

Charakterisierung der Typ-IV-Sekretionssysteme und der kryptischen
Plasmide von *Helicobacter pylori*
hinsichtlich ihrer Beteiligung am DNA-Transfer



DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Stefanie Rohrer

2010

Dissertation eingereicht am: 30.11.10

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

2. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Mascher

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Haas angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Fischer W., Windhager L., Rohrer S., Zeiller M., Karnholz A., Hoffmann R., Zimmer R., Haas R. (2010). Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res.* 2010 May 16.

Rohrer S., Fischer W., Haas R. The *Helicobacter pylori* ComB type IV secretion system has a dual function as DNA transformation and conjugative plasmid transfer system.

In Vorbereitung

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS.....	XII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Entdeckung und Epidemiologie von <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2 Pathogenese <i>H. pylori</i> assoziierter Erkrankungen.....	2
1.3 Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	4
1.4 Genetische Variabilität von <i>H. pylori</i>	8
1.4.1 Intergenomische Variabilität.....	10
1.4.2 Intragenomische Variabilität.....	10
1.4.2.1 Repetitive Sequenzen.....	10
1.4.2.2 DNA-Reparatur-Systeme in <i>H. pylori</i>	11
1.4.3 Genetische Plastizität vs. genomische Integrität.....	13
1.5 Typ-IV-Sekretionssysteme in <i>H. pylori</i> P12.....	14
1.5.1 Das Typ-IV-Sekretionssystem ComB und die natürliche Kompetenz von <i>H. pylori</i>	16
1.5.2 Das Cag-Typ-IV-Sekretionssystem.....	17
1.5.3 Das Typ-IV-Sekretionssystem <i>Tfs3</i>	17
1.5.4 Das Typ-IV-Sekretionssystem <i>Tfs4</i>	18
1.6 Bakterielle Konjugation.....	19
1.7 Kryptische Plasmide in <i>H. pylori</i>	21
1.8 Ziele dieser Arbeit.....	22
2 MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Bakterienstämme.....	24

2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i>	24
2.1.1.2	<i>Helicobacter pylori</i>	24
2.1.2	Plasmide und Vektoren.....	26
2.1.3	Oligonukleotide	28
2.1.4	Zelllinie.....	32
2.1.5	Antikörper.....	32
2.1.5.1	Primäre Antikörper.....	32
2.1.5.2	Sekundäre Antikörper	33
2.1.6	Nährmedien für Bakterien	33
2.1.7	Hemmstoffe und Medienzusätze.....	34
2.1.8	Zellkulturmedien und -puffer.....	35
2.1.9	Enzyme und Proteine.....	35
2.1.10	Molekulargewichtsmarker	35
2.1.11	Chemikalien und Reagenzien.....	35
2.1.12	Kommerziell erwerbbaare Kits.....	36
2.1.13	Hilfsmittel	36
2.1.14	Apparaturen und Geräte	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	38
2.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	38
2.2.1.2	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Helicobacter pylori</i>	38
2.2.1.3	Messen der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen	38
2.2.1.4	„Plasmid curing“.....	39
2.2.2	Genetische und molekularbiologische Methoden	39
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (Holmes and Quigley, 1981).....	39
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit.....	40
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>H. pylori</i>	40
2.2.2.4	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>H. pylori</i>	40
2.2.2.5	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (Hanahan, 1983).....	40
2.2.2.6	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	41
2.2.2.7	Transformation von <i>E. coli</i> TOP10-Zellen.....	41
2.2.2.8	Transformation von <i>H. pylori</i>	41
2.2.2.9	Elektroporation von <i>H. pylori</i> modifiziert nach Segal und Tompkins (Segal and Tompkins, 1993).....	42
2.2.2.10	Konjugation von Plasmiden zwischen <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i>	42
2.2.2.11	Kokultivierungsexperimente mit <i>H. pylori</i> -Stämmen (modifiziert nach Kuipers <i>et al.</i> 1998).....	43
2.2.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
2.2.2.13	Kolonie-PCR nach Sambrook <i>et al.</i> (1989).....	45

2.2.2.14	RAPD-PCR (Akopyanz <i>et al.</i> 1992)	45
2.2.2.15	Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA	46
2.2.2.16	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen.....	46
2.2.2.17	DNA-Aufreinigung aus enzymatischen Reaktionen	47
2.2.2.18	Proteinextraktion aus Nukleinsäure-haltigen Lösungen mittels Phenol-Chlorophorm- Extraktion	47
2.2.2.19	Saure Ethanolfällung.....	47
2.2.2.20	Restriktion von dsDNA.....	48
2.2.2.21	Dephosphorylierung.....	48
2.2.2.22	Ligation von DNA-Fragmenten	49
2.2.2.23	DNA-Sequenzierung	49
2.2.2.24	Generierung Marker-freier <i>H. pylori</i> Deletionsmutanten mit Hilfe einer Kontraselektionsmethode (Dailidienne <i>et al.</i> 2006)	49
2.2.2.25	Quantifizierung von extrazellulärer DNA mit dem Quant-iT™ PicoGreen ® dsDNA Reagenz (Invitrogen).....	50
2.2.3	Biochemische und analytische Methoden.....	51
2.2.3.1	Herstellung bakterieller Zellysate	51
2.2.3.2	Lyse von Zellmaterial zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts	51
2.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976).....	52
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.2.3.5	Detektion von Proteinen im Polyacrylamid-Gel	53
2.2.3.6	Western Blot-Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	53
2.2.3.7	Immundetektion immobilisierter Proteine.....	53
2.2.4	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	54
2.2.4.1	Kultivierung von AGS-Zellen.....	54
2.2.4.2	Transfektion von AGS-Zellen.....	55
2.2.4.3	Infektion von AGS-Zellen mit <i>H. pylori</i>	55
2.2.4.4	Quantifizierung des Anteils toter AGS-Zellen in einer Population durch Propidiumjodid-Färbung und Durchflusszytometrie (FACS).....	55
2.2.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	56
2.2.6	Statistische Auswertung.....	57
3	ERGEBNISSE	58
3.1	Nachweis des Transfers der kryptischen Plasmide von <i>H. pylori</i>	58
3.1.1	Sequenzvergleich der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12	58
3.1.2	Insertion eines Selektionsmarkers in pHel4 und pHel12	59
3.1.3	Durchführung von Kokultivierungsexperimenten zur Charakterisierung des DNA-Transfer- Mechanismus	61

3.1.4	Die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 werden sowohl durch Transformation, also auch in einem konjugativen Mechanismus zwischen <i>H. pylori</i> -Stämmen transferiert.....	63
3.1.5	Der Transfer von chromosomalen DNA-Abschnitten erfolgt über Transformation	67
3.2	Generierung markerfreier <i>H. pylori</i> P12 Mutanten durch Anwendung einer Kontraselektionsmethode (Dailidienne <i>et al.</i> , 2006).....	68
3.2.1	Sukzessive Deletion aller Typ-IV-Sekretionssysteme in <i>H. pylori</i> P12	69
3.2.1.1	Deletion von <i>Tfs3</i> und/oder <i>Tfs4</i>	70
3.2.1.2	Deletion des ComB-T4SSs.....	73
3.2.1.3	Deletion des Cag-T4SSs.....	74
3.2.1.4	Schrittweise Deletion aller T4SS und Generierung von Einfach-, Doppel-, Dreifach- und Vierfach-Mutanten.....	74
3.2.2	Komplementation der Funktion der <i>virB4</i> - und <i>topA</i> -Homologen innerhalb des Typ-IV-Sekretionssystems <i>Tfs4</i> von <i>H. pylori</i> P12	75
3.3	Charakterisierung aller T4SS von <i>H. pylori</i> P12 hinsichtlich ihrer Beteiligung am DNA-Transfer	76
3.3.1	Untersuchung der Funktion aller T4SS von <i>H. pylori</i> P12 für die Aufnahme von DNA	77
3.3.2	Beteiligung der T4SS von <i>H. pylori</i> P12 bei der DNA-Sekretion durch den Donor	78
3.3.2.1	Das ComB-System ist auch beim DNA-Export aus dem Donor beteiligt.....	79
3.3.2.2	Das Typ-IV-Sekretionssystem <i>Tfs4</i> vermittelt die Sekretion von Plasmid-DNA	81
3.3.3	Das Membranprotein Come3 ist essentiell für die DNA-Aufnahme.....	84
3.4	Deletion und Untersuchung der Funktion der Plasmid- und chromosomal kodierten Relaxasen und von RecA für den Plasmidtransfer in <i>H. pylori</i> P8 und P12	85
3.4.1	Deletion bzw. Inaktivierung der Plasmid-kodierten putativen Relaxasen in pHel4 und pHel12	86
3.4.2	Deletion der chromosomal kodierten putativen Relaxasen in <i>Tfs3</i> und <i>Tfs4</i> von <i>H. pylori</i> P12.	87
3.4.3	Rolle der Plasmid-kodierten Relaxasen für den konjugativen Transfer der Plasmide pHel4 und pHel12	89
3.4.4	Rolle der Plasmid-kodierten Relaxase in pHel12 für den Rezipienten.....	91
3.4.5	Untersuchung der Funktion der chromosomal kodierten Relaxasen in <i>H. pylori</i> P12	92
3.4.6	Funktion von RecA für die Aufnahme von Plasmid-DNA	93
3.5	Weitere Charakterisierung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12.....	94
3.5.1	Untersuchung der Funktion des kryptischen Plasmids pHel12 für seine konjugative Übertragung.....	94
3.5.1.1	Deletion von pHel12 in <i>H. pylori</i> P12.....	94
3.5.1.2	Das kryptische Plasmid pHel12 ist essentiell für die Plasmidaufnahme im Rezipient..	95

3.5.1.3	Charakterisierung der Funktion einzelner Genprodukte von pHel12 für den Transfer des Plasmids.....	97
3.5.2	Identifizierung eines putativen Toxin-Antitoxin-Systems in den kryptischen Plasmiden pHel4 und pHel12	99
3.5.2.1	Klonierung der Komponenten des putativen TA-Systems von pHel4	100
3.5.2.2	Mögliche Rolle des TA-Systems in pHel12 für die Stabilität des Plasmids und den Plasmidtransfer	100
3.5.3	Identifizierung und Charakterisierung einer Fic-Domäne innerhalb der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12.....	101
3.5.3.1	Identifizierung einer Fic-Domäne in pHel4 und pHel12.....	102
3.5.3.2	Die Expression der Gene <i>orf4M</i> und <i>orf12M</i> in eukaryotischen Zellen stört das Aktinzytoskelett.....	103
3.5.3.3	Quantifizierung des Anteils toter Zellen in einer AGS-Zellpopulation nach Expression von <i>orf4M</i> bzw. <i>orf12M</i>	106
3.5.3.4	Infektion von AGS-Zellen mit <i>H. pylori</i> P12-Mutanten zur Bestätigung der Funktion von <i>orf12M</i>	107
4	DISKUSSION	110
4.1	Mechanismen des DNA-Transfers zwischen <i>H. pylori</i> Stämmen, horizontaler Gentransfer und die Erzeugung genetischer Variabilität	110
4.2	Funktionen der Typ-IV-Sekretionssysteme in <i>H. pylori</i> P12	112
4.2.1	Duale Funktion des ComB-Systems für den DNA-Transfer	113
4.2.2	DNA Sekretion und konjugativer Transfer der PZ1 durch <i>Tfs4</i>	114
4.3	Neuartige DNaseI-resistente Übertragung von pHel4 und pHel12 in einem Relaxase-unabhängigen Prozess – Rolle von RecA?.....	115
4.4	Charakterisierung der Funktion der kryptischen Plasmide in <i>H. pylori</i>	117
4.4.1	Module für den Austausch genetischen Materials	117
4.4.2	Charakterisierung einzelner Genprodukte von pHel12 bezüglich ihrer Rolle für den Transfer von DNA.....	118
4.4.3	Potentiell zytotoxische Elemente der kryptischen Plasmide.....	120
4.5	Interaktion von <i>H. pylori</i> mit eukaryotischen Zellen auf DNA-Ebene?.....	122
4.6	Alternative Mechanismen zur Aufnahme und zur Verbreitung genetischen Materials	123
4.6.1	DNA-Übertragung durch Membranvesikel?.....	123
4.6.2	Sekretion von DNA	124
4.6.3	Autolyse.....	125

4.7	Übertragung von DNA durch einen neuartigen, Konjugations-ähnlichen Mechanismus...	127
5	ZUSAMMENFASSUNG	130
6	LITERATURVERZEICHNIS	132

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
α	anti
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp ^R	Ampicillinresistenz
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BB	engl.: „ <i>brucella broth</i> “; Brucella Medium
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
CFU	engl.: „ <i>colony-forming units</i> “
CLSM	engl.: „ <i>confocal laser scanning microscopy</i> “
C-Terminus	Carboxyterminaler Bereich der DNA bzw. eines Proteins
D	Aspartat
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> (DNS; Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat; Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL-Lösung	„ <i>enhanced chemiluminescence</i> “-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erm ^R	Erythromycinresistenz
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FCS	engl.: „ <i>fetal calf serum</i> “; Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyante
g	Gramm
(x) g	x- faches der Erdbeschleunigung
G	Glycin
G	Guanin
GFP	engl.: „ <i>green fluorescent protein</i> “

h	Stunde
H	Histidin
H ₂ O _{dest.}	einfach destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthio-β-galactosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol/l)
m	milli (10 ⁻³)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	engl.: „multiplicity of infection“
μ	mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
n	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OMP	engl.: „outer membrane protein“
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte NaCl- Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidinfluoride
RAPD	engl.: „random amplification of polymorphic DNA“
rpm	engl.: „rounds per minute“; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Str ^R	Streptomycinresistenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
T _M	Schmelztemperatur
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett

V	Volt
(w/v)	Gewichtsanteil
WT	Wildtyp
(w/w)	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Pathologie von <i>H. pylori</i> -induzierten Erkrankungen.....	3
Abbildung 1.2: Mechanismen zur Generierung genetischer Variabilität in <i>H. pylori</i>	9
Abbildung 1.3: Beeinflussung der genetischen Variabilität auf DNA-Reparatur-Ebene.....	13
Abbildung 1.4: Übersicht aller in <i>H. pylori</i> identifizierten T4SS im Vergleich zum VirB/D4-System von <i>A. tumefaciens</i>	15
Abbildung 1.5: Modell der DNA-Aufnahme durch das ComB-System und den ComE3-Kanal. .	17
Abbildung 1.6: Das T4SS <i>Tfs3</i>	18
Abbildung 1.7: Das T4SS <i>Tfs4</i>	19
Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12.....	60
Abbildung 3.2: Versuchsablauf der Kokultivierungsexperimente.....	62
Abbildung 3.3: Transfer der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12.....	63
Abbildung 3.4: Nachweis des unidirektionalen Plasmid-Transfers vom Donor in den Rezipienten.....	64
Abbildung 3.5: Nachweis der Plasmide in den Transkonjuganten.....	66
Abbildung 3.6: Transfer des chromosomalen Locus <i>rpsL</i> *.....	67
Abbildung 3.7: Die Zwei-Gen-Kassette <i>rpsL-erm</i>	68
Abbildung 3.8: Ablauf der Deletion von Genen mit Hilfe der <i>rpsL-erm</i> -Kassette.....	69
Abbildung 3.9: Übersicht der für die Deletion von <i>Tfs3</i> und <i>Tfs4</i> eingesetzten Oligonukleotidpaare.....	72
Abbildung 3.10: Bestätigung der Deletion von <i>Tfs3</i> und/oder <i>Tfs4</i>	73
Abbildung 3.11: Nachweis der Deletion von <i>comB6-10</i>	74
Abbildung 3.12: Komplementation der <i>topA/virB4</i> -Region in <i>Tfs4</i>	76
Abbildung 3.13: Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Deletionsmutanten als Rezipient..	77
Abbildung 3.14: Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Deletionsmutanten als Donor.....	80
Abbildung 3.15: Auswirkung der Deletion des ComB-T4SSs in Kokultivierungsexperimenten..	81
Abbildung 3.16: Beteiligung von <i>Tfs4</i> am Export von Plasmid-DNA.....	82
Abbildung 3.17: Untersuchung der Beteiligung von <i>Tfs4</i> am Transfer von chromosomaler DNA.....	83
Abbildung 3.18: Quantifizierung der im extrazellulären Milieu vorhandenen DNA.....	84
Abbildung 3.19: Graphische Darstellung der Deletion bzw. Inaktivierung der Funktion der putativen Relaxasen <i>orf4C</i> und <i>orf04</i> in pHel4 und pHel12.....	87
Abbildung 3.20: Übersicht der für die Deletion der chromosomalen Relaxasen eingesetzten Oligonukleotide in ihrem genetischen Kontext.....	88
Abbildung 3.21: Rolle der Plasmid-kodierten Relaxase für den Transfer von pHel4 und pHel12.....	90
Abbildung 3.22: Beeinflussung des Plasmidtransfers nach Deletion der Plasmid-kodierten Relaxase im Donor bzw. Rezipient.....	91
Abbildung 3.23: Untersuchung der Funktion der chromosomal kodierten Relaxasen beim Plasmidtransfer.....	92
Abbildung 3.24: Untersuchung der Funktion der chromosomal und Plasmid-kodierten Relaxasen für den Plasmidtransfer.....	93
Abbildung 3.25: Deletion von pHel12 in <i>H. pylori</i> P12.....	95
Abbildung 3.26: Rolle des kryptischen Plasmids pHel12 für die Funktionalität des Rezipienten.....	96
Abbildung 3.27: Graphische Darstellung eines Ausschnitts der Shuttle-Vektoren pHel3 und pHel6.....	98
Abbildung 3.28: Beeinflussung des Plasmidtransfers durch die Shuttle-Vektoren pHel3 und pHel6 in <i>H. pylori</i> P12 ΔpHel12-Rezipienten.....	99
Abbildung 3.29: AMPylierung.....	102
Abbildung 3.30: Aminosäuresequenz von Orf4M und HPP12_p11 (Orf12M) aus pHel4 bzw. pHel12.....	102
Abbildung 3.31: Nachweis der Expression von <i>orf4M-EGFP</i>	103
Abbildung 3.32: Transfektion von AGS-Zellen mit pEGFP-N1.....	104
Abbildung 3.33: Abrundung der AGS-Zellen nach Expression von <i>orf4M</i> - und <i>orf12M-EGFP</i>	105
Abbildung 3.34: Auswirkung der Expression von <i>orf4M</i> - und <i>orf12M-EGFP</i> auf AGS-Zellen. .	106
Abbildung 3.35: Anteil toter Zellen in einer AGS-Population nach Transfektion mit pEGFP-N1, pEGFP_ <i>orf4M</i> und pEGFP_ <i>orf12M</i>	107
Abbildung 3.36: Kokultivierung verschiedener <i>H. pylori</i> Stämme mit AGS-Zellen.....	108

Abbildung 4.1: DNA-Transfer-Mechanismen in *H. pylori* 129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	24
Tabelle 2.2: <i>Helicobacter pylori</i> Stämme.	24
Tabelle 2.3: Plasmide und Vektoren.	26
Tabelle 2.4: Oligonukleotide.....	28
Tabelle 2.5: Primäre Antikörper.	32
Tabelle 2.6: Sekundäre Antikörper.....	33
Tabelle 2.7: Nährmedien.	33
Tabelle 2.8: Hemmstoffe und Medienzusätze.....	34
Tabelle 2.9: Bezugsquellen für Enzyme und Proteine.	35
Tabelle 2.10: Molekulargewichtsmarker.....	35
Tabelle 2.11: Kommerziell erwerbbaare Kits.	36
Tabelle 2.12: PCR-Protokoll.....	45
Tabelle 2.13: RAPD-PCR-Protokoll.	46
Tabelle 3.1: Vergleich der ORFs von pHel4 und pHel12 bzgl. ihrer Sequenzidentität und ihrer vermuteten Funktion.....	59
Tabelle 3.2: Übersicht der für die Deletion von <i>Tfs3</i> und <i>Tfs4</i> eingesetzten Oligonukleotide und entsprechenden Plasmide.....	71
Tabelle 3.3: Übersicht der T4SS-Deletionsmutanten.....	75
Tabelle 3.4: Übersicht der für die Deletion der chromosomal kodierten Relaxasen innerhalb <i>Tfs3</i> und <i>Tfs4</i> eingesetzten Oligonukleotide und entsprechenden Plasmide	89
Tabelle 3.5: Übersicht der Relaxase-Deletionsmutanten.....	89
Tabelle 4.1: Übersicht der T4SS von <i>H. pylori</i> und ihre Funktion.	113

1 Einleitung

1.1 Entdeckung und Epidemiologie von *Helicobacter pylori*

Bereits im Jahr 1893 wurden spiral-förmige Mikroorganismen im Magen von Hunden nachgewiesen (Bizzozero, 1893). Georg Ernst Konjetzny beschrieb 1923 erstmals einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Duodenalgeschwüren und Antrumgastritis und dem Grad der mikrobiellen Besiedlung des Magens bei einer bakteriellen Infektion (Konjetzny, 1923). Da aber eine Kultivierung von Mikroorganismen aus dem Magen zu dieser Zeit nicht möglich war, hielt sich weiterhin die Annahme, dass das saure Milieu des Magens steril sei und nicht besiedelt werden kann. Erst im Jahre 1984 wurde *Helicobacter pylori*, damals noch *Campylobacter pyloridis*, als „*unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis*“ beschrieben (Marshall and Warren, 1984). Barry Marshall und Robin Warren gelang es, *H. pylori* aus Magenbiopsien von gastroscopisch untersuchten Patienten zu isolieren und zu kultivieren. Um letzte Kritiker davon zu überzeugen, dass die Infektion mit *H. pylori* und nicht, wie lange Zeit angenommen Stress und eine ungesunde Ernährung die Entstehung einer Gastritis (Magenschleimhautentzündung) und die Bildung von Magengeschwüren hervorruft, unternahm Barry Marshall einen Selbstversuch, indem er eine *H. pylori*-Suspension trank. Kurze Zeit später entwickelte er die ersten akuten Symptome einer Gastritis, die er dann mit Antibiotika heilte. Somit konnte er die Koch'schen Postulate erfüllen (Marshall *et al.*, 1985). Erst im Jahr 1994 wurden diese Erkenntnisse von einem Rat des *National Institute of Health* (NIH) anerkannt. Dies hatte ein grundlegendes Umdenken bei der Diagnose und medizinischen Behandlung von Magenerkrankungen zur Folge. Im selben Jahr stufte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *H. pylori* in die Gruppe I der definierten Kanzerogene ein. Im Jahre 2005 erhielten Barry Marshall und Robin Warren den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für die Entdeckung eines Bakteriums, *H. pylori*, als Ursache für Magengeschwüre, chronische atrophische Gastritis und Magenkarzinom.

H. pylori ist ein gram-negatives, spiralförmiges, polar begeiseltes Bakterium, das der Klasse der ϵ -Proteobakterien angehört. Mit einer Prävalenz von weltweit ca. 50% ist die *H. pylori*-Infektion eine der häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen (Suerbaum and Michetti, 2002). *H. pylori* ist weltweit verbreitet und hat den Menschen schon sehr früh in der Entwicklungsgeschichte kolonisiert und sich mit

diesem von Afrika aus weltweit verbreitet (Covacci *et al.*, 1999; Falush *et al.*, 2003; Suerbaum and Josenhans, 2007; Linz *et al.*, 2007). Epidemiologische Studien zeigen, dass die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion in verschiedenen Ländern und unter verschiedenen Populationsgruppen stark variiert. So sind in den Entwicklungsländern 70-90% der Bevölkerung mit *H. pylori* infiziert, während die Infektionsrate in den Industrieländern bei 20-50% liegt (Dunn *et al.*, 1997). Die Infektion besteht meist von Kindheit an und wird vertikal durch direkten Kontakt innerhalb der Familie weitergegeben (Schwarz *et al.*, 2008), wobei sozioökonomische Bedingungen die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion stark beeinflussen (Malaty and Graham, 1994). Die Übertragung der *H. pylori*-Infektion erfolgt hauptsächlich in der frühen Kindheit von der Mutter auf das Kind (Dunn *et al.*, 1997). Der genaue Übertragungsweg konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass es innerhalb von Familien eine Häufung von *H. pylori*-Infektionen gibt, weist auf eine oral-orale oder oral-fäkale Übertragung hin (Drumm, 1990; Elitsur *et al.*, 1999). In den Entwicklungsländern könnte außerdem eine Übertragung durch unbehandeltes Wasser eine Rolle spielen (Goodman *et al.*, 1996). Eine häufig unterschätzte Infektionsgefahr stellte lange Zeit die iatrogene Übertragung durch kontaminierte Endoskope dar (Katoh *et al.*, 1993). Diese kann jedoch bei Einhaltung der entsprechenden Hygienemaßnahmen weitgehend ausgeschlossen werden (Ribeiro *et al.*, 2004). Durch allgemein verbesserte Hygienebedingungen und kleinere Familien kann in den Industrieländern seit Mitte des 19. Jahrhunderts ein deutlicher Rückgang der Infektionen mit *H. pylori* verzeichnet werden (Rupnow *et al.*, 2000; Rehnberg-Laiho *et al.*, 2001; Perez-Perez *et al.*, 2002).

1.2 Pathogenese *H. pylori* assoziierter Erkrankungen

Die Magenschleimhaut ist durch vielfältige Mechanismen gegen das Eindringen von Bakterien geschützt. *H. pylori* ist aufgrund der Kombination aus verschiedenen Virulenzfaktoren und seiner genetischen Variabilität an das saure Milieu des Magenlumens angepasst, kann in die hochviskose Magenmukosa eindringen, sich an die Epithelzellen anhaften und hat eine Strategie entwickelt, sehr lange in seinem Wirt zu persistieren. Die Infektion besteht ohne entsprechende Behandlung gewöhnlich Jahrzehnte oder sogar lebenslang (Parsonnet, 1998). *H. pylori* besiedelt die Antrum- und Corpus-Region des Magens und ruft verschiedene Krankheiten hervor (Abbildung 1.1).

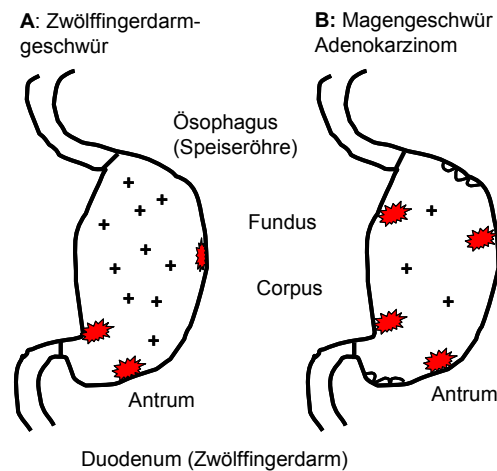


Abbildung 1.1: Pathologie von *H. pylori*-induzierten Erkrankungen.

A: Zwölffingerdarmgeschwüre gehen mit einer starken Entzündung des Antrums (rote Sterne) und einer starken Säuresekretion (+) einher.

B: Atropische Gastritis, Magengeschwüre und Adenokarzinome korrelieren mit einer starken Entzündung (rote Sterne) des Corpus, einer geringen Säuresekretion (+) und multifokaler Atrophie (Geweberückgang; wellenförmige Linien) (nach Dorer *et al.* 2009).

Die Infektion der Magenschleimhaut mit *H. pylori* führt zu einer chronischen Persistenz des Erregers und der Ausprägung einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut (Gastritis), die in 90% der Fälle ohne Symptome verläuft. Nur 15 bis 20% der infizierten Personen entwickeln aufgrund dieser chronischen Entzündung Folgeerkrankungen wie chronische atrophische Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, Magenkarzinome oder ein „*mucosa associated lymphoid tissue*“ (MALT)-Lymphom (Atherton, 2006). Etwa 72-98% der Patienten mit MALT-Lymphom sind mit *H. pylori* infiziert (Parsonnet *et al.* 1994; Wotherspoon, 1998). Zwölffingerdarmgeschwüre sind die Folge einer im Antrum lokalisierten Gastritis, welche durch erhöhte Säureproduktion und eine leichte Entzündung des Corpus charakterisiert ist (Abbildung 1.1 A). Magengeschwüre oder -krebs entstehen aufgrund einer starken Entzündung des Corpus und sind mit multifokaler Atrophie (Gewebeschwund) assoziiert (Abbildung 1.1 B). Die Säureproduktion ist hier aufgrund der Zerstörung der Säure-produzierenden Parietalzellen gering (Rubin, 1997; Amieva and El-Omar, 2008). Der Übergang einer chronischen, *H. pylori*-induzierten Entzündung zu schwereren Krankheitsbildern wie Gastritis oder gar Krebs zeigt sich dabei erst nach Jahrzehnten. Schätzungen gehen davon aus, dass *H. pylori* für 5,5% aller menschlichen Krebsfälle verantwortlich ist. Die Infektion mit *H. pylori* ist der stärkste

bekannte Risikofaktor für die Entstehung von Adenokarzinomen, der zweithäufigsten Krebsart weltweit. Etwa 700000 Menschen erliegen dieser Krankheit jährlich (Correa, 1996; Peek, Jr. and Blaser, 2002). Bei der Entstehung von *H. pylori*-induzierten Adenokarzinomen spielen Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*, sowie genetische Faktoren des Wirtes eine Rolle. Zu Beginn einer Infektion mit *H. pylori* kommt es zu einer oberflächlichen, chronischen Entzündung. Dabei sind die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) mit dem translozierten Effektorprotein CagA (*cytotoxin-associated gene A*), das vakuolisierende Zytotoxin VacA (*vacuolating cytotoxin A*), sowie das Adhäsin BabA (*blood group antigen-binding adhesin*) signifikant mit der Ausbildung einer atrophischen Gastritis verknüpft (Boren *et al.*, 1993; Covacci *et al.*, 1993; Atherton *et al.*, 1995). *H. pylori* induziert die Ausschüttung des Zytokins IL-1 β und löst die proinflammatorische Immunantwort aus (Basso *et al.*, 1996). Gleichzeitig wird die Produktion von Magensäure inhibiert (El-Omar *et al.*, 2000). Genetische Determinanten des Wirtes, welche für die Entstehung und das Fortschreiten der Krankheit von Bedeutung sind, sind z.B. Polymorphismen des Interleukin-Genclusters, die eine übermäßige Produktion des Zytokins IL-1 β fördern. Dadurch ist die Entzündungsreaktion stärker und die Wahrscheinlichkeit einer atrophischen Gastritis und *H. pylori*-assoziiertem Magenkrebs erhöht (El-Omar *et al.*, 2000).

Eine Infektion mit *H. pylori* kann jedoch auch von Vorteil sein. Kürzlich wurde gezeigt, dass ein inverser Zusammenhang zwischen Speiseröhrenkrebs, Reflux-Ösophagitis (*gastroesophageal reflux disease*, GERD), Barrett-Ösophagus und der Infektion mit *H. pylori* besteht (Atherton, 2006; Anderson *et al.*, 2008).

H. pylori kann aufgrund der langen Co-Evolution mit dem Menschen und der Tatsache, dass eine Infektion nicht immer nur von Nachteil ist, nicht nur als Pathogen sondern auch als Kommensale betrachtet werden (Dorer *et al.*, 2009).

1.3 Virulenzfaktoren von *H. pylori*

H. pylori hat verschiedene Strategien entwickelt, um sich optimal an die unwirtlichen Bedingungen seiner ökologischen Nische, dem menschlichen Magen, anzupassen. Verschiedene Virulenzfaktoren ermöglichen es *H. pylori*, sowohl dem niedrigen pH-Wert, der Instabilität der Mukusschicht und der Nährstoffknappheit zu trotzen als auch dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen.

Eine der ersten Hürden, die *H. pylori* meistern muss, um erfolgreich im Magen zu kolonisieren ist der vorherrschende saure pH-Wert, welcher durchschnittlich bei 1,4 liegt (Teyssen *et al.*, 1995). Der wichtigste, für die Säure-Resistenz von *H. pylori* verantwortliche Faktor ist die Produktion des zytosolischen Enzyms Urease (Stingl and De Reuse, 2005). Dieses stellt einen essentiellen Kolonisierungsfaktor dar (Eaton *et al.*, 1991). Es handelt sich um ein Heterooligomer, welches aus den Untereinheiten UreA und UreB, sowie aus akzessorischen Proteinen, die für die Aufnahme und den Einbau des Kofaktors Ni^{2+} in das aktive Zentrum des Apo-Enzyms benötigt werden, besteht (Labigne *et al.*, 1991; Ha *et al.*, 2001). Die Aufnahme von Harnstoff wird durch das Membranprotein UreI, das einen pH-Wert regulierten Harnstoffkanal bildet, gesteuert (Weeks *et al.*, 2000). Bei einem pH-Wert $< 6,5$ ist der Kanal offen, so dass Harnstoff aufgenommen und umgesetzt werden kann. Bei neutralem pH-Wert ist der Kanal geschlossen, wodurch kein Harnstoff mehr aufgenommen und eine Alkalisierung des Zytosols vermieden wird. Anschließend wird der Harnstoff durch die Urease in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid gespalten. Durch die Protonierung von Ammoniak wird die unmittelbare Umgebung und das Periplasma von *H. pylori* gepuffert (Marshall *et al.*, 1990). Aufgrund der Zytotoxizität von Ammonium wird eine Beteiligung der Urease bei der Generierung von Zellschäden diskutiert (Sommi *et al.*, 1996).

Jedoch ist die Aktivität der Urease nicht ausreichend, um eine permanente Besiedlung des Magenumens zu ermöglichen, da *H. pylori* nur für kurze Zeit niedrige pH-Werte ($\text{pH} < 4$) tolerieren kann (Sachs *et al.*, 2003). *H. pylori* verliert hier seine Motilität schon nach kurzer Zeit (Schreiber *et al.*, 2005). Für eine erfolgreiche Kolonisierung ist daher eine schnelle Orientierung und Bewegung in Richtung Bicarbonat-gepufferter, viskoser Magenmukosa erforderlich. Die Beweglichkeit von *H. pylori* wird durch dessen helikale Morphologie sowie durch die polar lokalisierten 5 bis 6 Flagellen, welche aus den Flagellinen FlaA und FlaB zusammengesetzt sind, vermittelt (Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993). Die Flagellen sind von einer Membran-artigen, das Lipoprotein HpaA enthaltenden Hülle umgeben, deren Funktion möglicherweise den Schutz vor der Depolymerisierung durch Säuren und Proteasen darstellt (Geis *et al.*, 1993). Die Orientierung in der Magenmukosa wird durch chemotaktisches Verhalten ermöglicht, wobei der pH-Gradient das wichtigste chemotaktische Signal darstellt (Schreiber *et al.*, 2004). Im Tiermodell konnte gezeigt

werden, dass nicht-motile *H. pylori*-Mutanten nicht kolonisieren können (Eaton *et al.*, 1992).

Obwohl *H. pylori* größtenteils die Magenmukosa kolonisiert (Schreiber *et al.*, 2004), ist auch die Bindung von *H. pylori* an Epithelzellen, sowie die Besiedlung tiefer liegender Gewebe und eine intrazelluläre Lokalisation zu beobachten (Necchi *et al.*, 2007; Dubois and Boren, 2007). Die Adhäsion verhindert einen Abtransport von *H. pylori* durch Peristaltik und Mukus-Erneuerung und ist eine Voraussetzung zur Translokation verschiedener Pathogenitätsfaktoren. Auch für die Gewinnung essentieller Membranbestandteile, wie z.B. Cholesterol spielt die Adhäsion eine zentrale Rolle (Wunder *et al.*, 2006). Die Adhäsion an Epithelzellen wird über verschiedene Proteine der äußeren Membran (*outer membrane proteins*, OMP) der Hop-Familie (*Helicobacter outer membrane proteins*), wie BabA, SabA oder AlpA und AlpB, vermittelt (Yamaoka und Alm, 2008). Die Adhäsine BabA (*blood group antigen-binding adhesin*) und SabA (*sialic acid binding adhesin A*) binden an Blutgruppen-Antigene, so genannte Lewis-Antigene, auf der Oberfläche von Magenepithelzellen. BabA erkennt fukosylierte Lewis^b-Antigene von Epithelzellen und stellt das dominierende Adhäsine von *H. pylori* dar (Boren *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998; Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). SabA bindet an sialylierte Strukturen auf der Zelloberfläche, wie z.B. an die sialylierten Blutgruppenantigene Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a, welche verstärkt im entzündeten Gewebe vorkommen (Mahdavi *et al.*, 2002). Weitere beschriebene Adhäsine von *H. pylori* sind die Proteine AlpA und AlpB (*adherence associated lipoproteins A* und *B*), die ebenso Adhäsion an Magenepithelzellen vermitteln. Der eukaryotische Rezeptor von AlpA und AlpB ist noch nicht bekannt (Odenbreit *et al.*, 1999).

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *H. pylori* ist das Zytotoxin CagA (*cytotoxin-associated gene A*). Dieses wird durch das Cag-Typ-IV-Sekretionssystem, welches in der 37 kb großen *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) kodiert ist, in eukaryotische Zellen transloziert (Censini *et al.*, 1996; Odenbreit *et al.*, 2000; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2001). Der C-terminale Bereich von CagA (130-170 kDa) zeichnet sich durch verschiedene Sequenzmotive (A-D) aus, die durch die konservierten Aminosäuren EPIYA charakterisiert sind (Higashi *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2006). Die Interaktion des Cag-T4SSs von *H. pylori* mit der eukaryotischen Zelle erfolgt über den Rezeptor β 1-Integrin (Jimenez-Soto *et al.*, 2009). Nach der Translokation lagert sich

CagA an der Zytoplasmamembran an und wird an einem konservierten Tyrosin-Rest innerhalb des EPIYA-Motivs durch eine Src-Kinase phosphoryliert (Odenbreit *et al.*, 2000;Asahi *et al.*, 2000;Higashi *et al.*, 2002;Tsutsumi *et al.*, 2003). Die Translokation von CagA führt zu morphologischen Veränderungen und Umlagerungen des Aktinzytoskeletts der eukaryotischen Zelle und zur Ausbildung des sogenannten „*hummingbird*“-Phänotyps (Segal *et al.*, 1999). Zudem wird die Integrität der Zellen durch ein Öffnen der „*tight junctions*“ beeinträchtigt. Dadurch wird die Barrierefunktion des Magenepithels gestört und es kann zum Verlust der apikal-basolateralen Zellpolarität kommen (Saadat *et al.*, 2007). Neben CagA werden auch Peptidoglykan-Fragmente T4SS-abhängig in die eukaryotische Zelle transloziert, wodurch der intrazelluläre Rezeptor Nod1 aktiviert und die Produktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B gesteigert wird (Viala *et al.*, 2004). Die Aktivierung von NF- κ B bedingt eine vermehrte Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8, was zur massiven Infiltration von polymorphonukleären Zellen (PMN) im Zuge der Infektion beiträgt (Sharma *et al.*, 1995;Segal *et al.*, 1997;Fischer *et al.*, 2001).

Das vakuolisierende Zytotoxin VacA (*vacuolating cytotoxin A*) wurde nach Beobachtung von Zellen, die in Folge des Kontakts mit *H. pylori* saure zytoplasmatische Vakuolen bildeten, entdeckt (Cover and Blaser, 1992). VacA wird zunächst als etwa 140 kDa großes Vorläuferprotein produziert, welches über einen Sec-abhängigen Transportweg über die innere Membran transportiert und anschließend mit der C-terminalen Autotransporter-Domäne über die äußere Membran sekretiert wird (Typ-V-Sekretionsmechanismus). Die Reifung des Toxins erfolgt durch Abspaltung der Autotransporterdomäne, wobei das 88 kDa große Toxin in den Kulturüberstand abgegeben wird oder mit der bakteriellen Oberfläche assoziiert bleibt (Cover *et al.*, 1994;Schmitt and Haas, 1994;Nguyen *et al.*, 2001). Charakteristisch für VacA ist die Oligomerisierung zu hexameren Ringen, wobei jeweils zwei Ringe hochmolekulare dodekamere Komplexe mit einer blumenförmigen Struktur bilden (Lupetti *et al.*, 1996). Für die Aktivierung des Toxins VacA ist eine Disassemblierung der oligomeren Struktur im sauren (< pH 4) oder alkalischen (> pH 9) pH-Wert erforderlich (Cover *et al.*, 1997;Molinari *et al.*, 1998). Sekretiertes VacA kann in einen N-terminalen (p33) und C-terminalen (p55) Bereich prozessiert werden (Telford *et al.*, 1994;Burrioni *et al.*, 1998). Das p33-Fragment enthält einen hydrophoben Bereich, welcher mit der Kanalbildung und der Bildung der Vakuolen in Zusammenhang gebracht wird (Vinion-

Dubiel *et al.*, 1999). Das p55-Fragment spielt bei der Oligomerisierung und bei der Bindung an die Zielzelle eine wichtige Rolle (Pagliaccia *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu AB-Toxinen sind die Domänen p33 und p55 nicht unabhängig voneinander. Das in allen *H. pylori*-Stämmen vorkommende Gen *vacA* liegt in unterschiedlichen Sequenzvariationen vor. So können im Bereich der N-terminalen Signalsequenz die Allele s1 und s2, in der Mittelregion von p55 die Allele m1 und m2 und in der Zwischenregion die Allele i1 und i2 voneinander unterschieden werden (Atherton *et al.*, 1995; Rhead *et al.*, 2007). Hierbei sind die Allele s1 und i1 mit der Entwicklung von Geschwüren assoziiert (Basso *et al.*, 2008). *H. pylori*-Stämme werden als Typ 1-(s1/m1-VacA) und Typ 2-Stämme (s1/m2-VacA) eingeteilt. Typ 1-Stämme weisen im Gegensatz zu Typ 2-Stämmen ein deutlich höheres Risiko für die Ausbildung von Magengeschwüren und Adenokarzinomen auf. Außerdem besitzen sie im Gegensatz zu Typ 2-Stämmen zusätzlich die *cag*-PAI mit CagA als Effektorprotein. VacA bindet über Glykosphingolipide an die Zellmembran (Roche *et al.*, 2007). Als Rezeptor dienen die Tyrosinphosphatasen RPTP α und RPTP β auf Epithelzellen (Yahiro *et al.*, 1999; Yahiro *et al.*, 2003) und die β 2-Intergrin-Untereinheit CD18 auf T-Lymphozyten (Sewald *et al.*, 2008). VacA ist ein multifunktionelles Toxin (Cover and Blanke, 2005). Es beeinträchtigt den Vesikeltransport im endosomalen System (Satin *et al.*, 1997), führt zur Inhibition der Proliferation von Epithelzellen (Ricci *et al.*, 1996) und induziert Apoptose (Kuck *et al.*, 2001; Cover *et al.*, 2003). Die immunsupprimierende Wirkung von VacA äußert sich unter anderem durch die Inhibition der Prozessierung und Präsentation von Antigenen (Molinari *et al.*, 1998) und der Reifung von *H. pylori*-enthaltenden Phagosomen in Makrophagen (Zheng and Jones, 2003). Dies führt zur Bildung von Megasomen und verhindert ein effektives Abtöten der Bakterien (Allen *et al.*, 2000). Außerdem inhibiert VacA das Wachstum von T-Zellen und deren Aktivierung durch Hemmung der IL-2-Expression (Gebert *et al.*, 2003; Boncristiano *et al.*, 2003; Sundrud *et al.*, 2004).

1.4 Genetische Variabilität von *H. pylori*

In verschiedenen Studien wurde mit Hilfe von RAPD-PCR (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), MLST (*multilocus sequence typing*) und PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) die enorme genetische Variabilität von *H. pylori* gezeigt (Akopyanz *et al.*, 1992a; Go *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996; Achtman *et al.*, 1999).

So konnten z.B. mit nur einem RAPD-Oligonukleotid 64 Stämme unterschieden werden (Akopyanz *et al.*, 1992b). *H. pylori* gehört zu den Bakterienspezies mit der größten genetischen Variabilität (Suerbaum *et al.*, 2007). Diese wird durch erhöhte Mutationsraten und eine hohe Rekombinationsfrequenz erreicht (Suerbaum *et al.*, 1998; Falush *et al.*, 2001). *H. pylori* hat eine mit den *E. coli* Mutator-Stämmen vergleichbare Mutationsrate von 10^{-5} bis 10^{-7} (Horst *et al.*, 1999; Bjorkholm *et al.*, 2001). Dabei finden intragenomische Veränderungen durch z.B. Punktmutationen, Rekombination, „*slipped strand mispairing*“ und intergenomische Rekombination nach der Aufnahme von genetischem Material durch z.B. Transformation und Konjugation statt (Abbildung 1.2) (Suerbaum *et al.*, 1998; Dorer *et al.*, 2009).

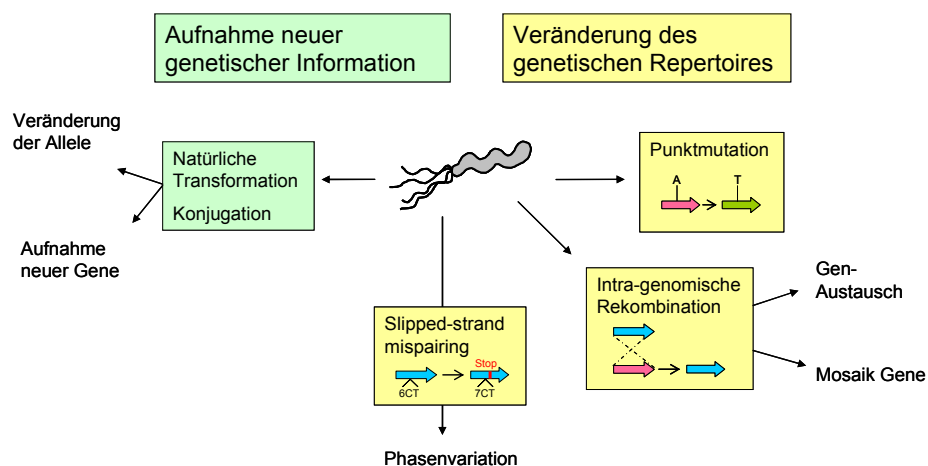


Abbildung 1.2: Mechanismen zur Generierung genetischer Variabilität in *H. pylori*.

Genetische Variabilität kann auf intra (gelb)- oder intergenomischer (grün) Ebene erzeugt werden. So führt die Aufnahme neuer genetischer Information durch Transformation und Konjugation und die anschließende Rekombination oder Replikation von Plasmiden zur Erweiterung des genetischen Repertoires. Auf intragenomischer Basis führen Mutationen, z.B. Punktmutationen, intragenomische Rekombination, sowie die Phasenvariation durch „*slipped-strand mispairing*“ zur Erzeugung der genetischen Plastizität von *H. pylori*.

Es konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* in der Lage ist, innerhalb von etwa 40 Jahren die Hälfte seines Genoms mit Genomabschnitten anderer *H. pylori*-Stämme auszutauschen. Die Plastizität des Genoms erlaubt *H. pylori* eine enorme genetische Adaptationsfähigkeit (Falush *et al.*, 2001). Als chronisch, im Magen des Wirts persistierender Organismus hat *H. pylori* Mechanismen zur Anpassung und Diversifikation an ein sich ständig änderndes Habitat mit verschiedenen Mikronischen entwickelt. Dabei wird das Gleichgewicht zwischen Wirt und Pathogen unter anderem durch Mikroevolution, also durch genetische Variation einer Spezies innerhalb sehr

kurzer Zeitspannen, aufrechterhalten (Lee and Josenhans, 2005). Die Gene im *Helicobacter*-Chromosom können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Der Gruppe der variablen Gene, welche für die Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen eine wichtige Rolle spielen, stehen sogenannte Kerngene (*core genes*) gegenüber, welche in allen Stämmen vorkommen und z.B. bei der Infektion oder Kolonisierung des Wirts von Bedeutung sind (Dorer *et al.*, 2009).

1.4.1 Intergenomische Variabilität

Ein wichtiger Faktor, der zur intergenomischen Variabilität beiträgt ist die natürliche Kompetenz von *H. pylori* (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990). *H. pylori* ist in der Lage mit Hilfe des ComB-T4SS DNA aus dem umgebenden Milieu durch natürliche Transformation aufzunehmen (siehe 1.5.1) (Hofreuter *et al.*, 1998; Hofreuter *et al.*, 2001). Hierbei sind, anders als bei *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und *H. influenzae* keine DNA-Aufnahme-Sequenzen, die die Erkennung von verwandter DNA ermöglichen, involviert (Saunders *et al.*, 1999). Neben der Aufnahme von DNA durch Transformation wird auch ein konjugativer DNA-Transfer-Mechanismus diskutiert (Kuipers *et al.*, 1998). Hierbei spielen wahrscheinlich die in verschiedenen Stämmen anwesenden kryptischen Plasmide eine Rolle, deren Sequenz die Ansammlung und den Austausch von Genen zwischen verschiedenen Plasmiden und dem Chromosom vermuten lässt (siehe 1.7) (Hofreuter and Haas, 2002; Hofler *et al.*, 2004). Die Aufnahme und Integration von DNA-Fragmenten durch natürliche Kompetenz und homologe Rekombination ist ein wichtiger Bestandteil des horizontalen Gentransfers zwischen nicht-verwandten Stämmen, die den gleichen Wirt besiedeln (Kersulyte *et al.*, 1999). Dieser Vorgang trägt zur Bildung einer panmiktischen Population bei (Suerbaum *et al.*, 1998).

1.4.2 Intragenomische Variabilität

1.4.2.1 Repetitive Sequenzen

Eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression spielen hypermutable, aus einem, zwei oder vielen Nukleotiden bestehende Sequenzwiederholungen (*repeat sequences*). Wenn die Sequenzwiederholungen innerhalb der

kodierenden Region eines Gens lokalisiert sind, können Gene an- und ausgeschaltet werden (*all-or-nothing* Prinzip). Außerdem kann durch das Vorhandensein von Sequenzwiederholungen die Promotoraktivität beeinflusst und somit die Genexpression reguliert werden. Dieser Mechanismus der Phasenvariation wird als „*slipped-strand mispairing*“ (SSM) bezeichnet (Saunders *et al.*, 1998; Salaun *et al.*, 2004). Dabei kommt es zur Insertion oder Deletion von Nukleotiden gewöhnlich am 5`-Ende von repetitiven DNA-Abschnitten, wodurch der Leserahmen verändert wird (Aras *et al.*, 2003; Salaun *et al.*, 2004). Die variable Produktion der Proteine in der äußeren Membran (OMPs; *outer membran proteins*) wird z.B. über diesen Mechanismus der Phasenvariation reguliert (Tomb *et al.*, 1997).

1.4.2.2 DNA-Reparatur-Systeme in *H. pylori*

Ein weiterer Faktor, der zur genetischen Diversität und Mikroevolution von *H. pylori* beiträgt sind fehlende, oder nur teilweise funktionelle DNA-Reparatur-systeme (Tomb *et al.*, 1997; Alm and Trust, 1999; Wang *et al.*, 1999).

So führt die Abwesenheit von Komponenten des Fehlpaarungs-Reparatur-Systems (*mismatch repair*, MMR), MutS1, MutH und MutL, welche die Reparatur von fehlgepaarter DNA veranlasst und die nicht-homologe Rekombination verhindert, zu einer hohen Mutations- und Rekombinationsfrequenz (Schofield and Hsieh, 2003). In einer Studie wurde gezeigt, dass 72% der mikrobiellen Population des Magens durch *H. pylori* verkörpert werden (Bik *et al.*, 2006). Ein funktionelles MMR-System würde die Rekombination der ohnehin eingeschränkt verfügbaren Stamm-/Spezies-fremden DNA, sowie Mutation und Phasenvariation verhindern.

Das Vorhandensein eines Basen-Exzisions-Reparatur-Systems (BER-System) ist vor allem für Mikroorganismen von großer Bedeutung, welchen das MMR-System fehlt. Im Genom von *H. pylori* sind zu den Glykosylasen MutY, MutM und Ung, sowie zu den Endonukleasen Xth und Nfo homologe Proteine kodiert (Huang *et al.*, 2006). Diese bewerkstelligen die Entfernung von einzelnen, mutierten DNA-Basen, wie z.B. des durch oxidativen Stress entstandenen 3-Oxoguanin, dessen Manifestation im Genom zur Etablierung einer Punktmutation führen würde. Da das BER-System für die Erkennung und Reparatur von Punktmutationen zuständig ist, hat es eine sehr wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. Es wurde gezeigt, dass die Phasenvariation von *mutY* zur spontanen Inaktivierung des Proteins MutY führen kann

und die Ausbildung von Mutator-Stämmen zur Folge hat. Dadurch wird eine schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingungen ermöglicht (Huang *et al.*, 2006).

