

---

## A. SUMMARY

The Gram-negative, spiral-shaped, microaerophilic bacterium *Helicobacter pylori* is the causative agent of various disorders of the upper gastrointestinal tract, such as chronic superficial gastritis, chronic active gastritis, peptic ulceration and adenocarcinoma. Although many of the bacterial factors associated with disease development have been analysed in some detail in the recent years, very few studies have focused so far on the mechanisms that regulate expression of these factors at the molecular level. In an attempt to obtain an overview of the basic mechanisms of virulence gene expression in *H. pylori*, three important virulence factors of this pathogen, representative of different pathogenic mechanisms and different phases of the infectious process, are investigated in detail in the present thesis regarding their transcriptional regulation. As an essential factor for the early phase of infection, including the colonisation of the gastric mucosa, the flagella are analysed; the chaperones including the putative adhesion factors GroEL and DnaK are investigated as representatives of the phase of adherence to the gastric epithelium and persistence in the mucus layer; and finally the cytotoxin associated antigen CagA is analysed as representative of the *cag* pathogenicity island, which is supposed to account for the phenomena of chronic inflammation and tissue damage observed in the later phases of infection.

RNA analyses and *in vitro* transcription demonstrate that a single promoter regulates expression of *cagA*, while two promoters are responsible for expression of the upstream divergently transcribed *cagB* gene. All three promoters are shown to be recognised by RNA polymerase containing the vegetative sigma factor  $\sigma^{80}$ . Promoter deletion analyses establish that full activation of the *cagA* promoter requires sequences up to -70 and binding of the C-terminal portion of the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase to an UP-like element located between -40 and -60, while full activation of the major *cagB* promoter requires sequences upstream of -96 which overlap with the *cagA* promoter. These data suggest that the promoters of the pathogenicity island represent a class of minimum promoters, that ensure a basic level of transcription, while full activation requires regulatory elements or structural DNA binding proteins that provide a suitable DNA context.

Regarding flagellar biosynthesis, a master transcriptional factor is identified that regulates expression of a series of flagellar basal body and hook genes in concert with the alternative sigma factor  $\sigma^{54}$ . Evidence is provided that this regulator, designated FlgR (for flagellar regulatory protein), is necessary for motility and transcription of five promoters for seven basal body and hook genes. In addition, FlgR is shown to act as a repressor of transcription of the  $\sigma^{28}$ -regulated promoter of the *flaA* gene, while changes in DNA topology are shown to affect transcription of the  $\sigma^{54}$ -regulated *flaB* promoter. These data indicate that the regulatory network that governs flagellar gene expression in *H. pylori* shows similarities to the systems of both *Salmonella* spp. and *Caulobacter crescentus*.

In contrast to the flagellar genes which are regulated by three different sigma factors, the three operons encoding the major chaperones of *H. pylori* are shown to be transcribed by RNA polymerase containing the vegetative sigma factor  $\sigma^{80}$ . Expression of these operons is shown to be regulated negatively by the transcriptional repressor HspR, a homologue of a repressor protein of *Streptomyces* spp., known to be involved in negative regulation of heat shock genes. *In vitro* studies with purified recombinant HspR establish that the protein represses transcription by binding to large DNA regions centered around the transcription initiation site in the case of one promoter, and around -85 and -120 in the case of the the other two promoters. In contrast to the situation in *Streptomyces*, where transcription of HspR-regulated genes is induced in response to heat shock, transcription of the HspR-dependent genes in *H. pylori* is not inducible with thermal stimuli. Transcription of two of the three chaperone encoding operons is induced by osmotic shock, while transcription of the third operon, although HspR-dependent, is not affected by salt treatment.

Taken together, the analyses carried out indicate that *H. pylori* has reduced its repertoire of specific regulatory proteins to a basic level that may ensure coordinate regulation of those factors that are necessary during the initial phase of infection including the passage through the gastric lumen and the colonisation of the gastric mucosa. The importance of DNA topology and/or context for transcription of many virulence gene promoters may on the other hand indicate, that a sophisticated global regulatory network is present in *H. pylori*, which influences transcription of specific subsets of virulence genes in response to changes in the microenvironment.

---

Das Gram-negative, spiralförmige Bakterium *Helicobacter pylori* verursacht verschiedene Krankheiten des oberen Verdauungstraktes, wie z.B. chronische superfizielle Gastritis, chronische aktive Gastritis, Ulzera und Magenkarzinom. Obwohl viele der bakteriellen Faktoren, die zur Entwicklung dieser Krankheitsformen beitragen, in den letzten Jahren untersucht wurden, sind die molekularen Mechanismen, die die Expression dieser Faktoren regulieren, noch weitgehend unbekannt. Als Ansatz zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der Virulenzgenexpression in *H. pylori* wurden in der vorliegenden Arbeit drei wichtige Virulenzfaktoren repräsentativ für die verschiedenen Phasen des Infektionsprozesses ausgewählt und in Bezug auf ihre transkriptionelle Regulation analysiert. Als essentielle Faktoren für die frühe Phase der Infektion, gekennzeichnet durch die Erstbesiedelung der Schleimschicht des Magens durch die Bakterien, wurden die Flagellen untersucht. Die Chaperone-Proteine mit den mutmaßlichen Adhärenzfaktoren GroEL und DnaK wurden stellvertretend für die Phase der Adhäsion an die Magenepithelzellen und die anschließende persistente Besiedelung der Magenschleimhaut analysiert. Als Vertreter der *cag* Pathogenitätsinsel, die mit großer Wahrscheinlichkeit für die chronische Entzündung und Schädigung des Magengewebes in den späteren Phasen der Infektion verantwortlich ist, wurde schließlich das sogenannte Cytotoxin-assoziierte Antigen CagA untersucht.

