

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl Bakteriologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Herstellung eines biolumineszierenden *Helicobacter pylori* Stammes
– und dessen Einsatz im Tiermodell der Mongolischen Wüstenrennmaus



DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Barbara Eberle
aus Kempten im Allgäu

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Rainer Haas

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Holger Rüssmann
Priv. Doz. Dr. Gabriele Rieder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2014

Die hier 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 Herrn Prof. Dr. R. Haas im Zeitraum von Februar 2011 bis März 2013 gefertigt.

*Ich widme diese Arbeit
meinen Eltern*

*„Deus fortitudo mea tu es de luce
consurgam ad te
sitivit te anima mea desideravit te
caro mea ...“*

Ps 62.2

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	10
1.1.	Bedeutung von Infektionskrankheiten	10
1.2.	Das Bakterium <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.2.1.	Geschichte	11
1.2.2.	Allgemeines und Epidemiologie	12
1.2.3.	Pathogenese von <i>H. pylori</i> assoziierten Erkrankungen	14
1.2.4.	Diagnostik und Therapie	17
1.2.5.	Pathogenitätsfaktoren	19
1.2.6.	Tiermodell	25
1.3.	Biolumineszenz	26
1.3.1.	Luciferase und Luciferin	26
1.3.2.	<i>in vivo</i> Biolumineszenz Bildung (BLI)	28
1.4.	Zielsetzung	30
2.	Materialien und Methoden	32
2.1.	Materialien	32
2.1.1.	Plasmide	32
2.1.2.	Oligonukleotide	38
2.1.3.	Bakterienstämme	41
2.1.3.1.	<i>E. coli</i> Stämme	41
2.1.3.2.	<i>Helicobacter pylori</i> Stämme	42
2.1.4.	Medien für Bakterien	43
2.1.5.	Antibiotika als Mediumzusätze	44
2.1.6.	Enzyme und Proteine	45
2.1.7.	Chemikalien, Puffer und Lösungen	45
2.1.7.1.	Kommerziell erhältliche Kits	45
2.1.7.2.	Puffer für Enzymreaktionen	46
2.1.7.3.	weitere Puffer	46
2.1.7.4.	Chemikalien	47
2.1.7.5.	Molekulargewichtsmarker	47
2.1.8.	Verbrauchsmaterial	48
2.1.9.	Geräte	48
2.1.10.	Mongolische Wüstenrennmäuse als Modeltiere	49
2.2.	Methoden	51
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden	51
2.2.1.1.	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	51
2.2.1.2.	Kultivierung und Stammhaltung von <i>H. pylori</i>	51
2.2.1.3.	Messen der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen	52
2.2.2.	Genetische und molekularbiologische Methoden	52
2.2.2.1.	Analytische und präperative Gelelektrophorese von DNA	52
2.2.2.2.	Aufreinigen von DNA aus enzymatischer Reaktionen und Agarosegel	53
2.2.2.3.	Restriktionsenzymverdau	53
2.2.2.4.	Dephosphorylierung	53
2.2.2.5.	Ligation	54
2.2.2.6.	<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	54
2.2.2.7.	<i>Overlap-PCR</i>	56
2.2.2.9.	Isolation von Plasmid-DNA	59
2.2.2.9.1.	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> mit Kits	59
2.2.2.9.2.	Plasmid-Präparation aus <i>H. pylori</i> mit Kits	59
2.2.2.9.3.	Kochpräparation	59

2.2.2.9.4.	Isolierung von genomischer DNA aus <i>H. pylori</i>	60
2.2.2.10.	Transformation in chemokompetente <i>E. coli</i>	60
2.2.2.11.	Transformation in Top10 Zellen	61
2.2.2.12.	Transformation in <i>Helicobacter pylori</i>	61
2.2.2.13.	Elektroporation in <i>Helicobacter pylori</i>	62
2.2.2.14.	Generierung markerfreier <i>H. pylori</i> Mutanten	62
2.2.3	Biolumineszenz Bildgebung	63
2.2.3.1.	Biolumineszenz Plattenlesegerät	63
2.2.3.1.	IVIS® lumina System zur Biolumineszenz Bildgebung	64
2.2.4	Arbeiten im Tiermodell	64
2.2.4.1	Infektion der Tiere	64
2.2.4.2	Anästhesie	65
2.2.4.3	Tötung der Tiere und CFU-Bestimmung	65
3.	Ergebnisse	67
3.1.	Konstruktion eines biolumineszierenden <i>Helicobacter pylori</i>	67
3.1.1.	Integration des ganzen <i>Lux</i>-Operon in <i>H. pylori</i>	69
3.1.1.1.	Integration des ganzen <i>Lux</i> -Operon in das <i>H. pylori</i> Chromosom	69
3.1.1.1.1.	Verwendung des <i>moeB</i> -Lokus	69
3.1.1.1.2.	Verwendung des <i>TrpA</i> -Lokus	77
3.1.1.2.	Integration des <i>Lux</i> -Operon in das <i>H. pylori</i> Plasmid pHel12	80
3.1.2.	Integration des <i>Lux</i>-Operon geteilt in <i>luxAB</i> und <i>luxCDE</i> in <i>H. pylori</i>	83
3.1.2.1.	<i>luxAB</i> potentiell induzierbar und <i>luxCDE</i> konstitutiv exprimiert	84
3.1.2.2.	Nicht-induzierbares geteiltes Luciferasesystem	88
3.1.3.	Vergleich der einzelnen Konstrukte in <i>H. pylori</i> B8	92
3.2.	Infektionsexperimente mit biolumineszierenden <i>H. pylori</i>	94
3.2.1.	Infektion von Gerbils mit H-6 (<i>moeB::cat_mcc_luxCDABE-mut</i>)	94
3.2.2.	Infektion von Gerbils mit H-20 (<i>TrpA::uptetO_luxAB_aphA3; pHel12_cat_alpA_luxCDE-mut</i>)	94
3.2.3.	Infektion von Gerbils mit H-25 (<i>TrpA::fla_luxCDE-mut_aphA3; pHel12_cat_alpA_luxAB</i>)	95
3.2.4.	Tripleinfektion von Gerbils mit H-10/11, H-19 und H-25	96
3.2.5.	Überblick über die Ergebnisse der Infektionsversuche	98
4.	Diskussion	100
4.1.	Biolumineszenz Bildgebung – Einordnung dieser Arbeit in die schon bestehende Literatur	100
4.2.	Eignung des verwendeten Tiermodells für <i>in vivo</i> Biolumineszenz Bildgebung	102
4.3.	Biolumineszierender <i>H. pylori</i> – Kolonisierung, Persistenz und Erregerlast im Gerbil	104
4.4.	Aussagekraft des Modells	105
4.5.	Verbesserungsmöglichkeiten und Ausblick	105
5.	Zusammenfassung	108
6.	Literaturverzeichnis	110
7.	Anhang	121
7.1	Abkürzungen	121
7.2	Tabellenverzeichnis	124

7.3	Abbildungsverzeichnis _____	125
7.4	Danksagungen _____	126
7.5	Curriculum vitae _____	127

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von Infektionskrankheiten

Seit Urzeiten suchen den Menschen Infektionskrankheiten heim. Ohne eine Erklärung für die Ursachen derselben zu haben, behalf man sich mit anschaulichen Bildern, wie dem Würgeengel der Kinder (Diphtherie) oder dem schwarzen Tod (Pest), um dem Schrecken ein Gesicht zu geben. Woher kamen Krankheit, Leiden und Tod? War es Apollo, der mit seinen Pfeilen die Pest unter den Menschen säte, wie in der Ilias? War es die schlechte Luft, die aus den Sümpfen kroch und den Menschen das Fieber brachte? Oder waren es missgünstige Menschen, die die Brunnen vergiftet hatten? Erst sehr viel später sollte der Mensch eine Antwort finden. Schon 1677 entdeckte Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) mit seinem selbstgebauten Mikroskop kleine Lebewesen in Teichwasser und in seinem eigenen Speichel, allerdings ohne sich der Reichweite dieser Entdeckung bewusst zu sein. Später in den 50er Jahren des 19. Jahrhunderts erforschte Louis Pasteur (1822-1895) unter anderem Milchsäure- und alkoholische Gärung und stellte die Vermutung auf, dass Mikroorganismen, wie sie von ihm beobachtet wurden, auch für manche Krankheiten des Menschen eine Rolle spielen könnten (Eckart, 2009). Diese Vermutung konnte Robert Koch (1843-1910) schließlich bestätigen, als er im Jahre 1882 den Erreger der Tuberkulose, *Mycobacterium tuberculosis*, und ein Jahr später den Choleraerreger, *Vibrio comma (sive cholerae)*, entdeckte. Die Schüler Kochs destillierten aus dessen bakteriologischen Erkenntnissen die bekannten Koch'schen Postulate, die eine Kausalkette von Erreger zu Infektion und Krankheit ziehen (Eckart, 2009). Die Entdeckung von viralen Erregern, eingeläutet durch die Entdeckung des Pockenvirus durch Enrique Paschen, schien das Bild über die Ursachen von Infektionen zu vervollständigen.

Während der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts ließen schließlich Errungenschaften, wie Antibiotika und Impfung eine Befreiung des Menschen von der Geißel der Infektionskrankheiten in naher Zukunft erhoffen - ein Irrtum wie sich herausstellte. Noch heute gehören Infektionskrankheiten nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gerade in den Entwicklungsländern zu den häufigsten Todesursachen. Vermehrte Resistenzen und eine zunehmende

Impfmüdigkeit lassen Krankheiten florieren, die man eigentlich für so gut wie ausgestorben gehalten hatte (z.B. Tuberkulose, Masern,...). „Neuartige“ Infektionskrankheiten, wie Prionenerkrankungen, AIDS oder Ebola, sowie Ereignisse, wie die SARS-Pandemie (2002/2003) (*severe acute respiratory syndrome*), lassen uns erkennen, dass die Geißel der Infektionserkrankungen noch lange nicht gebannt ist.

1.2. Das Bakterium *Helicobacter pylori*

1.2.1. Geschichte

„Die unmögliche Tatsache“ so lautet der Titel eines Gedichts von Christian Morgenstern und dies könnte auch das Leitwort zu der Geschichte der „(Wieder)Entdeckung“ von *Helicobacter pylori* sein. Als B. Marshall und J. R. Warren in den 80er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts ein spiralförmiges Bakterium im menschlichen Magen beschrieben, welches in Assoziation mit aktiver chronischer Gastritis und peptischer Ulkuserkrankung stand (Marshall & Warren, 1984), wurde ihre Entdeckung von der Fachwelt mit gemischten Gefühlen aufgenommen. Denn es schien eine weithin anerkannte Tatsache zu sein, dass der Magen wegen seiner starken Azidität kein Habitat für Bakterien darstellen konnte. Dabei hatte schon 1875 G. Bottcher spiralige Bakterien am Grunde und am Rand von Magenulzera beschrieben (Kidd & Modlin, 1998). 1889 hatte W. Jaworski an der Universität in Krakau zum ersten Mal spiralige Bakterien im Sediment von humanem Magenaspirat nachgewiesen, welche er *Vibrio rugula* nannte (Jaworski, 1889). Und im Jahre 1896 publizierte H. Salomon eine Schrift mit dem Titel „Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen“ (Salomon, 1896), nachdem Bizzozero drei Jahre zuvor ein spiralförmiges Bakterium in den Mägen von Hunden gefunden hatte (Bizzozero, 1893). Nichtsdestotrotz stellte es sich als schwierig bis unmöglich heraus den Erreger zu kultivieren bzw. sicher darzustellen, was dazu führte, dass Palmer in den frühen 50er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts zu dem Schluss kam, dass die Resultate der früheren Publikationen,

die das spiralförmige Bakterium im Magen behandelten, durch postmortale Kolonisierung durch einen im Mund heimischen Erreger zu erklären seien (Palmer, 1954). So schien sich, obwohl schon im 19. Jahrhundert Bismutsalz erfolgreich gegen Magenerkrankungen eingesetzt wurde (Marshall, 2001), das Dogma zu festigen, welches Säure und Stress als alleinige Ursachen für peptische Ulzera postulierte und eine Therapie mit antibiotischen Mitteln hierbei als obsolet erachtete.

Dies änderte sich aber, als 1979 ein Pathologe namens J. R. Warren am Royal Perth Hospital ein spiralförmiges Bakterium in einer Routinebiopsie eines Patienten mit aktiver chronischer Gastritis entdeckte und befand, dass dieses einer näheren Untersuchung wert sei.

Schließlich gelang ihm zusammen mit dem Mikrobiologen B. Marshall nicht nur die Kultivierung des Erregers, sondern letztendlich auch die Darstellung des Zusammenhangs zwischen jenem spiralförmigen Bakterium, welches seit 100 Jahren immer wieder am Rande der wissenschaftlichen Literatur aufgetaucht war, und Erkrankungen wie aktiver Gastritis und peptischen Ulzera. So hatte Marshall nach einem Selbstversuch, in welchem er das Bakterium oral zu sich nahm, eine aktive Gastritis entwickelt, welche er mit Antibiotika heilen konnte; somit konnte das Koch'sche Postulat erfüllt werden (Marshall *et al.*, 1985). Schließlich wurde die Arbeit von Warren und Marshall im Jahr 2005 zu Recht mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt - elf Jahre, nachdem die WHO das inzwischen *H. pylori* genannte Bakterium (Goodwin *et al.* 1989) in die Gruppe I der definierten Kanzerogene eingestuft hatte.

Heutzutage ist *H. pylori* als Ursache von aktiver chronischer Gastritis, Ulzera des Magens und des Duodenums, Magenkarzinom und gastrischem MALT-Lymphom (*mucosal-associated lymphoid tissue*) beim Menschen weltweit anerkannt und die Kombinationstherapie mit Antibiotika und Protonenpumpenhemmern hat die bis vor wenigen Jahren üblichen Magenteilresektionen und Vagotomien als Goldstandard in der Ulkusbehandlung abgelöst.

1.2.2. Allgemeines und Epidemiologie

Helicobacter pylori ist ein spiralförmiges, mikroaerophiles, gramnegatives Bakterium mit 2-6 unipolaren Flagellen aus der Gruppe der ϵ -Proteobakterien (Ordnung

Camphylobacterales, Familie *Helicobacteraceae*). Neben der spiraligen Form tritt *Helicobacter pylori* auch in kokkoider Form auf, vor allem bei zu langer *in vitro* Kultivierung oder bei Antibiotikabehandlung (Kusters *et al.*, 1997). Diese kokkoiden Formen sind *in vitro* nicht mehr kultivierbar. Man nimmt an, dass es sich bei dieser Wesensart um tote Bakterien handelt (Kusters *et al.*, 1997), obwohl auch gemutmaßt wird, dass hierbei ein sporenlähnlicher, vitaler, nicht kultivierbarer, potentiell pathogener Zustand vorliegen könnte (Enroth *et al.*, 1999). Das Wachstumsoptimum von *H. pylori* liegt bei 37°C, 2-5% O₂, einem CO₂-Wert zwischen 5-10%, und hoher Feuchtigkeit (Kusters *et al.*, 2006).

Heutzutage schätzt man die weltweite Prävalenz von *H. pylori* ungefähr bei 50%, jedoch gibt es erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Ländern und ethnischen Gruppen. So liegt die Prävalenz in den Entwicklungsländern mit 70-90% deutlich höher als in den Industrienationen mit < 40% (Suerbaum & Michetti, 2002; Perez-Perez *et al.*, 2004). Zusätzlich sinkt die Prävalenz von *Helicobacter pylori* in den Ländern der 1. Welt (Genta, 2002).

Der eigentliche Übertragungsmechanismus von *H. pylori* liegt nach wie vor im Dunkeln. Meist wird eine *H. pylori* Infektion in der frühen Kindheit erworben und persistiert dann ohne Therapie lebenslang (Perez-Perez *et al.*, 2004; Kusters *et al.*, 2006). Man nimmt an, dass die Mensch-zu-Mensch-Übertragung via oral-fäkal oder oral-oralem Weg die größte Rolle spielt, da *H. pylori* im Stuhl, Erbrochenem und Speichel nachgewiesen werden konnte (Goodman *et al.*, 1996; Parsonnet *et al.*, 1999). Für diese Theorie spricht weiter, dass es anscheinend einen Transfer innerhalb der Familie, besonders zwischen Mutter und Kind gibt (Yilmaz *et al.*, 2002; Malaty & Nyren, 2003). Auch Menschen, die in Heimen und Anstalten untergebracht sind, haben eine wesentlich erhöhte *H. pylori* Infektionsrate, welche zusätzlich mit der Aufenthaltsdauer im Heim positiv korreliert (Brown, 2000).

Neben der direkten Mensch-zu-Mensch Übertragung wird diskutiert, ob gerade in den Entwicklungsländern kontaminiertes Wasser bei der Übertragung eine Rolle spielen könnte (Goodman *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2003). Auch Transmission via Haustiere (Dore *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001; Goodman *et al.*, 1996), Fliegen (Brown, 2000) oder über kontaminiertes Essen aus dem Kühlschrank (Poms & Tatini, 2001) wurde untersucht. Allerdings scheint der direkte Übertragungsweg von Mensch zu Mensch der wahrscheinlichste, da *H. pylori* nur selten in Tieren nachgewiesen wurde und andere Transmissionswege (Wasser, Essen) durch ihre für *H. pylori* schädlichen

Umweltbedingungen (Sauerstoff >5%, Temperatur <34°C) kaum bevorzugt erscheinen, außer man geht von einem vitalen, nicht kultivierbaren Zustand aus, in welchem *H. pylori* auch bei widrigen Umständen überleben und infektiös bleiben kann (Adams *et al.*, 2003).

Da die Assoziation von *Helicobacter pylori* und Mensch entwicklungsgeschichtlich bis zu 58000 Jahre zurückreicht kann *H. pylori* in mancher Hinsicht vielleicht sogar als Normalflora gewertet werden (Falush *et al.*, 2003; Blaser & Atherton, 2004). Zusätzlich ist es aufgrund der genetischen regionalen Unterschiede von *H. pylori*-Isolaten möglich, Rückschlüsse auf die Verbreitung und Wanderung der frühen Menschen zu ziehen (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007).

1.2.3. Pathogenese von *H. pylori* assoziierten Erkrankungen

Eine Infektion des Magens durch *H. pylori* bewirkt in allen Fällen eine histologische Gastritis, welche aber nur in ungefähr 10% der Fälle symptomatisch ist. Daten über die am Anfang der *H. pylori* Infektion stehenden aktiven Gastritis stammen vor allem von Fällen, in denen kontaminiertes Material oral aufgenommen wurde (Marshall *et al.*, 1985; Morris & Nicholson, 1987). Folgen sind Völlegefühl, Übelkeit und Erbrechen meist in Zusammenhang mit einer Hypochlorhydrie. Meist ist diese initiale Phase der *Helicobacter pylori* Infektion aber symptomlos (Dixon, 2001). Die Infektion an sich besteht in den überwiegenden Fällen Jahrzehnte oder lebenslang, wenn keine geeignete Therapie begonnen wird (Perez-Perez *et al.*, 2004). Die Persistenz von *H. pylori* führt schließlich zu einer chronischen B-Gastritis, welche einen Großteil aller chronischen Gastritiden ausmacht.

Während der chronischen Persistenz des Erregers bestimmt unter anderem der Säuregehalt des Magens die Verteilung der Infektion und auch die resultierenden Folgeerkrankungen (Kusters *et al.*, 2006) (s. Abb. 1); wobei anzumerken ist, dass nur ca. 15-20% der Infizierten mit Ulzera, Magenkrebs oder anderen Komplikationen rechnen müssen (Dorer *et al.*, 2009).

Bei intakter oder erhöhter Säuresekretion beschränkt sich die Kolonisierung vor allem auf das Antrum des Magens, da hier der Säuregehalt aufgrund einer geringeren Dichte an Belegzellen geringer ist (Kusters *et al.*, 2006). Dies führt zu einer auf das Antrum beschränkten Gastritis mit ascendierendem Charakter. Diese Patienten

haben ein erhöhtes Risiko ein Duodenalulcus zu entwickeln (Dixon, 2001; Kusters *et al.*, 2006). Wahrscheinlich führt der Säurereiz im Duodenum zu einer gastralen Metaplasie, welche dann von *H. pylori* besiedelt werden kann (Marshall *et al.*, 1985b; Dixon, 2001). 95% der meist im *Bulbus duodeni* lokalisierten duodenalen Ulzera sind mit einer *Helicobacter pylori* Infektion vergesellschaftet (Kuipers *et al.*, 1995).

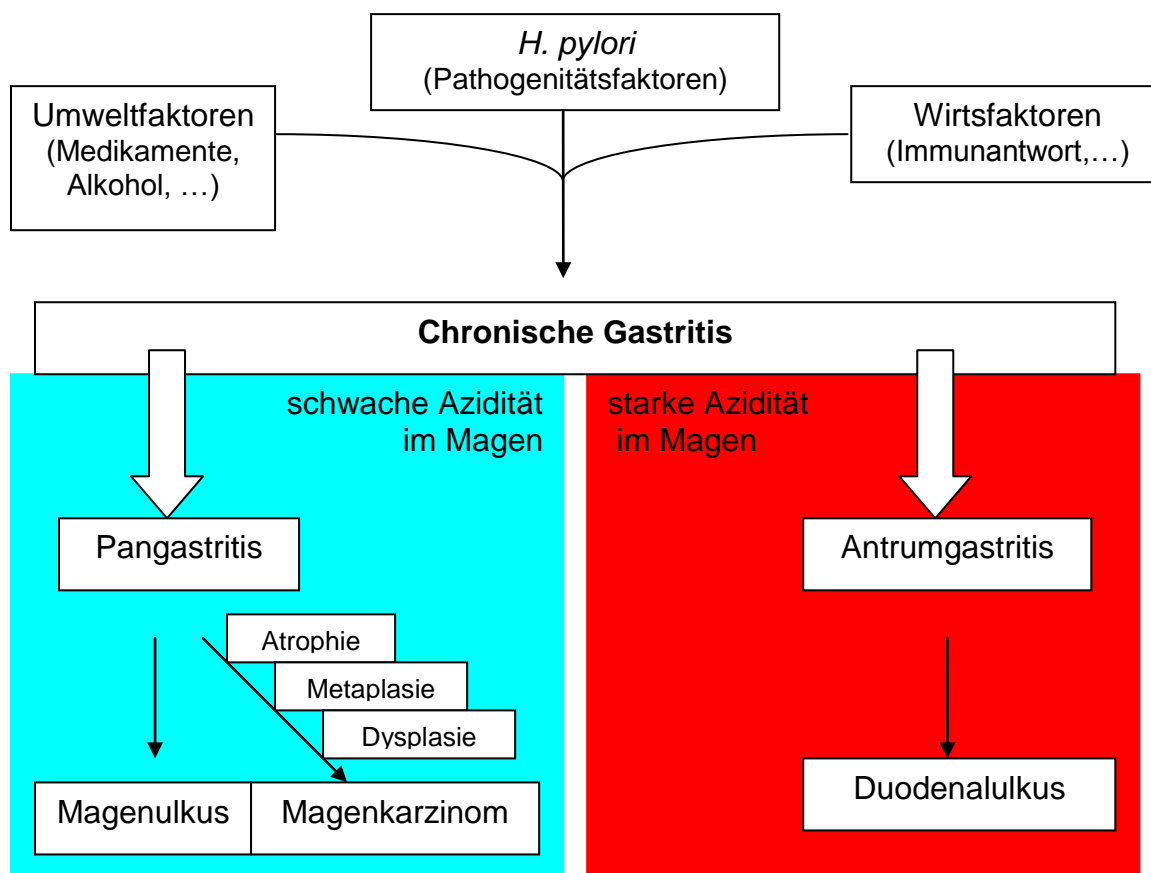


Abbildung 1: Pathologie von *H. pylori* induzierten Erkrankungen

Die Infektion mit *H. pylori* wird durch Wirtsfaktoren, Umweltfaktoren und den Pathogenitätsfaktoren des Erregers maßgeblich bestimmt. Die resultierende chronische Gastritis kann in Abhängigkeit von der Azidität im Magen zu verschiedenen Folgeerkrankungen führen. Starke Azidität im Magen beschränkt die Entzündung durch *H. pylori* auf das Antrum und erhöht das Risiko für duodenale Ulzera, während bei niedriger Azidität eine Entzündung des gesamten Magens (Pangastritis) entsteht, welche neben dem Risiko eines Magenulcus auch das Risiko für Magenkarzinome vom intestinalen Typ nach Lauren in sich birgt. Diese Karzinome entstehen meist über eine Atrophie der Magenschleimhaut, welche durch verminderte Säureproduktion in der Folge zu interstinalen Metaplasien führen kann, welche als präkanzeröse Kondition einzuschätzen sind. (nach Kusters *et al.*, 2006)

Bei erniedrigtem Säuregehalt, welcher z. B. bei einer atrophischen Gastritis oder bei Einnahme von Protonenpumpenhemmern vorkommt, ist die Entzündung im Magen homogener verteilt (Kuipers, 1995b). Es resultiert eine Pangastritis mit Schwerpunkt auf das *corpus ventriculi*. Dadurch kommt es zu einer weiteren Abnahme der Säureproduktion, auch dadurch, dass die Belegzellen in ihrer Funktionsfähigkeit

durch die Entzündungsfaktoren beeinträchtigt werden (El-Omar *et al.*, 2000). Der ständige Entzündungsreiz kann zu Magengeschwüren führen, welche sich vor allem am Übergang vom Antrum zum Corpus an der kleinen Kurvatur befinden, da in dieser Transitionszone die Entzündung besonders ausgeprägt ist (Dixon, 2001; Kusters *et al.*, 2006). 85% der Magengeschwüre lassen sich auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückführen (Kuipers *et al.*, 1995).

Die Verminderung des Säuregehalts durch entzündungsbedingte Atrophie kann zur Ausbildung einer intestinalen Metaplasie führen (Dixon, 2001), welche als präkanzeröse Kondition anzusehen ist. Durch Dysplasien steigt das Risiko ein Adenokarzinom des Magens zu entwickeln erheblich (Peek & Blaser, 2002). Somit wurde *Helicobacter pylori* 1994 in die Gruppe I der Kanzerogene eingestuft (Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*, 1994). Drei Jahre später konnte der Zusammenhang zwischen *Helicobacter pylori* und Magenkrebs im Tiermodell der mongolischen Wüstenrennmaus gezeigt werden (Watanabe *et al.*, 1998).

Beim Menschen zeigen ungefähr 50% der *H. pylori* Infizierten Atrophie und intestinale Metaplasie im Magen (Kusters *et al.*, 2006). Letztlich aber entwickeln nur weniger als 3% ein Magenkarzinom (Peek & Blaser, 2002; Dorer *et al.*, 2009). Einerseits ist die Kanzerogenese von Wirtsfaktoren, wie zum Beispiel Interleukin-1-Gencluster-Polymorphismen, welche mit einer erhöhten Zytokin IL-1 β Produktion einhergehen, abhängig (El-Omar *et al.*, 2000). Andererseits spielt die Art des Erregerstamms eine bedeutende Rolle, also die Expression von verschiedenen mit Malignität assoziierten Faktoren wie *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*), *vacA* (*vacuolating cytotoxin A*) und *babA2* (*blood group antigen-binding adhesin*) und Umweltfaktoren, wie zum Beispiel Ernährungs- und Rauchgewohnheiten (Perez-Perez *et al.*, 2004). Nach Angaben der WHO sterben jährlich etwa 740000 Menschen an Magenkrebs; 80% der Magenkarzinome lassen sich dabei auf eine *Helicobacter pylori* Gastritis zurückführen (Sipponen & Marshall, 2000). Im Jahre 2008 entsprach das ca. 660 000 Krebsfällen, die auf eine *H. pylori* Infektion zurückzuführen waren (Plummer *et al.* 2014).

Neben einem Adenokarzinom kann *H. pylori* in seltenen Fällen zur Entwicklung eines MALT-Lymphoms im Magen führen, ein Non-Hodgkin-Lymphom, welches in 72-98% der Fälle mit *Helicobacter pylori* assoziiert ist, jedoch nur bei weniger als 1% der *Helicobacter* Infizierten auftritt (Dorer *et al.*, 2009; Kusters *et al.* 2006). Eine *H. pylori* Eradikation im frühen Stadium des MALT-Lymphoms führt in 80% der Fällen zu einer

Lymphomremission (Fischbach *et al.*, 2009). In den Fällen, bei denen es zu keiner Remission kommt, ist meist zusätzlich eine genetische Translokation t(11;18)(q21;q21) nachweisbar (Liu *et al.*, 2001; Inagaki *et al.*, 2004).

Neben dieser negativen Auswirkung der *H. pylori* Infektion auf den Wirt gibt es anscheinend auch positive Effekte. So scheint *H. pylori* das Risiko für eine GERD (*gastroesophageal reflux disease*) zu senken (Labenz *et al.*, 1997; Loffeld *et al.*, 2000). Diese Erkrankung kann durch den ständigen Entzündungsreiz, welcher durch den Reflux des sauren Magensaftes in den Ösophagus getriggert wird, zu einer intestinalen Metaplasie des ösophagealen Plattenepithels führen. Diese intestinale Metaplasie, auch Barrett-Ösophagus genannt, zeigt eine erhöhte Neigung zu Ulzerationen und Dysplasien mit der Gefahr der Ausbildung eines Adenokarzinoms des distalen Ösophagus. Diese Art von Malignom hat in den letzten Jahren stark zugenommen (Devesa *et al.*, 1998; Peek and Blaser, 2002) - eine Entwicklung, die sich vielleicht auch auf die sinkende Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit *Helicobacter pylori* zurückführen lässt (Genta, 2002; Dorer *et al.*, 2009).

Letztendlich ist also die Beziehung zwischen Mensch und *Helicobacter pylori* vielschichtig. Zwar geht eine Infektion mit einem erhöhten Risiko für Ulzera, Magenkrebs und MALT-Lymphom einher, andererseits scheint das Risiko für GERD, Ösophagitis, Karzinome des gastroösophagealen Übergangs und vielleicht auch für Asthma und Allergien zu sinken (Chen & Blaser, 2007).

1.2.4. Diagnostik und Therapie

Es gibt in der Praxis verschiedene Möglichkeiten eine Infektion durch *Helicobacter pylori* beim Menschen zu diagnostizieren. Man unterscheidet dabei zwischen invasiven und nicht invasiven Methoden (Suerbaum & Michetti, 2002; Fischbach *et al.*, 2009).

Zu den invasiven Methoden gehören die, welche nach Biopsat-Entnahme im Rahmen einer Ösophago-Gastro-Duodenoskopie zur Verfügung stehen - also Kultur, Histologie, Urease-Schnelltest und PCR. Die nicht invasiven Methoden sind Harnstoff-Atemtest, Stuhl-Antigentest und IgG-Nachweis im Serum. Spezifität und Sensitivität sind mit Ausnahme der Kultur, deren Spezifität 100% ist, bei keiner dieser

Methoden fehlerfrei (siehe Tabelle 1). Die Aussagekraft der invasiven Methoden hängt vor allem von der Güte der Biopsie ab.

Tabelle 1: Spezifität und Sensitivität von *H. pylori* Diagnoseverfahren
(nach Fischbach *et al.*, 2009)

	Diagnoseverfahren	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
Invasiv	Kultur	70-90	100
	Histologie	80-98	90-95
	Urease-Schnelltest	90-95	90-95
	PCR	90-95	90-95
Nicht invasiv	Harnstoff-Atemtest	85-95	85-95
	Stuhl-Antigentest	85-95	85-95
	IgG-Antikörpernachweis	70-90	70-90

Aufgrund der heterogenen Verteilung von *H. pylori* im Magen sollte immer eine Biopsie aus Magenantrum und -corpus genommen werden, wobei die Sensitivität mit der Anzahl der Biopsien stark zunimmt. Für aussagekräftige histologische Befunde sollte die Biopsieentnahme der update-Sydney-Empfehlung folgen, um neben Erregerdiagnose auch die Entdeckung von eventuell vorhandenen präkanzerösen Läsionen zu ermöglichen (Dixon *et al.*, 1994).

Welches Testverfahren angewandt wird, hängt stark von der jeweiligen Fragestellung ab. Epidemiologische Untersuchungen stützen sich zum großen Teil auf Serologie und Urease-Atemtest. Bei Letzterem trinkt der Proband mit Kohlenstoff-13 markierten Harnstoff. Dann wird eine Probe der Atemluft durch Expiration gewonnen und der Anteil an C-13-markiertem CO₂ gemessen. Der Gedanke dahinter ist, dass die dem *H. pylori* eigene Urease besagten Harnstoff in Ammoniak und C-13-markiertes CO₂ spaltet und somit durch Messung des gekennzeichneten CO₂ Rückschlüsse auf eine *Helicobacter* Infektion gezogen werden können. Falsch positive Ergebnisse können zum Beispiel durch eine Überwucherung des Magens mit anderen Urease-bildenden Bakterien bedingt sein.

Therapiert wird eine *H. pylori* Infektion meist mit einer Triple-Therapie bestehend aus einem Protonenpumpenhemmer und zwei Antibiotika (Suerbaum & Michetti, 2002). Die gebräuchlichsten Therapieformen sind die „italienische Therapie“ mit Clarithromycin und Metronidazol und die „französische Therapie“ mit Clarithromycin und Ampicillin für sieben Tage. Allerdings bleibt anzumerken, dass die Anzahl von

therapierefraktären *H. pylori*-Infektionen zunimmt. Dabei spielt vor allem eine zunehmende Resistenzbildung eine wichtige Rolle (Mégraud *et al.*, 2004; (siehe Tabelle 2), sodass unter Berücksichtigung lokaler Resistenzraten immer mehr auf Bismutsalz-enthaltende Therapieformen (sog. Quadruple-Therapie) oder auch verlängerte Therapieschemata zurückgegriffen werden muss (Yang *et al.*, 2014).

Tabelle 2: Häufigkeit der Resistenzen im Bezug auf verschiedene Antibiotika bei *Helicobacter pylori*

Der weite Bereich der angegebenen Resistenzraten ergibt sich aus den großen regionalen Unterschieden der einzelnen Resistenzen. So ist zum Beispiel gerade die Metronidazolresistenzrate von *H. pylori* in den Entwicklungsländern sehr hoch.

(nach Mégraud & Lamouliatte, 2003; und Yang *et al.*, 2014)

Antibiotika	Häufigkeit von Resistenzen
Makrolide	10-30%
Metronidazol	10-90%
Levofloxacin	0-25%
Amoxicillin	0-15%

Obligate Behandlungsindikation einer *H. pylori* Infektion besteht bei einem peptischen *Ulcus ventriculi* oder *duodeni*. Bei MALT-Lymphom im Stadium I ist die Eradikation kurative Therapie der Wahl, wobei hier in 80% der Fälle mit einer Lymphomremission zu rechnen ist (Fischbach *et al.*, 2009). Die asymptomatische *H. pylori* Gastritis an sich stellt keinen Behandlungsgrund dar, allerdings kann sie zum Beispiel bei absehbarer langfristiger NSAR-Einnahme oder bei Risikopatienten für Magenkarzinom erfolgen (Fischbach *et al.*, 2009).

Aufgrund der potentiell positiven Effekte, die eine *Helicobacter pylori* Infektion auch mit sich bringen kann (siehe Kapitel 1.2.3.), sollte eine Eradikation nie um der Eradikation willen erfolgen, sondern sorgsam abgewogen werden.

1.2.5. Pathogenitätsfaktoren

H. pylori ist sehr gut an seine ökologische Nische den menschlichen Magen angepasst, sodass er sowohl der starken Azidität des Magensaftes und der Nährstoffknappheit, als auch dem menschlichen Immunsystem trotzen kann.

Um eine Kolonisierung des menschlichen Magens zu gewährleisten und zur spezifischen Interaktion mit dem Magenepithel, benötigt *H. pylori* eine Vielzahl an unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren (siehe auch Abbildung 2).

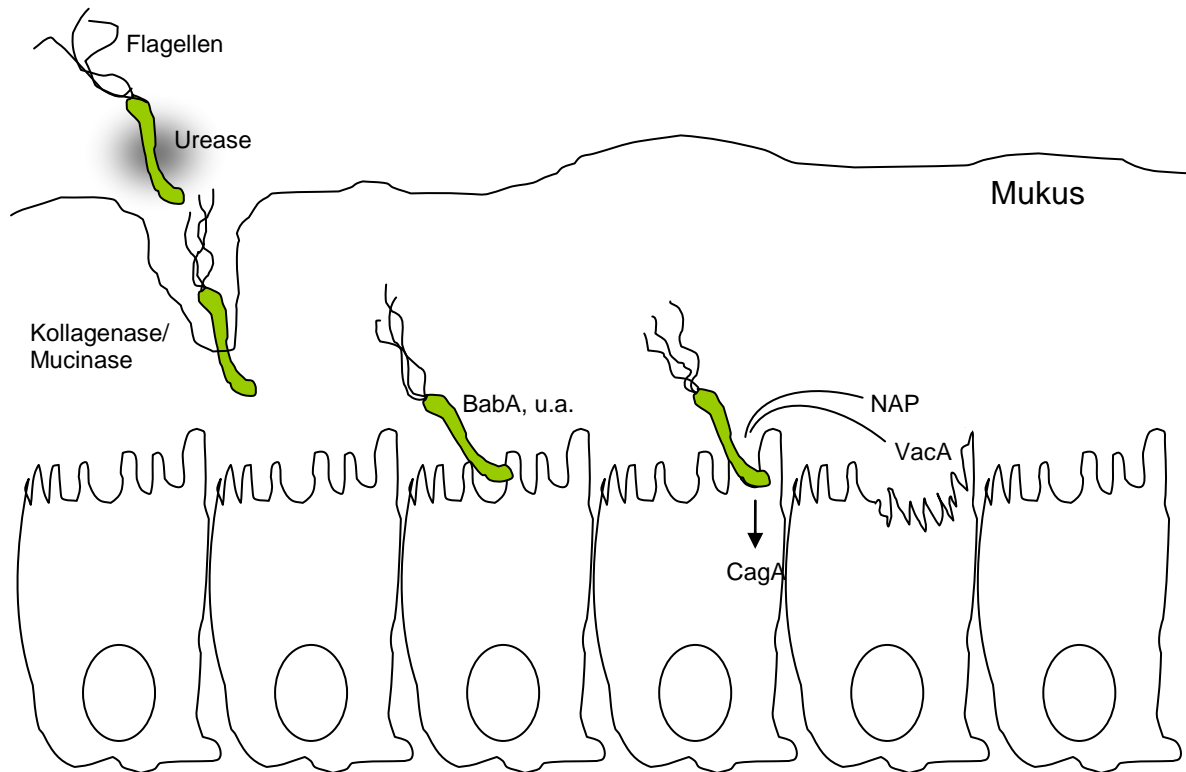


Abbildung 2: *H. pylori* Kolonisierung

In dieser Abbildung werden die Hauptschritte der Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* veranschaulicht (weitere Erläuterung siehe Text). Zusätzlich ist ein weiterer Faktor, die Kollagenase, aufgeführt, welche von Kavermann *et al.* als essentieller Kolonisierungsfaktor identifiziert wurde und vielleicht benutzt wird, um eine Passage von *H. pylori* durch den Mucus zu erleichtern. (nach Covacci & Rappuoli 2003)

Essentiell für die Kolonisierung des Magens ist das zytosolische Enzym Urease (Andrutis *et al.*, 1994; Eaton & Krakowa, 1994), welches den bedeutendsten Faktor für die Säureresistenz darstellt (Rektorschek *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich um ein nickelhaltiges Enzym aus jeweils 12 Untereinheiten UreA (27kDa) und UreB (62kDa) mit zusätzlichen assoziierten Proteinen (UreEFGH), welche wahrscheinlich den Cofaktor Ni²⁺ aufnehmen und ihn in das aktive Zentrum des Enzyms einbauen (Cussac *et al.*, 1992; Mobley *et al.*, 1995; Ha *et al.*, 2001). Liegt der pH unter 6,5 kommt es durch den Membrankanal UreI zu einem Einstrom von Harnstoff in das Zytosol (Rektorschek *et al.*, 2000; Bury-Mone *et al.*, 2001; Kusters *et al.*, 2006). Der Harnstoff wird durch die Urease in CO₂ und Ammoniak gespalten. Dadurch können das Periplasma und die unmittelbare Umgebung abgepuffert werden. Wie im

Tiermodell gezeigt, kann *Helicobacter pylori* ohne diese Fähigkeit nicht kolonisieren (Eaton *et al.*, 1991; Andrutis *et al.*, 1994; Eaton & Krakowa 1994).