Ebenso besitzt *H. pylori* alle Komponenten des Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System (NER- System) (Kang and Blaser, 2006). Dabei handelt es sich um die, den Nuklease-Komplex bildenden Proteine UvrA, UvrB und UvrC und die Helikase UvrD. Die Komponenten des NER-Systems erkennen und reparieren Schäden, die aufgrund der Exposition gegenüber UV-Licht oder alkylierenden Substanzen entstanden sind. (Grossman and Yeung, 1990; Abril *et al.*, 1992). Das genotoxische Milieu des Magens, welches sich durch einen niedrigen pH-Wert und die Anwesenheit von DNA-schädigenden Agenzien, wie reaktiven Sauerstoff- (*reactive oxygen species*, ROS), reaktiven Stickstoffverbindungen (*reactive nitrogen species*; RNS) und potenziell schädlichen Stoffwechselprodukten anderer *H. pylori*-Stämme und kokolonisierender Mikroorganismen auszeichnet, erfordert die Funktionalität des NER-Systems

Lange Zeit wurde angenommen, dass *H. pylori* kein funktionelles Rekombinations-Reparatur-System, bestehend aus den Proteinen RecB, C und D besitzt. Die Hauptaufgabe dieses Systems ist es, Doppelstrangbrüche zu reparieren und die durch Toxine, Proteinkomplexe oder ausgebildete DNA-Sekundärstrukturen blockierte Replikationsgabel wieder für die DNA-Polymerase zugänglich zu machen (McGlynn and Lloyd, 2002). Das RecBCD Trimer ist eine ATP-abhängige Exonuklease und Helikase. Ein funktionelles Analog dieses Trimers wurde erstmals in *B. subtilis* identifiziert. Dabei handelt es sich um das Dimer AddAB. Sowohl RecBCD, als auch AddAB binden an dsDNA und führen zur Entspiralisierung und zum Abbau beider DNA-Stränge (Kooistra *et al.*, 1988; Chedin and Kowalczykowski, 2002). Der Bildung eines Einzelstrangs folgen die Beladung mit dem Protein RecA, das Suchen nach homologen Regionen und der Strangaustausch. In mehreren Studien wurde die Anwesenheit und Funktionalität der AddAB Homologen für die homologe Rekombination in *H. pylori* gezeigt (Amundsen *et al.*, 2008; Marsin *et al.*, 2008; Wang and Maier, 2009; Marsin *et al.*, 2010). Sowohl AddAB, als auch RecA sind für die erfolgreiche Kolonisierung des Magen erforderlich (Amundsen *et al.*, 2009). Abbildung 1.3 zeigt eine Zusammenfassung der Aktivität der DNA-Reparatur-Systeme in *H. pylori* und deren Beeinflussung der genetischen Variabilität.

Zudem konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* auf DNA-Schäden mit der Aktivierung der Transkription und Translation von Genen, welche für die natürliche

Kompetenz eine Rolle spielen, reagiert und somit die Transformationsfrequenz erhöht wird. Des Weiteren wird die Transkription eines Lysozym-ähnlichen Proteins aktiviert, wodurch DNA durch Lyse freigesetzt und zur natürlichen Transformation zur Verfügung steht. Somit reagiert *H. pylori* auf Schäden der DNA mit einer Aktivierung der DNA-Aufnahme durch natürliche Transformation (Dorer *et al.*, 2010).

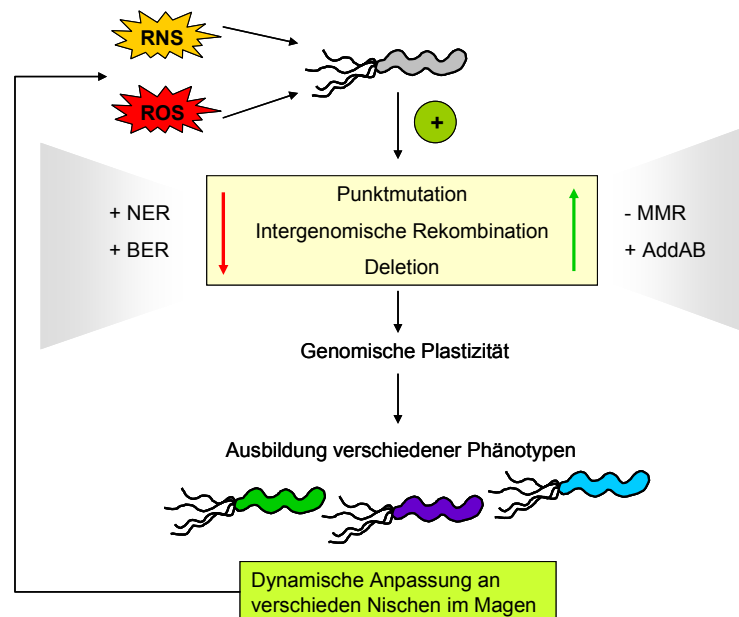


Abbildung 1.3: Beeinflussung der genetischen Variabilität auf DNA-Reparatur-Ebene.

H. pylori ist im genotoxischen Milieu des Magens u.a. RNS (*reactive nitrogen species*; orangefarbener Stern) und ROS (*reactive oxygen species*; roter Stern) ausgesetzt. Die An- (+: NER, BER, AddAB) bzw. Abwesenheit (-: MMR) bestimmter DNA-Reparatursysteme, die das Auftreten von Punktmutationen, intergenomischer Rekombination und Deletionen regulieren (roter und grüner Pfeil), tragen zur Ausbildung verschiedener Phänotypen (●, ●, ●) und zur dynamischen Anpassung an verschiedene Nischen im Magen bei (NER: Nukleotid-Exzisions-Reparatur; BER: Basen-Exzisions-Reparatur; MMR: *mismatch repair*). Weitere Erläuterungen siehe Text.

1.4.3 Genetische Plastizität vs. genomische Integrität

Obwohl *H. pylori* dominierender Bestandteil des mikrobiellen Ökosystems Magen ist, ist die Anwesenheit anderer Mikroorganismen und verschiedener *H. pylori*-Stämme von großer Bedeutung. Das zur Verfügung stehende genetische Repertoires ermöglicht die Aneignung neuartiger Eigenschaften (Ghose *et al.*, 2005; Bik *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2008). Gerade für einen auf einen einzigen Wirt beschränkten Pathogen, ist die Anpassung und optimale Nutzung der Ressourcen in seinem

spezifischen Habitat zur Besiedlung einer größeren Vielfalt an zugänglichen Nischen unabdinglich. Jedoch ist die Regulierung und Einschränkung der Mechanismen, die zur Plastizität des Genoms von *H. pylori* beitragen sehr wichtig. Eine große Rolle hierbei spielen Stamm-spezifische Restriktions-Modifikations-Systeme (R-M-Systeme) (Xu *et al.*, 2000; Aras *et al.*, 2001; Takata *et al.*, 2002). R-M-Systeme setzen sich aus einer Restriktionsendonuklease, welche spezifische DNA-Sequenzen erkennt und schneidet und einer Methyltransferase, welche die eigene DNA methyliert und gegen deren Abbau schützt, zusammen. Sie verhindern die willkürliche Aufnahme fremder DNA, wie z.B. Bakteriophagen-DNA und bilden eine Barriere im horizontalen Gentransfer bei der Aufnahme Stamm-fremder DNA (Kong *et al.*, 2000). So hat jeder Stamm seinen eigenen Methylierungs-Code, wodurch die Rekombination mit DNA anderer *Helicobacter*-Stämme, anderer Bakterien aber auch mit eukaryotischer DNA eingeschränkt wird (Humbert and Salama, 2008). R-M-Systeme sind nicht nur in der Lage die genetische Variabilität zu kontrollieren, sondern können auch die Genexpression durch Methylierung von Sequenzen in Promotorregionen beeinflussen (Dorer *et al.*, 2009).

Im Zuge der persistenten Besiedlung von und Anpassung an alle potentiellen Nischen im menschlichen Magen hat *H. pylori* ein nicht lineares System entwickelt, dass neben der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität Plastizität ermöglicht. Die Spannung zwischen Integrität und Diversität erzeugt eine Vielzahl an genetischen Varianten, die in der Lage sind sich optimal an die jeweilige Nische anzupassen.

1.5 Typ-IV-Sekretionssysteme in *H. pylori* P12

Type-IV-Sekretionssysteme (T4SS) sind komplexe, aus vielen Untereinheiten bestehende molekulare Maschinen, die sich von bakteriellen Konjugationsapparaten ableiten (Cascales and Christie, 2003; Lawley *et al.*, 2003). Sie setzen sich aus einem die Zelle umspannenden Translokationskanal, drei zytoplasmatischen ATPasen und einer extrazellulären Pilusstruktur zusammen. Je nach transloziertem Substrat ist eine Einteilung der T4SS in Konjugationssysteme, DNA-Aufnahme/-Sekretionssysteme und Effektor-Translokationssysteme (Injektisomen) möglich. T4SS katalysieren die Translokation von Proteinen, DNA und DNA-Protein-Komplexen in Zielzellen prokaryotischer und eukaryotischer Natur. Die Eigenschaft der T4SS sowohl DNA, als auch Proteine zu translozieren ist beschränkt auf diesen Typ Sekretionssystem. Das

prototypische T4SS ist das VirB/D4-System von *Agrobacterium tumefaciens*, welches das Tumor-induzierende (Ti-) Plasmid in die Pflanzenzelle transferiert (Cascales *et al.*, 2003; Christie *et al.*, 2005). In *H. pylori* konnten insgesamt vier T4SS identifiziert werden. Unter ihnen das ComB- und das Cag-System, deren Funktion bereits beschrieben wurde (Hofreuter *et al.*, 1998; Odenbreit *et al.*, 2000; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2001). Die Sequenzierung des ca. 1,67 Mb großen Genoms des *H. pylori* Typ I-Stamms P12 ermöglichte die Identifizierung von drei Plastizitätsregionen (PZ), wobei PZ1 und PZ3 in einem nicht-funktionellen R-M-System Gen inseriert sind. Die meisten Stamm-spezifischen Gene sind in den genomischen PZ inseriert. Sowohl in PZ1, als auch in PZ3 konnten für T4SS-Komponenten kodierende Gene identifiziert werden (Kersulyte *et al.*, 2003; Kersulyte *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2010). Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht aller in *H. pylori* bekannten T4SS im Vergleich zu den Komponenten des VirB/D4-T4SS von *A. tumefaciens*.

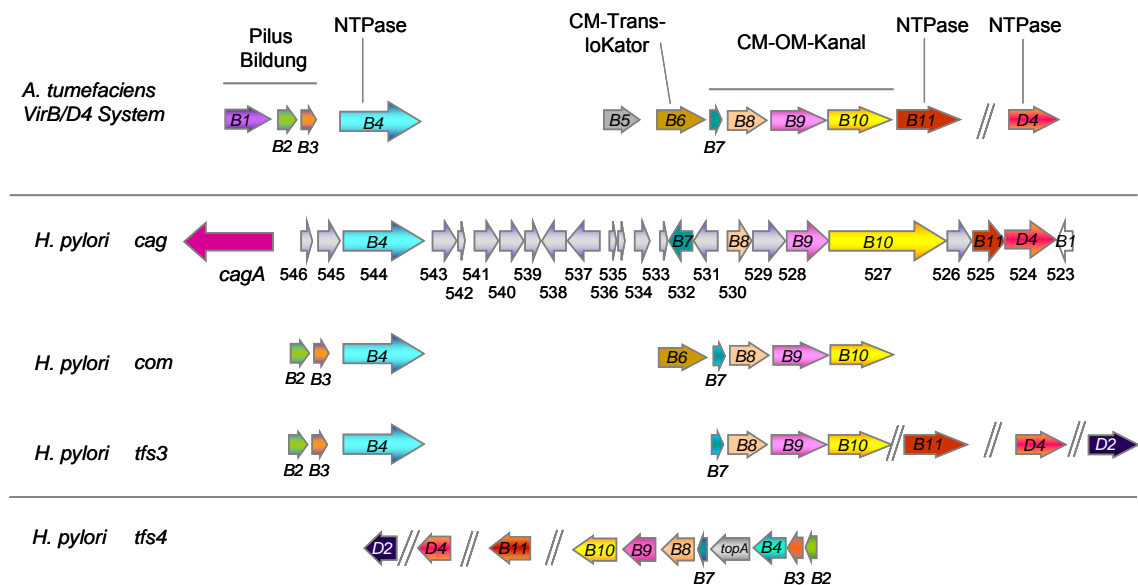


Abbildung 1.4: Übersicht aller in *H. pylori* identifizierten T4SS im Vergleich zum VirB/D4-System von *A. tumefaciens*.

Dargestellt ist die Zusammensetzung des prototypischen T4SS VirB/D4 von *A. tumefaciens* und der in *H. pylori* identifizierten T4SS Cag, Tfs3, Tfs4 und ComB. Die Homologien zwischen den Komponenten sind farblich veranschaulicht und deren Funktion in *A. tumefaciens* ist beschrieben.

1.5.1 Das Typ-IV-Sekretionssystem ComB und die natürliche Kompetenz von *H. pylori*

H. pylori ist natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990). Die Aufnahme von DNA durch natürliche Transformation wird von den meisten Mikroorganismen mit Hilfe von DNA-Aufnahme-Systemen durchgeführt, die Homologien zu Typ-IV-Pili und Typ-II-Sekretionssystemen zeigen (Lorenz and Wackernagel, 1994; Dubnau, 1999; Chen and Dubnau, 2004). Im Gegensatz hierzu nutzt *H. pylori* die Komponenten eines Typ-IV-Sekretionssystems (T4SS), des ComB-Systems, für die Aufnahme von DNA (Hofreuter *et al.*, 1998; Hofreuter *et al.*, 2001). Das ComB-T4SS kommt in allen *H. pylori*-Stämmen vor. Obwohl Homologien zwischen den bereits identifizierten T4SS in *H. pylori* bestehen, scheinen sie unabhängig voneinander zu arbeiten (Israel *et al.*, 2000; Hofreuter *et al.*, 2001). Namensgebend für die Komponenten des ComB-Systems ist das prototypische T4SS von *A. tumefaciens*, das VirB/D4-System. Dieses besteht aus 11 VirB Proteinen (VirB1-11) und dem Kopplungsprotein VirD4 (siehe Abbildung 1.4). Im ComB-System konnten alle Orthologen des VirB-Systems, bis auf die Proteine VirB1, VirB5, VirB11 und VirD4 identifiziert werden. Die für das ComB-System kodierenden Gene sind nicht in einem einzelnen Operon organisiert, sondern auf zwei Loci im Genom verteilt. Einer dieser Loci enthält die Gene *comB2*, *comB3* und *comB4*, während der zweite Locus die Gene *comB6* bis *comB10* enthält. Jede der Komponenten des ComB-Systems, außer ComB7, ist für dessen Funktionalität essentiell (Hofreuter *et al.*, 2001; Karnholz *et al.*, 2006). Kürzlich wurde gezeigt, dass die DNA-Aufnahme durch natürliche Transformation in einem Zwei-Stufen-Mechanismus abläuft (Stingl *et al.*, 2010) (Abbildung 1.5). Das ComB-System transportiert dsDNA mit relativ geringer Spezifität über die äußere Membran in das Periplasma. Hier wird die DNA von dem Membranprotein ComE3, das einen Kanal in der inneren Membran bildet, übernommen und spezifisch als Einzelstrang in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma wird die DNA durch Einzelstrangbindeproteine vor ihrem Abbau geschützt (Stingl *et al.*, 2010).

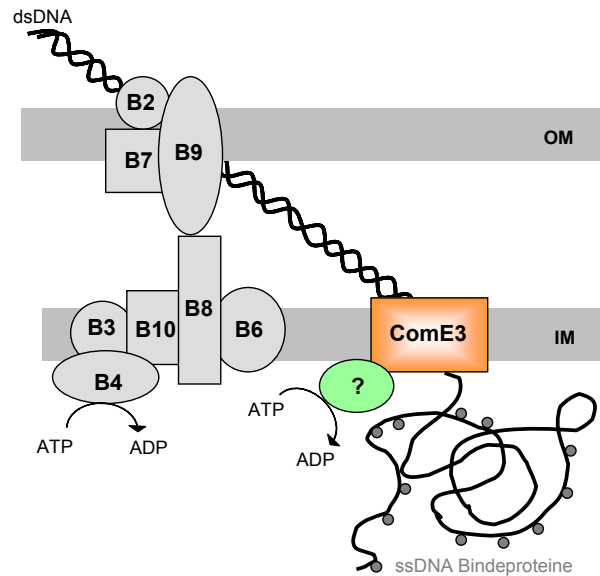


Abbildung 1.5: Modell der DNA-Aufnahme durch das ComB-System und den ComE3-Kanal.

Doppelsträngige DNA wird durch das ComB-T4SS über die äußere Membran (OM) in das Periplasma transportiert und dem ComE3-Kanal zur Verfügung gestellt. Der ComE3-Kanal (■) transportiert einzelsträngige DNA über die innere Membran (IM). Diese wird im Zytoplasma durch Einzelstrangbindeproteine (*ssDNA binding proteins*; ●) vor ihrem Abbau geschützt. Die energetische Versorgung dieses Prozesses ist noch nicht bekannt (nach Stingl *et al.* 2010).

1.5.2 Das Cag-Typ-IV-Sekretionssystem

Das durch die 37 kb große *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) kodierte Cag-T4SS ist für die Translokation des Effektorproteins CagA verantwortlich (Hofreuter *et al.*, 1998; Odenbreit *et al.*, 2000; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2001). Die *cag*-PAI besteht aus 27 Genen, unter ihnen das für das Effektorprotein kodierende Gen *cagA*. Nur fünf Komponenten des Cag-Systems haben signifikante Homologien zu anderen T4SS, darunter CagE (VirB4), CagX (VirB9), CagY (VirB10), Cag α (VirB11) und Cag β (VirD4). Die Funktion der einzelnen Komponenten der *cag*-PAI konnte mittels Transposonmutagenese bestimmt werden. Es ist eine Einteilung in Apparatskomponenten, Translokationsfaktoren, unterstützende Komponenten und Komponenten mit unbekannter Funktion möglich (Fischer *et al.*, 2001).

1.5.3 Das Typ-IV-Sekretionssystem *Tfs3*

Ein weiteres T4SS ist in der Plastizitätsregion 3 (PZ3) von etwa 24% der untersuchten *H. pylori* Stämme inseriert. Es besteht aus 16 Genen, wobei 7 Gene für T4SS-Homologe, darunter VirB4, VirB7-11 und VirD4, kodieren. Es wird

angenommen, dass *Tfs3* über ein Transpositions-ähnliches Ereignis in das Genom integriert wurde und sich zwischen verschiedenen Stämmen verbreitet hat (Kersulyte *et al.*, 2003). Abbildung 1.6 zeigt eine Veranschaulichung des Aufbaus von *Tfs3*. Die am nächsten zum *Tfs3* verwandten Gene sind Homologe des ComB-Systems. Eine Beteiligung von *Tfs3* bei der natürlichen Transformation konnte jedoch ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde eine mögliche Funktion von *Tfs3* bei der konjugativen Übertragung von DNA, bei der Kolonisierung des Mausmodells und bei der Invasion und dem Überleben in Zellen mit Hilfe von Sequenzvergleichen überprüft, konnte aber nicht bestätigt werden. Somit ist die Funktion dieses T4SSs für *H. pylori* noch nicht bekannt (Kersulyte *et al.*, 2003).

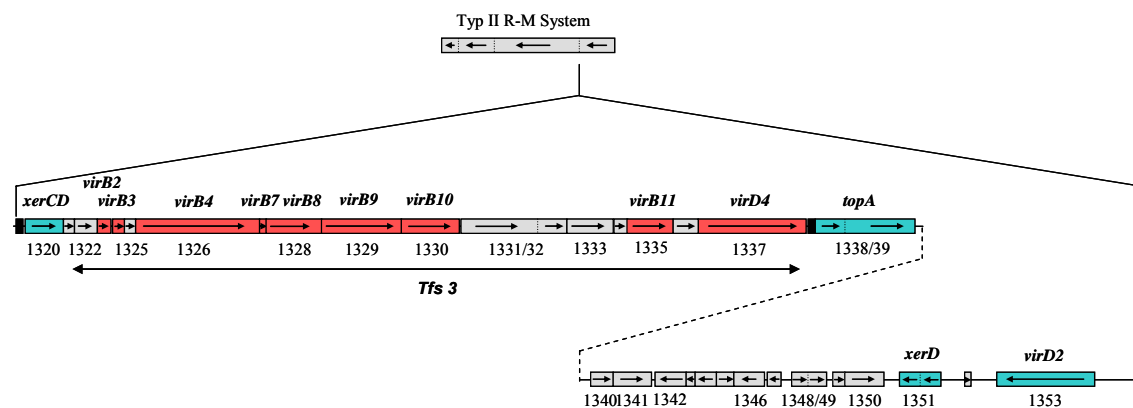


Abbildung 1.6: Das T4SS *Tfs3*.

Tfs3 ist in einem nicht-funktionellen R-M-System-Gen innerhalb der PZ3 inseriert. Komponenten, die Homologien zum VirB/D4-System von *A. tumefaciens* aufweisen sind rot dargestellt. Andere, für die potentielle Funktion von *Tfs3* wichtige Elemente sind in blau dargestellt.

1.5.4 Das Typ-IV-Sekretionssystem *Tfs4*

Kürzlich wurde das in der 40,7 kb großen Plastizitätsregion PZ1 inserierte *Tfs4* erstmals beschrieben (Kersulyte *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2010). Die PZ1 ist ebenso wie die PZ3 in einem nicht-funktionellen, für ein R-M-System kodierendes Gen, inseriert (Abbildung 1.7). In beiden Plastizitätsregionen sind T4SS integriert, deren Gene für Relaxasen, Kopplungsproteine, Topoisomerasen, Helikasen und Tyrosin-Rekombinasen der XerCD-Familie kodieren. Die Komponenten von *Tfs3* sind näher mit dem ComB-System, als mit *Tfs4* verwandt. Southern Blot-Hybridisierungen zeigten, dass etwa 30% aller untersuchten *H. pylori* Stämme *Tfs4* enthalten, wobei nicht in allen

Stämmen alle, für dieses T4SS kodierenden Gene vorhanden sind. Hierbei könnte eine funktionelle Komplementation durch entsprechende Gene eines anderen T4SS stattfinden (Fischer *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die PZ1 in einem XerCD-abhängigen, konjugativen Mechanismus als genomische Insel zwischen Stämmen transferiert wird (Fischer *et al.*, 2010). Die Mobilisierung der Plastizitätsregion bekräftigt die Bedeutung des horizontalen DNA-Transfers zur Generierung und Aufrechterhaltung genomischer Plastizität.

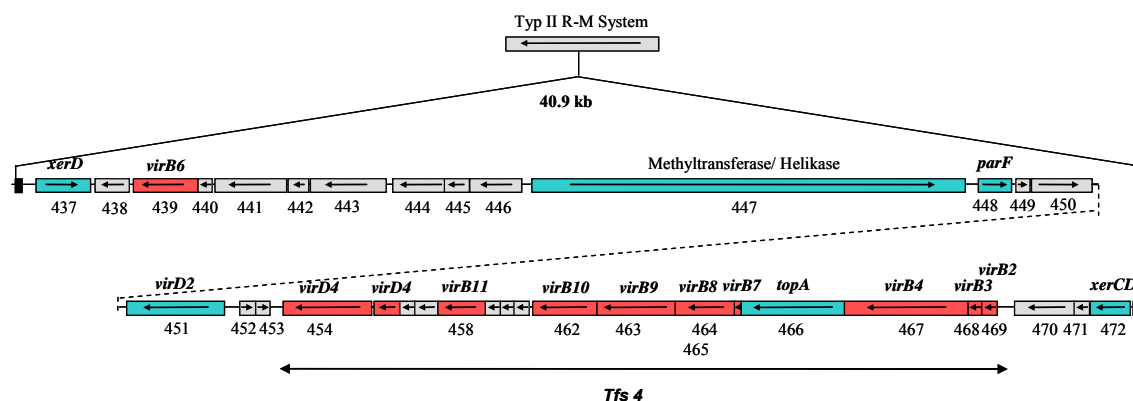


Abbildung 1.7: Das T4SS *Tfs4*.

Tfs4 ist in einem nicht-funktionellen R-M-System-Gen innerhalb der PZ1 inseriert. Komponenten, die Homologien zum VirB/D4-System von *A. tumefaciens* aufweisen sind rot dargestellt. Andere, für die (potentielle) Funktion von *Tfs4* wichtige Elemente sind in blau dargestellt.

1.6 Bakterielle Konjugation

Horizontaler Gentransfer (HGT) ermöglicht Mikroorganismen die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen durch die Aufnahme genetischen Materials und den Erwerb neuer Eigenschaften und ist die treibende Kraft der Evolution (de la Cruz and Davies, 2000; Gogarten and Townsend, 2005; Thomas and Nielsen, 2005). Genetisches Material wird durch Transformation, Transduktion und Konjugation übertragen (Ochman *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Bei der bakteriellen Konjugation wird der Transfer-Strang, ein einzelsträngiges DNA-Molekül plasmidaler oder chromosomaler Natur („*integrated conjugative elements*“; ICE) in einem direkten Zell-Zell-Kontakt erfordernden Prozess von der Donor- in die Rezipientenzelle übertragen (Durrenberger *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2005). Die Donorzelle synthetisiert einen Multiprotein-Komplex (*mpf*; *mating pair formation*), bei *A. tumefaciens* bestehend aus

den Untereinheiten VirB1-B11 und dem Kopplungsprotein VirD4, welcher die beiden Zellen verbindet und den Transfer der DNA bewerkstelligt. Die meisten konjugativen Systeme sind auf Plasmiden kodiert, wobei die Plasmid-kodierte DNA das typische Substrat ist. Nach dem Transfer der DNA und dem Erwerb der genetischen Eigenschaften des Donors, wird die Rezipientenzelle als Transkonjugant bezeichnet.

Das Schlüsselenzym der Konjugation ist die Relaxase. Ihren Namen hat diese Helikase/Endonuklease aufgrund ihrer Fähigkeit überspiralisierte DNA durch Schneiden eines Stranges zu entwinden. Die Relaxase schneidet spezifisch eine Phosphodiesterbindung (Transesterifikation) innerhalb des Transferursprungs *oriT* (*origin of transfer*) und bleibt über eine Phosphotyrosin-Bindung am 5'-Ende der ssDNA kovalent gebunden, während das 3'-Ende der DNA frei ist (Lanka and Wilkins, 1995; Fekete and Frost, 2000; Llosa *et al.*, 2002). Das Entwinden der dsDNA erfolgt in ATP-abhängiger Weise, wobei die Relaxase vom 5'- zum 3'-Ende des verdrängten DNA-Stranges wandert. Der intakte Strang dient in der Donorzelle als Matrize für die Synthese des komplementären Stranges durch die DNA Polymerase III (Kingsman and Willetts, 1978). Die Replikation des Plasmids erfolgt im sogenannten „*rolling circle*“ Mechanismus (Kramer *et al.*, 1997; Furuya and Komano, 2000). Die am 5'-Ende der einzelsträngigen Transfer-DNA gebundene Relaxase bildet mit einigen zusätzlichen Faktoren das Relaxosom (Lanka *et al.*, 1995). Der Kontakt des Relaxosoms mit der Transport-Maschinerie, dem T4SS, wird durch das Typ-IV-Kopplungsprotein (*type IV coupling protein*, T4CP), einem homohexameren NTP-abhängigen integralen Membranprotein, hergestellt (Tato *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass es sich bei dem T4CP um einen molekularen Motor handelt, der die ssDNA während des konjugativen Transfers über die innere Membran pumpt (Gomis-Ruth *et al.*, 2004). Die Translokation der T-DNA wurde in *A. tumefaciens* intensiv untersucht. Der Weg der DNA von der Donor- in die Rezipientenzelle wurde mit Hilfe der **Transfer-DNA-Immunopräzipitation** (TrIP-Assay) beschrieben (Cascales and Christie, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass das Kopplungsprotein VirD4 die T-DNA an die AAA⁺-ATPase VirB11, welche an der Innenseite der zytoplasmatischen Membran lokalisiert ist, übergibt. Von VirB11 wird die T-DNA nacheinander auf die Proteine VirB6, VirB11 und schließlich auf die periplasmatischen bzw. die an der äußeren Membran gebundenen Untereinheiten VirB2 und VirB9 übertragen (Atmakuri *et al.*, 2004). Der Transfer der T-DNA wird zum einen durch die ATPasen VirD4, VirB11 und VirB4,

aber auch mit Hilfe der protonenmotorischen Kraft energetisiert (Palmen *et al.*, 1994). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Relaxase in der Rezipienten-Zelle aktiv ist. Dies unterstützt die Annahme, dass die an der T-DNA gebundene Relaxase den Transfer von der Donor- in die Rezipientenzelle und die Rezirkularisierung des Plasmids im Rezipienten steuert (Howard *et al.*, 1992; Vergunst *et al.*, 2000; Draper *et al.*, 2005).

1.7 Kryptische Plasmide in *H. pylori*

Plasmide können in drei Gruppen eingeteilt werden: Konjugative, mobilisierbare und nicht-mobilisierbare Plasmide (Smillie *et al.*, 2010). Konjugative Plasmide enthalten neben einer *mob* (*mobility*)-Region, die für die Bestandteile des Relaxosoms kodiert, Gene, die für das Kopplungsprotein (T4CP) und das Mpf-System (*mating pair formation*) kodieren. Konjugative Plasmide sind in der Lage ihren Transfer eigenständig zu bewerkstelligen. Im Gegensatz dazu kodieren die mobilisierbaren Plasmide zwar für eine *mob*-Region, jedoch sind Gene für das Mpf-System und das T4CP abwesend. Die kryptischen Plasmide pHel4 aus *H. pylori* P8 und pHel12 aus *H. pylori* P12 gehören der Gruppe der mobilisierbaren Plasmide an (Hofreuter *et al.*, 2002). Etwa 50% aller klinischen *H. pylori* Isolate enthalten kryptische Plasmide unterschiedlicher Größe (Penfold *et al.*, 1988). Die Funktion dieser Plasmide ist bisher jedoch nicht bekannt. Man unterscheidet zwischen minimalen Plasmiden (*minimal plasmids*), die nur für einen Replikationsursprung (*ori*), eine Replikase (*repA* oder *repB*) und für ein Gen mit unbekannter Funktion (ORF2) kodieren und den erweiterten Plasmiden (*extended plasmids*). Diese enthalten neben den für die Replikation notwendigen Genen zusätzliche Gene unbekannter Funktion. Die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 können basierend auf ihrem Replikationsmechanismus, dem konservierten Gen *repA* und den Itron-Strukturen in die Gruppe der Theta-Plasmide eingeteilt werden (De Ungria *et al.*, 1999). Sie sind durch das Vorhandensein einer *mob*-Region, bestehend aus den Genen *orf4C-orf4F* (pHel4) bzw. *orf04-orf07* (pHel12) charakterisiert. Die Gene *orf4C* und *orf04* kodieren für eine putative, zu MobA homologe Relaxase. Nukleotidsequenzanalysen der verschiedenen, auf Plasmiden vorkommenden Relaxasen erlaubten eine Einteilung in verschiedene MOB-Familien: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P und MOB_V (Francia *et al.*, 2004; Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Die *mob*-Region der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 aus *H. pylori* gehört zur MOB_H-

Familie (Francia *et al.*, 2004). Neben der *mob*-Region sind auf den kryptischen Plasmiden pHel4 und pHel12 Gene, die zum Microcin-Gencluster (*mccC7*) von *E. coli* Homologien zeigen, ein mutmaßliches Toxin-Antitoxin-System und Gene unbekannter Funktion kodiert (Gonzalez-Pastor *et al.*, 1994; Hofreuter *et al.*, 2002).

1.8 Ziele dieser Arbeit

Mit einer Prävalenz von weltweit ca. 50% ist die *H. pylori*-Infektion eine der häufigsten chronischen bakteriellen Infektionen. Die Anpassung und chronische Persistenz des Pathogens im unwirtlichen Milieu des Magens ist dabei von großer Bedeutung. Eine wichtige Grundlage hierfür ist die enorme genetische Variabilität von *H. pylori*. *H. pylori* ist nicht nur in der Lage genetisches Material zur Erweiterung und Änderung des eigenen Repertoires durch natürliche Transformation, sondern vermutlich auch in einem konjugativen Mechanismus aufzunehmen. Das Verstehen der Mechanismen und Grundlagen der Übertragung von (Plasmid-) DNA ist von großer Relevanz, da unter anderem die Verbreitung von Antibiotika-Resistenzen ein immer größer werdendes Problem darstellt. Neben der Fähigkeit zur natürlichen Transformation konnte bisher der Transfer von chromosomalen Markern und *E. coli*-*H. pylori*-Shuttlevektoren durch einen konjugativen Mechanismus in *H. pylori* gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die intrinsischen, kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 von *H. pylori* P12 und eine mögliche konjugative Übertragung dieser zwischen *H. pylori*-Stämmen untersucht werden. Die in *H. pylori* P12 identifizierten Typ-IV-Sekretionssysteme sollten hinsichtlich ihrer Beteiligung am DNA-Transfer genauer charakterisiert werden. Zur Verfolgung dieses Ziels sollten alle in *H. pylori* P12 vorhandenen Typ-IV-Sekretionssysteme sukzessive mit Hilfe einer Kontraselektionsstrategie deletiert werden (Dailidiane *et al.*, 2006). Kokultivierungsexperimente mit den Deletionsmutanten sollten Erkenntnisse über den DNA-Export aus der Donorzelle und den DNA-Import in den Rezipienten liefern. Des Weiteren sollte eine Beteiligung der Plasmid- und chromosomal kodierten Relaxasen von *H. pylori* P12 beim Transfer von Plasmid-DNA zwischen *H. pylori*-Stämmen untersucht werden. Die Charakterisierung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion in *H. pylori* stellte einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Diese sollte unter anderem durch die Untersuchung einzelner Genprodukte

bezüglich ihrer Rolle für den Transfer dieser Plasmide zwischen *H. pylori*-Stämmen umgesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *Escherichia coli*

Tabelle 2.1: *Escherichia coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacO</i> 74 <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe)	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
DH5α	F- Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ - <i>thi-l</i> <i>gyr A96</i> <i>relA1</i> (Invitrogen)	(Hanahan, 1983)
β2150	<i>thrB1004</i> <i>pro</i> <i>thi</i> <i>strA</i> <i>hsdS</i> <i>lacZ</i> Δ M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacI</i> ^q <i>traD36</i> <i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺) Δ <i>dapA::erm</i> (Erm ^R) <i>pir</i>	(Dehio and Meyer, 1997)
β2150[pRK2013]	<i>thrB1004</i> <i>pro</i> <i>thi</i> <i>strA</i> <i>hsdS</i> <i>lacZ</i> Δ M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacI</i> ^q <i>traD36</i> <i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺) Δ <i>dapA::erm</i> (Erm ^R) <i>pir</i>	(Dehio <i>et al.</i> , 1997)
β2155	<i>thrB1004</i> <i>pro</i> <i>thi</i> <i>strA</i> <i>hsdS</i> <i>lacZ</i> Δ M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacI</i> ^q <i>traD36</i> <i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺) Δ <i>dapA::erm</i> (Erm ^R) <i>pir::RP4</i> [:: <i>kan</i> (Kan ^R) from SM10]	(Dehio <i>et al.</i> , 1997)

2.1.1.2 *Helicobacter pylori*

Tabelle 2.2: *Helicobacter pylori* Stämme.

Name	Stamm	Genotyp und Referenz
	ATCC 43526	typisierter Referenzstamm (Maeda <i>et al.</i> , 1997)
SR-P4	P8	pHel4 [<i>mccC::cat</i>] ; Δ <i>recA::erm</i>
SR-P5	P8	pHel4 [<i>orf4C::cat</i>] ; Δ <i>recA::erm</i>

SR-P9	P8	Wildtypstamm
SR-P27	P12	Δ pHel12
SR-P29	P12	$\Delta Tfs3$, $\Delta Tfs4$, Δ cag-PAI; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P43	P12	<i>rpsL*</i>
SR-P54	26695	WT
SR-P61	P12	$\Delta Tfs3$; $\Delta Tfs4$; Δ cag-PAI; Δ comB; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P166	P12	$\Delta Tfs3$; $\Delta Tfs4$; Δ cag-PAI; Δ comB; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P172	P12	<i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P173	P12	<i>virB4/topA</i> [43526]; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P248	P12	Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie und Immunologie“ der Universität Hamburg (Schmitt <i>et al.</i> , 1994)
SR-P333	P12	$\Delta Tfs3$; $\Delta Tfs4$; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P359	P12	$\Delta Tfs4$; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P366	P12	$\Delta Tfs3$; $\Delta Tfs4$; Δ cag-PAI; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P373	P12	<i>moeB::aphA3</i>
SR-P375	P12	Δ pHel12; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P377	P12	$\Delta Tfs4$; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P378	P12	$\Delta Tfs3$; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P379	P12	$\Delta Tfs3$; $\Delta Tfs4$; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P385	P12	<i>pHel12 Δorf08/09::aphA-3</i>
SR-P389	P12	Δ pHel12 [WT]; + <i>pHel12 Δorf08/09::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P396	P12	<i>pHel12 ΔmobA::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P398	P12	<i>pHel12::cat</i> ; $\Delta Tfs3$; Δ recA::erm
SR-P400	P12	Δ comB; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P402	P12	$\Delta Tfs4$ Δ Rel; <i>pHel12 ΔmobA::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P420	P1	<i>moeB::aphA3</i>
SR-P424	P12	Δ comB; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P426	P12	<i>moeB::aphA3</i> ; Δ recA::erm
SR-P430	P12	$\Delta Tfs4$ Δ Rel; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P431	P12	$\Delta Tfs4$ Δ Rel; <i>pHel12 ΔmobA::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P435	P12	$\Delta Tfs3$ Δ Rel; <i>pHel12 ΔmobA::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P438	P12	$\Delta Tfs3$ Δ Rel; <i>pHel12::cat</i> ; Δ recA::erm
SR-P458	P1	klinisches Isolat der Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universität Amsterdam (Haas <i>et al.</i> , 1993)

SR-P465	P12	$\Delta vacA::aphA-3$, Δcag -PAI:: <i>rpsL-erm</i>
SR-P469	P12	$\Delta pHel12 \Delta vacA::aphA-3$; Δcag -PAI:: <i>rpsL-erm</i>
SR-P490	P12	$\Delta orf12M::cat$; $\Delta vacA::aphA-3$; Δcag -PAI:: <i>rpsL-erm</i>
SR-P497	P12	$\Delta pHel12$ +pHel3
SR-P498	P1	+ pHel3
SR-P502	P12	<i>virB4/topA</i> [43526]; <i>moeB::aphA3</i>
SR-P506	P12	$\Delta Tfs3 \Delta Rel$; $\Delta Tfs4 \Delta Rel$; pHel12:: <i>cat</i> ; $\Delta recA::erm$
SR-P511	P12	$\Delta orf12C::aphA-3$
SR-P512	P12	$\Delta pHel12$ +pHel6
SR-P513	P12	$\Delta orf12M::aphA-3$
SR-P514	P12	$\Delta comE3::aphA-3$
SR-P539	P12	$\Delta Tfs3 \Delta Rel$; $\Delta Tfs4 \Delta Rel$; pHel12 $\Delta mobA::cat$; $\Delta recA::erm$

2.1.2 Plasmide und Vektoren

Tabelle 2.3: Plasmide und Vektoren.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pACYCDuet-1	T7 Promoter, p15A <i>ori</i> , <i>lacI</i> , Cam ^R ; zwei MCS zur Co-Expression von zwei Genen	Novagen
pAK23	pMin1, <i>comB6-comB10</i> Deletionsplasmid mit <i>aphA-3</i> Kassette zwischen upstream und downstream Bereichen, Tet ^R , Erm ^R	(Karnholz <i>et al.</i> , 2006)
pBluescript II SK+	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{fl(+)}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse Primerbindungsstellen Amp ^R ,	Stratagene
pCR2.1-TOPO	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{fl}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-, reverse- und T7-Promotor-Primerbindungsstellen, Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen
pDH29	pBluescript II KS ⁺ mit <i>recA</i> (partial):: <i>erm</i> , Amp ^R , Erm ^R	(Schmitt <i>et al.</i> , 1995)
pEGFP-N1	P _{CMV} ; <i>egfp</i> ; Kan ^R ; Neo ^R	BD Biosciences Clontech (Heidelberg)
pHel3	<i>E. coli-H. pylori</i> Shuttle-Plasmid, <i>aphA-3</i> Kassette; Kan ^R	(Heuermann and Haas, 1998)
pHel6	<i>E. coli-H. pylori</i> Shuttle-Plasmid, <i>aphA-3</i>	Claudia Höfler

	Kassette; <i>orf4C</i> ; <i>orf4F</i> ; putative <i>nic-site</i> ; Kan ^R	
pJP44	flankierende Bereiche von <i>cag</i> -PAI	Jürgen Püls
pSR7a	pACYCDuet-1 mit <i>orf4G</i> in <i>NcoI</i> und <i>Sall</i>	diese Arbeit
pSR11	pBluescript II SK+ mit <i>rpsL-erm</i> -Kassette in <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pSR12	Deletion des T4SSs <i>Tfs3</i> ; mit <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit
pSR13	Deletion des T4SSs <i>Tfs3</i> ohne <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit
pSR14	Deletion des T4SSs <i>Tfs4</i> ; mit <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit
pSR15	Deletion des T4SSs <i>Tfs4</i> ohne <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit
pSR17	pSR19 ohne <i>rpsL-erm</i> -Kassette	diese Arbeit
pSR18	Deletion des T4SS innerhalb der <i>cag</i> -PAI mit <i>rpsL-erm</i> in <i>BgIII</i> (pJP44+ <i>rpsL-erm</i>)	diese Arbeit
pSR19	Deletion des T4SS ComB mit <i>rpsL-erm</i> in <i>KpnI</i> und <i>ClaI</i> (pAK23+ <i>rpsL-erm</i>)	diese Arbeit
pSR20	pSP76 mit <i>aphA-3</i> Kassette in <i>KpnI</i> und <i>Sall</i> ; Insertion von <i>aphA-3</i> Kassette in <i>moeB</i> Locus	diese Arbeit
pSR21	Deletion von <i>virB4/topA</i> ; Insertion von <i>rpsL-erm</i> Kassette	diese Arbeit
pSR23	Insertion von <i>virB4/topA</i> [ATCC43526]	diese Arbeit
pSR24	Deletion von <i>orf08/09</i> in pHel12; Insertion von <i>aphA-3</i> -Kassette	diese Arbeit
pSR25	Deletion von <i>orf08/09</i> in pHel12; Insertion von <i>cat_{GC}</i> -Kassette	diese Arbeit
pSR26	Deletion von <i>orf04</i> in pHel12; Insertion von <i>cat_{GC}</i> Kassette	diese Arbeit
pSR27	Deletion von <i>orf04</i> in pHel12; Insertion von <i>aphA-3</i> -Kassette	diese Arbeit
pSR28	Insertion von <i>cat_{GC}</i> Kassette zwischen <i>orf4M</i> und <i>orf4A</i> in pHel12	diese Arbeit
pSR29	Deletion von <i>Tfs3</i> inkl. chromosomal kodierter Relaxase mit <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit
pSR30	Deletion von <i>Tfs3</i> inkl. chromosomal kodierter Relaxase ohne <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit
pSR31	Deletion von <i>Tfs4</i> inkl. chromosomal kodierter Relaxase mit <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit

pSR32	Deletion von <i>Tfs4</i> inkl. chromosomal kodierter Relaxase ohne <i>rpsL-erm</i>	diese Arbeit
pSR33	Deletion von <i>comE3</i> ; Insertion von <i>aphA-3</i>	diese Arbeit
pSR34	Deletion von <i>orf11</i> in pHel12; Insertion von <i>cat_{GC}</i> -Kassette	diese Arbeit
pSR35	Deletion von <i>orf11</i> in pHel12; Insertion von <i>aphA-3</i> -Kassette	diese Arbeit
pWS48	pBluescript II KS ⁺ mit <i>recA</i> (partial):: <i>cat</i> , Amp ^R , Cam ^R	Wolfgang Fischer
pWS102	Deletion von <i>vacA</i> ; Insertion von <i>aphA-3</i> -Kassette	Wolfgang Fischer

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen. Die Sequenz (5'→3'), der Verwendungszweck, sowie eventuell enthaltene Schnittstellen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide.

Aufgeführt sind die Sequenz, der Verwendungszweck und die Referenz der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Enthaltene Restriktionsschnittstellen sind farbig markiert.

Name	Sequenz 5' → 3'	Verwendungszweck und Referenz
SR4	act gat tac ata ttc gta ata ata ttt	sense Primer zur Sequenzierung der Deletion von <i>orf4C</i> bzw. <i>orf04</i> von pHel4 bzw. pHel12
SR5	aga aat cag caa tca att aga aca ac	antisense Primer zur Sequenzierung der Deletion von <i>orf4C</i> bzw. <i>orf04</i> von pHel4 bzw. pHel12
SR13	gat cct cga gct tct aaa tct ttg cta aat	sense Primer mit <i>XhoI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs4</i>
SR14	gat cat cga taa gcc caa tga aga agt gt	antisense Primer mit <i>ClaI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs4</i>
SR17	gat cct cga gct aaa ctc tgg cgt aaa att	sense Primer mit <i>XhoI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs3</i>
SR18	gat cat cga tgt ccc ttt cta tga gac tta g	antisense Primer mit <i>ClaI</i> Schnittstelle

		zur Deletion von <i>Tfs3</i>
SR22	aca cca agt ttg tta aat ac	Sequenzierung der Deletion von <i>Tfs4</i>
SR24	gag cgt ctt tga aat gcg tt	Sequenzierung der Deletion von <i>Tfs3</i>
SR25	tct cta tca gtg tca gtg gc	Sequenzierung der Deletion von <i>Tfs3</i>
SR28	gat cgc ggc cgc cat tct tat tcc ttt atg tt	sense Primer mit <i>NotI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs4</i>
SR30	gat cgc ggc cgc aca caa agc acc caa agt ta	sense Primer mit <i>NotI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs3</i>
SR32	gat cgc ggc cgc cat taa gac tta aat tag ga	sense Primer mit <i>NotI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs4</i>
SR34	gat ccc gcg gat aat ctc caa att tta gag	antisense Primer mit <i>SacII</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs4</i>
SR35	gat ccc gcg gca ctt tca tac tat att taa	antisense Primer mit <i>SacII</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>Tfs3</i>
SR41	gat cgg atc caa ttc ttt ttt tat atc tgt	antisense Primer zur Deletion von <i>orf04</i> in pHel12; <i>BamHI</i> Schnittstelle
SR42	cag cat cga tat gct tta taa cta tgg att	sense Primer zur Amplifikation der <i>rpsL-erm</i> -Kassette mit <i>ClaI</i> Schnittstelle
SR43	gcg gta cct tac tta tta aat aat tta tag	antisense Primer zur Amplifikation der <i>rpsL-erm</i> -Kassette mit <i>KpnI</i> Schnittstelle
SR44	agc cca tgg atg tta aaa gat gta gaa gta	sense Primer mit <i>NcoI</i> Schnittstelle zur Amplifikation von <i>orf4G</i> aus pHel4
SR45	agc gtc gac tca ata tcc agc ata tat ctc	antisense Primer mit <i>SalI</i> Schnittstelle zur Amplifikation von <i>orf4G</i> aus pHel4
SR46	agc cat atg ctg gat att gaa tac cac aat	sense Primer mit <i>NdeI</i> Schnittstelle zur Amplifikation von <i>orf4H</i> aus pHel4
SR47	agc ctc gag cta aaa caa ctc gct atg act	antisense Primer mit <i>XhoI</i> Schnittstelle zur Amplifikation von <i>orf4H</i> aus pHel4
SR48	gat cct cga gta ttg gtg ggc att gcc aat	sense Primer mit <i>XhoI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>virB4</i> in P12
SR49	gat cat cga tta ttt atc cga gtg ttt atc	antisense Primer mit <i>ClaI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>virB4</i> in P12
SR50	gat cgc ggc cgc cat aag cat gga aat tga	sense Primer mit <i>NotI</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>virB4</i> in P12
SR51	gat ccc gcg gat act caa gag gaa ata agc	antisense Primer mit <i>SacII</i> Schnittstelle zur Deletion von <i>virB4</i> in P12

SR52	gat cgg atc cat tta act aac ata ctt agc	sense Primer mit BamHI Schnittstelle zur Deletion von <i>orf04</i> aus pHel12
SR53	gat cgg atc ccc tac agg tct cac aca tca	sense Primer mit BamHI Schnittstelle zur Insertion von <i>cat_{GC}</i> -Kassette zwischen <i>orf01</i> und <i>orf11</i> in pHel12
SR54	gat cgg atc ccc aaa ctt tcc cta tgg gca	antisense Primer mit BamHI Schnittstelle zur Insertion von <i>cat_{GC}</i> -Kassette zwischen <i>orf01</i> und <i>orf11</i> in pHel12
SR59	gat cgt cga cag cga acc att tga ggt gat ag	Antisense Primer zur Klonierung von <i>aphA-3</i> -Kassette aus pHel3 mit SalI Schnittstelle
SR60	gat cgg tac ccg ggg atc ttt tag aca tct	sense Primer zur Klonierung von <i>aphA-3</i> -Kassette aus pHel3 mit KpnI Schnittstelle
SR69	gat cgc ggc cgc ata caa acc cct taa gac	sense Primer mit NotI -Schnittstelle zur Deletion der chromosomal kodierten Relaxase innerhalb und inkl. <i>Tfs3</i>
SR70	gat ccc gcg gat tag ggc tag atg acg ctt	antisense Primer mit SacII -Schnittstelle zur Deletion der chromosomal kodierten Relaxase innerhalb und inkl. <i>Tfs3</i>
SR71	gat cct cga gta ttg ata cta agg gcg aac	sense Primer mit XhoI -Schnittstelle zur Deletion der chromosomal kodierten Relaxase innerhalb und inkl. <i>Tfs4</i>
SR72	gat cat cga taa cca tcc ata aaa tta aat	antisense Primer mit ClaI -Schnittstelle zur Deletion der chromosomal kodierten Relaxase innerhalb und inkl. <i>Tfs4</i>
SR73	gag ctg gtg ata tgg gat ag	sense Sequenzierprimer innerhalb <i>cat_{GC}</i> -Kassette
SR74	ctc cag agc gat gaa aac gt	antisense Sequenzierprimer innerhalb <i>cat_{GC}</i> -Kassette
SR79	gat cgg atc ctt tgt cct agt atc taa att	Antisense Primer zur Deletion von <i>orf12M</i> mit BamHI -Schnittstelle
SR80	gat cgg atc cca gat gca tgc taa cta gac	Sense Primer zur Deletion von <i>orf12M</i> mit BamHI -Schnittstelle
SR99	ctc gag gtg tta tct aca aaa tct ac	Sense Primer zur Amplifikation von <i>orf4M</i> aus pHel4 mit XhoI -Schnittstelle
SR100	gtc gac gct gat ttt ttg aca gaa aaa t	Antisense Primer zur Amplifikation von

		<i>orf4M</i> aus pHel4 mit SaII -Schnittstelle
SR105	gat cga att cgt gat gga tta taa aga att	Sense Primer zur Amplifikation von <i>orf12M</i> mit EcoRI -Schnittstelle
SR106	gat cgt cga cgc tga ttt ttt gac aga aaa at	Antisense Primer zur Amplifikation von <i>orf12M</i> mit SaII -Schnittstelle
SR109	aca tta tcc ctt act tca cc	Sense Primer zur Sequenzierung der Deletion der Relaxase innerhalb <i>Tfs4</i>
SR110	ata tct agg aat tag gac ca	antisense Primer zur Sequenzierung der Deletion der Relaxase innerhalb <i>Tfs4</i>
SR111	gat cgg atc ctt tta gtt tct tgt ccc tct	Sense Primer zur Deletion von <i>comE3</i> mit BamHI -Schnittstelle
SR112	gat cgg atc cta gcg tta ctc cct aaa ttg	antisense Primer zur Deletion von <i>comE3</i> mit BamHI -Schnittstelle
SR113	tca cgc gct atg aag aca tg	Sense Primer zur Sequenzierung der Deletion von <i>comE3</i>
SR114	tcc aaa gcg acc aat tcg ct	antisense Primer zur Sequenzierung der Deletion von <i>comE3</i>
AK250	gga gaa cca tgg atg act aac gaa acc att aac caa c	Sense Primer mit NcoI -Schnittstelle zur Amplifikation von CagA
AK251	gga tcc gac gac gcg gcc gct taa gat ttt tgg aaa cca cct ttt g	Antisense Primer mit SaII -Schnittstelle zur Amplifikation von CagA
AK59	gga att cga aga aca tca taa gcg ttt	Bestätigung der Deletion von ComB-System
CH123	gatc ggt acc act aac ata ctt agc tct ta	Deletion von TA-System aus pHel4 bzw. pHel12 (Claudia Höfler)
CH124	gatc aga tct ctt atc tcc tta act caa t	Deletion von TA-System aus pHel4 bzw. pHel12 (Claudia Höfler)
CH125	gatc aga tct aca aat ttc ttc cta aaa t	Deletion von TA-System aus pHel4 bzw. pHel12 (Claudia Höfler)
CH126	gatc gag ctc aca acg gcg atg acg gcg ta	Deletion von TA-System aus pHel4 bzw. pHel12 (Claudia Höfler)
D9355	ccg gat ccg tga tgc ggt gcg	RAPD-PCR; (Akopyanz <i>et al.</i> , 1992b)
DHO15	gaa gat ctc aaa aag ggt aaa gat g	Bestätigung der Deletion von ComB-System (Dirk Hofreuter)
HH64	cag cgg atc cat gct tta taa cta tgg att	BamHI Primer zur Amplifikation von <i>rpsL-erm</i> Kasette

HH66	gcg gat cct tac tta tta aat aat tta tag	BamHI Primer zur Amplifikation von <i>rpsL-erm</i> Kasette
WS393	tat ggt atc agg gca tac c	Sequenzierung von <i>virB4/topA</i> -Region innerhalb <i>Tfs4</i>
WS394	ggt ctt tga gat act cag g	Sequenzierung von <i>virB4/topA</i> -Region innerhalb <i>Tfs4</i>

2.1.4 Zelllinie

Es wurde die humane Magenkarzinomzelllinie AGS (ATCC CRL 1739) verwendet.

