E. (2001) The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **39**: 1595-1609.
- Pruess, B.M., Campbell, J.W., Van Dyk, T.K., Zhu, C., Kogan, Y., and Matsumura, P. (2003) FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer. *J Bacteriol* **185**: 534-543.
- Pruss, B.M., and Matsumura, P. (1997) Cell cycle regulation of flagellar genes. *J.Bacteriol.* **179**: 5602-5604.
- Raddatz, G., Dehio, M., Meyer, T.F., and Dehio, C. (2001) PrimeArray: genome-scale primer design for DNA-microarray construction. *Bioinformatics* **17**: 98-99.
- Rain, J.C., Selig, L., de Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A., and Legrain, P. (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**: 211-215.
- Rappuoli, R. (2000) Pushing the limits of cellular microbiology: microarrays to study bacteria-host cell intimate contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13467-13469.
- Rathbone, B.J., Wyatt, J.I., Worsley, B.W., Shires, S.E., Trejdosiewicz, L.K., Heatley, R.V., and Losowsky, M.S. (1986) Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. *Gut*. **27**: 642-647.
- Rauhut, R., and Klug, G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 353-370.
- Redlinger, T., O'Rourke, K., and Goodman, K.J. (1999) Age distribution of *Helicobacter pylori* seroprevalence among young children in a United States/Mexico border community: evidence for transitory infection. *Am J Epidemiol.* **150**: 225-230.
- Revel, A.T., Talaat, A.M., and Norgard, M.V. (2002) DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1562-1567.
- Reynolds, D.J., and Penn, C.W. (1994) Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *J.Gen.Microbiol.* **140**: 2649-2656.
- Rhodius, V., Van Dyk, T.K., Gross, C., and LaRossa, R.A. (2002) Impact of genomic technologies on studies of bacterial gene expression. *Annu Rev Microbiol* **56**: 599-624.
- Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H., and Blattner, F.R. (1999) Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **27**: 3821-3835.
- Rothenbacher, D., Bode, G., Berg, G., Knayer, U., Gonser, T., Adler, G., and Brenner, H. (1999) *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J Infect Dis* **179**: 398-402.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T.K., Sherlock, G., Tompkins, L., and Falkow, S. (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**: 14668-14673.
- Salama, N.R., Otto, G., Tompkins, L., and Falkow, S. (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun* **69**: 730-736.
- Salaun, L., Audibert, C., Le Lay, G., Burucoa, C., Fauchere, J.L., and Picard, B. (1998) Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers. *FEMS Microbiol.Lett.* **161**: 231-239.

- Salyers, A.A., and Whitt, D.D. (1994) Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. ASM Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, M.C., and Theriot, J.A. (1996) Tails from the hall of infection: actin-based motility of pathogens. *Trends Microbiol* **4**: 211-213.
- Saunders, N.J., Peden, J.F., Hood, D.W., and Moxon, E.R. (1998) Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Mol.Microbiol.* **27**: 1091-1098.
- Scarlato, V., Delany, I., Spohn, G., and Beier, D. (2001) Regulation of transcription in *Helicobacter pylori*: simple systems or complex circuits? *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 107-117.
- Schauer, A., Ranes, M., Santamaria, R., Guijarro, J., Lawlor, E., Mendez, C., Chater, K., and Losick, R. (1988) Visualizing gene expression in time and space in the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Science* **240**: 768-772.
- Scherer, D.C., DeBuron Connors, I., and Minnick, M.F. (1993) Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect Immun.* **61**: 4962-4971.
- Schirm, M., Soo, E.C., Aubry, A.J., Austin, J., Thibault, P., and Logan, S.M. (2003) Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **48**: 1579-1592.
- Schlemper, R.J., van der Werf, S.D., Biemond, I., and Lamers, C.B. (1996) Seroepidemiology of gastritis in Japanese and Dutch male employees with and without ulcer disease. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **8**: 33-39.
- Schmitz, A., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (1997) Cloning and characterization of the *Helicobacter pylori flbA* gene, which codes for a membrane protein involved in coordinated expression of flagellar genes. *J.Bacteriol.* **179**: 987-997.
- Schoenhals, G.J., and Macnab, R.M. (1996) Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J.Bacteriol.* **178**: 4200-4207.
- Schoolnik, G.K. (2002) Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **5**: 20-26.
- Schreiber, S., Stüben, M., Josenhans, C., Scheid, P., and Suerbaum, S. (1999) *In vivo* distribution of *Helicobacter felis* in the gastric mucus of the mouse: Experimental method and results. *Infect.Immun.* **67**: 5151-5156.
- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14559-14564.
- Seidler, R.J., and Starr, M.P. (1968) Structure of the flagellum of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J.Bacteriol.* **95**: 1952-1955.
- Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F., and Backert, S. (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **277**: 6775-6778.
- Shi, W., Li, C., Louise, C.J., and Adler, J. (1993) Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **175**: 2236-2240.
- Siewert, J.R., and Stein, H.J. (1998) Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* **85**: 1457-1459.
- Smoot, D.T., Mobley, H.L., Chippendale, G.R., Lewison, J.F., and Resau, J.H. (1990) *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect.Immun.* **58**: 1992-1994.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., and Bertin, P. (1999) Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon. *J Bacteriol* **181**: 7500-7508.
- Soutourina, O.A., and Bertin, P.N. (2003) Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 505-523.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A., and Kaper, J.B. (2001) Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **183**: 5187-5197.
- Spohn, G., and Scarlato, V. (1999) Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J.Bacteriol.* **181**: 593-599.