Zusätzlich benötigt *H. pylori* die Befähigung sich schnell in den Magenmucus und damit in Richtung höherer pH-Werte zu bewegen, da zu niedrige pH-Werte nicht lange toleriert werden können. Diese Beweglichkeit verdankt *H. pylori* einerseits seiner spiralförmigen Morphologie, welche es ihm ermöglicht in den zähen Magenmucus einzudringen, andererseits seiner 2-6 Flagellen, welche aus Flagellin A und B bestehen (Leying *et al.*, 1992) und einen essentiellen Kolonisierungsfaktor darstellen (Eaton *et al.*, 1989; Eaton *et al.*, 1992). Ziel der Bewegung sind die tieferen Schichten des Magenmucus, welche durch Bikarbonat einen pH Wert von 6-7 aufweisen und von *H. pylori* durch Chemotaxis erreicht werden (Spohn & Scarlato, 2001; Kusters *et al.*, 2006). Als Chemotaxine dienen Aminosäuren (Worku *et al.*, 2004), Muzine (Turner *et al.*, 1997), Harnstoff und Natriumbikarbonat (Mizote *et al.*, 1997).

Durch viele verschiedene Oberflächenmoleküle ist es *H. pylori* möglich sich an Magenepithelzellen zu heften und somit nicht nur zu persistieren, sondern auch verschiedene Pathogenitätsfaktoren zu translozieren. Diese Fähigkeit zur Adhärenz scheint essentiell bei der initialen Kolonisierung, sowie bei der Erregerpersistenz zu sein. Die Bindung an das Magenepithel wird durch Proteine der äußeren Membran vermittelt (OMPs: *outer membrane protein*), von welchen es fünf verschiedene Familien gibt. Die Proteine der Hop-Familie (*Helicobacter outer membrane protein*) sind Teil dieser Gruppe und dienen zum großen Teil der Adhäsion. Dazu gehören zum Beispiel BabA (*blood group antigen binding adhesin*), welches an Lewis-B-Antigene bindet (Ilver *et al.* 1998), SabA (*sialic acid binding adhesin*) und AlpA/B (*adherence-associated lipoprotein*). Dabei ist BabA das dominierende Adhäsion von *Helicobacter pylori* und das am besten charakterisierte.

Im Gegensatz zu den Lipopolysacchariden (LPS) von anderen Bakterien scheinen die LPS von *Helicobacter pylori* keine große Bedeutung bei der Entzündungsinitiation zu haben (Muotiala *et al.*, 1992). Die Epitope der LPS ähneln allerdings denen von Blutgruppenantigenen (Appelmeik *et al.*, 1996). Diese Tatsache hat zu der Mutmaßung geführt, dass sie durch molekulare Mimikry eine Rolle in der Entwicklung von *H. pylori*-assoziierten Autoimmunreaktionen unter anderem gegen die Protonenpumpe der Belegzellen spielen könnten (Appelmeik *et al.*, 1996). Allerdings sind die Daten widersprüchlich (Appelmeik & Vandenbroucke-Grauls, 2001).

Wahrscheinlicher jedoch nehmen sie vor allem einen wichtigen Platz bei der Persistenz des Erregers und der Chronifizierung der Infektion ein (Ferrero & Fox, 2001).

VacA (*vacuolating cytotoxin*) ist ein in allen *Helicobacter pylori* Stämmen encodiertes multifunktionelles, bakterielles Toxin. Aufmerksamkeit erregte es erstmals 1988, als Leunk *et al.* beobachteten, dass ein Überstand von *Helicobacter*flüssigkultur in verschiedenen Zelllinien die Bildung von zytoplasmatischen Vakuolen induziert.

Während des Transports von VacA über die Bakterienmembran erfolgt eine posttranskriptionelle Prozessierung des Proteins unter Entfernung von C- und N-terminalen Aminosäuren, sodass ein 88kDa großes reifes VacA entsteht (Blanke & Cover, 2008). Dieses verbleibt entweder auf der Bakterienoberfläche (Ilver *et al.*, 2004; Telford *et al.*, 1994) oder gelangt in den Kulturüberstand (Cover & Blaser., 1992). Auch die Abgabe von VacA über Membranbläschen ist möglich (Keenan *et al.*, 2000). Das freigesetzte VacA kann in zwei Abschnitte eingeteilt werden, eine N-terminale p33-Region und eine C-terminale p55-Region (Telford *et al.*, 1994). Erstere besitzt einen stark hydrophoben Bereich, welcher für die Bildung von Kanälen nötig ist (Vinion-Dubiel *et al.*, 1999; Ye & Blanke, 2000). Die p55-Domäne scheint dagegen eine wichtige Rolle bei der Bindung von VacA an die Wirtszelle zu spielen (Wang *et al.*, 2001). Innerhalb der *H. pylori* Stämme unterscheidet man verschiedene Arten von *vacA*. Dabei gibt es zwei Alleltypen für eine Region innerhalb der p55-Domäne, m1 und m2 genannt, zwei Hauptalleltypen für eine am 5'-Ende des *vacA*-Gens liegende Region, s1 und s2 (Atherton *et al.*, 1995) und zwei Alleltypen für eine mittlere Region, i1 und i2 (Rhead *et al.*, 2007). Durch Rekombination sind verschiedene Kombinationen dieser Alleltypen möglich (Atherton *et al.*, 1995). Dabei unterscheiden sich diese Stämme nicht nur in der Sequenz, sondern auch in der Menge des produzierten VacA (Forsyth *et al.*, 1998) und ihrer Pathogenität. So ist gerade der s1 Alleltyp mit einem erhöhten Risiko für peptische Ulzera und Magenkarzinom assoziiert (Atherton *et al.*, 1995; van Doorn *et al.*, 1998), was mit der Tatsache korreliert, dass der s2 Alleltyp einer zytotoxischen Fähigkeit *in vitro* entbehrt (Atherton *et al.*, 1995; Letley *et al.*, 2003).

Als multifunktionelles Toxin sind die Wirkungen von VacA vielfältig (s. auch Abb. 3): So bildet VacA Anionen-selektive Kanäle in der Membran von Zellen und kann somit die Permeabilität der Membran für verschiedene Moleküle wie zum Beispiel Bikarbonat erhöhen (Szabo *et al.*, 1999; Debellis *et al.*, 2001). Außerdem beeinflusst

VacA die Bildung von sauren Vakuolen und den Vesikeltransport im endosomalen System (Satin *et al.*, 1997).

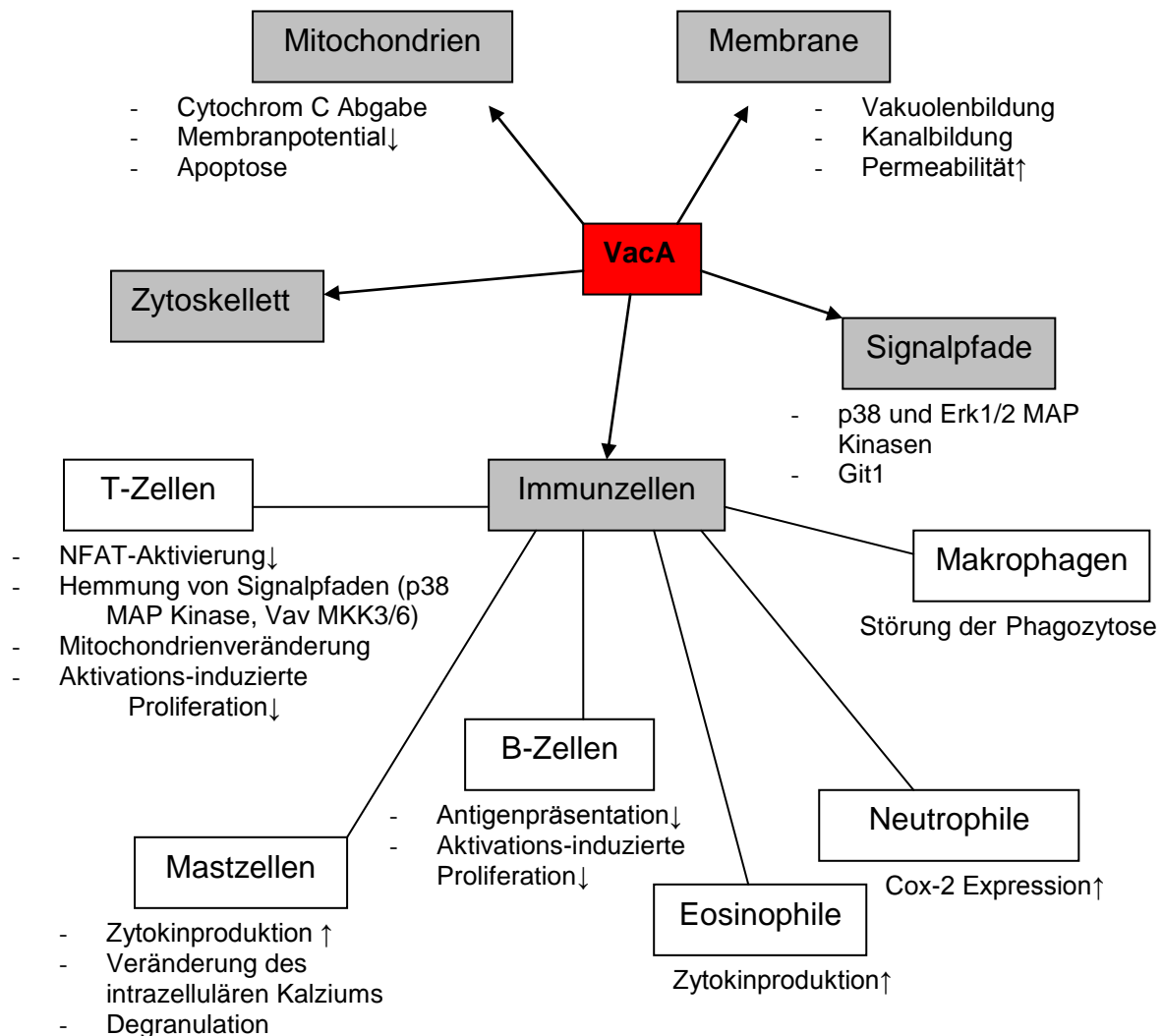


Abbildung 3: VacA-Wirkung

Zielstrukturen und Wirkungen von VacA *in vitro* nach Blanke & Cover, 2008

Weiter führt VacA zu Veränderung der Mitochondrien mit Abnahme des Membranpotentials (Kimura *et al.*, 1999) und Abgabe von Cytochrom C mit Aktivierung von Caspase 3 (Galmiche *et al.*, 2000), was zur Apoptose der Zelle führt (Galmiche *et al.*, 2000; Cover *et al.*, 2003). Auch Auswirkungen von VacA auf intrazelluläre Signalwege (z. B. p38, ATF-2) (Hisatsune *et al.*; 2007), auf das Zytoskelett (Pai *et al.*, 1999) und auf verschiedene Immunzellen sind beschrieben worden (siehe Abb. 3). Letztere Effekte sind sowohl immunstimulierend als auch immunsuppressiv (Blanke & Cover, 2008). Obwohl VacA bei der Kolonisierung im

Tiermodell nicht essentiell ist (Eaton *et al.*, 1997; Salama *et al.*, 2001), scheint es aber doch beim Menschen eine wichtige, vielleicht sogar essentielle Rolle bei Kolonisierung und Persistenz einzunehmen (Blanke & Cover, 2008). So sind alle aus dem menschlichen Magen gewonnenen Isolate *vacA*-positiv (Blanke & Cover, 2008). Eng mit dem Auftreten von aktivem *VacA* assoziiert, ist ein weiterer Pathogenitätsfaktor von *Helicobacter pylori*: *CagA* (Atherton *et al.*, 1995). Dieses Protein wird mit Hilfe eines *Cag*-Typ-IV-Sekretionssystems (*cag-T4SSs*) in die Magenepithelzelle injiziert (Odenbreit *et al.*, 2000), wobei die Interaktion über den eukaryontischen β 1-Integrin-Rezeptor stattfindet (Jimenez-Soto *et al.*, 2009). Das Sekretionssystem ist zusammen mit dem sekretierten *CagA* auf der sog. *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag_PAI*) codiert. In den westlichen Ländern sind ungefähr 30-40% der *Helicobacter pylori* *cagA*-positiv (Hatakayama, 2009). In der eukaryontischen Zelle kommt es durch Src-Kinasen zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des translozierten *CagA* innerhalb konservierter EPIYA-Sequenzen (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), die in variabler Anzahl am C-terminalen Ende vorhanden sind (Odenbreit *et al.*, 2000; Naito *et al.*, 2006). Das phosphorylierte *CagA* kann nun mit der zytosolischen Proteinphosphatase SHP-2 (Higashi *et al.*, 2002) und anderen Wirtsproteinen interagieren. Die Translokation und auch die Phosphorylierung von *CagA* haben eine Vielzahl von Auswirkungen auf die eukaryontische Zelle. So kommt es durch eine Umlagerung des Aktinzytoskeletts zur Ausbildung des typischen *Hummingbird*-Phänotyps, welcher durch veränderte Zellmorphologie und erhöhte Motilität (*scattering phenotyp*) gekennzeichnet ist (Segal *et al.*, 1999). Durch Interaktionen mit eukaryontischen Proteinen kommt es zu einer Zerstörung der *tight junctions* (Amieva *et al.*, 2003) und damit zu einem Verlust der baso-apikalen Polarität des Magenepithels (Bagnoli *et al.*, 2005). Wahrscheinlich führen zusammen mit *CagA* translozierte Peptidoglycane zu einer NK- κ B Aktivierung und der Produktion von Zytokinen wie *Il-8* (Viala *et al.*, 2004). Insgesamt kommt es durch Injektion von *CagA* zu einem veränderten Genexpressionsprofil der Zelle, wobei viele verschiedene Proteine betroffen zu sein scheinen, darunter auch Proteine, die in der Kanzerogenese eine Rolle spielen. Denn das Auftreten von *CagA* ist eng mit einem erhöhten Risiko für Magenkrebs assoziiert (Peek & Blaser, 2002) - ein Zusammenhang, der im Tiermodell bekräftigt werden konnte (Rieder *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2005). Für die Bezeichnung von *CagA* als bakterielles Onkoprotein

spricht weiter, dass transgenetische Mäuse, die *cagA* exprimieren, Magenkarzinome entwickeln (Ohnishi *et al.*, 2008).

1.2.6. Tiermodell

In der Erforschung von Infektionskrankheiten ist der Gebrauch von Tiermodellen essentiell. Ob Wirt-Erreger-Interaktionen, die Wirkung von Impfungen und Antibiotika oder die Erforschung von Pathogenitätsfaktoren, der Gebrauch von Tiermodellen erlaubt einen Einblick den *in vitro* Untersuchungen und Zellkulturen nur bedingt bieten können. Bei der Erforschung von *Helicobacter pylori* reichen die benützten Tiermodelle vom Ferkel über Nagetiere bis hin zu Primaten.

Prinzipiell hat das Mausmodell den Vorteil, dass die Haltung unkompliziert und kostengünstig ist, außerdem sind diese Modelle weithin standardisiert und es stehen viele Mutanten zur Verfügung. Zusätzlich sind die Mäuse aufgrund von exzessiver Inzucht genetisch weitgehend konstant. Allerdings führt eine Infektion durch *cagA*-positive *H. pylori* Stämme im Mausmodell zu Deletionen innerhalb der *cag-PAI* (Sozzi *et al.*, 2001). Somit kann einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren im Menschen in der Maus nicht nachvollzogen werden. So zeigen infizierte Mäuse zwar eine Gastritis und Veränderung der Magenschleimhaut, aber keine Entwicklung eines Magenkarzinoms (O'Rourke & Lee, 2003). Allerdings kann die Entwicklung eines MALT-Lymphoms durch *H. felis* (Enno *et al.* 1995) und verschiedene Immunantworten auf *Helicobacter pylori* in der Maus dargestellt werden. Auch die Entwicklung eines Adenokarzinoms bei Wild-Typ C57BL/6 Mäusen durch *H. felis* konnte beschrieben werden (Cai *et al.*, 2005), jedoch besitzt das Genom von *H. felis* weder eine *cagA-PAI* noch *vacA* (Peek, 2008), was die Beurteilung von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren in diesem Modell schwierig macht.

Ein gutes Modell zur Darstellung der Kanzerogenität von *Helicobacter pylori* stellt das so genannte Gerbilmodell dar. So zeigen mongolische Rennmäuse (*Meriones unguiculatus*) nach Infektion durch *H. pylori* neben Gastritis, gastralen Ulzera, Atrophie, intestinaler Metaplasie und Dysplasie nach mehreren Wochen die Entwicklung eines gastralen Adenokarzinoms ohne dass exogen Kanzerogene hinzugegeben werden müssen (Hirayama F *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2005). Dabei scheint die Kausalkette über Entzündung und Atrophie zu intestinaler Metaplasie, Dysplasie und Magenkarzinom

dem im Menschen postulierten Weg zu folgen (Watanabe *et al.*, 1998; O'Rourke & Lee, 2003). Die verwendeten Erregerstämme benötigen eine intakte *cagA*-Pathogenitätsinsel (Rieder *et al.*, 2005). Somit kann dieses Modell diesen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *H. pylori* nachvollziehen. Jedoch bleibt anzumerken, dass das Gerbilmodell die Veränderungen bei *H. pylori* Infektion im Menschen nicht vollständig darstellen kann. So zeigt sich bei den mongolischen Wüstenrennmäusen eine Hyperplasie der Lymphfollikel in der Submukosa und eine *Gastritis cystica profunda*, welche beide nicht bei infizierten Menschen anzutreffen sind (Kodama *et al.*, 2005). Zusätzlich limitiert die Tatsache, dass keine transgenen Tiere zur Verfügung stehen, die Forschung an Wirtsfaktoren.

1.3. Biolumineszenz

1.3.1. Luciferase und Luciferin

Biolumineszenz stellt ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen dar, welches bei einer großen Bandbreite an Organismen Verwendung findet: von Bakterien, über Plankton, Fische, Pilze bis hin zu Insekten. Phylogenetische Analysen legen nahe, dass es mehr als dreißig verschiedene Ursprünge der Biolumineszenz gibt (Andreu *et al.*, 2010). Dabei folgen die einzelnen Systeme meist ähnlichen Prinzipien (Hastings, 1996): Biochemisch betrachtet sind Luciferasen alle Oxigenasen, mit deren Hilfe letztendlich ein bestimmtes Substrat oxigeniert wird. Dieses Substrat, Luciferin genannt, ist genauso wie die Luciferase selbst und die notwendige Energiequelle von System zu System unterschiedlich. Die gebräuchlichsten Systeme im Labor und deshalb auch die am besten erforschten sind die Leuchtsysteme von leuchtenden Insekten (*Photinus pyralis*, *Pyrophorus plagiophtalamus*), von der zu den Seefedern gehörenden *Renilla reniformis*, vom Ruderfußkrebs *Gaussia princeps* und natürlich von verschiedenen Bakterien (Andreu *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde das bakterielle Luciferasesystem von *Photorhabdus luminescens* aus der Familie der *Enterobacteriaceae* verwendet. Dessen Luciferase hat den Vorteil, dass sie ein Optimum bei 37°C hat und deswegen sehr geeignet für

in vivo Bildung ist (Szittner & Meighen, 1990). In Grundzügen sieht hier die zugrunde liegende biochemische Reaktion folgendermaßen aus (Hastings, 1978; Hastings, 1996) (siehe Abbildung 4): Sauerstoff und reduziertes Flavin (FMNH_2) binden an die bakterielle Luciferase (77kDa)– ein Heterodimer, dessen Alpha und Beta Kette durch *luxAB* codiert werden. Es entsteht ein Peroxyd, welches mit einem langkettigen Aldehyd (Luciferin) weiterreagiert. Dieses Aldehyd wird *in vivo* mithilfe eines durch *luxCDE* codierten Fettsäure-Reduktase-Komplex synthetisiert. *In vitro* kann bei Bakterien, die nur das Luciferase-codierende *luxAB* ohne den *luxCDE*-Genkomplex besitzen, n-Decanal als Substat verwendet werden. Der eigentliche Lichtemitter ist ein Luciferase-gebundenes Zwischenprodukt, ein 4a-Hydroxylflavin, welches ein blaugrünes Licht mit einem typischen Maximum bei 490nm freisetzt.

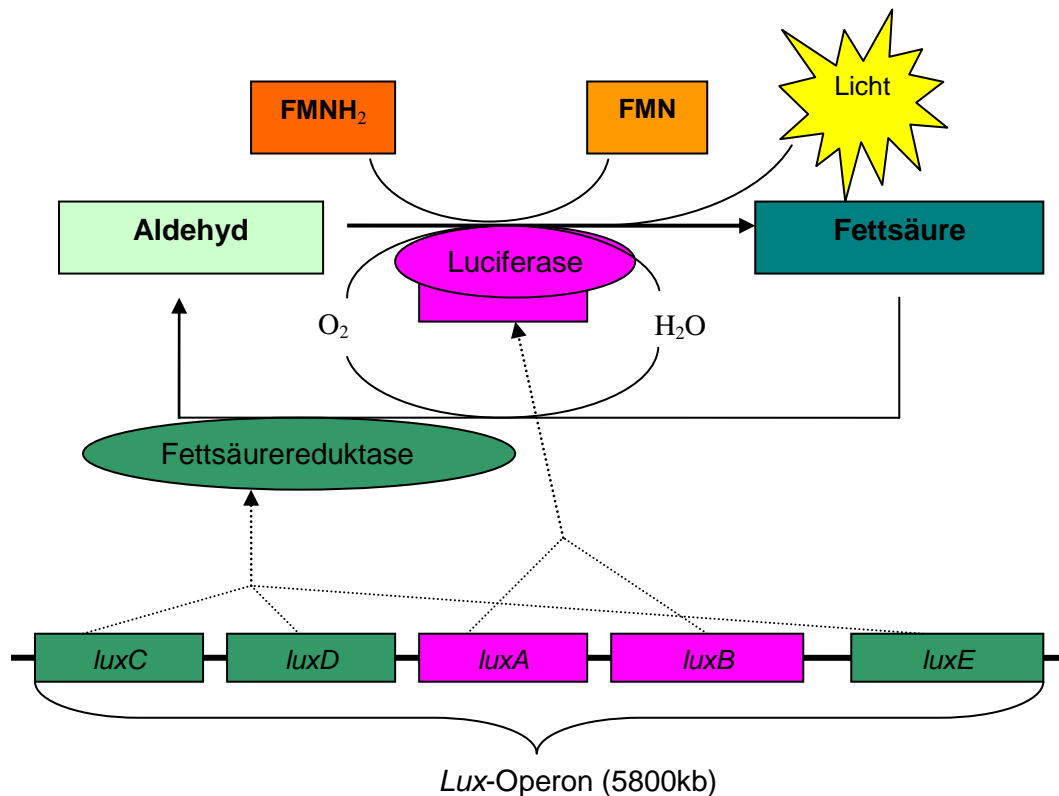


Abbildung 4: Entstehung von Biolumineszenz bei biolumineszierenden Bakterien

Das 5800bp große *Lux*-Operon von *Photobacterium luminescens* enthält 5 verschiedene Gene. *luxAB* codiert die Untereinheiten einer heterodimeren Luciferase, während *luxCDE* einen Fettsäurereduktase-Komplex codiert. Ein von diesem Enzymkomplex synthetisiertes langkettiges Aldehyd wird in einer Luciferase-katalysierten Reaktion unter Sauerstoff- und FMNH_2 -Verbrauch zu einer Fettsäure oxidiert. Eines der in dieser Reaktion entstehenden Zwischenprodukte setzt Licht mit einem Maximum bei 490nm Wellenlänge frei.

1.3.2. in vivo Biolumineszenz Bildgebung (BLI)

Die Möglichkeit biolumineszierende Erreger *in vivo* darstellen zu können birgt eine Vielzahl von Möglichkeiten und Vorteile (Andreu *et al.*, 2010). Die Methode an sich ist einfach und benötigt neben einer lichtundurchlässigen Kammer lediglich eine spezielle lichtsensitive Kamera. Versuchstiere, die mit biolumineszierenden Erregern infiziert worden sind, werden unter Narkose in die Kammer gelegt und nach einer angemessenen Expositionszeit wird ein Bild der Lichtemission in Pseudofarben am Computer angezeigt.

So ist zum einen eine Darstellung der Erregerlast und ihrer Lokalisation möglich, also eine Veranschaulichung der der Infektion eigenen Dynamik im lebenden Tier. Wird das bakterielle *Lux*-Operon konstitutiv exprimiert, so ist die Lichtemission direkt proportional zur jeweiligen Erregerzahl (Andreu *et al.*, 2010), sodass die spezifische Erregerlast bestimmt werden kann und somit auch Vorhersagen über den weiteren Verlauf der Erkrankung möglich sind.

Darüber hinaus erlaubt die Biolumineszenz Bildgebung (BLI) nicht nur die Dokumentation schon bekannter Wege der Infektion, sondern z.B. auch das Entdecken neuer Nischen des Erregers im Wirtskörper. Somit konnte bei *Listeria monocytogenes* eine Persistenz in der Gallenblase infizierter Mäuse nachgewiesen werden (Hardy *et al.*, 2004); ein Befund den man nur dann durch konventionelle Methoden entdeckt hätte, wenn man explizit danach gesucht hätte. Auch die Forschung an *Bacillus anthracis* (Glomski *et al.*, 2007), *Salmonella typhimurium* (Contag *et al.*, 1995), biofilmbildenden Bakterien wie *S. aureus* und *P. aeruginosa* (Kadurugamuwa *et al.*, 2003; Engelsman *et al.*, 2009) und vielen anderen profitierte von der Möglichkeit Infektionen longitudinal darstellen zu können, ohne das jeweilige Versuchsobjekt bei der Untersuchung zu zerstören.

Auch für die Erforschung von Genexpression und Virulenzfaktoren kann BLI gute Dienste leisten, wenn zum Beispiel die Infektionskinetik verschiedener Mutanten mit dem Wild-Typ verglichen wird (Orihuela *et al.*, 2004; Disson *et al.*, 2008). Natürlich kann mit BLI gleichzeitig das Verhalten des Wirts auf den Erreger dargestellt werden, indem Mäuse mit verschiedenen Immunsystem-Modulationen mit biolumineszierenden Erregern infiziert werden (Burns-Guydish *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2008). Auch die Möglichkeit transgene Mäuse zu verwenden, die selbst unter bestimmten Bedingungen Biolumineszenz zeigen fällt in diese Kategorie (Hemrajani *et al.*, 2008).

Da transgene Mäuse meist ein anderes Biolumineszenz-System mit anderem Spektrum der Lichtemission als das bakterielle benutzen, ist es auch möglich solche biolumineszierende Mäuse mit Bakterien zu infizieren, welche das bakterielle *Lux*-Operon exprimieren (Kadurugamuwa *et al.*, 2005).

Eine große Bedeutung kommt der BLI bei der *in-vivo*-Darstellung von Antibiotika- und Impfstoffwirkung zu, da sozusagen in Echtzeit am selben Tier das Verhalten des Erregers auf bestimmte Wirkstoffe getestet werden kann (Contag *et al.*, 1995; Kadurugamuwa *et al.*, 2003b).

So gesehen sind die Vorteile von BLI vielfältig (siehe auch Andreu *et al.*, 2010). Die Methode ist hoch-sensitiv, da sie ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis besitzt (Doyle *et al.*, 2004). Dies verdankt sie vor allem der Tatsache, dass die Autobiolumineszenz von Lebewesen äußerst gering ist und somit die Lichtemission aus dem Hintergrund nur marginal vorhanden ist, im Gegensatz zur Fluoreszenz Bildgebung, bei welcher dies eine große Rolle spielt (Troy *et al.*, 2004). Des Weiteren kann bei dieser Methode auf toxische Marker, wie zum Beispiel radioaktive Substanzen, verzichtet werden. Biolumineszenz ist weiter eng mit der metabolischen Aktivität des jeweiligen Erregers verbunden, lässt also Aussagen über die Vitalität und Anzahl der metabolisch aktiven Zellen zu (Kadurugamuwa *et al.*, 2003b). Allerdings führt dies auch zu einer Abnahme der Lichtemission beim Eintreten in die stationäre Phase *in vitro* (Francis *et al.*, 2001; Hardy *et al.*, 2004).

Der größte Vorteil der BLI ist, dass die Methode weder invasiv noch destruktiv ist, d.h. dass die Versuchsobjekte nicht zerstört und die Erreger nicht aus ihrer Umwelt herausgerissen werden müssen, um zum Beispiel die Erregerlast zu bestimmen. Dies ist bei der BLI von Biofilmen (Kadurugamuwa *et al.*, 2003; Engelsman *et al.*, 2009) ein wichtiger Vorzug, hilft aber auch entscheidend in der Anwendung im Tiermodell. So müssen die Tiere nicht getötet werden, um Erregerlast und Erregerlokalisierung zu bestimmten Zeitpunkten zu bestimmen. Dies senkt nicht nur die Kosten, da weniger Tiere pro Infektionsexperiment benötigt werden und jedes Tier quasi als seine eigene Kontrolle dienen kann, sondern erlaubt ins Besondere eine genaue Bestimmung der Kinetik der Infektion an ein und demselben Tier.

Ein Faktor, der BLI einschränkt, ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff. Allerdings scheint Biolumineszenz bis zu einer Sauerstoffkonzentration von 10nM (Bourgois *et al.*, 2001) und auch im Darmtrakt von Mäusen möglich zu sein (Foucault *et al.*, 2010). Auch die Menge an verfügbarem FMNH₂ und Substrat limitieren die Lichtemission.

So konnte in Hefen eine 100fache Steigerung des Lichtsignals erreicht werden durch eine Co-Expression von *luxAB* und *frp* aus *V. harveyi*, welches für eine NADPH-FMN-Oxidoreduktase codiert (Gupta *et al.*, 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass eine Expression von *luxCDE* unter einem eigenen Promotor die Biolumineszenz erhöht. Yagur-Kroll *et al.* konnten darlegen, dass die besten Ergebnisse der Biolumineszenz von *E. coli* erreicht werden, wenn *luxAB* induzierbar und *luxCDE* konstitutiv exprimiert werden.

Ein grundlegender Makel der Methoden, welche Biolumineszenz im Tiermodell verwenden, stellt die Tatsache dar, dass die Lichtschwächung im Gewebe durch Absorption und Streuung sehr hoch ist. So werden allgemein pro cm Gewebe 10mal weniger Photonen detektiert (Contag *et al.*, 1995). Dabei ist die Absorption durch Hämoglobin von größter Bedeutung (Taroni *et al.*, 2003). Dies gilt im besonderen Maße für Licht, dessen Wellenlänge dem grünen und blauen Spektrumsbereich zugehört (Doyle *et al.*, 2004). Licht mit einer Wellenlänge von über 600nm hingegen hat eine sehr gute Transmission durch das Gewebe (Rice *et al.*, 2001; Doyle *et al.*, 2004). Allerdings ist der Anteil von Licht mit Wellenlängen über 600nm bei Verwendung der bakteriellen Luciferase nur ca. 10% (Rice *et al.*, 2001) und somit relativ gering. Deswegen ist es wichtig Faktoren, welche die Lichtabsorption steigern, auszuschalten: d.h. zum Beispiel der Gebrauch von möglichst kleinen Versuchstieren ohne oder mit weißem Fell.

1.4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es einen biolumineszierenden *H. pylori* zu entwickeln, um die Vorteile der Biolumineszenz Bildgebung auch bei *H. pylori* nutzbar zu machen. Experimente mit *H. pylori* im Gerbilmodell sind relativ zeitaufwendig, muss doch nach der Infektion mindestens 4 Wochen gewartet werden, um eine hohe Wahrscheinlichkeit der Kolonisierung zu erreichen. Dann müssen die Tiere getötet, der Magen entnommen, homogenisiert und eine Verdünnung des Homogenisats auf Platten ausgebracht werden. Bis mit den ersten Kolonien auf den Platten zu rechnen ist müssen noch einmal 3-5 Tage in Anspruch genommen werden. Während dieser ganzen Zeit besteht eine „black box“ d.h. man kann nicht sicher sein, ob eine

Kolonisation stattgefunden hat, und selbst wenn, ist es nicht sicher, ob man die kolonisierenden *Helicobacter* wirklich reisolieren und eine stattgefundene Kolonisierung so beweisen kann. Die Möglichkeit *H. pylori* per Biolumineszenz Bildgebung zu detektieren könnte diese Lücken schließen. So wäre es nicht nur möglich *H. pylori* im lebenden Tier zu detektieren, sondern auch die Lokalisation des biolumineszierenden Erregers im Magen, spätestens nach Entnahme desselben, darzustellen. Die Anzahl der bei Impf- und Therapiestudien benötigten Tiere könnte zusätzlich gesenkt werden und eine longitudinale Darstellung der Infektion die Ergebnisse solcher Studien besser veranschaulichen. Vielleicht könnten sogar grundlegende Erkenntnisse über *H. pylori* gewonnen und schon bestehende verdeutlicht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Plasmide

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt (s. Tab. 3).

Tabelle 3: verwendete Plasmide

Orange gezeichnet sind Plasmide, die das jeweilige Insert in den *moeB*-Lokus inserieren. Blau bzw. grün sind die Konstrukte gekennzeichnet, welche flankierende Bereiche des *TrpA*-Lokus bzw. von pHel12 beinhalten.