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.5: Primäre Antikörper.

Antikörper	Herkunft
AK175	Polyklonales Antiserum gegen intakte <i>H. pylori</i> Zellen (Kaninchen)
α-CagA (AK257)	α -547, Polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen CagA-Bereich von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer)
α-ComB8 (AK250)	Polyklonales Antiserum gegen ein <i>H. pylori</i> P1 ComB8 Fusionsprotein (Kaninchen) (D. Hofreuter)
α-ComB9 (AK251)	Polyklonales Antiserum gegen ein <i>H. pylori</i> P1 ComB9 Fusionsprotein (Kaninchen) (D. Hofreuter)
α-ComB10 (AK252)	Polyklonales Antiserum gegen ein <i>H. pylori</i> P1 ComB10 Fusionsprotein (Kaninchen) (D. Hofreuter)
α-GFP	Sigma-Aldrich
α-P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper (IgG2b) gegen Phosphotyrosin (Maus) (Santa Cruz)

	Biotechnologies)
α-RecA (AK263)	(Schmitt <i>et al.</i> , 1995)
α-VacA (AK197)	polyklonales Antiserum gegen VacA von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.6: Sekundäre Antikörper.

Antikörper	Herkunft
α-Kaninchen IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG (Ziege), (Dianova)
α-Kaninchen IgG-Alexa488	Alexa488-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen Kaninchen IgG (Ziege), (Molecular Probes)

2.1.6 Nährmedien für Bakterien

Für die Herstellung aller Nährmedien wurde entsalztes und filtriertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D) verwendet. Alle Nährmedien wurden in Wasserdampfhochdruckautoklaven SterimaquetTM (Maquet/Getinge, Rastatt, D) für 20 min bei 121°C und $1,013 \times 10^5$ Pascal Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wie Antibiotika und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 μ m Porengröße; Millipore) und den jeweiligen Nährmedien nach dem Autoklavieren bei max. 55°C Medientemperatur steril zugegeben. Tabelle 2.7 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Nährmedien.

Tabelle 2.7: Nährmedien.

Nährmedium	Herstellung und Bezugsquelle
LB-Flüssigmedium	20g/l Lennox-L-Medium (Gibco/Invitrogen), autoklaviert
LB-Platten	32 g/l Lennox-L-Agar (Gibco/Invitrogen), autoklaviert
Brucella-Medium (<i>Brucella Broth</i>; BB)	28 g/l Brucella Broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), autoklaviert
Serumplatten	36 g/l GC-Agar-Basis (Oxoid), autoklaviert, danach Zugabe

	von 10 ml/l Vitamin-Mix, 80 ml/l Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprin, 1 mg/l Nystatin
Vitaminmix	100 g/l α -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l Nicotinamidadeninindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l LCystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil

2.1.7 Hemmstoffe und Medienzusätze

Chloramphenicol und Nystatin wurden von Merck (Darmstadt, D), alle weiteren Antibiotika und Zusätze von Sigma-Aldrich (St. Luis, USA) bezogen. Tabelle 2.8 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Hemmstoff und Medienzusätze.

Tabelle 2.8: Hemmstoffe und Medienzusätze.

Medienzusätze	Abkürzung	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Amp	H ₂ O	100 μ g/ml
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid	X-Gal	H ₂ O	40 μ g/ml
Chloramphenicol	Cam	EtOH	30 μ g/ml (<i>E. coli</i>) 6 μ g/ml (<i>H. pylori</i>)
Diaminopimelinsäure	DAP	H ₂ O	14 μ g/ml
Erythromycin	Erm	EtOH	250 μ g/ml (<i>E. coli</i>) 10 μ g/ml (<i>H. pylori</i>)
Kanamycin	Kan	H ₂ O	50 μ g/ml (<i>E. coli</i>) 8 μ g/ml (<i>H. pylori</i>)
Nystatin	Nys	-	440 μ l/l (<i>H. pylori</i>)
Streptomycin	Strep	H ₂ O	250 μ g/ml
Trimetoprim		H ₂ O	5 μ g/ml
Vancomycin	Van	H ₂ O	10 μ g/ml

2.1.8 Zellkulturmedien und -puffer

Für die Kultivierung von AGS-Zellen wurde RPMI-Medium (RPMI 1640) mit L-Glutamin mit 10% FCS (inaktiviert) versetzt. In der Zellkultur wurde kommerziell erhältliches PBS der Firma Gibco eingesetzt (Dulbeccos's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat).

2.1.9 Enzyme und Proteine

Tabelle 2.9: Bezugsquellen für Enzyme und Proteine.

Enzym/Protein	Firma
Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A	Sigma
DNase I	Roche
Expand High Fidelity Taq-Polymerase	Roche
Takara-Taq-Polymerase	TaKaRa Bio Inc
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
Pferdeserum	Invitrogen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL
Lysozym	Roche
Proteinase K	Merck
Restriktionsenzyme	Roche, NEB
T4-DNA-Ligase	Roche
Pfu-Polymerase	Roche

2.1.10 Molekulargewichtsmarker

Tabelle 2.10: Molekulargewichtsmarker.

Anwendung	Marker und Bezugsquelle
DNA-Gelelektrophorese	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Prestained High Range (Bio-Rad, 161-0373)

2.1.11 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%) (Roth), Agarose (Sigma), Ammoniumsulfat (Roth), Ampicillin (Sigma), ATP (Roche), 5-Brom-3-chlor-3-

indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP) (Roth), Bromphenolblau (Serva), Brucella-Medium (Becton Dickinson), Chloramphenicol (Serva), Cholesterol (Gibco), Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat Mix (dNTPs) (Roche), Diaminopimelinsäure (DAP) (Sigma), DMSO (Sigma), EDTA (Sigma), Ethidiumbromid (Sigma), Fluoroprep™ (BioMérieux), GC-Agar (Oxoid), Glycerin (Roth), Kanamycin (Merck), Lennox-L-LB-Agar (Invitrogen), Leupeptin (Sigma), Methyleneblau (Serva), Natriumlaurylsulfat (SDS) (Roth), NNN'N'Tetramethylendiamid (TEMED) (Sigma), Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT) (Roth), PBS Dulbecco's (Invitrogen), Pepstatin (Sigma), PFA (Paraformaldehyd) (Sigma), PMSF (Sigma), RPMI 1640-Medium mit Glutamin (Invitrogen), Tetracyclin (Roche), Trimethoprim (Sigma), Trypan Blau (Invitrogen), Tween20 (Serva), Vancomycin (Sigma), Western Lightning™-Detektionsreagenz (Perkin Elmer Life Science), X-Gal (Sigma)

Alle weiteren organischen und anorganischen Chemikalien wurden von Merck, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.12 Kommerziell erwerbbaare Kits

Tabelle 2.11: Kommerziell erwerbbaare Kits.

Kit	Firma
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	PEQLAB
<i>illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	GE-Healthcare
QIAprep Spin Miniprep Kit™	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit™	Qiagen
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit	Invitrogen
TOPO-TA-Cloning™-Kits mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor	Invitrogen
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega

2.1.13 Hilfsmittel

Anaerobentöpfe (Fritz Gößner GmbH), Deckgläser (Menzel), Dialyse Kassette Slide-A-Lyzer 30 kDa (ThermoScientific), Dialyseschläuche (Medicell), Einfrierröhrchen (Nalgene), Elektroporationsküvetten (Eurogenetec), Eppendorfgefäße (Eppendorf), Expositionskassetten für Röntgenfilme (Kodak), Falcon Röhrchen 15ml, 50ml (Falcon, BD), Filterpapiere (Whatman), Glycerperlen 3mm (Omnilab), Halbmikroküvetten (Brand),

Petrischalen (Greiner), PVDF-Membran (Bio-Rad), Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schüll), Nitrocellulose-Filter (Millipore), Objektträger (Langenbrinck), Röntgenfilme (Fuji), Quick-SealTM-Röhrchen (Beckmann), Röntgenfilme (Fujifilm), Zellkulturflaschen/-schalen (BD Falcon), 0,2 µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH).

2.1.14 Apparaturen und Geräte

Agarosegelkammern (Bio-Rad), Brutschränke (Binder, Scholzen), Durchflusszytometer (BD), Fluoreszenzmikroskop Leitz MDRD (Leica), Fluoreszenz-Plattenlesegerät (Fluostar Optima; BMG Labtech), -80°C Gefriertruhe (Heraeus), Gelelektrophoresesystem Mini-Protean IIITM (Bio-Rad), Gene PulserTM (Bio-Rad), Heizblöcke (Techne), Konfokales Laserscanning- Mikroskop (Leica SP5), Kühlschrank (Liebherr), Magnetrührer (Heidolph), Mikrowelle (AEG), pH-Meter (WTW), Photometer Libra S12 (Biochrom), Rollmischer (Assistent), Schüttelinkubatoren (GFL), Schüttler (Eppendorf), Spannungsquellen (Biotec Fischer, Delta Elektronika), Speed-Vac (Savant), Sterile Werkbank (BDK), Thermocycler (Perkin Elmer, Eppendorf); UV-Transluminator (Kaiser), Video-Geldokumentationsanlage (Bio-Rad), Vortex (Scientific Industries), Waagen (Fischer), Wasserbäder (GFL), Western Blot-Apparatur (Biotec Fischer), Zentrifugen (Heraeus, Beckmann, Sorvall).

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte je nach Bedarf auf festem bzw. in flüssigem Luria-Bertani (LB) Komplexmedium, welches bei Bedarf nach dem Autoklavieren mit entsprechenden Antibiotika versetzt wurde. Die Inkubation erfolgte aerob bei 37°C in einem Brutschrank bzw. Schüttelinkubator bei 180 rpm. Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer halben LB-Agarplatte in 1 ml LB-Medium mit 20% Glycerin resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

2.2.1.2 Kultivierung und Stammhaltung von *Helicobacter pylori*

H. pylori wurde auf Serumplatten bzw. Selektivagar mit entsprechenden Antibiotika ein bis zwei Tage unter mikroaeroben Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) bei 37°C im Anaerobtopf oder im Inkubationsschrank (Scholzen) kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Brucella-Medium, welches mit 10% FCS bzw. Cholesterol (1:250 (v/v); Gibco/Invitrogen; Carlsbad, USA) versetzt wurde bei 80 rpm im Anaerobtopf unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert. Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer halben dicht bewachsenen Platte in 1 ml Brucella-Medium mit 20% Glycerin und 10% FCS suspendiert und bei -70°C gelagert. Zur Rekultivierung wurden aus der Gefrierkultur *H. pylori*-Stämme auf Serumplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und 48 h bei 37°C bebrütet. Nach ein- bis zweimaligem Passagieren auf neue Platten wurden die Bakterien für Experimente eingesetzt.

2.2.1.3 Messen der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Die Bestimmung der optische Dichte (OD) einer Bakteriensuspension erfolgte in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550$ nm (OD₅₅₀). Dazu wurden Bakterien entweder von Platte abgenommen und im gewünschten Medium bzw. 1 x PBS resuspendiert, oder es wurde ein Aliquot aus einer Flüssigkultur entnommen. Nach entsprechender Verdünnung fand die Bestimmung der optischen Dichte gegen den jeweiligen Blindwert statt.

2.2.1.4 „Plasmid curing“

Novobiocin, ein Aminocumarin, welches die bakterielle DNA Gyrase angreift, indem es die ATPase-Aktivität der GyrB Untereinheit des Enzyms inhibiert, wurde für das „*plasmid curing*“ von *H. pylori* P12 ausgewählt (O'Connell and Nicks, 2006). Die Behandlung von Zellen mit sublethalen Dosen von Novobiocin führt zum Verlust des intrinsischen Plasmids. Zur Bestimmung einer geeigneten sublethalen Dosis wurde die minimale inhibitorische Konzentration (MHK) durch serielle Verdünnungsreihen auf Novobiocin-enthaltenden Agarplatten ermittelt. Hierzu wurden Serum-Platten mit 30-60 µg/ml Novobiocin eingesetzt. Der entsprechende *H. pylori*-Stamm wurde sofort auf den die MHK enthaltenden Novobiocinplatten passagiert bis der Verlust des Plasmid bestätigt werden konnte.

2.2.2 Genetische und molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (Holmes and Quigley, 1981)

Eine kostengünstige Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke stellt die von Holmes und Quigley etablierte Kochpräparation dar. Es wurden *E. coli* Klone auf ein Sechstel einer selektiven LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Zellmaterial wurde mit einer sterilen Impföse abgenommen und in 300 µl STET-Puffer (8% Saccharose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in STET-Puffer gelöst) wurde die Zellsuspension mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 1minütiges Kochen bei 95°C lysiert. Durch 15minütige Zentrifugation bei 13000 rpm wurden Zelltrümmer und die chromosomale DNA von der in Lösung verbleibenden Plasmid-DNA abgetrennt. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Nach Zugabe von 200 µl Isopropanol, 20minütiger Inkubation und damit verbundener Fällung der DNA bei -20°C wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die gefällte DNA mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren 5minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die präzipitierte DNA für 10 min in der

Vakuumentrifuge getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 30-50 µl sterilem destillierten H₂O aufgenommen.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* für präparative Zwecke wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori* wurde das „WizardTM Plus SV Miniprep“ Kit von Promega (Madison, USA) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde mit 100 µl sterilem H₂O_{dest.} eluiert.

2.2.2.4 Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori* wurde das QIAamp Tissue Kit der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben eingesetzt. *H. pylori* wurde über Nacht bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Das Zellmaterial wurde mit einer sterilen Impföse von der Serumagarplatte abgenommen. Die Elution der chromosomalen DNA erfolgte mit 200 µl sterilem H₂O_{dest.}

2.2.2.5 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* (Hanahan, 1983)

Die Herstellung chemokompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidium-Chlorid-Methode. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 - 0,6 bei 37°C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis für 30 min gekühlt und durch Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4°C) sedimentiert. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in 40 ml TFB I (30 mM Kaliumacetat CH₃COOK, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerin; pH 5,2 mit 0,2 M CH₃COOH eingestellt; sterilfiltriert) und anschließender 5minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 4 ml TFB II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl; 15%

(v/v) Glycerin; pH 6,5 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert) resuspendiert, zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.2.6 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Transformation von Plasmiden bzw. Ligationsansätzen wurden 50 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA bzw. mit 5 µl Ligationsansatz versetzt. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein 90sekündiger Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Nach einer 1minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C aerob bei 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Zellmaterial durch eine 5minütige Zentrifugation bei 4000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in ca. 100 µl Überstand resuspendiert und auf selektivem Medium ausplattiert. Die Ansätze wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.7 Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen

Für eine erhöhte Transformationseffizienz bzw. zur Durchführung von TOPO[®] *cloning* wurden käuflich erwerbbar, superkompetente *E. coli* Top10-Zellen (Invitrogen) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.8 Transformation von *H. pylori*

H. pylori ist natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA. Für die Transformation wurden die Bakterien ohne Vorbehandlung in Brucella-Flüssigmedium, welches mit 10% FCS versetzt wurde, resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 0,2 eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde mit 1 µg DNA versetzt und ca. 4 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde auf entsprechende Selektivagarplatten ausplattiert und unter mikroaeroben Bedingungen 3-5 Tage inkubiert.

2.2.2.9 Elektroporation von *H. pylori* modifiziert nach Segal und Tompkins (Segal and Tompkins, 1993)

Zur Elektroporation von *H. pylori* wurde Zellmaterial in 1 ml sterilem 1 x PBS resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 1 pro ml eingestellt. Nach 5minütigem Zentrifugieren bei 3000 rpm wurde das Zellmaterial einmal mit 500 µl 1 x PBS und einmal mit 500 µl Elektroporationspuffer (272 mM Saccharose; 15% (v/v) Glycerin; 2,43 mM K₂HPO₄; 0,57 mM KH₂PO₄) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 40 µl Elektroporationspuffer aufgenommen und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach Zugabe von 1-2 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA wurde in einer Gene PulserTM Apparatur bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Nach dem Puls wurden die Zellen unmittelbar mit 1 ml BB + 10% FCS versetzt und in eine 12-Napf-Platte überführt. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C und 10% CO₂ wurde das sedimentierte Zellmaterial auf Selektivagar ausplattiert und für 3-6 Tage unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert.

2.2.2.10 Konjugation von Plasmiden zwischen *E. coli* und *H. pylori*

Sowohl in *E. coli* als auch in *H. pylori* replizierbare „Shuttle-Vektoren“ wurden mittels Konjugation von den *E. coli*-Donorstämmen β2150 oder β2155, welche auf dem Plasmid pRK2013 die für die Konjugation notwendigen, für den Konjugationsapparat kodierenden *tra*-Gene enthalten mit Hilfe eines *E. coli* Mobilisator-Stammes auf einen *H. pylori*-Akzeptorstamm übertragen. In einem ersten Schritt wird das Plasmid pRK2013 vom Mobilisator auf den Donor über Konjugation übertragen, wodurch der Donor selbst zu einem Konjugations-kompetenten Stamm wird, und den „Shuttle-Vektor“ in einer zweiten Konjugation an den Akzeptorstamm weitergeben kann. Die *E. coli*-Donorstämme β2150 und β2155 sind ebenso wie der Mobilisatorstamm durch die Defizienz des für die DAP-Aminotransferase kodierenden Gens ($\Delta dapA::erm$) auxotroph für Diaminopimelinsäure (DAP) und benötigen daher für die Biosynthese von Lysin die Supplementation von DAP. Die Auxotrophie der *E. coli*-Stämme ermöglicht die Selektion der *H. pylori* Transkonjuganten auf Selektivagar ohne DAP. Sowohl der das entsprechende Plasmid enthaltende Donorstamm, als auch der Mobilisatorstamm wurden auf DAP-enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen. Der *H. pylori* Akzeptorstamm wurde auf entsprechenden GC-Agarplatten ausgestrichen.

Nach Resuspension der Stämme in jeweils 1 ml BB-Medium wurden Suspensionen mit einer OD₅₅₀ von 10 hergestellt und im Verhältnis 1:1:10 (Donor:Mobilisator:Akzeptor) vereinigt. Das sedimentierte Zellmaterial wurde resuspendiert und auf einen, auf einer Serumplatte aufgelegten Nitrozellulosefilter getropft und für 4 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Zellmaterial mit 1 ml BB vom Filter gespült, sedimentiert, auf Selektivagarplatten ausplattiert und unter mikroaeroben Bedingungen für 3-6 Tage inkubiert.

2.2.2.11 Kokultivierungsexperimente mit *H. pylori*-Stämmen (modifiziert nach Kuipers *et al.* 1998)

Für Kokultivierungsexperimente wurden Donor- und Rezipienten-Stämme mit jeweils einem spezifischen Resistenzmarker eingesetzt. Um den Transfer des kryptischen Plasmids des Donors in den Rezipienten zu verfolgen wurde die *cat_{GC}*-Kassette in das Plasmid pHel4 bzw. pHel12 inseriert. Zur Selektion des Rezipienten wurde die *aphA-3*-Kassette in den *moeB*-Locus, welcher für die Kolonisierung *in vivo* nicht essentiell ist, mit Hilfe des Plasmids pSR20 inseriert (Kavermann *et al.*, 2003). Um eine Übertragung der *aphA-3*-Kassette vom Rezipienten in den Donor und somit bidirektionalen Gentransfer zu verhindern, wurde im Donor das Gen *recA* mit Hilfe des Plasmids pDH29 deletiert. Donor- und Rezipientenstämme wurden nach etwa 24stündigem Wachstum auf entsprechenden Selektivagarplatten in 1 ml BB resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 2 pro ml eingestellt. In Experimenten mit DNaseI (Roche; 1 mg/ml in 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM MgCl₂) wurden 25 µl Donor- und 25 µl Rezipienten-Zellsuspension mit jeweils 25 µl 1 mg/ml DNaseI für 30 min bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurden Donor und Rezipient mit 50 µl DNaseI resuspendiert und auf eine Serumagarplatte getropft. In Experimenten ohne DNaseI wurden 25 µl Donor- and 25 µl Rezipienten-Zellsuspension direkt in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 30 min bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Donor-Rezipienten-Gemisch auf eine Serumagarplatte getropft. Nach 16-18-stündiger Inkubation bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen wurde das Zellmaterial in 1 ml BB resuspendiert. Um die CFU/ml des Donors zu bestimmen wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und auf GC-Agarplatten mit Chloramphenicol ausplattiert. Zur Bestimmung der Transkonjuganten pro ml wurden 100 µl der Zellsuspension und das verbliebene, geerntete Zellmaterial

auf Doppelselektivagarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin bzw. Streptomycin ausplattiert. Nach 3-6tägiger Inkubation bei 37°C und unter mikroaeroben Bedingungen wurde die Plasmidtransferrate (CFU pro ml/Transkonjuganten pro ml) bestimmt.

2.2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (Maniatis *et al.*, 1982; Mullis *et al.*, 1986). Die PCR stellt ein enzymatisches *in vitro*-Verfahren zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten dar. Dazu werden zwei kurze Oligonukleotide (meist 18-25 bp) eingesetzt, die sich nach Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges gerichtet an komplementäre DNA-Einzelstränge (*Template*) anlagern (*Annealing*) und somit den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die Verlängerung (Elongation) der Oligonukleotide entlang der denaturierten DNA-Matrize findet mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und den im Reaktionspuffer enthaltenen Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) statt. Um eine erneute Oligonukleotidanlagerung nach der Elongation zu ermöglichen, wird die DNA zu Beginn jedes Zyklus neu denaturiert. Auf diese Weise kommt es zur exponentiellen Amplifikation der DNA. Zur Klonierung wurde die Polymerase Takara[®]-*Taq* der Firma Promega mit dem dazugehörigen Puffersystem eingesetzt. Diese Polymerase zeichnet sich durch eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion aus, die eine geringe Fehlerwahrscheinlichkeit verspricht. Bei analytischen Arbeiten wurde die PCR mit der *Taq* Polymerase PAN der Firma Promega im zugehörigen Puffersystem durchgeführt. Als Matrize wurde chromosomale DNA (1:20-Verdünnung) oder Plasmid-DNA (1:10-Verdünnung) eingesetzt. Je nach Anwendung wurden die PCR- Ansätze in einem Gesamtvolumen von 25 oder 50 µl durchgeführt. Pro 50 µl Ansatz wurden 1 µl Template-DNA, je 100 pmol Oligonukleotid, je 20 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP sowie 2 U *Taq*-Polymerase eingesetzt. MgCl₂ wurde je nach Anwendung in einer Endkonzentration von 1,5 mM oder 2 mM eingesetzt. Abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Gen-Abschnittes wurde die Dauer der Elongation angepasst (1000 bp pro 1 min). Die Temperatur-Zeit-Zyklen, die zur PCR- Amplifikation verschiedener Matrizen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2.12 dargestellt. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.2.15) überprüft.

Tabelle 2.12: PCR-Protokoll.

Die PCR-Reaktion wurde mit Variation der Annealing-Temperatur, Synthesetemperatur (PAN:72°C; Takara: 68°C) und -zeit wie angegeben durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Primäre Denaturierung	94°C	5 min	1 x
Denaturierung	94°C	40 sec	25- 30 x
Annealing	48°C – 58°C	45 sec	
Elongation	Takara/PAN 68°C / 72°C	1 min / 1 kb	
Finale Elongation	Takara/PAN 68°C / 72°C	10 min	1 x

2.2.2.13 Kolonie-PCR nach Sambrook *et al.* (1989)

Zur schnellen Identifizierung von Klonen wurde die so genannte „*colony* PCR“ nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Hierzu wurde Zellmaterial mit einer Pipettenspitze in 14,75 µl H₂O resuspendiert und eine PCR nach Standardprotokoll (siehe 2.2.2.12) im 25 µl Ansatz durchgeführt.

2.2.2.14 RAPD-PCR (Akopyanz *et al.* 1992)

Die RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA), eine DNA-Fingerprinting Methode, kann zur Unterscheidung von klinischen Isolaten eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die RAPD-PCR eingesetzt, um nach Kokultivierungen die Transkonjugantenzelle als Abkömmling der Rezipientenzelle zu identifizieren. Hierzu wurde chromosomale DNA von Donor, Rezipient und Transkonjugant isoliert und eine PCR mit dem Oligonukleotid D9355 („*random primer*“) durchgeführt. Die RAPD-PCR wurde im 25 µl Ansatz mit 20 ng chromosomaler DNA, 3 mM MgCl₂, 20 pmol Primer, jeweils 250 µM dCTP, dGTP, dATP und dTTP und 1 U Takara® *Taq* DNA-Polymerase durchgeführt. Das RAPD-PCR-Programm ist in Tabelle 2.13 aufgeführt.

Tabelle 2.13: RAPD-PCR-Protokoll.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Amplifikation mit geringer Stringenz	94°C	5 min	4 x
	40°C	5 min	
	72°C	5 min	
Amplifikation mit hoher Stringenz	94°C	1 min	30 x
	55°C	1 min	
	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1 x

2.2.2.15 Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten für präparative und analytische Zwecke erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) auf horizontalen 1-2%igen Agarose-Gelen in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) für ca. 50 min bei 70 V. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das entsprechende Agarosegel mit ¼ Volumen GEBS-Puffer (20% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (w/v) N-Laurylsarcosyl) versetzt. Ein mitgeführter DNA-Längen-Standard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; MBI Fermentas) ermöglichte die Abschätzung der Fragmentgrößen. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei eine Auftrennung der Fragmente in der Gelmatrix nach ihrer Größe erfolgt. Für analytische Zwecke wurden die Agarosegele nach Beendigung des Laufs in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) angefärbt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Exposition bei 260 nm mit Hilfe eines Videosystems (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad). Für präparative Zwecke wurden die Agarosegele nach erfolgter Auftrennung mit einer 0,1%-igen Methylenblau-Lösung (1 g/l Methylenblau) angefärbt. Nach Entfärben des Gels mit Wasser konnten die blau angefärbten DNA-Fragmente auf einem Durchlichttisch ausgeschnitten werden.

2.2.2.16 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

In Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden durch Methylenblau-Färbung sichtbar gemacht und ausgeschnitten (siehe 2.2.2.15). Die Extraktion der

DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* nach Herstellerangaben (GE Healthcare). Die Elution der an die Säule gebundenen DNA erfolgte durch Zugabe von 30-50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

2.2.2.17 DNA-Aufreinigung aus enzymatischen Reaktionen

Zur Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen wurde das *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von GE Healthcare nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Elution der an die Säule gebundenen DNA erfolgte durch Zugabe von 30-50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

2.2.2.18 Proteinextraktion aus Nukleinsäure-haltigen Lösungen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Als Phenol-Chloroform-Extraktion wird eine biochemische Extraktionsmethode bezeichnet, welche in der Molekularbiologie für die Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren eingesetzt wird. Das Verfahren beruht auf den unterschiedlichen Löslichkeiten der zu extrahierenden Substanzen in einer zweiphasigen Emulsion (Chomczynski and Sacchi, 1987). Die Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA-Lösungen diente der Entfernung von im nächsten Schritt möglicherweise störenden Proteinen und Enzymen. Für die Trennung wurde die DNA-enhaltende Lösung auf 200 μl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgefüllt und mit 300 μl eines 4°C kalten Phenol-Chloroform-Gemischs (1:1) versetzt. Die Lösung wurde kurz auf dem Vortexer gemischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurde erneut gevortext und anschließend 10 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Es bildet sich ein Zwei-Phasen-System. Proteine sammeln sich in der unteren, organischen Phase, während die Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase gelöst sind. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde die in 2.2.2.19 beschriebene saure Ethanol-fällung durchgeführt.

2.2.2.19 Saure Ethanol-fällung

Die Aufkonzentrierung und Entsalzung von DNA-enhaltenden Lösungen erfolgten mit Hilfe der Ethanol-fällung. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und dem 2,5-fachen Volumen 96%igem Ethanol

versetzt und 20 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen.

2.2.2.20 Restriktion von dsDNA

Für präparative und analytische Zwecke wurden Restriktionen gemäß den Angaben der Hersteller der Restriktionsenzyme (Roche bzw. NEB, Schwalbach) nach Maniatis *et al.* (1982) durchgeführt und entsprechende Puffer- und Inkubationsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme gewählt. Bei Restriktionen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigen, wurde zwischen den Restriktionen eine Aufreinigung der DNA mit dem *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* durchgeführt (siehe 2.2.2.17). Analytische Plasmid-DNA-Restriktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 10 μl . Es wurden etwa 2-5 U der entsprechenden Enzyme zur Hydrolyse von ca. 0,1-0,5 μg DNA bei 37°C für ca. 1,5 h eingesetzt. Präparative Restriktionen wurden in einem Volumen von 40-50 μl durchgeführt. Dabei wurde entsprechend mehr Enzym (10-15 U) eingesetzt sowie die Inkubationszeit auf mindestens 4 h verlängert, um eine möglichst vollständige Restriktion der DNA zu erreichen. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch Zugabe von GEBS ($\frac{1}{4}$ des Ansatzvolumens). Die Restriktionen wurden mit Hilfe des *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (siehe 2.2.2.17) aufgereinigt.

2.2.2.21 Dephosphorylierung

Nach der Restriktion von Vektor-DNA mit nur einem Restriktionsenzym wurde diese durch die Alkalische Phosphatase (SAP; *shrimp alkaline phosphatase*) dephosphoryliert, um die Religationsrate des Vektors zu verhindern, bzw. zu reduzieren. Hierzu wurde der Restriktionsansatz direkt mit 1:10 SAP-Puffer und 1 U/ μg DNA SAP versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung dephosphorylierter Vektoren wurde mit dem *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* entweder direkt oder nach erfolgter präparativer Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

2.2.2.22 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden in einem Gesamtvolumen von 12 µl durchgeführt, wobei 1,2 µl 10 x Ligationspuffer und 0,8 µl T4-DNA-Ligase (Roche Applied Science) eingesetzt wurden. Das Volumen des geschnittenen Vektors sowie des zu inserierenden DNA-Fragmentes wurde entsprechend der jeweiligen DNA-Konzentration angepasst, wobei ein Verhältnis von 1:3 (Vektor:DNA-Fragment) angestrebt wurde. Die Inkubation erfolgte entweder 4 h bei 16°C oder über Nacht bei 4°C. Für die nachfolgende Transformation in *E. coli* wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.2.2.23 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg, D) und GATC (Kempten, D) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden entweder von der jeweiligen Firma angebotene Standardprimer oder für die entsprechende DNA-Sequenz spezifische Oligonukleotide gewählt. Zur Auswertung der Sequenzen wurde das Programm DNAMAN (Lynnon Software) und ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) eingesetzt.

2.2.2.24 Generierung Marker-freier *H. pylori* Deletionsmutanten mit Hilfe einer Kontraselektionsmethode (Dailidienne *et al.* 2006)

Zur Herstellung Selektionsmarker-freier Deletionsmutanten wurde die Kontraselektionsstrategie nach Dailidienne *et al.* (2006) eingesetzt. Diese Methode beruht auf der dominanten Funktion des, in der *rpsL-erm*-Kassette vorhandenen *rpsL*-Wildtyp-Gens, welches aus *Campylobacter jejuni* stammt. In einem Streptomycin-resistenten *H. pylori* Stamm, welcher eine Punktmutation im chromosomal kodierten *rpsL*-Gen trägt ist somit nach Transformation der *rpsL-erm*-Kassette eine Selektion auf Erythromycin-Resistenz und Streptomycin-Sensitivität möglich. Nach der Deletion des gewünschten Gens bzw. Genabschnittes kann die Resistenzkassette durch Transformation mit einem Plasmid, welches nur die flankierenden Bereiche des untersuchten Locus enthält und Selektion auf Streptomycin-Resistenz und Erythromycin-Sensitivität entfernt werden. Bei allen Klonierungen wurden 1000-2000 bp große, flankierende Bereiche stromauf- („A-Teil“) und stromabwärts („B-Teil“) des zu deletierenden bzw. komplementierenden Genabschnittes mit spezifischen

Oligonukleotiden und der genomischen DNA von *H. pylori* P12 als Template amplifiziert und in den Vektor pBluescript II SK+ inseriert. Diese Plasmide konnten gleich zur späteren Entfernung der Resistenzkassette aus dem Chromosom eingesetzt werden. Zur Deletion der Genabschnitte bzw. Insertion der *rpsL-erm*-Kassette wurde in den die flankierenden Bereiche enthaltenden pBluescript-Vektor die *rpsL-erm*-Kassette kloniert. Die Transformation von *H. pylori* P12str mit den Deletionsplasmiden erfolgte wie unter 2.2.2.8 beschrieben. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausbringen auf Selektiv-GC-Agarplatten mit 10 µg/ml Erythromycin. Streptomycin-Sensitivität der Transformanten deutete bereits eine erfolgreiche Deletion an, welche mit spezifischen Oligonukleotiden und PCR bestätigt wurde. Zum Entfernen der Resistenzkassette wurden die Streptomycin-sensitiven, Erythromycin-resistenten Transformanten mit dem, nur die flankierenden Bereiche enthaltenden Plasmid transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Selektiv-GC-Agarplatten mit 250 µg/ml Streptomycin. Deletionsmutanten ohne Resistenzkassette waren somit wieder Streptomycin-resistent und Erythromycin-sensitiv. Die Deletion bzw. Komplementation der untersuchten Loci wurde durch PCR und Sequenzierung mit spezifischen Oligonuklotiden und der chromosomalen DNA als Template bestätigt.

2.2.2.25 Quantifizierung von extrazellulärer DNA mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz (Invitrogen)

Zur Quantifizierung von DNA im extrazellulären Milieu wurde das kommerziell erhältliche Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz der Firma Invitrogen eingesetzt. Es wurden Kokultivierungsexperimente durchgeführt (siehe 2.2.2.11). Als Donoren wurden der Wildtypstamm SR-P172 und der Stamm SR-P173, welcher die *virB4/topA_{TFS4}* Homologen von Stamm ATCC 43526 enthält, eingesetzt. Als Rezipient diente in beiden Fällen der Stamm SR-P373, welcher die *aphA-3*-Kassette im *moeB*-Locus enthält. Nach Durchführung des Kokultivierungsexperiments wurde das Zellmaterial in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Einhundert µl der Kulturüberstände wurden direkt für die Quantifizierung der DNA eingesetzt. Hierzu wurde der Überstand in 96-Napf-Platten mit lichtdurchlässigem Boden, jedoch lichtundurchlässigen Wänden überführt und mit 100 µl PicoGreen®-Arbeitslösung versetzt. Zur Quantifizierung der DNA wurde eine Standardkurve mit der im Kit enthaltenen Lamda-*HindIII*-DNA, wie vom Hersteller beschrieben angesetzt.

Jeweils 100 µl der Standard-DNA-Lösungen wurden ebenso mit 100 µl PicoGreen®-Arbeitslösung versetzt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach 5minütiger Inkubation bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Mit Hilfe der Standardkurve wurde der DNA-Gehalt der Kulturüberstände ermittelt und anschließend auf den Gesamtproteingehalt des Konjugationsansatzes normalisiert. Dieser wurde nach Lyse der Zellen nach Bradford (1976) ermittelt (siehe 2.2.3.2 und 2.2.3.3).

2.2.3 Biochemische und analytische Methoden

2.2.3.1 Herstellung bakterieller Zelllysate

Zur Herstellung von Lysaten wurden Bakterien in 1 x PBS resuspendiert und mit 2 x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM DTT; 2% (w/v) SDS; 10% (w/v) Glycerin; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die Zelllysate wurden vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamid-Gel für 10 min bei 96°C gekocht und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen.

2.2.3.2 Lyse von Zellmaterial zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts

Zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts einer Probe wurde das Zellmaterial durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt und mit entsprechendem Volumen RIPA-Puffer versetzt. Dem Lysepuffer wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt, um den Abbau der Proteine zu verhindern. Die Lyse erfolgte im Ultraschall-H₂O-Bad bei 4°C für ca. 45 min. Entsprechende Verdünnungen des Lysats wurden für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford eingesetzt (siehe 2.2.3.3).

RIPA	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,25% (w/v) Natriumdeoxylat
RIPA*	RIPA + Proteaseinhibitoren: 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Konzentration zytosolischer Proteine wurde mit Hilfe der Methode von Bradford unter Verwendung von BSA als Standard bestimmt (Bradford, 1976). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 100 µl einer gegebenenfalls verdünnten Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 5% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Phosphorsäure (85%ig)) versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm gegen das Bradfordreagenz als Blindwert. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen aufgenommen.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe und unabhängig von ihrer Ladung wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-Protein IIITM von BioRad durchgeführt. Trenn- und Sammelgele wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt. Je nach Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurden 6%-12%ige Trenngele eingesetzt, während die Konzentration des Sammelgels stets 5% betrug. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 2-15 µl. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100-120 V. Durch Mitführen von Molekulargewichtsstandards wie LMW (*low molecular weight*) (Biorad, München) oder der *Prestained Protein Ladder* #SM0671 (Fermentas, St. Leon-Roth) konnte nach Färbung der Gele die Molekülmasse der aufgetrennten Proteine abgeschätzt werden. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend vom Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.2.3.6) oder mit einer Coomassie-Lösung (siehe 2.2.3.5) angefärbt.

Elektrophoresepuffer	250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 25 mM Tris/HCl pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,0 M Tris/HCl pH 6,8

2.2.3.5 Detektion von Proteinen im Polyacrylamid-Gel

Nach elektrophoretischer Auftrennung können Proteine in Polyacrylamidgelen (PAA-Gele) durch Färbung sichtbar gemacht werden. Die Detektion von Proteinen in PAA-Gelen erfolgte mittels Coomassie-Färbung (Marshall and Williams, 1992). PAA-Gele wurden 20 min in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend so lange in Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

Coomassie-Färbelösung	0,275% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Ethanol, 7,5% (v/v) Essigsäure

2.2.3.6 Western Blot-Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Übertragung der durch SDS-PAGE im PAA-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran erfolgte in einem *semi-dry* Blotsystem durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld (Towbin *et al.*, 1992). Auf der Graphitanode wurde ein Stapel aus jeweils zwei dicken und zwei dünnen Filterpapieren, einer PVDF-Membran, dem PAA-Gel und wiederum zwei dünnen und zwei dicken Filterpapieren geschichtet. Die Filterpapiere wurden zuvor in Westerntransferpuffer getränkt. Die Aktivierung der PVDF-Membran erfolgte durch kurze Inkubation in Methanol und nachfolgendes Schwenken in Westerntransferpuffer. Der Proteintransfer erfolgte im Allgemeinen bei 1 mA cm^{-2} für 90 min. Anschließend konnten einzelne Proteine auf den Membranen mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Westerntransferpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol, 0,1% (w/v) SDS (pH = 8,3)
------------------------------	--

2.2.3.7 Immundetektion immobilisierter Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden freie Bindungsstellen auf der Membran für mindestens eine Stunde oder über Nacht abgesättigt. Als Absättigungspuffer wurde entweder TBS/3% BSA oder TBST/5% Magermilchpulver (MMP) eingesetzt. Anschließend wurde das jeweilige Antiserum je

nach Titer 1:1000 bis 1:10000 in TBS/3% BSA oder TBST/1% MMP verdünnt und mindestens zwei Stunden oder über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST wurde die Membran mit einem Konjugat aus Protein A und alkalischer Phosphatase (AP) (Protein A-AP) (1:2500 in TBST) oder einem Peroxidase (POX)-gekoppelten Zweitantikörper (1:10000 in TBST/1% MMP) für 45 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran bei Verwendung von Protein A-AP durch Schwenken in 10 ml Detektionslösung entwickelt und die Farbreaktion anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgestoppt. Zum sensitiveren Nachweis über Chemilumineszenz wurden POX-gekoppelte Zweitantikörper eingesetzt. Dabei erfolgte die Entwicklung mit dem Western LightningTM-Detektionsreagenz von Perkin Elmer Life Science nach Herstellerangaben.

TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5
TBST	TBS, 0,05-0,1% (v/v) Tween
Detektionslösung	0,1 M Tris/HCl pH 9,6, 0,1 g/l NBT, 7 mM MgCl_2 , 50 mg/l BCIP

2.2.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.4.1 Kultivierung von AGS-Zellen

AGS-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C unter 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert und vor Bildung eines konfluenten Rasens verdünnt. Dazu wurde einmal mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL) behandelt. Für mikroskopische Analysen verwendete Zellen wurden mit 2 mM EDTA abgelöst, da eine Behandlung mit Trypsin die Adhärenz an Glasdeckgläschen negativ beeinflusst. Das Ablösen der Zellen nach einigen Minuten wurde mikroskopisch kontrolliert. Zur Inaktivierung von Trypsin-EDTA-Lösung bzw. EDTA wurden 5 ml RPMI-Medium mit 10% FCS eingesetzt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche bzw. in eine 6- oder 12-Napfplatte mit frischem Medium umgesetzt.

2.2.4.2 Transfektion von AGS-Zellen

Zur Transfektion von Plasmiden in AGS-Zellen wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamine*TM 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Transfektion wurde mit AGS-Zellen durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Transfektion 30-40% konfluent waren. Es wurden 500 ng Kontroll-DNA bzw. 1 µg Ziel-DNA transfiziert. Die Effizienz wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Für die Untersuchung des Effekts der Expression von *orf4M* und *orf12M* in eukaryotischen Zellen wurde eine Zeitreihe durchgeführt und jeweils 8, 10 und 12 Stunden nach der Transfektion eine Fixierung und Färbung der Zellen durchgeführt (siehe 2.2.5). Zudem wurde die Produktion des Fusionsproteins biochemisch im α -GFP-Westernblot überprüft (siehe 2.2.3.7).

2.2.4.3 Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori*

Die Infektion von AGS-Zellen mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen erfolgte mit ca. 1×10^6 AGS-Zellen (MOI=100). Für anschließende Mikroskopie-Experimente wurde die Zellkulturschale mit Deckgläschen bestückt. Für die Infektion der AGS-Zellen wurde das Medium gewechselt, das *H. pylori*-Zellmaterial in RPMI-Medium mit 10% FCS resuspendiert und eine optische Dichte $OD_{550} = 0,1$ in 2 ml RPMI + 10% FCS eingestellt. Die Infektion wurde für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Fixierung und Färbung der Präparate wie unter 2.2.5 beschrieben bzw. die Quantifizierung des Anteils toter Zellen in der AGS-Population durchgeführt (siehe 2.2.4.4).

2.2.4.4 Quantifizierung des Anteils toter AGS-Zellen in einer Population durch Propidiumjodid-Färbung und Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Quantifizierung von toten Zellen in einer Population wurde eine Propidiumjodid-Lösung (PI) eingesetzt (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Propidiumjodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Er wird von lebenden Zellen ausgeschlossen, kann aber die Zellmembran von toten Zellen durchqueren. Die Bestimmung der toten AGS-Zellen in einer Population erfolgte nach der Transfektion der Plasmide pEGFP_*orf4M* und pEGFP_*orf12M* und 8-stündiger Expression von *orf4M* und *orf12M* und nach 5-

stündiger Kokultivierung von AGS-Zellen mit verschiedenen *H. pylori*-Mutanten. Hierzu wurden die Zellen aus dem Kulturüberstand bei 200 x g für 10 min bei 4°C geerntet, da sich tote, normalerweise adhärenz AGS-Zellen von der Kulturschale ablösen. Zum Ablösen der noch adhärenz Zellen wurde jedes 6-well mit 500 µl TE versetzt und für 2 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zum Abstoppen der Aktivität von TE wurden anschließend 500 µl RPMI + 10% FCS zugegeben, die abgelösten Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 200 x g für 10 min bei 4°C geerntet. Das Zellmaterial aus dem Kulturüberstand und die abgelösten Zellen wurden entweder in 100 µl 1 x PBS oder in 100 µl PI-Lösung (1:100 in 1 x PBS) resuspendiert, vereinigt und sofort durch Anregung mit dem 488 nm Laser (Pycoerythrin-Kanal) im Durchflusszytometer (BD FACS Canto II; BD Bioscience, Heidelberg) gemessen. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden alle Zellen und Infektionsansätze auch ungefärbt im Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrolle und zur Definition der verschiedenen Populationen wurden nicht transfizierte, lebende und durch 1minütiges Vortexen getötete AGS-Zellen ungefärbt und PI-gefärbt im Durchflusszytometer gemessen. Es wurden standardmäßig 10000 Zellen gezählt. Die Hauptpopulation wurde mit Hilfe des Größen- (FCS) und des Granularitätsparameters (SSC) im Punktwolkendiagramm festgelegt.

2.2.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden Deckgläschen in 6-, 12- oder 24-Napfschalen ausgebracht und die gewünschte Zellmenge darauf verteilt. Nach erfolgter Transfektion oder Infektion wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläschen mit 1 x PBS gewaschen und das Präparat mit 1%-PFA-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur bzw. 20 min bei 37°C fixiert. Nach der Fixierung wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 1 x PBS mit 10% FCS über Nacht bei 4°C oder 1 h bei 37°C blockiert. Nach dem Absättigen der freien Bindungsstellen wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen und zur Färbung des Aktin-Zytoskeletts TritC-markiertes Phalloidin in 1 x PBS mit 10% FCS zugegeben und für 1 h bei RT unter Lichtabschluss inkubiert. Zur Färbung von *H. pylori*-Zellen wurde mit dem Antikörper AK175 (1:1000-Verdünnung in 1 x PBS + 10% FCS) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurde der zweite Antikörper mit dem Fluorophor, in diesem Fall α -Kaninchen IgG-Alexa488, in einer 1:2500-Verdünnung eingesetzt und

für 1 h bei RT in 1 x PBS + 10% FCS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurde eine Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (1:1000; 1 min) durchgeführt. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Präparate luftdicht in Fluoprep® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) eingebettet und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Mikroskopie wurde an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica SP5) durchgeführt. Zur Anregung der Fluorophore wurden Laser der Wellenlänge 488 nm und 561 nm verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels LAS AF (Leica) und Adobe Photoshop.

2.2.6 Statistische Auswertung

Alle Werte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bestimmt und ist für das entsprechende Experiment angegeben. Die Werte sind normalverteilt. Signifikanz-Werte von $(p) \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des Transfers der kryptischen Plasmide von *H. pylori*

Etwa 50% aller klinischen *H. pylori* Isolate tragen kryptische Plasmide. Die Funktion dieser Plasmide ist noch nicht bekannt. Bei den in dieser Arbeit untersuchten intrinsischen Plasmiden handelt es sich um das Plasmid pHel4 aus *H. pylori* P8 und um das Plasmid pHel12, welches natürlicherweise in *H. pylori* P12 vorkommt. Die bei deren Nukleotidsequenzanalyse identifizierte *mob*-Region lässt die Vermutung zu, dass sie durch einen konjugativen Mechanismus zwischen *H. pylori*-Stämmen transferiert werden.

3.1.1 Sequenzvergleich der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12

Die Nukleotidsequenzen der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 zeigen eine Sequenzähnlichkeit von ca. 80% (Sequenzalignment mit Hilfe von ClustalW; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin/clustalw2>; Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1). Beide Plasmide beinhalten eine Region, welche zum *mccC7*-Gencluster von *E. coli* homolog ist (Hofreuter *et al.*, 2002). *Orf4A* in pHel4 und *orf01* in pHel12, welche zu *mccC* homolog sind, zeigen eine 95%ige Identität. Die zu *mccB* homologen Gene *orf4B* und *orf02* sind ebenfalls zu 95% identisch. *Orf4C* und *orf04* kodieren für eine putative Relaxase und zeigen eine Sequenzidentität von 91%. Die für die jeweilige Replikase RepA kodierenden Gene *orfI* und *orf10* zeigen eine Identität von 87%. Innerhalb der Gene *orf4M* und *orf11* (*orf12M*), welche zu 98% identisch sind, konnte eine sogenannte Fic-Domäne identifiziert werden (siehe 3.5.3). Die weiteren in pHel4 kodierten Gene *orf4J*, *orf4K*, *orf4L*, *orf4N* und *orf4O* sind hypothetische Gene, die keine Homologen in pHel12 haben. Eine Übersicht der Nukleotidsequenz-Identität zwischen den Genen von pHel4 und pHel12 und die vermutete Funktion der einzelnen Genprodukte zeigt Tabelle 3.1. In Abbildung 3.1 ist die Zusammensetzung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 graphisch dargestellt. Dadurch wird die Ähnlichkeit der beiden Plasmide deutlich.