RNA-Analysen und *in vitro*-Transkriptionsstudien konnten zeigen, daß die Transkription des *cagA*-Gens von einem einzigen Promotor aus gesteuert wird, während die Expression des stromaufwärts gelegenen divergenten *cagB*-Gens von zwei Promotoren reguliert wird. Alle drei Promotoren werden von der vegetativen,  $\sigma^{80}$ -enthaltenden RNA-Polymerase erkannt. Durch die Einführung spezifischer Deletionen zwischen *cagA* und *cagB* konnte weiterhin gezeigt werden, daß zur vollständigen Aktivierung des *cagA*-Promoters Sequenzen bis -70 sowie die Bindung der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase an ein UP-ähnliches Element zwischen -40 und -60 erforderlich sind, während die vollständige Aktivierung des wichtigsten *cagB*-Promoters Sequenzen oberhalb von -96 erfordert, die mit denjenigen des *cagA* Promoters überlappen. Diese Daten lassen darauf schließen, daß die Promotoren der Pathogenitätsinsel eine Klasse von Minimalpromotoren darstellen, die ein geringes Niveau an Transkription garantieren, für ihre volle Aktivierung aber regulatorische Elemente oder strukturelle DNA-bindende Proteine benötigen, die ein spezielles topologisches Umfeld produzieren.

Bezüglich der Flagellen konnte ein zentraler Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der in Kooperation mit dem alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^{54}$  die Expression einer Serie von Genen kontrolliert, die für strukturelle Komponenten des Flagellenkörpers kodieren. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Faktor (genannt FlgR für Flagellen-Regulator) für die Motilität der Bakterien notwendig ist und die Transkription von fünf Operonen reguliert, die für sieben strukturelle Gene des Flagellen-Basalkörpers und -Hakens kodieren. Darüberhinaus reprimiert FlgR die Transkription des  $\sigma^{28}$ -regulierten *flaA*-Gens, während Änderungen der DNA-Topologie die Transkription des  $\sigma^{54}$ -regulierten *flaB*-Promotors beeinflussen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das regulatorische Netzwerk, welches die Expression der strukturellen Komponenten der Flagellen in *H. pylori* kontrolliert, Ähnlichkeiten zu den in *Caulobacter crescentus* und *Salmonella* spp. beschriebenen Systemen aufweist.

Im Gegensatz zu den Flagellengen, die von drei verschiedenen Sigma-Faktoren reguliert werden, konnte im Fall der drei Operone, die für die Haupt-Chaperone von *H. pylori* kodieren, eine  $\sigma^{80}$ -abhängige Transkription nachgewiesen werden. Die Expression dieser Operone wird darüberhinaus negativ reguliert durch den transkriptionellen Repressor HspR, ein Homolog des gleichnamigen Hitzeschockrepressors von *Streptomyces* spp. *In vitro*-Experimente mit gereinigtem rekombinantem HspR konnten zeigen, daß das Protein die Transkription durch die Bindung an große DNA Regionen reprimiert, die in einem Fall mit dem Transkriptionsstart überlappen, und in den anderen beiden Fällen um -85 bzw. -120 lokalisiert sind. Im Gegensatz zur Situation in *Streptomyces*, wo die Transkription HspR-abhängiger Gene durch Hitzeschock induziert werden kann, ist die Transkription der HspR-regulierten Gene in *H. pylori* nicht mit Temperaturerhöhungen induzierbar. Die Expression zweier der drei Chaperone-kodierenden Operone kann dagegen durch osmotischen Schock induziert werden, während die Transkription des dritten Operons, trotz seiner HspR-Abhängigkeit, nicht durch osmotische Reize beeinflussbar ist.

In ihrer Gesamtheit lassen die transkriptionellen Analysen der verschiedenen Virulenzfaktoren darauf schließen, daß *H. pylori* sein Repertoire an spezifischen regulatorischen

Genen auf ein minimales Niveau reduziert hat, das die koordinierte Regulation derjenigen Faktoren sicherstellt, die für die Anfangsphase der Infektion, namentlich die Durchquerung des Magenlumens und die Erstbesiedelung des Magenepithels, notwendig sind. Die Bedeutung von DNA-Topologie und -Kontext für die Transkription vieler Virulenzgene könnte andererseits auf die Anwesenheit eines hochentwickelten globalen regulatorischen Netzwerkes hinweisen, welches die Transkription spezifischer Untergruppen von Virulenzgenen in Reaktion auf bestimmte Umweltfaktoren beeinflusst.