Name	Charakterisierung	Verwendung	Referenz
pBE1	pSR20 mit <i>rpsL-erm</i> -Kassette (<i>KpnI</i> / <i>Sall</i>) (pSR20_ <i>rpsL-erm</i>)	Insertion von <i>rpsL-erm</i> -Kassette in <i>moeB</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE2	pSP77 mit <i>luxCDABE-mut</i> (<i>NdeI</i> / <i>KpnI</i>) (pSP77_ <i>mcc_luxCDABE-mut</i>)	Insertion von <i>luxCDABE-mut</i> in <i>moeB</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE3	pBE2 mit <i>cat_{GC}</i> -Kassette (<i>SacI</i>) (pSP77_ <i>cat_mcc_luxCDABE-mut</i>)	Insertion von <i>luxCDABE-mut</i> und <i>cat_{GC}</i> -Kassette in <i>moeB</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE4	pSR350 mit <i>luxAB</i> (<i>NcoI</i> / <i>NotI</i>) und <i>cat_{GC}</i> -Kassette (<i>Sall</i> / <i>Sall</i>) (pSR350_ <i>fla_TetR_uptetO_luxAB_cat</i>)	Insertion von <i>luxAB</i> in pHel12	diese Arbeit
pBE4'	pSR350 mit <i>luxAB</i> (<i>NdeI</i> / <i>NotI</i>) und <i>cat_{GC}</i> -Kassette (<i>Sall</i> / <i>Sall</i>) → Verbesserung gegenüber pBE4: keine zwei ATG initial	Insertion von <i>luxAB</i> in pHel12	diese Arbeit
pBE5	pLH2 mit <i>luxAB</i> (<i>NdeI</i> / <i>NotI</i>) (pLH2_ <i>cat_alpA_luxAB</i>)	Insertion von <i>luxAB</i> in pHel12	diese Arbeit
pBE6	pHel12 mit <i>alpA_LuxAB_cat</i>	Shuttlevektor von P12 zu B8	diese Arbeit
pBE7	pSR350 mit <i>luxCDABE-mut</i> (<i>NdeI</i> / <i>NotI</i>) (pSR350_ <i>fla_TetR_uptetO_luxCDA BE-mut_cat</i>)	Insertion von <i>luxCDABE-mut</i> und <i>cat</i> in pHel12	diese Arbeit
pBE8	pLH2 mit <i>luxCDABE-mut</i> (<i>NdeI</i> / <i>NotI</i>) (pLH2_ <i>cat_alpA_luxCDABE-mut</i>)	Insertion von <i>luxCDABE-mut</i> in pHel12	diese Arbeit
pBE9	pLH2 mit <i>luxCDE-mut</i> (<i>NdeI</i> / <i>NotI</i>)	Insertion von <i>luxCDE-mut</i> und <i>cat</i> in pHel12	diese Arbeit

pBE10	(pLH2_cat_alpA_luxCDE-mut) pHel12 mit <i>alpA_luxCDE-mut_cat</i>	Shuttelvektor von P12 zu B8	diese Arbeit
pBE11	pSP77 mit <i>alpA_luxCDABE-mut (PstI/KpnI)</i> (pSP77_alpA_luxCDABE-mut)	Insertion von <i>alpA_luxCDABE-mut</i> in <i>moeB</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE12	pBE11 mit <i>aphA3</i> -Kassette (<i>KpnI</i>) (pSP77_aphA3_alpA_luxCDABE-mut)	Insertion von <i>alpA_luxCDABE-mut</i> und <i>aphA3</i> -Kassette in <i>moeB</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE13	pSP77 mit <i>fla_luxCDABE-mut</i> und <i>cat_{GC}</i> -Kassette (pSP77_cat_fla_luxCDABE-mut)	Insertion von <i>fla_luxCDABE-mut</i> und <i>cat_{GC}</i> -Kassette in <i>moeB</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE14	pBlu_TrpA_uptetO mit <i>luxAB (NdeI/SalI)</i> (pBlu_TrpA_uptetO_luxAB)	Insertion von <i>luxAB</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE15	pBE13 mit <i>aphA3</i> -Kassette (<i>SalI</i>) (pBlu_TrpA_uptetO_luxAB_aphA3)	Insertion von <i>luxAB</i> und <i>aphA3</i> -Kassette in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE16	pBlu_TrpA_uptetO mit <i>luxCDABE-mut (NdeI/SalI)</i> (pBlu_TrpA_uptetO_luxCDABE-mut)	Insertion von <i>luxCDABE-mut</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE17	pBE16_cat (<i>SalI</i>) (pBlu_TrpA_uptetO_luxCDABE-mut_cat)	Insertion von <i>luxCDABE-mut</i> und <i>cat</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE18	pBlu_TrpA mit <i>fla_luxCDABE-mut (AscI/SalI)</i> (pBlu_TrpA_fla_luxCDABE-mut)	Insertion von <i>fla_luxCDABE-mut</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE19	pBE18_cat (<i>SalI</i>) (pBlu_TrpA_fla_luxCDABE-mut_cat)	Insertion von <i>fla_luxCDABE-mut</i> und <i>cat</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE20	pBlu_TrpA_fla mit <i>luxAB (NdeI/SalI)</i> (pBlu_TrpA_fla_luxAB)	Insertion von <i>fla_luxAB</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE21	pBE20_aphA3 (<i>SalI</i>) (pBlu_TrpA_fla_luxAB_aphA3)	Insertion von <i>fla_luxAB_aphA3</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE22	pBlu_TrpA_uptetO mit <i>rpsL-erm (NdeI/SalI)</i> (pBlu_TrpA_fla_luxCDABE-mut_cat)	Insertion von <i>rpsL-erm</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE23	pBlu_TrpA_fla mit <i>luxCDE-mut (NdeI/SalI)</i> (pBlu_TrpA_fla_luxCDE-mut)	Insertion von <i>fla_luxCDE-mut</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBE24	pBE23_aphA3 (<i>SalI</i>) (pBlu_TrpA_fla_luxCDE-mut_aphA3)	Insertion von <i>fla_luxCDE-mut</i> und <i>aphA3</i> in <i>TrpA</i> -Lokus	diese Arbeit
pBluescript II SK+ (pBlu)	<i>ori_{ColE1}</i> , <i>ori_{f1(+)}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse Primerbindungsstellen, Amp ^R	Plasmidrückgrat	Stratagene
pBlu_TrpA_u	pBluescript II SK+ mit	Plasmidrückgrat zur	Alexandra

ptetO	flankierenden Bereichen des <i>TrpA</i> -Lokus und <i>uptetO</i> -Promotor	Insertion in <i>TrpA</i> -Lokus	Debovski, Uni Western Australia 2012
pJT-LuxCDABE-cm	Cam ^R	Beinhaltet <i>luxCDABE</i> von <i>Photorhadus luminescens</i>	Arbeitsgruppe Heesemann
pLH2	pBluescript II SK+ mit flankierenden Bereichen aus pHel12; <i>alpA</i> -Promotor; Kan ^R , Cam ^R	Insertion in pHel12	Lea Holsten (geplante Dissertation)
pSR20	pSP77 ohne Promotor, Strep ^R	Insertion in <i>moeB</i> -Lokus	(Rohrer, 2010)
pSR11	pBluescript II SK+ mit <i>rpsL-erm</i> -Kassette (<i>Bam</i> HI)	<i>rpsL-erm</i> -Kassette	(Rohrer, 2010)
pHel2	Shuttle-Plasmid	<i>cat_{GC}</i> -Kassette	(Heuermann & Haas, 1998)
pHel3	<i>E. coli</i> - <i>H. pylori</i> Shuttle-Plasmid, <i>aphA3</i> -Kassette	<i>aphA3</i> -Kassette	(Heuermann & Haas, 1998)
pHel12	Plasmid des <i>H. pylori</i> -Stamms P12		(Rohrer, 2012)
pSP77	Strep ^R	Insertion in <i>moeB</i> -Lokus	Sandra Praßl
pSR350	pBluscript II SK+ mit flankierenden Bereichen aus pHel12; <i>uptetO</i> -induzierbares System Kan ^R ,	Insertion in pHel12	(Rohrer, 2010)

In Abbildung 5-7 sind die wichtigen Konstrukte nochmals schematisch nach Rekombinationsort aufgeführt. Gelb dargestellt ist jeweils das gesamte *Lux*-Operon, pink der *luxAB* Abschnitt und dunkelgrün *luxCDE-mut*, wenn die jeweiligen Untereinheiten des *Lux*-Operons getrennt kloniert wurden. Die Flankierenden Bereiche, welche die homologe Rekombination mit dem jeweiligen *H. pylori* Genomabschnitt erlauben sind folgendermaßen markiert: Orange gefärbt sind flankierende Bereiche des *moeB*-Lokus des *H. pylori* Chromosoms, blau markiert sind die flankierenden Bereiche des *TrpA*-Lokus des *H. pylori* Chromosoms und hellgrün sind die homologen Bereiche zum Plasmid des *H. pylori* Stammes P12, pHel12.

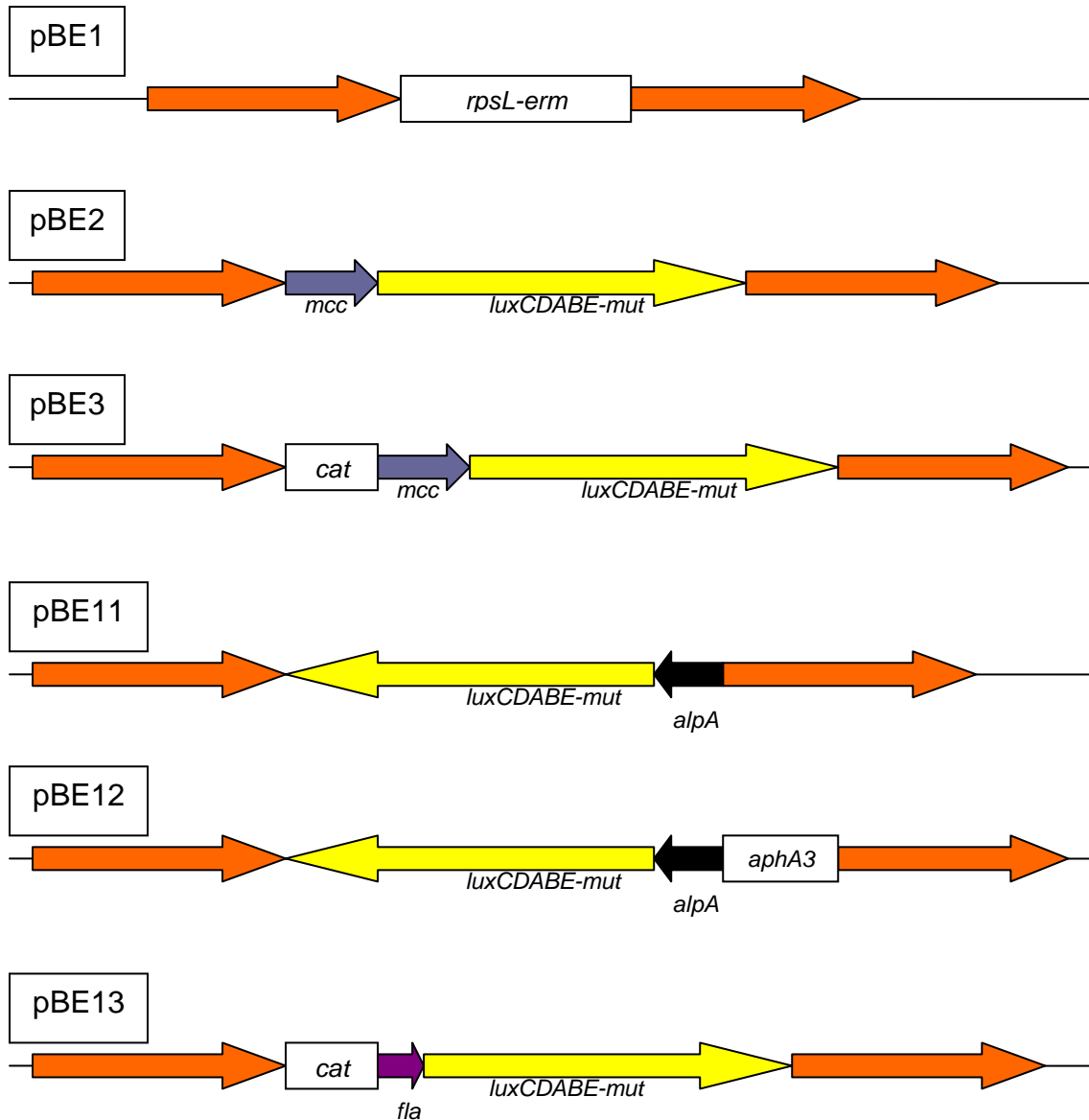


Abbildung 5: Konstrukte zur Rekombination in *moeB*-Lokus

Die das Inseerat flankierenden Bereiche sind orange dargestellt und sind weitgehend homolog zu den flankierenden Sequenzen des *moeB*-Lokus in *H. pylori* (B8, P12). Als Vektor für diese Konstrukte diente das Plasmid pSP77.

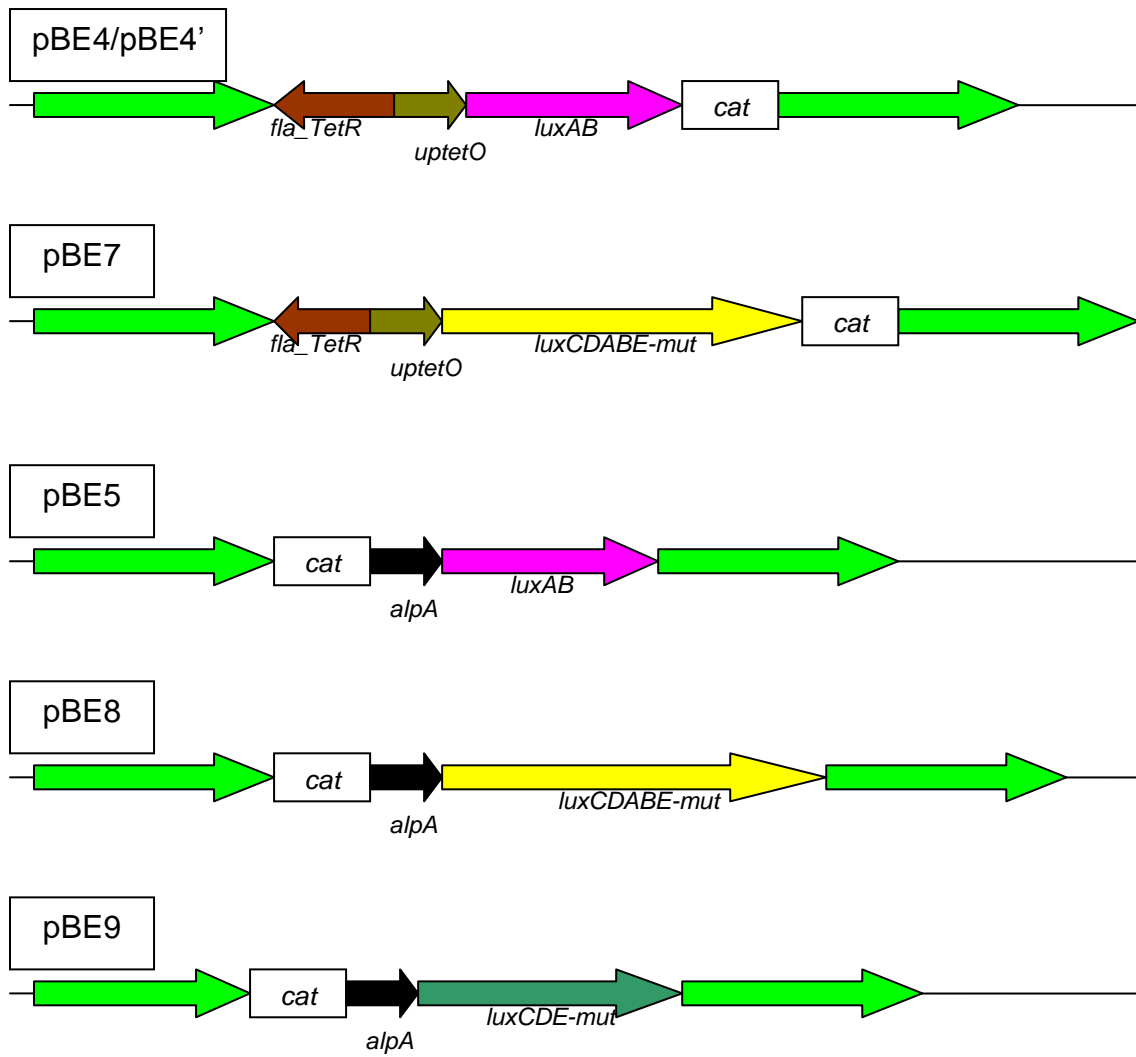
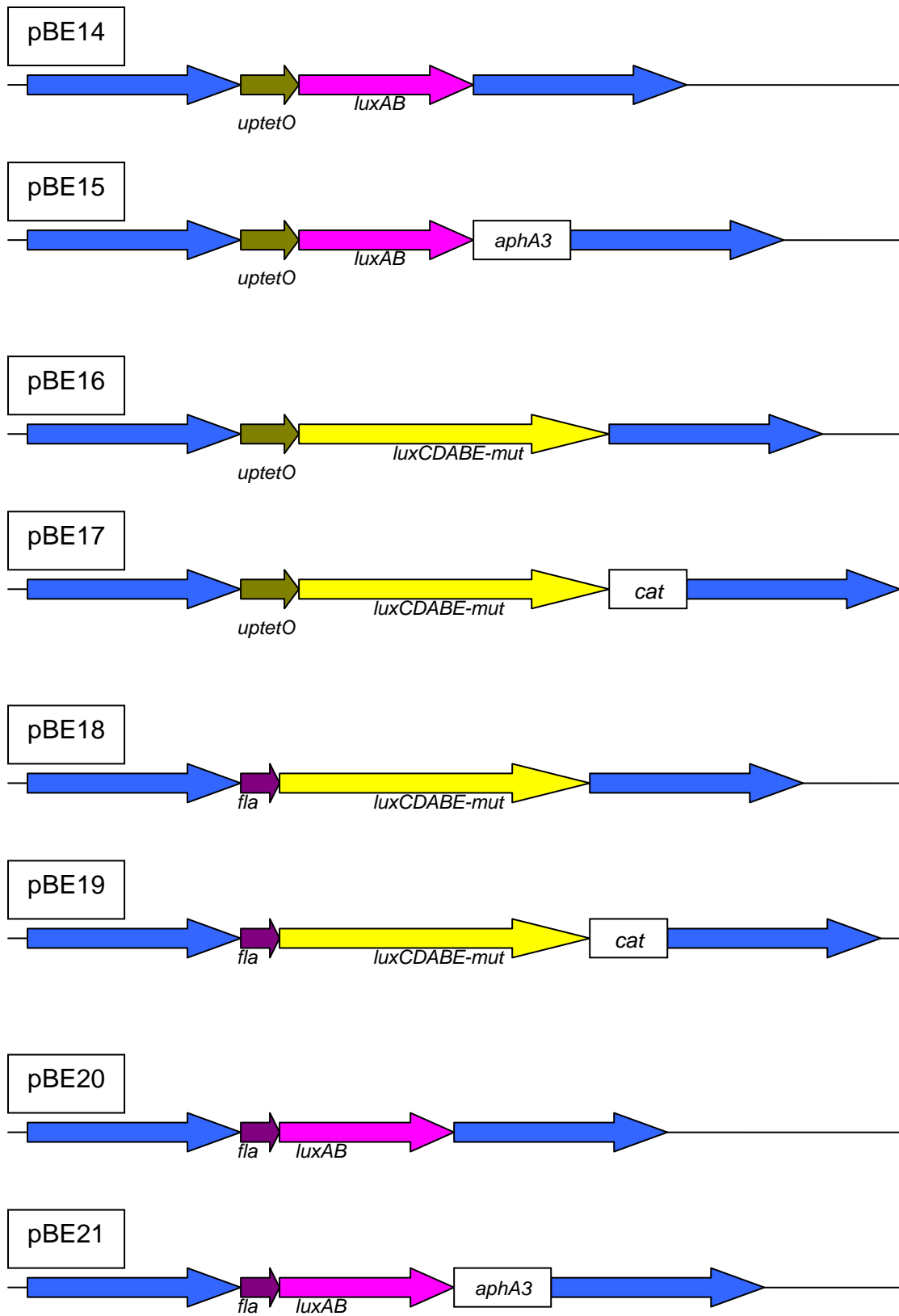


Abbildung 6: Konstrukte zur Rekombination in pHel12

Die flankierenden Bereiche sind grün dargestellt und sind homolog zu Sequenzen von pHel12. Als Vektor diente pSR350 bei den Plasmiden pBE4 und pBE7 und pLH2 für die restlichen Konstrukte.



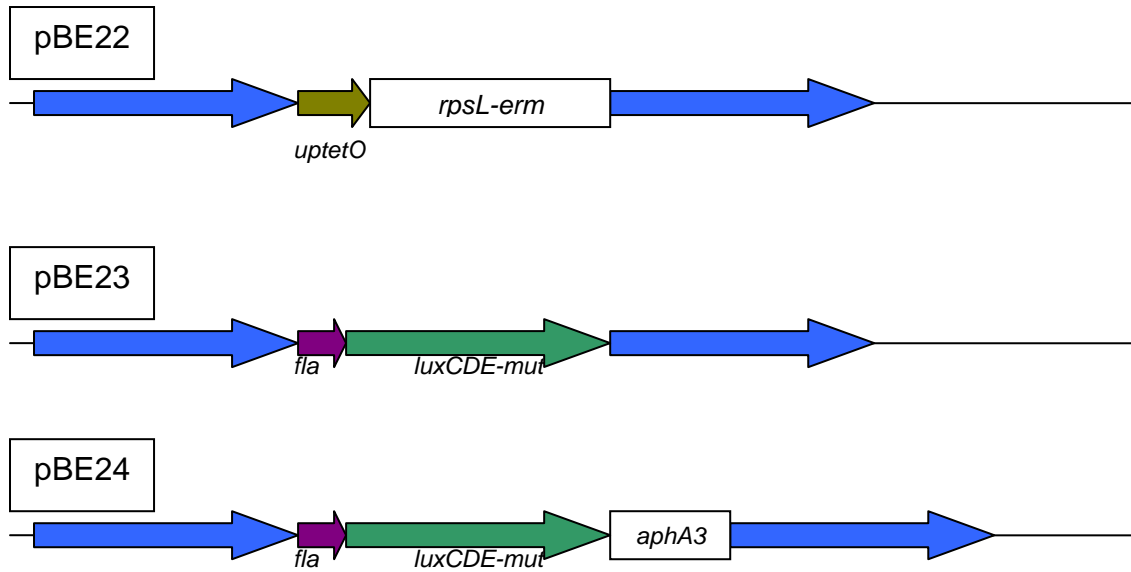


Abbildung 7: Konstrukte zur Rekombination in *TrpA*-Lokus

Die flankierenden Bereiche, welche weitgehend homolog zu den flankierenden Sequenzen des *TrpA*-Lokus in *H. pylori* B8 und X47 sind, sind blau dargestellt. Als Vektor diente pBlu.

2.1.2. Oligonukleotide

Die verwendeten und in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen. Restriktionsenzymststellen sind farbig markiert.

Tabelle 4: Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'- 3')	Verwendungszweck
BE1	CAGC GGTACC ATGCTTTATAACTATGGATT	s-Primer, <i>rpsL-erm</i> -Kassette aus pSR11 mit <i>KpnI</i>
BE2	GC GTCGAC TTACTTATTAATAATTTATAG	as-Primer; <i>rpsL-erm</i> -Kassette aus pSR11 mit <i>Sall</i>
BE3	GATC GGTACC CAGGCTTGGAGGATACGTATG	s-Primer, <i>Lux-Operon</i> aus pJT <i>luxCDABE</i> -cm mit <i>KpnI</i>
BE4	GATC CCATGG ATGAAATTTGGAACTTTTTGC	s-Primer; <i>luxAB</i> aus <i>Lux-Operon</i> mit <i>NcoI</i>
BE5	GATC GTCGAC GCTGCTTTCACCTCACCCAG	as-Primer, <i>luxAB</i> aus <i>Lux-Operon</i> mit <i>Sall</i>
BE6	GATC ACTAGT GCCAACAAAGCAGCAGCTTG	s-Primer; <i>luxE</i> aus <i>Lux-Operon</i> mit <i>SpeI</i>
BE7	GATC ACTAGT AGTGATAGAATATCTCAATAG	as-Primer; <i>luxCD</i> aus <i>Lux-Operon</i> mit <i>SpeI</i>

BE8	GTATGACTT CG TATGTTGATAAAC	s-Primer; overlap PCR <i>luxCDABE</i> um <i>NdeI</i> zu entfernen
BE9	CTGTAATTTCTTGTTTATCAACATACGAAGTCATAC	as-Primer; overlap PCR <i>luxCDABE</i> um <i>NdeI</i> zu entfernen
BE10	GATC CATATG AAATTTGGAACTTTTTG	s-Primer; <i>LuxAB</i> aus <i>Lux</i> -Operon mit <i>NdeI</i>
BE11	GATC GCGGCCGC GCTGCTTTCACCTCACCCAG	as-Primer; <i>LuxAB</i> aus <i>Lux</i> -Operon mit <i>NotI</i>
BE12	GATC GAGCTC CCTTTCTCCGCCATATTGTGTTG	s-Primer; <i>cat_{GC}</i> -Kassette aus pHel2 mit <i>SacI</i>
BE13	CAGC GTCGAC ATGCTTTATAACTATGGATT	s-Primer, <i>rpsL-erm</i> -Kassette aus pSR11 mit <i>SalI</i>
BE14	GATC GGTACC TTACTTATTAATAATTTATAG	as-Primer, <i>rpsL-erm</i> -Kassette aus pSR11 mit <i>KpnI</i>
BE15	GATC GCGGCCGC TTACAGCCGGATCCTCTAGAG	as-Primer, <i>Lux</i> -Operon aus pJ <i>luxCDABE</i> -cm mit <i>NotI</i>
BE16	GATC GGCGCGCC CTAGAAGATCTCATGTCCGC	as-Primer, pBlu_ <i>TrpA</i> mit <i>AscI</i>
BE17	GATC GTCGAC ATCCGCTCAAAAACAC	s-Primer, pBlu_ <i>TrpA</i> mit <i>SalI</i>
BE19	CAGC CATATG CCTTTATAACTATGGATTAAC	s-Primer, <i>rpsL-erm</i> -Kassette aus pSR11 mit <i>NdeI</i>
fla-s	CGCGCCT TAAAGCCCTTTAAAATTTCAAACCTTTAA CCGATAATAGTTCCAACCAAAAAGCAAGAAGGAG TTACA CA	s-Sequenz von <i>flaA</i> -Promotor mit <i>AscI/NdeI</i>
fla-as	TATGT GAACTCCTTCTTGCTTTTGGTTGGAAC TTATCGGTTAAAGTTTCAAATTTAAAGGGCTTTA GG	as-Sequenz von <i>flaA</i> -Promotor mit <i>AscI/NdeI</i>
Lux_KpnI_as	GATC GGTACC TTACAGCCGGATCCTCTAGAG	as-Primer; <i>Lux</i> -Operon aus pJT <i>luxCDABE</i> -cm mit <i>KpnI</i>
Lux_Nde_s	GATC CATATG ACTAAAAAATTTTCATTCAT	s-Primer, <i>Lux</i> -Operon aus pJT <i>luxCDABE</i> -cm mit <i>NdeI</i>
Lux_Sal_as	GATC GTCGACT TTACAGCCGGATCCTCTAGA	as-Primer, <i>Lux</i> -Operon aus pJT <i>luxCDABE</i> -cm mit <i>SalI</i>
SR118	GATCCTGCAG GTCGACT CTAGAGGATCCCC	as-Primer; <i>cat_{GC}</i> -Kassette aus pHel2 mit <i>SalI</i>
1602	CACTGACTTAATTAATAAAATCGTTATAAAAATCAA TGCG	as-Primer für flankierenden

		Bereich hinter <i>moeB</i> -Lokus
1604/ SP118	CTAAGTG GTCGAC GTTAATCCGCCATATTGTGT TG	s-Primer; <i>cat_{GC}</i> -Kassette aus pHel2 mit <i>Sall</i>
1608	ACCTGACGGATCCATTTATGAAGATTCCCTAGA CAGAG	s-Primer für flankierenden Bereich vor <i>moeB</i> -Lokus
1870	GATC AGATCT AGCGAACCATTTGAGGTGAT	as-Primer; <i>aphA3</i> -Kassette aus pHel3 mit <i>BglII</i>
1875	CAGC ATCGAT ATGCTTTATAACTATGGATT	s-Primer; <i>rpsL-erm</i> -Kassette mit <i>Clal</i>
1876	GC GGTACC TTACTTATTAATAATTTATAG	as-Primer; <i>rpsL-erm</i> -Kassette mit <i>KpnI</i>
1889	GATC GGTACC AGCGAACCATTTGAGGTGAT	as-Primer für <i>aphA3</i> -Kassette aus pHel3 mit <i>KpnI</i>
1892	GATC GTCGAC AGCGAACCATTTGAGGTGATAG	as-Primer für <i>aphA3</i> -Kassette aus pHel3 mit <i>Sall</i>
1893	GATC GGTACC CGGGGATCTTTTAGACATCT	s-Primer für <i>aphA3</i> -Kassette aus pHel3 mit <i>KpnI</i>
1934	TAATCTTACTCATTTTAGAC	as-Primer; Sequenzierung von <i>rpsL-erm</i> Kassette
1935	CATGCAGGAATTGACGATTT	s-Primer; Sequenzierung von <i>rpsL-erm</i> -Kassette
2154	TCACGCGCTATGAAGACATG	s-Primer; Sequenzierung der Deletion von <i>ComE3</i> in P12
2155	TCCAAAGCGACCAATTCGCT	as-Primer; Sequenzierung der Deletion von <i>ComE3</i> in P12
2157	GATC GTCGAC CGGGGATCTTTTAGACATCT	s-Primer für <i>aphA3</i> -Kassette aus pHel3 mit <i>Sall</i>

2.1.3. Bakterienstämme

2.1.3.1. E. coli Stämme

Tabelle 4 und 5 zeigen die verwendeten *E. coli* Stämme an. Dabei sind in Tabelle 4 die für die einzelnen Experimente verwendeten Ausgangsstämme beschrieben, während Tabelle 5 die hergestellten *E. coli* Mutanten auflistet.

Tabelle 5: *E. coli* Stämme

Stamm	Charakterisierung	Referenz
DH5α	F-Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-I gyr A96 relA1</i> (Invitrogen, Karlsruhe)	(Hanahan, 1983)
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacO74 recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galJ galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe)	(Grant et al., 1990)

Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte *E. coli* Mutanten

Name	Ausgangsstamm	Resistenzen	Plasmid (Plasmidrückgrat <i>Insert</i>)
E-1	DH5α	Erm ^R	pBE1 (pSR20_ <i>rpsL-erm</i>)
E-2	Top-10	Erm ^R	pBE1 (pSR20_ <i>rpsL-erm</i>)
E-4	DH5α	Strep ^R	pBE2 (pSP77_ <i>mcc_luxCDABE-mut</i>)
E-5	Top10	Strep ^R ; Cam ^R	pBE3 (pSP77_ <i>cat_mcc_luxCDABE-mut</i>)
E-6	DH5α	Cam ^R ; Kan ^R	pBE4 (pSR350_ <i>fla_TetR_uptetO_luxAB_cat</i>)
E-8	Top10	Strep ^R ; Cam ^R ; Kan ^R	pBE4' (pSR350_ <i>fla_TetR_uptetO_luxAB_cat</i>)
E-9	Top10	Strep ^R ; Cam ^R ; Kan ^R	pBE7 (pSR350_ <i>fla_TetR_uptetO_luxCDABE-mut_cat</i>)
E-10	Top10	Strep ^R ; Cam ^R ; Kan ^R	pBE5 (pLH2_ <i>cat_alpA_luxAB</i>)
E-11	Top10	Strep ^R ; Cam ^R ; Kan ^R	pBE8 (pLH2_ <i>cat_alpA_luxCDABE-mut</i>)
E-12	Top10	Strep ^R ; Cam ^R ; Kan ^R	pBE9 (pLH2_ <i>cat_alpA_luxCDE-mut</i>)
E-13	Top10	Strep ^R ; Amp ^R	pBE16

			(pBlu_TrpA_uptetO_luxCDABE-mut)
E-14	Top10	Strep ^R ; Amp ^R	pBE14 (pBlu_TrpA_uptetO_luxAB)
E-15	Top10	Amp ^R ; Cam ^R	pBE17 (pBlu_TrpA_uptetO_luxCDABE-mut_cat)
E-16	Top10	Amp ^R ; Kan ^R	pBE15 (pBlu_TrpA_uptetO_luxAB_aphA3)
E-17	Top10	Strep ^R	pBE11 (pSP77_alpA_luxCDABE-mut)
E-18	Top10	Strep ^R ; Kan ^R	pBE12 (pSP77_aphA3_alpA_luxCDABE-mut)
E-19	Top10	Strep ^R ; Cam ^R	pBE13 (pSP77_cat_fla_luxCDABE-mut)
E-21	Top10	Strep ^R ; Amp ^R	pBE18 (pBlu_TrpA_fla_luxCDABE-mut)
E-22	Top10	Strep ^R ; Amp ^R ; Cam ^R	pBE19 (pBlu_TrpA_fla_luxCDABE-mut_cat)
E-26	Top10	Strep ^R ; Amp ^R	pBE20 (pBlu_TrpA_fla_luxAB)
E-27	Top10	Strep ^R ; Amp ^R ; Kan ^R	pBE21 (pBlu_TrpA_fla_luxAB_aphA3)
E-28	Top10	Amp ^R ; Erm ^R	pBE22 (pBlu_TrpA_rpsL-erm)
E-29	Top10	Strep ^R ; Amp ^R	pBE23 (pBlu_TrpA_fla_luxCDE-mut)
E-30	DH5α	Amp ^R ; Kan ^R	pBE24 (pBlu_TrpA_fla_luxCDE-mut_aphA3)

2.1.3.2. *Helicobacter pylori* Stämme

In Tabelle 6 sind die für die einzelnen Experimente verwendeten Ausgangsstämme aufgelistet, während Tabelle 7 die hergestellten *H. pylori* Mutanten auflistet.

Tabelle 7: Ausgangsstämme *H. pylori*

Name	Charakterisierung	Referenz
B8	Humanes <i>H. pylori</i> Isolat, B128	(Israel <i>et al.</i> , 2001)
P12	Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie und Immunologie“ der Universität Hamburg mit <i>rpsL</i>	(Schmitt und Haas, 1994)
X47	Isolat aus Katze, <i>Cag-PAI</i> -neg, Strep ^R	(Ermak <i>et al.</i> , 1998)

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte *H. pylori* Mutanten

Name	Stamm	Resistenz	Charakterisierung	Biolumineszenz
H-6	B8	Strep ^R ; Cam ^R	<i>moeB::cat_mcc_luxCDABE-mut</i>	√
H-8	P12	Strep ^R ; Cam ^R	<i>moeB::cat_mcc_luxCDABE-mut</i>	√
H-10 H-11	B8	Strep ^R ; Cam ^R	<i>moeB::cat fla_luxCDABE-mut</i>	√
H-12	B8	Strep ^R , Kan ^R	<i>moeB::aphA3_alpA_luxCDABE-mut</i>	√
H-13	P12	Strep ^R ; Cam ^R	<i>pHel12_alpA_luxAB_cat</i>	
H-14	B8	Strep ^R ; Cam ^R	<i>pHel12_cat_alpA_luxAB</i>	
H-15	P12	Strep ^R ; Kan ^R	<i>pHel12_cat_alpA_luxCDE-mut</i>	
H-16	B8	Strep ^R ; Kan ^R	<i>TrpA::uptetO_luxAB_aphA3</i>	
H-19	B8	Strep ^R ; Cam ^R	<i>TrpA::uptetO_luxCDABE-mut_cat</i>	√
H-20	B8	Strep ^R ; Cam ^R ; Kan ^R	<i>TrpA::uptetO_luxAB_aphA3; pHel12_cat_alpA_luxCDE-mut</i>	√
H-21	X47	Strep ^R ; Kan ^R	<i>TrpA::uptetO_luxAB_aphA3</i>	
H-23	B8	Strep ^R ; Kan ^R	<i>TrpA::fla_luxAB_aphA3</i>	
H-24	B8	Strep ^R ; Kan ^R	<i>TrpA::fla_luxCDE-mut_aphA3</i>	
H-25	B8	Strep ^R ; Kan ^R ; Cam ^R	<i>TrpA::fla_luxCDE-mut_aphA3; pHel12_cat_alpA_luxAB</i>	√
H-26	B8	Strep ^R ; Cam ^R	<i>TrpA::fla_luxCDABE-mut_cat</i>	√

2.1.4. Medien für Bakterien

Die Nährmedien zur Kultivierung der jeweiligen Bakterien wurden mit entsalztem und filtriertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D) hergestellt und mithilfe eines Wasserdampfhochdruckautoklaven SterimaquetTM (Maquet/Getinge, Rastatt, D) für 20 min bei $1,013 \times 10^5$ Pascal Überdruck und 121°C sterilisiert. Weitere Zusätze wie zum Beispiel Vitamine und Antibiotika wurden nach Sterilfiltrierung mittels Sterifilter mit Porengröße 0,2 µm (Millipore) hinzugegeben, wenn das jeweilige Nährmedium auf ca. 55°C abgekühlt war.

Folgende Medien wurden zur Kultivierung von *H. pylori* und *E. coli* verwendet (Tab. 9-10):

Tabelle 9: *E. coli* Medien

LB-Platten	16g/500ml Lennox-L-Agar (Invitrogen) → autoklaviert
------------	---

LB-Flüssigmedium	20g/l Lennox-L-Medium (Invitrogen) → autoklaviert
E. coli-Einfriermedium	20g/l Lennox-L-Medium (Invitrogen) → autoklaviert, mit 20% Glycerin
GC-Platten	Entsprechen den <i>H. pylori</i> -Serumplatten ohne Nystatin, Trimetoprim und Vancomycin → autoklavierter GC-Agar + 10ml/l Vitamin-Mix + 80ml/l Pferdeserum

Tabelle 10: *H. pylori* Medien

BB-Flüssigmedium	28g/l Brucella Broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) → autoklaviert
Hpy-Einfriermedium	28g/l Brucella Broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) → autoklaviert, dann Zugabe von 10% FCS und 20% Glycerin
Serumplatten	18g/500ml GC-Agar-Basis (Oxoid) → autoklaviert, dann Zugabe von: - 10ml/l Vitamin-Mix* - 80ml/l Pferdeserum - 10mg/l Vancomycin - 5mg/l Trimethoprim - 1mg/l Nystatin (440µl/l)
*Vitaminmix	100g/l α-D-Glucose, 10g/l L-Glutamin, 26g/l L-Cystein, 0,1g/l Cocarboxylase, 20mg/l Fe(III)-Nitrat, 3mg/l Thiamin, 13mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25g/l Nicotinamidadeninindinucleotid (NAD), 10mg/l Vitamin B12, 1,1g/l LCystin, 1g/l Adenin, 30mg/l Guanin, 0,15g/l L-Arginin, 0,5g/l Uracil

2.1.5. Antibiotika als Mediumzusätze

Tabelle 11: Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentrationen
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	100mg/l (<i>E.coli</i>)
Chloramphenicol (Cam)	EtOH	30mg/l (<i>E. coli</i>) 6mg/l (<i>H. pylori</i>)
Erythromycin (Erm)	EtOH	250mg/l (<i>E. coli</i>) 10mg/l (<i>H. pylori</i>)
Kanamycin (Kan)	H ₂ O	50mg/l (<i>E. coli</i>) 8mg/l (<i>H. pylori</i>)
Streptomycin (Strep)	H ₂ O	250mg/l (<i>E. coli/H. pylori</i>)

Trimetoprim (Tri)	H ₂ O	5µg/ml (<i>H. pylori</i>)
Vancomycin (Van)	H ₂ O	10µg/ml (<i>H. pylori</i>)

2.1.6. Enzyme und Proteine

Alkalische Shrimp Phosphatase (Fermentas)

Fetales Kälberserum (FCS) (PAA)

Kinase (Roche)

Lysozym (Fluka/Sigma)

Pferdeserum (PAA)

Pfu-DNA-Polymerase (Fermentas)

Restriktionsenzyme (Roche/Fermentas)

Taq-DNA-Polymerase (TaKaRa, Promega)

T4-DNA-Ligase (Roche)

2.1.7. Chemikalien, Puffer und Lösungen

2.1.7.1. Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 12: kommerziell erhältliche Kits

Kit	Funktion	Referenz
illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Aufreinigen von DNA aus Enzymreaktionen und Gel	GE Healthcare
QIAamp DANN Mini Kit	Isolation von genomischer DNA aus <i>H. pylori</i>	Qiagen (Cat. No.51306)
QIAquick Gel Ectraction Kit	Aufreinigen von DNA aus Enzymreaktionen und Gel	Qiagen (Cat. No. 28706)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Aufreinigen von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	Qiagen (Cat. No. 27106)
Wizard SV Gel and PCR clean-up System	Aufreinigen von DNA aus Enzymreaktionen und Gel	Promega
Wizard Plus SV Miniprep	Aufreinigen von Plasmiden aus <i>H. pylori</i>	Promega
ZR BAC DNA Miniprep	Aufreinigen von großen	Zymo research

Kit	Plasmiden aus <i>E. coli</i>	(Cat. No.D4048)
Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit	Aufreinigen von großen DNA-Fragmenten aus Gel	Zymo research (Cat. No.D4045)

2.1.7.2. Puffer für Enzymreaktionen

Tabelle 13: Puffer für Enzymreaktionen

Puffer	Funktion	Zusammensetzung (in 1x Konzentration)	Referenz
10x A-Puffer	Restriktionspuffer	33mM Tris-Acetat, 10mM Mg-Acetat, 66mM K-Acetat, 0,5 Dithiothreitol	Roche
10x B-Puffer	Restriktionspuffer	10mM Tris-Acetat, 5mM MgCl ₂ , 10mM NaCl, 1mM 2-Mercaptoethanol	Roche
10x H-Puffer	Restriktionspuffer	50mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 1mM Dithioerythritol	Roche
10x L-Puffer	Restriktionspuffer	10mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 1mM Dithioerythritol	Roche
10x O-Puffer	Restriktionspuffer	50mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 0.1mg/ml BSA (pH 7.5)	Fermentas
10x Tangopuffer	Restriktionspuffer	33mM Tris-Acetat, 10mM Mg-Acetat, 66mM K-Acetat, 0.1mg/ml BSA (pH 7.9)	Fermentas
10x Ligasepuffer	Ligasepuffer	66mM Tris-HCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 1mM ATP (pH 7,5)	Roche
10x Pfu-Puffer	PCR-Puffer	20mM Tris-HCl, 10mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA (pH 8,8), 10mM (NH ₄) ₂ SO ₄	Fermentas
10x Taq-Puffer	PCR-Puffer	100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl ₂ , (pH 8.3)	TaKaRa, Promega
10x SAP-Puffer	Puffer für Shrimp Alkaline Phosphatase	10mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 1mg/ml BSA (pH7,5)	Fermentas

2.1.7.3. weitere Puffer

Tabelle 14: Puffer für Elektroporation in *H. pylori*

Elektroporationspuffer	2,43mM K ₂ HPO ₄ , 0,57mM KH ₂ PO ₄ , 272mM
------------------------	---

	Saccharose, 15% Glycerin
PBS	0,2g/l KCl, 8g/l NaCl, 0,2g/l KH ₂ PO ₄ , 1,44g/l Na ₂ HPO ₄

Tabelle 15: Puffer für Kochpräparation

STET-Puffer	8 % Saccharose, 5 % Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl (pH 8,0)
-------------	---

Tabelle 16: Puffer für DNA-Elektrophorese

GEBS	50mM EDTA, 20 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) N-Laurylsarkosin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
1x TAE-Puffer	40mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7,5)
Ethidiumbromidbad	1 mg/l Ethidiumbromid in H ₂ O

2.1.7.4. Chemikalien

Agarose (Sigma), Ampicillin (Sigma), ATP (Roche), Bromphenolblau (Serva), Brucella-Medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), Chloramphenicol (Serva), Cholesterol (Gibco), n-Decanal (Sigma), Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat Mix (dNTPs) (Roche), Diaminopimelinsäure (DAP) (Sigma), EDTA (Sigma), Erythromycin (Sigma), Ethidiumbromid (Sigma), GC-Agar (Oxoid), Glycerin (Roth), Kanamycin (Merck), Lennox-L-LB-Agar (Invitrogen), Methylenblau (Serva), Streptomycin (Sigma), Trimethoprim (Sigma), Vancomycin (Sigma).