Tabelle 3.1: Vergleich der ORFs von pHel4 und pHel12 bzgl. ihrer Sequenzidentität und ihrer vermuteten Funktion.

pHel4 kodierte ORFs	pHel12 kodierte ORFs	Sequenzidentität zwischen pHel4 und pHel12 ORFs	Vermutete Funktion
pHel4	pHel12	80%	
<i>orf4A</i>	<i>orf01</i>	95%	Homolog zum <i>mccC7</i> -Gencluster von <i>E. coli</i>
<i>orf4B</i>	<i>orf02</i>	95%	
<i>orf4X</i>	<i>orf03</i>		
<i>orf4C</i>	<i>orf04</i>	91%	Relaxase <i>mob</i> -Region
<i>orf4D</i>	<i>orf05</i>	90%	
<i>orf4E</i>	<i>orf06</i>	88%	
<i>orf4F</i>	<i>orf07</i>	96%	
<i>orf4G</i>	<i>orf08</i>	50%	Putatives Antitoxin
<i>orf4H</i>	<i>orf09</i>	66%	Putatives Toxin
<i>orf4I</i>	<i>orf10</i>	87%	Replikase
<i>orf4J</i>	-		Hypothetische Proteine
<i>orf4K</i>	-		
<i>orf4L</i>	-		
<i>orf4M</i>	<i>orf11</i>	98%	Fic-Domäne enthaltendes Protein
<i>orf4N</i>	-		Hypothetische Proteine
<i>orf4O</i>	-		

3.1.2 Insertion eines Selektionsmarkers in pHel4 und pHel12

Um den Transfer der Plasmide pHel4 und pHel12 zwischen *H. pylori*-Stämmen in anschließenden Kokultivierungsexperimenten sichtbar zu machen, wurde die *cat_{GC}*-Kassette (Cam^R) aus pWS48 als Selektionsmarker in das entsprechende Plasmid über homologe Rekombination inseriert. Im Fall von pHel4 wurde diese stromabwärts von *orf4B* mit Hilfe des Plasmids pCH3c, welches flankierende Bereiche zur homologen Rekombination in pHel4 und die *cat_{GC}*-Kassette enthält, eingesetzt (pHel4 [*mccA::cat*]; Abb. 3.1 A). Hierbei bleibt die *mob*-Region des Plasmids intakt. Für die Insertion der *cat_{GC}*-Kassette in pHel12 wurde ein in der Klonbank, welche im Zuge der Sequenzierung von *H. pylori* P12 angelegt wurde (Fischer *et. al.* 2010), vorhandenes Plasmid eingesetzt (Klon 2kb_02_N15). Dieses enthält flankierende Bereiche aus

pHel12, welche nach erfolgreicher homologer Rekombination zur Insertion der Resistenzkassette stromabwärts von *orf11* und stromaufwärts von *orf01* führen (pHel12::*cat*; siehe Abbildung 3.1 B).

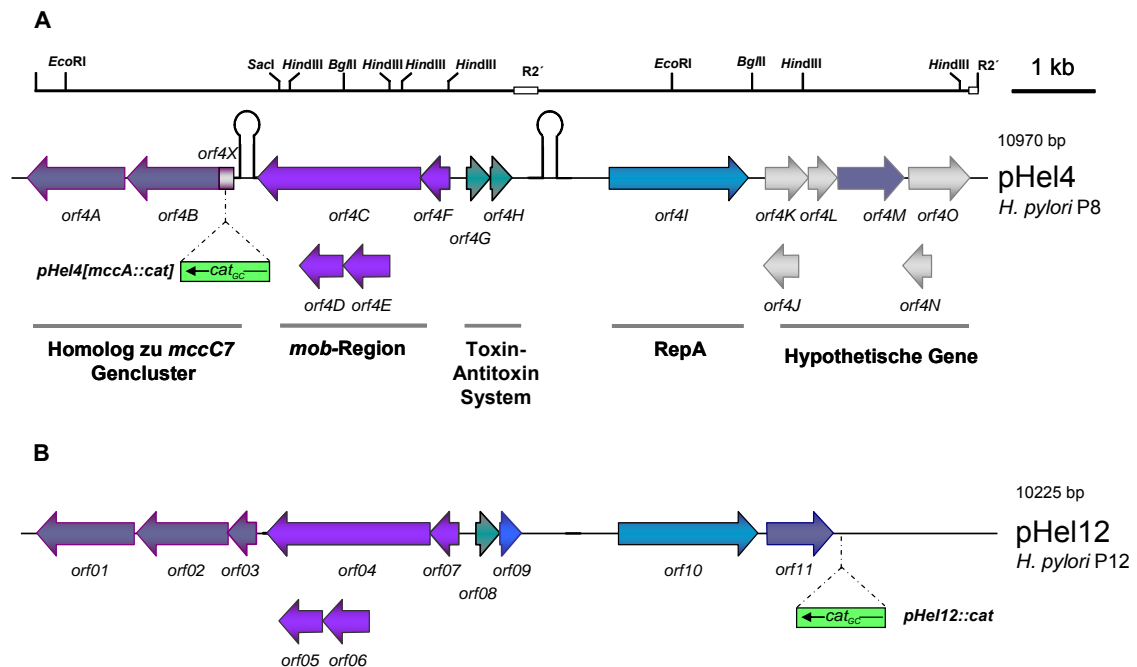


Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12.

Die graphische Darstellung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 macht die Homologien zwischen den beiden Plasmiden deutlich. Beide Plasmide kodieren für eine Region, welche zum *mccC7*-Gencluster von *E. coli* homolog ist (*orf4A, B, X* bzw. *orf01, 02, 03*). Die aus *orf4C-F* bzw. *orf04-orf07* bestehende *mob*-Region ist möglicherweise für die Mobilisierung der Plasmide verantwortlich. *Orf4G* und *orf4H* bzw. *orf08* und *orf09* zeigen Sequenzhomologien zu einem Toxin-Antitoxin-System. Die Replikase wird durch *orf4I* bzw. *orf10* kodiert. Des Weiteren konnte sowohl in *orf4M*, als auch in *orf11* eine Fic-Domäne identifiziert werden. Grau dargestellte *orfs* sind hypothetische Gene. Dargestellt sind die Orte der Insertion der *cat_{GC}*-Resistenzkassette (grün) in pHel4 (A) und pHel12 (B). Eine Insertion in der Microcin-Region im Falle von pHel4 sollte ebenso wie die Insertion der *cat_{GC}*-Kassette zwischen *orf01* und *orf11* in pHel12 die Fähigkeit zur konjugativen Übertragung der Plasmide nicht beeinflussen.

Hierfür wurde eine inverse PCR des Plasmids aus Klon 2kb_02_N15 mit den Oligonukleotiden SR53 und SR54 durchgeführt. Die Resistenzkassette *cat_{GC}* wurde mit Hilfe der über die Oligonukleotide eingefügten *Bam*HI-Schnittstellen inseriert (pSR28). Nach Transformation des Plasmids pSR28 in *H. pylori* P12 und erfolgreicher homologer Rekombination wurde die Insertion der *cat_{GC}*-Kassette in einer spezifischen PCR und anschließender Sequenzierung mit den Oligonukleotiden SR57 und SR58 bestätigt. Durch die Insertion der *cat_{GC}*-Kassette in die kryptischen Plasmide pHel4 und

pHel12 konnte deren Transfer vom Donor in den Rezipienten in Kokultivierungsexperimenten verfolgt werden.

3.1.3 Durchführung von Kokultivierungsexperimenten zur Charakterisierung des DNA-Transfer-Mechanismus

H. pylori ist natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990). Diese Fähigkeit wird durch das ComB-Typ-IV-Sekretionssystem vermittelt (Hofreuter *et al.*, 1998; Hofreuter *et al.*, 2001). Zur Bearbeitung der Fragestellung, ob Plasmid-DNA auch in einem DNaseI-geschützten, konjugativen Mechanismus zwischen Stämmen transferiert wird, ist deshalb eine Abgrenzung der beiden DNA-Aufnahmemechanismen Transformation und Konjugation erforderlich.

Der Nachweis des DNA-Transfers zwischen *H. pylori*-Stämmen erfolgte mit Hilfe von Kokultivierungsexperimenten auf Serumagarplatten (siehe 2.2.2.11). Als Rezipient wurde entweder *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*] (SR-P373) eingesetzt, welcher aufgrund einer chromosomal kodierten *aphA-3*-Kassette gegen Kanamycin resistent ist oder *H. pylori* P12 *str* (SR-P43), welcher aufgrund einer Punktmutation im *rpsL*-Gen (*rpsL**) Streptomycin-resistent ist (*str*). Die *aphA-3*-Kassette wurde mit dem Plasmid pSR20 in den *moeB*-Locus (*hp0755*) inseriert. Der *moeB*-Locus wurde zur Insertion der Resistenzkassette ausgewählt, da in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, dass dieser *in vivo* nicht essentiell ist (Kavermann *et al.*, 2003). Der Transfer der intrinsischen Plasmide pHel4 bzw. pHel12 der Donorstämme *H. pylori* P8 bzw. P12 konnte aufgrund einer inserierten *cat_{GC}*-Kassette (pHel4 [*mccC::cat*] bzw. pHel12::*cat*) verfolgt werden (siehe 3.1.2). Die Selektion der Transkonjuganten und der Nachweis des Transfers von Plasmid-DNA waren somit durch Doppelselektion auf Chloramphenicol und Kanamycin bzw. Streptomycin möglich. Um bidirektionalen DNA-Transfer zu verhindern, wurde bei allen als Donor eingesetzten Stämmen das Gen *recA* durch Transformation mit dem Plasmid pDH29 (Schmitt *et al.*, 1995) deletiert und durch eine Erythromycin-Kassette ersetzt ($\Delta recA::erm$). RecA spielt eine wichtige Rolle für die homologe Rekombination. Die Deletion von *recA* stellte somit sicher, dass es sich bei den Transkonjuganten um Abkömmlinge des Rezipienten handelt und der Transfer von DNA nur in eine Richtung, nämlich vom Donor in den Rezipienten stattfindet. Die Deletion von *recA* wurde für alle als Donoren eingesetzten Stämme im Western Blot mit dem Antikörper AK263 (α -RecA) überprüft. Kokultivierungen der

entsprechenden Donor- und Rezipientenstämme wurden immer in An- und in Abwesenheit von extrazellulärer DNaseI durchgeführt. Die Anwesenheit der DNaseI in den Experimenten stellte sicher, dass die im extrazellulären Milieu befindliche, zur natürlichen Transformation verfügbare DNA abgebaut wurde. Auf diese Weise wurde eine Differenzierung zwischen DNaseI-sensitivem und DNaseI-resistentem Transfer, und somit eine Abgrenzung der DNA-Aufnahme durch natürliche Transformation und durch Konjugation ermöglicht (Kuipers *et al.*, 1998). Zur Bestimmung der Plasmidtransferrate wurden die CFU/ml und die Anzahl der Transkonjuganten ermittelt und logarithmisch dargestellt. Abbildung 3.2 zeigt ein Schema des Versuchsablaufs der Kokultivierungsexperimente.

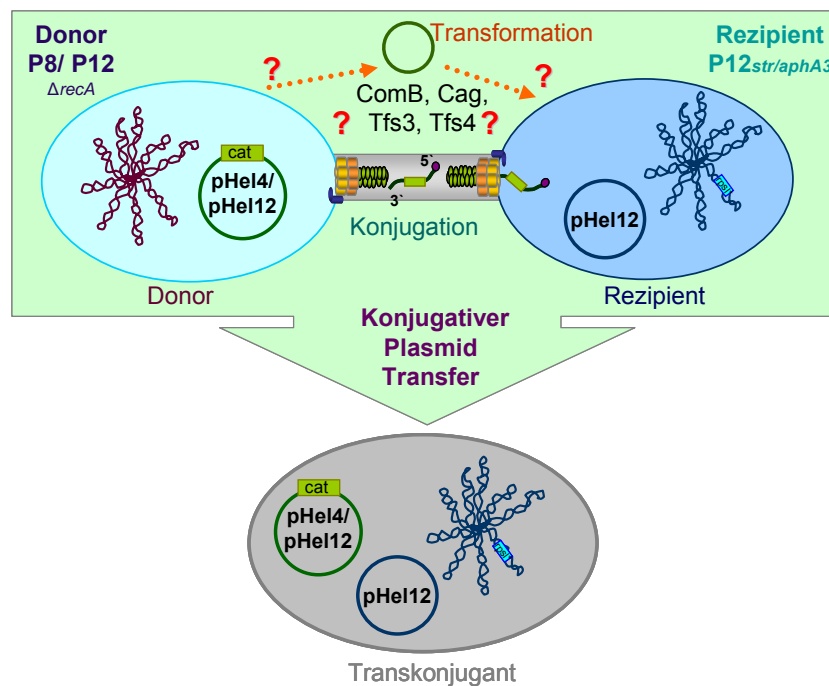


Abbildung 3.2: Versuchsablauf der Kokultivierungsexperimente.

Der Transfer der Plasmide pHel4 [*mccC::cat*] bzw. pHel12::*cat* aus *H. pylori* P8 bzw. *H. pylori* P12 konnte aufgrund einer inserierten Chloramphenicolkassette (*cat*) verfolgt werden. Bei allen Donorstämmen wurde der *recA*-Locus deletiert und gegen eine *erm*-Kassette ersetzt, um DNA-Transfer vom Rezipienten in den Donor zu verhindern. Als Rezipient wurde *H. pylori* P12 eingesetzt, welcher entweder aufgrund einer im *moeB*-Locus inserierten *aphA-3*-Kassette gegen Kanamycin, oder aufgrund einer Punktmutation im *rpsL*-Locus (*rpsL*^{*}) gegen Streptomycin resistent ist. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Chloramphenicol und Kanamycin bzw. Streptomycin.

3.1.4 Die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 werden sowohl durch Transformation, also auch in einem konjugativen Mechanismus zwischen *H. pylori*-Stämmen transferiert

Die Durchführung der Kokultivierungsexperimente, bei denen *H. pylori* P12 als Rezipient und *H. pylori* P8 oder P12 als Donor eingesetzt wurden, zeigte, dass der Transfer der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von extrazellulärer DNaseI stattfindet. Die Zugabe von DNaseI führte zur Reduzierung der Plasmidtransferrate um etwa eine Zehnerpotenz im Fall des Transfers von pHel4 und um ca. zwei Zehnerpotenzen im Fall des Transfers von pHel12. Frei vorliegende Plasmid-DNA wird durch DNaseI zerstört und somit ihre Aufnahme durch natürliche Transformation verhindert (siehe Abbildung 3.3).

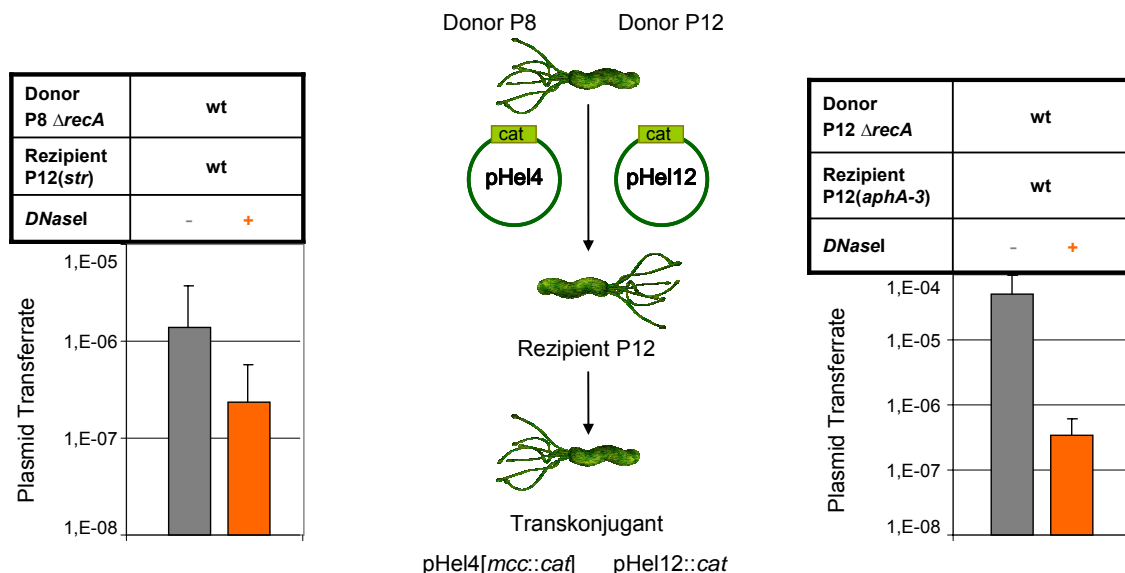


Abbildung 3.3: Transfer der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12.

Der Transfer der kryptischen Plasmide pHel4 [mcc::cat] und pHel12::cat aus den Donorstämmen *H. pylori* P8 bzw. P12 in den Rezipienten *H. pylori* P12 str bzw. P12 [moeB::aphA-3] wurde sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (□) von DNaseI verfolgt. Die Kokultivierungsexperimente wurden jeweils mindestens dreimal durchgeführt und die Plasmidtransferrate (Anzahl Transkonjuganten/CFU pro ml) ermittelt. Die Ergebnisse sind logarithmisch dargestellt und mit Standardabweichung angegeben.

Es war jedoch auch in Anwesenheit von DNaseI DNA-Transfer nachweisbar. Sowohl der *H. pylori* Stamm P8, als auch P12 sind in der Lage intrinsische Plasmid-DNA in den Rezipienten P12 zu übertragen, wobei eine geringere Transferrate des

Plasmids pHel4 von P8 in den Stamm P12 zu beobachten ist (Abbildung 3.3). Gründe hierfür könnten Inkompatibilitätsprobleme oder Restriktionsbarrieren sein.

Zur Verifizierung des Plasmidtransfers in den Rezipienten wurde die Plasmid-DNA aus den jeweiligen Donorstämmen und Transkonjuganten isoliert (Abbildung 3.4 A und B). Die Anwesenheit der Donorplasmide in den Transkonjuganten konnte bestätigt werden (Abbildung 3.4 B). Des Weiteren wurden die Transkonjuganten durch RAPD-Fingerprinting mit dem Oligonukleotid D9355 ihrer Abstammung zugeordnet (Abbildung 3.4 C) (Akopyanz *et al.*, 1992b).

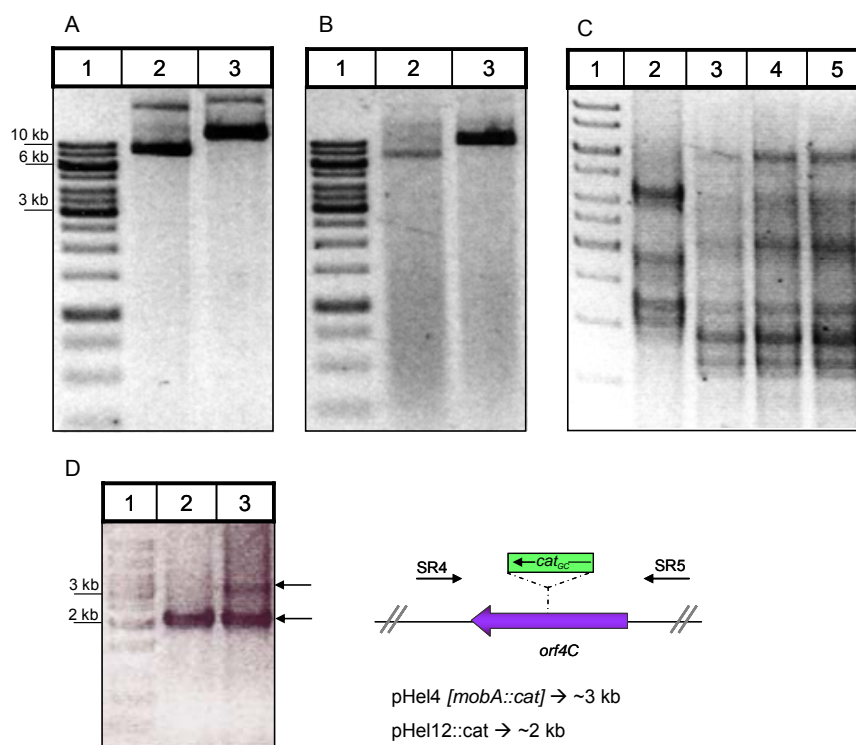


Abbildung 3.4: Nachweis des unidirektionalen Plasmid-Transfers vom Donor in den Rezipienten.

A: In Kokultivierungsexperimenten wurden als Donorstämme die das Plasmid pHel4::*mccC::cat* (Spur 2) und pHel4 [*mobA::cat*] (Spur 3) enthaltenden Stämme SR-P4 und SR-P5 eingesetzt.

B: Nach der Kokultivierung der Stämme SR-P4 und SR-P5 mit dem Rezipienten P12*str*, wurde aus den Transkonjuganten Plasmid-DNA isoliert und die Anwesenheit des Donorplasmids bestätigt. Spur 2 zeigt das Plasmid pHel4::*mccC::cat*, Spur 3 das Plasmid pHel4 [*mobA::cat*].

C: Zur Bestätigung der Abstammung der Transkonjuganten vom Rezipienten wurde eine RAPD-PCR mit dem Oligonukleotid D9355 durchgeführt. Spur 2 zeigt das Muster des Donors P8, Spur 3 das Muster des Rezipienten P12. Die Muster der untersuchten Transkonjuganten (Spur 4-5) konnten eindeutig dem Rezipienten zugeordnet werden.

D: Zur Bestätigung der Anwesenheit beider Plasmide in den Transkonjuganten wurde eine spezifische PCR mit den Oligonukleotiden SR4 und SR5 durchgeführt. Diese liefert ein ca. 2kb großes Fragment für pHel4::*mccC::cat* und pHel12 und ein ca. 3 kb. großes Fragment für pHel4 [*mobA::cat*]. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Das Muster der RAPD-PCR der Transkonjuganten (Spur 4 und 5) konnte eindeutig dem Rezipienten (Spur 3) zugeordnet und vom Donor (Spur 2) abgegrenzt werden (Abbildung 3.4 C). Eine PCR mit den Oligonukleotiden SR4 und SR5 wurde durchgeführt, um die Anwesenheit des Donorplasmids in den Transkonjuganten zu bestätigen (siehe Abbildung 3.4 D). Diese liefert im Falle von pHel4::*mccC::cat*] und pHel12 ein ca. 2 kb großes, und im Falle von pHel4 [*mobA::cat*] (siehe 3.4.1) ein ca. 3 kb großes PCR-Produkt. Beide PCR-Produkte sind in den Transkonjuganten nachweisbar (Abbildung 3.4 D, Spur 3).

Im Falle des Transfers von pHel4 in *H. pylori* P12 konnte somit gezeigt werden, dass die beiden kryptischen Plasmide nebeneinander vorliegen. Es konnte bestätigt werden, dass der Transfer der Plasmid-DNA unidirektional stattfindet. Eine vollständige Integration in das Chromosom oder eine homologe Rekombination der beiden Plasmide findet nicht statt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Plasmide teilweise miteinander oder mit der genomischen DNA rekombinieren, da die Menge an PCR-Produkt, welches zur Überprüfung der Anwesenheit beider Plasmide im Rezipienten erzeugt wurde, unterschiedlich groß ist (Abbildung 3.4 D, Spur 3). Zudem könnte es aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks und der Inkompatibilität mehrerer Plasmide im Rezipienten zum Verlust oder zur Reduzierung der Kopienzahl eines Plasmids kommen.

Ebenso wurde Plasmid-DNA aus den Transkonjuganten, welche aus dem Kokultivierungsexperiment zwischen *H. pylori* P12-Donor und -Rezipient resultierten, isoliert. Auch hier war keine vollständige Integration der beiden Plasmide nachzuweisen (siehe Abbildung 3.5). Die Plasmide pHel12 und pHel12::*cat* liegen nebeneinander in den Transkonjuganten vor. Abbildung 3.5 A zeigt das isolierte, aufgrund der *cat_{GC}*-Kassette größere Donorplasmid (roter Pfeil) und das Wildtypplasmid pHel12 aus dem Rezipienten (schwarzer Pfeil). RAPD-Fingerprinting war in diesem Falle nicht möglich, da es sich bei Donor und Rezipient um den gleichen Stamm handelt. Zur Bestätigung, dass beide Plasmide im Rezipienten nicht vollständig ineinander integrierten, wurde eine Restriktion mit dem Enzym *Bgl*III durchgeführt. Dieses schneidet einmal in pHel12 und führt zur Linearisierung des Plasmids. In Abbildung 3.5 B ist zu sehen, dass die Restriktion ein ca. 10 kb großes Fragment liefert. Aufgrund der relativ ähnlichen Größe von pHel12 und pHel12::*cat* konnten hier die beiden Plasmide nicht voneinander unterschieden werden. Eine vollständige Integration der beiden Plasmide kann jedoch

ausgeschlossen werden, da das resultierende Fragment nicht der Größe von zwei Plasmiden entspricht. Zudem wurde eine spezifische PCR mit den aus den Transkonjuganten isolierten Plasmiden mit den Oligonukleotiden SR57 und SR58 durchgeführt. Diese binden stromauf- und stromabwärts der Position, an welcher die *cat_{GC}*-Kassette in pHel12::*cat* inseriert wurde. Im Falle einer Insertion der *cat_{GC}*-Kassette liefert die PCR-Reaktion ein ca. 1,3 kb großes Fragment. Ohne *cat_{GC}*-Kassette resultiert ein ca. 400 bp großes Fragment. In den Transkonjuganten waren sowohl das 1,3 kb (roter Pfeil) als auch das ca. 400 bp große Fragment (schwarzer Pfeil) nachweisbar (siehe Abbildung 3.5 C, Spur 3 und 4). Somit konnte bestätigt werden, dass beide Plasmide in den Transkonjuganten anwesend sind. Jedoch ist auch in diesem Fall der Mengenunterschied der PCR-Produkte (Abbildung 3.5 C) und der Plasmide auffällig (Abbildung 3.5 A).

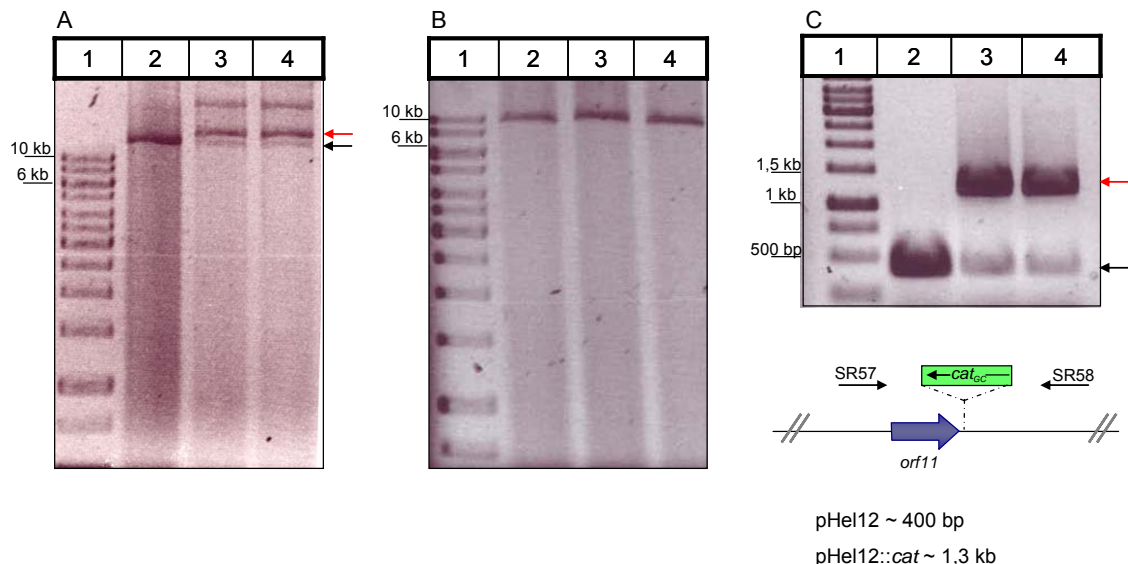


Abbildung 3.5: Nachweis der Plasmide in den Transkonjuganten.

A: Plasmid-Isolierung aus den Transkonjuganten nach Kokultivierung von P12-Stämmen. Nach der Kokultivierung von *H. pylori* P12 pHel12::*cat* mit *H. pylori* P12 [*moeB*::*aphA*-3] wurde Plasmid-DNA aus den Transkonjuganten isoliert. Die Anwesenheit des Donorplasmids pHel12::*cat* (roter Pfeil) und des Rezipienten-Plasmids pHel12 (schwarzer Pfeil) wurde gezeigt (Spur 3 und 4). Spur 1: 1 kB Leiter; Spur 2: pHel12.

B: *Bg*/II-Restriktion der Plasmide pHel12 (Spur 2), und der aus den Transkonjuganten isolierten Plasmide (Spur 3 und 4). Spur 1: 1 kB Leiter

C: Spezifische PCR zum Nachweis des Donor- und Rezipienten-Plasmids in den Transkonjuganten. Zum Nachweis des Donor- und Rezipienten-Plasmids in den Transkonjuganten wurde eine spezifische PCR mit den Oligonukleotiden SR57 und SR58 durchgeführt. Diese lieferte ein ca. 1,3 kb großes Fragment (roter Pfeil) im Falle des Donor- und ein ca. 400 bp großes Fragment (schwarzer Pfeil) im Falle des Rezipienten-Plasmids. Spur 1: 1 kB Leiter; Spur 2: pHel12 als Template; Spur 3 und 4: aus Transkonjuganten isolierte Plasmide als Template.

Somit ist auch hier nicht auszuschließen, dass eine teilweise Integration/Rekombination der Plasmide untereinander bzw. mit der genomischen DNA stattfindet. Außerdem könnte es aufgrund der Inkompatibilität mehrerer Plasmide im Rezipienten zur Verdrängung eines Plasmids kommen. Vor allem der Mengenunterschied der nachgewiesenen PCR-Produkte spricht für einen derartigen Mechanismus, da bei der Verfügbarkeit gleicher Template-Konzentrationen die Amplifikation kleinerer PCR-Produkte effektiver stattfindet. Dass sich die Konzentration der Plasmide in Richtung pHel12::*cat* verschiebt, ist in Abbildung 3.5 A deutlich zu erkennen (roter Pfeil). Da auf dieses Plasmid selektioniert wurde kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Plasmid pHel12 des Rezipienten in geringerer Konzentration als pHel12::*cat* vorliegt und eventuell mit der Zeit verdrängt wurde.

3.1.5 Der Transfer von chromosomalen DNA-Abschnitten erfolgt über Transformation

Neben dem Transfer von Plasmid-DNA wurde der Transfer eines chromosomalen Locus untersucht. Hierbei wurde der Transfer des *rpsL**-Gens, welches Streptomycin-Resistenz vermittelt, in den Kanamycin-resistenten Rezipienten *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*] verfolgt. Als Donor wurde *H. pylori* P12str (SR-P43) eingesetzt. Der Transfer des *rpsL**-Locus konnte nur in Abwesenheit von DNaseI nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass chromosomale Loci nicht über Konjugation, sondern in einem DNaseI-sensitiven Mechanismus, der Transformation, zwischen *H. pylori* P12-Stämmen übertragen werden. Die Transferrate beträgt etwa 10^{-5} (siehe Abbildung 3.6).

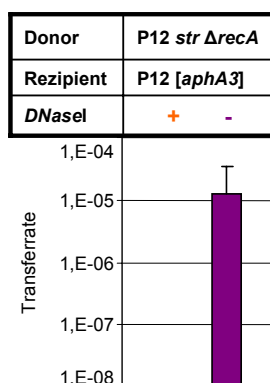


Abbildung 3.6: Transfer des chromosomalen Locus *rpsL**.

Der Transfer des chromosomalen Locus *rpsL** wurde in Kokultivierungsexperimenten in An- und Abwesenheit von DNaseI untersucht. Als Donor wurde der Stamm *H. pylori* P12str Δ recA eingesetzt. Als Rezipient diente *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*]. Die vermittelte Streptomycin-Resistenz ermöglicht eine Selektion der Transkonjuganten auf Kanamycin und Streptomycin. Die Experimente wurden in An (■)- und in Abwesenheit (■) von DNaseI durchgeführt. Die Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt, die Ergebnisse logarithmisch dargestellt und die Standardabweichung ermittelt.

3.2 Generierung markerfreier *H. pylori* P12 Mutanten durch Anwendung einer Kontraselektionsmethode (Dailidienne *et al.*, 2006)

Die Herstellung markerfreier Mutanten ist vor allem bei genetischen Arbeiten mit *H. pylori* von großem Vorteil, da nur eine limitierte Auswahl an Selektionsmarkern zur Verfügung steht. Sie erlaubt die Mutation und Deletion von Genen und Abschnitten im Chromosom, ohne einen Selektionsmarker im veränderten Locus zu hinterlassen. Dies erweist sich bei der Deletion mehrerer Loci im gleichen Stamm von großem Vorteil. Außerdem wird eine Beeinflussung der Expression von Genen, welche stromabwärts des Selektionsmarkers liegen vermieden. Des Weiteren können Allele mit nur geringen Unterschieden, wie z.B. Punktmutationen verglichen und Allele aus verschiedenen Stämmen im gleichen genetischen Hintergrund untersucht werden (Dailidienne *et al.*, 2006).

Die Zwei-Gen-Kassette, die im Rahmen dieser Kontraselektionsstrategie zur Anwendung kam ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die dominante Funktion des *rpsL*-Wildtyp-Gens aus *Campylobacter jejuni* (*rpsL_{Cj}*) in Streptomycin-resistenten Stämmen, welche eine Punktmutation im chromosomal kodierten *rpsL*-Gen tragen (*rpsL*^{*}) und der *erm*-Selektionsmarker ermöglichten die Selektion der Transformanten auf Streptomycin-Sensitivität (Str^S) und Erythromycin-Resistenz (Erm^R). Nach der Deletion des gewünschten Gens bzw. Genabschnitts konnte die Resistenzkassette durch Transformation mit einem Plasmid, welches nur die flankierenden Bereiche des entsprechenden Locus enthielt, und Selektion auf Str^R und Erm^S entfernt werden.

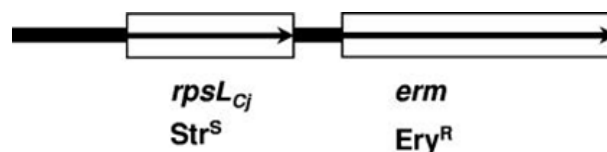


Abbildung 3.7: Die Zwei-Gen-Kassette *rpsL-erm*.

Die *rpsL-erm*-Kassette besteht aus dem Gen *rpsL_{Cj}* aus *C. jejuni* und dem Gen *erm*. Sie vermittelt im Streptomycin-resistenten Hintergrund Streptomycin-Sensitivität und Erythromycin-Resistenz (Dailidienne *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kontraselektionsmethode nach Dailidienne *et al.* (2006) etabliert und für die Deletion und den Austausch von Genen und Genabschnitten im *H. pylori* Stamm P12 eingesetzt. Hierzu wurden die flankierenden

Bereiche der entsprechenden Gene stromauf- und stromabwärts der *rpsL-erm*-Kassette in den Vektor pBluescript II SK+ über spezifische Schnittstellen kloniert. Die Transformation des in *H. pylori* nicht replizierenden Plasmids führte nach erfolgreicher homologer Rekombination der flankierenden Bereiche zur Deletion der entsprechenden Abschnitte im Chromosom und zur Insertion der *rpsL-erm*-Kassette (Str^S und Erm^R ; siehe Abbildung 3.8 A). Zur Entfernung der *rpsL-erm*-Kassette wurde mit einem, nur die flankierenden Bereiche enthaltenden Plasmid transformiert und auf Str^R und Erm^S selektiert (siehe Abbildung 3.8 B). Anders als von Dailidene und Kollegen beschrieben reichte eine Streptomycin-Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht aus und wurde auf 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erhöht. Die markerfreie Mutante konnte anschließend weiteren Deletionen bzw. Insertionen unterzogen werden.

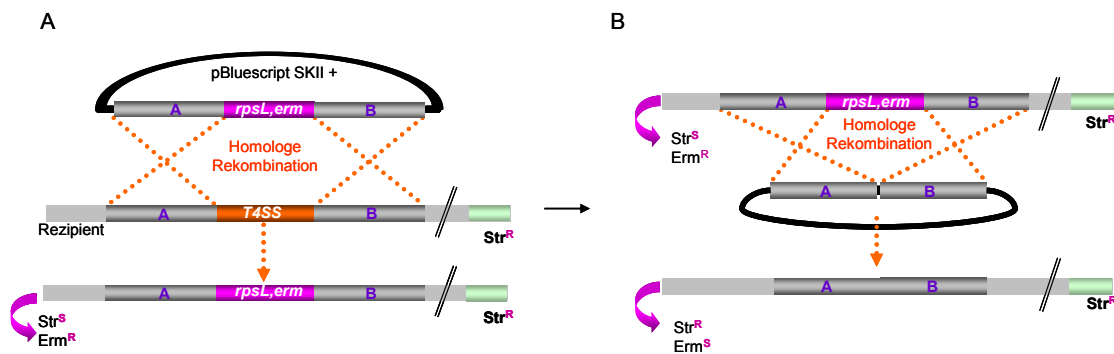


Abbildung 3.8: Ablauf der Deletion von Genen mit Hilfe der *rpsL-erm*-Kassette.

A: Die Transformation von *H. pylori* P12str (*rpsL**; Str^R) mit einem die flankierenden Bereiche A und B eines Gens/mehrerer Gene und die *rpsL-erm*-Kassette enthaltenden, nicht in *H. pylori* replizierenden Plasmid führt zur homologen Rekombination der flankierenden Bereiche, der damit verbundenen Deletion des entsprechenden Abschnitts und zur Insertion der *rpsL-erm*-Kassette in das Chromosom. Die Transformanten können auf Str^S und Erm^R selektiert werden.

B: Zur Entfernung der *rpsL-erm*-Kassette aus dem entsprechenden Locus wird mit einem nur die flankierenden Bereiche A und B enthaltenden Plasmid transformiert und auf Str^R und Erm^S selektiert. Die homologe Rekombination der flankierenden Bereiche und die Selektion auf Str^R und Erm^S führen zur Deletion der *rpsL-erm*-Kassette und resultieren in einer markerfreien Mutante.

3.2.1 Sukzessive Deletion aller Typ-IV-Sekretionssysteme in *H. pylori* P12

Die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 enthalten unter anderem Gene, welche für eine *mob*-Region kodieren (siehe 3.1.1). Innerhalb dieser *mob*-Region befindet sich das Gen für eine putative Relaxase, das Schlüsselenzym der Konjugation. Jedoch ist auf den Plasmiden keine Maschinerie zum Transport der DNA während der Konjugation kodiert. In Frage kommende Kandidaten hierfür sind die chromosomal

kodierten Typ-IV-Sekretionssysteme (T4SS) von *H. pylori*. T4SS stellen zu Konjugationsapparaten verwandte Systeme dar, welche in der Lage sind DNA, DNA-Protein-Komplexe oder Proteine zu transportieren (Alvarez-Martinez and Christie, 2009). In *H. pylori* wurden insgesamt vier chromosomal kodierte T4SS beschrieben (ComB-System, Cag-System, *Tfs3* und *Tfs4*; siehe 1.5), wobei die Vermutung nahe liegt, dass eines davon für den konjugativen Transfer von DNA genutzt wird. Da die Funktion des ComB- und Cag-Systems bereits charakterisiert wurde, wurde zunächst für *Tfs3* bzw. *Tfs4* die eventuelle Beteiligung am konjugativen DNA-Transfer vermutet. Die Funktion des erstmals durch Kersulyte und Kollegen beschriebenen *Tfs3* konnte noch nicht ermittelt werden. Dieses ist innerhalb der Plastizitätsregion 3 (PZ3) im Genom lokalisiert, welche in einem nicht-funktionellen Restriktions-Modifikations-Gen inseriert ist (Kersulyte *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2010). Verwandtschaftsanalysen haben gezeigt, dass *Tfs3* näher mit dem ComB-System als mit dem erst kürzlich identifizierten *Tfs4* verwandt ist (Fischer *et al.*, 2010). Dies könnte eine Beteiligung an der DNA-Aufnahme, und somit eine ähnliche Aufgabe wie die des ComB-Systems vermuten lassen. *Tfs4* ist innerhalb der Plastizitätsregion 1 (PZ1), welche wie die PZ3 in einem nicht-funktionellen Restriktions-Modifikations-Gen inseriert ist, lokalisiert. *Tfs3* und *Tfs4* sind von den bereits beschriebenen T4SS völlig unabhängige Systeme.

Um der Frage nach der Beteiligung der T4SS von *H. pylori* beim DNA-Transfer nachzugehen, wurden nacheinander alle T4SS im Chromosom von *H. pylori* P12 mit Hilfe der Kontraselektionsmethode nach Dailidene *et al.* (2006) deletiert und Kokultivierungsexperimente mit den Mutanten als Donor bzw. Rezipient durchgeführt.

3.2.1.1 Deletion von *Tfs3* und/oder *Tfs4*

Da die Funktion von *Tfs3* und *Tfs4* noch nicht aufgeklärt ist, wurden zunächst Deletionsmutanten hergestellt, bei welchen entweder der für *Tfs3* und/oder *Tfs4* kodierende Bereich im Chromosom deletiert wurde. Um eine funktionelle Komplementation der Deletionen durch homologe Gene innerhalb der anderen T4SS zu vermeiden, wurde der gesamte, für das entsprechende T4SS kodierende Abschnitt im Genom deletiert. Hierzu wurden, wie unter 2.2.2.24 beschrieben die flankierenden Bereiche stromauf- (A) und stromabwärts (B) des zu deletierenden Abschnitts und die *rpsL-erm*-Kassette in den Vektor pBluescript II SK+ kloniert. Die flankierenden Bereiche wurden mit Hilfe der Oligonukleotide SR17/SR18 (A) und SR30/SR35 (B) im

Falle der Deletion von *Tfs3*, und SR13/SR14 (A) und SR32/SR34 (B) im Falle der Deletion von *Tfs4* amplifiziert. Die Amplifikation der *rpsL-erm*-Kassette erfolgte mit den Oligonukleotiden HH64 und HH66, und pHH70 als Template. Die hierbei eingefügten Schnittstellen *XhoI/ClaI* bzw. *NotI/SacII* in den flankierenden Bereichen und *BamHI* in der *rpsL-erm*-Kassette ermöglichten die Insertion in den Vektor pBluescript II SK+ (siehe Tabelle 3.2). Die resultierenden Plasmide pSR12 bzw. pSR14 wurden zur Deletion des entsprechenden T4SSs und zur Insertion der *rpsL-erm*-Kassette eingesetzt. Die Transformanten wurden hinsichtlich Erm^R und Str^S überprüft. Die Entfernung der Resistenzkassette erfolgte durch Transformation der Mutanten mit pSR13 bzw. pSR15 und Selektion auf Erm^S und Str^R.

Tabelle 3.2: Übersicht der für die Deletion von *Tfs3* und *Tfs4* eingesetzten Oligonukleotide und entsprechenden Plasmide.

T4SS	A-Teil Primer / Größe in bp	B-Teil Primer / Größe in bp	Plasmid
<i>Tfs3</i>	SR17/SR18 2100 bp	SR30/SR35 2017 bp	pSR12 bzw. 13
<i>Tfs4</i>	SR13/SR14 2299 bp	SR32/SR34 1850 bp	pSR14 bzw. 15

Die Überprüfung der Mutanten und Bestätigung der Deletion des entsprechenden T4SSs erfolgte neben der Selektion auf Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Erythromycin bzw. Streptomycin zudem mit spezifischen Oligonukleotiden in verschiedenen PCR-Reaktionen und durch anschließende Sequenzierung. Abbildung 3.9 zeigt eine schematische Übersicht der für die Deletion und deren Nachweis eingesetzten Oligonukleotidpaare in ihrem genetischen Kontext.

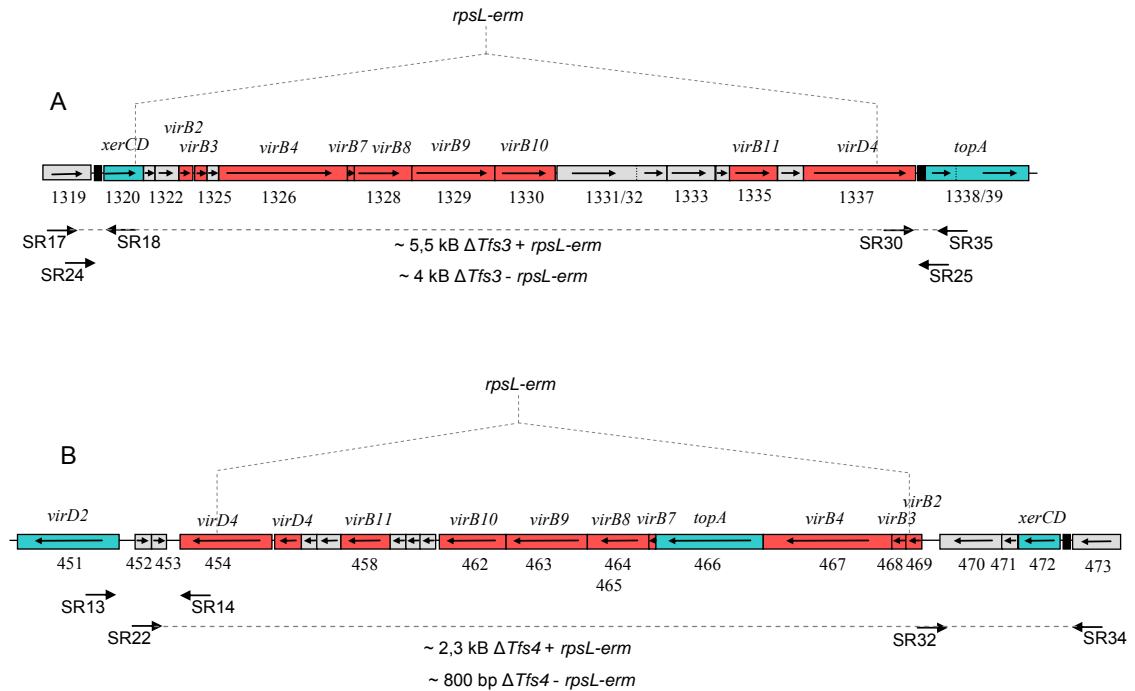


Abbildung 3.9: Übersicht der für die Deletion von *Tfs3* und *Tfs4* eingesetzten Oligonukleotidpaare.

A: Für die Deletion von *Tfs3* wurden die flankierenden Bereiche mit den Oligonukleotiden SR17/SR18 und SR30/SR35 amplifiziert. Der Nachweis der Deletion erfolgte durch Sequenzierung des mit den Oligonukleotiden SR17/SR35 erzeugten PCR-Produktes mit den Oligonukleotiden SR24 und SR25. Im Falle der Deletion von *Tfs3* entsteht ein ca. 5,5 kb großes PCR-Produkt, wenn die *rpsL-erm*-Kassette noch inseriert ist und ein ca. 4 kb großes Fragment, wenn diese deletiert ist.

B: Für die Deletion von *Tfs4* wurden die flankierenden Bereiche mit den Oligonukleotiden SR13/SR14 und SR32/SR34 amplifiziert. Der Nachweis der Deletion erfolgte durch Sequenzierung des mit den Oligonukleotiden SR22/SR34 erzeugten PCR-Produktes. Im Falle der Deletion von *Tfs4* entsteht ein ca. 2,3 kb großes PCR-Produkt, wenn die *rpsL-erm*-Kassette noch inseriert ist und ein ca. 800 bp großes Fragment, wenn diese deletiert ist.

Zur Sequenzierung der *H. pylori* P12 $\Delta Tfs3$ -Mutante wurde ein ca. 4 kb großes PCR-Fragment mit Hilfe der Oligonukleotide SR17 und SR35 erzeugt (siehe Abbildung 3.9 und 3.10 A), welches anschließend mit den Oligonukleotiden SR24 und SR25 sequenziert wurde. Die Deletion von *Tfs4* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide SR22 und SR34 durch ein ca. 800 bp großes Fragment nachgewiesen (siehe Abbildung 3.9 und 3.10 B; Spur 3 und 4). Ist die *rpsL-erm*-Kassette noch inseriert, liefert die PCR ein ca. 2,3 kb großes Produkt. Sowohl in den Einzelmutanten *H. pylori* P12 $\Delta Tfs3$ bzw. $\Delta Tfs4$, als auch in der Doppelmutante *H. pylori* P12 $\Delta Tfs3 \Delta Tfs4$ konnte die Deletion von *Tfs3* und/oder *Tfs4* bestätigt werden.

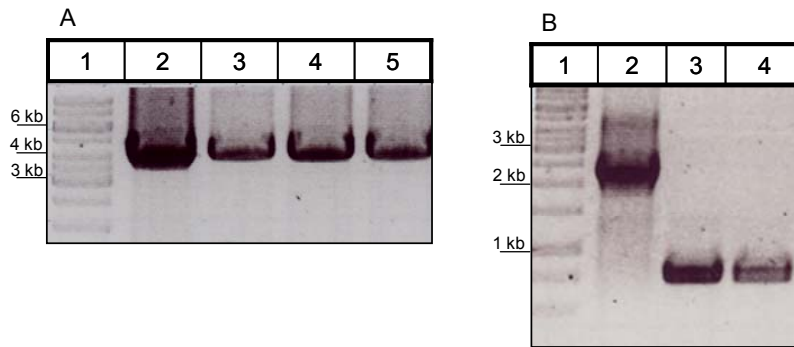


Abbildung 3.10: Bestätigung der Deletion von *Tfs3* und/oder *Tfs4*.

Zur Bestätigung der Deletion der T4SS *Tfs3* und/oder *Tfs4* wurden spezifische PCR-Reaktionen durchgeführt.

A: Bestätigung der Deletion von *Tfs3* mit Hilfe der Oligonukleotide SR17 und SR35. 1: 1 kb- Leiter; 2: pSR13 (*Tfs3*-Deletionsplasmid ohne *rpsL-erm*-Kassette); 3-5: *H. pylori* P12 Δ *Tfs3* Klon 1-3.

B: Bestätigung der Deletion von *Tfs4* mit Hilfe der Oligonukleotide SR22 und SR34. 1: 1 kb- Leiter; 2: pSR14 (*Tfs4*-Deletionsplasmid mit *rpsL-erm*-Kassette); 3: pSR15 (*Tfs4*-Deletionsplasmid ohne *rpsL-erm*-Kassette); 4: *H. pylori* P12 Δ *Tfs4* Klon 1.

3.2.1.2 Deletion des ComB-T4SSs

Da eine Beteiligung des ComB-Systems beim konjugativen DNA-Transfer aufgrund seiner Funktion für die Aufnahme von DNA im Rahmen der natürlichen Kompetenz nicht ausgeschlossen werden kann, wurde dieses ebenfalls mit der Kontraselektionsmethode nach Dailidienne *et al.* (2006) deletiert. Die Deletion des ComB-Systems führt zum Verlust der Fähigkeit der natürlichen Transformation. Weitere Transformationen dieser Deletionsmutante mussten deshalb durch Elektroporation stattfinden. Die Deletion des ComB-Systems bzw. der Gene *comB6-10*, welche zum Verlust der Funktionalität des ComB-Systems führt, und die Insertion der *rpsL-erm*-Kassette erfolgte mit Hilfe des Plasmids pAK23 (Karnholz *et al.*, 2006). Die in diesem Plasmid vorhandene *aphA-3*-Kassette wurde durch die *rpsL-erm*-Kassette, welche mit den Oligonukleotiden SR42/SR43 und dem Plasmid pHH70 als Template amplifiziert wurde, über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *ClaI* ersetzt (pSR19). Die *rpsL-erm*-Kassette wurde nach erfolgreicher Deletion von *comB6-10* in *H. pylori* P12 durch Transformation mit dem Plasmid pSR17 und Selektion auf Str^{R} und Erm^{S} wieder entfernt. Die Deletion von *comB6-10* wurde einerseits in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden DHO15 und AK59 gezeigt und konnte auch aufgrund des Verlusts der Fähigkeit der natürlichen Transformation bestätigt werden (siehe Abbildung 3.11).

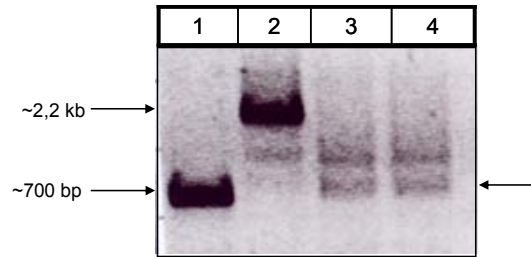


Abbildung 3.11: Nachweis der Deletion von *comB6-10*.

Es wurde eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden AK59 und DHO15 durchgeführt, um die Deletion von *comB6-10* nachzuweisen. Als Kontrolle wurden das Plasmid pSR17 (*comB6-10*-Deletionsplasmid ohne *rpsL-erm*-Kassette) (Spur 1) und pSR19 (*comB6-10*-Deletionsplasmid mit *rpsL-erm*-Kassette) (Spur 2) als Template für die PCR eingesetzt. Ist die *rpsL-erm*-Kassette noch inseriert, entsteht ein ca. 2,2 kb großes Fragment. Ist sie deletiert resultiert ein etwa 700 bp großes Fragment. Die Pfeile zeigen die nach der Deletion von *comB6-10* erwartete Bande an. In Spur 3 und 4 ist das PCR-Produkt der beiden untersuchten Klone zu sehen.