- Spohn, G., and Scarlato, V. (2001) Motility, Chemotaxis, and Flagella. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H.L., Mendz, G.L. and Hazell, S. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 239-247.
- Stark, R.M., Suleiman, M.S., Hassan, I.J., Greenman, J., and Millar, M.R. (1997) Amino acid utilisation and deamination of glutamine and asparagine by *Helicobacter pylori*. *J.Med.Microbiol.* **46**: 793-800.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J., and Covacci, A. (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* **43**: 971-980.
- Suerbaum, S., Josenhans, C., and Labigne, A. (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J.Bacteriol.* **175**: 3278-3288.
- Suerbaum, S., Brauer-Steppkes, T., Labigne, A., Cameron, B., and Drlica, K. (1998a) Topoisomerase I of *Helicobacter pylori*: juxtaposition with a flagellin gene (*flaB*) and functional requirement of a fourth zinc finger motif. *Gene* **210**: 151-161.
- Suerbaum, S., Maynard Smith, J., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E., Dyrek, I., and Achtman, M. (1998b) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**: 12619-12624.
- Suerbaum, S., and Josenhans, C. (1999) Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Mol.Med.Today* **5**: 32-39.
- Suerbaum, S. (2000) Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int.J.Med.Microbiol.* **290**: 175-181.
- Suerbaum, S., and Michetti, P. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**: 1175-1186.
- Suerbaum, S., Josenhans, C., Sterzenbach, T., Drescher, B., Brandt, P., Bell, M., Droge, M., Fartmann, B., Fischer, H.-P., Ge, Z., Horster, A., Holland, R., Klein, K., Konig, J., Macko, L., Mendz, G.L., Nyakatura, G., Schauer, D.B., Shen, Z., Weber, J., Frosch, M., and Fox, J.G. (2003) The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *PNAS* **100**: 7901-7906.
- Sun, H., Zusman, D.R., and Shi, W. (2000) Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr Biol* **10**: 1143-1146.
- Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and Zoratti, M. (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* **18**: 5517-5527.
- Testerman, T.L., McGee, D.J., and Mobley, H.L. (2001) Adherence and Colonization. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H.L., Mendz, G.L. and Hazell, S. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 381-413.
- Thompson, L.J., Merrell, D.S., Neilan, B.A., Mitchell, H., Lee, A., and Falkow, S. (2003) Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun* **71**: 2643-2655.
- Thöny, B., and Hennecke, H. (1989) The -24/-12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol.Rev.* **63**: 341-358.
- Tindberg, Y., Blennow, M., and Granstrom, M. (1999) Clinical symptoms and social factors in a cohort of children spontaneously clearing *Helicobacter pylori* infection. *Acta Paediatr.* **88**: 631-635.
- Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., 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., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M., and Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547.
- Tran, P.H., Peiffer, D.A., Shin, Y., Meek, L.M., Brody, J.P., and Cho, K.W. (2002) Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals. *Nucleic Acids Res* **30**: e54.
- Tsuda, M., Karita, M., and Nakazawa, T. (1993) Genetic transformation in *Helicobacter pylori*. *Microbiol.Immunol.* **37**: 85-89.

- Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K., and Nakazawa, T. (1994) A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect.Immun.* **62**: 3586-3589.
- Tummuru, M.K., Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1993) Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun.* **61**: 1799-1809.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., and Schlemper, R.J. (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* **345**: 784-789.
- van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., Waidner, B., Davies, B.J., de Vries, N., Penn, C.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Kist, M., Bereswill, S., and Kusters, J.G. (2001) Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect Immun* **69**: 4891-4897.
- VandeBroek, A., Lambrecht, M., and Vanderleyden, J. (1998) Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* **144**: 2599-2606.
- Vanet, A., Marsan, L., Labigne, A., and Sagot, M.F. (2000) Inferring regulatory elements from a whole genome. An analysis of *Helicobacter pylori* sigma(80) family of promoter signals. *J.Mol.Biol.* **297**: 335-353.
- Vitkute, J., Stankevicius, K., Tamulaitiene, G., Maneliene, Z., Timinskas, A., Berg, D.E., and Janulaitis, A. (2001) Specificities of eleven different DNA methyltransferases of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* **183**: 443-450.
- Wang, G., Rasko, D.A., Sherburne, R., and Taylor, D.E. (1999) Molecular genetic basis for the variable expression of Lewis Y antigen in *Helicobacter pylori*: analysis of the alpha (1,2) fucosyltransferase gene. *Mol Microbiol* **31**: 1265-1274.
- Wang, Q., Frye, J.G., McClelland, M., and Harshey, R.M. (2004) Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol Microbiol* **52**: 169-187.
- Wang, X., Sturegard, E., Rupar, R., Nilsson, H.O., Aleljung, P.A., Carlen, B., Willen, R., and Wadstrom, T. (1997) Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J.Med.Microbiol.* **46**: 657-663.
- Wang, Y., Roos, K.P., and Taylor, D.E. (1993) Transformation of *Helicobacter pylori* by chromosomal metronidazole resistance and by a plasmid with a selectable chloramphenicol resistance marker. *J.Gen.Microbiol.* **139**: 2485-2493.
- Warren, J.R., and Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**: 1273-1275.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., and Sachs, G. (2000) A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**: 482-485.
- Wei, Y., Lee, J.M., Smulski, D.R., and LaRossa, R.A. (2001) Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 2265-2272.
- Wen, Y., Marcus, E.A., Matrubutham, U., Gleeson, M.A., Scott, D.R., and Sachs, G. (2003) Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **71**: 5921-5939.
- Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.
- Williams, C.L., Preston, T., Hossack, M., Slater, C., and McColl, K.E.L. (1996) *Helicobacter pylori* utilises urea for amino acid synthesis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **13**: 87-94.
- Wilson, D.R., and Beveridge, T.J. (1993) Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can.J.Microbiol.* **39**: 451-472.
- Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, H.H., Imboden, P., Rane, S., Brown, P.O., and Schoolnik, G.K. (1999) Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**: 12833-12838.
- Woodward, M., Morrison, C., and McColl, K. (2000) An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Epidemiol* **53**: 175-181.

- Worku, M.L., Sidebotham, R.L., Walker, M.M., Keshavarz, T., and Karim, Q.N. (1999) The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology* **145**: 2803-2811.
- Wösten, M.M., Wagenaar, J.A., and van Putten, J.P. (2004) The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the *fla* regulon in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **279**: 16214-16222.
- Wu, J., and Newton, A. (1997) Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol Microbiol* **24**: 233-239.
- Xu, C., and Hoover, T.R. (2001) Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 138-144.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl. Acids. Res.* **30**: e15-.
- Yang, Y.H., and Speed, T. (2002) Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* **3**: 579-588.
- Ye, F., Brauer, T., Josenhans, C., Niehus, E., Drlica, K., and Suerbaum, S. (2004) Global and flagellar gene regulation in *Helicobacter pylori* is dependent on changes in DNA supercoiling. *submitted*.
- Yokota, T., and Gots, J.S. (1970) Requirement of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate for flagella formation in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **103**: 513-516.
- Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C.M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T., and Fujita, Y. (2001) Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **29**: 683-692.
- Yoshiyama, H., and Nakazawa, T. (2000) Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect* **2**: 55-60.
- Young, G.M., Smith, M.J., Minnich, S.A., and Miller, V.L. (1999) The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J Bacteriol* **181**: 2823-2833.
- Young, K., Silver, L.L., Bramhill, D., Cameron, P., Eveland, S.S., Raetz, C.R., Hyland, S.A., and Anderson, M.S. (1995) The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase. *J Biol Chem* **270**: 30384-30391.
- Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L., and Mekalanos, J.J. (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3129-3134.
- Zimmer, D.P., Soupene, E., Lee, H.L., Wendisch, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Bender, R.A., and Kustu, S. (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14674-14679.





## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Adenosinphosphosulfat
ATCC	Amerikanische Bakterien-Stammsammlung
BHI	Brain-Heart-Infusion-Medium
Bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBD	Chitin-Bindedomäne
cDNA	`copy`-DNA
Cm	Chloramphenicol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dd	doppelt destilliert
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	`et alteri` (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Frkt.	Fraktion
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
J	Joule
kB	Kilobasenpaare (1 kB=1000 Bp)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	molar
m	milli- ( $10^{-3}$ ); Meter
μ	mikro- ( $10^{-6}$ )
min	Minute
mRNA	`messenger`-RNA
n	nano- ( $10^{-9}$ )