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

2.1.7.5. Molekulargewichtsmarker

Tabelle 17. verwendete Molekulargewichtsmarker

Name	Anwendung	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	DNA-Gelelektrophorese	MBI Fermentas

2.1.8. Verbrauchsmaterial

Eppendorfgefäße (Eppendorf)
Elektroporationsküvetten (Eurogenetec)
Falcon 15ml (Falcon, BD)
Falcon 50ml (Falcon, BD)
Glashomogenisatoren, unbeschichtet (Braun)
Injektionsnadeln (Braun)
Knopfkanüle, gebogen mit Spitzenolive (Acufirm)
Kryoröhrchen (Nalgene)
Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll)
Objektträger (Langenbrinck)
PCR-Gefäße (Life Science Products Brand)
Petrischalen (Greiner)
Photometerküvetten (Plastibrand)
Pipettenspitzen (Starstedt)
Spritze, 1ml (BD Plastipak)
Spritze, 50ml (Braun)
0,2 µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH)
Wattestäbchen, steril (Eurotubo)
well-Platten, durchsichtig (costar)
96-*well*-Platte, weiß (Greiner)

2.1.9. Geräte

Anaerobentöpfe (Fritz Gößner GmbH)
Agarosegelkammern (Bio-Rad)
Biolumineszenz-Plattenlesegerät Optima (BMG Labtech)
Gefrierschrank -20°C (Liebherr)
Gefriertruhe -80°C (Heraeus)
Gelelektrophoresesystem Mini-Protean III™ (Bio-Rad)
Gene Pulser (Bio-Rad)
Heizblock (Techne)

Inkubatoren

für *H. pylori* (Scholzen Mikroinkubator MI220; Binder)

für *E. coli* (Binder)

IVIS[®] lumina system (Xenogen, Calpiter)

Kühlschrank (Liebherr)

Magnetrührer (Heidolph)

Mikroskop (Leitz MDRD (Leica))

Mikrowelle (AEG)

Photometer (HACH)

Pipetten (Gilson: Pipetman)

Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D)

Schüttler (Eppendorf; Kertomat)

Schüttelinkubatoren (GFL)

Spannungsquellen (Biotec Fischer; Delta Elektronik),

Sterile Werkbank (BDK; Hera safe)

Thermocycler (Thermo Hybaid; Eppendorfer; PEQ Lab)

UV-Transluminator mit Photo-Geldokumentationsanlage (Bio-Rad)

Vakuumzentrifuge (Savant)

Vortex (Scientific Industries)

Waage (Fischer)

Wasserbad (GFL)

Wasserdampfhochdruckautoklaven Sterimaquet[™] (Maquet/Getinge, Rastatt, D)

Zentrifugen (Beckmann, Heraeus, Sorvall)

2.1.10. Mongolische Wüstenrennmäuse als Modeltiere

Für die *in vivo* Versuch wurden mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) verwendet. Die Gerbilinae (Rennmäuse) aus der Unterfamilie der Langschwanzmäuse sind vorwiegend in den trockenen und heißen Regionen Afrikas und Asiens beheimatet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere stammten aus hausinterner Züchtung des Max von Pettenkofer-Instituts oder aus Zukäufen über die Firma Janvier (Le Genest Saint-Isle, Frankreich). Die Haltung der mongolischen Rennmäuse erfolgt innerhalb

des Instituts nach dem Hygienemanagement der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) und folgt dabei prinzipiell den Vorgaben bei der Maushaltung (da die Gerbilinae nicht einzeln aufgeführt sind) und spezifisch pathogenfrei (SPF). Die verwendeten Räume dürfen nur mit Schutzkleidung betreten werden und die in den Versuchen benötigten Materialien haben steril bzw. autoklaviert zu sein. Alle Infektionen, sowie Probenentnahmen, an den Tieren werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Den Tieren steht Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung und die Haltungsbedingungen folgen einem 12h Licht/Dunkelheit -Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 21-22°C.

Infektionen im Gerbilmodell wurden durch den *H. pylori*-Stamm B8 (bzw. B128), einen Typ-I-Stamm oder mit von diesem Stamm abstammenden Mutanten durchgeführt.

Die Tierversuchsantragsnummer lautet AZ-55.2-1-54-2532-1-11.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von *E.coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde je nach Bedarf festes oder flüssiges LB-Medium benützt, welches gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt worden war. Das Wachstum erfolgte jeweils aerob bei 37°C in einem Brutschrank oder bei Flüssigkulturen in einem Schüttelinkubator bei 180-200rpm.

Zur Stammhaltung wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte genommen und in 0,5-1ml *E. coli*-Einfriermedium (LB-Flüssigmedium und 20% Glycerin) in einem Kryoröhrchen resuspendiert. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

2.2.1.2. Kultivierung und Stammhaltung von *H. pylori*

Zur Kultivierung von *H. pylori* wurden entweder Serumplatten aus GC-Agar (+ 10 ml/l Vitamin-Mix*, 80 ml/l Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprin, 1 mg/l Nystatin, gegebenenfalls mit bestimmten Antibiotika) oder BB-Flüssigmedium mit 10% FCS verwendet. Die Inkubation erfolgte unter mikroaerophilen Bedingungen (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) bei 37°C im Brutschrank (Scholzen) oder in einem Anaerobentopf. Flüssigkulturen wurden unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Anaerobentopf bei 80rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Zur Stammhaltung wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte genommen und in einem Kryoröhrchen (Nalgene) in 0,5-1ml *Hpy*-Einfriermedium (BB mit 10% FCS, 20% Glycerin) resuspendiert. Die Bakterien wurden dann bei -80°C gelagert. Um wieder mit den eingefrorenen Bakterien arbeiten zu können, wurden diese mit einer sterilen Impföse auf die jeweilig nötige Platte gestrichen und 48h bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert.

Nach ein- bis zweimaligem Passagieren der Bakterien auf neue Platten konnten dann Experimente durchgeführt werden.

2.2.1.3. Messen der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Um die Dichte von Bakterien in einer Suspension zu eruiieren, wurde die optische Dichte derselben bestimmt. Dazu wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte genommen und in BB mit 10% FCS oder 1xPBS suspendiert. Bei Flüssigkulturen wurde ein Aliquot genommen. Dann wurde eine 1/100 Verdünnung in eine Kunststoffküvette in ein Spektralphotometer gegeben und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ gegen einen Leerwert gemessen.

2.2.2. Genetische und molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Analytische und präperative Gelelektrophorese von DNA

Zur Gelelektrophorese von DNA würde ein 1% Agarosegel mit 1,1g Agarose und 110ml 1xTAE-Puffer hergestellt. Dazu wurden die zwei Komponenten gemischt und in einer Mikrowelle erhitzt. Dann wurde das Gel mit den gewünschten Taschengrößen gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in eine Gelelektrophoresekammer gelegt. Bei der analytischen Elektrophorese wurden je 2 μ l der zu untersuchenden Proben mit GEBS vermischt und in die Taschen gegeben. Zusätzlich wurde ein Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder von MBI Fermentas) aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief dann bei 70V für 50min. Schließlich wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und dann mithilfe eines UV-Transluminators betrachtet. Sollten DNA-Fragmente mithilfe der Elektrophorese aufgereinigt werden ließ man die Elektrophorese 120min bei 70V laufen und färbte dann das Gel mit 0,1% Methylenblau. Die gewünschte Bande konnte dann nach Entfärben des Gels mit Wasser ausgeschnitten und durch die jeweils passenden Kits aufgereinigt werden.

2.2.2.2. Aufreinigen von DNA aus enzymatischer Reaktionen und Agarosegel

Zur Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen und aus Agarosegel wurde der *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von GE Healthcare bzw. das *Wizard SV Gel and PCR clean-up System* von Promega bzw. der *QIAquick Gel Ectraction Kit* von Qiagen nach Herstellerprotokoll eingesetzt und mit 30-50µl nukleasefreiem Wasser eludiert.

Handelte es sich um besonders große DNA-Fragmente wurde der *Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit* von Zymo research verwendet.

Um entsprechende Banden aus dem Agarosegel ausschneiden zu können, wurde das Gel vor der Aufreinigung mit Methylenblau (0,1%) gefärbt.

2.2.2.3. Restriktionsenzymverdau

Zur Restriktion von dsDNA wurden die benötigten Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben (Roche, NEB, Fermentas) mit den zugehörigen Puffern und unter den vorgegebenen Inkubationsbedingungen verwendet. Wenn bei einer Reaktion zwei Enzyme mit unterschiedlichen Puffern benötigt wurden, wurde das System nach Reaktion mit dem ersten Enzym nach Herstellertabelle umgepuffert und das zweite Enzym dazugegeben. War eine Umpufferung nicht möglich wurde zwischen dem Verdau durch Enzym eins und zwei das Reaktionsgemisch mit Hilfe der oben genannten kommerziell erhältlichen Kits nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.2.2.4. Dephosphorylierung

Wenn Vektor-DNA mit einem Restriktionsenzym aufgeschnitten wurde, dann wurde dieselbe nach der Restriktion mit Alkalische Phosphatase (SAP; *shrimp alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Dadurch sollte die Religationsrate des Vektors verringert oder gänzlich verhindert werden. Dazu wurde der Ansatz direkt mit 1:10 SAP-Puffer und 1U/µg(DNA) SAP versehen und für 45 min bei 37°C inkubiert. Am

Schluss wurde das ganze durch die entsprechenden Aufreinigungskits nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.2.2.5. Ligation

Zur Ligation eines gewünschten DNA-Fragments mit einem Vektor wurden standardmäßig 25ng Plasmidbackbone eingesetzt und 5mal mehr Fragmentmoleküle. Hierbei wurde folgende Formel verwendet (nach Mulhardt, 2009):

$$\text{Vektor [ng]} = \text{Vektor[ng]} \times 5 \times (\text{Länge des Fragments[bp]} / \text{Länge des Vektors[bp]})$$

Nach Zugabe von T4-DNA-Ligase, Ligasepuffer und gegebenenfalls nukleasefreiem Wasser wurde der meist 10 bis 12 µl messende Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.2.6. Polymerase chain reaction (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA *in vitro* wurde die von Kary Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Diese Methode folgt nachfolgenden Prinzipien: DNA wird in einem ersten Denaturierungsschritt aufgeschmolzen, sodass sie als Einzelstrang vorliegt. Dann wird im sogenannten *Annealings*schritt der Ansatz abgekühlt, wobei dadurch speziell synthetisierte Primer an die jeweilige Einzelstrang-DNA (*Template*) binden können. Bei diesen Primer handelt es sich um Oligonukleotide (meist 18-25 bp), welche komplementär zur Anfang- und Endsequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts synthetisiert worden sind. Das Binden der Primer erlaubt die Anlagerung einer hitzestabilen Polymerase, welche nun ausgehend vom jeweiligen Primer mit Hilfe von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) den zweiten Strang in 5'-3' Richtung synthetisiert, sodass nach Abschluss des Elongationsschritts wieder Doppelstrang-DNA vorliegt. Diese DNA wird in einem weiteren Denaturierungsschritt wieder aufgeschmolzen und der Zyklus beginnt von neuem. Durch dieses Verfahren erreicht man eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments.

Für die durchgeführten PCRs wurden als Ausgangsmaterial Plasmid-DNA (1:10-Verdünnung) oder chromosomale DNA (1:20-Verdünnung) eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug entweder 50 oder 25 µl. Der gesamte Ansatz wurde auf Eis hergestellt und bis zur Überbringung in den Thermozykler auf Eis gekühlt.

Wenn das zu amplifizierende DNA-Fragment zur Klonierung eingesetzt werden sollte, wurde die Polymerase TaKaRa[®]-*Taq* der Firma Promega mit dem dazugehörigen 10xPuffer eingesetzt. Denn diese Polymerase besitzt dank einer 3'-5'-*Exonuklease*-Aktivität eine Korrekturaktivität (*proofreading*) und gewährleistet somit eine geringerer Fehlerwahrscheinlichkeit. Die relativ hohe Prozessivität d.h. die Anzahl an Nukleotide, die die TaKaRa[®]-*Taq*-Polymerase an das 3'-Ende der DNA binden kann bevor sie wieder abdiffundiert, spiegelt sich in einer raschen Synthesegeschwindigkeit von 1-2 kb pro Minute wieder.

Sollten DNA-Fragmente für analytische Zwecke amplifiziert werden, so wurde mit der *Taq*-Polymerase PAN der Firma Promega und dem dazugehörigen Puffersystem gearbeitet.

Die Dauer der Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der Prozessivität der verwendeten DNA-Polymerase. Um den Erfolg der PCR zu überprüfen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Tabelle 18: PCR-Ansätze für TaKaRa und PAN

Ansatz mit Polymerase TaKaRa [®] - <i>Taq</i> (50µl Endvolumen)	Ansatz mit <i>Taq</i> -Polymerase PAN (50µl Endvolumen)
1µl Template-DNA	1µl Template-DNA
50pmol je Primer (0,5µl)	50pmol je Primer (0,5µl)
5µl 10xPolymerasepuffer	5µl 10xPolymerasepuffer
80nmol dNTP (8µl von 10mM dNTP-Mix)	50nmol dNTP (5µl von 10mM dNTP-Mix)
125nmol MgCl ₂ (5µl von 25mM MgCl ₂)	75nmol MgCl ₂ (3µl von 25mM MgCl ₂)
2U TaKaRa	2U <i>Taq</i> -PAN

Tabelle 19: PCR-Programme für TaKaRa und PAN

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Initiale-Denaturierung	94°C	10min	1x
Denaturierung	94°C	30s	30x
<i>Annealing</i>	52°C	30s	
Elongation	68°C (TaKaRa) 72°C (PAN)	2000kb/min (TaKaRa) 1000kb/min (PAN)	
Finale-Elongation	68°C 72°C	bzw. 10min	1x
<i>Storing</i>	10°C		

2.2.2.7. Overlap-PCR

Zur Einfügung von Punktmutationen z.B. um Restriktionsenzymchnittstellen zu entfernen wurde die *overlap*-PCR verwendet (s. auch Abb. 8). Dazu wurden zwei Primer synthetisiert, die die gewünschte Punktmutation enthielten, sich in einem Bereich von mind. 20bp überlappten und gegenläufige Orientierung besaßen. Dann wurden zwei voneinander unabhängige PCRs durchgeführt mit jeweils einem der Primer, der die Mutation enthielt, und einem entgegengesetzten, das gewünschte DNA-Fragment flankierenden Primer. Die bei diesen Reaktionen entstehenden Fragmente wurden in einer weiteren PCR für 10 Zyklen mit verlängerter Annealingzeit von 1min gleichzeitig als Primer und Template eingesetzt. Nach Beendigung der 10 Zyklen wurden Primer, welche das gewünschte ganze Fragment flankierten, zum Reaktionsansatz dazugegeben und noch einmal 20 PCR-Zyklen durchgeführt. Dies geschah um die Menge des Endprodukts zu erhöhen.

Mithilfe dieser Technik konnten gezielt einzelne Punktmutationen eingefügt werden, welche mittels Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese überprüft werden konnten.

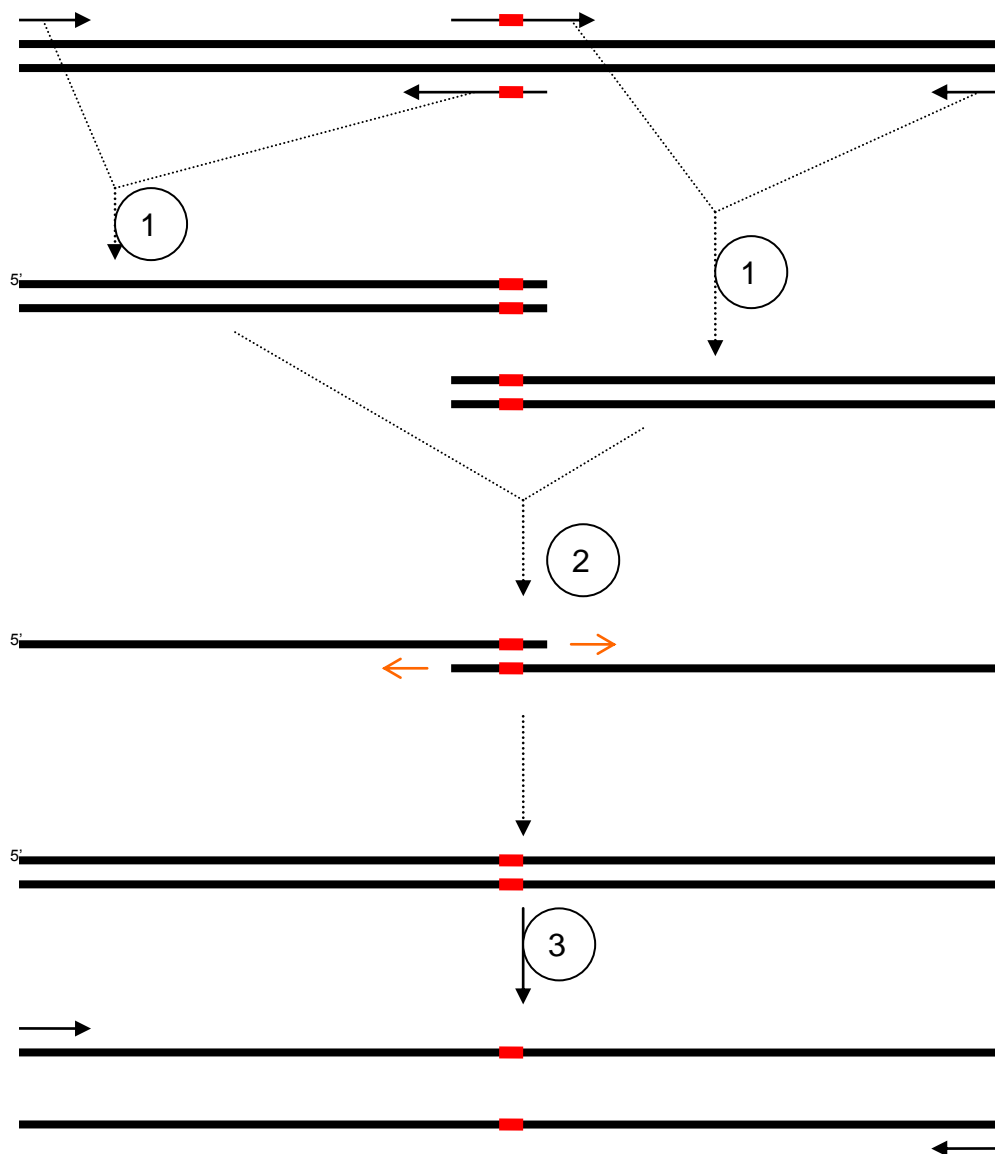


Abbildung 8: Durchführung einer *overlap*-PCR

1.) Durchführen von zwei standardisierten PCRs mit Primer, die die gewünschte **Mutation** enthalten, und jeweils einem flankierenden Primer (schwarze Pfeile); 2.) *Overlap*-PCR ohne Primer nur mit *Annealing* der beiden sich überlappenden Fragmente für 10 Zyklen (die orangenen Pfeile geben die Syntheserichtung der DNA-Polymerase an); 3.) Zugabe von flankierenden Primern (für 20 Zyklen) zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts

Tabelle 20: PCR Programm für *overlap*-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Initiale Denaturierung	94°C	10min	1x
Denaturierung	94°C	30s	10x
Annealing	52°C	60s	

Elongation	68°C	2000kb/min (TaKaRa)	
„Finale Elongation“	68°C	10min	1x
Zugabe von 50pmol je flankierender Primer			
„Initiale Denaturierung“	94°C	10min	1x
Denaturierung	94°C	30s	20x
Annealing	52°C	60s	
Elongation	68°C	2000kb/min (TaKaRa)	
Finale Elongation	68°C	10min	1x

Tabelle 21: Ansatz für *overlap*-PCR

Ansatz für <i>overlap</i> -PCR (50µl Endvolumen)
50nmol Fragment 1
50nmol Fragment2
5µl 10xPolymerasepuffer
80nmol dNTP (8µl von 10mM dNTP-Mix)
125nmol MgCl ₂ (5µl von 25mM MgCl ₂)
2U TaKaRa [®] - <i>Taq</i> -Polymerase
Nach 10 Zyklen: + 50pmol je Primer (0,5µl)

2.2.2.8. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um eine Hybridisierung von Oligonukleotiden zu erreichen, wurden die entsprechenden Oligonukleotide mit sense- und antisense-Sequenz des gewünschten DNA-Fragments bei Biomers (Ulm) bestellt. Dann wurden 200pmol je Oligonukleotid mit 3µl 10xLigasepuffer, 2µl Kinase und 3µl ATP(1mM) versetzt und das Gemisch mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 30µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 45min inkubiert und dann für 10min bei 95°C im Wasserbad gekocht. Danach ließ man das Wasserbad langsam auf 45°C abkühlen

ohne den Ansatz herauszunehmen. Waren 45°C erreicht, wurde der Ansatz noch 15min bei 45°C inkubiert.

Als Nächstes folgte die saure Ethanolfällung der DNA. Dabei wurden zum Ansatz das 2,5fache Volumen 100% Ethanol und ein Zehntel Volumen Na-Acetat (3M, pH=4,7) hinzugegeben und das ganze für 30min bei -70°C gekühlt. Die dadurch ausgefallene DNA wurde durch eine dreißigminütige Zentrifugation auf höchster Stufe zu einem Pellet geformt, welches einmal mit 70% Ethanol gewaschen und dann schließlich in einer Vakuumzentrifuge getrocknet wurde. Das trockene Pellet wurde dann in 15µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

2.2.2.9. Isolation von Plasmid-DNA

2.2.2.9.1. Plasmid-Präparation aus *E. coli* mit Kits

Zur sauberen Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* wurde der *QIAamp DNA Mini Kit* der Firma QIAGEN gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Handelte es sich um sehr große Plasmide (>10kb) wurde alternativ der *ZR BAC DNA Miniprep Kit* von Zymo research angewandt. Eluiert wurde am Ende beider Protokolle mit 30-50µl nukleasefreiem Wasser.

2.2.2.9.2. Plasmid-Präparation aus *H. pylori* mit Kits

Um Plasmide aus *H. pylori* zu isolieren wurde der *Wizard Plus SV Miniprep Kit* von Promega gemäß dem Benutzerprotokoll durchgeführt.

2.2.2.9.3. Kochpräparation

Eine kostengünstigere Methode zur Isolierung von Plasmiden ist die so genannte Kochpräparation nach Holmes und Quigley. Diese wurde eingesetzt, wenn Klone

lediglich auf ihre Richtigkeit überprüft wurden und somit keine allzu saubere Plasmid-Präparation nötig war.

Bei dieser Methode wurden die entsprechenden *E. coli*, nachdem sie über Nacht auf ein sechstel einer Agarplatte gewachsen waren, mit einer sterilen Impföse aufgenommen und in STET-Puffer (8% Saccharose, 5% Triton X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Dem Gemisch wurden 15µl Lysozymlösung zugegeben (10mg/ml in STET-Puffer gelöst) und das Ganze für 5 Minuten auf Eis gelagert. Dann wurde das Gemisch für 1 Minute bei 95°C gekocht, um die Zellstruktur aufzubrechen. Zur Entfernung der Zelltrümmer und der chromosomalen DNA wurde die Suspension 15min bei 13000rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Nun wurden 200µl Isopropanol hinzugegeben und das Gemisch für 20min bei -20°C inkubiert, um die DNA zu fällen. Nach 10min Zentrifugation bei 13000rpm wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet in 400µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die Suspension wurde nun ein weiteres Mal 5min bei 13000rpm zentrifugiert, der Überstand erneut entfernt und das Pellet mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge getrocknet, um es schließlich in 30-50µl sterilem Wassers zu lösen.

2.2.2.9.4. Isolierung von genomischer DNA aus *H. pylori*

Zur Isolation von genomischer DNA aus *H. pylori* wurde der *QIAamp DNA Mini Kit* von Quiagen nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.10. Transformation in chemokompetente *E. coli*

Um chemisch kompetente *E. coli* herzustellen wurde die Rubidium-Chlorid-Methode verwendet. Dabei wurden zuerst 100ml LB-Medium mit *E. coli* aus einer Übernachtskultur geimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,6 bei 37°C und 180rpm inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension für 30min auf Eis gekühlt und schließlich mit 4000rpm für 15min bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 40ml steril-filtriertem TFB I (30mM Kaliumacetat CH₃COOK, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,2 (durch 0,2M CH₃COOH))

gelöst. Nach 5min auf Eis wurde der Ansatz noch einmal zentrifugiert und das Zellpellet schließlich in 4 ml steril-filtrierte TFB II (10mM MOPS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl; 15 % (v/v) Glyzerin; pH 6,5 (durch KOH)) resuspendiert. In 50µl-Aliquots wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schock-gefroren. Danach wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein 50µl-Aliquot aus der Lagerung genommen und sofort auf Eis gestellt. Dann wurden 5µl des gewünschten Ligations-Ansatzes dazugegeben und das ganze 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 90s wurde die Zellsuspension noch einmal für 1min auf Eis gestellt, dann mit 1ml LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 180rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Suspension 5min bei 4000rpm zentrifugiert und auf die benötigte Selektivplatte ausplattiert. Die Platte wurde dann bei 37°C inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu steigern, wurde in seltenen Fällen bei 18-22°C über 48h inkubiert.

2.2.2.11. Transformation in Top10 Zellen

Bei schwierigen Klonierungen wurde für eine bessere Transformationseffizienz kommerziell erworbene, hochkompetente *E. coli* Top10 (Invitrogen) verwendet. Dabei erfolgte die Transformation nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2.12. Transformation in *Helicobacter pylori*

Unbehandelte *Helicobacter pylori* aus einer Übernachtskultur wurden mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens von der Platte genommen und in 1ml BB mit 10% FCS resuspendiert. In einer 12- bzw. 24-*well*-Platte wurde in einer Gesamtmenge von 1 ml eine OD₅₅₀ von 0.2 eingestellt und diese Platte für 1-2 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Dann wurde 1µg Plasmid-DNA hinzu gegeben und das Ganze noch einmal 4-6h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Bakterien-Gemisch in ein 1ml-Eppendorfgefäß umgefüllt und bei 4000rpm 5min zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde

in 100µl des Überstands resuspendiert und die Suspension auf entsprechende Selektivplatten ausplattiert.

2.2.2.13. Elektroporation in *Helicobacter pylori*

Mit einem sterilen Wattestäbchen wurden *Helicobacter* von der Platte einer Übernachtskultur genommen und in 1ml sterilem 1xPBS resuspendiert. Mithilfe des Photometers wurde eine OD₅₅₀ von 1 in 1ml Volumen eingestellt. Nach Zentrifugation bei 3000rpm für 5 min wurde das Zellpellet in 500µl 1xPBS gewaschen. Dann wurde erneut zentrifugiert (3000rpm, 5min) und schließlich das Zellpellet in 500µl Elektroporationspuffer (2,43mM K₂HPO₄; 0,57mM KH₂PO₄; 272mM Saccharose; 15% Glycerin) gewaschen. Das durch Zentrifugation (3000rpm, 5min) entstehende Bakterienpellet wurde nun in 40µl Elektroporationspuffer resuspendiert, 1-2 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA zugegeben und die Suspension in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte in einer Gene Pulser™ Apparatur bei 2,5kV, einer Kapazität von 25µF und einem Widerstand von 200Ω. Unmittelbar nach der Pulsgabe wurde je Ansatz 1ml BB mit 10% FCS hinzugegeben und das Ganze in eine 12-well-Platte überführt, welche für 4h bei 10% CO₂ und 37°C inkubiert wurde.

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension bei 4000rpm 5min zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in ca. 100µl des Überstands resuspendiert und auf die jeweilige Selektivplatte ausplattiert. Die Platten wurden für 5-7 Tage unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert.

2.2.2.14. Generierung markerfreier *H. pylori* Mutanten

Zur Generierung von markerfreien *H. pylori* Mutanten wurde die Kontra-Selektionsstrategie nach Dailidiane *et al.* 2006 angewandt. Dazu wurde in den gewünschten Locus eine *rpsL-erm*-Kassette inseriert. Diese Kassette ist gegenüber dem *rpsL*-Wildtypgen dominant, d.h. ein Streptomycin-resistenter *H. pylori*-Stamm, welcher eine Punktmutation innerhalb des chromosomalen *rpsL*-Gen trägt, wird durch Transformation der *rpsL-erm*-Kassette Streptomycin-sensitiv (*rpsL*) und

gleichzeitig gegenüber Erythromycin (*erm*) resistent. Somit ist nach Transformation der *rpsL-erm*-Kassette eine Selektion auf Erythromycin möglich.

Nun kann eine Transformation mit einem Plasmid durchgeführt werden, welches zwischen den flankierenden Bereichen des gewünschten Lokus eine bestimmte DNA-Sequenz enthält. Wird diese inseriert fällt die *rpsL-erm*-Kassette heraus und der *H. pylori* ist wieder Streptomycin-resistent und Erythromycin-sensitiv.

2.2.3 Biolumineszenz Bildgebung

2.2.3.1. Biolumineszenz Plattenlesegerät

Zur Darstellung und Messung von Biolumineszenz von Bakterien wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattetupfer von der Platte einer Übernachtskultur genommen und in Flüssigmedium (BB mit 10% FCS für *H. pylori*; LB für *E. coli*) resuspendiert. Dann wurde eine Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte bei 550nm von 1 bzw. 0,2 hergestellt. Von dieser Suspension wurden in eine weiße 96-well-Platte je 30, 40, 50, ... 100µl gegeben. Handelte es sich um Bakterien, die nur das *luxAB* Gen besaßen also zur Biolumineszenz die Zugabe von n-Decanal benötigten, wurden die jeweiligen Volumina in den einzelnen *wells* auf 100µl mit Medium aufgefüllt. Dann wurde in diesem Fall nach einer Messung der Platte im Biolumineszenz-Plattenlesegerät Optima (BMG Labtech) 30µl n-Decanal-Lösung (0.05% n-Decanal in PBS) dazugegeben und nach 5min erneut gemessen. Besaßen die Bakterien das gesamte *Lux*-Operon wurde die Platte ohne Zugabe von n-Decanal gemessen. Als Negativkontrolle dienten Bakterien ohne (vollständiges) *Lux*-Operon und Medium ohne Bakterien. Die jeweiligen *H. pylori*-Suspensionen in den 96-well-Platten wurden vor der Messung 1 bis 2 h in einem CO₂-Schrank bei 10% CO₂ und 37°C inkubiert. Da die benützte Luciferase ein Optimum bei 37°C besitzt musste allgemein darauf geachtet werden, dass die Bakteriensuspension vor der Messung nicht zu stark auskühlte. Allerdings differierten die erhaltenen Messwerte innerhalb einer Messreihe so stark z.B auch in Abhängigkeit von Kulturalter der jeweiligen Bakterienstämme, sowie dem zeitlichen Abstand zwischen Entnahme der Bakterien aus dem Inkubator und der Messung, dass die hierbei erhaltenen Daten nur relative

Messwerte zum Vergleich der einzelnen Stämme unter zum jeweiligen Zeitpunkt gleichen Bedingungen darstellen. Die Messung (in *relative luminescence units* (RLU)) wurde mit einer Expositionszeit von 0,5s pro *well* durchgeführt.

2.2.3.1. IVIS[®] lumina System zur Biolumineszenz Bildgebung

Zur Darstellung und Messung von Biolumineszenz von Bakterien im Tiermodell oder auf einer Agarplatte wurde das IVIS[®] lumina System von Xenogen verwendet. Dieses System besteht aus einer lichtundurchlässigen Kammer mit einer speziellen CCD-Kamera und einem Computer. Um die Biolumineszenz eines Gegenstandes zu detektieren wurde derselbe in die Kammer gelegt und eine geeignete Expositionszeit (meist unter 1min bei Platten; im Tierversuch 1-5min) nach der zu erwartenden Intensität der Biolumineszenz eingestellt. Dann folgt die Messung: hierbei wurde zuerst eine Schwarzweißaufnahme des Gegenstandes in der Kammer am Computer generiert und nach Ende der Expositionszeit ein Bild der Biolumineszenz in Pseudofarben darüber projiziert. Dieses Bild gab sowohl über die Lokalisation als auch über die Stärke der Biolumineszenz Auskunft. Anhand von ROI-Messungen (*Region of interest*) konnten genaue Angaben über die emittierten Photonen pro cm² in einem bestimmten Bereich gegeben werden.

2.2.4 Arbeiten im Tiermodell

2.2.4.1 Infektion der Tiere

Die Infektion der mongolischen Wüstenrennmäuse mit *H. pylori* wurde oral am wachen Tier durchgeführt. Indem auf eine Narkose verzichtet wurde, konnte die schmerzlose Prozedur schnell und mit möglichst wenig Stress für die Tiere vor sich gehen. Die Tiere wurden am Schwanzansatz gehalten, aus dem Käfig genommen und dann durch Greifen des Rückenfalls in der Hand fixiert. Über eine gebogene Knopfkanüle wurde die Bakteriensuspension direkt in den Magen gegeben. Dabei sollte die Kanüle passiv über die Schluckbewegungen des Gerbils in den Ösophagus

gleiten und auf keinen Fall durch Gewalt in die Speiseröhre gezwungen werden. Zur Infektion wurden 1×10^9 *H. pylori* in einem Gesamtvolumen von 400 μ l BB-Medium an zwei Tagen verabreicht.

2.2.4.2 Anästhesie

Um zu gewährleisten, dass die Tiere regungslos liegen blieben und somit eine Messung der Biolumineszenz mithilfe des IVIS[®] lumina Systems möglich wurde, wurden die Versuchstiere sediert. Dabei wurde den Tieren zuerst eine gewichtsadaptierte Verdünnung Hellabrunner Mischung (9mg/kg Xylazin und 7,5mg/kg Ketamin) in den *Musculus triceps surae* gespritzt. Dann wurden die schon benommenen Tiere in die Isofluran-Kammer des IVIS[®] lumina Systems gelegt und nach ca. 3 min in die Dunkelkammer überführt, wo sie mithilfe des Narkosesystems in der Kammer über ein Schlauch-Ende an der Schnauze weiter mit Isofluran versorgt wurden. Die Inhalationsnarkose wurde mit 1,5 bis 2,0 Volumenprozent Isofluran aufrechterhalten bei einem inspiratorischen Sauerstofffluss von 0,35l/min. Nach der Messung wurden die Tiere wieder in ihren Käfig gelegt und ihr Aufwachen aus der Narkose überwacht.

2.2.4.3 Tötung der Tiere und CFU-Bestimmung

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheit (CFU = „*colony forming unit*“) wurden die Versuchstiere mindestens 3 Wochen nach der Infektion getötet. Dazu wurden die Tiere nacheinander in einen mit CO₂ gefüllten Container gelegt, welcher noch zusätzlich mit CO₂ begast wurde, und ca. 3 min dem Gas ausgesetzt. Nach Überprüfung der Vitalfunktionen und Sicherstellung des Todes wurden die Versuchsobjekte auf eine Styroporplatte mittels Kanülen befestigt, mit einem V-förmigen Schnitt das Abdomen geöffnet und der Magen entnommen. Dieser wurde an der großen Krümmung der Länge nach eröffnet und mit 1xPBS gespült. Schließlich wurde der Magen auf eine mit Parafilm abgedeckten Wachsplatte mit Kanülen aufgespannt, das noch vorhandene Plattenepithel entfernt und das Organ grob zerkleinert in 1ml BB-Medium übertragen. Mithilfe eines autoklavierten,

unbeschichteten Glashomogenisators wurden die Magenteile dann zermahlen. Abschließend wurden 100µl einer 1:100 Verdünnung der entstandenen Suspension auf eine Streptomycin-haltige Platte ausplattiert und die Platte für 3-5 Tage bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Mit Hilfe des Magengewichts und der gewachsenen Kolonien konnte dann die cfu/g Gewebe errechnet werden.

3. Ergebnisse

3.1. Konstruktion eines biolumineszierenden *Helicobacter pylori*

Um einen biolumineszierenden *H. pylori* herzustellen wurde das *Lux*-Operon von *Photorhabdus luminescens* verwendet. Dieser ca. 5800bp große DNA-Abschnitt enthält 5 Gene *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* und *luxE* und ist im Vektor pJT*luxCDABE*-cm enthalten (siehe Abb.9).