3.2.1.3 Deletion des Cag-T4SSs

Obwohl die Funktion des Cag-Systems bereits aufgeklärt wurde, kann auch für dieses T4SS die Beteiligung am konjugativen DNA-Transfer nicht ausgeschlossen werden. Die Deletion des Cag-Systems erfolgte mit Hilfe des Plasmids pJP44, in welches die mit den Oligonukleotiden HH64 und HH66 und dem Plasmid pHH70 als Template amplifizierte *rpsL-erm*-Kassette über *Bam*HI/*Bgl*II-Fusion in die *Bgl*II-Schnittstelle inseriert wurde (pSR18). Ebenso wie bei der Deletion der anderen T4SS wurden die Mutanten hinsichtlich Str^R und Erm^S überprüft. Zudem wurde die Deletion von CagA in einem Western-Blot und mit den Oligonukleotiden AK250/AK251 bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.4 Schrittweise Deletion aller T4SS und Generierung von Einfach-, Doppel-, Dreifach- und Vierfach-Mutanten

Die Kontraselektionsmethode nach Dailidiene *et al.* (2006) ermöglicht die Deletion von mehreren Loci im selben Stamm, ohne dabei einen Selektionsmarker zu hinterlassen. Da eine Komplementation der Funktion der einzelnen T4SS durch ein anderes T4SS nicht auszuschließen ist, wurden alle T4SS schrittweise im Chromosom deletiert und zuletzt eine Vierfach-Mutante ohne T4SS erzeugt. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht der Mutanten, welche in nachfolgenden Kokultivierungsexperimenten auf ihre Fähigkeit, DNA zu transferieren bzw. aufzunehmen untersucht wurden.

Tabelle 3.3: Übersicht der T4SS-Deletionsmutanten.

<i>H. pylori</i> P12 pHel12:: <i>cat</i>	<i>H. pylori</i> P12 [<i>moeB</i> :: <i>aphA-3</i>]	Deletion
SR-P398	SR-P378	$\Delta Tfs3$
SR-P359	SR-P377	$\Delta Tfs4$
SR-P424	SR-P400	$\Delta comB6-10$
SR-P333	SR-P379	$\Delta Tfs3 \Delta Tfs4$
SR-P366	SR-P29	$\Delta Tfs3 \Delta Tfs4 \Delta cag$ -PAI
SR-P166	SR-P61	$\Delta Tfs3 \Delta Tfs4 \Delta cag$ -PAI $\Delta comB6-10$

3.2.2 Komplementation der Funktion der *virB4*- und *topA*-Homologen innerhalb des Typ-IV-Sekretionssystems *Tfs4* von *H. pylori* P12

Im Zuge der Sequenzierung des Genoms von *H. pylori* P12 wurde das bislang nicht beschriebene *Tfs4* identifiziert (Kersulyte *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2010). Sequenzanalysen von *Tfs4* zeigten zwei Leserasterverschiebungen innerhalb der für die *virB4*- (HPP12_0467) und *topA*- Homologen (HPP12_0466) kodierenden Gene an. Aufgrund dieser Mutationen muss angenommen werden, dass das *Tfs4* in *H. pylori* P12 nicht funktionell ist. Zur Wiederherstellung der potentiellen Funktion von *Tfs4* wurden die Gene HPP12_0466 und HPP12_0467 in *H. pylori* P12 gegen ein entsprechendes, die beiden intakten Gene enthaltendes Fragment aus *H. pylori* ATCC43526 ausgetauscht. Hierzu wurde die Kontraselektionsstrategie nach Dailidiane *et al.* (2006) eingesetzt. Zunächst wurden die die Gene *virB4* und *topA* flankierenden Bereiche mit Hilfe der Oligonukleotide SR48/SR49 und SR50/SR51 amplifiziert (Abbildung 3.12) und in das die *rpsL-erm*-Kassette enthaltende Plasmid pSR11 über die Restriktionsschnittstellen *XhoI/ClaI* bzw. *NotI/SacII* inseriert. Das resultierende Plasmid pSR21 führte nach Transformation in *H. pylori* P12 und Selektion auf Erm^R und Str^S zur Deletion der *virB4*- und *topA*-Homologen und zur Insertion der *rpsL-erm*-Kassette. Um die *rpsL-erm*-Kassette in *H. pylori* P12 $\Delta topA \Delta virB4 + rpsL-erm$ zu entfernen und die intakten *virB4*- und *topA*-Homologen aus *H. pylori* ATCC43526 zu inserieren, wurden die Mutanten mit dem Plasmid pSR23 transformiert und auf Str^R und Erm^S selektioniert. Die Oligonukleotide SR48 und SR51 wurden zur Amplifikation der *topA/virB4*-Region in *H. pylori* ATCC43526 eingesetzt. Die Komplementation der Gene wurde nach Amplifikation der etwa 4 kB großen *topA/virB4*-Region mit den spezifischen

Oligonukleotiden SR48/SR51 durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden WS393/394 bestätigt (Abbildung 3.12). Der resultierende Stamm *H. pylori* P12 *rep* („repariert“) wurde für Kokultivierungsexperimente eingesetzt.

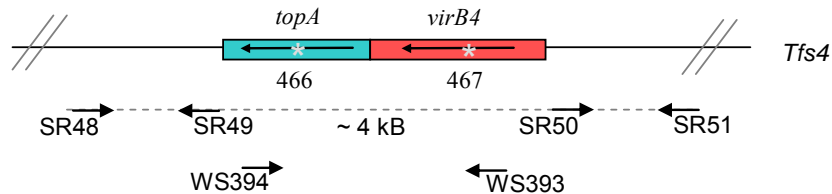


Abbildung 3.12: Komplementation der *topA/virB4*-Region in *Tfs4*.

Die die Leserasterverschiebungen (*) enthaltenden Gene *topA* und *virB4* innerhalb von *Tfs4* wurden mit Hilfe der Kontraselektionsstrategie nach Dailidene *et al.* (2006) gegen ein entsprechendes intaktes, etwa 4 kB großes Fragment aus *H. pylori* ATCC43526 ausgetauscht. Für die Deletion und nachfolgende Insertion wurden die flankierenden Bereiche der Gene mit den Oligonukleotiden SR48/49 und SR50/51 amplifiziert. Die *topA/virB4*-Region aus *H. pylori* ATCC43526 wurde mit den Oligonukleotiden SR48/SR51 amplifiziert. Zur Bestätigung des Austausches der entsprechenden Region wurde mit den Oligonukleotiden WS393/WS394 sequenziert.

3.3 Charakterisierung aller T4SS von *H. pylori* P12 hinsichtlich ihrer Beteiligung am DNA-Transfer

Typ-IV-Sekretionssysteme stellen potentielle Kandidaten für den DNA-Transfer zwischen *H. pylori*-Stämmen dar. Da der Mechanismus für den DNaseI-resistenten, konjugativen DNA-Transfer zwischen *H. pylori*-Stämmen bisher noch nicht aufgeklärt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die eventuelle Beteiligung der in Stamm *H. pylori* P12 vorkommenden T4SS, ComB-, Cag-System, *Tfs3* und *Tfs4*, untersucht. Um eine potentielle Beteiligung der T4SS in *H. pylori* P12 bei der DNA-Ausschleusung bzw. bei der DNA-Aufnahme zu identifizieren, wurden Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Mutanten als Donor oder Rezipient durchgeführt (siehe 3.1.3 und 3.2.1.4). Hierfür wurde sowohl als Donor, als auch als Rezipient der Stamm *H. pylori* P12 eingesetzt, da bei *H. pylori* eine große Anzahl von verschiedenen Restriktions-Modifikationssystemen (R-M-Systeme) identifiziert wurde. Somit konnte eine Ausschließung von „Stamm-fremder“ DNA aufgrund der sehr spezifischen Aktivität der R-M-Systeme verhindert werden.

3.3.1 Untersuchung der Funktion aller T4SS von *H. pylori* P12 für die Aufnahme von DNA

Zunächst wurden die T4SS von *H. pylori* P12 hinsichtlich ihrer Beteiligung bei der DNA-Aufnahme durch den Rezipienten untersucht. Hierzu wurden Kokultivierungsexperimente mit den in 3.2.1.4 beschriebenen Deletionsmutanten als Rezipient durchgeführt. Als Donorstamm diente in allen Experimenten der Wildtypstamm SR-P172 (*H. pylori* P12 [pHel12::cat] $\Delta recA::erm$).

Zunächst wurden die $\Delta Tfs3$ - und $\Delta Tfs4$ -Mutanten für die Kokultivierungsexperimente eingesetzt. Im Vergleich zum Wildtyp-Rezipient konnte allerdings weder bei der $\Delta Tfs3$ -, noch bei der $\Delta Tfs4$ -Mutante eine Beeinträchtigung hinsichtlich der Fähigkeit zur Plasmid-Aufnahme in DNaseI-resistenter bzw. -sensitiver Weise festgestellt werden (siehe Abbildung 3.13).

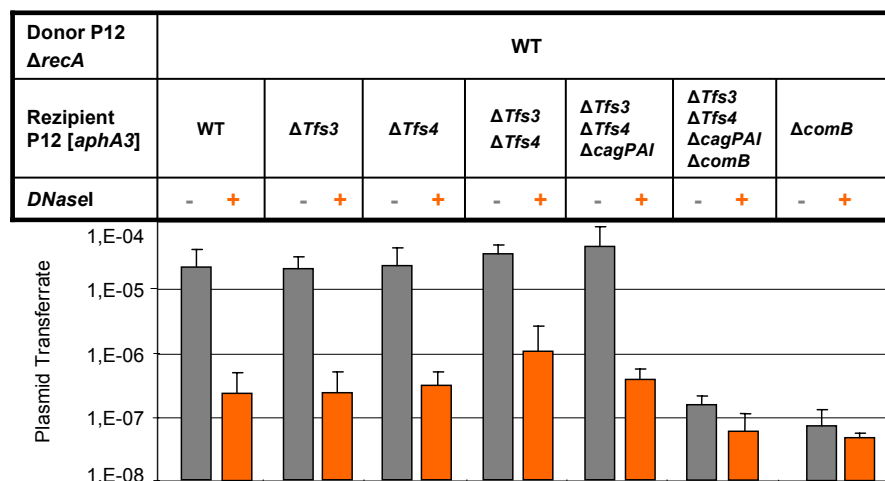


Abbildung 3.13: Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Deletionsmutanten als Rezipient.

Um eine eventuelle Beteiligung der T4SS in *H. pylori* P12 bei der Aufnahme von DNA in konjugativen Prozessen nachzuweisen, wurden Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Deletionsmutanten als Rezipient durchgeführt. Als Donor wurde in allen Fällen der Wildtyp *H. pylori* P12 pHel12::cat $\Delta recA$ eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (□) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer des Plasmids wurde durch Selektion der Transkonjuganten auf Kanamycin und Chloramphenicol verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Da eine Kompensation der Funktion von *Tfs3* durch *Tfs4* bzw. von *Tfs4* durch *Tfs3* nicht ausgeschlossen werden kann, wurde eine $\Delta Tfs3 \Delta Tfs4$ -Doppelmutante als Rezipient eingesetzt. Die Vermutung, dass die Funktion von *Tfs3* bzw. *Tfs4* durch das

jeweils andere T4SS ausgeglichen wird, konnte nicht bestätigt werden. Die Plasmidtransferrate ist auch bei der Doppelmutante vergleichbar mit dem Wildtyp-Experiment (Donor SR-P172; Rezipient SR-P373), in Anwesenheit von DNaseI sogar höher als das vergleichbare Experiment mit dem Wildtyp-Rezipient (Abbildung 3.13).

Um sicherzustellen, dass nicht eines der weiteren, in *H. pylori* P12 vorkommenden T4SS, das Cag- und/oder ComB-System, durch ihre funktionellen Einheiten die Funktion von *Tfs3* und/oder *Tfs4* komplementieren, wurde eine Dreifach- ($\Delta Tfs3 \Delta Tfs4 \Delta cag$ -PAI) und Vierfachmutante ($\Delta Tfs3 \Delta Tfs4 \Delta cag$ -PAI $\Delta comB6-10$ = $\Delta T4SS$ -Mutante) als Rezipient eingesetzt. Nur im Fall der $\Delta T4SS$ -Mutante, also in Abwesenheit aller T4SS, konnte eine drastische Abnahme der Plasmidtransferrate im Vergleich zum Wildtyp, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DNaseI festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass das ComB-System neben seiner Funktion für die natürliche Transformation auch für den DNaseI-resistenten Transfer eine Rolle spielt. Um zu bestätigen, dass der Effekt der Deletion des ComB-Systems auf der Deletion desselben und nicht aufgrund additiver Effekte der Deletion aller T4SS beruht, wurden die Konjugationsexperimente mit einer $\Delta comB6-10$ -Mutante wiederholt und bestätigt. Auch hier ist eine starke Reduzierung der Plasmidtransferrate des DNaseI-resistenten und -sensitiven DNA-Transfers festzustellen (siehe Abbildung 3.13).

Auffällig ist jedoch, dass auch im Fall der Deletion aller T4SS der DNA-Transfer zwischen Donor und Rezipient immer noch möglich ist. Dies deutet auf einen alternativen, von T4SS unabhängigen, neuartigen DNaseI-resistenten Mechanismus der DNA-Aufnahme in *H. pylori* hin.

3.3.2 Beteiligung der T4SS von *H. pylori* P12 bei der DNA-Sekretion durch den Donor

Der Konjugationsapparat setzt sich bei gramnegativen Bakterien aus einem Translokationskanal und einem Pilus zusammen (Lawley *et al.*, 2003). Der Transfer der DNA wird durch Proteine, welche das *mating pair formation* (Mpf)-System bilden und das Kopplungsprotein bewerkstelligen. Hierbei baut das Mpf-System den extrazellulären Pilus auf und ermöglicht den Kontakt mit dem Rezipienten. Die Interaktion des DNA-Substrats mit dem Mpf-System erfolgt durch das Kopplungsprotein. Neben der Fähigkeit DNA-Protein-Komplexe zu transportieren, sind T4SS in der Lage Proteine in

eukaryotische Zellen zu translozieren und spielen bei der Aufnahme, aber auch bei der Sekretion von DNA eine Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine eventuelle Beteiligung der T4SS von *H. pylori* P12 bei der Übertragung von DNA durch Konjugation und eine Aktivität hinsichtlich der DNA-Sekretion untersucht werden. Hierzu wurden Kokultivierungsexperimente mit den Deletionsmutanten als Donor und einem Wildtyp-Rezipient durchgeführt.

3.3.2.1 Das ComB-System ist auch beim DNA-Export aus dem Donor beteiligt

Um eine eventuelle Beteiligung der T4SS am DNA-Export aus der Donorzelle nachzuweisen, wurden Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Deletionsmutanten als Donor und einem Wildtyp-Rezipient (SR-P373; *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*]) durchgeführt. Zunächst wurden *Tfs3* und *Tfs4* auf ihre Fähigkeit DNA zu exportieren untersucht. Experimente, welche mit den jeweiligen Einzelmutanten *H. pylori* P12 $\Delta Tfs3$ bzw. $\Delta Tfs4$ durchgeführt wurden, zeigten keine Beeinträchtigung des Plasmidtransfers im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.14). Ebenso blieb die Deletion beider T4SS, *Tfs3* und *Tfs4*, ohne Auswirkung auf die Plasmidtransferrate. Da auch auf der Seite des Donors nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Funktion eines T4SS durch ein anderes kompensiert wird, wurde eine Dreifachmutante eingesetzt, bei welcher zusätzlich zu *Tfs3* und *Tfs4* das in der *cag*-PAI kodierte T4SS deletiert wurde. Auch diese Mutante lieferte sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DNaseI mit dem Wildtyp-Donor SR-P172 vergleichbare Plasmidtransferraten. Erst die zusätzliche Deletion des ComB-Systems in der Vierfachmutante ($\Delta T4SS$) zeigte eine negative Beeinflussung der Plasmidtransferrate, vor allem in Abwesenheit von DNaseI (Abbildung 3.14). Um diesen Effekt zu bestätigen und um auszuschließen, dass die Deletion aller T4SS ($\Delta T4SS$) eine additive negative Auswirkung auf den Donor hat, wurde eine $\Delta comB6-10$ -Mutante als Donorstamm eingesetzt. Auch bei der Einzelmutante konnte eine Reduzierung der Plasmidtransferrate nachgewiesen werden (Abbildung 3.14). Dies deutet darauf hin, dass das ComB-System nicht nur im Rahmen der natürlichen Transformation bei der DNA-Aufnahme, sondern auch bei konjugativen Prozessen sowohl auf Seiten des Donors, als auch für den Rezipienten eine wichtige Rolle spielt.

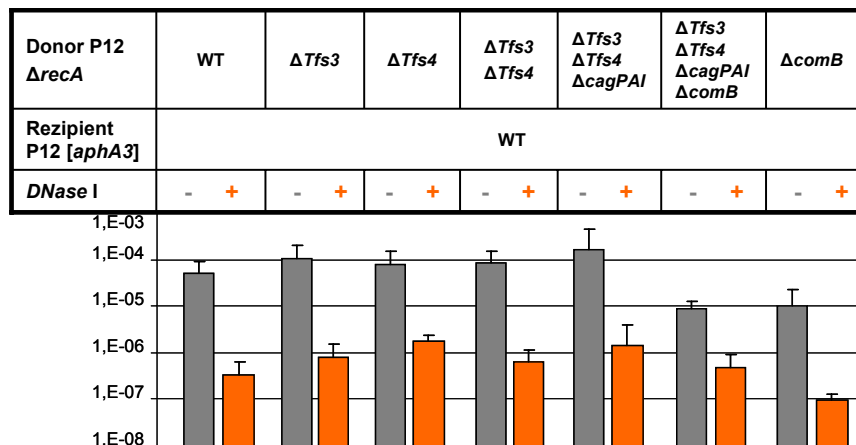


Abbildung 3.14: Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Deletionsmutanten als Donor.

Um eine eventuelle Beteiligung der T4SS in *H. pylori* P12 beim Export bzw. der Sekretion von DNA nachzuweisen, wurden Kokultivierungsexperimente mit den T4SS-Deletionsmutanten als Donor durchgeführt. Als Rezipient wurde in allen Fällen der Wildtyp *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*] eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (■) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* wurde durch Selektion der Transkonjuganten auf Kanamycin und Chloramphenicol verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Um diese Daten zu bestätigen und die Funktion des ComB-Systems hinsichtlich DNA-Aufnahme und -Export zu zeigen wurden Kokultivierungsexperimente mit der *ΔcomB6-10*-Einzelmutante und der *ΔT4SS*-Mutante als Donor und/oder Rezipient durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das ComB-System im Rezipienten für die DNA-Aufnahme sowohl in DNaseI-resistenter, als auch in DNaseI-sensitiver Weise erforderlich ist (siehe Abbildung 3.15). Darüber hinaus ist das ComB-System auch im Donor für den DNA-Export von Bedeutung. Die mit der *ΔcomB6-10*-Mutante als Donor und Rezipient durchgeführten Experimente lieferten die geringsten Plasmidtransferraten in Abwesenheit von DNaseI. DNaseI-resistenter Plasmidtransfer war nicht mehr möglich (Abbildung 3.15).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass das ComB-System nicht nur im Rezipienten für die DNA-Aufnahme, sondern auch im Donor für die DNA-Ausschleusung von Bedeutung ist. Somit ist eine Rolle des ComB-Systems als Konjugationspore, welche den DNA-Transfer aus der Donorzelle und die DNA-Aufnahme in den Rezipienten vermittelt, denkbar.

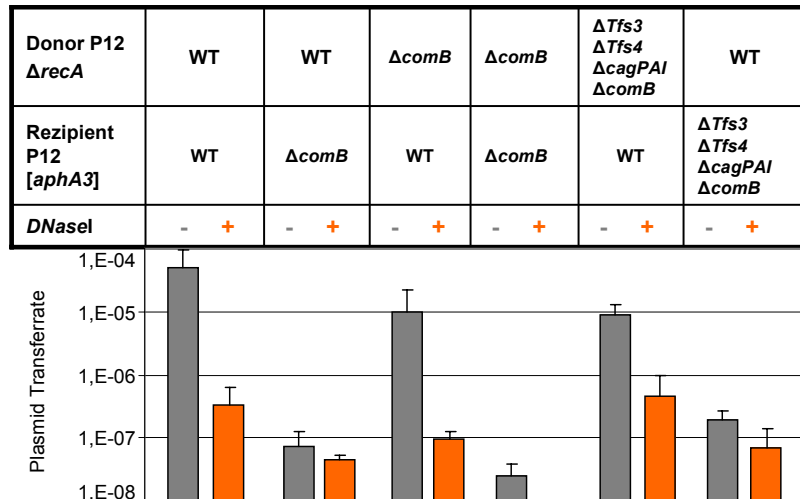


Abbildung 3.15: Auswirkung der Deletion des ComB-T4SSs in Kokultivierungsexperimenten.

Zur Bestätigung der eventuellen Beteiligung des ComB-T4SSs bei der Ausschleusung von DNA aus dem Donor wurden weitere Kokultivierungsexperimente mit der $\Delta comB6-10$ -Einzelmutante und der $\Delta T4SS$ -Mutante als Donor und/oder Rezipient durchgeführt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (□) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* wurde durch Selektion auf Kanamycin und Chloramphenicol verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

3.3.2.2 Das Typ-IV-Sekretionssystem *Tfs4* vermittelt die Sekretion von Plasmid-DNA

Neisserien sind, ebenso wie *H. pylori* natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA (Sparling, 1966; Lorenz *et al.*, 1994). In Neisserien wird die zur natürlichen Transformation zur Verfügung stehende DNA entweder durch Autolyse freigesetzt (Elmros *et al.*, 1976) oder in einem Typ-IV-Sekretions-abhängigen Prozess aktiv sekretiert (Hamilton *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2005). Wie für Neisserien beschrieben, ist auch für *H. pylori* eine Sekretion von DNA durch den Donorstamm denkbar. Diese würde ein funktionelles T4SS erfordern. Sequenzanalysen des in der PZ1 integrierten *Tfs4* zeigten Leserasterverschiebungen innerhalb der Gene *virB4* (HPP12_467) und *topA* (HPP12_466) an (siehe 3.2.2). Um die eventuelle Beeinträchtigung der Funktionalität von *Tfs4* zu revidieren, wurden die Gene *virB4* und *topA* im Chromosom von *H. pylori* P12 gegen ein entsprechendes, intaktes Fragment aus *H. pylori* ATCC43526 mit Hilfe der Kontraselektionsmethode ausgetauscht (siehe 3.2.2). Der bezüglich *virB4/topA_{TFS4}* „reparierte“ Stamm *H. pylori* P12 *rep* (SR-P173) wurde im Vergleich zum Wildtypstamm SR-P172 in Kokultivierungsexperimenten als Donor mit

SR-P373 (*H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*]) als Rezipient eingesetzt. Hierbei wurde der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* in den Rezipienten verfolgt. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Chloramphenicol und Kanamycin. Die Auswertung der Anzahl der Transkonjuganten ($\text{Cam}^{\text{R}}/\text{Kan}^{\text{R}}$) bezogen auf die CFU/ml zeigte in Abwesenheit von DNaseI (Konjugation + Transformation) eine um mehr als eine Zehnerpotenz höhere Plasmidtransferrate an. Der DNaseI-geschützte Transfer wurde durch den Austausch der *virB4*- und *topA*-Homologen im Donor nicht beeinflusst (siehe Abbildung 3.16).

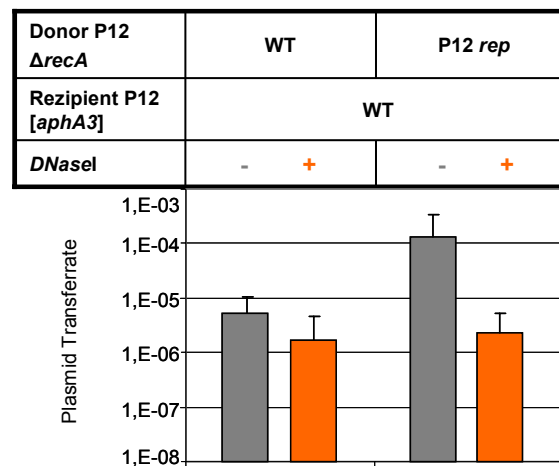


Abbildung 3.16: Beteiligung von *Tfs4* am Export von Plasmid-DNA.

Zur Charakterisierung der Funktion des komplementierten *Tfs4* wurden Kokultivierungsexperimente mit einem Wildtyp-Donor (SR-P172) und einem „reparierten“ Donor, P12 rep (SR-P173), welcher die *virB4*- und *topA*-Homologen von *H. pylori* ATCC43526 enthielt, durchgeführt. Als Rezipient wurde in beiden Fällen der Wildtyp *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*] (SR-P373) eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (■) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* wurde durch Selektion der Transkonjuganten auf Kanamycin und Chloramphenicol verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Es konnte also gezeigt werden, dass *H. pylori* P12 mit einem funktionellen *Tfs4* die Sekretion von Plasmid-DNA, welche dann für die Aufnahme durch natürliche Transformation zur Verfügung steht, katalysiert.

Neben der Ausschleusung von Plasmid-DNA wurde auch die Beeinflussung der Transferrate von chromosomaler DNA durch die Anwesenheit eines potentiell funktionellen *Tfs4* untersucht. Hierbei wurde der Transfer des *rpsL**-Locus von einem Wildtyp-Donor (SR-P172) bzw. von P12 rep (SR-P173) in einen Wildtyp-Rezipienten (SR-P373) verfolgt. Wie unter 3.1.5 beschrieben, findet der Transfer des

chromosomalen Locus *rpsL** nur in Abwesenheit von DNaseI statt und wird durch natürliche Transformation vermittelt. Zudem war keine Beeinflussung der Transferrate bei Anwesenheit eines aktiven *Tfs4* festzustellen (Abbildung 3.17).

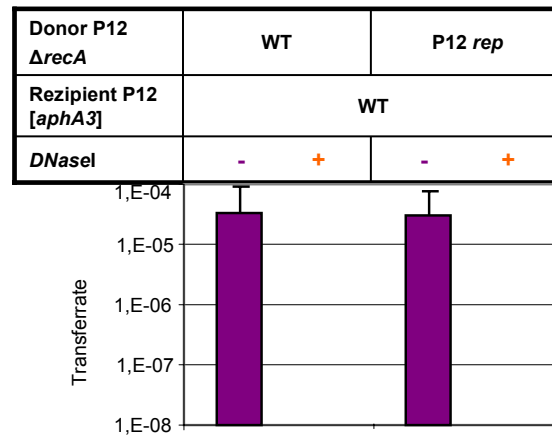


Abbildung 3.17: Untersuchung der Beteiligung von *Tfs4* am Transfer von chromosomaler DNA.

Zur Untersuchung der Beteiligung des komplementierten *Tfs4* am Transfer von chromosomaler DNA wurden Kokultivierungsexperimente mit dem Wildtyp-Donor SR-P172 und dem „reparierten“ Donor SR-P173 (P12 *rep*) durchgeführt. Es wurde der Transfer des chromosomalen Locus *rpsL** und somit der Transfer der Streptomycin-Resistenz in den Wildtyp-Rezipienten SR-P373 verfolgt. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Streptomycin und Kanamycin. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (■) von DNaseI durchgeführt. Die Transferrate des chromosomalen Locus *rpsL** wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Zur Bestätigung der Sekretion von Plasmid-DNA wurde die im extrazellulären Milieu in Kokultivierungsansätzen vorhandene DNA mit Hilfe des PicoGreen®-Reagenz quantifiziert. Mit Hilfe dieses Reagenz ist nach Hamilton *et al.* (2005) die Quantifizierung von ssDNA und dsDNA möglich. Die Menge an sekretierter DNA in ng wurde auf den Gesamtproteingehalt in μg bezogen (siehe 2.2.2.25). Es konnte gezeigt werden, dass in Kokultivierungsexperimenten mit *H. pylori* P12 *rep* als Donor signifikant mehr DNA im extrazellulären Milieu im Vergleich zum Wildtyp vorliegt (Abbildung 3.18). Die Menge an sekretierter bzw. freigesetzter DNA beträgt etwa 180% bezogen auf das Wildtyp-Experiment (=100%) (Abbildung 3.18).

Dadurch konnte bestätigt werden, dass in Anwesenheit eines funktionellen *Tfs4* Sekretion von Plasmid-DNA in das extrazelluläre Milieu stattfindet. Die DNA steht dann für die Aufnahme durch natürliche Transformation zur Verfügung.

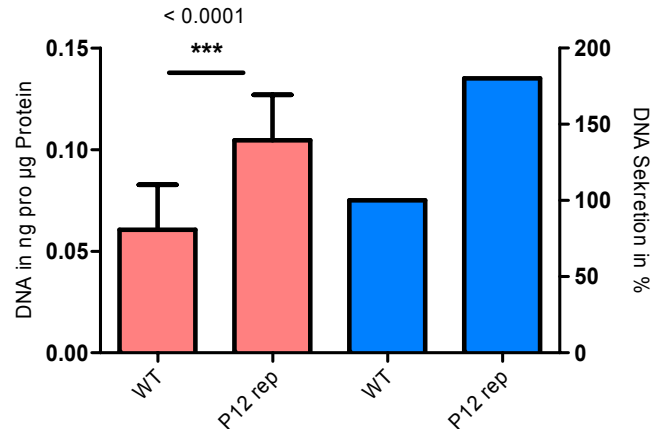


Abbildung 3.18: Quantifizierung der im extrazellulären Milieu vorhandenen DNA.

Zur Quantifizierung der in Kokultivierungsexperimenten im extrazellulären Milieu vorhandenen DNA wurde der PicoGreen® Assay (Invitrogen) durchgeführt. Hierbei wurde die Menge an DNA in ng im Überstand eines Kokultivierungsansatzes bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge in µg bezogen (■). Als Donor wurde der WT-Stamm SR-P172 und der „reparierte“ Stamm SR-P173 (P12 rep), als Rezipient der WT-Stamm SR-P373 eingesetzt. Die sekretierte DNA in ng pro µg Protein wurde in % zum Wildtyp (= 100%) angegeben (■). Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung und Signifikanz (t-Test) ermittelt.

3.3.3 Das Membranprotein ComE3 ist essentiell für die DNA-Aufnahme

Die Aufnahme von DNA durch das ComB-System wurde kürzlich als zwei-Stufen-Prozess beschrieben (Stingl *et al.*, 2010). Hierbei wird zunächst die doppelsträngige DNA (dsDNA) mit relativ geringer Substratspezifität über die äußere Membran in das Periplasma transportiert. Dieser Prozess wird durch das ComB-System bewerkstelligt, welches die äußere und innere Membran durchquert (Hofreuter *et al.*, 2001; Hofreuter *et al.*, 2003; Karnholz *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass die DNA anschließend durch das ComB-System dem Kanalprotein ComE3 zur Verfügung gestellt und in einem spezifischen Mechanismus durch den zu ComEC aus *B. subtilis* homologen Kanal über die innere Membran in das Zytoplasma transportiert wird (Stingl *et al.*, 2010).

Dass das ComB-T4SSs nicht nur bei der natürlichen Transformation, sondern auch beim DNaseI-resistenten DNA-Transfer von Bedeutung ist, wurde bereits gezeigt (siehe 3.3.1 und 3.3.2.1). Es ist denkbar, dass es als Konjugationspore im Rezipienten fungiert. Die Deletion des für das Kanalprotein ComE3 kodierenden Gens und anschließende Kokultivierungsexperimente sollten zeigen, ob eine DNA-Aufnahme auch in der $\Delta comE3$ -Mutante nur durch den ComB-Apparat erfolgen kann.

Zur Deletion von *comE3* (HPP12_1360) in *H. pylori* P12 wurde ein Plasmid aus der Klonbank eingesetzt, welches die flankierenden Bereiche des Gens enthielt (Klon 2kb-02-C16). Mit Hilfe der Oligonukleotide SR111 und SR112 wurde eine inverse PCR durchgeführt und dabei die Schnittstelle *Bam*HI am 5`- und 3`-Ende des PCR-Produkts eingefügt. Als Selektionsmarker wurde die *aphA-3*-Kassette über *Bgl*III-*Bam*HI-Fusion eingesetzt. Nach der Transformation des resultierenden Plasmids pSR33 in *H. pylori* P12 wurde auf Kanamycin selektioniert und anschließend chromosomale DNA aus den Transformanten isoliert. Die Deletion von *comE3* wurde mit Hilfe der spezifischen Oligonukleotide SR113 und SR114 in einer PCR-Reaktion und anschließender Sequenzierung bestätigt.

Um die Beteiligung des ComE3-Kanalproteins am Konjugationsprozess zu untersuchen, wurden Kokultivierungsexperimente mit einem Wildtypdonor (SR-P172) und der Δ *comE3*-Mutante (SR-P514) als Rezipient durchgeführt. Die Experimente wurden sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DNaseI durchgeführt, wobei der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* durch Selektion der Transkonjuganten auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt wurde. Weder in Ab- noch in Anwesenheit von DNaseI war eine Übertragung des Plasmids vom Wildtypdonor in die Δ *comE3*-Mutante möglich (Daten nicht gezeigt). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Kanalprotein ComE3 eine essentielle Rolle für die Aufnahme von DNA und deren Transport über die innere Membran sowohl im Zuge der natürlichen Transformation als auch beim DNaseI-resistenten DNA-Transfer spielt.

3.4 Deletion und Untersuchung der Funktion der Plasmid- und chromosomal kodierten Relaxasen und von RecA für den Plasmidtransfer in *H. pylori* P8 und P12

Der konjugative Transfer von DNA erfordert eine funktionelle Relaxase. Relaxasen sind die Schlüsselenzyme der bakteriellen Konjugation. Sie katalysieren die ortsspezifische Spaltung der Plasmid-DNA, den Transfer der Einzelstrang-DNA von der Donor- in die Akzeptorzelle und die Termination des Transfers im Rezipienten (de la Cruz *et al.*, 2010).

Sequenzanalysen von pHel4 und pHel12 zeigten, dass beide Plasmide Gene enthalten, welche für eine *mob*-Region kodieren. Die Gene der *mob*-Region weisen Homologien zu den Genen *mobA*, *mobB*, *mobC* und *mobD* der colizinogenen Plasmide

von *E. coli* auf (Hofreuter *et al.*, 2002). Die Gene *orf4C* in pHel4 und *orf04* in pHel12 kodieren für putative Relaxasen (im Folgenden *mobA* genannt), welche Homologien zur Relaxase MobA aufweisen.

Außerdem konnten innerhalb von *Tfs3* und *Tfs4* zu Relaxasen homologe Gene identifiziert werden (Fischer *et al.*, 2010).

Zur Bearbeitung der Fragestellung, ob die entsprechenden Relaxasen bei der Übertragung von Plasmid-DNA eine Rolle spielen, wurden Deletionsmutanten hergestellt und anschließend Kokultivierungsexperimente durchgeführt.

3.4.1 Deletion bzw. Inaktivierung der Plasmid-kodierten putativen Relaxasen in pHel4 und pHel12

Zur Inaktivierung der Funktion der putativen Relaxase in pHel4 wurde eine *cat_{GC}*-Kassette innerhalb des Leserahmens von *orf4C* inseriert (siehe Abbildung 3.19). Hierfür wurde das Plasmid pCH25 eingesetzt, welches flankierende Bereiche des Relaxasegens und die *cat_{GC}*-Kassette enthält. Die Deletion des Relaxasegens *orf04* in pHel12 erfolgte mithilfe eines Plasmids aus der Klonbank, welches homologe Bereiche von pHel12 enthält (Klon 5kb_04_N02). Dieses diente innerhalb einer inversen PCR mit den Oligonukleotiden SR52 und SR41 als Template. Über die während der Amplifikation durch die Oligonukleotide eingefügte *Bam*HI-Schnittstelle wurde die *cat_{GC}*-Kassette als Selektionsmarker inseriert (pSR26). Die Deletion der Relaxase und die Insertion der *cat_{GC}*-Kassette wurden durch PCR und Sequenzierung mit den spezifischen Oligonukleotiden SR4, SR5, SR73 und SR74 überprüft. Abbildung 3.19 veranschaulicht die Deletion bzw. Inaktivierung der putativen Relaxasen in pHel4 und pHel12.

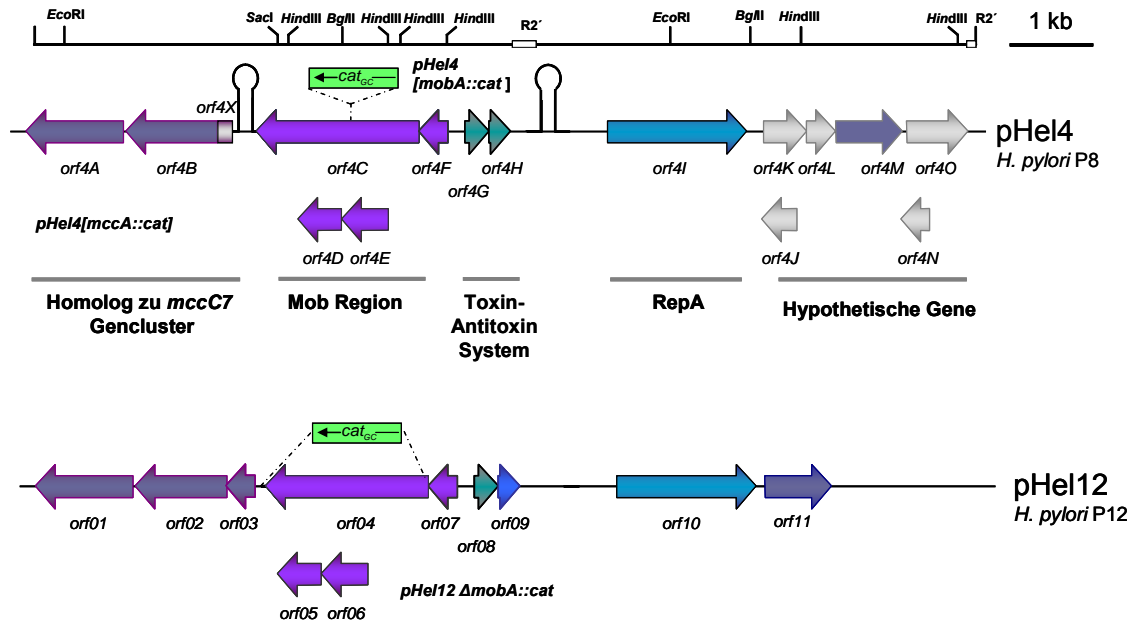


Abbildung 3.19: Graphische Darstellung der Deletion bzw. Inaktivierung der Funktion der putativen Relaxasen *orf4C* und *orf04* in pHel4 und pHel12.

In Fall von pHel4 findet die Inaktivierung der putativen Relaxase durch eine Insertion der *cat_{GC}*-Kassette (■) in *orf4C* (pHel4 [*mobA::cat*]) statt. In pHel12 wurde die putative Relaxase *orf04* durch die *cat_{GC}*-Kassette (■) ersetzt (pHel12Δ*mobA::cat*).

3.4.2 Deletion der chromosomal kodierten putativen Relaxasen in *Tfs3* und *Tfs4* von *H. pylori* P12

Bei der Genomanalyse von *H. pylori* P12 konnten Gene identifiziert werden, welche Homologien zu Relaxasen zeigen. Da nicht auszuschließen ist, dass diese eine Funktion für die Übertragung von DNA übernehmen wurde das jeweils in *Tfs3* bzw. *Tfs4* enthaltene *virD2*-Homolog HPP12_1353 bzw. HPP12_0451 in beiden Fällen zusammen mit den anderen, für das entsprechende T4SS kodierenden Genen deletiert. Hierzu wurde die Kontraselektionsstrategie nach Dailidiane *et al.* (2006) eingesetzt (siehe 2.2.2.24 und 3.2). Die flankierenden Bereiche stromauf- (A) und stromabwärts (B) von *Tfs3* bzw. *Tfs4* wurden mit den spezifischen Oligonukleotiden SR17/SR18 (*XhoI/ClaI*; A) und SR69/SR70 (*NotI/SacII*; B) bzw. SR71/SR72 (*XhoI/ClaI*; A) und SR32/SR34 (*NotI/SacII*; B) amplifiziert und zusammen mit der *rpsL-erm*-Kassette (*BamHI*) in den Vektor pBluescript II SK+ kloniert (siehe Tabelle 3.4 und Abbildung 3.20). Die resultierenden Plasmide pSR29 und pSR31 führten nach Transformation in *H. pylori* P12 *str* und erfolgreicher homologer Rekombination zur Deletion von *Tfs3*

bzw. *Tfs4* und zur Insertion der *rpsL-erm*-Kassette. Eine Transformation der Deletionsmutanten mit den Plasmiden pSR30 und pSR32 und Selektion auf Str^R und Erm^S ermöglichte das Entfernen der Resistenzkassette. Die Deletion wurde mit den spezifischen Oligonukleotiden SR17/SR70 bzw. SR109/SR110 in einer PCR bestätigt. Abbildung 3.20 zeigt eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide in ihrem genetischen Kontext.

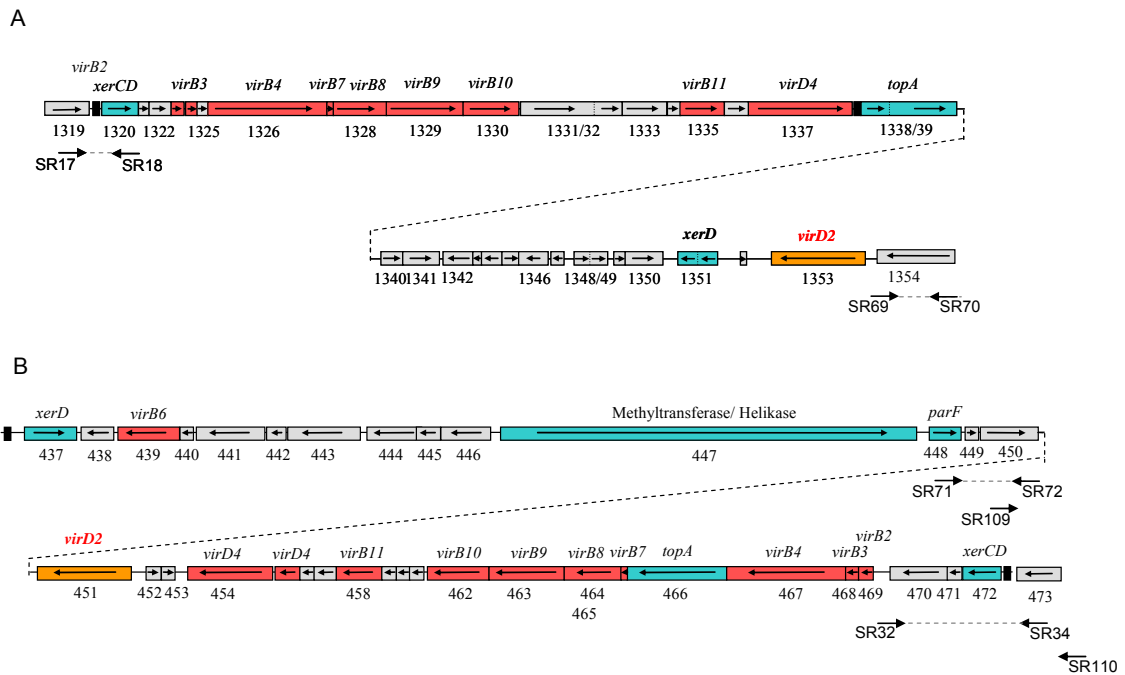


Abbildung 3.20: Übersicht der für die Deletion der chromosomalen Relaxasen eingesetzten Oligonukleotide in ihrem genetischen Kontext.

A: Für die Deletion von *Tfs3* und der chromosomal kodierten Relaxase *virD2* (HPP12_1353; orange) wurden die Oligonukleotid-Paare SR17/SR18 und SR69/SR70 zur Amplifikation der flankierenden Bereiche eingesetzt. Die Deletion erfolgte mit Hilfe der Kontraselektionsstrategie (Dailidienne *et al.* 2006). Die erfolgreiche Deletion wurde durch Sequenzierung des mit SR17/SR70 amplifizierten PCR-Produktes bestätigt.

B: Für die Deletion von *Tfs4* und der chromosomal kodierten Relaxase *virD2* (HPP12_0451; orange) wurden die Oligonukleotid-Paare SR71/SR72 und SR32/SR34 zur Amplifikation der flankierenden Bereiche eingesetzt. Die Deletion erfolgte mit Hilfe der Kontraselektionsstrategie (Dailidienne *et al.* 2006). Die erfolgreiche Deletion wurde durch Sequenzierung des mit SR109/SR110 amplifizierten PCR-Produktes bestätigt.

Neben Einzel- und Doppelmutanten hinsichtlich chromosomal kodierter Relaxasen wurden auch Mutanten hergestellt, bei denen jeweils eine bzw. beide chromosomal kodierte Relaxasen, sowie die Plasmid-kodierte Relaxase deletiert wurden. Tabelle 3.5 zeigt eine Übersicht der Mutanten.

Tabelle 3.4: Übersicht der für die Deletion der chromosomal kodierten Relaxasen innerhalb *Tfs3* und *Tfs4* eingesetzten Oligonukleotide und entsprechenden Plasmide

T4SS+Relaxase	A-Teil	B-Teil	Plasmid
	Primer / Größe in bp	Primer / Größe in bp	
<i>Tfs3</i>	SR17/SR18	SR69/SR70	pSR29 bzw.
	2100 bp	1961 bp	pSR30
<i>Tfs4</i>	SR71/SR72	SR32/SR34	pSR31 bzw.
	1973 bp	1850 bp	pSR32

Tabelle 3.5: Übersicht der Relaxase-Deletionsmutanten.

Stamm	Deletion	Plasmid
SR-P396	$\Delta mobA$	pHel12 $\Delta mobA::cat$
SR-P430	$\Delta Tfs4 \Delta HPP12_0451$	pHel12:: <i>cat</i>
SR-P438	$\Delta Tfs3 \Delta HPP12_1353$	pHel12:: <i>cat</i>
SR-P402	$\Delta Tfs4 \Delta HPP12_0451 \Delta mobA$	pHel12 $\Delta mobA::cat$
SR-P435	$\Delta Tfs3 \Delta HPP12_1353 \Delta mobA$	pHel12 $\Delta mobA::cat$
SR-P506	$\Delta Tfs3 \Delta HPP12_1353 \Delta Tfs4 \Delta HPP12_0451$	pHel12:: <i>cat</i>
SR-P515	$\Delta Tfs3 \Delta HPP12_1353 \Delta Tfs4 \Delta HPP12_0451 \Delta mobA$	pHel12 $\Delta mobA::cat$

Zur Überprüfung der Beteiligung der Plasmid- und chromosomal kodierten Relaxasen am konjugativen Transfer von Plasmid-DNA wurden Kokultivierungsexperimente mit den Deletionsmutanten durchgeführt.

3.4.3 Rolle der Plasmid-kodierten Relaxasen für den konjugativen Transfer der Plasmide pHel4 und pHel12

Zur Überprüfung der Beteiligung der Plasmid-kodierten Relaxasen am konjugativen Transfer der kryptischen Plasmide wurden Kokultivierungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde der Transfer der Plasmide aus den Donorstämmen *H. pylori* P8 pHel4 [*mobA::cat*] bzw. *H. pylori* P12 pHel12 $\Delta mobA::cat$ in den Rezipientenstamm *H. pylori* P12str bzw. *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*] durch Selektion der Transkonjuganten auf Chloramphenicol und Streptomycin bzw. Kanamycin verfolgt.

Die resultierenden Plasmidtransferraten wurden mit Wildtyp-Experimenten verglichen (Donor P8 pHel4 [*mccC::cat*] bzw. P12 pHel12::*cat*).

Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmid-kodierte Relaxase beim Transfer des Plasmids pHel4 vom Donor P8 in den Rezipienten P12 eine Rolle spielt. Die Transferrate sinkt im Vergleich zum Wildtyp sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DNaseI um eine Zehnerpotenz (siehe Abbildung 3.21 A).

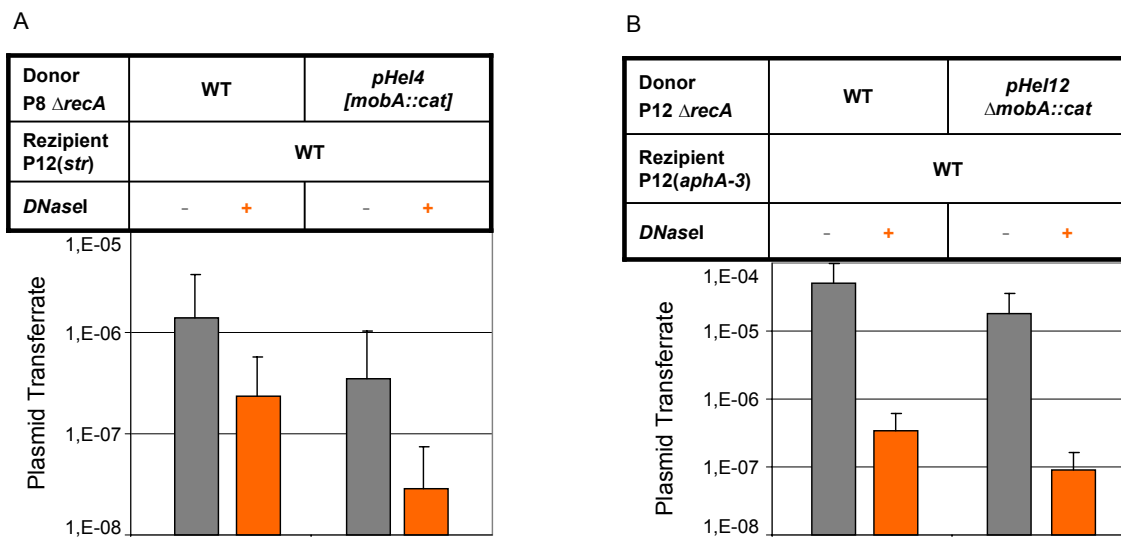


Abbildung 3.21: Rolle der Plasmid-kodierten Relaxase für den Transfer von pHel4 und pHel12.

Zur Charakterisierung der Funktion der Plasmid-kodierten Relaxasen in pHel4 und pHel12 wurden Kokultivierungsexperimente mit den WT-Donoren *H. pylori* P8 pHel4 [*mcc::cat*] (A) bzw. P12 pHel12::*cat* (B) im Vergleich zu den entsprechenden Relaxase-Mutanten P8 pHel4 [*mobA::cat*] (A) bzw. P12 pHel12 $\Delta mobA::cat$ (B) durchgeführt. Als Rezipient wurde entweder der Stamm *H. pylori* P12 *str* oder P12 [*moeB::aphA-3*] (SR-P373) eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (□) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer der entsprechenden Plasmide wurde durch Selektion auf Chloramphenicol und Streptomycin bzw. Kanamycin verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Im Gegensatz dazu konnte nur eine geringfügige Beeinflussung des Plasmidtransfers nach Deletion der Plasmid-kodierten Relaxase von pHel12 gezeigt werden. Die Effizienz der Übertragung des Plasmids pHel12 $\Delta mobA::cat$ ist zwar im Vergleich zum Wildtyp-Plasmid pHel12::*cat* etwas niedriger, jedoch ist weiterhin auch in Anwesenheit von DNaseI DNA-Transfer möglich (siehe Abbildung 3.21 B).

Dies lässt die Vermutung zu, dass die Rolle der Plasmid-kodierten Relaxase beim Transfer von pHel12 durch eine oder beide chromosomal kodierte Relaxasen kompensiert werden könnte. Da die Genomsequenz von *H. pylori* P8 noch nicht bekannt ist, kann auch beim Transfer von pHel4 eine Beteiligung von potentiell, im

Chromosom kodierten Relaxasen nicht ausgeschlossen werden. Hierauf deutet vor allem die verbleibende, auch in der Mutante *H. pylori* P8 pHel4 [*mobA::cat*] vorhandene Fähigkeit hin, Plasmide in einem DNaseI-resistenten Mechanismus zu übertragen.