O.D. <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen('open reading frame')
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
POX	Peroxidase
pH	pH-Wert
pSUS	Bezeichnung selbsthergestellter Plasmide
RLU	Lichtemission ('relative light units')
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur; reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
Sp	Spectinomycin
sp.	Spezies (sg.)
ssp.	Spezies (pl.)
Taq-Polymerase	Thermostabile Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Unit
u. a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vs.	'versus', gegen
v/v	'volume per volume', Volumenanteile
W	Watt
w/v	'weight per volume', Gewichts- pro Volumenanteile
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-b-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

---

## 6.2 Elektronischer Anhang

- 6.2.1 Nicht auf dem *H. pylori*-PCR-Produkt-Microarray vorhandenen PCR-Produkte (Datei: Anhang 6 2 1.pdf)
- 6.2.2 Gesamtliste der Microarray-Ergebnisse (Datei: Anhang 6 2 2.pdf)
- 6.2.3 Stammspezifisch regulierte Gene *flhA* (Datei: Anhang 6 2 3.pdf)
- 6.2.4 Stammspezifisch regulierte Gene *flhF* (Datei: Anhang 6 2 4.pdf)

## 6.3 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Eike Niehus  
Geburtsdatum: 25.06.1972  
Geburtsort: Goslar  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1978-1982: Ev. Grundschule, Linnich  
1982-1991: Gymnasium Haus Overbach, Jülich  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst:

1991-1993: AWO-Altenpflegeheim Morillengang, Aachen

### Studium:

1993-1996: Studium an der Georg-August Universität Göttingen mit der Fachrichtung Biologie/Diplom  
1996: Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Chemie, Physik  
1996-2000: Studium an der Universität Rostock  
1999: Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Molekularbiologie, Meeresbiologie, Umwelt und Ökotoxikologie  
1999-2000: Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie der Universität Rostock bei Prof. Dr. Hubert Bahl und Dr. Ralf-Jörg Fischer mit dem Thema „Untersuchungen zur Genstruktur und Transkription eines Zwei-Komponenten-Systems aus *Clostridium acetobutylicum*.“  
2000: Verteidigung der Diplomarbeit  
2000-2003: Assoziiertes Mitglied des europäischen Graduiertenkollegs der Universitäten Würzburg und Umeå (Schweden) „Gene Regulation in and by Microbial Pathogens“, koordiniert von Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker

### Promotion:

2000-2004: Promotion am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. Sebastian Suerbaum und Dr. Christine Josenhans mit dem Thema „Regulation Motilitäts-assoziiierter Gene in *Helicobacter pylori*.“

Würzburg, den

Eike Niehus

## 6.4 Publikationen

**Josenhans, C., Niehus, E., Amersbach, S., Hoerster, A., Betz, C., Drescher, B., Hughes, K. T. & Suerbaum S. (2002).** Functional characterization of the antagonistic flagellar late regulators FliA and FigM of *Helicobacter pylori* and their effects on the *H. pylori* transcriptome. *Mol. Microbiol* **43**, 307-322

**Niehus, E., Ye, F., Suerbaum, S. & Josenhans, C. (2002).** Growth phase-dependent and differential transcriptional control of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **148**, 3827-3837.

**Niehus, E., Gressmann H., Ye, F., Schlapbach, R., Dehio, M., Dehio, C., Stack, A., Meyer T. M., Suerbaum S. & Josenhans C. (2004).** Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol* **52**: 947-961.

## **Vielen Dank!**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Sebastian Suerbaum für die Bereitstellung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie das ständige Interesse, die Diskussionsbereitschaft und die tatkräftige Hilfe am Fortgang dieser Arbeit.

Genauso herzlich danke ich PD Dr. Christine Josenhans für die engagierte Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und immerwährende Begeisterungsfähigkeit und Offenheit für neue Ideen.

Insbesondere vielen Dank für die Ermöglichung eines eigenständigen wissenschaftlichen Arbeitens und die Möglichkeit im Laufe der Arbeit an vielen nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu können.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jürgen Kreft für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin, Prof. Dr. Thomas Meyer, Dr. Ralph Schlappach, Helga Gressmann, Dr. Christoph Dehio und Dr. Michaela Dehio, von der MWG-Biotech AG, Dr. Bernd Drescher, Dr. Andrea Hörster, Dr. Christian Betz, Dr. Robert Bell und bei Prof. Dr. Kelly Hughes.

Vielen Dank für die tolle Arbeitsatmosphäre, die große Kollegialität und den leckeren Kuchen an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Heli-Labore in Würzburg und Hannover. Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter am Institut für Hygiene und Mikrobiologie in Würzburg, insbesondere den Mitarbeitern der `Microarray-Facility` für die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank an meine Familie für die Ermöglichung des Studiums und die moralische Unterstützung.

Tausend Dank an Antje für Deine Geduld, Hilfe und Unterstützung im Allgemeinen und bei dieser Arbeit...