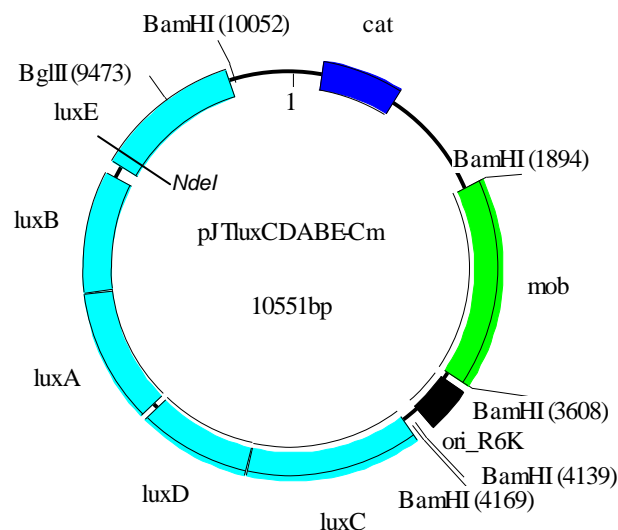


Abbildung 9: pJT*luxCDABE*-cm

Das Plasmid enthält das in dieser Arbeit verwendete *Lux*-Operon von *Photorhabdus luminescens* und stellt den Ausgangspunkt der ausgeführten Klonierungen da. (Abbildung und Plasmid bezogen von Arbeitsgruppe Heesemann)

Da die Klonierungsstrategien eine *NdeI* Schnittstelle am 5'-Ende des *Lux*-Operons vorsahen, war es nötig eine sich innerhalb des *Lux*-Operon befindende *NdeI* Schnittstelle bei ca. 4700bp (siehe Abb.9 und 10) per *overlap*-PCR zu entfernen. Dies war auch deshalb erforderlich, da eine Strategie, welche vorsah das durch *NdeI*-Verdau entstehende kleine (*NdeI/NdeI*) und große (*NdeI/KpnI*) Fragment des *Lux*-Operon nacheinander in den Vektor (pSP77) zu klonieren gescheitert war: Es gelang zwar das kleine Fragment in den Vektor zu klonieren, allerdings konnte das

große Fragment auch nach mehrfachen Versuchen nicht inseriert werden. Deshalb wurde die *NdeI*-Schnittstelle mittels *overlap*-PCR entfernt.

```

... ATG AAG GGT ATA AAA GAG TAT GAC AGC AGT GCT GCC ATA CTT TCT AAT ATT ATC
TTG AGG AGT AAA ACA GGT ATG ACT TCA TAT G GTT GAT ...
                                L mutiert zu TCG per overlap-PCR
  
```

Abbildung 10: Position der internen *NdeI*-Schnittstelle

ATG bezeichnet das Startcodon von *luxE*, dem letzten Gen im *Lux*-Operon. Die interne *NdeI*-Schnittstelle, welche durch *overlap*-PCR entfernt werden sollte, ist rot markiert

Hierzu wurde eine stille Punktmutation im 26. Codon nach dem Startcodon von *luxE* mit den Primern BE8 und BE9 eingefügt. Das betroffene Codon wurde von TCA nach TCG verändert und codierte somit weiterhin für ein Serin (s. Abb. 10). Der Verdau des in der *overlap*-PCR entstandenen Fragments mit *NdeI* zeigt, dass die *NdeI*-Schnittstelle innerhalb von *luxE* durch die *overlap*-PCR eliminiert werden konnte (s. Abb.11).

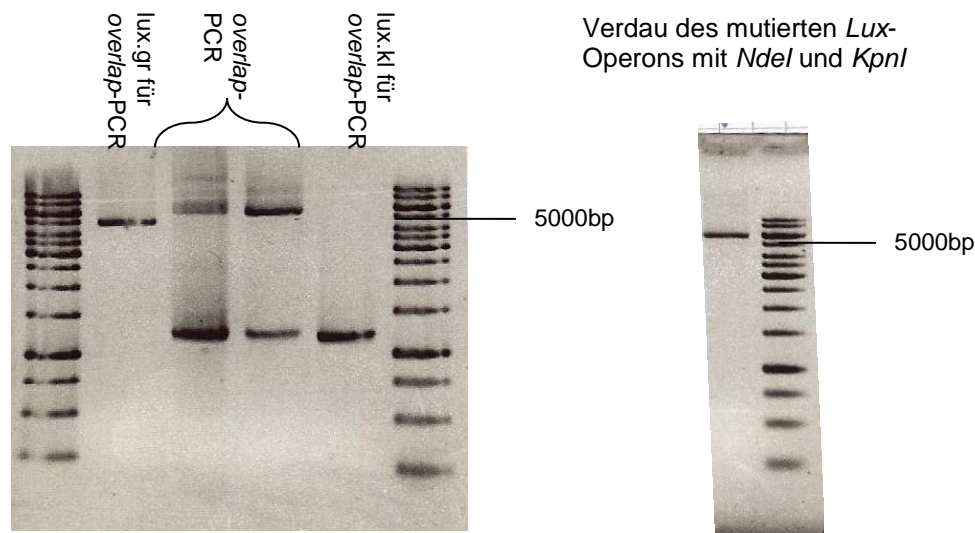


Abbildung 11: *Overlap*-PCR an *Lux*-Operon zur Entfernung der internen *NdeI*-Schnittstelle

Die linke Elektrophorese zeigt aufgetragen das große *Lux*-Operon- (*lux_NdeI_s* und BE9) und das kleine *Lux*-Operon-Fragment (BE8 und *lux_KpnI_as*). Die mittleren Bande entstanden bei der *overlap*-PCR mit den beiden *Lux*-Operon-Fragmenten. Man sieht eine Bande bei ca. 5800bp welche der Länge des ganzen *Lux*-Operon entspricht. Diese Bande wurde ausgeschnitten, aufgereinigt und die DNA mit *NdeI* und *KpnI* verdaut. Auf der rechten Seite ist der Verdau des *Lux*-Operons nach *overlap*-PCR (*luxCDABE-mut*) aufgetragen: *NdeI* schneidet nicht mehr innerhalb des *Lux*-Operon. Die Entfernung der *NdeI*-Schnittstelle ist erfolgt. Das Fragment, im folgenden *luxCDABE-mut* genannt, wurde nun in pSP77 kloniert.

Das so mutierte *Lux*-Operon (*luxCDABE-mut*) stand nun für diverse Klonierungen zur Verfügung, welche nun im Folgenden erläutert werden sollen. Dabei unterschieden

sich die einzelnen Strategien im Template (ganzes *Lux*-Operon oder *luxAB* und *luxCDE* getrennt), im Rekombinationsort (Chromosom oder Plasmid) und im Rekombinationsort innerhalb des Chromosoms (*moeB*-, *TrpA*-Lokus).

3.1.1. Integration des ganzen *Lux*-Operon in *H. pylori*

Vorteil des bakteriellen *Lux*-Operon ist, dass eine Aufnahme desselben zur Biolumineszenz des Empfängerbakteriums führt ohne dass Substrat hinzugefügt werden muss. Somit wurde in Anlehnung an diverse Arbeiten (siehe auch Contag et al, 1995) versucht das *Lux*-Operon in seiner Originalstruktur auf *H. pylori* zu übertragen d.h. *luxCDABE-mut* als Einheit.

3.1.1.1. Integration des ganzen *Lux*-Operon in das *H. pylori* Chromosom

Die Integration des *Lux*-Operon in das *Helicobacter pylori* Chromosom schien insofern von Vorteil, da dieses Konstrukt eine gewisse Stabilität verspricht. Zwar wird angenommen, dass auch das Plasmid pHel12 relativ stabil exprimiert wird, jedoch ist anzunehmen, dass sich eine chromosomale Expression von *luxCDABE* als widerstandsfähiger erweist (Andreu et al. 2010). Als Insertionsort wurde der *moeB*-Lokus, welcher für ein Molybdopterin-Biosynthese-Protein kodiert, oder der *TrpA*-Lokus, welcher für eine Tryptophan-Synthase kodiert, verwendet.

3.1.1.1.1. Verwendung des *moeB*- Lokus

Aufgrund der Daten von Kavermann et al. (2003) schien der *moeB*-Lokus innerhalb des *H. pylori* Chromosom passend für die Rekombination des *Lux*-Operons zu sein, da sein Genprodukt anscheinend keinen essentiellen Kolonisierungsfaktor (im Gerbilmodel) darstellt. Das Gen kodiert für ein Molybdopterin-Biosynthese-Protein und findet sich sowohl in dem *H. pylori* Stamm B8 als auch im Stamm P12 (siehe auch Abb. 12).

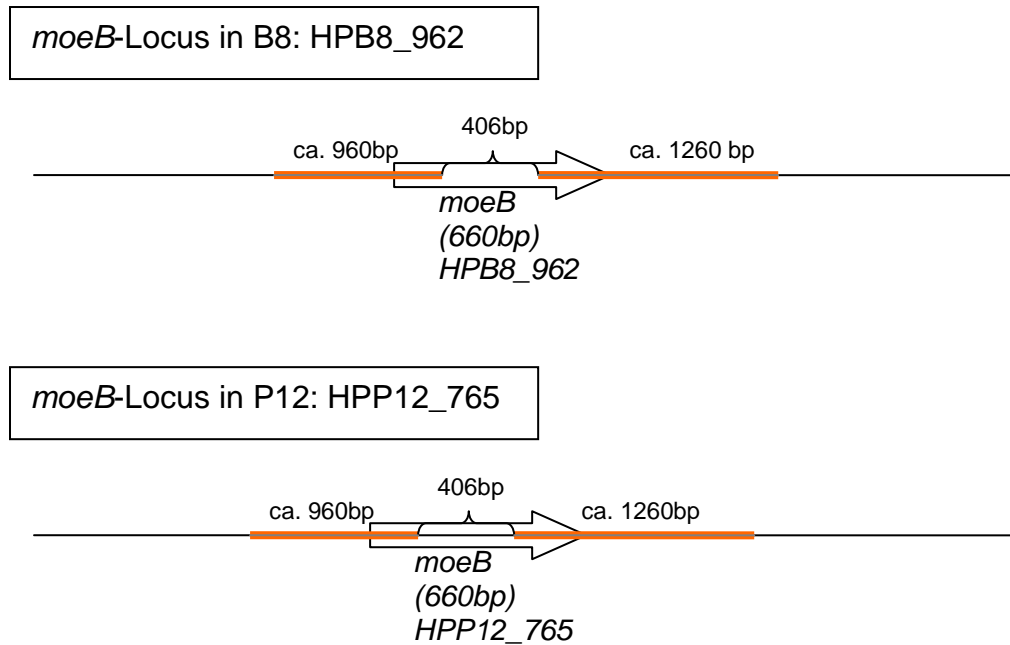


Abbildung 12: *moeB*-Lokus

Die Abbildung zeigt den *moeB*-Lokus der *H. pylori* Stämme B8 und P12, welcher als Insertionsort ausgewählt wurde. Orange eingefärbt sind die flankierenden Bereiche, welche homolog zum verwendeten Plasmid pSP77 (Abb. 13) sind und somit eine Rekombination zulassen.

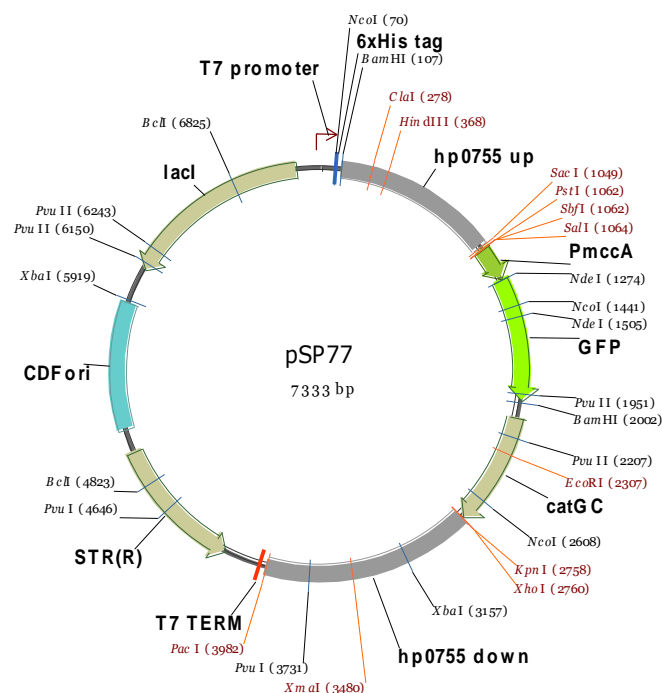


Abbildung 13: pSP77 - Plasmid zur Rekombination eines Inserts in den *moeB*-Lokus

Das Plasmid enthält flankierende Bereiche des *moeB*-Lokus des *H. pylori* Stammes 26695 (hp0755 down und hp0755 up). (Abbildung Sandra Praßl)

Zur Klonierung wurde der Vektor pSP77 verwendet (s. Abb. 13). Dieser Vektor enthält die flankierenden Bereiche des *moeB*-Lokus des *Helicobacter*-Stammes

26695, welche zu denen der Stämme B8 und P12 weitestgehend homolog sind. Zuerst wurde versucht eine *rpsL-erm*-Kassette in den *moeB*-Lokus zu inserieren, um dann mithilfe der Kontra-Selektionstechnik einen markerfreien biolumineszierenden *H. pylori* zu generieren. Als Vektor für die *rpsL-erm*-Kassette wurde das Vorläuferplasmid von pSP77, pSR20, verwendet, welches keinen *mcc*-Promotor besitzt. Mit den Primern BE1 und BE2 wurde die *rpsL-erm*-Kassette aus dem Plasmid pSR11 amplifiziert und über *Sall* und *KpnI* mit dem entsprechend verdauten Vektor pSR20 ligiert. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α konnten positive Kolonien gepickt und das Plasmid pBE1 aufgereinigt werden. Leider konnten trotz mehrfacher Transformation und Elektroporation in *H. pylori* (P12 und B8) keine *Helicobacter*-Transformanten hergestellt werden, sodass die Generierung eines markerfreien biolumineszierenden *H. pylori* mit diesem Konstrukt aufgegeben wurde.

Das mutierte *Lux*-Operon (ca. 5800bp) ohne interne *NdeI*-Schnittstelle (*luxCDABE-mut*) wurde über *NdeI* (*lux_NdeI_s*) und *KpnI* (*lux_KpnI_as*) mit dem entsprechend verdauten Vektor pSP77 (ca. 5800bp) ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die entstandenen Klone wurden durch *BamHI* Verdau überprüft und ihre Biolumineszenz über ein Biolumineszenz-Plattenlesegerät gemessen. Dabei zeigte Klon Nr. 5 die relativ beste Biolumineszenzrate (siehe Abb. 14), sodass mit diesem weitergearbeitet wurde.

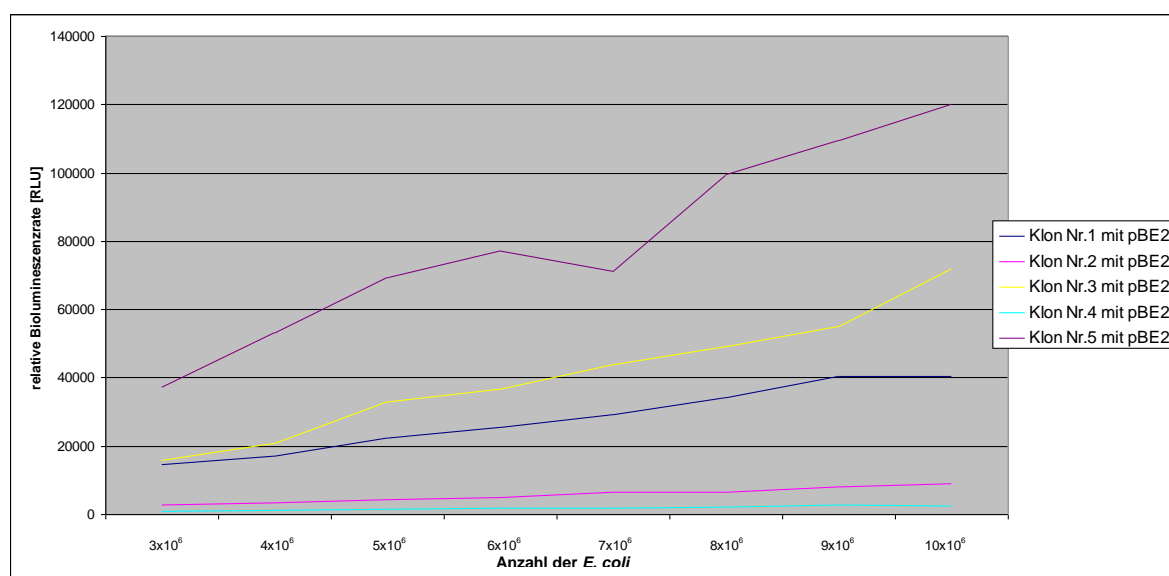


Abbildung 14: Biolumineszenz der DH5 α Klone mit pBE2

In PBS wurde von jedem *E. coli* Klon eine Suspension mit OD₅₅₀ 1 hergestellt, welche dann in verschiedenen Volumina auf eine weiße 96-well-Platte aufgetragen wurde. Zu Errechnung der Anzahl der *E. coli* wurde davon ausgegangen, dass bei DH5 α eine OD₅₅₀ von 1 einer Konzentration von ca. 10⁸ Bakterien/ml entspricht (Glover, 1995). Die Platte wurde mithilfe des Biolumineszenz-

Plattenlesegeräts bei einer Expositionszeit von 0,5s pro *well* ausgewertet: Als Negativkontrolle diente der *E. coli* Stamm E-10. Die auf der y-Achse aufgetragenen Biolumineszenzraten (in *relative luminescence units*) stellen aufgrund der ausgeprägten Abhängigkeit der Intensität der Biolumineszenz von Temperatur und Wachstumsphase der Bakterien keine absoluten Werte da, sondern sollen vor allem den Vergleich der einzelnen Klone unter gleichen Bedingungen gewährleisten.

Klon Nr. 5 zeigt die höchste Intensität an Biolumineszenz. Deshalb wurden für alle weiteren Klonierungen *luxCDABE-mut* aus Klon Nr. 5 verwendet.

Da die Kontra-Selektionsstrategie im vorhergehenden Experiment erfolglos geblieben war, wurde das Plasmid pBE2 des Klons Nr. 5 mit *SacI* vor dem *mcc*-Promotor geschnitten und eine *cat_{GC}*-Kassette (Cam^R) eingefügt, um auf die homologe Rekombination des Inserts in das *H. pylori* Chromosom über eine Antibiotikaresistenz selektionieren zu können. Die *cat_{GC}*-Kassette wurde mit den Primern SR118 und BE12 aus pHel2 amplifiziert. Nach der Transformation in Top10 wurde aus den entstandenen Kolonien das Plasmid (pBE3) isoliert und mit *SacI*-Verdau überprüft. Die Zellen wurden schließlich mit dem Biolumineszenz-Plattenlesegerät auf Biolumineszenz geprüft. Schließlich wurde das Plasmid pBE3 zur Transformation und Elektroporation von *Helicobacter pylori* P12 und B8 verwendet. Die Platten mit den *Helicobacter*kolonien wurden zur Detektion von Biolumineszenz in das IVIS[®] lumina System gelegt, sodass direkt an den Kolonien Biolumineszenz nachgewiesen werden konnte (s. Abb.15)

waren so konzipiert, dass durch ein Annealing derselben überhängende Enden entstanden, welche eine *AscI* und eine *NdeI*-Schnittstelle bildeten (siehe Abb.16) und somit die Ligation mit dem entsprechend verdauten Plasmid pBE3 erlaubten.

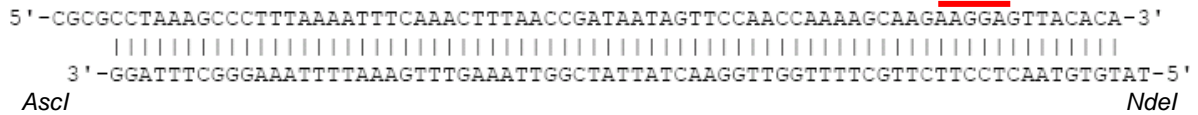


Abbildung 16: Herstellung des *flaA*-Promotors

Die Abbildung zeigt die beiden Oligonukleotide *flaA*-s (oben) und *flaA*-as (unten). Bei der Hybridisierung der beiden Oligonukleotide entstehen durch überhängende Enden eine *AscI*- und eine *NdeI*-Schnittstelle. Rot markiert ist die Shine-Delgarno-Sequenz.

Die Sequenz des *flaA*-Promotors wurde aus Leying *et al.* bezogen.

Somit konnte der *mcc*-Promotor durch den *flaA*-Promotor ausgetauscht werden. Der Ligationsansatz wurde in Top10-Zellen transformiert und die entstandenen Kolonien mithilfe des IVIS[®] lumina Systems auf Biolumineszenz geprüft. Um sicherzustellen, dass der *mcc*-Promotor wirklich entfernt worden war, wurden die isolierten Plasmide (pBE13) zusätzlich noch mit *Sall* verdaut.

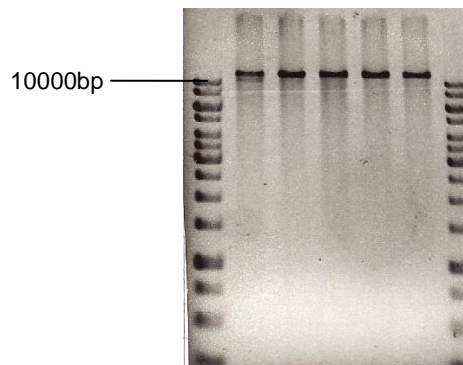
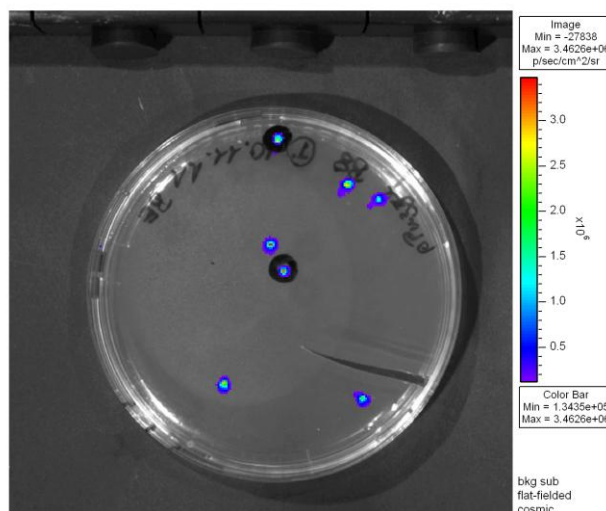
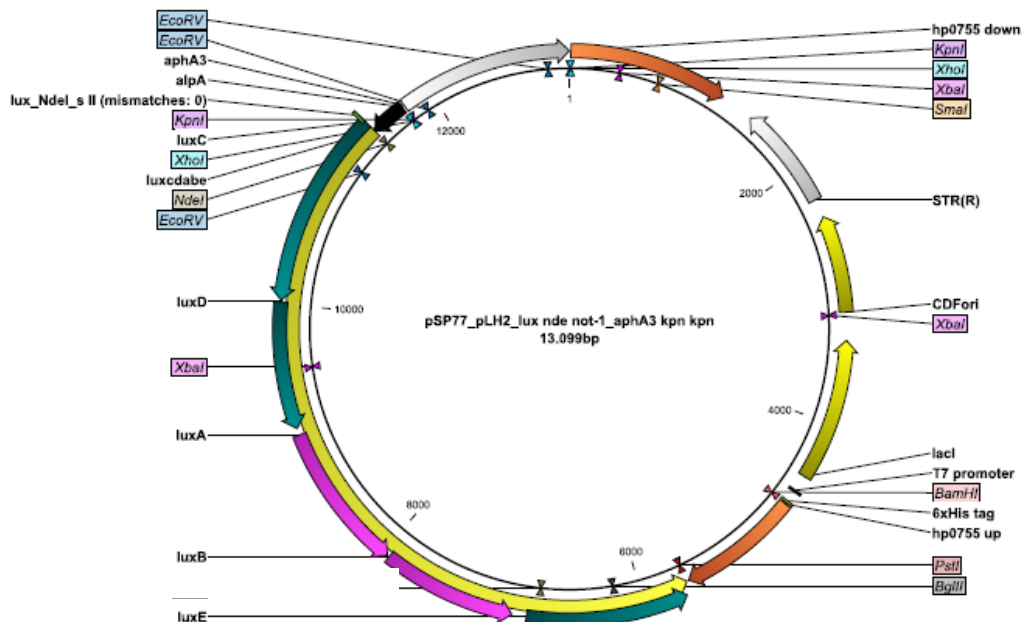


Abbildung 17: Verdau des Plasmids pBE13 mit *Sall*

Der Verdau von pBE13 (aus Klon Nr. 1 bis 5) mit *Sall* zeigt, dass das Plasmid linealisiert wird, also nur eine *Sall*-Schnittstelle vorhanden ist. Wenn aufgrund eines Klonierungsfehlers pBE3 aus den Kolonien gewonnen worden wäre, wäre das Plasmid bei dem Verdau mit *Sall* in zwei fast gleichgroße Fragmente bei ca. 5800bp geteilt worden. Somit zeigt sich, dass in den gewonnenen Plasmide der *mcc*-Promotor gegen den *flaA*-Promotor ausgetauscht worden war.

Wenn der *flaA*-Promotor inseriert war, sollte es nur zu einer Linealisierung des Plasmids kommen, wohingegen ein Plasmid mit *mcc*-Promotor in zwei Teile zerfallen würde. Wie Abb. 17 zeigt, enthalten alle überprüften Plasmide den *flaA*-Promotor. Das Plasmid pBE13 wurde in den B8 Stamm transformiert und die entstandenen Kolonien mit IVIS[®] lumina System überprüft (s. Abb. 18)

mut) gewonnen werden konnte. Nach der Ligation dieses Fragments mit dem entsprechend verdauten pSP77-Vektor, wurde der Ligationsansatz in Top10-Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Biolumineszenz mit dem IVIS[®] lumina System getestet und aus den biolumineszierenden Transformanten das Plasmid isoliert. Dieses Plasmid (pBE11) wurde noch einmal mit *KpnI* geschnitten, um eine *aphA3*-Kassette (Kan^R) einführen zu können. Diese Kassette wurde aus pHel3 mit den Primern 1889 und 1893 amplifiziert. Nach erneuter Ligation, Transformation und Überprüfung mittels IVIS[®] lumina Systems wurde das nun isolierte Plasmid (pBE12) per Transformation und Elektroporation in *H. pylori* B8 gebracht und die entstandenen Kolonien mit dem IVIS[®] lumina System auf Biolumineszenz untersucht (s. Abb. 19).



Click # BE20111116144147
Wed, Nov 16, 2011 14:42:00
Bin.M (4), FOV12.5, f1, 1m
Filter: Open
Camera: IVIS IS0647N4041, DW434

Series: h. Pylori
Experiment: pPuzzle2_apha
Label:
Comment:
Analysis Comment:

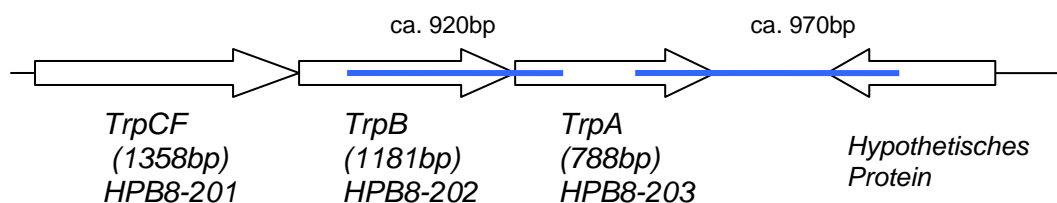
Abbildung 19: Biolumineszierende *H. pylori* mit pBE12

Die mit pBE12 transformierten *H. pylori* B8 zeigen Biolumineszenz und haben *aphA3_alpA_luxCDABE-mut* in den *moeB*-Lokus inseriert (Expositionszeit 1min). Oben ist das Plasmid pBE12 dargestellt, welches zur Transformation von *H. pylori* B8-Stamm verwendet wurde. Die den *moeB*-Lokus flankierenden Bereiche sind orange dargestellt.

3.1.1.1.2. Verwendung des *TrpA*-Lokus

Da trotz der Publikation von Kavermann *et al.* Zweifel bestanden, ob ein Verlust des *moeB*-Lokus tatsächlich ohne Konsequenzen im Gerbilmodell ist, wurde zusätzlich noch ein anderer chromosomaler Locus ausgewählt. Hierbei fiel die Wahl auf den *TrpA*-Lokus. Dieser Genlocus codiert für die alpha-Untereinheit einer Tryptophan Synthase und ist *in vivo* nicht essentiell (Alexandra Debovski, Uni Western Australia 2012). Als Vektor für diverse Konstrukte wurde pBlu_*TrpA*_uptetO verwendet. Dieses von pBluescript abstammende Plasmid enthält die flankierenden Bereiche des *TrpA*-Lokus des *H. pylori* Stamms X47 (über *SacI* und *KpnI*), welche weitgehend homolog zu denen von B8 und P12 sind. Zusätzlich beinhaltet das Plasmid einen *tetO*-Promotor also einen grundsätzlich durch *TetR* reprimierbaren Promotor, was die Verwendung als induzierbares System bei Bedarf möglich macht.

TrpA-Locus in B8: HPB8- 203



TrpA-Locus in P12: HPP12-1243

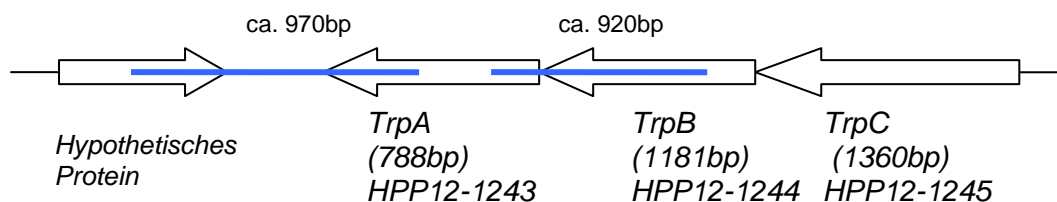


Abbildung 20: Der *TrpA* Locus in B8 und P12

Die Abbildung zeigt schematisch den *TrpA*-Lokus und angrenzende Bereiche im *H. pylori* Stamm P12 und B8. Blau markiert sind die flankierenden Bereiche, welche Teil des pBlu_*TrpA*- Rückgrats sind und somit eine Rekombination des gewünschten Inserts in den *TrpA*-Lokus erlauben sollen.

Aus pBE2 wurde *luxCDABE-mut* mithilfe der Primer *lux_NdeI_s* und *lux_Sall_as* amplifiziert und mit *pBlu_TrpA_uptetO* ligiert. Aus den gewonnenen leuchtenden *E. coli* Mutanten wurde das Plasmid (pBE16) aufgereinigt und erneut mit *Sall* verdaut, um eine *cat_{GC}*-Kassette (*Cam^R*) zu inserieren. Das fertige Plasmid pBE17 wurde dann in B8 transformiert. Erst nach mehrfacher Elektroporation war es möglich eine leuchtende *H. pylori* Mutante in B8 zu erhalten, welche *uptetO_luxCDABE-mut_cat* in den *TrpA*-Lokus aufgenommen hatte (siehe Abb. 21)

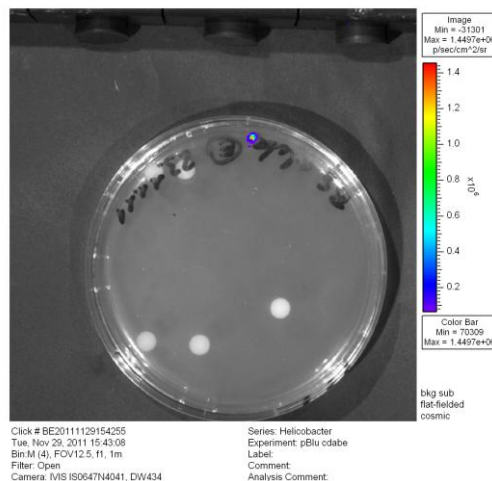
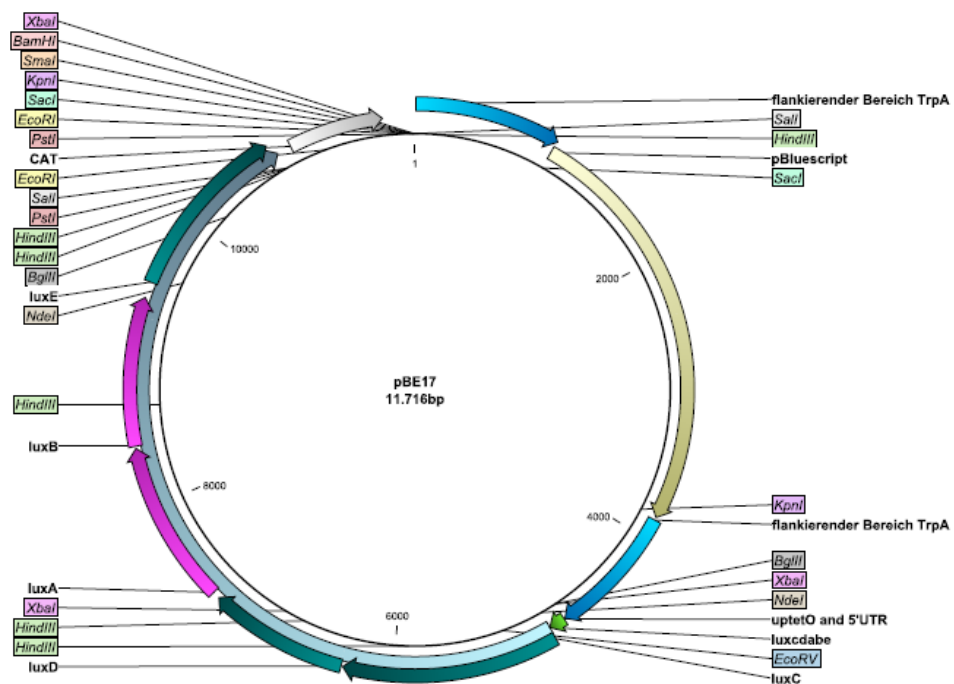


Abbildung 21: B8 mit *uptetO_luxCDABE-mut_cat* im *TrpA*-Lokus

Die Abbildung unten zeigt eine leuchtende Kolonie nach Elektroporation von pBE17 in den *H. pylori* Stamm B8. Die Abbildung wurde mit IVIS[®] lumina System generiert (Expositionszeit 1min). Oben ist das zur Elektroporation verwendete Plasmid pBE17 dargestellt mit den den *TrpA*-Lokus flankierenden Sequenzen (blau).

Um dieses System unter einem stärkeren Promotor als den *tetO*-Promotor zu exprimieren, wurde aus dem Plasmid pBE13 *fla_luxCDABE-mut* mit *AscI* und *Sall* ausgeschnitten. Dann wurde eine inverse PCR des Vektors *pBlu_TrpA_uptetO* durchgeführt. Dabei wurden die Primer BE16 (*AscI*) und BE17 (*Sall*) verwendet und somit ein Fragment, welches nur das eigentliche Rückgrat (pBluescript) und die flankierenden Bereiche von *TrpA* enthielt, generiert. Die beiden Fragmente *AscIfla_luxCDABE-mutSall* und *SallpBlu_TrpAAscI* wurden ligiert und in Top10 transformiert. Nach Überprüfung der Klone auf Biolumineszenz wurde das Plasmid (pBE18) extrahiert und noch einmal mit *Sall* geschnitten, um eine *cat_{GC}*-Kassette (Cam^R) einzufügen. Nach erneuter Transformation in Top10 wurde das Plasmid (pBE19) der leuchtenden Mutanten entnommen und via Elektroporation in B8 gebracht (s. Abb. 22). Die nach mehrfacher Elektroporation erhaltenen leuchtenden B8 Mutanten (H-26) zeigten bei guten Biolumineszenzraten ein schlechtes Wachstum auf der Platte bei Durchmesser der einzelnen Kolonien \ll 1mm.

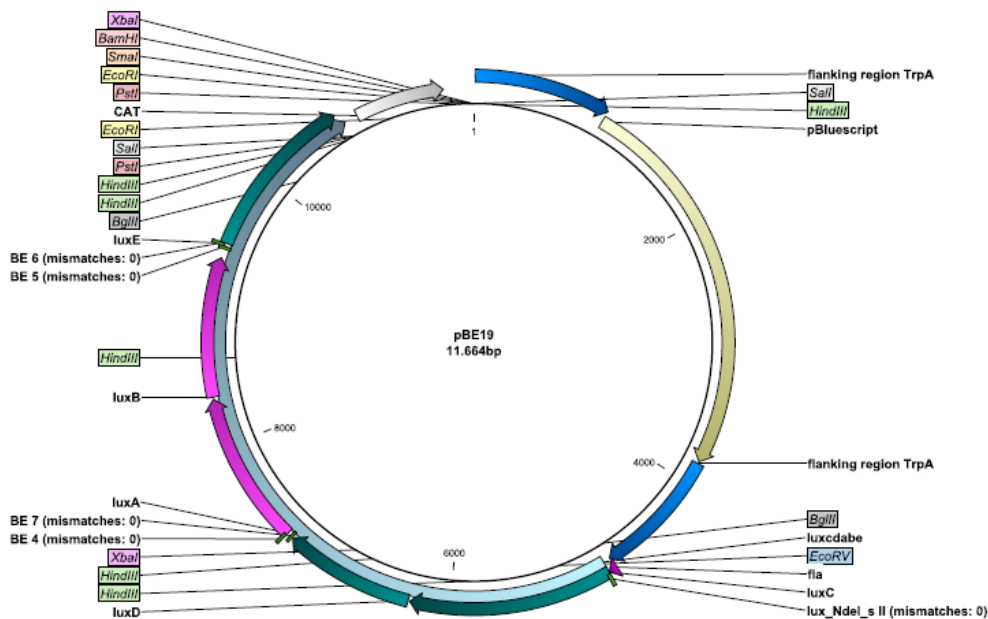


Abbildung 22: pBE19

Dieses Plasmid wurde zur Herstellung des biolumineszierenden *H. pylori* Stamm H-26 verwendet, welcher *fla_luxCDABE-mut_cat* im *TrpA*-Lokus inseriert hat.

3.1.1.2. Integration des *Lux*-Operon in das *H. pylori* Plasmid pHel12

pHel12 ist ein kryptisches Plasmid aus dem *H. pylori* Stamm P12. Dabei weist das Vorhandensein einer *mob*-Region (*orf04-orf07*), welche für Bestandteile des Relaxosoms kodiert, pHel12 als mobilisierbares Plasmid aus (Rohrer 2012). Ein Konstrukt, welches die Rekombination des *Lux*-Operon in pHel12 oder allgemein in ein kryptisches *H. pylori* Plasmid erlaubt, hat den Vorteil, dass dieses modifizierte *H. pylori* Plasmid als Shuttle zwischen verschiedenen *H. pylori* Stämmen verwendet werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte beinhalten beide flankierende Bereiche aus pHel12, sodass es zu einer Insertion des jeweiligen Inserts zwischen *orf11* und *orf01* kommt (siehe Abb. 23).