3.4.4 Rolle der Plasmid-kodierten Relaxase in pHel12 für den Rezipienten

Zur Untersuchung der möglichen Funktion der Plasmid-kodierten Relaxase in der Rezipientenzelle wurde eine entsprechende Mutante (SR-P511) hergestellt und für Kokultivierungsexperimente eingesetzt. Die Deletion erfolgte mit Hilfe des Plasmids pSR27. Die dabei inserierte *aphA-3*-Kassette ermöglichte die Selektion der Transkonjuganten auf Chloramphenicol und Kanamycin. Als Donor wurde der Wildtypstamm SR-P172 eingesetzt und der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* verfolgt (siehe Abbildung 3.22). Es konnte keine negative Beeinflussung der Plasmidtransferrate in An- und in Abwesenheit von DNaseI nach Deletion der Plasmid-kodierten Relaxase im Rezipienten dokumentiert werden (siehe Abbildung 3.22).

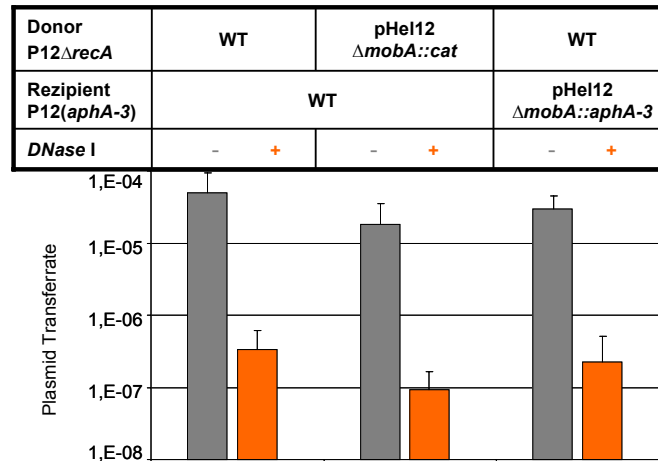


Abbildung 3.22: Beeinflussung des Plasmidtransfers nach Deletion der Plasmid-kodierten Relaxase im Donor bzw. Rezipient.

Zur Charakterisierung der Funktion der Plasmid-kodierten Relaxasen in pHel12 im Donor bzw. im Rezipient wurden Kokultivierungsexperimente mit dem WT-Donor *H. pylori* P12 pHel12::*cat* im Vergleich zur Relaxase-Mutante P12 pHel12 Δ *mobA::cat* durchgeführt. Als Rezipient wurde entweder der Stamm *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*] (SR-P373) oder die Relaxase-Mutante SR-P511 (P12 pHel12 Δ *mobA::aphA-3*) eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (■) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer der entsprechenden Plasmide wurde durch Selektion auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

3.4.5 Untersuchung der Funktion der chromosomal kodierten Relaxasen in *H. pylori* P12

Um eine eventuelle Kompensation der Funktion der Plasmid-kodierten Relaxase für den konjugativen Transfer von pHel12 durch eine oder beide der innerhalb *Tfs3* und *Tfs4* kodierten, zu VirD2 homologen Relaxasen zu untersuchen, wurden Kokultivierungsexperimente mit den Deletionsmutanten (siehe 3.4.2) durchgeführt. Hierbei wurde der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* von einer Deletionsmutante in den Wildtyprezipienten *H. pylori* P12 [*moeB*::*aphA-3*] verfolgt. Die Deletion des für die putative Relaxase kodierenden Gens HPP12_1353 innerhalb von *Tfs3* zeigte im Gegensatz zur Deletion von HPP12_0451 innerhalb von *Tfs4* eine geringe Auswirkung auf die Plasmidtransferrate. Diese ist im Vergleich zum Wildtyp sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DNaseI etwa um eine Zehnerpotenz geringer (siehe Abbildung 3.23).

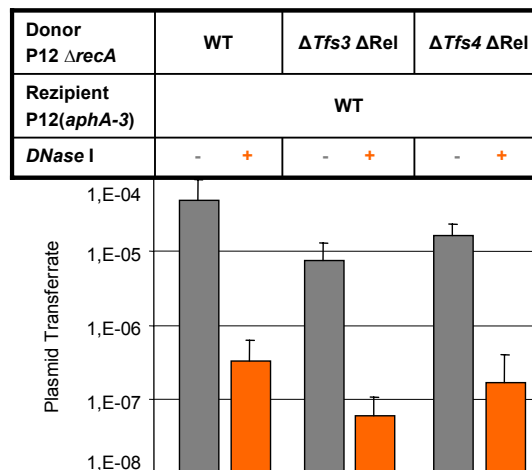


Abbildung 3.23: Untersuchung der Funktion der chromosomal kodierten Relaxasen beim Plasmidtransfer.

Zur Untersuchung der Funktion der chromosomal kodierten Relaxasen innerhalb *Tfs3* bzw. *Tfs4* für den DNaseI-resistenten Plasmidtransfer wurden Kokultivierungsexperimente mit den Deletionsmutanten SR-P430 (Δ *Tfs4* Δ HPP12_0451) und SR-P438 (Δ *Tfs3* Δ HPP12_1353) durchgeführt. Als Rezipient wurde der Stamm *H. pylori* P12 [*moeB*::*aphA-3*] (SR-P373) eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (□) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* wurde durch Selektion auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Auch nach zusätzlicher Deletion der Plasmid-kodierten Relaxase *orf04* in pHel12 war keine Veränderung der Plasmidtransferraten feststellbar. Es konnte weiterhin eine Reduzierung der Effizienz des Plasmidtransfers bei Abwesenheit der

innerhalb *Tfs3* kodierten Relaxase dokumentiert werden, jedoch beeinflusste die zusätzliche Deletion der Plasmid-kodierten Relaxase den Transfer von pHel12 nicht. Auch in Abwesenheit aller Relaxasen ($\Delta Tfs3\Delta Rel\Delta Tfs4\Delta Rel\Delta mobA$; SR-P515) ist Plasmidtransfer zu beobachten (siehe Abbildung 3.24).

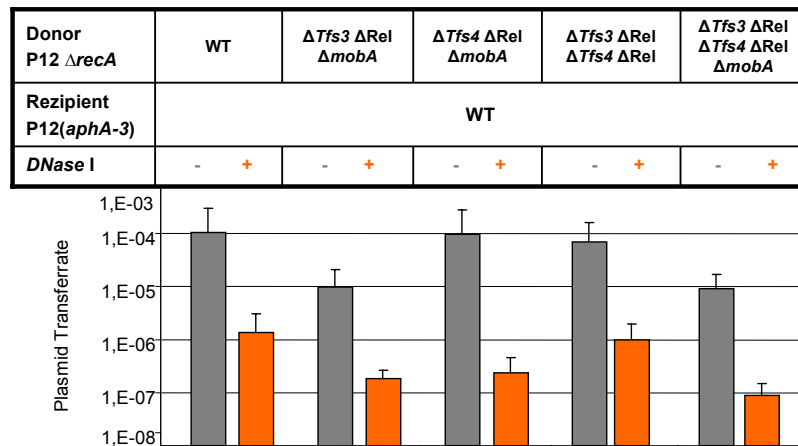


Abbildung 3.24: Untersuchung der Funktion der chromosomal und Plasmid-kodierten Relaxasen für den Plasmidtransfer.

Es wurden Kokultivierungsexperimente mit den Deletionsmutanten SR-P402 ($\Delta Tfs4 \Delta Rel \Delta mobA$), SR-P435 ($\Delta Tfs3 \Delta Rel \Delta mobA$), SR-P506 ($\Delta Tfs3 \Delta Rel \Delta Tfs4 \Delta Rel$) und SR-P515 ($\Delta Tfs3 \Delta Rel \Delta Tfs4 \Delta Rel \Delta mobA$) durchgeführt, um die Rolle der Plasmid- und chromosomal kodierten Relaxasen für den DNaseI-resistenten Plasmidtransfer zu untersuchen (siehe Tabelle 3.4). Als Rezipient wurde der Stamm *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*] (SR-P373) eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (■) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer der Plasmide pHel12::*cat* und pHel12 $\Delta mobA::cat$ wurde durch Selektion auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt

Diese Daten deuten auf einen DNaseI-resistenten neuartigen Mechanismus zur Übertragung von Plasmid-DNA hin, für den die Funktion von Relaxasen nicht essentiell ist.

3.4.6 Funktion von RecA für die Aufnahme von Plasmid-DNA

Weder für die Plasmid- noch für die chromosomal kodierten Relaxasen konnte eine signifikante Beteiligung an der Übertragung der kryptischen Plasmide zwischen *H. pylori*-Stämmen nachgewiesen werden. In mehreren Studien wurde der Transfer linearisierter DNA und eine mögliche Rolle von RecA für ihre Rezirkularisierung nach DNaseI-resistenter Übertragung im Rezipienten beschrieben (Biswas *et al.*, 1986; Wang

and Derbyshire, 2004). RecA ist Bestandteil des SOS-Reparatur-Systems und spielt bei der homologen Rekombination eine entscheidende Rolle. RecA ist auch in *H. pylori* für die DNA-Reparatur nötig und katalysiert die homologe Rekombination von DNA welche durch die natürliche Transformation zur Verfügung gestellt wird. Um eine eventuelle Beteiligung von RecA auch für die konjugative Übertragung in *H. pylori* zu zeigen, wurde *recA* im Chromosom des Rezipienten deletiert und gegen eine *erm*-Kassette ersetzt (SR-P426). Die durchgeführten Kokultivierungsexperimente lieferten weder in An- noch in Abwesenheit von DNaseI Transkonjuganten (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Funktion von RecA für die Rezirkularisierung des transferierten Plasmids ist somit nicht auszuschließen.

3.5 Weitere Charakterisierung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12

Ungefähr 50% aller klinischen *H. pylori* Isolate tragen Plasmide unterschiedlicher Größe (Penfold *et al.*, 1988). Da die Funktion dieser Plasmide im Wesentlichen nicht bekannt ist, werden sie auch kryptische Plasmide genannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einzelne Genprodukte der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 charakterisiert und bezüglich ihrer Funktion für den konjugativen Transfer untersucht.

3.5.1 Untersuchung der Funktion des kryptischen Plasmids pHel12 für seine konjugative Übertragung

3.5.1.1 Deletion von pHel12 in *H. pylori* P12

Die stabile Weitergabe der kryptischen Plasmide auf die Tochterzellen findet ohne Selektionsdruck statt (Hofreuter *et al.*, 2002). Die Stabilität dieser Plasmide lässt eine wichtige Rolle für *H. pylori* vermuten. Um mehr über die Funktion des kryptischen Plasmids pHel12 für *H. pylori* P12 herauszufinden, wurde das sogenannte „*plasmid curing*“ durchgeführt, wodurch Plasmide gezielt und dauerhaft entfernt werden können. Die Deletion des Plasmids wurde mit dem Gyraseinhibitor Novobiocin durchgeführt. Novobiocin ist ein Aminocumarin, welches die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert und somit die negative Überspiralisierung der DNA unterbindet. Die Behandlung von Zellen

mit sublethalen Dosen von Novobiocin beeinflusst das Ausmaß der Überspiralisierung der DNA und macht es somit zu einem effektiven „*plasmid curing*“-Agens (Wolfson *et al.*, 1983; Hooper *et al.*, 1984; Gado *et al.*, 1987; Luttinger, 1995).

Um die Auswirkung von Novobiocin auf die Stabilität von pHel12 zu ermitteln musste zunächst die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt werden. Durch serielle Verdünnungsreihen auf Novobiocin enthaltenden Serumagarplatten wurde die MHK von Novobiocin für *H. pylori* P12 zunächst auf 30 µg/ml festgelegt. Nach mehrmaligem Prozessieren konnte eine höhere Toleranz gegenüber Novobiocin beobachtet und die MHK schrittweise auf 60 µg/ml erhöht werden. Um den Verlust des Plasmids zu dokumentieren wurde mit Hilfe des Plasmids pSR25 eine Chloramphenicol-Kassette in das kryptische Plasmid pHel12 inseriert (SR-P310; pHel12 Δ orf08/09::*cat*). Nach siebenmaligen Passagieren von Stamm SR-P310 auf Serumagarplatten mit 60 µg/ml Novobiocin wurde der Verlust des Plasmids aufgrund Chloramphenicol-Sensitivität, durch Plasmidisolierung und eine spezifische PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden SR4/SR5 bestätigt (Abbildung 3.25).

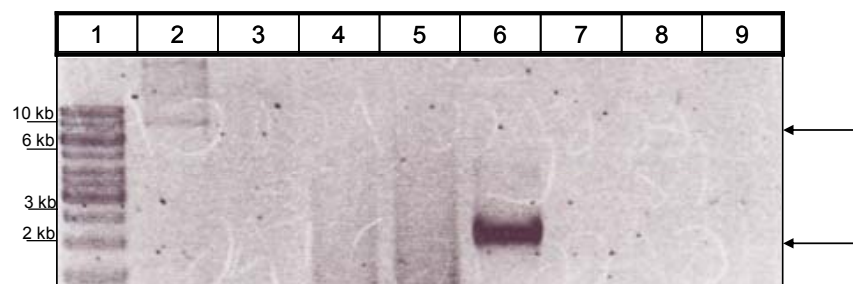


Abbildung 3.25: Deletion von pHel12 in *H. pylori* P12.

Zur Bestätigung der Abwesenheit von pHel12 wurde Plasmid-DNA aus dem Wildtyp-Stamm *H. pylori* P12 (Spur 2) und den potentiell Plasmid-freien Stämmen isoliert (Spur 3-5). Zudem wurde eine spezifische PCR mit der isolierten Plasmid-DNA und den Oligonukleotiden SR4 und SR5 durchgeführt (Spur 6-9). Spur 6: *H. pylori* P12 Wildtyp; Spur 7-9: *H. pylori* P12 Δ pHel12.

3.5.1.2 Das kryptische Plasmid pHel12 ist essentiell für die Plasmidaufnahme im Rezipient

Der Plasmid-freie Stamm wurde in Kokultivierungsexperimenten als Rezipient eingesetzt, nachdem die *aphA-3*-Kassette mit Hilfe des Plasmids pSR20 in den *moeB*-Locus inseriert wurde (SR-P375). Als Donorstamm wurde der Wildtypstamm SR-P172 eingesetzt und der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* durch Selektion der

Transkonjuganten auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt. Es wurde eine höhere Plasmidtransferrate erwartet, da das Vorhandensein von zwei ca. 10 kb großen pHel12-Plasmiden in den Transkonjuganten zu Problemen führen könnte. Erstaunlicherweise führte die Abwesenheit des Plasmids pHel12 im Rezipienten zum kompletten Verlust der Fähigkeit als funktioneller Rezipient zu dienen (siehe Abbildung 3.26). Der Transfer des Plasmids pHel12::cat aus dem Donorstamm SR-P172 in den Plasmid-freien Rezipienten war nicht mehr möglich. Da das „*plasmid curing*“ durch Novobiocin nicht zu sonstigen Mutationen führen sollte, ist davon auszugehen, dass das Plasmid pHel12 eine wichtige Rolle für die Plasmidaufnahme durch den Rezipienten in Kokultivierungsexperimenten spielt.

Um die Rolle der Anwesenheit von pHel12 für die Aufnahme von Plasmiden durch den Rezipienten zu bestätigen und eine anderweitige Veränderung des Stamms durch die Behandlung mit Novobiocin auszuschließen, wurde das Plasmid pHel12 $\Delta orf08/09::aphA3$ aus Stamm SR-P385 wieder in den Plasmid-freien Stamm *H. pylori* P12 $\Delta pHel12$ (SR-P27) transformiert.

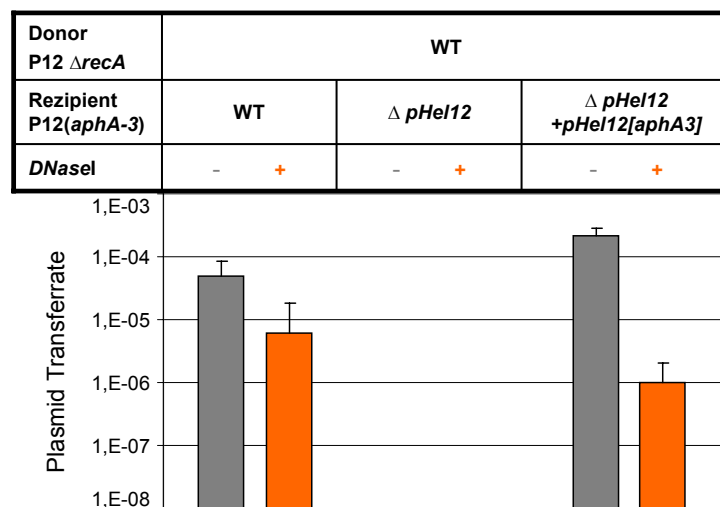


Abbildung 3.26: Rolle des kryptischen Plasmids pHel12 für die Funktionalität des Rezipienten.

Zur Charakterisierung der Rolle des Plasmids pHel12 für den Rezipienten wurde der WT-Donor *H. pylori* P12 pHel12::cat (SR-P172) und ein WT-Rezipient (SR-P373; *H. pylori* P12 [*moeB::aphA-3*]), ein Plasmid-freier P12 ($\Delta pHel12$; SR-P375) und ein wieder das Plasmid pHel12 enthaltender Plasmid-freier Stamm (P12 $\Delta pHel12$ +pHel12[*aphA-3*]; SR-P389) als Rezipient in Kokultivierungsexperimenten eingesetzt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (■) von DNaseI durchgeführt. Der Transfer von pHel12::cat wurde durch Selektion auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

Die Effizienz dieser Transformation war verglichen mit einer Transformation des Wildtyps *H. pylori* P12 sehr schlecht. Erst nach vielen Versuchen konnte ein Klon mit Plasmid identifiziert werden. Dieser wurde auf Anwesenheit des Plasmids hin untersucht und bestätigt. Kokultivierungsexperimente mit *H. pylori* Δ pHel12 + pHel12 Δ orf08/09::aphA3 (SR-P389) als Rezipient und einem Wildtyp-Donor (SR-P172) zeigten, dass durch die erneute Anwesenheit des Plasmids die Fähigkeit in Kokultivierungsexperimenten als Rezipient zu dienen, wieder hergestellt werden konnte. Die resultierenden Transferraten des Plasmids waren vergleichbar mit dem Wildtypexperiment (Abbildung 3.26).

3.5.1.3 Charakterisierung der Funktion einzelner Genprodukte von pHel12 für den Transfer des Plasmids

Ob die Eigenschaft als funktioneller Rezipient beim DNA-Transfer zu agieren auf der Anwesenheit des Plasmids pHel12 im Speziellen, auf der Funktion eines bestimmten Genproduktes von pHel12 beruht oder auch durch ein anderes Plasmid erreicht werden kann, wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht.

Hierzu wurden die Shuttle-Vektoren pHel3 und pHel6 in den Plasmid-freien *H. pylori* P12 transformiert. Der in *E. coli* und *H. pylori* replizierende Shuttlevektor pHel3 zeichnet sich durch die Anwesenheit des für eine Replikase kodierenden Gens *repA*, der *aphA-3*-Resistenzkassette, des Replikationsursprungs aus dem Plasmid ColE1 (*oriV*) und des Transferursprungs *oriT* (*origin of transfer*) aus (Abbildung 3.27) (Heuermann *et al.*, 1998). Das Plasmid pHel6 enthält neben den Genen *repA*, *aphA-3* und *oriV* die putative *nic-site* und das für die Relaxase kodierende Gen *orf4C* aus pHel4 (*mobA*). Außerdem enthält pHel6 ein *mobC*-Homolog, *orf4F*, welches im Relaxosom als Keil agiert und bei der Trennung der dsDNA beteiligt ist (Zhang and Meyer, 1997) (Abbildung 3.27).

Die Effizienz der Transformation, Konjugation und Elektroporation der Plasmide pHel3 bzw. pHel6 in den Plasmid-freien *H. pylori* P12 Δ pHel12 (SR-P27) war sehr gering. Dies bekräftigt die Hypothese, dass das Plasmid pHel12 für die Aufnahme von Plasmid-DNA im Rezipienten eine Rolle spielt.

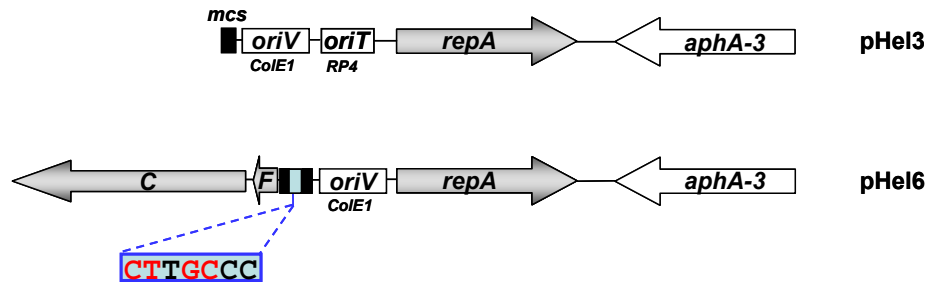


Abbildung 3.27: Graphische Darstellung eines Ausschnitts der Shuttle-Vektoren pHel3 und pHel6.

Der Shuttlevektor pHel3 enthält neben dem für die Replikase kodierenden Gen *repA* die Kanamycin-Resistenz vermittelnde *aphA-3*-Kassette, den ColE1-Replikationsursprung *oriV* und den RP4 *origin oriT* (*origin of transfer*), welcher eine wichtige Rolle für die Mobilisierung des Plasmids spielt (Heuermann & Haas 1998). Das Plasmid pHel6 enthält neben den Genen *repA*, *aphA-3* und *oriV* die putative *nic-site* CTTGCCC für die Relaxase *orf4C* (MobA) und *orf4F* (MobC) aus pHel4.

Die das Plasmid pHel3 bzw. pHel6 enthaltenden Stämme (SR-P497 bzw. SR-P512) wurden als Rezipient in Kokultivierungsexperimenten mit dem Wildtypdonor *H. pylori* pHel12::*cat* (SR-P172) eingesetzt. Der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* wurde durch Selektion der Transkonjuganten auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt. Wurde *H. pylori* P12 Δ pHel12 + pHel3 (SR-P497) als Rezipient eingesetzt, konnten weder in An- noch in Abwesenheit von DNaseI Transkonjuganten nachgewiesen werden. Somit ist die Anwesenheit des Plasmids pHel3 im Rezipienten nicht ausreichend um die Fähigkeit zur Plasmidaufnahme in *H. pylori* P12 Δ pHel12 wiederherzustellen. Dies bestätigt auch die geringe Transformationseffizienz von *H. pylori* P12 Δ pHel12. Auch in Abwesenheit von DNaseI sind keine Transformationsereignisse bei der Kokultivierung von SR-P172 und SR-P497 nachzuweisen. Das Plasmid pHel6 konnte die Fähigkeit der Plasmidaufnahme durch den Rezipienten nur teilweise, nämlich in Abwesenheit von DNaseI und im Vergleich zum Wildtyp in geringerem Ausmaß, wieder herstellen (siehe Abbildung 3.28). Diese Daten veranschaulichen, dass die Anwesenheit von pHel12 in *H. pylori* P12 für die effiziente Transformation und Konjugation von Plasmid-DNA entscheidend ist. Auch die Anwesenheit einer auf pHel6 kodierten Relaxase und eines *oriT* mit *nic-site* stellen die Fähigkeit zur Plasmidaufnahme nur teilweise, nämlich in DNaseI-sensitiver Weise, wieder her. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Transfer des Plasmids pHel12::*cat* in DNaseI-resistenten, konjugativen Prozessen nur in einen Wildtyprezipienten, welcher das Plasmid pHel12 enthält, möglich war. Die Fähigkeit als funktioneller Rezipient zu agieren konnte nicht durch die Anwesenheit des Plasmids

pHel3 im Rezipienten *H. pylori* P12 Δ pHel12 (SR-P27) wiederhergestellt werden. Die Anwesenheit des Plasmids pHel6 ermöglichte nur den DNA-Transfer innerhalb DNaseI-sensitiver Transformation.

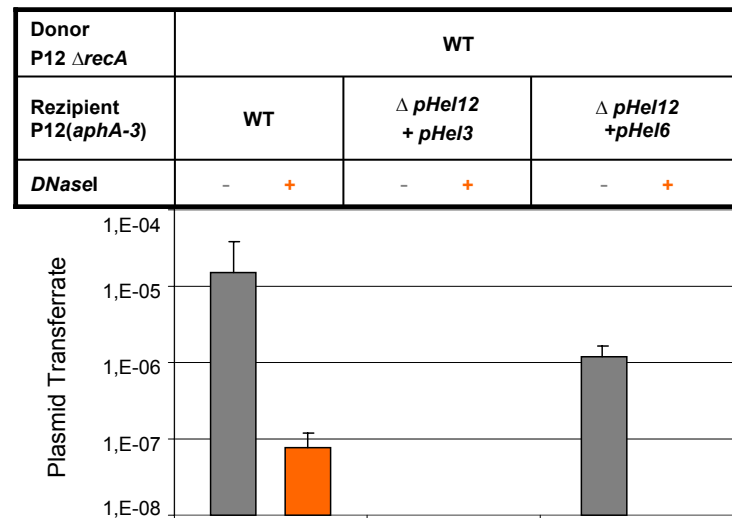


Abbildung 3.28: Beeinflussung des Plasmidtransfers durch die Shuttle-Vektoren pHel3 und pHel6 in *H. pylori* P12 Δ pHel12-Rezipienten.

Es wurden Kokultivierungsexperimente mit dem WT-Donor SR-P172 (*H. pylori* P12 pHel12::*cat*) und mit den Rezipienten P12 [*moeB::aphA-3*] (SR-P373), P12 Δ pHel12 + pHel3 (SR-P497) und P12 Δ pHel12 + pHel6 (SR-P512) durchgeführt. Der Transfer von pHel12::*cat* wurde durch Selektion der Transkonjuganten auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt. Die Experimente wurden sowohl in An- (■) als auch in Abwesenheit (□) von DNaseI durchgeführt. Die Plasmidtransferrate wurde als Anzahl der Transkonjuganten pro CFU/ml bestimmt und logarithmisch dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung ermittelt.

3.5.2 Identifizierung eines putativen Toxin-Antitoxin-Systems in den kryptischen Plasmiden pHel4 und pHel12

Bei der Sequenzanalyse von pHel4 und pHel12 konnte mit Hilfe von Datenbankrecherchen ein putatives Toxin-Antitoxin-System (TA-System) identifiziert werden. Toxin-Antitoxin-Systeme dienen zur Aufrechterhaltung und stabilen Weitergabe eines Plasmids in einer Bakterienpopulation während der Replikation. Plasmid-freie Tochterzellen werden abgetötet und somit die Stabilität des Plasmids in einer Bakterienpopulation gewährleistet. TA-Systeme setzen sich aus einem instabilen Antitoxin und einem stabilen Toxin zusammen. Gewöhnlich ist das Antitoxin stromaufwärts des Toxins kodiert. Nukleotidsequenzanalysen haben eine Zuordnung des putativen TA-Systems von pHel4, bestehend aus dem Antitoxin *orf4G* und dem

Toxin *orf4H*, zur RelE-Familie ergeben. Mitglieder dieser TA-System-Familie hemmen die Translation durch Spaltung der mRNA (Gotfredsen and Gerdes, 1998; Gerdes *et al.*, 2005).

3.5.2.1 Klonierung der Komponenten des putativen TA-Systems von pHel4

Um Aussagen über die eventuelle Funktion des mutmaßlichen TA-Systems in pHel4 treffen zu können, wurde eine Klonierung des Antitoxins *orf4G*, des Toxins *orf4H* sowie der beiden Gene zusammen in die Polylinker (*multiple cloning site*, MCS) des Duet-Vektors pACYC-Duet mit den Schnittstellen *NcoI/SalI* bzw. *NdeI/XhoI* angestrebt. Hierzu wurde das Antitoxin mit den Oligonukleotiden SR44/SR45 und das Toxin mit SR46/SR47 und pHel4 als Template amplifiziert. Auch nach mehrmaligen Versuchen blieb die Klonierung des putativen Toxins erfolglos, wohingegen die Klonierung des putativen Antitoxins *orf4G* kein Problem darstellte. Die Sequenz des putativen Toxins enthielt immer Punktmutationen. Auch die Klonierung im *E. coli*-Stamm C43 (DE3), welcher toleranter gegenüber toxischen Genprodukten ist als *E. coli* BL21 (DE3), blieb erfolglos (Miroux and Walker, 1996). Die Expression des potentiellen Antitoxins *orf4G* in *E. coli* BL21 (DE3) zeigte keine Beeinflussung der Wachstumsrate (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Probleme, die die Klonierung des putativen Toxins verursachte, ist davon auszugehen, dass es sich tatsächlich um ein solches handelt.

3.5.2.2 Mögliche Rolle des TA-Systems in pHel12 für die Stabilität des Plasmids und den Plasmidtransfer

Toxin-Antitoxin-Systeme spielen für die Stabilität von Plasmiden in einer Bakterienpopulation, beim programmierten Zelltod und Zellzyklusarrest eine große Rolle (Hayes, 2003). Erhält eine Tochterzelle im Laufe der Replikation kein Plasmid, wird das labile Antitoxin nicht mehr nachproduziert und schneller als das Toxin abgebaut. Die Aktivität des Toxins führt zur Hemmung der Teilung oder zum Tod der Plasmid-freien Bakterienzelle. Sowohl in pHel4 als auch in pHel12 konnte ein putatives Toxin-Antitoxin-System nachgewiesen werden. Diese könnten für die Stabilität der kryptischen Plasmide in *H. pylori* eine Rolle spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das putative Toxin-Antitoxin-System in pHel12 deletiert und durch die *cat_{GC}*-Kassette

ersetzt. Hierfür wurde das Plasmid pSR25 in *H. pylori* P12 transformiert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination konnte die Deletion des putativen TA-Systems und die Insertion des Selektionsmarkers mit den spezifischen Oligonukleotiden CH123 und CH126 innerhalb einer PCR und anschließender Sequenzierung bestätigt werden (SR-P310; *H. pylori* P12 pHel12 $\Delta orf08/09::cat$). Auch nach 35maligem Passagieren von SR-P310 auf Serumagarplatten ohne Selektionsdruck wurde das Plasmid pHel12 $\Delta orf08/09::cat$ stabil an die Tochterzellen weitergegeben und konnte nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde SR-P310 als Donor für Kokultivierungsexperimente eingesetzt. Als Rezipient wurde der Wildtypstamm SR-P373 und der Plasmid-freie SR-P375 eingesetzt. Alle Experimente wurden auch mit einem Wildtyp-Donor (SR-P172; *H. pylori* P12 pHel12::cat) zur Kontrolle durchgeführt. Der Transfer des Plasmids pHel12::cat wurde durch Selektion der Transkonjuganten auf Chloramphenicol und Kanamycin verfolgt.

Auch nach der Deletion des putativen Toxin-Antitoxin-Systems im Plasmid pHel12 des Donors war kein Plasmidtransfer in den Plasmid-freien Rezipienten möglich. Die Hypothese, dass der Transfer des Plasmids pHel12 $\Delta orf08/09::cat$ in den Plasmid-freien P12 wieder möglich ist, wenn weder im Donor noch im Rezipienten ein Plasmid-kodiertes TA-System vorhanden ist, konnte nicht bestätigt werden.

3.5.3 Identifizierung und Charakterisierung einer Fic-Domäne innerhalb der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12

Die Übertragung von AMP (AMPylierung) auf GTPasen der Rho-Familie wurde kürzlich in mehreren Studien als neuer Mechanismus der posttranslationalen Modifikation in eukaryotischen Zellen durch pathogene Mikroorganismen beschrieben (Worby *et al.*, 2009; Yarbrough *et al.*, 2009). Proteine, die eine sogenannte Fic (*filamentation induced by cyclic adenosine monophosphate*)-Domäne enthalten, sind in der Lage, mit Hilfe eines konservierten Histidin-Rest des Kernmotivs (HPFxxGNGR) zelluläre Prozesse in der Wirtzelle durch AMPylierung zu regulieren (Abbildung 3.29) (Roy and Mukherjee, 2009). In den kryptischen Plasmiden pHel4 und pHel12 konnte das Kernmotiv einer Fic-Domäne innerhalb der Aminosäuresequenz von Orf4M und Orf12M (HPP12_p11; *orf11*) identifiziert werden, woraufhin die möglichen Zytotoxine genauer untersucht wurden.

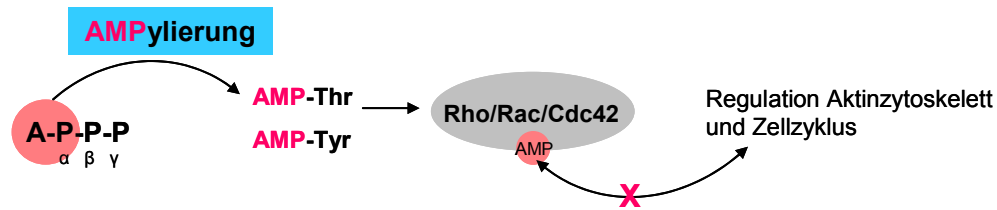


Abbildung 3.29: AMPylierung.

Bei der AMPylierung handelt es sich um eine kürzlich beschriebene posttranslationale Modifikation, die von pathogenen Mikroorganismen genutzt wird. Durch Übertragung eines AMPs (●) auf eine konservierte Aminosäure in der *switch-1*-Region der Rho-GTPasen Rho, Rac oder Cdc42 (**T**hreonin oder **T**yrosin) werden diese inaktiviert und somit die Interaktion mit deren Effektoren inhibiert. Dies hat Auswirkungen auf die Zellmorphologie und den Zellzyklus (Yarbrough and Orth, 2009).

3.5.3.1 Identifizierung einer Fic-Domäne in pHel4 und pHel12

Die Gene in den kryptischen Plasmiden pHel4 und pHel12, welchen bisher keine (putative) Funktion zugeordnet werden konnte, wurden Nukleotidsequenzanalysen unterzogen. Hierbei konnte sowohl in pHel4, als auch in pHel12 eine Fic-Domäne innerhalb der Aminosäuresequenz von Orf4M bzw. HPP12_p11 (Orf12M) identifiziert werden (siehe Abbildung 3.30).

pHel4 Orf4M (GI:20502850)

```
MLSTKSTDNYDKVMDYKELLEFDDYAMDLTIRMAHHNSAMEGNN
LTLGDTMSILIDRKTPIKSVSLDEVHEIENYRNFVPLILEFLERDKIIDEHLIGHFHFS
VLMRNILPDFGKFKTTYNEIIGAKKPTASPIMVQPRINNLCLKIQDEALLNLSGEEKI
KKIAEHHIEFEEIHPFSDGNGR TGRALMFYQTIKANLTPFVIEVSARSEYMHAMREQD
ANALVGIIKNCQKIELEKIERIAAILKERRAANFSVKKS
```

pHel12 HPP12_p11 (GI:210135781)

```
MMDYKELLEFDDYAMDLTIRMAHHNSAMEGNNLTLGDTMSILID
RKTPIKSVSLDEVHEIENYRNFVPLILEFLERDKVIDEHLIGHFHFSVLMRNILPDFG
KFKTTYNEIIGAKKPTASPIMVQPRINDLCLKIQDEALLNLSGEEKIKKIAEHHIEF
EEIHPFSDGNGR TGRALMFYQTIKANLTPFVIEVSARSEYMHAMREQDANALVGIIK
NCQKIELEKIERIAAILKERRAANFSVKKS
```

Abbildung 3.30: Aminosäuresequenz von Orf4M und HPP12_p11 (Orf12M) aus pHel4 bzw. pHel12.

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von Orf4M aus pHel4 und Orf12M aus pHel12. Rot markiert ist das identifizierte, konservierte Kernmotiv HPFSDGNGR der Fic-Domäne.

Das Kernmotiv der Fic-Domäne zeichnet sich N-terminal durch die konservierten Aminosäuren Histidin, Prolin und Phenylalanin (HPF) und C-terminal durch Glycin, Asparagin, Glycin und Arginin (GNGR) aus. Die variablen Aminosäuren in der Mitte sind in beiden Fällen Serin und Asparaginsäure (SD).

3.5.3.2 Die Expression der Gene *orf4M* und *orf12M* in eukaryotischen Zellen stört das Aktinzytoskelett

Zur Charakterisierung möglicher Effekte der Expression der Gene *orf4M* und *orf12M* in eukaryotischen Zellen, wurden diese amplifiziert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech) kloniert. Hierzu wurden die Oligonukleotide SR99/SR100 bzw. SR105/106, welche die Restriktionsschnittstellen *XhoI/SalI* bzw. *EcoRI/SalI* enthalten, eingesetzt und das spezifische PCR-Produkt mit den kryptischen Plasmiden pHel4 bzw. pHel12 als Template erzeugt. Die resultierenden Plasmide pEGFP_*orf4M* und pEGFP_*orf12M* wurden wie unter 2.2.4.2 beschrieben in AGS-Zellen transfiziert. Nach 17 Stunden wurde die Produktion des Fusionsproteins Orf4M-EGFP exemplarisch mit Hilfe des Antikörpers α -GFP im Westernblot überprüft und bestätigt (siehe Abbildung 3.31). Während die Produktion von EGFP in einer ca. 27 kDa großen Bande resultierte, war das Fusionsprotein auf einer Laufhöhe von etwa 60 kDa lokalisiert.

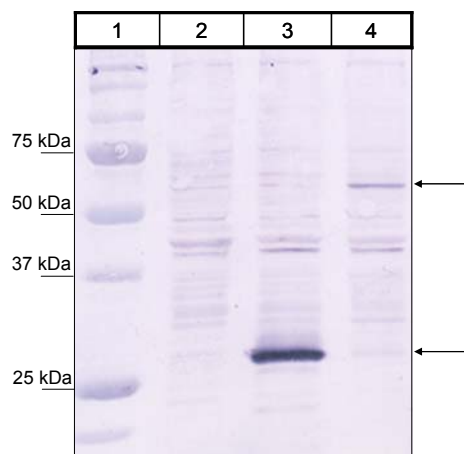


Abbildung 3.31: Nachweis der Expression von *orf4M*-EGFP.

Zum Nachweis der Produktion des Fusionsprotein Orf4M-EGFP wurde nach 17-stündiger Expression ein Western-Blot mit dem Antikörper α -GFP durchgeführt. 1: Prestained Marker Bio-Rad; 2: AGS-Zellen, nicht-transfiziert; 3: Transfektion mit pEGFP-N1; 4: Transfektion mit pEGFP_*orf4M*.

Eine Produktion des Fusionsproteins konnte erst nach 17 h nachgewiesen werden. Das geringe Maß der Expression könnte mit der Toxizität der untersuchten Proteine in Zusammenhang gebracht werden, da die Ausbeute an lebenden, transfizierten Zellen mit dem Kontrollplasmid viel höher als mit den Plasmiden pEGFP_orf4M und pEGFP_orf12M war. Um Aussagen über die vermutete Zytotoxizität der Proteine zu treffen, wurden die Zellen nach 8-stündiger Produktion des EGFP-Fusionsproteins fixiert, das Aktinzytoskelett mit Phalloidin und der Zellkern mit DAPI angefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Wie für die in der Literatur beschriebenen, die Fic-Domäne enthaltenden Proteine VopS (*v*ibrio *o*uter *p*rotein *S*) aus *Vibrio parahaemolyticus* (Yarbrough *et al.* 2009) und IbpA (*i*mmunoglobulin *b*inding *p*rotein *A*) aus *Histophilus somni* (Worby *et al.* 2009) ist eine Veränderung der Zellmorphologie nach Transfektion der Plasmide pEGFP_orf4M und pEGFP_orf12M zu erkennen. Im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Kontrollvektor pEGFP-N1 (siehe Abbildung 3.32) transfiziert wurden ist auffällig, dass viele mit pEGFP_orf4M und pEGFP_orf12M transfizierte Zellen einen runden Phänotyp aufweisen (siehe Abbildung 3.33).

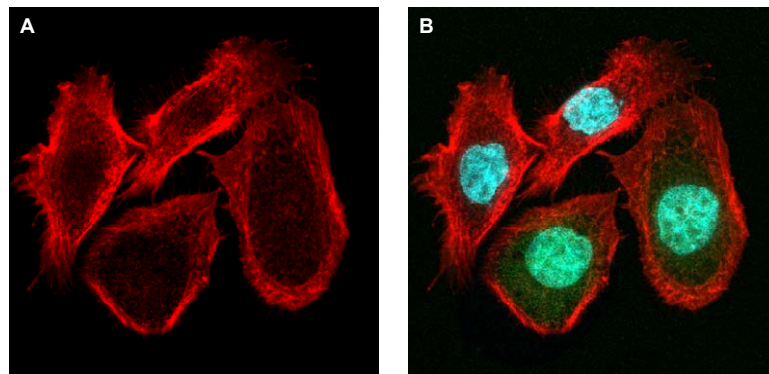


Abbildung 3.32: Transfektion von AGS-Zellen mit pEGFP-N1.

Nach Transfektion der AGS-Zellen mit dem Vektor pEGFP-N1 und 8-stündiger Expression von *egfp* wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin angefärbt und der Zellkern mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. **A:** Phalloidin-Färbung von AGS-Zellen nach Transfektion mit pEGFP-N1; **B:** Phalloidin- und DAPI-gefärbte AGS-Zellen nach Transfektion mit pEGFP-N1. Überlagerung der Kanäle für GFP, DAPI und Phalloidin-Tritic.

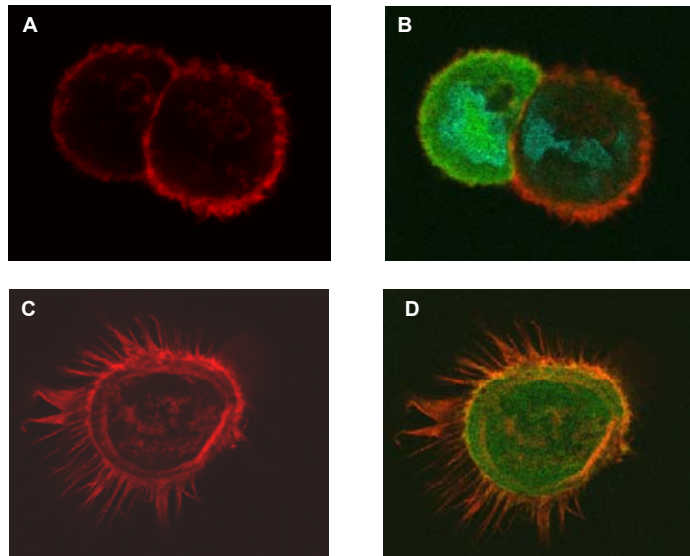


Abbildung 3.33: Abrundung der AGS-Zellen nach Expression von *orf4M*- und *orf12M*-EGFP.

Die Plasmide pEGFP_*orf4M* und pEGFP_*orf12M* wurden in AGS-Zellen transfiziert und die Morphologie der Zellen nach 8-stündiger Produktion der EGFP-Fusionsproteine untersucht. Das Aktinzytoskelett der fixierten Zellen wurde mit Phalloidin sichtbar gemacht und der Zellkern mit DAPI angefärbt.

A: Transfektion mit pEGFP_*orf4M*. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin gefärbt.

B: Transfektion mit pEGFP_*orf4M*. Überlagerung der Kanäle für GFP, DAPI und Phalloidin-Tritic.

C: Transfektion mit pEGFP_*orf12M*. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin gefärbt.

D: Transfektion mit pEGFP_*orf12M*. Überlagerung der Kanäle für GFP, DAPI und Phalloidin-Tritic.

Hierbei kann es sich sowohl um tote Zellen, als auch um Zellen mit veränderter Morphologie des Zytoskeletts handeln. Die Aufrechterhaltung der Stabilität des Zytoskeletts ist nicht mehr gewährleistet. Im Vergleich zur Kontrolle waren eine Veränderung des Aktinzytoskeletts und eine Ablösung der Plasmamembran zu beobachten (Abbildung 3.34). Diese Daten lassen eine zytotoxische Aktivität der auf den kryptischen Plasmiden kodierten Proteine Orf4M und Orf12M vermuten.

Die Kokultivierung von AGS-Zellen mit verschiedenen *H. pylori*-Mutanten und die Quantifizierung des Anteils toter AGS-Zellen in einer Population durch Propidiumjodid-Färbung wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob unter Kokultivierungsbedingungen eine Zytoskelettveränderung in humanen Zellen durch *H. pylori* induziert werden kann.

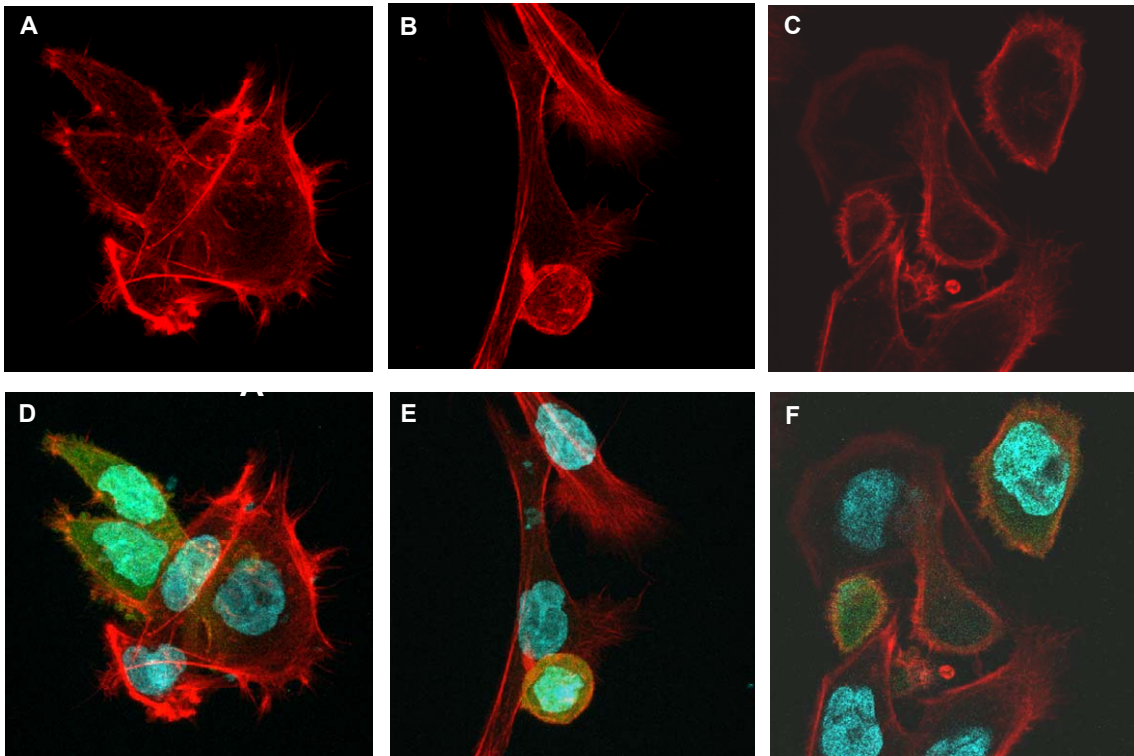


Abbildung 3.34: Auswirkung der Expression von *orf4M*- und *orf12M*-EGFP auf AGS-Zellen.

Die Plasmide pEGFP_*orf4M* und pEGFP_*orf12M* wurden in AGS-Zellen transfiziert und die Morphologie der Zellen nach 8-stündiger Produktion der EGFP-Fusionsproteine untersucht. Abbildung A, B, D und E zeigen AGS-Zellen nach der Transfektion mit pEGFP_*orf4M*. Abbildung C und F zeigen mit pEGFP_*orf12M* transfizierte Zellen. Das Aktinzytoskelett der fixierten Zellen wurde mit Phalloidin sichtbar gemacht und der Zellkern mit DAPI angefärbt. Abbildung A, B und C zeigen das Phalloidin-gefärbte Aktinzytoskelett, Abbildung D, E und F zeigen eine Überlagerung der Kanäle für GFP, DAPI und Phalloidin-Tritic. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.5.3.3 Quantifizierung des Anteils toter Zellen in einer AGS-Zellpopulation nach Expression von *orf4M* bzw. *orf12M*

Zur Bestätigung der durch die mikroskopische Untersuchung erlangten Erkenntnisse bezüglich der möglichen Zytotoxizität von Orf4M und Orf12M wurde der Anteil toter Zellen in einer Population von AGS-Zellen nach 8-stündiger Expression von *orf4M* und *orf12M* mit Hilfe einer Propidiumjodid-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Propidiumjodid diffundiert durch die beschädigte Zellmembran toter Zellen und interkaliert mit der DNA-Doppelhelix. Nach der Transfektion der Plasmide pEGFP-N1 (Kontrolle), pEGFP_*orf4M* und pEGFP_*orf12M* und 8-stündiger Produktion der (Fusions-)Proteine wurde der prozentuale Anteil der toten, gefärbten Zellen in der jeweiligen Population im Vergleich zur jeweiligen ungefärbten Probe (=100%) ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die

Expression von *orf4M*, als auch von *orf12M* den Anteil toter Zellen in der Gesamtpopulation im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 3.35).

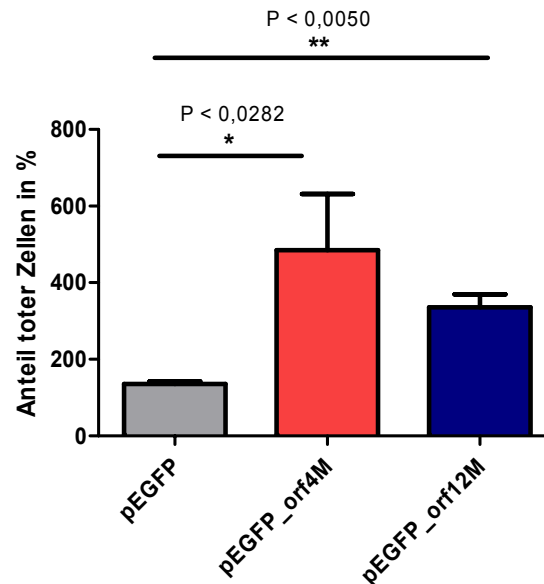


Abbildung 3.35: Anteil toter Zellen in einer AGS-Population nach Transfektion mit pEGFP-N1, pEGFP_orf4M und pEGFP_orf12M.

Die Bestimmung des Anteils toter Zellen in einer AGS-Population nach Transfektion der Plasmide pEGFP-N1, pEGFP_orf4M und pEGFP_orf12M und 8-stündiger Produktion der Proteine erfolgte mit Hilfe der Propidiumjodidfärbung im Durchflusszytometer. Es wurde der prozentuale Anteil toter Zellen im Vergleich zur jeweiligen ungefärbten Probe (=100%) ermittelt. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und die Standardabweichung und Signifikanz mit Hilfe des t-Tests ermittelt.

Dies bestätigt die Hypothese, dass die Produktion von Orf4M und Orf12M in AGS-Zellen zytotoxische Auswirkungen hat und zum Tod der Zellen führt.

3.5.3.4 Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori* P12-Mutanten zur Bestätigung der Funktion von *orf12M*

Um die zytotoxische Aktivität von Orf12M näher zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten hergestellt und AGS-Zellen infiziert. Eventuelle Effekte auf die Morphologie und Vitalität der Zellen wurden durch die Anfärbung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin und durch die Quantifizierung des Anteils toter Zellen mit Hilfe einer Propidiumjodidfärbung überprüft. Für die Infektion wurden Δ cag-PAI- und Δ vacA-Mutanten hergestellt und eingesetzt, da eine Beeinträchtigung der Zellen

durch die Zytotoxine CagA und VacA ausgeschlossen werden sollte. Die Deletion von *vacA* erfolgte mit Hilfe des Plasmids pWS102. Die Deletion der für die *cag*-PAI kodierenden Gene wurde mit dem Plasmid pSR18 durchgeführt. Neben einem das Wildtyp-Plasmid pHel12 enthaltenden Stamm (SR-P465), wurde ein Plasmid-freier Stamm (SR-P469) und eine $\Delta orf12M$ -Mutante (SR-P490) für die Infektion eingesetzt. Für die Deletion von *orf12M* und die Insertion der *cat_{GC}*-Kassette wurde das Plasmid pSR34 eingesetzt, welches mit Hilfe der Oligonukleotide SR79 und SR80 und dem Plasmid aus Klon 2kb_03_J19 aus der Klonbank erzeugt wurde.

Die mikroskopische Auswertung der Kokultivierungsansätze zeigte, dass alle eingesetzten *H. pylori*-Mutanten in der Lage sind an die AGS-Zellen zu adhären (siehe Abbildung 3.36). Eine eindeutige Aussage über das Zytotoxizitätspotential der untersuchten Stämme konnte allerdings mit Hilfe der mikroskopischen Auswertung nicht getroffen werden.

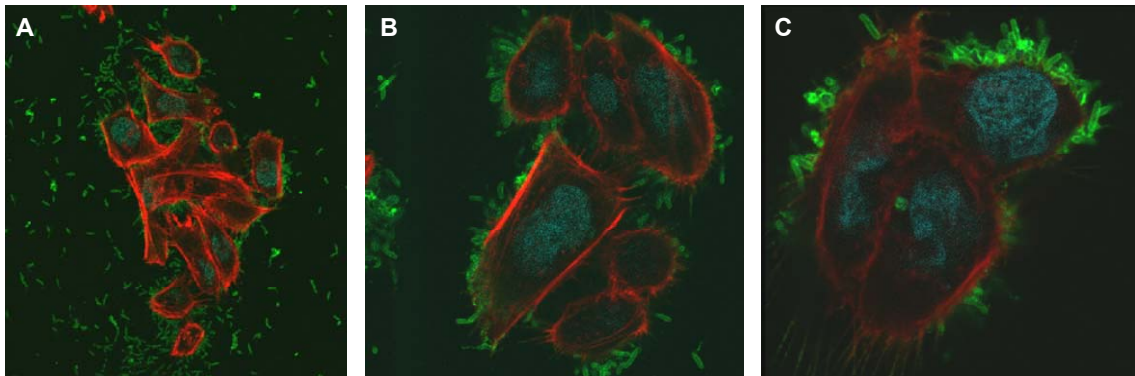


Abbildung 3.36: Kokultivierung verschiedener *H. pylori* Stämme mit AGS-Zellen.

Zur Bestimmung des möglichen Zytotoxizitätspotential von *orf12M* wurden die *H. pylori*-Mutanten SR-P465 (A; $\Delta vacA \Delta cag\text{-PAI}$), SR-P469 (B; $\Delta vacA, \Delta cag\text{-PAI} \Delta p\text{Hel}12$) und SR-P490 (C; $\Delta vacA, \Delta cag\text{-PAI} \Delta orf12M$) mit AGS-Zellen kokultiviert. Nach 4-stündiger Inkubation wurden die Präparate fixiert, die AGS-Zellen mit Phalloidin und DAPI und *H. pylori* mit AK175 und IgG-Alexa488 gefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

Eine Bestimmung des Anteils toter AGS-Zellen nach 6-stündiger Kokultivierung mit den *H. pylori* Stämmen SR-P465 (A; $\Delta vacA \Delta cag\text{-PAI}$), SR-P469 (B; $\Delta vacA, \Delta cag\text{-PAI} \Delta p\text{Hel}12$) und SR-P490 (C; $\Delta vacA, \Delta cag\text{-PAI} \Delta orf12M$) mit Hilfe der Propidiumjodidfärbung wurde durchgeführt, um die mögliche Zytotoxizität des auf dem Plasmid pHel12 kodierten potentiellen Toxin Orf12M zu ermitteln.

Der Anteil toter Zellen war bei allen Kokultivierungen vergleichbar hoch (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Versuchsansatz konnten keine Aussagen bezüglich der möglichen Zytotoxizität von Orf12M getroffen werden.

4 Diskussion

4.1 Mechanismen des DNA-Transfers zwischen *H. pylori* Stämmen, horizontaler Gentransfer und die Erzeugung genetischer Variabilität

Eine der beeindruckendsten Eigenschaften von *H. pylori* ist seine enorme genetische Variabilität (Akopyanz *et al.*, 1992b; Alm *et al.*, 1999; Suerbaum and Achtman, 2004). Durch den Transfer von DNA zwischen verschiedenen Stämmen und durch die Integration von genetischem Material vor allem in den Plastizitätsregionen wird die Stamm-spezifische Diversität erhöht (Fischer *et al.*, 2010). Eine wichtige Grundlage für die Beschaffung von neuartigem genetischem Material ist die natürliche Kompetenz von *H. pylori*, welche die Aufnahme von DNA durch Transformation aus dem umgebenden Milieu ermöglicht (Hofreuter *et al.*, 2001). Neben der Fähigkeit zur natürlichen Transformation, welche mit großer Effizienz zum horizontalen Gentransfer beiträgt, ist auch ein konjugativer DNA-Transfer-Mechanismus zwischen *H. pylori*-Stämmen beschrieben (Kuipers *et al.* 1998; Backert *et al.* 2005). So finden der Transfer von chromosomalen Markern und auch die Mobilisierung von *E. coli*-*H. pylori* Shuttle-Vektoren in DNaseI-resistenter, konjugativer Weise zwischen *H. pylori*-Stämmen statt (Kuipers *et al.* 1998; Backert *et al.* 2005). Der dieser Art des Transfers zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Kuipers und Kollegen zeigten bereits im Jahr 1998, dass chromosomale Resistenzmarker sowohl in DNaseI-sensitiver, als auch in DNaseI-resistenter Art und Weise übertragen werden können. Der Transfer erfolgt in Anwesenheit von DNaseI unidirektional, wohingegen in Abwesenheit von DNaseI bidirektionale Übertragung von DNA durch Transformation erfolgt. Dieser DNaseI-resistente Transfer erfordert direkten Zell-Zell-Kontakt und konnte von der DNA-Übertragung durch Transduktion, durch Protein-geschützte DNA und Membranvesikel abgegrenzt werden (Kuipers *et al.* 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Transfer von *E. coli*-*H. pylori*-Shuttle-Vektoren zwischen *H. pylori*-Stämmen in DNaseI-resistenter Weise von einem, zum Kopplungsprotein TraG homologen Protein und der putativen, chromosomal kodierten Relaxase Rlx1 abhängig ist (Backert *et al.*, 2005). Dies erfordert ebenso wie die Übertragung chromosomaler Marker direkten Zell-Zell-Kontakt und ist unabhängig von der DNA-Übertragung durch Transduktion (Backert *et al.* 2005). Neben dem Transfer von DNA zwischen *H. pylori*-Stämmen konnte auch die Übertragung von chromosomalen

Markern zwischen *H. pylori* und *C. jejuni*-Stämmen gezeigt werden (Oyarzabal *et al.*, 2007). Obwohl das natürliche Habitat von *H. pylori* und *C. jejuni* durch verschiedene ökologische Nischen des Gastrointestinaltrakts charakterisiert ist, ist ein genetischer Austausch zwischen den beiden Spezies und somit ein Beitrag zur genomischen Diversität nicht auszuschließen. Die DNaseI-resistente, durch Zell-Zell-Kontakt stattfindende Übertragung von DNA ist vor allem im unwirtlichen Milieu des Magens zur Anpassung an verschiedene Mikronischen und sich ändernde Umweltbedingungen von großer Bedeutung. Freie DNA ist hier nur von kurzer Lebensdauer. Außerdem kann die Übertragung von einzelsträngiger DNA dazu beitragen die zwischen verschiedenen Stämmen bestehenden Restriktionsbarrieren zu überwinden, da ssDNA schlechter von Restriktionsenzymen erkannt wird (Nobusato *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Aras *et al.*, 2002). In anderen natürlich kompetenten Mikroorganismen, wie *N. gonorrhoeae* und *H. influenzae* wird auch ssDNA effizient als Substrat der natürlichen Transformation genutzt, während *H. pylori* 1000fach effizienter dsDNA transformiert (Levine *et al.*, 2007). Diese ist zum Schutz vor Restriktionsendonukleasen stammspezifisch methyliert (Donahue *et al.*, 2000; Ando *et al.*, 2000; Aras *et al.*, 2002). Durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* relativ kleine DNA-Fragmente (~1300 bp) importiert und ins Genom über homologe Rekombination inseriert (Kulick *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009). Ein zur Transformation alternativer Transportweg der DNA-Aufnahme würde den Transfer größerer DNA-Fragmente ermöglichen. Bereits gezeigt wurde die Exzision und der Transfer der PZ1 von *H. pylori* P12 in einem DNaseI-resistenten, von einer zur XerCD-Familie gehörenden Tyrosin-Rekombinase abhängigen Mechanismus (Fischer *et al.* 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals der DNaseI-resistente Transfer der intrinsischen, kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 zwischen *H. pylori*-Stämmen gezeigt werden. Die Übertragung dieser Plasmide findet sowohl in DNaseI-sensitiver, Transformations-abhängiger Weise, als auch in einem neuartigen DNaseI-resistenten Mechanismus statt (siehe 3.1.4). Im Gegensatz hierzu konnte der Transfer des chromosomalen Locus *rpsL** nur in Abwesenheit von DNaseI gezeigt werden (siehe 3.1.5). Da in anderen Arbeiten DNaseI-resistenter Transfer chromosomaler Loci nachgewiesen werden konnte (Kuipers *et al.* 1998; Fischer *et al.* 2010), scheint dieser vom jeweiligen Locus abhängig zu sein.

Der unidirektionale Transfer der kryptischen Plasmide unter DNaseI-resistenten Bedingungen, in einem Konjugations-ähnlichen Mechanismus konnte durch den Nachweis beider Plasmide, des Donor- und Rezipientenplasmids, in den Transkonjuganten dokumentiert werden (siehe 3.1.4). Jedoch stellt sich die Frage nach dem Nutzen von zwei (verschiedenen) Plasmiden in der Transkonjugantenzelle. Bisher ist nicht bekannt, ob der Mechanismus der DNaseI-resistenten Übertragung der kryptischen Plasmide und dem mit ihnen assoziierten genetischen Material auch unter natürlichen Bedingungen *in vivo* stattfindet und für *H. pylori* für die Besiedlung, Persistenz oder Virulenz von Bedeutung ist. Der Nachweis und die Relevanz dieses Prozesses *in vivo* muss noch erbracht und genauer untersucht werden.

4.2 Funktionen der Typ-IV-Sekretionssysteme in *H. pylori* P12

Während die Rolle des Cag-T4SSs und des ComB-T4SSs weitgehend bekannt ist (siehe 1.5), gab es bisher über die beiden weiteren T4SS, *Tfs3* und *Tfs4*, keine konkreten Informationen bezüglich ihrer Funktion. *Tfs3* wurde durch Kersulyte und Kollegen erstmals beschrieben (Kersulyte *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass die Enden des 16,3 kb großen Segments konserviert sind und dass es in einer Plastizitätsregion (TnPZ), welche ähnlich einem konjugativen Transposon mobilisiert werden kann, inseriert ist (Kersulyte *et al.*, 2009). Obwohl *Tfs3* am stärksten Homologien zum ComB-T4SS zeigt, konnte eine essentielle Beteiligung bei der DNA-Aufnahme bzw. dem DNA-Transfer auch im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden (siehe 3.3.1 und 3.3.2) (Kersulyte *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2010). Aufgrund der Homologien mit dem Virulenzplasmid pVir von *C. jejuni*, welches für das intrazelluläre Wachstum und die natürliche Kompetenz von *C. jejuni* verantwortlich ist (Bacon *et al.*, 2002) wurde ein Zusammenhang von *Tfs3* mit der Virulenz von *H. pylori*-Stämmen vermutet, konnte aber nicht gezeigt werden (Kersulyte *et al.*, 2003). Neben dem in der PZ3 integrierten *Tfs3*, befindet sich in der PZ1 das *Tfs4*. Die PZ1 stellt ein transponierbares Element dar, welches durch flankierende Sequenzwiederholungen gekennzeichnet und in einem nicht-funktionellen Restriktions-Modifikationssystem inseriert ist. Die Mobilisierung der PZ1 erfolgt in einem konjugativen Mechanismus und ist abhängig von einer XerCD-Familie-Rekombinase (Fischer *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiterer Mechanismus des DNA-Transfers,

die Sekretion von DNA durch *Tfs4*, identifiziert und die Rolle von *Tfs4* für den horizontalen Gentransfer untermauert werden (siehe 3.3.2.2).

Die Untersuchung des Mechanismus der DNaseI-resistenten Übertragung von DNA zwischen *H. pylori*-Stämmen stellte einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Da T4SS zu Konjugationsapparaten verwandte Systeme darstellen, wurde eine Beteiligung dieser beim DNA-Transfer zwischen *H. pylori*-Stämmen vermutet. Die Deletion aller T4SS zeigte, dass nur das ComB-System in *H. pylori* P12 für den DNaseI-resistenten konjugativen Plasmid-DNA-Transfer zwischen Stämmen von Bedeutung ist. Das ComB-System stellt also das entscheidende System für die Übertragung von DNA, nicht nur während der natürlichen Transformation dar und könnte eine Rolle als Konjugationspore während der DNaseI-resistenten Mobilisierung von DNA haben. Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht der in *H. pylori* identifizierten T4SS und deren (mutmaßliche) Funktion(en).

Tabelle 4.1: Übersicht der T4SS von *H. pylori* und ihre Funktion.

T4SS	Funktionen
Cag	-Translokation des Effektorproteins CagA in eukaryotische Zellen
ComB	-Aufnahme von DNA im Rahmen der natürlichen Transformation und auch während konjugativen Prozessen -DNA-Export aus dem Donor -Konjugationspore?
<i>Tfs3</i>	?
<i>Tfs4</i>	-Sekretion von Plasmid-DNA -Transfer der PZ1 (Fischer <i>et al.</i> , 2010) -Modifikation von DNA durch Methylierung?

4.2.1 Duale Funktion des ComB-Systems für den DNA-Transfer

Die Aufnahme von DNA während der natürlichen Transformation in *H. pylori* verläuft in einem Zwei-Stufen-Prozess (Stingl *et al.*, 2010) und wird durch Schäden der DNA aktiviert (Dorer *et al.*, 2010). Stingl und Kollegen konnten zeigen, dass das Kanalprotein ComE3 in der inneren Membran eine essentielle Funktion für den spezifischen Transport von DNA bei der natürlichen Transformation hat, während das ComB-System relativ unspezifisch DNA aufnimmt und ComE3 zur Verfügung stellt

(Stingl *et al.*, 2010). In Rahmen dieser Arbeit wurde die Beteiligung von ComE3 am Transfer von Plasmid-DNA in konjugativen Prozessen untersucht. Auch hier spielt das Kanalprotein ComE3 eine essentielle Rolle (siehe 3.3.3). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das ComB-System auch in Anwesenheit von DNaseI, also unter konjugativen Bedingungen, das entscheidende T4SS für die Aufnahme von Plasmid-DNA darstellt (siehe 3.3.1). Darüber hinaus wurde die Beteiligung des ComB-Systems beim Export von Plasmid-DNA aus dem Donor untersucht und bestätigt (siehe 3.3.2.1). So ist eine duale Funktion des ComB-Systems, im Donor und im Rezipienten, für den Plasmid-DNA-Export und die Aufnahme von DNA, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DNaseI zu beobachten. Ob das ComB-System als Konjugationspore dient muss in weiteren Experimenten noch genauer untersucht werden.

4.2.2 DNA Sekretion und konjugativer Transfer der PZ1 durch *Tfs4*

Neben dem ComB-System spielt das *Tfs4* für den Transfer von DNA eine wichtige Rolle. So wurde bereits die XerCD-abhängige Mobilisierung der PZ1 und des darin integrierten *Tfs4* beschrieben (Fischer *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiterer Aspekt des DNA-Transfers, die Sekretion von DNA und eine eventuelle Beteiligung von *Tfs4* untersucht. Während *Tfs4* für den konjugativen Transfer von Plasmid-DNA nicht von Bedeutung ist, konnte durch Kokultivierungsexperimente und die Quantifizierung der im extrazellulären Milieu vorhandenen DNA bestätigt werden, dass ein potentiell funktionelles *Tfs4* die Sekretion von Plasmid-DNA vermittelt (siehe 3.3.2.2). Dieser Mechanismus zeigt Parallelen zu der für *N. gonorrhoeae* beschriebenen aktiven DNA-Sekretion durch ein in der GGI (*gonococcal genetic island*) lokalisiertes T4SS (Hamilton *et al.*, 2005). Die sekretierte DNA könnte als Substrat für die natürliche Transformation dienen, zur genetischen Variation und der Verbreitung von Resistenzen beitragen, und könnte auch die Immunantwort des Wirts modulieren (Hamilton *et al.*, 2005). Ob Relaxasen für die Sekretion der DNA von Bedeutung sind, und ob die sekretierte DNA einzel- oder doppelsträngig im extrazellulären Milieu vorliegt muss in zukünftigen Arbeiten näher untersucht und charakterisiert werden.

Neben der Fähigkeit zur DNA-Sekretion von *Tfs4* könnte das in *Tfs4* kodierte Gen HPP12_0447, welches für ein Protein mit Helikase- und Methylase-Aktivität kodiert, für die Interaktion des Pathogens mit dem Wirt von Bedeutung sein. Dieses

könnte mit der Regulation der Genexpression durch Methylierung in Verbindung gebracht werden und somit das bakterielle Wachstum und/oder die Interaktion mit der Wirtszelle beeinflussen. Die Modifikation von Histonen und die strukturelle Umlagerung des Chromatins beeinflusst die Transkription von Genen, wodurch die Immunantwort des Wirts beeinträchtigt und die Entzündungsreaktion eingeschränkt werden kann. Diese Strategie wird von Pathogenen wie *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* und *Streptococcus pneumoniae* genutzt (Hamon *et al.*, 2007). Kürzlich wurde in einer Studie die Modifikation von Histonen durch die Induktion der Dephosphorylierung und Reduktion der Acetylierung durch *H. pylori* beschrieben (Ding *et al.*, 2010). Die Modifikation durch Methylierung würde eine weitere Möglichkeit für *H. pylori* darstellen, in die Regulation der Genexpression der Wirtszelle einzugreifen und diese zu Gunsten des Pathogens zu modellieren.

4.3 Neuartige DNaseI-resistente Übertragung von pHel4 und pHel12 in einem Relaxase-unabhängigen Prozess – Rolle von RecA?

Während für das Plasmid pHel4 eine Beteiligung, jedoch keine essentielle Funktion der Plasmid-kodierten Relaxase für den Transfer des kryptischen Plasmids gezeigt werden konnte, scheint die Plasmid-kodierte Relaxase von pHel12 nicht bei der DNaseI-resistenten Übertragung des Plasmids involviert zu sein (siehe 3.4.3 und 3.4.4). Die Sequenzierung des Genoms von *H. pylori* P12 zeigte die Anwesenheit von zwei weiteren putativen Relaxasen innerhalb der PZ1 und PZ3 (Fischer *et al.* 2010). Die vermutete Kompensierung der Funktion des auf pHel12 kodierten MobA-Homologs durch die im Chromosom von *H. pylori* P12 kodierten Relaxasen konnte nicht bestätigt werden (siehe 3.4.5). Während in mehreren Studien gezeigt wurde, dass die Relaxase für die Initiation, Mobilisierung und Termination der konjugativen Plasmid-Übertragung essentiell ist, konnte den Relaxasen von *H. pylori* P12 keine eindeutige Beteiligung beim DNaseI-resistenten DNA-Transfer zugeordnet werden. Die Mobilisierung der an die DNA gebundenen Plasmid-kodierten Relaxase MobA und auch DNA-unabhängiger Transport von Proteinen von der Donor- in die Rezipientenzelle wurde bereits nachgewiesen (Wilkins and Thomas, 2000; Luo and Isberg, 2004; Vergunst *et al.*, 2005; Schulein *et al.*, 2005). Neben MobA wurde auch der Transfer von anderen Proteinen, wie z.B. RecA, welches einzelsträngige DNA bindet, und der Sog Primase des IncI α -Plasmids CollB gezeigt (Heinemann, 1999; Wilkins *et al.*,

2000). Die Frage nach einer eventuellen Funktion der Relaxase im Rezipienten konnte unter anderem durch Draper und Kollegen (Draper *et al.*, 2005) und Garcillan-Barcia und Kollegen (Garcillan-Barcia *et al.*, 2007) geklärt werden. So wurde gezeigt, dass der Transfer der Relaxase TrwC des Plasmids R388 auch ohne DNA, aber mit Hilfe des Kopplungsprotein TrwB stattfindet. Neben ihrer Funktion bei der Konjugation, welche im Rezipienten in der Rezirkularisierung der transferierten DNA besteht, ist die Relaxase TrwC auch in der Lage die ortsspezifische Rekombination zwischen zwei *oriT*-Kopien zu katalysieren (Draper *et al.* 2005). Bestätigt wurde die Funktion der Relaxase im Rezipienten durch Expression von stabilen, intrazellulären Antikörpern (*intrabodies*) gegen die Relaxase TrwC (Garcillan-Barcia *et al.*, 2007). Der Transport der Relaxase, bzw. deren Funktionalität im Rezipienten ist wichtig, um den konjugativen Transfer der DNA durch Rezirkularisierung der DNA abzuschließen (Termination). Ob dies auch für die Relaxasen von *H. pylori* der Fall ist wäre in zukünftigen Experimenten, wie z.B. durch die Komplementation der Relaxase TrwC von *E.coli* durch eine *H. pylori* Relaxase zu prüfen.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine entscheidende Rolle der Plasmid- und chromosomal kodierten Relaxasen des Donors festgestellt werden konnte, wurde die Plasmid-kodierte Relaxase des Rezipienten untersucht (siehe 3.4.4). Auch die Deletion dieser beeinflusste den DNaseI-resistenten Transfer der kryptischen Plasmide nicht. Jedoch konnte nach Deletion von *recA* im Rezipienten kein Plasmid-Transfer mehr festgestellt werden (siehe 3.4.6). Eine Beteiligung von RecA bei der Rezirkularisierung der Plasmid-DNA im Rezipienten ist nicht auszuschließen. Obwohl für den Transfer von *E. coli*-*H. pylori*-Shuttle-Vektoren RecA nicht benötigt wird (Backert *et al.*, 2005), ist bekannt, dass RecA für die Rezirkularisierung von Plasmid-DNA in *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* und *Mycobacterium smegmatis* eine wichtige Rolle spielt (Biswas *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2004). In *M. smegmatis* wird die DNA in einem Konjugations-ähnlichen Mechanismus, der sich von der konventionellen Konjugation unterscheidet, übertragen. Neben der Beteiligung sogenannter *bom*-Sequenzen (*basis of mobilization*), die sowohl auf den Plasmiden, als auch im Chromosom verteilt sind wird die Rezirkularisierung der DNA im Rezipienten durch RecA und nicht durch eine Relaxase bewerkstelligt. Die Übertragung der DNA zwischen Donor und Rezipient erfolgt unidirektional (Wang *et al.*, 2004). Wie für *M. smegmatis* beschrieben, handelt es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten Transfer der intrinsischen, kryptischen

Plasmide um einen DNaseI-resistenten Prozess, der direkten Zell-Zell-Kontakt von lebensfähigen Donoren und Rezipienten erfordert. Für diesen Prozess ist die Aktivität von RecA in der Rezipientenzelle essentiell. Vermutlich übernimmt RecA die Funktion der Relaxase im Rezipienten für die Termination der Konjugation in diesem neuartigen Konjugations-ähnlichen Prozess, welche in der Rezirkularisierung der Plasmid-DNA besteht. Bisher konnte nur eine Beteiligung von RecA bei der Integration von genetischem Material ins Chromosom über homologe Rekombination nachgewiesen werden (Schmitt *et al.*, 1995). Eine Rolle bei der Aufnahme der kryptischen Plasmide während des DNaseI-resistenten Transfers muss noch genauer untersucht werden. Aufgrund der Unabhängigkeit des in dieser Arbeit untersuchten DNA-Transfers von den Plasmid- und chromosomal kodierten Relaxasen bleibt jedoch weiterhin unklar, wodurch die Initiation des Plasmid-Transfers, die Mobilisierung und der Transfer der DNA unterstützt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Transfer der kryptischen Plasmide unabhängig von den Schlüsselenzymen der Konjugation, den Relaxasen ist. Er findet jedoch in DNaseI-resistenter Weise statt und erfordert den Zell-Zell-Kontakt von lebensfähigen Donor- und Rezipientenzellen. Es ist davon auszugehen, dass es sich um einen neuartigen, Konjugations-ähnlichen Mechanismus handelt, für den neben dem ComB-System keines der beschriebenen T4SS von *H. pylori* essentiell ist (siehe 4.2).

4.4 Charakterisierung der Funktion der kryptischen Plasmide in *H. pylori*

4.4.1 Module für den Austausch genetischen Materials

Etwa 50% aller klinischen *H. pylori*-Isolate tragen Plasmide unterschiedlicher Größe, deren Funktion bisher nicht beschrieben ist (Penfold *et al.*, 1988). Die Modulartige Struktur der kryptischen Plasmide ermöglicht wahrscheinlich die Integration oder Deletion funktioneller Einheiten und trägt zum „gene shuffling“, also zum Austausch von genetischem Material zwischen Plasmiden und zwischen Plasmiden und dem Chromosom bei (Hofreuter *et al.*, 2002). Eine wichtige Rolle hierfür spielt vermutlich eine in mehreren kryptischen Plasmiden, darunter pHel4, pHel5, pHel1, pHPM180, pHPS1 und pHPM186, identifizierte R4-Sequenzwiederholung, die sich durch 36 konservierte bp am 3`-Ende des *repA* Gens auszeichnet (Heuermann and Haas,

1995; Minnis *et al.*, 1995; Hofreuter *et al.*, 2002). Ebenso wie die von Minnis und Kollegen identifizierte R2-Sequenzwiederholung stellt diese wahrscheinlich einen Ort der Integration neuer Sequenzen und somit einen Hot Spot der genetischen Rekombination dar (Minnis *et al.* 1995). Durch die Insertion und Deletion von Genen könnte die unterschiedliche Größe der in *H. pylori* vorkommenden kryptischen Plasmide erklärt werden. Die auf den kryptischen Plasmiden pHel4 und pHel12 kodierte *mob*-Region und die wahrscheinlich dadurch ermöglichte konjugative Übertragung der kryptischen Plasmide könnte eine Möglichkeit für die Erzeugung genetischer Variabilität und Sub-Spezies darstellen und zur Steigerung der genetischen Makrodiversität in *H. pylori*-Stämmen beitragen.

4.4.2 Charakterisierung einzelner Genprodukte von pHel12 bezüglich ihrer Rolle für den Transfer von DNA

Der konjugative Transfer stellt wie unter 4.1 beschrieben einen effizienten Mechanismus zur Übertragung genetischen Materials dar. Aufgrund der einzelsträngigen Natur des transferierten Substrats ist dieses dem Angriff durch sehr effektiv agierende Restriktions-Modifikations-Systeme weniger stark ausgesetzt (Donahue *et al.*, 2000). Hinweise, dass die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 in einem konjugativen Mechanismus übertragen werden, lieferte die auf beiden Plasmiden kodierte *mob*-Region (Hofreuter & Haas, 2002; Fischer *et al.* 2010). Diese kodiert unter anderem für eine Relaxase, MobA, das Schlüsselenzym der Konjugation (Lanka *et al.*, 1995). Eine Funktion von MobA für den konjugativen Transfer des Plasmids konnte allerdings nicht gezeigt werden. Neben der Funktionalität von RecA während der DNaseI-resistenten Übertragung von DNA (siehe 3.4.6) ist der Transfer von intrinsischer Plasmid-DNA von der Anwesenheit eines Plasmids im Rezipienten abhängig (siehe 3.5.1.2). So konnte gezeigt werden, dass ein natürlicherweise Plasmid-freier Stamm, wie z.B. *H. pylori* P1, ebenso wie ein *H. pylori* P12, dessen Plasmid mit Hilfe des sogenannten „Plasmid Curing“ entfernt wurde, keinen funktionellen Rezipienten in Kokultivierungsexperimenten darstellen. Entgegen der Daten, die Perez-Mendoza und de la Cruz veröffentlichten, scheint der Rezipient bei der DNaseI-resistenten Übertragung von DNA in *H. pylori* nicht nur, wie für *E. coli* beschrieben eine passive Rolle zu übernehmen (Perez-Mendoza and de la Cruz, 2009). Perez-Mendoza und de la Cruz zeigten in einem automatisierten Konjugationsexperiment mit

E. coli-Mutanten, dass hier im Rezipienten kein Gen essentiell für die Aufnahme von DNA während der Konjugation ist (Perez-Mendoza *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass der Rezipient passiv konjugiert wird. Entgegen dieser Annahme, weisen die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse darauf hin, dass einzelne Gene des kryptischen Plasmids pHel12 oder die Anwesenheit dieses Plasmids im Allgemeinen die Funktionalität eines Rezipienten ausmachen. Bisher wurden die Gene *orf04*, *orf11* und *orf08/09* hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Plasmidaufnahme im Rezipienten untersucht. Eine solche Beteiligung konnte jedoch nicht bestätigt werden. Darüber hinaus wurde in Anwesenheit der Shuttle-Vektoren pHel3 bzw. pHel6 in *H. pylori* P12 Δ pHel12 die Fähigkeit zur Plasmidaufnahme untersucht. Interessanterweise war Plasmidaufnahme nicht in Anwesenheit von pHel3 (*H. pylori* P12 Δ pHel12 + pHel3), jedoch in Anwesenheit von pHel6 (*H. pylori* P12 Δ pHel12 + pHel6), zumindest unter DNaseI-sensitiven Bedingungen, möglich (siehe 3.5.1.3). Das Plasmid pHel6 enthält neben dem Gen *mobA* aus pHel4 den mutmaßlichen *oriT* mit *nic site* aus pHel4. Draper und Kollegen haben die Funktion der Relaxase TrwC im Rezipienten untersucht und gezeigt, dass diese neben ihrer Funktion bei der Konjugation eine *oriT*-spezifische Rekombination von DNA katalysiert und somit die Integration von transferierter DNA in einen *oriT* des Rezipienten durchführt (Draper *et al.*, 2005). Da das Plasmid pHel3 weder die pHel4-kodierte Relaxase, noch den mutmaßlichen *oriT* mit *nic site* aus pHel4 enthält, ist denkbar, dass diese Bestandteile für die Aufnahme von Plasmid-DNA durch den Rezipienten von Bedeutung sind.

Dass die Anwesenheit eines Plasmids im Allgemeinen mit der Fähigkeit von *H. pylori* Plasmid-DNA aufzunehmen in Zusammenhang gebracht werden kann, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (siehe 3.5.1.2 und 3.5.1.3). Der Plasmid-freie *H. pylori* P12 und der natürlicherweise Plasmid-freie Stamm P1 sind nicht-funktionelle Rezipienten bei der DNaseI-resistenten Plasmid-Übertragung, und auch sehr ineffizient mit Plasmid-DNA transformierbar. Neben der Funktion einzelner Genprodukte von pHel12 für die Aufnahme von Plasmid-DNA, könnten auch die Rekombination und der Ringschluss des Plasmids durch Anlagerung an homologe Bereiche der intrinsischen DNA zur effizienten Übertragung und Etablierung des Plasmid erforderlich sein.

4.4.3 Potentiell zytotoxische Elemente der kryptischen Plasmide

Während eine Beteiligung der kryptischen Plasmide bei der Übertragung von genetischem Material durch den in dieser Arbeit bestätigten Transfer von pHel4 und pHel12 zwischen *H. pylori*-Stämmen untermauert werden konnte, ist die Funktion dieser bisher noch nicht aufgeklärt. Hinweise, dass die kryptischen Plasmide in Zusammenhang mit der Interaktion von *H. pylori* mit anderen Stämmen oder eukaryotischen Zellen gebracht werden könnten liefern ein Microcin-Cluster, ein putatives Toxin-Antitoxin-System und ein Gen, welches für ein Protein mit Fic-Domäne kodiert (siehe 3.1 und 3.5).

In den Plasmiden pHel4 und pHel12 konnten Gene identifiziert werden, die Homologien zu *mccA*, *mccB* und *mccC7* des Microcin-Genclusters von *E. coli* zeigen (Gonzalez-Pastor *et al.*, 1994). Diese könnten ebenso wie in *E. coli* die Synthese, die posttranslationale Modifikation und die Sekretion eines Bacteriocins bewerkstelligen und die Proteinbiosynthese in anderen Stämmen inhibieren. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von *mccA* aus pHel4 in *E. coli* BL21 DE3 das Wachstum inhibiert (Claudia Höfler; Daten nicht veröffentlicht). Welche Funktion der Microcin-Gencluster, bzw. dessen Genprodukte für *H. pylori* haben muss noch genauer untersucht werden.

Darüber hinaus konnte ein mutmaßliches Toxin-Antitoxin-System (TA-System) auf den kryptischen Plasmiden identifiziert werden. Die Überexpression des Toxins war im Gegensatz zum Antitoxin nicht erfolgreich (siehe 3.5.2.1). Dies unterstützte die Annahme, dass es sich tatsächlich um ein TA-System handelt. TA-Systeme werden mit der stabilen Weitergabe von Plasmiden in einer Population in Verbindung gebracht (Hayes, 2003). In dieser Arbeit konnte eine derartige Funktion nicht bestätigt werden. Auch nach Deletion des TA-Systems in *H. pylori* P12 wurde das Plasmid pHel12 ohne Selektionsdruck stabil an die Tochterzellen weitergegeben. Durch Kokultivierungsexperimente mit einem Plasmid-freien *H. pylori* P12-Stamm als Rezipient konnte die Aktivität des potentiellen TA-Systems ebenfalls nicht gezeigt werden. So ist auch der Transfer eines Plasmids, welches kein TA-System enthält (pHel12 Δ orf08/09) nicht in einen Plasmid-freien Stamm möglich (siehe 3.5.2.2). Es wurde angenommen, dass der Plasmid-freie Stamm aufgrund der Abwesenheit eines Antitoxins die Neutralisierung eines Toxins nicht durchführen kann. Das mit dem Donorplasmid transferierte Toxin würde zum Abtöten der Zelle führen, da das labile Antitoxin nicht schnell genug nachproduziert und abgebaut werden würde. Jedoch war auch kein Transfer eines

Plasmids ohne mutmaßliches TA-System in den Plasmid-freien Rezipienten möglich. Eigentlich würde man annehmen, dass der Plasmidtransfer in einen Plasmid-freien Stamm effektiver stattfindet, als in einen Stamm welcher bereits ein Plasmid enthält. Die Relevanz dieser Situation *in vivo* und der eventuelle Nutzen der Anwesenheit von zwei Plasmiden in einer Zelle muss noch weiter untersucht werden.

In mehreren Studien wurde eine neue Art der posttranslationalen Modifikation, die sogenannte AMPylierung beschrieben (siehe 3.5.3) (Worby *et al.* 2009; Yarbrough *et al.*, 2009). Durch die Übertragung eines AMPs auf einen konservierten Tyrosin- oder Threoninrest in der *switch* I-Region der kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 werden diese inaktiviert und nachfolgende Signalwege in der Zelle unterbunden. So konnte z.B. für das Protein IbpA von *H. somni* eine zytotoxische Aktivität, der die posttranslationale Modifikation durch AMPylierung zugrunde liegt, gezeigt werden. IbpA katalysiert mit dem in seiner Fic-Domäne enthaltendem Kernmotiv HPFAEGNGR die reversible Übertragung eines AMPs auf die *switch* I-Region der GTPase Rho (Worby *et al.* 2009). Dies führt zum Zusammenbruch der zellulären Integrität und schließlich zum Tod der eukaryotischen Zelle. Die kleinen GTPasen regulieren eine große Vielfalt an zellulären Prozessen in der Zelle, wie z.B. das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Zellmotilität und den Vesikeltransport (Takai *et al.*, 2001).

Die Nukleotidsequenzanalyse der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12, sowie die des Genoms von *H. pylori* P12 ermöglichte die Identifizierung von Proteinen mit Fic-Domäne. So konnte innerhalb Orf4M und Orf12M, sowie in einem hypothetischen Protein im Genom (GI:210135318; HPP12_1125) eine Fic-Domäne identifiziert werden. Erste Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit lieferten eindeutige Hinweise, dass die die Fic-Domäne enthaltenden hypothetischen Proteine Orf4M (GI:20502850) und Orf12M (GI:210135781; HPP12_p11) eine zytotoxische Aktivität gegenüber eukaryotischen Zellen zeigen (siehe 3.5.3). In nachfolgenden Experimenten muss noch geklärt werden, ob die Zytotoxizität durch eine Infektion mit *H. pylori*-Stämmen reproduzierbar ist und gegebenenfalls auf der Sekretion oder Translokation des jeweiligen Proteins oder dem Transfer des Plasmids bzw. der DNA von *H. pylori* in die eukaryotische Zelle beruht. Im Falle von IbpA wurde gezeigt, dass das Toxin durch ein Zwei-Partner-Sekretionssystem sekretiert wird. Es wird angenommen, dass die Wirtszelle IbpA durch Pinozytose aufnimmt und somit in das Zytoplasma transportiert (Worby *et al.*, 2009). Die auf den kryptischen Plasmiden

vorhandene *mob*-Region, sowie die Tatsache, dass diese Region für eine erfolgreiche Kolonisierung von Mäusen essentiell ist, könnten für einen konjugativen Transfer der DNA von *H. pylori* in eukaryotische Zellen sprechen (Heuermann & Haas, 2002; Castillo *et al.*, 2008). Der mögliche Transfer von DNA von *H. pylori* in eukaryotische Zellen könnte nach erfolgreicher Markierung der kryptischen Plasmide mit z.B. GFP gezeigt werden. Die die Fic-Domäne enthaltenden hypothetischen Proteine von *H. pylori* stellen eine interessante, bisher noch nicht beschriebene Möglichkeit zur pathogenetischen Veränderung eukaryotischer Zellen dar. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Fic-Proteine von *H. pylori* anders als für *H. somni* beschrieben keinen Einfluss auf eukaryotische Zellen haben und gegebenenfalls nur eine Funktion in *H. pylori* selbst ausüben.

4.5 Interaktion von *H. pylori* mit eukaryotischen Zellen auf DNA-Ebene?

Die Konjugation von Plasmiden zwischen prokaryotischen Zellen wurde erstmals 1946 beschrieben (Lederberg, 1946). Darüber hinaus konnte auch der Transfer von Plasmiden zwischen Prokaryoten und *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden (Heinemann and Sprague, Jr., 1989;Heinemann and Sprague, Jr., 1991). Das am besten beschriebene Modell des *Interkingdom*-DNA-Transfers ist jedoch die Mobilisierung des Ti (Tumor-induzierendes)-Plasmids von *A. tumefaciens* in etwa 90 Familien von dikotylen Pflanzen und die damit verbundene Entstehung der Wurzelhalsgalle (Zupan *et al.*, 2000;Christie, 2001). Bisher gilt dies als einziges beschriebenes Beispiel, indem natürlicher DNA-Transfer von einer prokaryotischen in eine eukaryotische Zelle zur Pathogenese beiträgt. Das System von *A. tumefaciens* wurde auch für die Übertragung von DNA in andere eukaryotische Zellen, wie *S. cerevisiae* und HeLa-Zellen genutzt (Piers *et al.*, 1996;Kunik *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte in einer Studie der konjugative Transfer von RK2-Plasmiden aus *E. coli* in CHO (*chinese hamster ovary*) K1-Zellen gezeigt werden (Waters, 2001). Die Lokalisierung der Proteine VirD2, TraI und MobA in eukaryotischen Zellen bestätigte den Transport der DNA in einem konjugativen Mechanismus von prokaryotischen in eukaryotische Zellen (Ziemienowicz *et al.*, 2001;Silby *et al.*, 2007).

Bei der Interaktion von *H. pylori* mit eukaryotischen Zellen findet die Translokation des Effektorproteins CagA mit Hilfe des Cag-T4SS statt (siehe 1.5.2). Darüber hinaus könnte, ähnlich wie für *A. tumefaciens* beschrieben, eine Mobilisierung

von genetischem Material stattfinden. Castillo und Kollegen konnten mit einer *Recombination-based In Vivo Expression-Technologie* (RIVET) verschiedene Promotoren identifizieren, die während der Kolonisierung des Wirts angeschaltet werden (Castillo *et al.*, 2008). Der Promotor *Pivi10* (*in vivo induced promoter*) reguliert wahrscheinlich die Gene *mobA*, *mobB* und *mobD*, die möglicherweise eine Funktion für die Mobilisierung von Plasmid-DNA haben. Es konnte gezeigt werden, dass eine *mobABD*-Mutante nicht in der Lage ist, Mäuse zu kolonisieren. Aufgrund dieser Daten kann eine Bedeutung der auf den kryptischen Plasmiden von *H. pylori* kodierten *mob*-Region bezüglich der Mobilisierung der Plasmide und der Interaktion mit eukaryotischen Zellen auf DNA-Ebene nicht ausgeschlossen werden. Einen weiteren Hinweis hierfür liefern Orf4M bzw. Orf12M. Wie unter 4.4.3 beschrieben stellen diese mögliche Zytotoxine dar.

4.6 Alternative Mechanismen zur Aufnahme und zur Verbreitung genetischen Materials

4.6.1 DNA-Übertragung durch Membranvesikel?

Im Rahmen dieser Arbeit konnte trotz Deletion aller in *H. pylori* P12 identifizierten T4SS und Relaxasen der Transfer des mobilisierbaren, kryptischen Plasmids pHel12 nachgewiesen werden (siehe 3.3.1, 3.3.2 und 3.4). Die Mobilisierung des Plasmids muss somit zusätzlich von einem alternativen, von der Transformation und Konjugation zu unterscheidenden Mechanismus stattfinden. Membranvesikel stellen hierfür prädestinierte Kandidaten dar, die neben der Mobilisierung von Virulenzfaktoren auch für den Transfer von DNA von Bedeutung sein könnten. Die Bildung und Funktion von Membranvesikeln in gram-negativen Mikroorganismen wurde in den letzten Jahren in vielen Studien untersucht. Membranvesikel werden von Mikroorganismen produziert, um Toxine in eukaryotische Zellen zu translozieren und Proteine und DNA zwischen Bakterienzellen zu transferieren. Zudem wird eine Beteiligung bei der Intra- und Interspezies-Kommunikation und der Transfer von Zell-Zell-Signalen vermutet (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006).

In den Membranvesikeln von *E. coli* und *P. aeruginosa* konnte DNA nachgewiesen werden (Kolling and Matthews, 1999; Yaron *et al.*, 2000; Renelli *et al.*, 2004). Yaron und Kollegen konnten zeigen, dass sowohl chromosomale, als auch

Plasmid-DNA in den von *E. coli* O157:H7 abgeschnürten Membranvesikeln vorhanden ist. Ein in den Membranvesikeln eines klinischen Isolats nachweisbares Plasmid enthielt zwar Gene für dessen Replikation und Mobilisierung (*mob*), jedoch fehlten Gene, die die Biogenese eines Pilus und somit die konjugative Übertragung des Plasmid ermöglichen würden. Die Übertragung der Plasmid-DNA in den DNaseI-geschützten Membranvesikeln zwischen Donor und Rezipient findet ohne direkten Zell-Zell-Kontakt und Pilusstruktur statt und stellt neben der Konjugation, Transformation und Transduktion einen vierten Mechanismus zum Transfer von DNA dar (Mashburn-Warren *et al.*, 2006). Auch in Membranvesikeln von *P. aeruginosa* konnte Plasmid-DNA nachgewiesen werden (Renelli *et al.*, 2004). Es wird diskutiert, dass die zytoplasmatische DNA entweder in das Periplasma transportiert und dann mit den Membranvesikeln abgeschnürt, oder extrazelluläre DNA z.B. von lysierten Zellen in das Periplasma aufgenommen und in Membranvesikel verpackt wird. Letztes spielt möglicherweise auch für die Aufnahme von in Membranvesikeln enthaltener DNA eine Rolle.

Auch *H. pylori* produziert Membranvesikel (Fiocca *et al.*, 1999; Keenan *et al.*, 2000). Diese werden unter anderem mit dem Transport von VacA, der Induktion von Apoptose, der Sekretion des Chemokins IL-8 und der Bildung von Mikronuclei in Verbindung gebracht (Fiocca *et al.*, 1999; Ismail *et al.*, 2003; Ayala *et al.*, 2006; Chitcholtan *et al.*, 2008; Parker *et al.*, 2010). Zudem könnten sie eine Rolle für die Übertragung von DNA zwischen *H. pylori*-Stämmen spielen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das in der inneren Membran lokalisierte Kanalprotein ComE3 sowohl für den Import von DNA in DNaseI-resistenter, als auch -sensitiver Weise essentiell ist (siehe 3.3.3). Nach der Aufnahme der DNA aus den Membranvesikeln in das Periplasma von *H. pylori* könnte ComE3 den Transport der DNA über die innere Membran bewerkstelligen.

4.6.2 Sekretion von DNA

Neben der Infektion mit nur einem *H. pylori*-Stamm, treten auch gemischte Infektionen mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen auf (Taylor *et al.*, 1995; Berg *et al.*, 1997; Israel *et al.*, 2001). Zur Steigerung der Diversität ist nicht nur die Aufnahme von genetischem Material von anderen, im spezifischen Habitat des Magens vorkommenden Mikroorganismen von Bedeutung, sondern vor allem auch der genetische Austausch

zwischen verschiedenen *H. pylori*-Stämmen, da *H. pylori* dominierender Bestandteil der mikrobiellen Population des Magen ist (Bik *et al.*, 2006). Wie *H. pylori* ist auch *N. gonorrhoeae* natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA. Hier wird die DNA-Aufnahme nicht durch ein T4SS, sondern durch Typ-IV-Pili vermittelt und ist von DNA-Aufnahmesequenzen abhängig (Sparling, 1966; Chen *et al.*, 2004). Die Freisetzung von DNA erfolgt bei *N. gonorrhoeae* nicht nur durch Autolyse, sondern auch durch die aktive Sekretion von DNA mit Hilfe eines in der GGI (*gonococcal genetic island*) liegendem T4SS. Die GGI ist in etwa 80% aller *N. gonorrhoeae*-Stämme vorhanden und wurde wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer erworben (Dillard and Seifert, 2001). Das T4SS der GGI sekretiert chromosomale DNA in das extrazelluläre Milieu und stellt sie zur natürlichen Transformation zur Verfügung. Hierbei spielt die chromosomal kodierte Relaxase TraI eine entscheidende Rolle für den Transport der ssDNA und ihren Schutz vor Nukleasen (Salgado-Pabon *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Komplementation der Gene *topA* und *virB4* innerhalb *Tfs4* die aktive Sekretion von Plasmid-DNA in *H. pylori* gezeigt (siehe 3.3.2.2). Dieser Mechanismus ist vor allem hinsichtlich der zur natürlichen Transformation zur Verfügung stehenden DNA, welche die genetische Variabilität erhöht, von Bedeutung. Das spezifische Milieu des Magens erfordert die Ausnutzung aller genetischen Reservoirs, da die mikrobielle Vielfalt hier sehr eingeschränkt ist. Die Sekretion der Modul-artig aufgebauten kryptischen Plasmide könnte auch die Verbreitung von neuen genetischen Informationen unterstützen. Die freigesetzte Plasmid-DNA ist nicht vor dem Abbau durch DNaseI geschützt, könnte aber durch DNA-Bindeproteine vor dem Abbau spezifisch am 5'- oder 3'-Ende angreifender Nukleasen geschützt sein. Ob eine der in *H. pylori* P12 kodierten Relaxasen für die Sekretion und/oder den Schutz vor Nukleasen erforderlich ist, muss noch aufgeklärt werden. Da *Tfs4* nicht in allen *H. pylori*-Stämmen vorkommt, ist der Mechanismus der Sekretion von DNA durch *Tfs4* nicht essentiell.

4.6.3 Autolyse

Neben der aktiven Sekretion von DNA spielt die durch Autolyse freigesetzte DNA für *N. gonorrhoeae* eine große Rolle für die Erzeugung genetischer Variabilität. Die Aufnahme von DNA mit Genus-spezifischen DNA-Aufnahme-Sequenzen wird hierdurch ermöglicht und findet gewöhnlich während der stationären Phase oder bei

Nährstoffknappheit und suboptimalen Wachstumsbedingungen statt (Hebeler and Young, 1975). Auch für *H. pylori* wurden Autolyse-Mechanismen beschrieben. Die dabei beteiligten Autolysine hydrolysieren Peptidoglykan (Shockman *et al.*, 1996). Marsich und Kollegen zeigten, dass etwa 70% der getesteten klinischen *H. pylori*-Isolate für Homologe des Gens *lys* (HP0339) kodieren, welches zum Lysozym des Phagen T4 homolog ist (Marsich *et al.*, 2002). Autolyse findet in *H. pylori* in der späten Log-Phase statt und wird durch einen Autolyse-induzierenden Faktor (AIF) induziert (Fujita *et al.*, 2005). Neben dem Transport von zytoplasmatischen Proteinen an die Zelloberfläche dient die Autolyse auch der Freisetzung von DNA. So konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* auf Schäden der DNA nicht nur mit der Aktivierung der Transkription von Genen, die für das ComB-T4SS kodieren reagiert, sondern auch die Transkription des Gens *lys* (HPG27_320) steigert, welches für das Lysozym-ähnliche Protein Lys kodiert. Dadurch kommt es zur Freisetzung von genetischem Material, welches für die natürliche Transformation und die Erhöhung der genetischen Variabilität zur Verfügung steht (Dorer *et al.* 2010). Auch in *H. pylori* P12 konnte ein zu *lys* homologes Gen identifiziert werden (HPP12_0335). Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der DNA-Aufnahme durch natürliche Transformation der DNaseI-resistente Transfer von DNA untersucht. Hierbei könnte auch die durch Autolyse freigesetzte DNA eine Rolle spielen, falls diese vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt vorliegt. Ob DNA-Bindeproteine eine Funktion für den Schutz von freigesetzter DNA vor dem Abbau durch Nukleasen übernehmen, muss noch untersucht werden. Die Nuklease DNaseI baut ungeschützte DNA unspezifisch ab. Die Frage nach DNA-Bindeproteinen am 5'- bzw. 3'-Ende der freigesetzten, einzel- oder doppelsträngig vorliegenden DNA, könnte durch den Einsatz spezifischer Nukleasen, welche die DNA in 5'-3'- oder 3'-5'-Richtung abbauen, geklärt werden. Die durch das T4SS von *N. gonorrhoeae* sekretierte einzelsträngige chromosomale DNA ist am 5'-Ende durch die Relaxase TraI vor ihrem Abbau geschützt (Salgado-Pabon *et al.*, 2007). Wie unter 3.3.2.2 beschrieben, sekretiert *Tfs4* DNA. Die Sekretion von DNA kann von der Autolyse abgegrenzt werden, da angenommen wird, dass ein Wildtypstamm und der bzgl. *topA* und *virB4* „reparierte“ Stamm, der ein potentiell funktionelles *Tfs4* enthält, gleichermaßen lysieren. Die Komplementation der Gene *virB4* und *topA* sollte nicht im Zusammenhang mit der Synthese und Freisetzung von Autolysinen stehen.

4.7 Übertragung von DNA durch einen neuartigen, Konjugations-ähnlichen Mechanismus

In mehreren Studien wurde die DNaseI-geschützte Übertragung von DNA zwischen *H. pylori*-Stämmen, *E. coli* und *H. pylori* und *H. pylori* und *C. jejuni* gezeigt (Kuipers *et al.*, 1998; Backert *et al.*, 2005; Oyarzabal *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten bestätigten, dass DNA, darunter auch die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12, in einem DNaseI-resistenten Mechanismus zwischen *H. pylori*-Stämmen übertragen werden kann. Jedoch weisen einige Fakten auf einen neuartigen, von der Konjugation abzugrenzenden Mechanismus hin.

Während die Relaxase als Schlüsselenzym der bakteriellen Konjugation beschrieben wird (Lanka and Wilkins, 1995), beeinflusste die Deletion aller bekannten Relaxasen von *H. pylori* P12 die DNaseI-geschützte Übertragung der kryptischen Plasmide kaum. Nach der Deletion der chromosomal und der Plasmid-kodierten Relaxasen konnte gezeigt werden, dass diese für die DNaseI-geschützte Übertragung der intrinsischen Plasmide zwischen *H. pylori*-Stämmen nicht essentiell sind (siehe 3.4.3 und 3.4.5). Sogar die Dreifachmutante, die weder die Plasmid- noch die beiden chromosomal kodierten Relaxasen enthält, ist in der Lage DNA in Anwesenheit von DNaseI zu transferieren. Relaxasen katalysieren neben der Initiation des konjugativen Transfers und der Mobilisierung der (Plasmid-)DNA auch die Termination des DNA-Transfers durch Rezirkularisierung der DNA (siehe 1.6) (Pansegrau and Lanka, 1996). Falls es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten DNaseI-geschützten Transfer der intrinsischen Plasmide um Konjugation handelt, so muss ein zur Relaxase äquivalentes Enzym deren Aufgaben erfüllen. Ein potentieller Kandidat hierfür ist RecA, das für die Rezirkularisierung der DNA im Rezipienten verantwortlich sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Plasmid-DNA in Kokultivierungsexperimenten nach Deletion von RecA nicht mehr möglich ist (3.4.6). RecA spielt für die Rezirkularisierung von Plasmid-DNA in *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* und *Mycobacterium smegmatis* eine wichtige Rolle (Biswas *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2004). Ob RecA eine derartige Funktion auch in *H. pylori* hat, muss noch weiter untersucht werden. Allerdings bleibt die Frage, wie die Initiation dieses Konjugations-ähnlichen Transfers und die Mobilisierung der DNA durchgeführt werden, offen. In Streptomyzeten wird der konjugative DNA-Transfer durch ein einziges, Plasmid-kodiertes Protein, die ATPase TraB, durchgeführt (Reuther *et al.*, 2006).

Dieses Membran-assoziierte, auch DNA-Translokator genannte Protein gehört der FtsK/SpoIIIE-Familie an und katalysiert den ATP-abhängigen Transport von doppelsträngiger DNA (Reuther *et al.*, 2006). Da für den DNaseI-resistenten Plasmid-DNA-Transfer in *H. pylori* gezeigt wurde, dass die Relaxasen für diesen Mechanismus nicht essentiell sind, könnte auch hier, vergleichbar mit der Situation in *Streptomyces*, ein einzelnes Protein den Transfer von DNA katalysieren. Der genaue Mechanismus und der Ablauf der Initiation des DNaseI-resistenten DNA-Transfers und der Mobilisierung der DNA muss in fortführenden Experimenten noch weiter untersucht werden.

Die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 sind aufgrund des Vorhandenseins einer *mob*-Region in die Gruppe der mobilisierbaren Plasmide einzuordnen. Eine Transfermaschinerie ist nicht auf diesen Plasmiden kodiert, weshalb ihre Mobilisierung nicht selbständig stattfinden kann. Als potentielle Kandidaten wurden die T4SS von *H. pylori* P12 vermutet. Die Deletion aller im Genom von *H. pylori* P12 kodierten T4SS zeigte, ausgenommen der Deletion des ComB-Systems, keine signifikante Auswirkung auf die Mobilisierung der kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12. Bereits bekannt ist, dass das ComB-System für die Aufnahme von DNA im Zuge der natürlichen Transformation verantwortlich ist. Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse zeigten, dass das ComB-System auch für die DNA-Aufnahme während eines DNaseI-geschützten Transfers von Bedeutung ist. Neben der Funktion des ComB-Systems für die DNA-Aufnahme im Rezipienten, konnte gezeigt werden, dass dieses auch im Donor für den Export von DNA von Bedeutung ist (siehe 3.3.2.1). Die duale Funktion des ComB-Systems, bei der Transformation und bei der DNaseI-resistenten Übertragung von DNA im Donor und Rezipienten zeigt die Bedeutung dieses Systems als entscheidendes T4SS für den DNA-Transfer. Ein weiteres, für den Transfer von DNA bedeutendes T4SS ist *Tfs4*. Dieses ist zum einen beim konjugativen Transfer der PZ1 involviert und zum anderen in der Lage DNA ins umgebende Milieu zu sekretieren und für die natürliche Transformation zur Verfügung zu stellen. Neben der Transformations-abhängigen DNA-Aufnahme nach Sekretion durch *Tfs4* und Autolyse und der Übertragung von DNA durch ComB bleiben Fragen zum DNaseI-geschützten Transfer von DNA offen. Die Tatsache, dass das Kanal-Protein ComE3 in der inneren Membran nicht nur während der Transformation, sondern auch in DNaseI-geschützten Transferprozessen von Bedeutung ist, lassen einen zusätzlichen alternativen

Mechanismus vermuten. Mögliche Kandidaten hierfür stellen die unter 4.6.1 diskutierten Membranvesikel dar. Abbildung 4.1 zeigt ein Modell des DNA-Transfers zwischen *H. pylori*-Stämmen und des möglicherweise stattfindenden DNA-Transfers zwischen *H. pylori* und eukaryotischen Zellen.

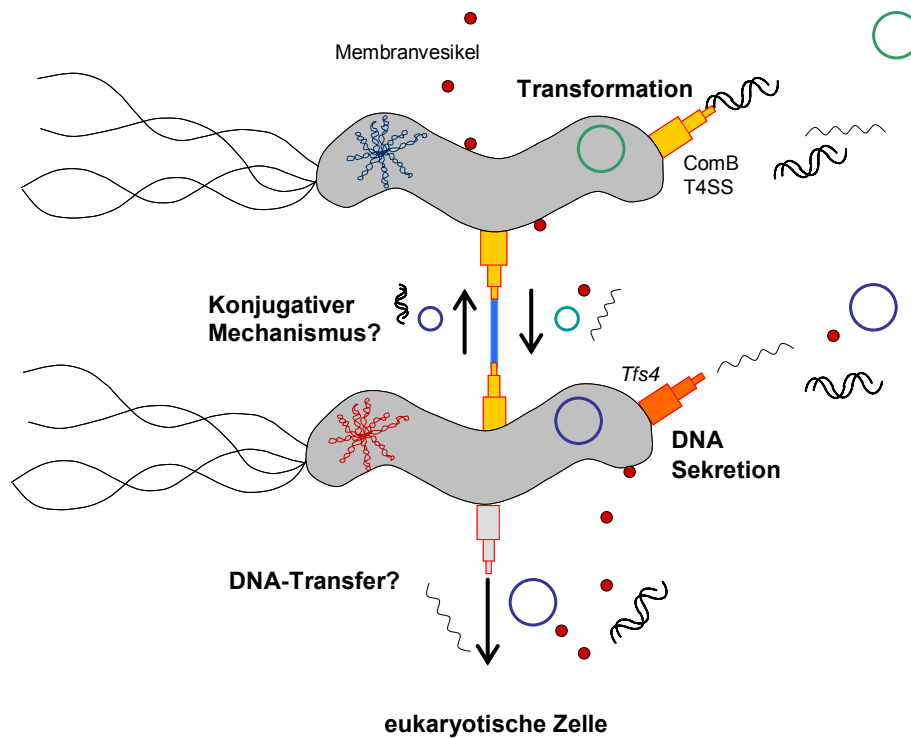


Abbildung 4.1: DNA-Transfer-Mechanismen in *H. pylori*.

H. pylori ist natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA. Für die natürliche Transformation wird das ComB-System (■) eingesetzt. Das ComB-System stellt das entscheidende T4SS für den DNA-Transfer dar und spielt sowohl im Donor, als auch im Rezipienten eine wichtige Rolle. Neben der natürlichen Transformation ist es beim DNA-Export aus dem Donor und bei der DNaseI-geschützten DNA-Aufnahme im Rezipienten von Bedeutung. *Tfs4* (■) stellt ein weiteres, für den horizontalen Gentransfer entscheidendes T4SS dar. Dieses ist für die Sekretion von Plasmid-DNA verantwortlich. Der DNA-Transfer durch Membranvesikel (●) stellt eine interessante Möglichkeit zur DNaseI-geschützten DNA-Übertragung dar. Möglicherweise findet auch eine Interaktion von *H. pylori* mit eukaryotischen Zellen auf DNA-Ebene statt. Ringe: Plasmid-DNA; schlagenförmige Linien: ssDNA und dsDNA.

5 Zusammenfassung

H. pylori kolonisiert die Magenmukosa von etwa 50% der Bevölkerung und ist die Ursache von vielen schweren Erkrankungen, wie z.B. chronischer Gastritis, Magengeschwüren und Magenkrebs. Lange Zeit wurde angenommen, dass das Milieu des Magens aufgrund der dort herrschenden Bedingungen steril sei. *H. pylori* hat Strategien entwickelt, um dieses Habitat zu besiedeln und stellt den dominierenden Bestandteil der Mikroflora im Magen dar. Eine entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Kolonisierung ist die genetische Diversität und die damit verbundene Anpassung an die verschiedenen Mikronischen des Magens. Die Pathogenität von *H. pylori* wird nicht nur durch Toxine vermittelt, sondern resultiert aus der komplexen Interaktion zwischen dem Bakterium, dem Wirt und der Umwelt. Eine wichtige Bedeutung hierbei hat der Austausch von genetischem Material. Während die natürliche Kompetenz eine entscheidende Rolle für die Aufnahme von genetischem Material spielt, wird auch ein konjugativer Mechanismus zum Transfer von DNA diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der DNaseI-resistente Transfer der intrinsischen, kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 zwischen *H. pylori*-Stämmen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass für diesen Mechanismus sowohl die Plasmid-, als auch die chromosomal-kodierten Relaxasen nicht essentiell sind. Möglicherweise wird die Rezirkularisierung der Plasmid-DNA im Rezipienten durch RecA durchgeführt. Um Informationen über die Maschinerie, welche den DNaseI-geschützten Transfer der intrinsischen Plasmide vermittelt zu erhalten, wurden alle in *H. pylori* P12 identifizierten T4SS mit Hilfe einer Kontraselektionsstrategie sequentiell deletiert und Kokultivierungsexperimente mit den entsprechenden Mutanten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass außer dem ComB-System keines der T4SS für den DNA-Transfer zwischen *H. pylori*-Stämmen essentiell ist. Dieses ist für die Aufnahme von DNA im Rezipienten verantwortlich und spielt auch eine Rolle für den DNA-Export durch den Donor. Das ComB-System stellt somit das entscheidende T4SS für den Transfer von DNA dar und hat eine duale Funktion hinsichtlich Transformation und einem Konjugations-ähnlichen Mechanismus im Donor und Rezipienten. Bemerkenswert ist, dass auch nach Deletion aller T4SS in *H. pylori* P12 DNA-Transfer stattfindet. Mögliche Kandidaten für einen alternativen DNA-Übertragungsweg, stellen Membranvesikel dar. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass *Tfs4* Plasmid-DNA in das umgebende Milieu sekretiert. Durch die

Sekretion des Modul-artig aufgebauten kryptischen Plasmids pHel12 kann die Verbreitung von genetischem Material zwischen Stämmen unterstützt werden. Die Unabhängigkeit des DNA-Transfermechanismus von den Relaxasen, sowie die Resistenz gegenüber dem Angriff durch DNaseI lassen einen neuartigen, Konjugations-ähnlichen DNA-Transfermechanismus vermuten, der von der konventionellen Konjugation abgrenzt werden kann.

Neben der Charakterisierung der DNA-Transfer-Mechanismen in *H. pylori* P12 wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die kryptischen Plasmide pHel4 und pHel12 und die mögliche Funktion ihrer Genprodukte untersucht. Etwa 50% aller klinischen Isolate enthalten kryptische Plasmide. Ihre Funktion ist bisher allerdings nicht klar. Die Anwesenheit einer *mob*-Region deutete auf eine konjugative Übertragung der Plasmide hin. Darüber hinaus lässt die Struktur der Plasmide eine Rolle bei der Verbreitung von genetischem Material als Orte des „*gene shufflings*“ vermuten. Zudem konnten erste Hinweise bezüglich der mit den Plasmiden verbundenen Zytotoxizität bestätigt werden. So beeinflusst die Expression von *orf4M* aus pHel4 und *orf12M* aus pHel12 in eukaryotischen Zellen die zelluläre Integrität und führt schließlich zum Zelltod. Die kryptischen Plasmide stellen eine interessante Möglichkeit für *H. pylori* dar, genetische Information auszutauschen und möglicherweise die Wirtszelle zu beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abril N, Roldan-Arjona T, Prieto-Alamo MJ, van Zeeland AA, and Pueyo C (1992) Mutagenesis and DNA repair for alkylation damages in *Escherichia coli* K-12. *Environ Mol Mutagen*, **19**, 288-296.
2. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, Suerbaum S, Thompson SA, van der EA, and van Doorn LJ (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*, **32**, 459-470.
3. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, and Berg DE (1992a) PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6221-6225.
4. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, and Berg DE (1992b) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5137-5142.
5. Allen LA, Schlesinger LS, and Kang B (2000) Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp Med*, **191**, 115-128.
6. Alm RA and Trust TJ (1999) Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med*, **77**, 834-846.
7. Alvarez-Martinez CE and Christie PJ (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, **73**, 775-808.
8. Amieva MR and El-Omar EM (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, **134**, 306-323.
9. Amundsen SK, Fero J, Hansen LM, Cromie GA, Solnick JV, Smith GR, and Salama NR (2008) *Helicobacter pylori* AddAB helicase-nuclease and RecA promote recombination-related DNA repair and survival during stomach colonization. *Mol Microbiol*, **69**, 994-1007.
10. Amundsen SK, Fero J, Salama NR, and Smith GR (2009) Dual nuclease and helicase activities of *Helicobacter pylori* AddAB are required for DNA repair, recombination, and mouse infectivity. *J Biol Chem*, **284**, 16759-16766.
11. Anderson LA, Murphy SJ, Johnston BT, Watson RG, Ferguson HR, Bamford KB, Ghazy A, McCarron P, McGuigan J, Reynolds JV, Comber H, and Murray LJ (2008) Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy and the stages of the oesophageal inflammation, metaplasia, adenocarcinoma sequence: results from the FINBAR case-control study. *Gut*, **57**, 734-739.
12. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyren P, and Engstrand L (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*, **3**, e2836.

13. Ando T, Xu Q, Torres M, Kusugami K, Israel DA, and Blaser MJ (2000) Restriction-modification system differences in *Helicobacter pylori* are a barrier to interstrain plasmid transfer. *Mol Microbiol*, **37**, 1052-1065.
14. Aras RA, Kang J, Tschumi AI, Harasaki Y, and Blaser MJ (2003) Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13579-13584.
15. Aras RA, Small AJ, Ando T, and Blaser MJ (2002) *Helicobacter pylori* interstrain restriction-modification diversity prevents genome subversion by chromosomal DNA from competing strains. *Nucleic Acids Res*, **30**, 5391-5397.
16. Aras RA, Takata T, Ando T, van der EA, and Blaser MJ (2001) Regulation of the HpyII restriction-modification system of *Helicobacter pylori* by gene deletion and horizontal reconstitution. *Mol Microbiol*, **42**, 369-382.
17. Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, and Sasakawa C (2000) *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med*, **191**, 593-602.
18. Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vikstrom S, Sjostrom R, Linden S, Backstrom A, Lundberg C, Arnqvist A, Mahdavi J, Nilsson UJ, Velapatino B, Gilman RH, Gerhard M, Alarcon T, Lopez-Brea M, Nakazawa T, Fox JG, Correa P, Dominguez-Bello MG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Normark S, Carlstedt I, Oscarson S, Teneberg S, Berg DE, and Boren T (2004) Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science*, **305**, 519-522.
19. Atherton JC (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, **1**, 63-96.
20. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, and Cover TL (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, **270**, 17771-17777.
21. Atmakuri K, Cascales E, and Christie PJ (2004) Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol*, **54**, 1199-1211.
22. Ayala G, Torres L, Espinosa M, Fierros-Zarate G, Maldonado V, and Melendez-Zajgla J (2006) External membrane vesicles from *Helicobacter pylori* induce apoptosis in gastric epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett*, **260**, 178-185.
23. Backert S, Kwok T, and Konig W (2005) Conjugative plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori* mediated by chromosomally encoded relaxase and TraG-like proteins. *Microbiology*, **151**, 3493-3503.
24. Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, and Meyer TF (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori*

- CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol*, **2**, 155-164.
25. Bacon DJ, Alm RA, Hu L, Hickey TE, Ewing CP, Batchelor RA, Trust TJ, and Guerry P (2002) DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun*, **70**, 6242-6250.
 26. Basso D, Scrigner M, Toma A, Navaglia F, Di MF, Rugge M, and Plebani M (1996) *Helicobacter pylori* infection enhances mucosal interleukin-1 beta, interleukin-6, and the soluble receptor of interleukin-2. *Int J Clin Lab Res*, **26**, 207-210.
 27. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M, Plebani M, and Atherton JC (2008) Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology*, **135**, 91-99.
 28. Berg DE, Gilman RH, Lelwala-Guruge J, Srivastava K, Valdez Y, Watanabe J, Miyagi J, Akopyants NS, Ramirez-Ramos A, Yoshiwara TH, Recavarren S, and Leon-Barua R (1997) *Helicobacter pylori* populations in Peruvian patients. *Clin Infect Dis*, **25**, 996-1002.
 29. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, and Relman DA (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 732-737.
 30. Biswas GD, Burnstein KL, and Sparling PF (1986) Linearization of donor DNA during plasmid transformation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, **168**, 756-761.
 31. Bizzozero G (1893) Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch Mikr Anat*, **42**, 82.
 32. Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, and Andersson DI (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14607-14612.
 33. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Olivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elis MM, Telford JL, and Baldari CT (2003) The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med*, **198**, 1887-1897.
 34. Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, and Normark S (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, **262**, 1892-1895.
 35. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

36. Burroni D, Lupetti P, Pagliaccia C, Reyrat JM, Dallai R, Rappuoli R, and Telford JL (1998) Deletion of the major proteolytic site of the *Helicobacter pylori* cytotoxin does not influence toxin activity but favors assembly of the toxin into hexameric structures. *Infect Immun*, **66**, 5547-5550.
37. Cascales E and Christie PJ (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, **1**, 137-149.
38. Cascales E and Christie PJ (2004) Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science*, **304**, 1170-1173.
39. Castillo AR, Woodruff AJ, Connolly LE, Sause WE, and Ottemann KM (2008) Recombination-based in vivo expression technology identifies *Helicobacter pylori* genes important for host colonization. *Infect Immun*, **76**, 5632-5644.
40. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, 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.
41. Chedin F and Kowalczykowski SC (2002) A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram-positive bacteria: insights into the initiation of DNA recombination. *Mol Microbiol*, **43**, 823-834.
42. Chen I, Christie PJ, and Dubnau D (2005) The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science*, **310**, 1456-1460.
43. Chen I and Dubnau D (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 241-249.
44. Chitcholtan K, Hampton MB, and Keenan JI (2008) Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis*, **29**, 2400-2405.
45. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
46. Christie PJ (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol*, **40**, 294-305.
47. Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, and Cascales E (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 451-485.
48. Correa P (1996) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **5**, 477-481.
49. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, and . (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.
50. Covacci A, Telford JL, Del GG, Parsonnet J, and Rappuoli R (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, **284**, 1328-1333.
 51. Cover TL and Blanke SR (2005) *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 320-332.
 52. Cover TL and Blaser MJ (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, **267**, 10570-10575.
 53. Cover TL, Hanson PI, and Heuser JE (1997) Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol*, **138**, 759-769.
 54. Cover TL, Krishna US, Israel DA, and Peek RM, Jr. (2003) Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*, **63**, 951-957.
 55. Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, and Blaser MJ (1994) Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem*, **269**, 10566-10573.
 56. Dailidienė D, Dailidė G, Kersulytė D, and Berg DE (2006) Contraselectable streptomycin susceptibility determinant for genetic manipulation and analysis of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 5908-5914.
 57. de la Cruz F and Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol*, **8**, 128-133.
 58. de la Cruz F, Frost LS, Meyer RJ, and Zechner EL (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **34**, 18-40.
 59. De Ungria MC, Kolesnikow T, Cox PT, and Lee A (1999) Molecular characterization and interstrain variability of pHPS1, a plasmid isolated from the Sydney strain (SS1) of *Helicobacter pylori*. *Plasmid*, **41**, 97-109.
 60. Dehio C and Meyer M (1997) Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 538-540.
 61. Dillard JP and Seifert HS (2001) A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol*, **41**, 263-277.
 62. Ding SZ, Fischer W, Kaparakis-Liaskos M, Liechti G, Merrell DS, Grant PA, Ferrero RL, Crowe SE, Haas R, Hatakeyama M, and Goldberg JB (2010) *Helicobacter pylori*-induced histone modification, associated gene expression in gastric epithelial cells, and its implication in pathogenesis. *PLoS One*, **5**, e9875.

63. Donahue JP, Israel DA, Peek RM, Blaser MJ, and Miller GG (2000) Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, **37**, 1066-1074.
64. Dorer MS, Fero J, and Salama NR (2010) DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog*, **6**, e1001026.
65. Dorer MS, Talarico S, and Salama NR (2009) *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog*, **5**, e1000544.
66. Draper O, Cesar CE, Machon C, de la CF, and Llosa M (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16385-16390.
67. Drumm B (1990) *Helicobacter pylori*. *Arch Dis Child*, **65**, 1278-1282.
68. Dubnau D (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **53**, 217-244.
69. Dubois A and Boren T (2007) *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol*, **9**, 1108-1116.
70. Dunn BE, Cohen H, and Blaser MJ (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*, **10**, 720-741.
71. Durrenberger MB, Villiger W, and Bachi T (1991) Conjugational junctions: morphology of specific contacts in conjugating *Escherichia coli* bacteria. *J Struct Biol*, **107**, 146-156.
72. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, and Krakowka S (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, **59**, 2470-2475.
73. Eaton KA, Morgan DR, and Krakowka S (1992) Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, **37**, 123-127.
74. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF, Jr., and Rabkin CS (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, **404**, 398-402.
75. Elitsur Y, Adkins L, Saeed D, and Neace C (1999) *Helicobacter pylori* antibody profile in household members of children with *H. pylori* infection. *J Clin Gastroenterol*, **29**, 178-182.
76. Elmros T, Burman LG, and Bloom GD (1976) Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, **126**, 969-976.
77. Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, 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*, **98**, 15056-15061.

78. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, 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.
79. Fekete RA and Frost LS (2000) Mobilization of chimeric oriT plasmids by F and R100-1: role of relaxosome formation in defining plasmid specificity. *J Bacteriol*, **182**, 4022-4027.
80. Fiocca R, Necchi V, Sommi P, Ricci V, Telford J, Cover TL, and Solcia E (1999) Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol*, **188**, 220-226.
81. 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.
82. Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, Hoffmann R, Zimmer R, and Haas R (2010) Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res*.
83. Francia MV, Varsaki A, Garcillan-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, and de la CF (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev*, **28**, 79-100.
84. Frost LS, Leplae R, Summers AO, and Toussaint A (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 722-732.
85. Fujita Y, Yamaguchi K, Kamegaya T, Sato H, Semura K, Mutoh K, Kashimoto T, Ohori H, and Mukai T (2005) A novel mechanism of autolysis in *Helicobacter pylori*: possible involvement of peptidergic substances. *Helicobacter*, **10**, 567-576.
86. Furuya N and Komano T (2000) Initiation and termination of DNA transfer during conjugation of IncI1 plasmid R64: roles of two sets of inverted repeat sequences within oriT in termination of R64 transfer. *J Bacteriol*, **182**, 3191-3196.
87. Gado I, Toth I, and Szvoboda G (1987) Curing of plasmid pE194 with novobiocin and coumermycin A1 in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, **265**, 136-145.
88. Garcillan-Barcia MP, Francia MV, and de la CF (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev*, **33**, 657-687.

89. Garcillan-Barcia MP, Jurado P, Gonzalez-Perez B, Moncalian G, Fernandez LA, and de la CF (2007) Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. *Mol Microbiol*, **63**, 404-416.
90. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, and Haas R (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, **301**, 1099-1102.
91. 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.
92. Gerdes K, Christensen SK, and Lobner-Olesen A (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 371-382.
93. Ghose C, Perez-Perez GI, van Doorn LJ, Dominguez-Bello MG, and Blaser MJ (2005) High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. *J Clin Microbiol*, **43**, 2635-2641.
94. Go MF, Kapur V, Graham DY, and Musser JM (1996) Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol*, **178**, 3934-3938.
95. Gogarten JP and Townsend JP (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 679-687.
96. Gomis-Ruth FX, Sola M, de la CF, and Coll M (2004) Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr Pharm Des*, **10**, 1551-1565.
97. Gonzalez-Pastor JE, San Millan JL, and Moreno F (1994) The smallest known gene. *Nature*, **369**, 281.
98. Goodman KJ, Correa P, Tengana Aux HJ, Ramirez H, DeLany JP, Guerrero PO, Lopez QM, and Collazos PT (1996) *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am J Epidemiol*, **144**, 290-299.
99. Gotfredsen M and Gerdes K (1998) The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol*, **29**, 1065-1076.
100. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, and Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4645-4649.
101. Grossman L and Yeung AT (1990) The UvrABC endonuclease of *Escherichia coli*. *Photochem Photobiol*, **51**, 749-755.
102. Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, and Oh BH (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol*, **8**, 505-509.

103. Haas R, Kahrs AF, Facius D, Allmeier H, Schmitt R, and Meyer TF (1993) TnMax--a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene*, **130**, 23-31.
104. Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, and Dillard JP (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol*, **55**, 1704-1721.
105. Hamilton HL, Schwartz KJ, and Dillard JP (2001) Insertion-duplication mutagenesis of neisseria: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. *J Bacteriol*, **183**, 4718-4726.
106. Hamon MA, Batsche E, Regnault B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, and Cossart P (2007) Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13467-13472.
107. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
108. Hayes F (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, **301**, 1496-1499.
109. Hebelers BH and Young FE (1975) Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, **122**, 385-392.
110. Heinemann JA (1999) Genetic evidence of protein transfer during bacterial conjugation. *Plasmid*, **41**, 240-247.
111. Heinemann JA and Sprague GF, Jr. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature*, **340**, 205-209.
112. Heinemann JA and Sprague GF, Jr. (1991) Transmission of plasmid DNA to yeast by conjugation with bacteria. *Methods Enzymol*, **194**, 187-195.
113. Heuermann D and Haas R (1995) Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene*, **165**, 17-24.
114. 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.
115. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, and Hatakeyama M (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, **295**, 683-686.
116. Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, and Hatakeyama M (2005) EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem*, **280**, 23130-23137.

117. Hofler C, Fischer W, Hofreuter D, and Haas R (2004) Cryptic plasmids in *Helicobacter pylori*: putative functions in conjugative transfer and microcin production. *Int J Med Microbiol*, **294**, 141-148.
118. Hofreuter D and Haas R (2002) Characterization of two cryptic *Helicobacter pylori* plasmids: a putative source for horizontal gene transfer and gene shuffling. *J Bacteriol*, **184**, 2755-2766.
119. Hofreuter D, Karnholz A, and Haas R (2003) Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence. *Int J Med Microbiol*, **293**, 153-165.
120. Hofreuter D, Odenbreit S, and Haas R (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol*, **41**, 379-391.
121. Hofreuter D, Odenbreit S, Henke G, and Haas R (1998) Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the comB locus. *Mol Microbiol*, **28**, 1027-1038.
122. Holmes DS and Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, **114**, 193-197.
123. Hooper DC, Wolfson JS, McHugh GL, Swartz MD, Tung C, and Swartz MN (1984) Elimination of plasmid pMG110 from *Escherichia coli* by novobiocin and other inhibitors of DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**, 586-590.
124. Horst JP, Wu TH, and Marinus MG (1999) *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol*, **7**, 29-36.
125. Howard EA, Zupan JR, Citovsky V, and Zambryski PC (1992) The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell*, **68**, 109-118.
126. Huang S, Kang J, and Blaser MJ (2006) Antimutator role of the DNA glycosylase mutY gene in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **188**, 6224-6234.
127. Humbert O and Salama NR (2008) The *Helicobacter pylori* HpyAXII restriction-modification system limits exogenous DNA uptake by targeting GTAC sites but shows asymmetric conservation of the DNA methyltransferase and restriction endonuclease components. *Nucleic Acids Res*, **36**, 6893-6906.
128. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, and Boren T (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, **279**, 373-377.
129. Ismail S, Hampton MB, and Keenan JI (2003) *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect Immun*, **71**, 5670-5675.

130. Israel DA, Lou AS, and Blaser MJ (2000) Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol Lett*, **186**, 275-280.
131. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, and Peek RM, Jr. (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14625-14630.
132. Ji X, Fernandez T, Burroni D, Pagliaccia C, Atherton JC, Reyrat JM, Rappuoli R, and Telford JL (2000) Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Infect Immun*, **68**, 3754-3757.
133. Jiang Q, Hiratsuka K, and Taylor DE (1996) Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*, **20**, 833-842.
134. Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, Ertl C, Weiss E, Kapp U, Rohde M, Pirch T, Jung K, Retta SF, Terradot L, Fischer W, and Haas R (2009) *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog*, **5**, e1000684.
135. Kang J and Blaser MJ (2006) UvrD helicase suppresses recombination and DNA damage-induced deletions. *J Bacteriol*, **188**, 5450-5459.
136. Karnholz A, Hoefler C, Odenbreit S, Fischer W, Hofreuter D, and Haas R (2006) Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **188**, 882-893.
137. Katoh M, Saito D, Noda T, Yoshida S, Oguro Y, Yazaki Y, Sugimura T, and Terada M (1993) *Helicobacter pylori* may be transmitted through gastrofiberscope even after manual Hyamine washing. *Jpn J Cancer Res*, **84**, 117-119.
138. Kavermann H, Burns BP, 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.
139. Keenan J, Day T, Neal S, Cook B, Perez-Perez G, Allardyce R, and Bagshaw P (2000) A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett*, **182**, 259-264.
140. Kersulyte D, Chalkauskas H, and Berg DE (1999) Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol*, **31**, 31-43.
141. Kersulyte D, Lee W, Subramaniam D, Anant S, Herrera P, Cabrera L, Balqui J, Barabas O, Kalia A, Gilman RH, and Berg DE (2009) *Helicobacter Pylori*'s plasticity zones are novel transposable elements. *PLoS One*, **4**, e6859.

142. Kersulyte D, Velapatino B, Mukhopadhyay AK, Cahuayme L, Bussalleu A, Combe J, Gilman RH, and Berg DE (2003) Cluster of type IV secretion genes in *Helicobacter pylori*'s plasticity zone. *J Bacteriol*, **185**, 3764-3772.
143. Kingsman A and Willetts N (1978) The requirements for conjugal DNA synthesis in the donor strain during flac transfer. *J Mol Biol*, **122**, 287-300.
144. Kolling GL and Matthews KR (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 1843-1848.
145. Kong H, Lin LF, Porter N, Stickel S, Byrd D, Posfai J, and Roberts RJ (2000) Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3216-3223.
146. Konjetzny GE (1923) Chronische Gastritis und Duodenitis als Ursache des Magenduoanalgeschwürs. *Zieglers Beitr Pathol Anat Allg Pathol*, **71**, 595-618.
147. Kooistra J, Vosman B, and Venema G (1988) Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* transcription unit involved in ATP-dependent DNase synthesis. *J Bacteriol*, **170**, 4791-4797.
148. Kramer MG, Khan SA, and Espinosa M (1997) Plasmid rolling circle replication: identification of the RNA polymerase-directed primer RNA and requirement for DNA polymerase I for lagging strand synthesis. *EMBO J*, **16**, 5784-5795.
149. Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, and Rudi J (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun*, **69**, 5080-5087.
150. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, and Blaser MJ (1998) Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **180**, 2901-2905.
151. Kulick S, Moccia C, Didelot X, Falush D, Kraft C, and Suerbaum S (2008) Mosaic DNA imports with interspersions of recipient sequence after natural transformation of *Helicobacter pylori*. *PLoS One*, **3**, e3797.
152. Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, and Citovsky V (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1871-1876.
153. 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.
154. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
155. Lanka E and Wilkins BM (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu Rev Biochem*, **64**, 141-169.

156. Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, and Frost LS (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett*, **224**, 1-15.
157. Lederberg J (1946) Studies in bacterial genetics. *J Bacteriol*, **52**, 503.
158. Lee SK and Josenhans C (2005) *Helicobacter pylori* and the innate immune system. *Int J Med Microbiol*, **295**, 325-334.
159. Levine SM, Lin EA, Emara W, Kang J, DiBenedetto M, Ando T, Falush D, and Blaser MJ (2007) Plastic cells and populations: DNA substrate characteristics in *Helicobacter pylori* transformation define a flexible but conservative system for genomic variation. *FASEB J*, **21**, 3458-3467.
160. 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.
161. Lin EA, Zhang XS, Levine SM, Gill SR, Falush D, and Blaser MJ (2009) Natural transformation of *Helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragments interrupted by gaps of variable size. *PLoS Pathog*, **5**, e1000337.
162. Lin LF, Posfai J, Roberts RJ, and Kong H (2001) Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2740-2745.
163. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, and Achtman M (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, **445**, 915-918.
164. Llosa M, Gomis-Ruth FX, Coll M, and de la Cruz FF (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol*, **45**, 1-8.
165. Lorenz MG and Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*, **58**, 563-602.
166. Luo ZQ and Isberg RR (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 841-846.
167. Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, Dallai R, Rappuoli R, and Telford JL (1996) Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol*, **133**, 801-807.
168. Luttinger A (1995) The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. *Mol Microbiol*, **15**, 601-606.
169. Maeda S, Kanai F, Ogura K, Yoshida H, Ikenoue T, Takahashi M, Kawabe T, Shiratori Y, and Omata M (1997) High seropositivity of anti-CagA antibody in

- Helicobacter pylori*-infected patients irrelevant to peptic ulcers and normal mucosa in Japan. *Dig Dis Sci*, **42**, 1841-1847.
170. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadstrom T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarstrom L, and Boren T (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, **297**, 573-578.
 171. Malaty HM and Graham DY (1994) Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, **35**, 742-745.
 172. Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 173. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, and Glancy RJ (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*, **142**, 436-439.
 174. Marshall BJ, Barrett LJ, Prakash C, McCallum RW, and Guerrant RL (1990) Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, **99**, 697-702.
 175. Marshall BJ and Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1**, 1311-1315.
 176. Marshall T and Williams KM (1992) Recovery of protein by coomassie brilliant blue precipitation prior to electrophoresis. *Electrophoresis*, **13**, 887-888.
 177. Marsich E, Zuccato P, Rizzi S, Vetere A, Tonin E, and Paoletti S (2002) *Helicobacter pylori* expresses an autolytic enzyme: gene identification, cloning, and theoretical protein structure. *J Bacteriol*, **184**, 6270-6279.
 178. Marsin S, Lopes A, Mathieu A, Dizet E, Orillard E, Guerois R, and Radicella JP (2010) Genetic dissection of *Helicobacter pylori* AddAB role in homologous recombination. *FEMS Microbiol Lett*.
 179. Marsin S, Mathieu A, Kortulewski T, Guerois R, and Radicella JP (2008) Unveiling novel RecO distant orthologues involved in homologous recombination. *PLoS Genet*, **4**, e1000146.
 180. Mashburn-Warren LM and Whiteley M (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol*, **61**, 839-846.
 181. McGlynn P and Lloyd RG (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 859-870.
 182. Minnis JA, Taylor TE, Knesek JE, Peterson WL, and McIntire SA (1995) Characterization of a 3.5-kbp plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid*, **34**, 22-36.

183. Miroux B and Walker JE (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, **260**, 289-298.
184. Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, and Montecucco C (1998) Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med*, **187**, 135-140.
185. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, 263-273.
186. Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, and Hatakeyama M (2006) Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*, **130**, 1181-1190.
187. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, Ricci V, and Solcia E (2007) Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **132**, 1009-1023.
188. Nedenskov-Sorensen P, Bukholm G, and Bovre K (1990) Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis*, **161**, 365-366.
189. Nguyen VQ, Caprioli RM, and Cover TL (2001) Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun*, **69**, 543-546.
190. Nobusato A, Uchiyama I, and Kobayashi I (2000) Diversity of restriction-modification gene homologues in *Helicobacter pylori*. *Gene*, **259**, 89-98.
191. O'Connell CM and Nicks KM (2006) A plasmid-cured *Chlamydia muridarum* strain displays altered plaque morphology and reduced infectivity in cell culture. *Microbiology*, **152**, 1601-1607.
192. Ochman H, Lawrence JG, and Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, **405**, 299-304.
193. Odenbreit S, Gebert B, Puls J, Fischer W, and Haas R (2001) Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol*, **3**, 21-31.
194. Odenbreit S, Puls 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.
195. 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.

196. Oyarzabal OA, Rad R, and Backert S (2007) Conjugative transfer of chromosomally encoded antibiotic resistance from *Helicobacter pylori* to *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, **45**, 402-408.
197. Pagliaccia C, de BM, Lupetti P, Ji X, Burrone D, Cover TL, Papini E, Rappuoli R, Telford JL, and Reyrat JM (1998) The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10212-10217.
198. Palmén R, Driessen AJ, and Hellingwerf KJ (1994) Bioenergetic aspects of the translocation of macromolecules across bacterial membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1183**, 417-451.
199. Pansegrau W and Lanka E (1996) Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing. Independence of tight substrate binding and catalytic activity of relaxase (TraI) of IncPalphA plasmid RP4. *J Biol Chem*, **271**, 13068-13076.
200. Parker H, Chitcholtan K, Hampton MB, and Keenan JI (2010) Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect Immun*.
201. Parsonnet J (1998) *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut*, **43 Suppl 1**, S6-S9.
202. Peek RM, Jr. and Blaser MJ (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, **2**, 28-37.
203. Penfold SS, Lastovica AJ, and Elisha BG (1988) Demonstration of plasmids in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis*, **157**, 850-851.
204. Perez-Mendoza D and de la Cruz F (2009) *Escherichia coli* genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: are there any? *BMC Genomics*, **10**, 71.
205. Perez-Perez GI, Salomaa A, Kosunen TU, Daverman B, Rautelin H, Aromaa A, Knekt P, and Blaser MJ (2002) Evidence that cagA(+) *Helicobacter pylori* strains are disappearing more rapidly than cagA(-) strains. *Gut*, **50**, 295-298.
206. Piers KL, Heath JD, Liang X, Stephens KM, and Nester EW (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1613-1618.
207. Rehnberg-Laiho L, Rautelin H, Koskela P, Sarna S, Pukkala E, Aromaa A, Knekt P, and Kosunen TU (2001) Decreasing prevalence of *Helicobacter* antibodies in Finland, with reference to the decreasing incidence of gastric cancer. *Epidemiol Infect*, **126**, 37-42.
208. Renelli M, Matias V, Lo RY, and Beveridge TJ (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, **150**, 2161-2169.

209. Reuther J, Gekeler C, Tiffert Y, Wohlleben W, and Muth G (2006) Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes: a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip. *Mol Microbiol*, **61**, 436-446.
210. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh HM, and Atherton JC (2007) A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, **133**, 926-936.
211. Ribeiro ML, Godoy AP, Benvengo YH, Ecclissato CC, Mendonca S, and Pedrazzoli J, Jr. (2004) The influence of endoscopic procedures upon the contamination of *Helicobacter pylori* cultures. *Arq Gastroenterol*, **41**, 100-103.
212. Ricci V, Ciacci C, Zarrilli R, Sommi P, Tumuru MK, Del Vecchio BC, Bruni CB, Cover TL, Blaser MJ, and Romano M (1996) Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. *Infect Immun*, **64**, 2829-2833.
213. Roche N, Ilver D, Angstrom J, Barone S, Telford JL, and Teneberg S (2007) Human gastric glycosphingolipids recognized by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA. *Microbes Infect*, **9**, 605-614.
214. Roy CR and Mukherjee S (2009) Bacterial FIC Proteins AMP Up Infection. *Sci Signal*, **2**, e14.
215. Rubin CE (1997) Are there three types of *Helicobacter pylori* gastritis? *Gastroenterology*, **112**, 2108-2110.
216. Rupnow MF, Shachter RD, Owens DK, and Parsonnet J (2000) A dynamic transmission model for predicting trends in *Helicobacter pylori* and associated diseases in the United States. *Emerg Infect Dis*, **6**, 228-237.
217. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, and Hatakeyama M (2007) *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, **447**, 330-333.
218. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, and Scott DR (2003) The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol*, **65**, 349-369.
219. Salaun L, Linz B, Suerbaum S, and Saunders NJ (2004) The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, **150**, 817-830.
220. Salgado-Pabon W, Jain S, Turner N, van der DC, and Dillard JP (2007) A novel relaxase homologue is involved in chromosomal DNA processing for type IV secretion in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol*, **66**, 930-947.
221. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

222. Satin B, Norais N, Telford J, Rappuoli R, Murgia M, Montecucco C, and Papini E (1997) Effect of helicobacter pylori vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J Biol Chem*, **272**, 25022-25028.
223. Saunders NJ, Peden JF, Hood DW, and Moxon ER (1998) Simple sequence repeats in the Helicobacter pylori genome. *Mol Microbiol*, **27**, 1091-1098.
224. Saunders NJ, Peden JF, and Moxon ER (1999) Absence in Helicobacter pylori of an uptake sequence for enhancing uptake of homospesific DNA during transformation. *Microbiology*, **145 (Pt 12)**, 3523-3528.
225. Schmitt W and Haas R (1994) Genetic analysis of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol*, **12**, 307-319.
226. Schmitt W, Odenbreit S, Heuermann D, and Haas R (1995) Cloning of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and functional characterization of its product. *Mol Gen Genet*, **248**, 563-572.
227. Schofield MJ and Hsieh P (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol*, **57**, 579-608.
228. Schreiber S, Bucker R, Groll C, zevedo-Vethacke M, Garten D, Scheid P, Friedrich S, Gatermann S, Josenhans C, and Suerbaum S (2005) Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo. *Infect Immun*, **73**, 1584-1589.
229. Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, and Suerbaum S (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5024-5029.
230. Schulein R, Guye P, Rhomberg TA, Schmid MC, Schroder G, Vergunst AC, Carena I, and Dehio C (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of Bartonella henselae into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 856-861.
231. Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, Owen RJ, Graham DY, van der MS, Achtman M, and Suerbaum S (2008) Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog*, **4**, e1000180.
232. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, and Tompkins LS (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14559-14564.
233. Segal ED, Lange C, Covacci A, Tompkins LS, and Falkow S (1997) Induction of host signal transduction pathways by Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7595-7599.
234. Segal ED and Tompkins LS (1993) Transformation of Helicobacter pylori by electroporation. *Biotechniques*, **14**, 225-226.

235. Sewald X, Gebert-Vogl B, Prassl S, Barwig I, Weiss E, Fabbri M, Osicka R, Schiemann M, Busch DH, Semmrich M, Holzmann B, Sebo P, and Haas R (2008) Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host Microbe*, **3**, 20-29.
236. Sharma SA, Tummuru MK, Miller GG, and Blaser MJ (1995) Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect Immun*, **63**, 1681-1687.
237. Shockman GD, neo-Moore L, Kariyama R, and Massidda O (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb Drug Resist*, **2**, 95-98.
238. Silby MW, Ferguson GC, Billington C, and Heinemann JA (2007) Localization of the plasmid-encoded proteins TraI and MobA in eukaryotic cells. *Plasmid*, **57**, 118-130.
239. Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, and de la CF (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, **74**, 434-452.
240. Sommi P, Ricci V, Fiocca R, Romano M, Ivey KJ, Cova E, Solcia E, and Ventura U (1996) Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions induced by *Helicobacter pylori*: an in vitro study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion*, **57**, 299-304.
241. Sparling PF (1966) Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J Bacteriol*, **92**, 1364-1371.
242. Stingl K and De Reuse H (2005) Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? *Int J Med Microbiol*, **295**, 307-315.
243. Stingl K, Muller S, Scheidgen-Kleyboldt G, Clausen M, and Maier B (2010) Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 1184-1189.
244. Suerbaum S and Achtman M (2004) *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *Int J Med Microbiol*, **294**, 133-139.
245. Suerbaum S and Josenhans C (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 441-452.
246. 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.
247. Suerbaum S and Michetti P (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, **347**, 1175-1186.

248. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, Dyrek I, and Achtman M (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12619-12624.
249. Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, and Cover TL (2004) Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7727-7732.
250. Takai Y, Sasaki T, and Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**, 153-208.
251. Takata T, Aras R, Tavakoli D, Ando T, Olivares AZ, and Blaser MJ (2002) Phenotypic and genotypic variation in methylases involved in type II restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2444-2452.
252. Tato I, Zunzunegui S, de la CF, and Cabezon E (2005) TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8156-8161.
253. Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS, Berg DE, Thompson N, Shames B, Yan L, Fontham E, Janney F, Hunter FM, and . (1995) Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*, **33**, 918-923.
254. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burrioni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, and . (1994) Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med*, **179**, 1653-1658.
255. Teyssen S, Chari ST, Scheid J, and Singer MV (1995) Effect of repeated boluses of intravenous omeprazole and primed infusions of ranitidine on 24-hour intragastric pH in healthy human subjects. *Dig Dis Sci*, **40**, 247-255.
256. Thomas CM and Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 711-721.
257. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, and Venter JC (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**, 539-547.
258. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, **24**, 145-149.

259. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, and Hatakeyama M (2003) Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem*, **278**, 3664-3670.
260. Vergunst AC, Schrammeijer B, den Dulk-Ras A, de Vlaam CM, Regensburg-Tuink TJ, and Hooykaas PJ (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, **290**, 979-982.
261. Vergunst AC, van Lier MC, den Dulk-Ras A, Stuve TA, Ouwehand A, and Hooykaas PJ (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 832-837.
262. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, and Ferrero RL (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, **5**, 1166-1174.
263. Vinion-Dubiel AD, McClain MS, Czajkowsky DM, Iwamoto H, Ye D, Cao P, Schraw W, Szabo G, Blanke SR, Shao Z, and Cover TL (1999) A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) inhibits VacA-induced cell vacuolation. *J Biol Chem*, **274**, 37736-37742.
264. Wang G, Humayun MZ, and Taylor DE (1999) Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol*, **7**, 488-493.
265. Wang G and Maier RJ (2009) A RecB-like helicase in *Helicobacter pylori* is important for DNA repair and host colonization. *Infect Immun*, **77**, 286-291.
266. Wang J and Derbyshire KM (2004) Plasmid DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis* involves novel DNA rearrangements in the recipient, which can be exploited for molecular genetic studies. *Mol Microbiol*, **53**, 1233-1241.
267. Waters VL (2001) Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat Genet*, **29**, 375-376.
268. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, and Sachs G (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, **287**, 482-485.
269. Wilkins BM and Thomas AT (2000) DNA-independent transport of plasmid primase protein between bacteria by the II conjugation system. *Mol Microbiol*, **38**, 650-657.
270. Wolfson JS, Hooper DC, Swartz MN, Swartz MD, and McHugh GL (1983) Novobiocin-induced elimination of F[']lac and mini-F plasmids from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **156**, 1165-1170.

271. Worby CA, Mattoo S, Kruger RP, Corbeil LB, Koller A, Mendez JC, Zekarias B, Lazar C, and Dixon JE (2009) The fic domain: regulation of cell signaling by adenylation. *Mol Cell*, **34**, 93-103.
272. Wunder C, Churin Y, Winau F, Warnecke D, Vieth M, Lindner B, Zahringer U, Mollenkopf HJ, Heinz E, and Meyer TF (2006) Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat Med*, **12**, 1030-1038.
273. Xu Q, Morgan RD, Roberts RJ, and Blaser MJ (2000) Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9671-9676.
274. Yahiro K, Niidome T, Kimura M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Imagawa K, Wada A, Moss J, and Hirayama T (1999) Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem*, **274**, 36693-36699.
275. Yahiro K, Wada A, Nakayama M, Kimura T, Ogushi K, Niidome T, Aoyagi H, Yoshino K, Yonezawa K, Moss J, and Hirayama T (2003) Protein-tyrosine phosphatase alpha, RPTP alpha, is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J Biol Chem*, **278**, 19183-19189.
276. Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL, and Orth K (2009) AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science*, **323**, 269-272.
277. Yarbrough ML and Orth K (2009) AMPylation is a new post-translational modification. *Nat Chem Biol*, **5**, 378-379.
278. Yaron S, Kolling GL, Simon L, and Matthews KR (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 4414-4420.
279. Zhang S and Meyer R (1997) The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer. *Mol Microbiol*, **25**, 509-516.
280. Zheng PY and Jones NL (2003) *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol*, **5**, 25-40.
281. Ziemienowicz A, Merkle T, Schoumacher F, Hohn B, and Rossi L (2001) Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *Plant Cell*, **13**, 369-383.
282. Zupan J, Muth TR, Draper O, and Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J*, **23**, 11-28.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung möchte ich mich nicht nur für die unkomplizierte Übernahme der Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken, sondern auch für die Begleitung und Unterstützung meiner akademischen Ausbildung seit Beginn meiner Diplomarbeit in seinem Labor. Vielen herzlichen Dank!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Haas für die Betreuung dieser Arbeit durch viele wertvolle Ratschläge und stetige Diskussionsbereitschaft. Sehr dankbar bin ich für die verschiedenen Möglichkeiten meine Daten auf wissenschaftlichen Kongressen im In- und Ausland zu präsentieren, das in mich gesetzte Vertrauen und für die beste Zeit in meinem Leben, den Aufenthalt in Australien!

Ein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann. Ich bedanke mich für die Einblicke in die Bodenökologie und dafür so tolle Menschen kennengelernt zu haben! Ich möchte dieses Jahr nicht missen!

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Wolfgang Fischer für seine Unterstützung bei sämtlichen wissenschaftlichen Herausforderungen, seine Diskussionsbereitschaft, die vielen Ratschläge und die kritische Durchsicht dieses Manuskripts bedanken. Sein stets offenes Ohr für wissenschaftliche und private Angelegenheiten war mir immer eine sehr große Stütze!

Luisa danke ich für den FACS-Crashkurs, für die geistige Unterstützung meiner Zellkultur-Experimente und die Beantwortung vieler Fragen. Ich habe viel gelernt, nicht nur über *H. pylori*.

Auch wenn wir mal nicht so viel zum Lachen hatten, getan haben wir es trotzdem. Ich danke meiner liebsten Kollegin Claudia für die vielen Tränen, die wir gelacht haben, dafür, dass ich immer meine Vierteldrehung machen durfte, für die Spitzen-Sport-Gemeinschaft, für die vielen Ratschläge bei privaten und auch wissenschaftlichen Problemen und für eine wirklich tolle Zeit!

Ein besonderer Dank geht an die gute Seele des Labors, Evelyn, und an Friederike. Ohne sie würde so vieles nicht reibungslos laufen! Vielen Dank für den einen oder anderen Ratsch` an der Sterilbank, über dieses und jenes...

Utkarsh danke ich für viele philosophische Gespräche und für seinen Optimismus, was unsere Zukunft betrifft. Something big is waiting out there for us!

Natürlich möchte ich mich auch bei all den Ehemaligen bedanken! Vor allem bei Iris, für ihre starke Schulter und die Unterstützung besonders am Anfang meiner Zeit bei den Haasen. Vielen Dank, Xaver, für viele gute Ratschläge und die Freude an der Wissenschaft.

Allen Kollegen und Freunden außerhalb der AG Haas möchte ich für die schöne Zeit danken! Ein besonderer Dank geht an Andrea für die Konferenzen im Pilzlabor und die gegenseitige Unterstützung bei allen Gemütslagen!

Ein großer Dank geht an meine Freunde! Schön, dass ihr immer für mich da seid!

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Geschwister, Christian, Sebastian und Karin, für die Unterstützung in allen Gemüts- und Lebenslagen. Besonders möchte ich meinem Zwillingsbruder für die Hilfe bei sämtlichen Computer-Problemen danken!

Mein größter Dank geht an meine lieben Eltern! Sie haben mich auf meinem Weg in jeder Hinsicht unterstützt und immer an mich geglaubt. Vielen Dank, dass ihr so voller Stolz mit mir durchgehalten habt!



Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....
(Unterschrift)