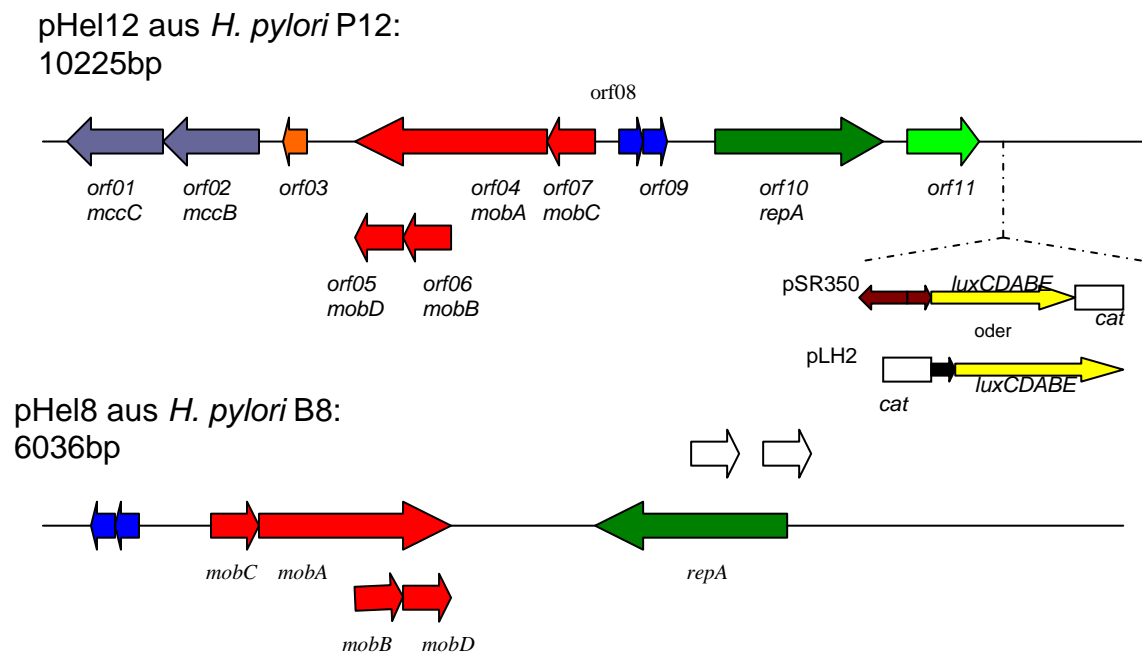


Abbildung 23: schematische Darstellung von pHel12 und pHel8

Die Abbildung zeigt die beiden kryptischen Plasmide pHel12 und pHel8 aus den *H. pylori* Stämmen P12 und B8. Einander entsprechende Abschnitte sind in denselben Farben markiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte besitzen homologe Sequenzen, welche eine Rekombination eines Inserts zwischen *orf11* und *orf01* von pHel12 erlauben. Diese Sequenzen haben auf pHel8 keine Entsprechung und somit können die Konstrukte nicht direkt in B8 transformiert werden. (nach Rohrer *et al.* 2012 und Farnbacher *et al.* 2010)

Hinderlich bei diesem System ist, dass diese flankierenden Bereiche nur in pHel12 und nicht im Plasmid pHel8 aus dem *H. pylori* Stamm B8 vorkommen, sodass die jeweiligen Konstrukte zuerst in P12 gebracht werden müssen, dann das mutierte pHel12 extrahiert und in B8 transformiert werden muss.

Die verwendeten Konstrukte unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Promotoren vor dem jeweiligen Insert. pSR350 beinhaltet ein über Tetracyclin induzierbares System bestehend aus *TetR* (Tet Repressor Protein), welches unter einem *flaA*-Promotor aus *H. pylori* exprimiert wird, und einen durch *TetR* reprimierbaren Promotor (*tetO*) vor dem jeweiligen Insert. pLH2 hingegen beinhaltet nur einen *alpA*-Promotor vor dem jeweiligen Insert.

Für die Klonierung des *Lux*-Operon in pSR350 wurde *luxCDABE-mut* über die Primer *lux_NdeI_s* und BE15 (*NotI*) aus pBE2 amplifiziert und in pSR350 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in Top10 transformiert und die entstandenen Klone auf Biolumineszenz überprüft. Es wurde versucht das so entstandene Plasmid pBE7 (Abb. 24) in den *H. pylori* Stamm P12 zu transformieren. Dies erwies sich leider als erfolglos. Da auch ein ähnliches Konstrukt mit *luxAB* als Insert in pSR350 (pBE4') nicht in *H. pylori* transformiert werden konnte, liegt vielleicht zusätzlich ein negativer Effekt von *TetR* auf *H. pylori* vor, wenn dieses auf dem Plasmid encodiert wird. Deswegen wurde nun versucht mit pLH2 (*alpA*-Promotor) eine Insertion des *Lux*-Operons in pHel12 zu erreichen. Dazu wurde das *NdeI/NotI*-verdaute *Lux*-Operon, welches beim pSR350-Konstrukt zum Einsatz kam, in pLH2 ligiert und in Top10 transformiert. Die entstandenen Klone wurden auf Biolumineszenz überprüft und das entsprechende Plasmid (pBE8) isoliert (Abb. 24). Auch hier gelang es jedoch nicht eine Insertion des über 7000bp großen Inserts in pHel12 zu erreichen. Zwar konnten *H. pylori* (P12) Klone gepickt werden, diese zeigten aber nie Biolumineszenz bzw. nur bei Zugabe von *n*-Decanal, was den Schluss nahe legt, dass es nur zu einer teilweisen Insertion kam.

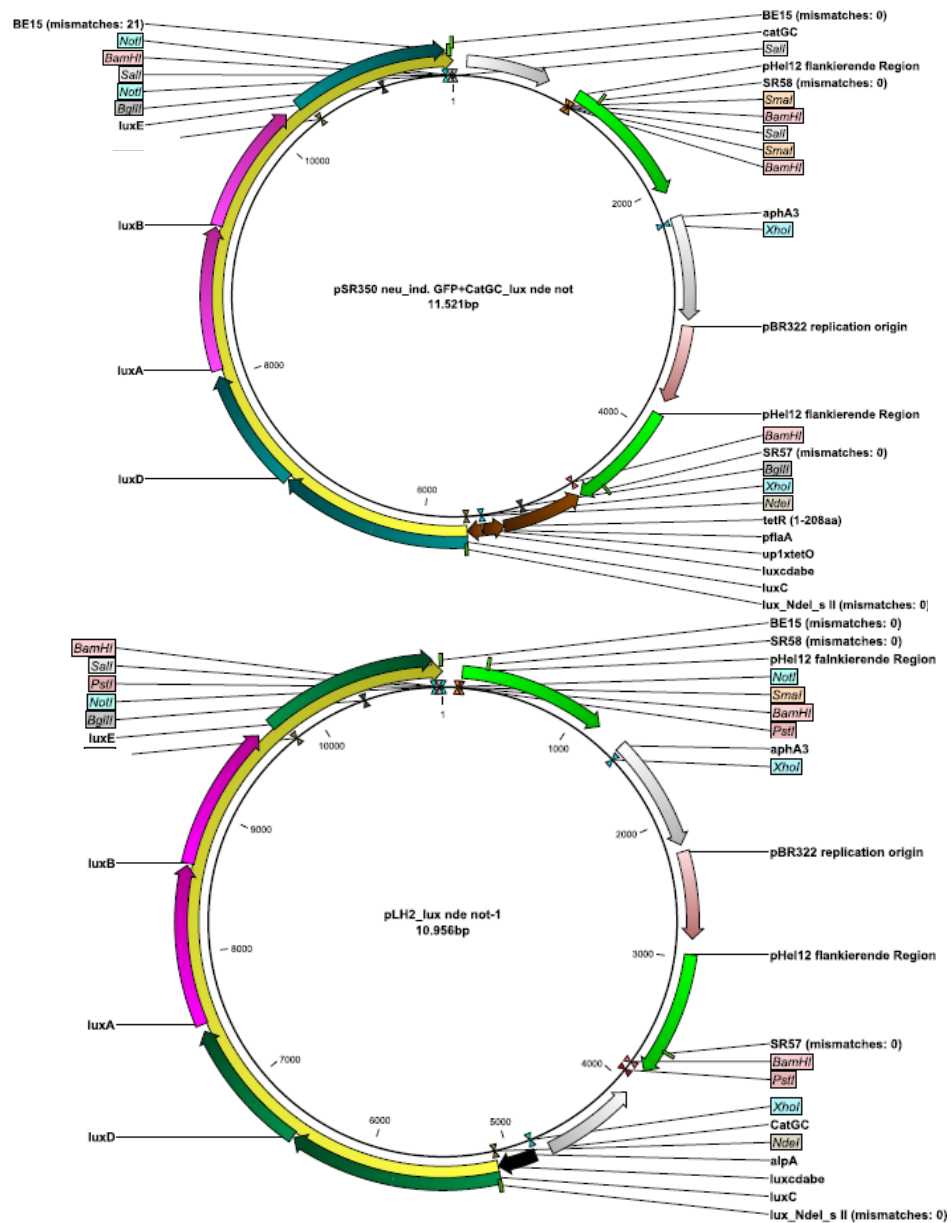


Abbildung 24: Plasmid pBE7 und pBE8

Die Abbildung zeigt oben pBE7 mit *fla_TetR* und *tetO*-Promotor (braun) und unten pBE8 mit *alpA*-Promotor (schwarz). Diese Plasmide sollten das gesamte *Lux*-Operon in pHel12 inserieren, was sich in der Praxis aber nicht durchführen ließ, da sich trotz mehrfacher Transformation und Elektroporation in *H. pylori* P12 keine Mutanten generieren ließen.

3.1.2. Integration des *Lux*-Operon geteilt in *luxAB* und *luxCDE* in *H. pylori*

Da die Verfügbarkeit des Substrats ein limitierender Faktor für die Stärke der Biolumineszenz ist, wurde das *Lux*-Operon in seine funktionellen Teile *luxAB* und *luxCDE* geteilt und unter verschiedenen Promotoren exprimiert (siehe auch Yagur Kroll & Belkin, 2010).

3.1.2.1. luxAB potentiell induzierbar und luxCDE konstitutiv exprimiert

Nach Yagur-Kroll & Belkin erreicht man hohe Biolumineszenzwerte mit einem Konstrukt, welches *luxAB* (Luciferase) unter einem induzierbaren Promotor und *luxCDE* (Substratbildender Enzymkomplex) unter einem konstitutiven Promotor exprimiert.

So wurde für *H. pylori luxAB* mit den Primern BE10 (*NdeI*-Schnittstelle) und BE5 (*Sall*-Schnittstelle) aus pJT*luxCDABE*-cm amplifiziert. Als Vektor wurde das schon in Kapitel 3.2.3.1.2. genannte Plasmid *pBlu_TrpA_uptetO* verwendet, welches flankierende Bereiche des *TrpA*-Gens aus dem *H. pylori* Stamms X47 und einen durch *TetR* reprimierbaren Promotor beinhaltet. Das vollständige Plasmid *pBlu_TrpA_uptetO_luxAB* (pBE14) wurde nach Überprüfung der Klone auf Biolumineszenz (bei Zugabe von n-Decanal) extrahiert und nach Verdau mit *Sall* mit einer *aphA3*-Kassette aus pHel3 (Primer: 1893; 2157) ligiert. Nach der Transformation wurden die entstandenen Klone unter Zugabe von n-Dekanal geprüft. Die extrahierten Plasmide selbst wurden noch einmal durch einen Verdau mit *NdeI/Sall* getestet. Das verifizierte Plasmid pBE15 wurde via Elektroporation in B8 transformiert und die entstandenen Klone durch n-Dakanal auf Biolumineszenz untersucht.

Für die Klonierung von *luxCDE* wurden 4 verschiedene Primer benötigt: zwei Primer für *luxCD* (*lux_Nde_s* und BE7(*SpeI*)) und zwei für *luxE* (BE8 (*SpeI*) und BE15 (*NotI*)). Als Template wurde pBE2 verwendet. Als Vektor für *luxCD* und *luxE* diente das Plasmid pLH2, welches eine Rekombination mit dem *H. pylori* Plasmid pHel12 zulässt und einen *alpA*-Promotor beinhaltet. Es wurde eine Zweifachligation mit den Fragmenten *NdeI/luxCD_{SpeI}*, *SpeI/luxE_{NotI}* und *NotI/pLH2_{NdeI}* durchgeführt. Aus den nach Transformation entstandenen Top10-Klonen wurde das Plasmid isoliert und durch einen *NdeI-NotI-SpeI*-Verdau kontrolliert. Wie Abb. 25 zeigt waren zwei der überprüften Plasmide richtig (pBE9).

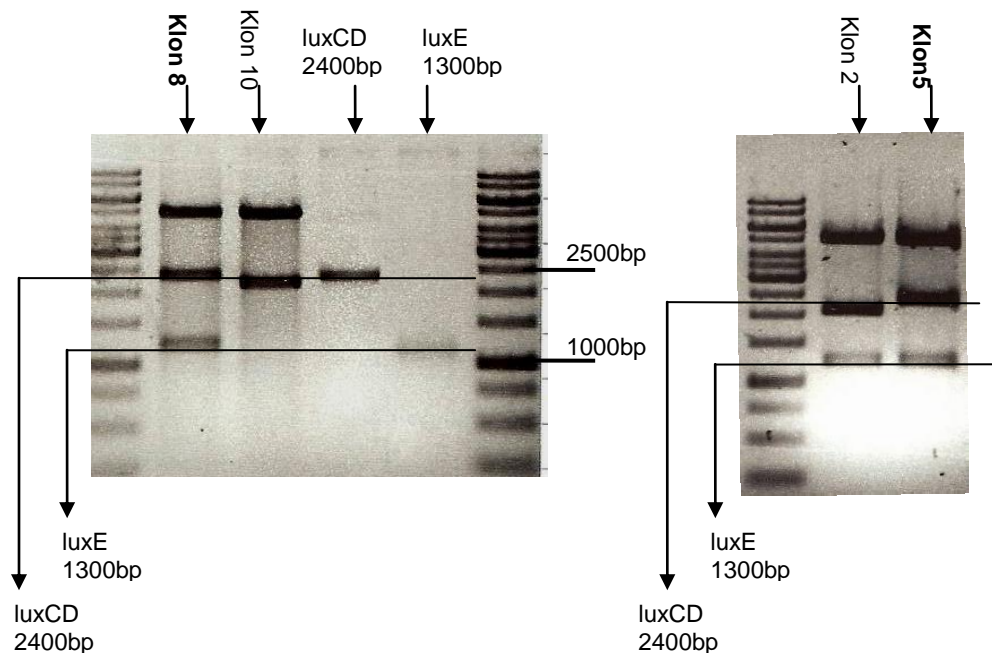


Abbildung 25: *luxCDE-mut* in pLH2 – Plasmid pBE9

Die Abbildung zeigt das Bandenmuster bei vier der überprüften Plasmide nach *NdeI*, *NotI* und *SpeI*-Verdau. Von den 12 der überprüften Plasmide zeigten nur diese vier ein vielversprechendes Bandenmuster, sodass diese weiter überprüft wurden. Bei Klon Nr. 8 und Nr. 5 sieht man nach Verdau mit den oben genannten Enzymen eine Teilung des Plasmids in 3 Fragmente: ein ca. 5000bp großes Fragment (pLH2-Backbone), ein ca. 2400bp großes Fragment (*luxCD*) und ein ca. 1300bp großes Fragment (*luxE*). Bei Überprüfung von Klon Nr. 8 und 10 (links) wurde zusätzlich noch der für die Klonierung verwendete Verdau von *luxCD* (*NdeI*, *SpeI*) und *luxE* (*SpeI*, *NotI*) aufgetragen, um einen ungefähren Vergleich anstellen zu können. Die Gelbilder zeigen, dass Klon Nr. 8 und 5 *luxCDE-mut* beinhalten.

Das Plasmid pBE9 wurde in den *H. pylori* Stamm P12 transformiert, da das Plasmid des B8-Stamms keine Homologien zu den flankierenden Bereichen aus pLH2 aufweist. Um die erhaltenen Kolonien zu überprüfen wurde mit dem aus *H. pylori* extrahierten Plasmid als Template eine PCR mit den Primern 1890 und 1891 durchgeführt. Diese Primer binden in den das Insert umgebene flankierenden Bereichen von pLH2 und damit auch von pHel12. Das resultierende PCR-Fragment ist bei Insertion des Inserts *cat_alpA_luxCDE-mut* in pHel12 ca. 5400bp groß. Sollte das Insert nicht in pHel12 rekombiniert worden sein, so wäre das PCR-Produkt ca. 400bp groß. Drei der fünf durchgeführten PCRs zeigen eine richtige Bande bei ca. 5400bp. Somit hatten 3 Klone *luxCDE-mut* aufgenommen (s. Abb. 26).

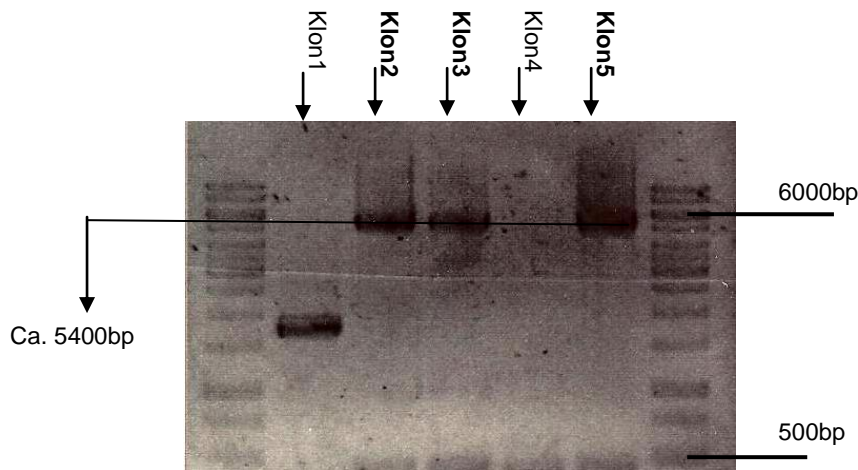


Abbildung 26: Insertion von *cat alpA luxCDE* in pHel12

Die Abbildung zeigt die Produkte einer PCR mit den extrahierten *Helicobacter*-Plasmiden mit den Primern 1890 und 1891, welche in den flankierenden Bereichen von pLH2 bzw. pHel12 binden. Wenn *cat alpA luxCDE-mut* inseriert ist zeigt sich eine Bande bei ca. 5400bp, wie bei Klon 2, 3 und 5. Wenn das Fragment nicht in pHel12 rekombiniert wurde zeigt sich eine Bande bei ca. 400bp. Die Tatsache, dass auch die Klone 2, 3 und 5 eine Bande bei ca. 400bp zeigen rührt wahrscheinlich daher, dass neben den Plasmiden die *luxCDE-mut* aufgenommen hatten auch native pHel12 vorhanden waren. Die Klone 2, 3, und 5 scheinen *luxCDE-mut* inseriert zu haben.

Dieses Plasmid pHel12_*cat alpA luxCDE-mut* (pBE10) wurde in den B8-Stamm H-16, welches *luxAB* im *TrpA*-Lokus enthält, via Elektroporation übertragen (s. Abb. 28). Zur Kontrolle der entstandenen Klone wurden die entsprechenden Platten mit IVIS[®] lumina System geprüft. Obwohl die Kolonien bemerkenswert klein waren (<1mm), zeigten alle gute Raten an Biolumineszenz (Abb. 27).

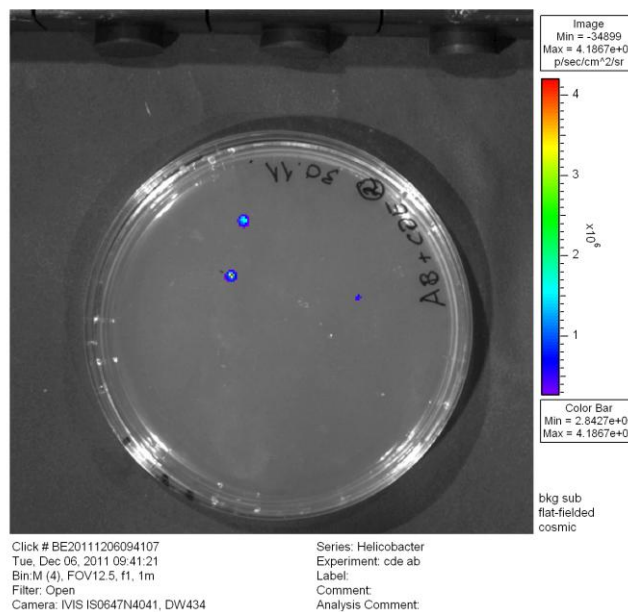


Abbildung 27: Kolonien von *Helicobacter pylori* B8 mit *alpA luxCDE-mut* auf dem Plasmid und *uptetO luxAB* auf dem Chromosom

Das Bild zeigt leuchtende Kolonien von *H. pylori* nach Elektroporation mit pBE10. Ausgangsstamm bei der Elektroporation war der Stamm H-15 welcher *luxAB* im *TrpA*-Lokus inseriert hat.

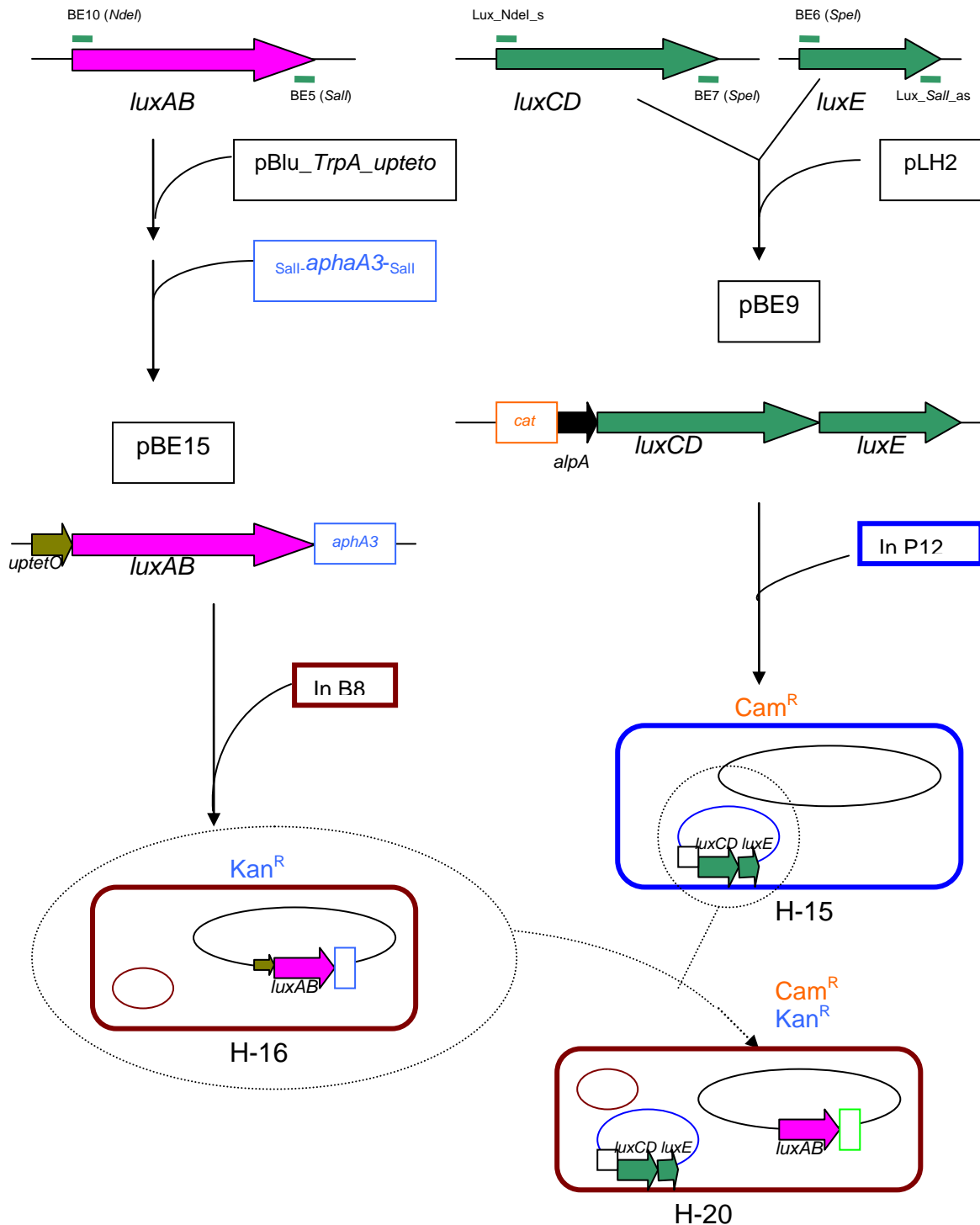


Abbildung 28: Klonierung des Lux-Operon geteilt in luxAB und luxCDE

luxAB wurde über den Vektor *pBlu_TrpA_apteto* zusammen mit einer *aphA3*-Kassette in das Chromosom des *H. pylori* Stamms B8 inseriert. Die Rekombination fand am *TrpA*-Lokus statt. Es entstand der Stamm H-16.

Das Plasmid pBE9 wurde in den *H. pylori* Stamm P12 transformiert. Durch homologe Rekombination zwischen pBE9 und pHel12 kam es zur Insertion von *luxCD*, *luxE* und einer *cat_{GC}*-Kassette in pHel12, das intrinsische Plasmid von P12. Dieses modifizierte *Helicobacter* Plasmid, pBE10 genannt, wurde in den B8-Stamm H-16 transformiert. Es resultiert ein Chloramphenicol und Kanamycin resistenter *Helicobacter pylori* H-20 der Biolumineszenz zeigt und das Lux-Operon getrennt an zwei verschiedenen Orten seines Genoms exprimiert.

3.1.2.2. Nicht-induzierbares geteiltes Luciferasesystem

Da die Klone mit dem geteilten *Lux*-Operon und induzierbarem System (H-20) scheinbar einen Wachstums-Nachteil hatten, da sie nur sehr langsam auf Platte wuchsen, die Intensität der Biolumineszenz aber zufriedenstellend war, wurden andere Konstrukte mit geteiltem *Lux*-Operon konstruiert. Der Wachstumsnachteil könnte einerseits von dem *uptetO*-Promotor herrühren, da sich bei Transformation desselben mithilfe von Konstrukten, die in das Plasmid rekombinieren sollten, keine Mutanten ergaben (siehe auch Kapitel 3.1.1.2.). So wurde das Plasmid pBE18, welches neben den flankierenden Bereichen des *TrpA*-Lokus einen *flaA*-Promotor beinhaltet, mit *NdeI* und *Sall* geschnitten und mit *NdeI**LuxAB**Sall* ligiert. Nach Transformation in Top10 und Überprüfung der Klone auf Biolumineszenz unter n-Dekanal-Zugabe wurde das extrahierte Plasmid (pBE20) mit *Sall* verdaut und mit einer *aphA3*-Kassette ligiert. Das so entstandene Plasmid (pBE21) wurde aus den *E. coli*-Klonen extrahiert und via Elektroporation in B8 gebracht. Die *H. pylori*-Klone (H-23) wurden unter Zugabe von n-Decanal auf Biolumineszenz überprüft. Anschließend sollte H-23 mit pBE10 (pHel12_ *cat*_ *alpA*_ *luxCD*_ *luxE*) analog zum Vorgehen in Abb. 28, transformiert werden, allerdings gelang es auch nach mehrfacher Transformation und Elektroporation nicht Transformanten zu erhalten.

Diese Tatsache und der oben genannte Wachstumsnachteil des induzierbaren geteilten *Lux*-Operon legten den Schluss nahe, dass bei den bis zum damaligen Zeitpunkt konstruierten geteilten *Lux*-Systemen in Relation zur Luciferase zu viel Substrat gebildet werden könnte, welches *H. pylori* im Wachstum beeinflusst; zumal hier *luxCDE-mut* unter dem starken *alpA*-Promotor und auf dem Plasmid, welches in mehreren Kopien vorliegt, exprimiert wird. So wurde im Weiteren ein Konstrukt entwickelt, welches *luxCDE-mut* im *TrpA*-Lokus unter einem *fla*-Promotor exprimiert und *luxAB* unter dem *alpA*-Promotor auf dem Plasmid. Dazu wurde *luxAB* mit den Primern BE10 (*NdeI*) und BE11 (*NotI*) amplifiziert und mit *NdeI*pLH2*NotI* ligiert. Die nach Transformation entstandenen Top10 Kolonien wurden unter n-Dekanal-Zugabe auf der Platte auf Biolumineszenz geprüft. Zwei Klone zeigten Biolumineszenz, Klon Nr. 18 und 5. Das Plasmid (pBE5) wurde extrahiert und in den *H. pylori*-Stamm P12 transformiert. Die resultierenden Kolonien wurden mit n-Decanal auf Biolumineszenz geprüft (siehe Abb. 29)

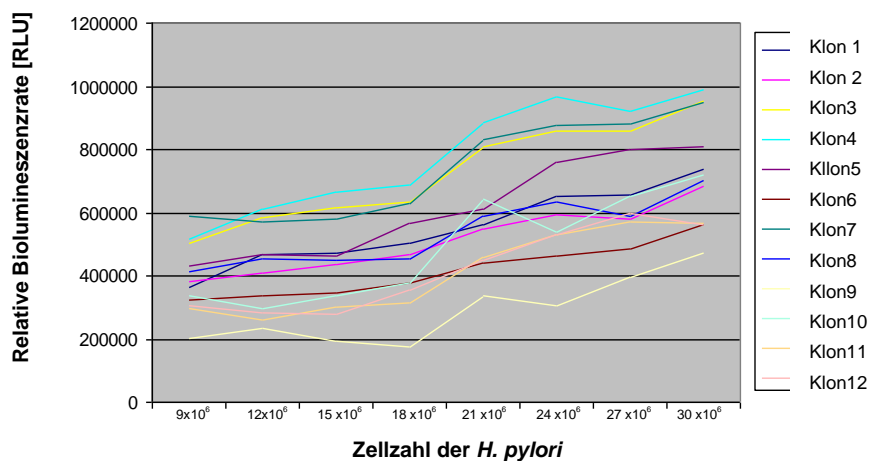


Abbildung 29: P12 mit *cat alpA luxAB* auf pHel12

Die *H. pylori* wurden in BB suspendiert und eine OD₅₅₀ von 1 wurde hergestellt. Die Anzahl der Bakterien errechnet sich ausgehend von der Annahme, dass eine OD₅₅₀ von 0,1 einer Konzentration von 3×10^7 Helicobacter/ml entspricht. Vor und nach Zugabe von 30 μ l n-Decanal (0,05%) pro well und mit einer Expositionszeit von 0,5s pro well wurde die Biolumineszenz bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein Kulturmedium ohne Bakterien, in welches auch n-Decanal gegeben wurde. Die ermittelten Biolumineszenzraten sind auch hier wieder relative Werte, die den Vergleich der einzelnen Klone unter gleichen Versuchsbedingungen gewährleisten sollen. Wie die Abbildung zeigt steigt die Biolumineszenz mit steigender Bakterienzahl an. Klon 4, 5 und 7 zeigen relativ die höchsten Biolumineszenzwerte.

Da Klon 4 besonders gute Biolumineszenzwerte lieferte, wurde das Plasmid von diesem extrahiert und in B8 transformiert (H-14).

Für das *luxCDE*-System wurde *luxCD* mit den Primern Lux_*NdeI*_s und BE7 (*SpeI*) und *luxE* mit den Primern BE6 (*SpeI*) und Lux_*Sall*_as aus pBE2 amplifiziert. Diese Fragmente wurden nach entsprechendem Verdau mit *Sall*p*Blu*_TrpA_*fla*_{NdeI} ligiert. Aus den nach Transformation entstandenen Top10-Kolonien wurde das Plasmid extrahiert und mithilfe eines Verdau mit *SpeI*, *NdeI* und *Sall* verifiziert (siehe Abb. 30).

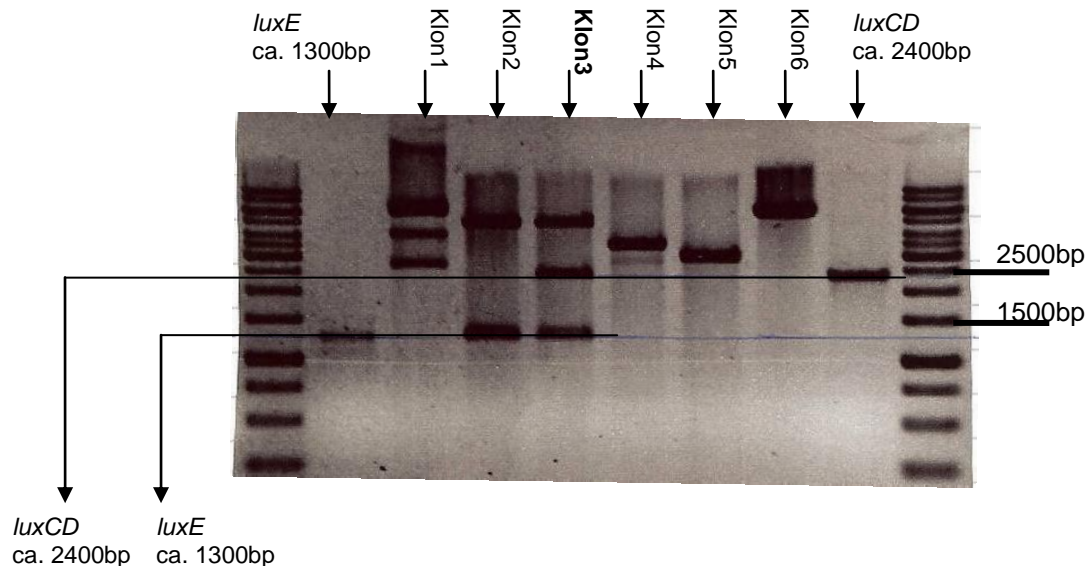


Abbildung 30: *luxCDE-mut* in *pBlu_TrpA_fla*

Die Abbildung zeigt das Bandenmuster nach Verdau der Plasmide durch *NdeI*, *Sall* und *SpeI*. Nur Klon Nr.3 zeigt eine Bande bei ca. 2400bp (*luxCD*) und ca. 1300bp (*luxE*) und scheint deshalb sowohl *luxCD* als auch *luxE* zu enthalten.

Das Plasmid (pBE23) wurde aus dem Klon Nr. 3 extrahiert und noch einmal mit *Sall* geschnitten, um eine *aphA3*-Resistenzkassette einzufügen (Kan^R). Nach Transformation des Ligationsansatzes in Top10, wurden Klone gepickt und deren Plasmid über einen *NdeI/Sall*-Verdau überprüft. Das Plasmid pBE24 wurde in die B8-Mutante H-14 transformiert (s. Abb. 32). Eine leuchtende Kolonie konnte gepickt werden (siehe Abb.31).

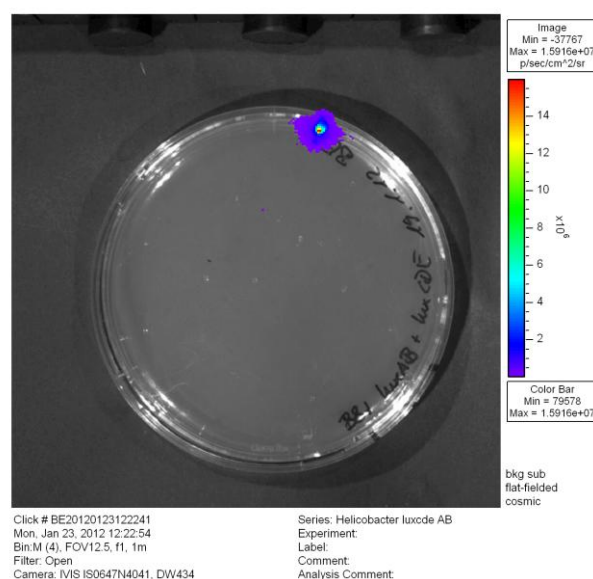


Abbildung 31: Kolonien von *H. pylori* B8 mit *alpA_luxAB* auf dem Plasmid und *fla_luxCDE-mut* auf dem Chromosom

Das Bild zeigt eine Kolonie von H-25.

Dieser Klon zeigte sehr gute Biolumineszenzwerte und im Gegensatz zu dem induzierbaren geteilten *Lux*-Operon Konstrukt gutes Wachstum.

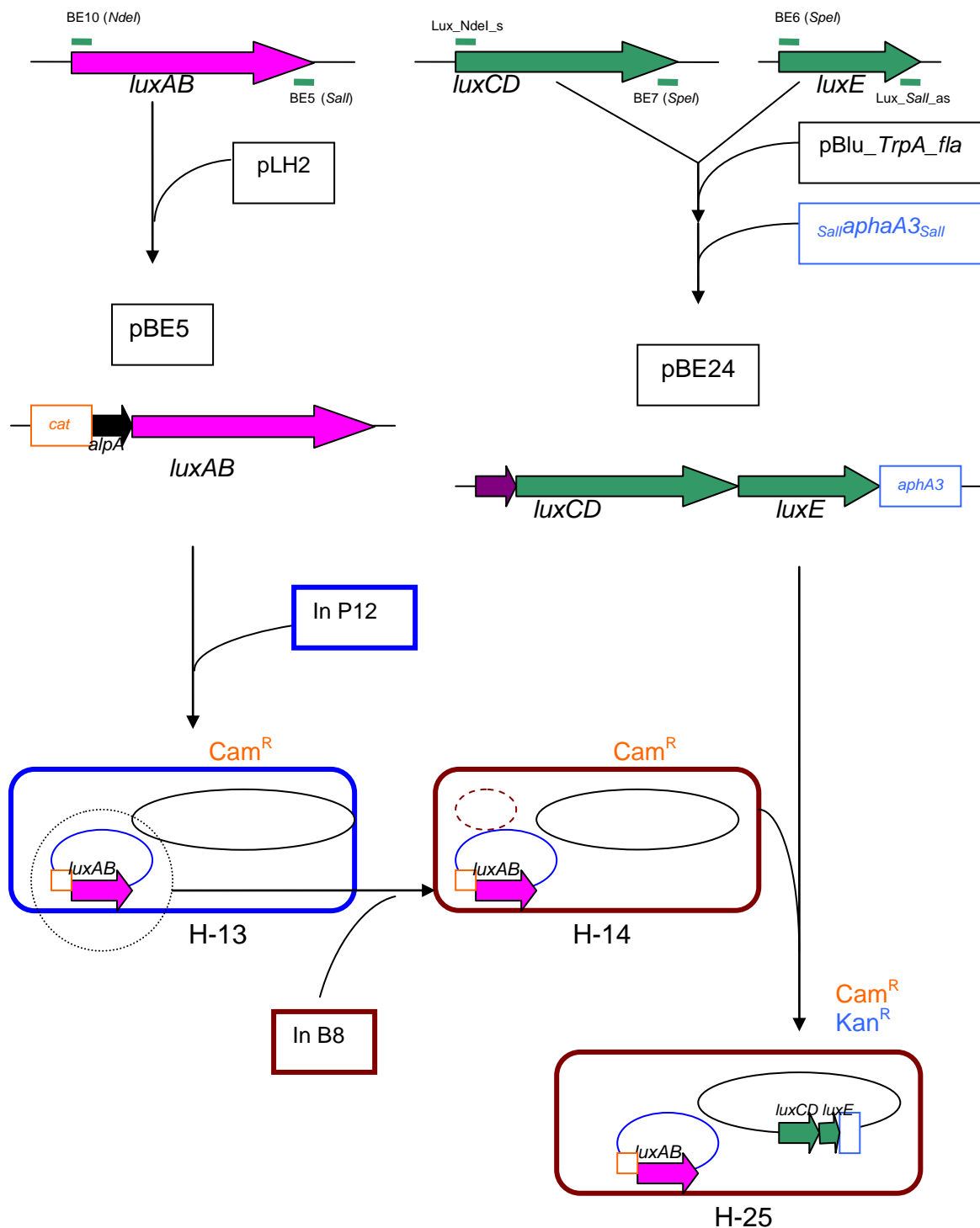


Abbildung 32: Klonierungsstrategie für ein geteiltes *luxCDABE*-Konstrukt mit *luxCDE*-mut auf dem Chromosom und *luxAB* auf dem Plasmid

luxAB wurde mithilfe des Vektors pLH2 auf P12 übertragen, wo es zu einer Rekombination zwischen pBE5 und pHel12 kam. Das modifizierte pHel12, welches *luxAB* inseriert hatte (pBE10), wurde extrahiert und in B8 transformiert. Der so entstandene Stamm H-14 wurde mit pBE24 transformiert, welches *luxCDE*-mut in den *TrpA*-Lokus inserierte. Der resultierende Stamm H-25 zeigte Biolumineszenz.

3.1.3. Vergleich der einzelnen Konstrukte in *H. pylori* B8

Insgesamt wurden 7 verschiedene *H. pylori* B8 Klone gewonnen, welche alle Biolumineszenz mithilfe von verschiedenen Konstrukten zeigten. Abb. 34 und 35 zeigen eine Übersicht über die einzelnen Konstrukte und die dazugehörigen Stämme.

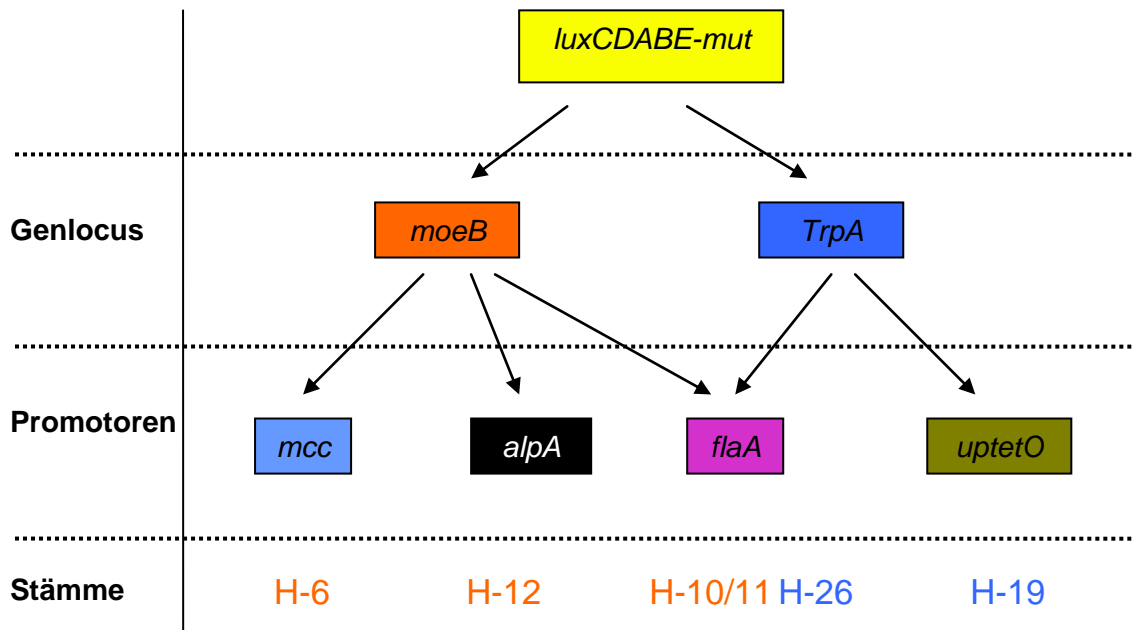


Abbildung 33: Zusammenfassung aller Konstrukte mit ungeteiltem *Lux*-Operon

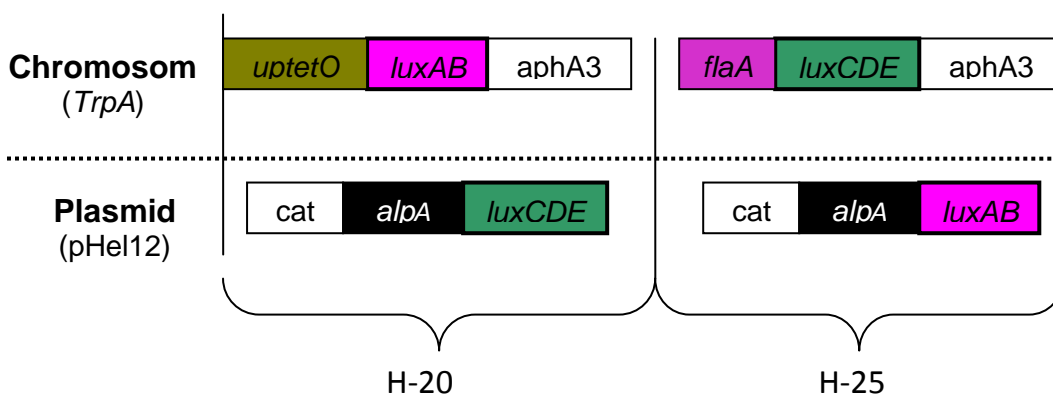


Abbildung 34: Zusammenfassung der relevanten Konstrukte mit geteiltem *Lux*-Operon

Dargestellt sind die Inserts, welche in den chromosomalen Locus durch Rekombination eingefügt wurden und die, welche in das Plasmid pHel12 inseriert wurden.

Um die einzelnen Konstrukte in *H. pylori* B8 zu vergleichen, wurden die einzelnen Stämme in BB + 10% FCS suspensiert und mithilfe des Biolumineszenz

Plattenlesegeräts ausgewertet. In eine 96-well-Platte wurde jeweils 25, 50 und 100µl der verschiedenen Bakteriensuspensionen mit einer OD₅₅₀ von 0,2 aufgetragen. Dabei betrug die Expositionszeit 0,5s. Abbildung 36 zeigt vergleichend die Graphen der Biolumineszenz der verschiedenen *H. pylori* Konstrukte, dabei fällt auf, dass die Klone mit dem geteilten *Lux*-Operon (H-25, H-20) sehr viel stärkere Biolumineszenzwerte erreichen als diejenigen mit dem ungeteilten Operon. Aber selbst innerhalb der Stämme gibt es von Klon zu Klon Unterschiede in der Biolumineszenzrate.

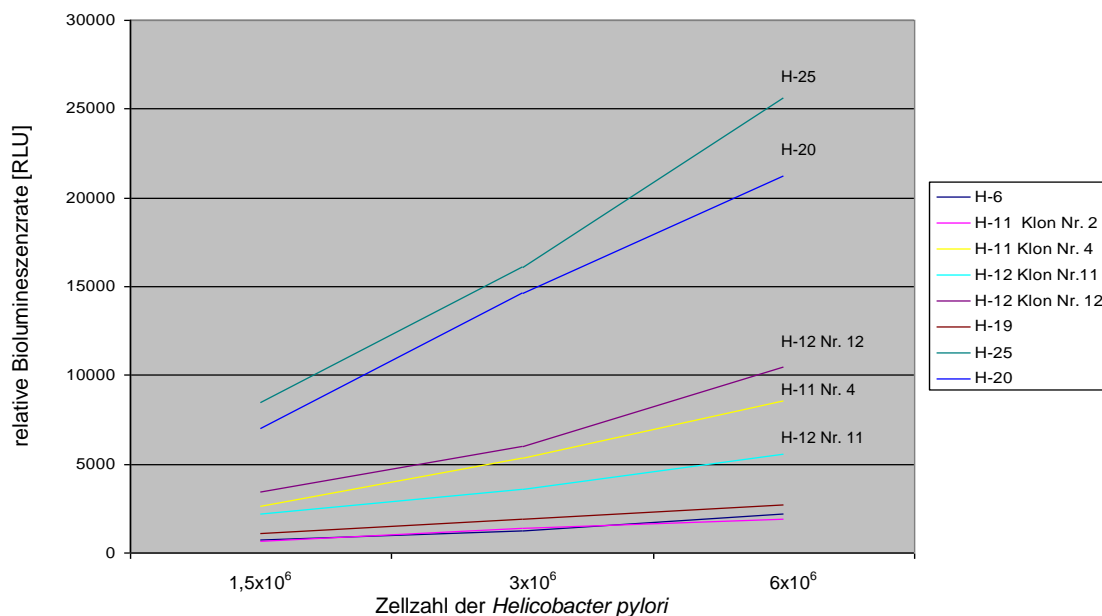


Abbildung 35: Vergleich der verschiedenen biolumineszierenden *H. pylori*

Zum Vergleich der einzelnen biolumineszierenden *Helicobacter pylori* wurde jeweils 25, 50 und 100µl der Flüssigkulturen der einzelnen *H. pylori* Stämme mit einer OD₅₅₀ von 0,2 aufgetragen und mit einer Expositionszeit von 0,5s gemessen. Als Negativkontrolle diente Kulturmedium ohne Bakterien. Die Anzahl der *H. pylori* ergibt sich aus der Annahme, dass eine OD von 0,2 einer Konzentration von 6×10^7 *Helicobacter*/ml entspricht. Die auf der y-Achse aufgetragenen Biolumineszenzraten (in RLU) zeigen relative Werte zum Vergleich der einzelnen Stämme unter gleichen Bedingungen an, da die jeweiligen Werte abhängig von Temperatur und Wachstumsphase der Bakterien ausgeprägten Schwankungen unterworfen waren.

3.2. Infektionsexperimente mit biolumineszierenden *H. pylori*

3.2.1. Infektion von Gerbils mit H-6 (*moeB::cat mcc luxCDABE-mut*)

Mit dem biolumineszierenden B8 Klon H-6 wurde eine Infektion im Gerbil durchgeführt. Dazu wurden zwei Gerbils mit biolumineszierenden *Helicobacter pylori* (B8-lux) infiziert. Zwei Tiere dienten als Kontrolle und wurden mit dem für die Transformation verwendeten streptomycinresistenten B8-Wildtyp (B8-wt) infiziert. Die Tiere wurden nach der Infektion mehrfach mit IVIS[®] lumina System auf Biolumineszenz getestet, jedoch konnte diese trotz Expositionszeiten bis 6 min nicht detektiert werden. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Tiere getötet und ihr Magen aufgespannt mit IVIS[®] lumina System gemessen, wobei wiederum keine Biolumineszenz nachgewiesen werden konnte. Die Mägen wurden homogenisiert und eine 1:100 Verdünnung auf Streptomycin-Platten ausplattiert. Eine Platte der B8-lux Tiere zeigte kein Wachstum von *Helicobacter pylori*, während bei der anderen wegen starker Kontamination eine Beurteilung von *Helicobacter-pylori* Wachstum nicht möglich war. Bei den B8-wt Tieren zeigten sich bei beiden Platten jeweils *Helicobacter pylori* Kolonien, wodurch gezeigt werden konnte, dass der verwendete *Helicobacter pylori* Stamm grundsätzlich im Gerbil kolonisiert.

3.2.2. Infektion von Gerbils mit H-20 (*TrpA::uptetO luxAB aphA3; pHel12 cat alpA luxCDE-mut*)

Zwei Gerbils wurden mit dem biolumineszierenden Stamm H-20 infiziert. Unmittelbar nach erfolgter erster Infektion wurden die Gerbils mithilfe des IVIS[®] lumina System gemessen. Dabei konnte bei einem der Gerbils eine Biolumineszenzemission im rechten Unterbauch detektiert werden. Wahrscheinlich entspricht die Lokalisation dem *Caecum* (siehe Abb. 36)

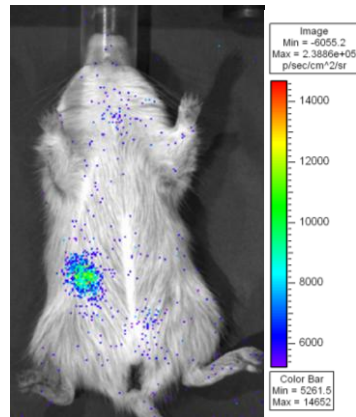


Abbildung 36: Detektion von Biolumineszenz bei Gerbils nach der oralen Infektion

Die Abbildung zeigt die detektierbare Biolumineszenz nach Infektion mit dem biolumineszierende *H. pylori* Stamm H-20. Das Bild wurde ungefähr 30min nach Infektion aufgenommen. Aufgrund der hohen Expositionszeit von 5min ist der Hintergrund etwas dominant, nichtsdestotrotz zeichnet sich eine im rechten unteren Quadranten des Abdomens gut abgrenzbare biolumineszierende Struktur ab. Wahrscheinlich hatte die Bakteriensuspension rel. schnell den Magen passiert und ist nun hier im Darmtrakt detektiert worden. Die Lokalisation sowie die Tatsache dass ein Signal detektierbar ist, obwohl sich die Suspension wahrscheinlich im Magendarmtrakt verbreitet hatte und somit relativ verdünnt war, sprechen für das Caecum als hier biolumineszierende Struktur.
Expositionszeit: 5min

Bei weiteren Messungen nach einer, zwei, drei und vier Wochen *post infectionem* konnte bei beiden Tieren keine Biolumineszenz detektieren werden. Nach vier Wochen wurden die Tiere getötet und ein Reisolationsversuch durchgeführt, in welchem keine *H. pylori* reisoliert werden konnten.

3.2.3. Infektion von Gerbils mit H-25 (*TrpA::fla luxCDE-mut aphA3; pHel12 cat alpA luxAB*)

Vier Gerbils wurden mit dem Stamm H-25 infiziert. Dieser Stamm hatte die stärkste Biolumineszenz *in vitro* gezeigt. Unmittelbar *post infectionem* konnte bei allen Gerbils Biolumineszenz detektiert werden (s. Abb. 37).

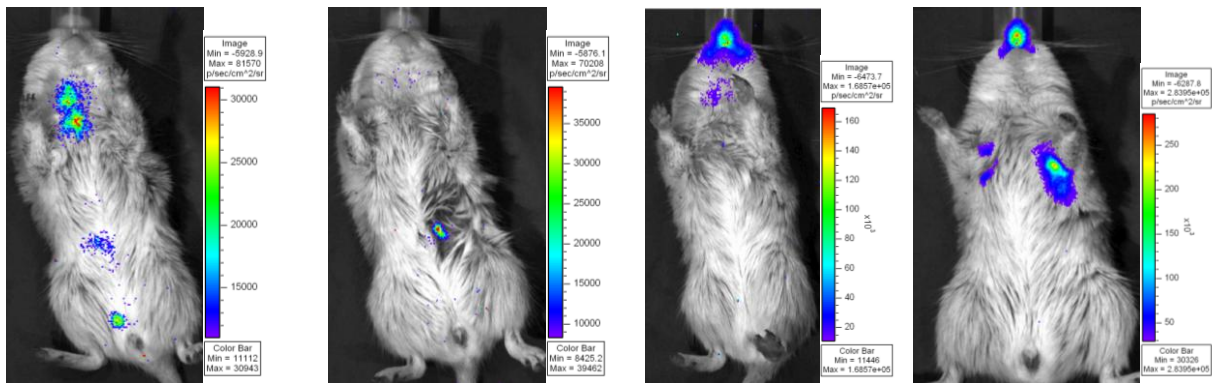


Abbildung 37: Gerbils *post infectionem* mit H-25

Unmittelbar nach Infektion mit H-25 wurden die Gerbils in Narkose gelegt und mit dem IVIS® lumina System abgebildet. Der zeitliche Abstand zur Infektion betrug hierbei von Tier eins (ganz links) bis Tier 4 (ganz rechts) 10, 15, 20 und 30min. Epositionszeit: 5min

Im wöchentlichen Abstand wurden die mongolischen Wüstenrennmäuse im Folgenden auf Biolumineszenz geprüft, wobei keine *in vivo* detektiert werden konnte. Nach 7 Wochen wurden zwei der Tiere getötet nach 8 Wochen die Übrigen. Es konnte weder am geöffneten Tier noch im aufgespannten Magen Biolumineszenz nachgewiesen werden. Die Rückisolierung von *H. pylori* gelang nicht.

3.2.4. Tripleinfektion von Gerbils mit H-10/11, H-19 und H-25

Um die Anzahl an Versuchstieren einzugrenzen und um einen gewissen Selektionsdruck zu erzeugen, wurden vier Gerbils jeweils mit einem Gemisch bestehend aus den drei Stämmen H-10/11, H-19 und H-25 infiziert. Unmittelbar nach der Infektion konnte Biolumineszenz nur an der Schnauze des jeweiligen Tieres nachgewiesen werden.

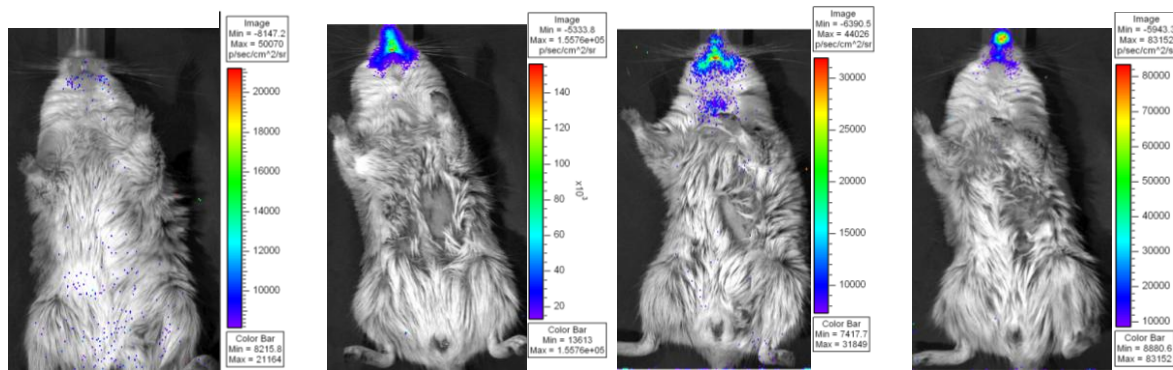


Abbildung 38: Gerbils nach Infektion mit einem Gemisch aus H-10/11, H-19 und H-25

Unmittelbar nach Infektion mit einem biolumineszierenden *H. pylori* Gemisch zeigen diese vier Gerbils nur Biolumineszenz im Bereich der Schnauze.

Expositionszeit 5min

Die Tiere wurden in den darauf folgenden Wochen wöchentlich untersucht, zeigten aber keine Biolumineszenz. Nach 7 bzw. 8 Wochen wurden die Tiere getötet. Im aufgeschnittenen und mit 1xPBS gespülten Magen konnte Biolumineszenz detektiert werden (siehe Abb. 39).

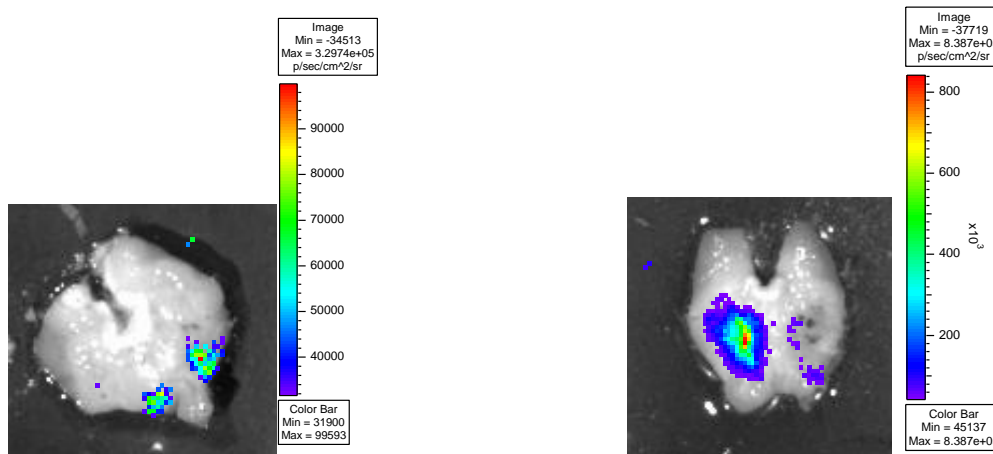


Abbildung 39: Mägen der infizierten Gerbils 7 bzw. 8 Wochen nach Infektion

links: Magen eines Gerbil 7 Wochen nach Infektion mit einem Gemisch aus H-10/11, H-19 und H-25

rechts: Magen eines Gerbil 8 Wochen nach Infektion mit einem Gemisch aus H-10/11, H-19 und H-25

Expositionszeit: 1min

Aus den zwei nach 8 Wochen getöteten Tieren konnten biolumineszierende *H. pylori* reisoliert werden (siehe Abb. 40).

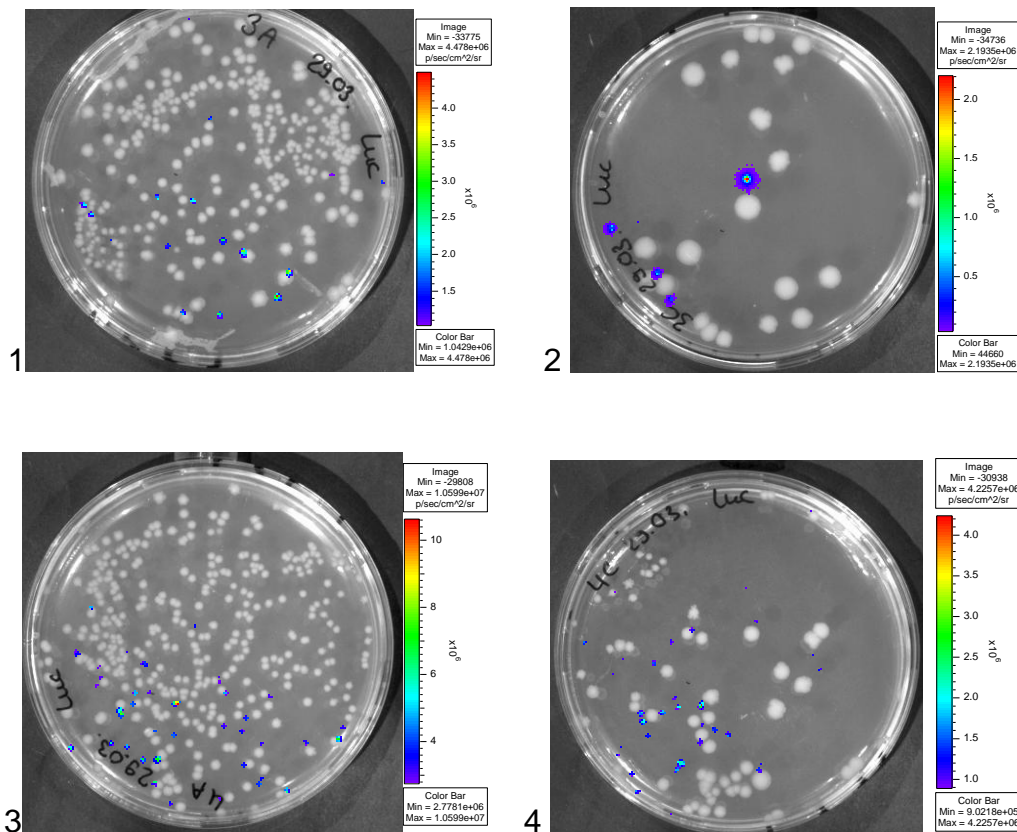


Abbildung 40: Reisolat aus Gerbils 8 Wochen nach Infektion mit einem Gemisch aus H-10/11, H-19 und H-25

Die Platte 1 und 2 sowie 3 und 4 stammen jeweils vom selben Gerbil, dabei stammt 1 und 3 aus dem Antrum und 2 und 4 aus dem Corpus. Die weißen Kolonien stellen eine Kontamination da.

Expositionszeit: 1min

Nach Überprüfung mittels PCR stand fest, dass alle reisolieren biolumineszierenden *H. pylori* Abkömmlinge des Stammes H-10/11 waren.

3.2.5. Überblick über die Ergebnisse der Infektionsversuche

Von den durchgeführten Infektionsversuchen führte nur die Infektion mit H-10/11 im Zuge einer Tripleinfektion durch die Stämme H-10/11, H-25 und H-19 zu einer dauerhaften Kolonisierung unter Erhalt der Biolumineszenz. Dabei erwies sich das verwendete chromosomale Konstrukt als äußerst stabil und noch nach 7 bis 8 Wochen *in vivo* funktionsfähig. Allerdings reichte die Intensität der ermittelten Biolumineszenz nur zur Detektion im eröffneten Magen aus und eine Detektion *in vivo* konnte nicht gezeigt werden. Die anderen Infektionsexperimente konnten keine Kolonisierung der Gerbils durch biolumineszierende *H. pylori* nachweisen, allerdings

stellt sich die Frage, wie aussagekräftig diese Versuche bei der so geringen Fallzahl und der unterschiedlichen Kolonisierbarkeit der einzelnen Gerbils durch *H. pylori* sind.

4. Diskussion

4.1. Biolumineszenz Bildgebung – Einordnung dieser Arbeit in die schon bestehende Literatur

Es gibt eine große Bandbreite an Arbeiten zur *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung (BLI) verschiedener Bakterien im Mausmodell. Seit der ersten dazu erschienenen Arbeit von Contag *et al.* 1995 an *Salmonella typhimurium* wurde das Prinzip vielfach an verschiedenen Bakterien angewandt – zuerst an gramnegativen dann zunehmend auch an grampositiven Erregern (siehe auch Andreu *et al.*, 2010). Arbeiten über *in vivo* Bildgebung biolumineszierender *H. pylori* im Gerbilmodell liegen soweit jedoch nicht vor.

Bei der BLI mit biolumineszierenden Bakterien wird im Allgemeinen vor allem das auch in dieser Arbeit angewandte *Lux*-Operon von *Photobacterium luminescens* verwendet, welches sich durch sein Optimum bei 37 °C (Szittner & Meighen 1990) und der eigenen Substratbildung besonders im *in vivo* Gebrauch bewährt. So zeichnet sich dieses System besonders dadurch aus, dass bei konstitutiver Expression des *Lux*-Operons die Biolumineszenzrate direkt proportional zu der Anzahl biolumineszierender Bakterien und dabei unabhängig von der Applikationsart und –menge eines Substrats ist (Andreu *et al.*, 2010). Gerade bei der BLI von *H. pylori* im Magen von Wüstenrennmäusen hat diese Herangehensweise ihren Vorteil, denn somit muss kein Substrat, dessen Kinetik in Bezug auf Verweildauer im Magen und Penetrationsfähigkeit des Magenmukus unbekannt ist, als weitere Variabel hinzugezogen werden.

Aufgrund der größeren Stabilität, die allgemein von einer chromosomalen Expression des *Lux*-Operon zu erwarten ist, wurden in dieser Arbeit eine Reihe von Konstrukten entwickelt, die *luxCDABE* in das Chromosom von *H. pylori* integrieren können. Dies geschah besonders deswegen, weil bei den Infektionsexperimenten mit *H. pylori* eine Reisolation der Keime bei ausreichender Erregerlast erst nach mindestens 3 Wochen durchgeführt wird und somit eine langfristige stabile Expression des *Lux*-Operons von Nöten ist ohne dass ein spezieller Selektionsdruck aufrecht erhalten wird. Gleichwohl wurden aber auch Konstrukte entwickelt, die Teile des *Lux*-Operon in das

intrinsische Plasmid pHel12 inserieren, welches die Möglichkeit beinhaltet einen direkten Austausch zwischen verschiedenen Stämmen vorzunehmen.

Mit der chromosomalen Integration des *Lux*-Operon folgt diese Arbeit dem Vorgehen in der Literatur, jedoch wurden hierbei keine Transposons verwendet (siehe zum Beispiel: Francis et al. 2001), sondern Plasmide mit flankierenden homologen Sequenzen zu nicht essentiellen Genloci des *H. pylori* Chromosoms.

Das allgemein verwendete Modell bei der *in vivo* BLI ist das Mausmodell, da Mäuse besonders aufgrund ihrer geringen Körpergröße weniger Schwächung des von den Bakterien emittierten Lichts zeigen. Die in dieser Arbeit verwendeten mongolischen Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) sind in der Literatur von BLI nicht weit verbreitet. So ist uns nur eine Veröffentlichung bekannt, welches das Gerbilmodell bei der Biolumineszenz Bildgebung zur Infektion mit *Listeria monocytogenes* verwendet (Disson et al. 2008), sich aber durch eine besonders hohe Erregerlast auszeichnete, sodass die Detektion von Biolumineszenz auch in der vergleichsweise großen Wüstenrennmaus möglich wurde.

Soweit es bei *H. pylori* möglich war, wurde in dieser Arbeit der schon bei anderen Bakterien erfolgreich beschrittene Weg zur Generierung eines biolumineszierenden Erregerstammes gewählt. Allerdings bleibt anzumerken, dass die Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten dadurch erschwert wird, dass es sich bei *H. pylori* um ein sehr spezielles Bakterium handelt, welches zusätzlich noch ein äußerst spezielles Habitat bevorzugt. So ist *H. pylori* kein Erreger, der *in vivo* eine Wachstumskinetik mit fulminantem Verlauf zeigt, wie viele in den BLI Studien verwendeten Bakterien. Im Zuge dessen sind Experimente mit *H. pylori in vivo* äußerst zeitaufwendig, da mindestens 3-4 Wochen benötigt werden, um überhaupt eine ausreichende Erregerlast zur Reisolierung zu gewährleisten. Diese Tatsache führt dazu, dass an ein Konstrukt, welches Biolumineszenz bei *H. pylori* im Tiermodell bewirkt, höchste Ansprüche im Bezug auf Stabilität gestellt werden müssen. Im Gegensatz zu Arbeiten, welche sich mit hoch pathogenen Erregern und fulminanten Verläufen beschäftigen, bedeutet dies, dass das in *Helicobacter* klonierte *Lux*-Operon ohne einen Selektionsvorteil zu bieten stabil über mehrere Wochen exprimiert werden muss, um die Kinetik einer *H. pylori* Infektion abbilden zu können. Neben einem stabilen Insertionsort des *Lux*-Operons im *H. pylori* Genom erfordert dies auch einen Promotor, dessen Aktivität *in vivo* langfristig garantiert werden kann.

Mit H-10/11 konnten wir schließlich eine *H. pylori* Mutante generieren, welche auch nach 7 bis 8 Wochen im Tier eine Expression des *Lux*-Operons und damit Biolumineszenz zeigte, ohne dass eine spezifische Selektion *in vivo* zum Beispiel mit Antibiotika vorgenommen werden musste. In diesem Experiment wurden Wüstenrennmäuse im Rahmen einer Tripleinfektion mit verschiedenen biolumineszierende *H. pylori* Stämme (H-25, H-19, H-10/11) gleichzeitig infiziert um einen gewissen Selektionsdruck zwischen den Stämmen zu generieren. Von den hierbei reisolierten *H. pylori*, welche alle dem Stamm H-10/11 an gehörten, zeigten nach Untersuchung der einzelnen Kolonien alle Biolumineszenz. Allerdings konnten im primären Koloniesierungsversuch die biolumineszierenden *H. pylori* nur am geöffneten Magen detektiert werden. Das Konstrukt welches bei H-10/11 verwendet wurde erfüllt also den Anspruch an Stabilität, der beim BLI mit *H. pylori* nötig ist, jedoch ist die hierbei emittierte Intensität der Biolumineszenz für das Gerbilmodell in der jetzigen Versuchsanordnung noch zu gering.

4.2. Eignung des verwendeten Tiermodells für *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung

In der vorliegenden Arbeit gelang es Biolumineszenz in *H. pylori* mithilfe verschiedener Konstrukte zu erreichen. Allerdings zeigte sich die Darstellung der biolumineszierenden Erreger im Tiermodell schwieriger als erwartet.

Die Arbeit mit biolumineszierenden Keimen verlangt immer eine Gratwanderung zwischen den zur Detektion *in vivo* benötigten Biolumineszenzwerten und den Werten, die das Wachstum und die Kolonisierung des Erregers gerade noch nicht beeinträchtigen. Die Möglichkeit *H. pylori* im Magen von mongolischen Wüstenrennmäusen darzustellen ist, wie bei anderen Arbeiten, die sich mit biolumineszierenden Keimen befassen, von der Absorption der Biolumineszenz *in vivo* abhängig. Je größer das verwendete Versuchstier, desto weniger Biolumineszenz kann von Außen aufgrund zunehmender Absorption detektiert werden. So stellt das Mausmodell bei BLI den Goldstandard dar. In dieser Arbeit wurde aber mit mongolischen Wüstenrennmäusen gearbeitet, da diese einen Modellorganismus zur Kanzerogenität von *H. pylori* darstellen (Watanabe *et al.*, 1998). Allerdings sind Wüstenrennmäuse viel größer als die bei der *in vivo*

Biolumineszenz Bildgebung eigentlich üblichen Mäuse, was die Abschwächung des emittierten Lichts durch Streuung und Absorption vergrößert, besonders dann, wenn es sich, wie in dieser Arbeit, um ein Biolumineszenzsystem mit bevorzugt blau-grüner (490nm) Emission handelt. Des Weiteren gibt es bei Gerbils keine so wie bei Mäusen üblichen Mutanten mit weißem Fell oder fellose Mutanten. So müssen die Wüstenrennmäuse vor Messung der Biolumineszenz entweder enthaart werden, oder eine weitere Absorption der Biolumineszenz durch das Fell (aber auch durch das Melanin der Haut) in Kauf genommen werden.

Ein weiteres Hindernis zur Detektion von biolumineszierenden *H. pylori* stellt das Habitat dieses Keimes dar - der Magen. Der Magen wird beim Gerbil zu einem großen Teil gerade in der Region des Antrums von der Leber verdeckt. Die Leber aber, als blutreiches Organ, absorbiert durch das reichliche Vorkommen von Hämoglobin einen Großteil der Biolumineszenz besonders im blau-grünen Bereich (Taroni *et al.*, 2003). Dabei sind in dem hier verwendeten Luciferasesystem von *Photobacterium luminescens* nur ca. 10% des emittierten Lichts dem Bereich von 600nm zuzuordnen (Rice *et al.* 2001), welcher die beste Gewebegängigkeit besitzt. Trotzdem wurde an diesem *Lux*-System festgehalten, da es keine Zugabe von Substrat benötigt und somit autark funktioniert.

Bis jetzt konnten biolumineszierende *H. pylori* im Tiermodell nur kurz nach der Infektion, wenn eine sehr große Erregerlast vorlag, und nach Aufschneiden des Magens detektiert werden, was zusätzlich die Frage aufwirft, ob der Sauerstoffgehalt im Magenmucus und im Bereich der *Foveolae* überhaupt zur Biolumineszenz ausreichend ist. Da *H. pylori* ein mikroaerophiler Erreger mit einem Wachstumsoptimum bei 2-5% O₂ (*in vitro*) ist (Kusters *et al.*, 2006), kann der Sauerstoffgehalt im Magen und speziell im Magenmucus als relativ niedrig angenommen werden, allerdings konnte gezeigt werden, dass bei marinen Bakterien Biolumineszenz schon ab einer Sauerstoffkonzentration von 10 nmol möglich ist (Bourgois *et al.*, 2001). Auch Studien über die Besiedlung des murinen Darms durch *Citrobacter rodentium* (Wiles *et al.* 2006) und *E. coli* (Foucault *et al.* 2010) konnte Biolumineszenz im Darmtrakt detektieren. Voraussetzung dabei war allerdings eine intakte Blutzirkulation, also ein lebendes Versuchstier, wobei sich aber ein direkter Zell-Bakterienkontakt als nicht essentiell für die Biolumineszenzemission herausstellte (Wiles *et al.* 2006). So kann zumindest das Kolon als nicht vollständig

anaerob gelten, wie es sich allerdings mit dem Magenmukus verhält, ist nicht bekannt.

4.3. Biolumineszierender *H. pylori* – Kolonisierung, Persistenz und Erregerlast im Gerbil

In den bisherigen *in vivo* Arbeiten mit biolumineszierenden Keimen wurden vor allem pathogene Erreger verwendet, die in relativ kurzer Zeit sehr schnell im Organismus hochwachsen und meist eine sehr große Erregerlast bedingen. Bei *H. pylori* hingegen sind ungefähr vier Wochen nötig um eine ausreichende Erregerlast zu sichern, die überhaupt eine Rückisolierung mit großer Wahrscheinlichkeit gewährleisten kann. Dieser relativ lange Zeitraum stellt hohe Ansprüche an die Stabilität des *Lux*-Operon im *H. pylori*. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnte diese Stabilität mit dem H-10/11-Stamm erreicht werden. Allerdings war wie oben erwähnt die mit diesem Stamm erreichbaren Biolumineszenzwerte nicht auszureichen, um sie *in vivo* mit den uns verfügbaren Geräten zu detektieren.

Eine Steigerung der Biolumineszenz durch Teilung des *Lux*-Operon *in vitro* war möglich, jedoch konnte bis jetzt mit diesen Stämmen (H-25, H-20) keine Kolonisierung im Gerbil erreicht werden. Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass zur Konstruktion dieser Stämme als Insertionsort eines Teils des *Lux*-Operon der *TrpA*-Lokus gewählt wurde, welcher sich bis jetzt nur in der Maus bewährt hat. Hinweise darauf liefert die Tatsache, dass der Stamm H-10/11, welcher *luxCDABE-mut* unter dem *flaA*-Promotor im *moeB*-Lokus exprimiert, Gerbils kolonisieren kann, bei dem Stamm H-19, welcher *luxCDABE-mut* im *TrpA*-Lokus unter einem *uptetO*-Promotor exprimiert, dies jedoch nicht gezeigt werden konnte.

Weiter scheint auch denkbar, dass bei exzessiven Biolumineszenzwerten, wie sie die geteilten Konstrukte H-25 und H-20 zeigen, die Kolonisierung von *H. pylori* erschwert bis unmöglich gemacht wird. Insgesamt wissen wir sehr wenig welche Auswirkungen die Expression des *Lux*-Operons auf *H. pylori* im Einzelnen hat. Zwar scheint das Wachstum *in vitro* besonders von Stamm H-25 nicht beeinträchtigt zu sein, allerdings liegen keine Hinweise vor, welche Störfaktoren, wie zum Beispiel das als Substrat gebildete Aldehyd, die Kolonisierung und Persistenz von biolumineszierenden *H. pylori in vivo* beeinflussen.

So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität des *Lux*-Operons Auswirkung auf die Kolonisierungsfähigkeit im unwirtlichen Magen hat.

4.4. Aussagekraft des Modells

Wenn allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass die Kolonisierungsfähigkeit durch die Expression des *Lux*-Operons gestört wird, stellt sich auch die Frage inwiefern das Modell Rückschlüsse auf die „Normalsituation“, sprich der Infektion durch den Wildtyp, zulässt. So müssen weitere Untersuchungen zeigen, inwiefern mit biolumineszierenden *H. pylori* erhobene Daten einen induktiven Schluss zulassen können. Jedoch ist dies ein Problem unter dem das ganze Modell der *in vivo* Bildgebung von biolumineszierenden Erregern zu leiden hat.

4.5. Verbesserungsmöglichkeiten und Ausblick

Welche Anstrengungen könnten zusätzlich unternommen werden, um BLI bei *H. pylori* zu verbessern? Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Biolumineszenz bei *H. pylori in vitro* und *in vivo* prinzipiell möglich ist, sowie eine stabile Expression des *Lux*-Operons in *H. pylori in vivo* erreicht wurde, ist es nun wichtig die Detektierbarkeit des Systems zu verbessern.

Um die Biolumineszenzrate der schon vorhandenen Konstrukte zu optimieren wäre es von Vorteil eine *H. pylori*-Codon adaptierte Version des *Lux*-Operon zu konstruieren, um somit eine optimale Expression des *Lux*-Operon zu sichern. So könnte das *Lux*-Operon synthetisch, mit auf die Bedürfnisse von *H. pylori* optimal zugeschnittenen genetischen Code hergestellt werden. In der Literatur gibt es manche Daten, die zeigen, dass ein solches Vorgehen erfolgreich sein kann (Craney *et al.* 2007), jedoch gibt es gleichzeitig auch Fälle, in denen eine so erregerspezifisch modifizierte Version des *Lux*-Operons nicht mehr funktionsfähig war (Andreu *et al.*, 2010b). Vorstellbar wäre auch eine Neuordnung des *luxCDABE* Gencluster in *luxABCDE* und Einfügung eines eigenen Promotors für *luxCDE*. Dieses Konstrukt könnte dann als gesplittete Variante in einen einzigen Genlokus (zum Beispiel dem

moeB-Lokus) inseriert werden. So wäre zum Beispiel folgendes Konstrukt denkbar: *alpA_luxAB_flaA_luxCDE*.

Des Weiteren wäre es möglich *cagA*-negative Mutanten einzusetzen, um eine erhöhte Erregerdichte im Gerbil zu erreichen und dadurch die detektierbare Biolumineszenz zu steigern. Allerdings würde somit die Übertragbarkeit des Modells auf die Infektion mit dem Wildtyp erheblich eingeschränkt. Zusätzlich würde ein solches Vorgehen dem Modell die Möglichkeit nehmen, einen der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren *in vivo* nachzuvollziehen.

Erfolgsversprechend scheint auch eine Infektion von neugeborenen Gerbils mit den in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukten. Die verwendeten Versuchstiere würden in diesem Fall wegen ihrer geringen Körpergröße weniger Biolumineszenz absorbieren und zusätzlich eine erhöhte Erregerdichte gewährleisten können. Beide Faktoren könnten die Detektion von Biolumineszenz verbessern. Ferner könnten bei einem solchen Versuchsansatz die Kinetik der Kolonisation des Magens durch *H. pylori* bei noch nicht vollständig gereiftem Immunsystem anschaulich dargestellt werden.

Auch neuartige Geräte zum BLI könnten die Wahrscheinlichkeit erhöhen geringe Mengen an Biolumineszenz bei großem Versuchstier bzw. geringer Erregerlast zu detektieren. So ist es mit der heutigen Technik schon möglich BLI bei Tieren vorzunehmen, die sich nicht in Narkose befinden, da die nötigen Messzeiten bei den hochsensiblen CCD-Kameras immer kleiner werden.

Sollte sich das Gerbilmodell trotz allem als ungeeignet zur Bildgebung von biolumineszierenden *H. pylori* erweisen, wäre es möglich die vorhandenen Konstrukte in einem mausadaptierten Stamm zu exprimieren. Dazu wäre eine Insertion des *Lux*-Operons in den schon in der Maus bewährten *TrpA*-Lokus des *H. pylori* Stamms X47 möglich. Die hierbei benötigten Konstrukte sind schon zum Großteil einsatzbereit.

Möglich wäre auch die Verwendung eines anderen Luciferasesystems mit einer erhöhten Emission im 600nm Bereich und damit geringerer Absorption im Gewebe. Allerdings birgt ein Umstieg auf andere Formen der Biolumineszenzsysteme natürlich die Schwierigkeit, dass das jeweilige Substrat oral zugeführt werden muss. Das *firefly*-Luciferasesystem von *Photinus pyralis* zum Beispiel hätte den Vorteil, dass es ein System mit größter Effizienz ist (Ando *et al.*, 2007) und im Tiermodell einen hohen Anteil an rotem Licht emittiert (Zhao *et al.*, 2005), was die Absorption und die Streuung minimiert. Inwiefern jedoch bei diesen Systemen das Substrat den

Magenmukus penetrieren kann und Entleerungszeiten des Magens bzw. andere Störgrößen eine Rolle bei der detektierbaren Biolumineszenzrate spielen können, ist aufgrund der großen Bandbreite an Variablen noch völlig unklar.

Im jetzigen Stadium ist es jedoch vor allem wichtig die schon vorhandenen biolumineszierenden Stämme von *H. pylori* weiter zu untersuchen. So sollten besonders die Infektionsversuche gerade mit dem reisolierten stabilen H-10/11 fortgeführt werden. Zusätzlich könnte versucht werden die Biolumineszenz von H-10/11 durch das Einfügen eines zusätzlichen *luxCDE*-Komplexes an geeigneter Stelle zu steigern. Somit könnte durch Bereitstellung von mehr Substrat die Biolumineszenzrate optimiert werden. Sollte ein solcher Stamm in seiner Kolonisierungsfähigkeit im Tiermodell beeinträchtigt werden, so könnte das zusätzliche *luxCDE* unter einem induzierbaren Promotor exprimiert werden, welcher nur im Bedarfsfall, also bei der Bildgebung, aktiviert wird.

Eine Frage stellt sich doch noch provokativ zum Schluss: Braucht es überhaupt ein *in vivo* Biolumineszenzsystem von *H. pylori*? Sind der zu erwartende Erkenntnisgewinn und der Nutzen eines solchen Systems so groß, dass es überhaupt der Mühen lohnt? Diese Frage lässt sich auch in Hinblick auf die vielen Arbeiten zur *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung von zahlreichen Bakterien beantworten. Die Möglichkeit die Kinetik einer Infektion am lebenden Tier darstellen zu können macht die BLI zu einer eleganten und erkenntnisreichen Methodik. So erhoffen wir uns durch diese Methode Studien für Antibiotika- und Impfwirkungen *in vivo* zu erleichtern, dadurch, dass die *H. pylori* Infektion sicher und longitudinal am lebenden Tier dargestellt werden kann. In den Tierversuchen mit *H. pylori* wäre es allein schon von Vorteil überhaupt eine Infektion noch auf andere Art als die Reisolation beweisen zu können. Welchen Erkenntnisgewinn die Biolumineszenz Bildgebung von *H. pylori* darüber hinaus mit sich bringen wird, wird die Zukunft zeigen.

5. Zusammenfassung

Infektionskrankheiten zählen noch immer zu den häufigsten Todesursachen weltweit; dabei gelangen durch Impfmüdigkeit und neu erworbene Antibiotikaresistenzen wieder Krankheiten in den Fokus, die der moderne Mensch schon längst besiegt glaubte. Auch die Eradikation des humanpathogenen Bakteriums *Helicobacter pylori* wird aufgrund veränderter Antibiotikaresistenzlage immer schwieriger.

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, spiralförmiges Bakterium, dessen natürliches Habitat der menschliche Magen darstellt. Ungefähr 50% der weltweiten Bevölkerung gelten als infiziert, wobei die Infektion nur in 10% der Fälle symptomatisch ist. Komplikationen einer *H. pylori* Infektion sind chronische Gastritis, *Ulcus ventriculi et duodeni*, Magenkarzinom und gastrales MALT-Lymphom. Obwohl die gemeinsame Geschichte von *Homo sapiens* und *Helicobacter pylori* weit zurückreicht, wurde *H. pylori* und sein Zusammenhang mit diversen Magenerkrankungen erst in den 80iger Jahren des 20. Jahrhunderts bekannt, was dazu führt, dass noch viele Fragen unbeantwortet sind. Biolumineszenz Bildgebung *in vitro* und *in vivo* könnte bei der Antwortsuche behilflich sein. Die Möglichkeit durch biolumineszierende Erreger Infektionen longitudinal und quasi unmittelbar im lebenden Tier darstellen zu können ohne das Versuchsobjekt bei der Untersuchung zu zerstören, stellt eine große Chance dar, die schon bei vielen verschiedenen Bakterien genutzt wurde.

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe des Luciferase-Operons des Bakteriums *Photobacterium luminescens* biolumineszierende *H. pylori* zu konstruieren und im Weiteren deren Überleben im Tiermodell zu testen. Dabei wurden verschiedene Konstrukte gewählt, die entweder das *Lux*-Operon (*luxCDABE*) im Ganzen exprimierten oder geteilt in seine funktionellen Einheiten *luxAB* und *luxCDE*. Weiter wurden verschiedene Insertionsorte und verschiedene Promotoren ausprobiert. Es gelang schließlich 7 verschiedene biolumineszierende *H. pylori* Mutanten mit verschiedenen Biolumineszenzintensitäten zu generieren. Von diesen *H. pylori* Mutanten konnte eine 8 Wochen nach Infektion aus dem Tier rückisoliert werden, wobei die Fähigkeit zur Biolumineszenz erhalten blieb.

Die ersten Schritte auf dem Weg zu einem biolumineszierenden *H. pylori* und der Biolumineszenz Bildgebung desselben *in vivo* sind getan. Verbesserungen der

Konstrukte, andere Promotoren, Insertionsorte, Modelltiere und neuartige CCD-Kameras lassen eine große Bandbreite an Variationen und Möglichkeiten zu, deren Ergebnisse sich in Zukunft weiter zeigen werden.

6. Literaturverzeichnis

Adams B L *et al.* Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. *Appl Environ Microbiol.* 69(12):7462–7466 (2003).

Amieva M R *et al.* Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science.* 300:1430-1434 (2003).

Ando Y *et al.* Firefly bioluminescence quantum yield an colour change by pH-sensitive green emission. *Nature Photonics.* 2(1):44-47 (2007).

Andreu N *et al.* Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. *FEMS Microbiol Rev.* 35: 360-394 (2010).

Andreu N *et al.* Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PLoS One.* 5:e10777 (2010b).

Andrutis K A. Inability of an isogenic urease-negative mutant stain of *Helicobacter mustelae* to colonize the ferret stomach. *Infect Immun.* 63(9): 3722–3725 (1994).

Appelmek B J. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun.* 64:2031–2040(1996).

Appelmek B J & Vandenbroucke-Grauls C M J E. Lipopolysaccharide Lewis Antigens in „*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics“. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Washington (DC): ASM Press (2001).

Atherton J C *et al.* Mosaicism in vakuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 270:17771-17777 (1995).

Blaser M J & Atherton J C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 113: 321-333 (2004).

Bagnoli F *et al.* *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci.* 102:16339-16344 (2005).

Bizzozero G. Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch Mikr Anat.* 42:82 (1893).

Blanke S R & Cover T L. *Helicobacter pylori* vaculating toxin in „*Helicobacter pylori*: Molecular genetics and cellular biology“ Yamaoka Y (editor). Norfolk (UK). Caister Academic Press (2008).

Bourgois J J *et al.* Kinetics of light emission and oxygen consumption by bioluminescent bacteria. *J Bioenerg Biomembr.* 33:353-363 (2001).

- Brown L M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routs of Transmission. *Epidem Reviews*. 22(2):283-297 (2000).
- Brown L M *et al.* *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand J Infect Dis*. 33:686-691 (2001).
- Burns-Guydish S M *et al.* Monitoring age-related susceptibility of young mice to oral *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection using an *in vivo* murine model. *Pediatr Res*. 58:153-158 (2005).
- Bury-Mone *et al.* The *Helicobacter Urel* protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for ist activity and for acid activation. *Mol Mikrobiol*. 42:1021-1034 (2001).
- Cai X *et al.* *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterol*. 128:1937-1952 (2005).
- Chen Y & Blaser M J. Inverse association of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med*. 167(8):821-827 (2007).
- Contag C H *et al.* Potonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol*. 18:593-603 (1995).
- Covacci A & Rappuoli R. *Helicobacter pylori*: After the Genomes, Back to Biology. *J Exp Med*. 197(7):807-811 (2003).
- Cover T L & Blaser M J. Purification and characterization of the vakuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 267:10570-10575 (1992).
- Cover T L *et al.* Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*. 63:951-957 (2003).
- Craney A *et al.* A synthetic *luxCDABE* gene cluster optimized for expression in high-GC bacteria. *Nucleid Acid Res*. 35:e46 (2007).
- Cussac V *et al.* Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol*. 174(8): 2466-2473 (1992).
- Dailidiene D *et al.* Contraselectable streptomycin susceptibility determinant for genetic manipulation and analysis of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*. 72:5908-5914 (2006).
- Debellis L *et al.* *Helicobacter pylori* cytotoxin VacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointes Liver Physiol*. 281:1440-1448 (2001).
- Devesa S S *et al.* Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer*. 83:2049-2053 (1998).
- Disson O *et al.* Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*. 455:1114-1118 (2008).

- Dixon M F *et al.* Classification and grading of gastritis. The update Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston. *Am J Surg Pathol.* 20:1161-1181 (1994).
- Dixon M F. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration in „*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics“. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Washington (DC): ASM Press (2001).
- Dore M P *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep – implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol.* 96:1396-1401 (2001).
- Dorer M S *et al.* *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog.* 5:e1000544 (2009).
- Doyle T C *et al.* *In vivo* bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cellular Microbiolog.* 6:303-317 (2004).
- Eaton K A *et al.* *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 57:1119-1125 (1989).
- Eaton K A *et al.* Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 59:2470–2475 (1991).
- Eaton K A *et al.* Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 37:123–127 (1992).
- Eaton K A & Krakowa S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 62(9):3604–3607(1994).
- Eaton K A *et al.* Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 65:3462-3464 (1997).
- Eckart W U. Geschichte der Medizin: Fakten, Konzepte, Haltungen. 6. völlig neu bearbeitete Auflage, Springer Berlin Heidelberg (2009).
- El-Omar EM *et al.* Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 404:398-402 (2000).
- Engelsman A F *et al.* Real time noninvasive monitoring of contaminating bacteria in a soft tissue implant infection model. *J Biomed Mater Res B.* 88:123-129 (2009).
- Enno A *et al.* MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*-a mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *Am J Pathol.* 147:217-222 (1995).
- Enroth H *et al.* *In vitro* aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter.* 4:7-16 (1999).
- Ermak T *et al.* Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted response. *J Exp Med.* 188:2277-2288 (1998).

- Falush D *et al.* Traces of Human Migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 299:1582 (2003).
- Farnbacher M *et al.* Sequencing, annotation, and comparative genome analysis of the gerbil-adapted *Helicobacter pylori* strain B8. *BMC Genomics*. 11:335 (2010).
- Ferrero R L & Fox J G. *In vivo* Modeling of *Helicobacter*-associated Gastrointestinal Diseases in „*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics“. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Washington (DC): ASM Press (2001).
- Fischbach W *et al.*, S3-Leitlinie „*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit“ der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten ... *Z Gastroenterol*. 47:68-102 (2009).
- Forsyth M H *et al.* Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun*. 66:3088-3094 (1998).
- Foucault *et al.* *In vivo* Bioluminescence Imaging for the study of Intestinal Colonization by *Escherichia coli* in mice. *Appl Environ Microbiol*. 76(1):264-274 (2010).
- Francis K P *et al.* Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using *Streptococcus pneumoniae* transformed with novel gram-positive lux transposon. *Infect Immun*. 69:3350-3358 (2001).
- Franco AT *et al.* Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci*. 102:10646-10651 (2005).
- Galmiche M *et al.* The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome *c* release. *EMBO J*. 19:6361-6370 (2000).
- Genta R M. Review article: after gastritis – an imaginary journey into an *Helicobacter*-free world. *Aliment Pharmacol Ther*. 16(4):89-94 (2002).
- Glomski I J *et al.* Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS Pathog*. 3:e76 (2007).
- Glover D M (Editor). DNA cloning - a practical approach volume I: Core Techniques. Practical approach series. *Oxford University Press*. 2 edition (1995).
- Goodman K J *et al.* *Helicobacter pylori* infection in the colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am J of Epi*. 144(3):290-299 (1996).
- Goodwin C S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*. 39:397-405 (1989).

- Grant SG *et al.* Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:4645-4649 (1990).
- Gupta R K *et al.* Expression of *Photobacterium luminescens* lux genes (lux A, B, C, D and E) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 4:305-313 (2003)
- Ha N C *et al.* Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol*. 8:505-509 (2001).
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 166:557-580 (1983).
- Hastings J W. Bacterial Bioluminescence: light emission in the mixed function oxidation of reduced flavin and fatty aldehyde. *CRC Crit Rev Biochem*. 5(2):163-84 (1978).
- Hastings J W. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*. 173:5-11 (1996).
- Hardy J *et al.* Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science*. 303:851-853 (2004).
- Hatakayama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol*. 44:239-248 (2009).
- Hemrajani C *et al.* Role of NleH, a type III secreted effector from attaching and effacing pathogens in colonization of the bovine, ovine and murine gut. *Infect Immun*. 76:4804-4813 (2008).
- Heuermann D & Haas R. A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol Gen Genet*. 257:519-528 (1998).
- Higashi H *et al.* SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*. 295:683-686 (2002).
- Hirayama F *et al.* Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian Gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol*. 31:755-757 (1996).
- Hisatsune J *et al.* *Helicobacter pylori* VacA enhances PGE2 production induction of COX-2 expression via a p38 MAP kinase/ARF-2-cascade in AZ-521 cells. *Infect Immun*. 75:4472-2281 (2007).
- Holmes D S & Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. 114:193-197 (1981).
- Inagaki H T *et al.* Gastric MALT lymphomas are divided into three groups based on responsiveness to *Helicobacter pylori* eradication and detection of API2-MALT1 fusion. *Am J Surg Pathol*. 28:1560-1567 (2004).

- Ilver D *et al.* *Helicobacter pylori* toxin *vacA* is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol.* 6:167-174 (2004).
- Ilver D *et al.* *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science.* 279:373-377 (1998).
- Israel *et al.* *Helicobacter pylori* strain specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest.* 107:611-620 (2001).
- Jaworski W. Prdcrecznik Chorob zoladka. *Wydawnictwa Dziel Lekarskirch Polskich:* 32 (1889).
- Jimenez-Soto L *et al.* *Helicobacter pylori* Type IV Secretion Apparatus Exploits β 1 Integrin in a Novel RGD-Independent Manner. *PLoS Pathog.* 5(12):e1000684 (2009).
- Kadurugamuwa J L *et al.* Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. *Infec Immun.* 71:882-890 (2003).
- Kadurugaguwa J L *et al.* Rapid direct method for monitoring antibiotics in a mouse model of bacterial biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3130-3137 (2003b).
- Kadurugaguwa J L *et al.* Reduction of astrogliosis by early treatment of pneumococcal meningitis measured by simultaneous imaging, *in vivo*, of the pathogen and host response. *Infect Immun.* 73:7836-7843 (2005).
- Kavermann *et al.* Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *JEM.* 197:813 (2003).
- Keenan J *et al.* A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 182:259-264 (2000).
- Kidd M & Modlin I M. A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost – paradims regained. *Digestion.* 59:1-15 (1998).
- Kimura M *et al.* Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog.* 26:45-52 (1999).
- Kodama M *et al.* *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 11:7063-7071 (2005).
- Kuipers E J *et al.* The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 9:59-69 (1995).
- Kuipers *et al.* Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implication for long-term safety. *Am J Gastroenterol.* 90:1401-1406 (1995b).

- Kusters JG *et al.* Cocoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun.* 65:3672-3679 (1997).
- Kusters J G *et al.* Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microb Reviews.* 19(3):449-490 (2006).
- Labenz J *et al.* Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterol.* 112:1442-1447 (1997).
- Letley D P *et al.* Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 278:26734-26741 (2003).
- Leunk *et al.* Cytotoxic activity in brothcultere filtrates of *Camphylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 26:93-99 (1988).
- Leying H *et al.* Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol.* 6:2863–2874 (1992).
- Linz B *et al.* An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature.* 445:915–918 (2007).
- Liu *et al.* Resistance of t(11;18) positive gastritic mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet.* 357:39-40 (2001).
- Loffeld R J *et al.* Colonization with *CagA*-positive *Helicobacter strains* inversely associated with reflux esohagitis and Barrett's esophagus. *Digestion.* 62:95-99 (2000).
- Malaty H M & Nyren O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Blackwell Publishing Ltd.* 8:8-12 (2003).
- Marshall B J & Warren J R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1(8390):1311-1315 (1984).
- Marshall *et al.* Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Camphylobacter*. *Med J Austr.* 142:436-439 (1985).
- Marshall B J *et al.* Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med J Austr.* 142:439–444 (1985b).
- Marshall B J. One Hundred Years of Discovery and Rediscovery of *Helicobacter pylori* and its Association with Peptic Ulcer Disease in „*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics“. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Washington (DC): ASM Press (2001).
- Mégraud F & Lamouliatte H. The treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 17:1333-43 (2003).
- Mégraud F *et al.* *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 53:1374-1384 (2004).

- Mizote T *et al.* Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect Immun.* 65:1519–1521 (1997).
- Mobley H L *et al.* Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* 59(3):451-480 (1995).
- Mobley H L. Urease in „*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics“. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Washington (DC): ASM Press (2001).
- Morris A J & Nicholson G I Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol.* 82(3):192-199 (1987).
- Mulhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag. 6. Auflage (2009).
- Mullis K *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio.* 51:263-273 (1986).
- Muotiala A *et al.* Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 60:1714–1716 (1992).
- Naito M *et al.* Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterol.* 130:1181-1190 (2006).
- Odenbreit S *et al.* Translokation of *Helicobacter pylori* *cagA* into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 287:1497-1500 (2000).
- Ohnishi N *et al.* Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(3):1003-1008 (2008).
- Orihuela C J *et al.* Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis.* 190:1661-1669 (2004).
- O'Rourke J L & Lee A. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Microbes and Infec.* 5:741-748 (2003).
- Pai R *et al.* *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 262:245-250 (1999).
- Palmer E. D. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. *Gastroenterology.* 27:218–220 (1954).
- Parsonnet J *et al.* Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA.* 282(23):2240-2245 (1999).
- Peek R M P & Blaser M J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2(1):28-37(2002).

- Peek R M P. *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Dis Model Mech.* 1: 50–55 (2008).
- Perez-Perez G I *et al.* Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 9: 1-6 (2004).
- Plummer M *et al.* Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer.* doi:10.1002/ijc.28999 [Epub ahead of print](2014).
- Poms R E & Tatini S. R. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4 degrees. *C Int J Food Microbiol.* 63:281-286 (2001)
- Rektorschek M *et al.* Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the Urel membrane protein and an inner membrane proton barrier. *Mol Microbiol.* 36:141–152 (2000).
- Rhead J L *et al.* A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterol.* 133:926-936 (2007).
- Rice B W *et al.* *In vivo* imaging of light emitting probes. *J Biomed Opt.* 6:432-440 (2001).
- Rieder G *et al.* *Helicobacter pylori* cag-Type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian Gerbils. *Gastroenterol.* 128:1222-1242 (2005).
- Rohrer S. Charakterisierung der Typ-IV-Sekretionssysteme und der kryptischen Plasmide von *Helicobacter pylori* hinsichtlich ihrer Beteiligung am DNA-Transfer. Dissertation LMU München (2010).
- Rohrer S *et al.* Multiple pathways of plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *PLoS One.* 7(9):e45623 (2012).
- Salama N R *et al.* Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun.* 69(2):730-736 (2001).
- Salomon H. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen (abstract 1). *Zentralbl Bakteriol.* 19:433–442 (1896).
- Satin B *et al.* 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 (1997).
- Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. 7-14 June 1994. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 61:1-241 (1994).
- Schmitt W & Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol.* 12:307-319 (1994).

- Segal E D *et al.* Altered states: Involvement of phosphorylated *CagA* in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *PNAS* 96(25):14559-14564 (1999).
- Sipponen P & Marshall B J. Gastritis and gastric cancer Western countries. *Gastroenterol Clin N Am.* 29:579-592 (2000).
- Sozzi M *et al.* Heterogeneity of *Helicobacter pylori cag* genotypes in experimentally infected mice. *FEMS Microbiol Lett.* 203:109-114 (2001).
- Spohn G & Scarlato V. Motility, Chemotaxis, and Flagella in „*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics“. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. Washington (DC): ASM Press (2001).
- Suerbaum S & Michetti P. Medical Progress: *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 347(15) (2002).
- Szabo I *et al.* Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin *VacA* of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* 18:5517-5527 (1999).
- Szittner R & Meighen E. Nucleotide sequence, expression and properties of luciferase coded by *lux* genes from a terrestrial bacterium. *J Biol Chem.* 265:16581-16587 (1990).
- Taroni P *et al.* *In vivo* absorption and scattering spectroscopy of biological tissues. *Photochem Photobio S.* 2:124-129 (2003)
- Telford J L *et al.* Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med.* 179:1653-1658 (1994).
- Troy *et al.* Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging.* 3:9-23 (2004).
- Turner G. A., *et al.* Trefoil peptides are unique chemotaxins for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 112:A1107 (1997).
- van Doorn L J *et al.* Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 115:58-66 (1998).
- Viala J *et al.* Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island. *Nat Immunol.* 5:1166-1174 (2004).
- Vinion-Dubiel A D *et al.* A dominant negative mutant of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits *VacA*-induced cell vacuolation. *J Biol Chem.* 274:37736-37742 (1999).
- Vuong C *et al.* Development of real-time *in vivo* imaging of device-related *Staphylococcus epidermidis* infection in mice and influence of animal immune status on susceptibility to infection. *J Infect Dis.* 198:258-261 (2008).

- Wang W C *et al.* Two distinctive cell binding patterns by vacuolating toxin fused with glutathione S-transferase: one high-affinity m1-specific binding and the other lower-affinity binding for variant forms. *Biochemistry*. 40:11887-11896 (2001).
- Watanabe T *et al.* *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterol.* 115:642-648 (1998).
- Wiles S *et al.* *In vivo* Bioluminescence Imaging of the Murine Pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 74(9):5391-5396 (2006).
- Worku M *et al.* Chemotactic response of *Helicobacter pylori* to human plasma and bile. *J Med Microbiol.* 53(8):807-811 (2004).
- Yagur-Kroll S & Belkin S. Upgrading bioluminescent bacterial bioreporter performance by splitting the lux operon. *Anal Bioanal Chem.* 400:1071-1082 (2011).
- Yang J *et al.* Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. *World J Gastroenterol.* 20(18):5283-5293 (2014).
- Yilmaz E. Seroprevalence of *Helicobacter palori* infection among children and their parents in eastern Turkey. *J Paediatr Child Health.* 33:183-186 (2002).
- Ye D & Blanke S R. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin amino terminus: identification of amino acids essential for cellular vacuolation. *Infect Immun.* 68:4354-4357 (2000).
- Zhao H *et al.* Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection *in vivo*. *J Biomed Opt.* 10(4):041210 (2005).
- Zheng Q *et al.* Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian Gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatho.* 19:1192-1198 (2004).

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
Amp ^R	Ampicillinresistenz
<i>alpA</i>	<i>alpA</i> -Promotor
Abb.	Abbildung
<i>aphA3</i>	<i>aphA3</i> -Resistenzkassette für Kanamycinresistenz
as-Primer	Antisense-Primer
ATP	Adenosintriphosphat
BabA	engl.: „ <i>blood group antigen binding adhesin</i> “
BB	engl.: „ <i>brucella broth</i> “; Brucella Medium
BLI	engl.: „ <i>bioluminescence imaging</i> “
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
<i>cagA</i>	Cytotoxin-assoziiertes Gen A
<i>cat/cat_{GC}</i>	<i>cat_{GC}</i> -Kassette; Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase und opa-Promotor aus Gonokokken
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
CFU	engl.: „ <i>colony-forming units</i> “
C-Terminus	Carboxyterminaler Bereich der DNA bzw. eines Proteins
DAP	Diaminopimelinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> (DNS; Desoxyribonukleinsäure)
<i>DNase I</i>	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat; Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erm ^R	Erythromycinresistenz
FCS	engl.: „ <i>fetal calf serum</i> “; Fötale Kälberserum
<i>fla</i>	Promotor des FlagellinA-Gens von <i>H. pylori</i>
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
<i>Hpy</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ₂ O _{dest.}	einfach destilliertes Wasser
K	Kalium

Kan ^R	Kanamycinresistenz
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
<i>luxAB</i>	Für die Luciferase codierender Teil des bakteriellen Luciferase-Operons
<i>luxCDABE</i>	bakterielle Luciferase-Operon
<i>luxCDABE-mut</i>	bakterielles Luciferase-Operon ohne interne <i>NdeI</i> -Schnittstelle
<i>luxCDE</i>	für den Substratbildenden Enzymkomplex codierender Teil des bakteriellen Luciferase-Operons
<i>luxCDE-mut</i>	für den Substratbildenden Enzymkomplex codierender Teil des bakteriellen Luciferase-Operons ohne interne <i>NdeI</i> -Schnittstelle
Lux-Operon	Bakterielles Luciferase-Operon von <i>Photobacterium luminescens</i>
M	Molar (mol/l)
MALT	engl.: „ <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> “
<i>mcc</i>	<i>mcc</i> -Promotor
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>moeB</i>	Lokus im Helicobacterchromosom codierend für ein Molybdopterin Biosynthese Protein
μ-	mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
n-	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550nm
OMP	engl.: „ <i>outer membrane protein</i> “
<i>orf</i>	engl.: „ <i>open reading frame</i> “
PAI	Engl.: „ <i>pathogenicity island</i> “
PBS	Phosphatgepufferte NaCl- Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RLU	engl.: „ <i>relative luminescence units</i> “, nicht standartisierte Einheit zur Darstellung von Biolumineszenzintensität
rpm	engl.: „ <i>rounds per minute</i> “; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
s	Sekunden
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
s-Primer	Sense-Primer
Strep ^R	Streptomycinresistenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrogenchlorid
<i>TrpA</i>	Lokus im Helicobacterchromosom codierend für eine Tryptophan Synthase
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolet
V	Volt
<i>vacA</i>	engl.: „ <i>vacuolating cytotoxin A</i> “
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spezifität und Sensitivität von <i>H. pylori</i> Diagnoseverfahren	18
Tabelle 2: Häufigkeit der Resistenzen im Bezug auf verschiedene Antibiotika bei <i>Helicobacter pylori</i>	19
Tabelle 3: verwendete Plasmide	32
Tabelle 4: Oligonukleotide	38
Tabelle 5: <i>E. coli</i> Stämme	41
Tabelle 6: In dieser Arbeit hergestellte <i>E. coli</i> Mutanten	41
Tabelle 7: Ausgangsstämme <i>H. pylori</i>	42
Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte <i>H. pylori</i> Mutanten	43
Tabelle 9: <i>E. coli</i> Medien	43
Tabelle 10: <i>H. pylori</i> Medien	44
Tabelle 11: Antibiotika	44
Tabelle 12: kommerziell erhältliche Kits	45
Tabelle 13: Puffer für Enzymreaktionen	46
Tabelle 14: Puffer für Elektroporation in <i>H. pylori</i>	46
Tabelle 15: Puffer für Kochpräparation	47
Tabelle 16: Puffer für DNA-Elektrophorese	47
Tabelle 17. verwendete Molekulargewichtsmarker	47
Tabelle 18: PCR-Ansätze für TaKaRa und PAN	55
Tabelle 19: PCR-Programme für TaKaRa und PAN	56
Tabelle 20: PCR Programm für overlap-PCR	57
Tabelle 21: Ansatz für overlap-PCR	58

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathologie von <i>H. pylori</i> induzierten Erkrankungen	15
Abbildung 2: <i>H. pylori</i> Kolonisation	20
Abbildung 3: VacA-Wirkung	23
Abbildung 4: Entstehung von Biolumineszenz bei biolumineszierenden Bakterien	27
Abbildung 5: Konstrukte zur Rekombination in <i>moeB</i> -Lokus	35
Abbildung 6: Konstrukte zur Rekombination in <i>pHel12</i>	36
Abbildung 7: Konstrukte zur Rekombination in <i>TrpA</i> -Lokus	38
Abbildung 8: Durchführung einer overlap-PCR	57
Abbildung 9: <i>pJTLuxCDABE-cm</i>	67
Abbildung 10: Position der internen <i>NdeI</i> -Schnittstelle	68
Abbildung 11: Overlap-PCR an <i>Lux</i> -Operon zur Entfernung der internen <i>NdeI</i> -Schnittstelle	68
Abbildung 12: <i>moeB</i> -Lokus	70
Abbildung 13: <i>pSP77</i> - Plasmid zur Rekombination eines Inserts in den <i>moeB</i> -Lokus	70
Abbildung 14: Biolumineszenz der <i>DH5α</i> Klone mit <i>pBE2</i>	71
Abbildung 15: Biolumineszenz bei <i>Helicobacter pylori</i> B8 mit <i>pBE3</i>	73
Abbildung 16: Herstellung des <i>flaA</i> -Promotors	74
Abbildung 17: Verdau des Plasmids <i>pBE13</i> mit <i>Sall</i>	74
Abbildung 18: Biolumineszierende <i>H. pylori</i> B8 mit <i>pBE13</i>	75
Abbildung 19: Biolumineszierende <i>H. pylori</i> mit <i>pBE12</i>	76
Abbildung 20: Der <i>TrpA</i> Lokus in B8 und P12	77
Abbildung 21: B8 mit <i>uptetO_luxCDABE-mut_cat</i> im <i>TrpA</i> -Lokus	78
Abbildung 22: <i>pBE19</i>	79
Abbildung 23: schematische Darstellung von <i>pHel12</i> und <i>pHel8</i>	80
Abbildung 24: Plasmid <i>pBE7</i> und <i>pBE8</i>	83
Abbildung 25: <i>luxCDE</i> in <i>pLH2</i> – Plasmid <i>pBE9</i>	85
Abbildung 26: Insertion von <i>cat_alpA_luxCDE-mut</i> in <i>pHel12</i>	86
Abbildung 27: Kolonien von <i>Helicobacter pylori</i> B8 mit <i>alpA_luxCDE-mut</i> auf dem Plasmid und <i>uptetO_luxAB</i> auf dem Chromosom	86
Abbildung 28: Klonierung des <i>Lux</i> -Operon geteilt in <i>luxAB</i> und <i>luxCDE</i>	87
Abbildung 29: P12 mit <i>alpA_luxAB_cat</i> auf <i>pHel12</i>	89
Abbildung 30: <i>luxCDE-mut</i> in <i>pBlu_TrpA_fla</i>	90
Abbildung 31: Kolonien von <i>H. pylori</i> B8 mit <i>alpA_luxAB</i> auf dem Plasmid und <i>fla_luxCDE-mut</i> auf dem Chromosom	90
Abbildung 32: Klonierungsstrategie für ein geteiltes <i>luxCDABE</i> -Konstrukt mit <i>luxCDE</i> auf dem Chromosom und <i>luxAB</i> auf dem Plasmid	91
Abbildung 33: Zusammenfassung aller Konstrukte mit ungeteiltem <i>Lux</i> -Operon	92
Abbildung 34: Zusammenfassung der relevanten Konstrukte mit geteiltem <i>Lux</i> -Operon	92
Abbildung 35: Vergleich der verschiedenen biolumineszierenden <i>H. pylori</i>	93
Abbildung 36: Detektion von Biolumineszenz bei Gerbils nach der oralen Infektion	95
Abbildung 37: Gerbils post infectionem mit H-25	96
Abbildung 38: Gerbils nach Infektion mit einem Gemisch aus H-10/11, H-19 und H-25	97
Abbildung 39: Mägen der infizierten Gerbils 7 bzw. 8 Wochen nach Infektion	97
Abbildung 40: Reisolat aus Gerbils 8 Wochen nach Infektion mit einem Gemisch aus H-10/11, H-19 und H-25	98

7.4 Danksagungen

Es ist nur recht den Menschen zu danken, deren Sachkenntnisse, Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und Forschergeist mich inspiriert und unterstützt haben diese Arbeit in der nun dargelegten Form zu vollenden. Jedoch würde es den Rahmen dieser Arbeit bei Weitem sprengen, auch nur im Ansatz diesen Menschen die ihnen wirklich zustehende Dankbarkeit zu offenbaren.

Ich möchte besonders meinem Doktorvater, Professor Dr. Rainer Haas, danken, dessen stoische Ruhe, Freundlichkeit und Wissen mir eine stete Quelle der Inspiration waren. Wissenschaftliche Arbeit benötigt ein gewisses Maß an Frustrationstoleranz, die zu erlangen gerade am Anfang schwer ist. Ohne die fachliche aber auch menschliche Unterstützung, die ich in der Arbeitsgruppe Rainer Haas erfahren durfte, wäre es mir sehr schwer gefallen diese Arbeit so zu vollenden und so danke ich jedem Einzelnen der Arbeitsgruppe Haas für jedes aufmunternde Wort, wenn nach Wochen der Arbeit kein hinreichendes Ergebnis erzielt werden konnte, für jede Freundlichkeit und Hilfestellung bei der Suche nach Lösungsmöglichkeiten bei im Augenblick schier unüberwindliche Problemstellungen. Danke.

Zusätzlich möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie danken, die mich in ihrer immerwährenden Geduld immer und uneingeschränkt bei allem was ich tue so liebevoll unterstützt.

7.5 Curriculum vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name, Vorname: Eberle, Barbara Sandra

Geburtsdatum: 4. August 1987

Geburtsort: Kempten im Allgäu

Nationalität: Deutsch

Kontaktadresse: Pfaffenhofen 9; 87490 Haldenwang
Tel.: 0049-8374-5617

AUSBILDUNG

1994 – 1998 Grundschule Haldenwang

1998 – 2007 Allgäu-Gymnasium in Kempten

7/2007 Abitur mit der Gesamtnote 1,0
Leistungskurse: Biologie, Latein

2007 – 2014 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

8/2009 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)

4/2014 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)

STIPENDIUM und FÖRDERUNG

2007 – 2014 Max- Weber-Programm des Freistaates Bayern zur Hochbegabtenförderung nach dem Bayrischen Eliteförderungs-gesetz

2007 Bio Zukunftspreis

2011 - 2012 Promotionsstudium Molekulare Medizin des Förderprogramms für Forschung und Lehre

(FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

PRAKTISCHES JAHR (2/2013 – 1/2014)

Urologie	Klinikum Memmingen Urologische Klinik und Prostatazentrum (Prof. Dr. Schneede)
Innere Medizin	Klinikum Memmingen, Innere Medizin I (Prof. Dr. König) Innere Medizin II (Prof. Dr. Pfeifer)
Chirurgie	Klinikum Memmingen Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie (Prof. Dr. Gutt) Unfallchirurgie (Prof. Dr. Schinkel)

FAMULATUR

Gynäkologie (2010)	Klinikum Kempten (Prof. Dr. Felberbaum)
Urologie (2010)	Klinikum Memmingen (Prof. Dr. Schneede)
Allgemeinmedizin (2012)	Arztpraxis Dr. Paulus Eberle, Probstried
Allgemeinmedizin (2012)	Arztpraxis Dr. Paulus Eberle, Probstried

DISSERTATION

Die Doktorarbeit mit dem Titel „Herstellung eines biolumineszierenden *Helicobacter pylori* Stammes – und dessen Einsatz im Tiermodell der Mongolischen Wüstenrennmaus“ wurde im Rahmen des Promotionsstudiums Molekulare Medizin des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München mit einem Stipendium gefördert.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Abteilung Bakteriologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Haas im Zeitraum Februar 2011 bis März 2013 angefertigt.

Eidesstattliche Versicherung

Eberle, Barbara

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Herstellung eines biolumineszierenden Helicobacter pylori Stammes-
und dessen Einsatz im Tiermodell der Mongolischen Wüstenrennmaus**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Haldenwang, 20.06.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand