

**Genetische und biochemische Untersuchungen
zum Aufbau und zur Funktion
des Cag Typ IV-Sekretionssystems von
*Helicobacter pylori***

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt

der Technischen Universität München

-Dr.rer.nat.-

vorgelegt von

Renate Buhrdorf

München 2004

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Mikrobiologie

**Genetische und biochemische Untersuchungen zum Aufbau
und zur Funktion des Cag Typ IV-Sekretionssystems von
*Helicobacter pylori***

Dipl. Biol. Univ. Renate Buhrdorf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Höll

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

2. Univ.-Prof. Dr. R. Haas, Ludwig-Maximilians
Universität München

Die Dissertation wurde am 02.02.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.03.2004 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Haas im Zeitraum Mai 2000 bis Januar 2004 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Fischer, W., Püls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. & Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology* **42**, 1337-1348.

Fischer, W., Buhrdorf, R., Gerland, E. & Haas, R. (2001) Outer Membrane Targeting of Passenger Proteins by the Vacuolating Cytotoxin Autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* **69**, 6769-6775.

Buhrdorf, R., Förster, C., Haas, R. & Fischer W. (2003) Topological analysis of a putative VirB8 homologue essential for the *cag* type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 213-217.

Rohde, M., Püls, J., Buhrdorf R., Fischer W. & Haas, R. (2003) A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system. *Molecular Microbiology* **49**, 219-234.

Savvides, S.N., Yeo, H-J., Beck M.R., Blaesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R. & Waksman, G. (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J.* **22**, 1969-1980.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
<i>aphA-3</i>	Kanamycinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
BlaM'	β -Lactamase ohne sekretorische Signalsequenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
<i>cat</i>	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>cat</i> _{GC}	Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase mit <i>opa</i> -Promotor aus Gonokokken und fd-Terminator
Chr.	Chromosom
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
C-Terminus	Carboxyterminaler Teil eines Proteins
DAP	Diaminopimelinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DR	„direct repeats“
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EM	Elektronenmikroskopie
EPEC	enteropathogener <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	und andere
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
(x)g	x-faces der Erdbeschleunigung
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GSP	„general secretory pathway“
HGF	humaner Wachstumsfaktor
His ₆	sechs Histidinreste
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hsp	Hitzeschockprotein

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IgA	Ig der Klasse A
IgG	Ig der Klasse G
IL	Interleukin
IR	„inverted repeats“
IS	Insertionssequenzen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
m.o.i.	“multiplicity of infection”
mRNA	“messenger” RNA
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
Nr.	Nummer
nt	Nucleotid(e)
N-Terminus	Aminoterminaler Teil eines Proteins
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x
Omp	äußeres Membranprotein
<i>ori</i> _{ColE1}	Replikationsursprung des ColE1-Plasmids
orf	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>P</i> _{flaA}	Promotor des <i>flaA</i> Gens von <i>H. pylori</i>
<i>P</i> _{IgA}	Promotor des Gens für die IgA-Protease von Gonokokken
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Meerrettichperoxidase
P-Tyr	Phosphotyrosin
x ^R	x-resistent
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src Homologieregion 2
spp.	sub species
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tet	Tetracyclin
Tn	Transposon
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TP	Tyrosinphosphorylierung
TPM	Tyrosinphosphorylierungsmotiv
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-isothiocyanat

Abkürzungsverzeichnis

UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Einheiten

A	Ampere
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
F	Farad
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
kb	kilo-Basenpaare
l	Liter
m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt
Ω	Ohm

Vorsätze

k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	pico	10^{-12}

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
1	Pathogenese und Epidemiologie von <i>H. pylori</i>	1
2	Virulenzfaktoren	3
3	Die <i>cag</i> Pathogenitätsinsel	7
4	Typ IV-Proteinsekretionssysteme	10
5	Zielsetzung	13
II	MATERIAL UND METHODEN	14
1	Material	14
1.1	Bakterienstämme	14
1.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	14
1.1.2	<i>Helicobacter pylori</i> -Stämme	14
1.2	Zelllinie	16
1.3	Plasmide	16
1.4	Oligonukleotide	19
1.5	Antikörper	21
1.5.1	Primäre Antikörper	21
1.5.2	Sekundäre Antikörper	21
1.6	Enzyme und Proteine	22
1.7	Molekulargewichtsmarker	22
1.8	Nährmedien und Platten	22
1.9	Antibiotika und Zusätze in Selektivmedien und -platten	23
1.10	Puffer und Lösungen	23
1.11	Chemikalien	26
1.12	Geräte und Apparaturen	27

2	Methoden.....	27
2.1	Bakterien- und Zellkulturen.....	27
2.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	27
2.1.2	Messen der optischen Dichte von Flüssigkulturen.....	28
2.1.3	Transformation von Bakterien.....	28
2.1.4	Konjugation von Bakterien.....	30
2.1.5	Transposonmutagenese.....	30
2.1.6	Zellsubfraktionierung von <i>H. pylori</i>	31
2.1.7	Kultivierung von Zellkulturen.....	32
2.1.8	Infektionsexperimente mit <i>H. pylori</i>	32
2.1.9	Herstellung bakterieller Zelllysate.....	33
2.2	Arbeiten mit DNA.....	33
2.2.1	Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	33
2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>H. pylori</i>	34
2.2.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>H. pylori</i>	34
2.2.4	Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA.....	34
2.2.5	DNA-Fragmentisolierung.....	35
2.2.6	Restriktion.....	35
2.2.7	Dephosphorylierung von linearer DNA.....	35
2.2.8	Zentrifugationsentsalzung.....	36
2.2.9	Ligation.....	36
2.2.10	DNA-Fällung mit Ethanol.....	36
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.2.12	Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning®.....	37
2.2.13	DNA-Sequenzierung.....	37
2.3	Arbeiten mit Protein.....	37
2.3.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	37
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
2.3.3	Fällung von Proteinen.....	39

2.3.4	His ₆ -markierte Proteine	39
2.4	Arbeiten mit Antikörpern	41
2.4.1	Western Blot und immunologischer Nachweis eines Antigens	41
2.4.2	Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von IL8	43
2.4.3	Auftrennung von Antikörpern über HiTrap ProteinG-Säulen.....	44
2.4.4	Absättigen von kreuzreagierenden Antikörpern gegen Nullmutanten.....	44
2.4.5	Enzymtests	45
2.5	Mikroskopie-Arbeiten.....	45
2.5.1	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	45
2.5.2	Elektronenmikroskopie	46
III	ERGEBNISSE	49
1	Systematische Mutagenese der <i>cag</i> PAI.....	49
1.1	Etablierung einer Methode zur Vermeidung von polaren Effekten bei der Mutagenese.....	49
1.2	Herstellung von <i>H. pylori</i> 26695 Mutanten in allen <i>cag</i> PAI-Genen	51
1.3	Untersuchungen zur Entstehung von polaren Effekten.....	52
1.4	Identifizierung von Genen der <i>cag</i> PAI, die für die CagA-Translokation essentiell sind	53
1.5	Analyse der Effekte einzelner Gene der <i>cag</i> PAI auf die IL8-Induktion	56
1.6	Gewinnung von Antikörpern gegen <i>cag</i> PAI-kodierte Proteine	57
1.6.1	Herstellung von His ₆ -markierten Fusionsproteinen	57
1.6.2	Austesten der Antiseren	60
1.7	Analyse des Einflusses definierter <i>cag</i> PAI-Mutationen auf die Expression oder Stabilität anderer Komponenten des Typ IV-Sekretions-systems.....	61
2	Studien zur Lokalisation und Topologie von <i>cag</i> PAI-kodierten Proteinen	63
2.1	Topologievorhersagen.....	63
2.2	Zellfraktionierung	65
2.3	Untersuchungen zum proteolytischen Abbau von <i>cag</i> PAI-kodierten Proteinen.....	67
2.4	Topologieanalysen	70

2.4.1	Identifizierung von HP530 als VirB8-Homolog	70
3	Mikroskopische Untersuchungen zur Oberflächenbeschaffenheit von <i>H. pylori</i> in Bezug auf den Aufbau des Typ IV-Sekretionsapparats	75
3.1	Absättigung der Antikörper für die Mikroskopie.....	76
3.2	Untersuchungen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop	77
3.3	Studien mit dem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop	79
3.4	Beobachtungen mit dem Rasterelektronenmikroskop.....	81
3.4.1	Mikroskopie einzelner Bakterien nach der Behandlung mit Immunogold	81
3.5	Mikroskopie von Bakterien mit AGS-Zellkontakt	85
4	Untersuchungen zur Komplementation der <i>hp525</i>-Deletionmutanten	87
4.1	Erzeugung von Plasmiden für die Komplementation von $\Delta hp525$	88
4.2	Komplementation der <i>H. pylori</i> Mutante 26695 $\Delta hp525$	88
4.3	Untersuchung der CagA-Translokation	90
IV	DISKUSSION	91
1	Aufbau des Cag PAI Typ IV-Sekretionsapparates.....	91
1.1	Essentielle <i>cag</i> PAI-Gene für die Tyrosinphosphorylierung von CagA und für die Induktion von IL8	92
1.2	Analyse von Stabilitätseffekten.....	96
1.3	Zellfraktionierung und proteolytische Experimente	99
1.4	Lokalisierungsstudien mit dem Mikroskop.....	101
1.5	Stukturelle und funktionelle Besonderheiten von HP527	103
1.6	Topologische Analyse von HP530 als VirB8-Homolog	107
1.7	Funktionelle Bedeutung von Punktmutationen im <i>hp525</i> -Gen	108
V	ZUSAMMENFASSUNG	111
VI	LITERATURVERZEICHNIS	113

I Einleitung

Im späten 19. Jahrhundert gab es einen ersten Bericht über spiral gewundene Bakterien, welche die Magenschleimhaut von Hunden besiedelten (Bizzozero, 1893). Von der ersten Kultivierung dieses Organismus wurde jedoch erst 1983 von Warren und Marshall, (1983) berichtet. Dieser kultivierte Gram-negative, mikroaerophile, spirilige und polar begeißelte Mikroorganismus stammte aus Biopsien von menschlichen Patienten mit aktiver chronischer Gastritis und wurde zunächst in die Gattung *Campylobacter* eingeordnet (Marshall und Goodwin, 1987). Zwei Jahre später wurde durch biochemische Untersuchungen und 16S-rRNA-Analyse dieses Bakterium als *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) bezeichnet und somit als erster Vertreter der neuen Gattung *Helicobacter* anerkannt (Goodwin *et al.*, 1989).

1 Pathogenese und Epidemiologie von *H. pylori*

Die Besiedelung des Gastroduodenal-Traktes durch *H. pylori* zählt zu einer der häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten (Blaser, 1993, Blaser und Parsonnet, 1994). Aus epidemiologischen Untersuchungen geht hervor, dass etwa die Hälfte der Weltbevölkerung chronisch mit *H. pylori* infiziert ist (Covacci *et al.*, 1999). Da in Entwicklungsländern Infektionsraten von 70-90% im Gegensatz zu 25-50% in Industrieländern ermittelt worden sind (Lee *et al.*, 1993), geht man davon aus, dass mangelnde Hygienezustände einen enormen Risikofaktor für den Erwerb einer *H. pylori*-Infektion darstellen. Aufgrund der Beobachtung, dass es innerhalb von Familien eine Häufung von Infektionen gibt und die Infektion meist schon im Kindesalter erworben wird (Drumm *et al.*, 1990; Elitsur *et al.*; 1999; Dunn *et al.*, 1997), wird ein oral-oralen Übertragungsweg (Mutter-Kind) diskutiert, wobei eine fäkal-orale Übertragung nicht ausgeschlossen werden kann.

Trotz einer relativ hohen Infektionsrate kommt es nur in etwa 10% aller Fälle zur Ausbildung von Krankheitssymptomen. Als Folge einer *H. pylori*-Infektion kann es im Zusammenhang mit zahlreichen Umweltfaktoren, wie z.B. Alkohol-, Zigarettenkonsum oder Stress im Laufe der Zeit zur Entstehung verschiedener in Abb I.1 gezeigter Krankheitsbilder kommen.

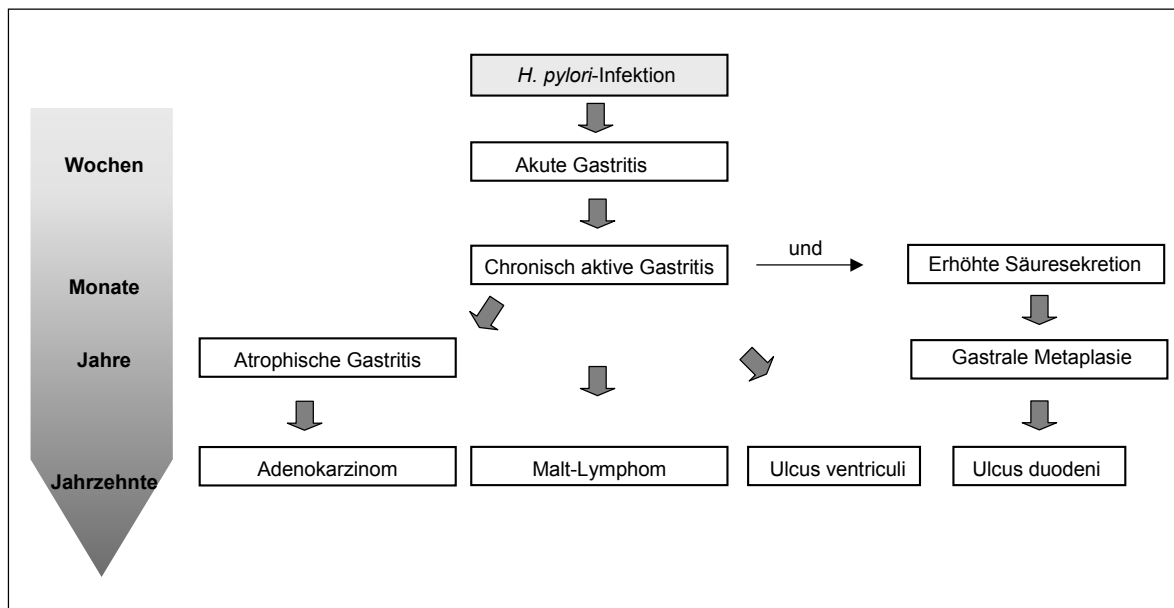


Abb. I.1: Pathogenese einer *H. pylori*-Infektion. MALT, mucosa associated lymphoid tissue (weitere Erläuterungen siehe Text).

Durch die Ansiedlung von *H. pylori* nahe der Magenepithelzellen wird eine starke Reaktion der humoralen Immunantwort verursacht. Leukozyten, Lymphozyten und Plasmazellen beginnen in die Lamina propria und das Magenepithel einzuwandern, sind aber nicht in der Lage, die Bakterien zu eliminieren. So kann sich im Laufe der Zeit aus einer akuten, asymptomatisch verlaufenden Gastritis eine chronisch aktive Gastritis entwickeln, die auch asymptomatisch verlaufen kann (Malfertheiner, 1996). Als weitere Abwehrmaßnahme des Körpers reifen Plasmazellen aus B-Zellen heran und sammeln sich in Lymphfollikeln. Dort werden anti-(α -)*H. pylori* IgA-Antikörper produziert, die ebenfalls nicht zur Eradikation des Bakteriums führen (Genta *et al.*, 1993). Das MALT (mucosa associated lymphoid tissue)-Gewebe selbst birgt wiederum das Risiko einer Entartung zu einem B-Zell-spezifischen MALT-Lymphom (Parsonnet *et al.*, 1994). Aufgrund einer vermehrten Säurebildung (Hyperchlorhydrie) kann es bei der chronisch aktiven Gastritis zu einer Zerstörung des Zwölffingerdarmepithels (Duodenum) kommen, das zur Regeneration durch Magenepithelzellen ersetzt wird (gastrale Metaplasie) (Walker und Dixon, 1996). Die Bereiche gastraler Metaplasie ermöglichen eine zusätzliche Besiedelung durch *H. pylori*, wodurch ein chronisches Geschwür (Ulcus duodeni) entstehen kann.

Eine andere Folge der Langzeitinfektion ist die Entstehung einer atrophischen Gastritis. Hierbei kommt es zur Zerstörung des Drüsengewebes, das zur Regeneration durch Dick- oder Dünndarmgewebe ersetzt wird (intestinale Metaplasie) (Craanen *et al.*, 1992). Untersuchungen ergaben, dass die intestinale Metaplasie eine Vorstufe zur

Entstehung von Magenkrebs (Adenokarzinom) darstellt (Malfertheiner, 1996). Aufgrund der Tatsache, dass sich das Risiko, infolge einer *H. pylori*-Infektion an einem Adenokarzinom zu erkranken, um einen Faktor von sechs erhöht, erklärte die Weltgesundheitsorganisation WHO *H. pylori* 1994 zum Klasse I- Karzinogen (IARC, 1994).

2 Virulenzfaktoren

Generell ist die menschliche Magenmukosa sehr gut gegen bakterielle Infektionen geschützt. Trotzdem hat sich der Mikroorganismus *H. pylori* sehr gut an diese ökologische Nische adaptiert. Zahlreiche Eigenschaften von *H. pylori* ermöglichen es ihm, in den Magen zu gelangen, sich dort zu bewegen und zu orientieren. Er kann an Epithelzellen adhären, einer Immunantwort entkommen, und als Resultat davon hat er die Möglichkeit, lebenslang im Menschen zu persistieren.

Nachdem das Bakterium in den Magen gelangt, muss es dem bakteriziden Milieu des Magenlumens entkommen. Im sauren Milieu von pH1-2 ist die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Keims sehr gering. Aus Studien im Tiermodell ging hervor, dass es zwei Faktoren gibt, die essentiell für eine erfolgreiche Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* sind. *H. pylori*-Mutanten, die flagellenlos waren oder das Enzym Urease nicht mehr produzieren konnten, waren nicht mehr in der Lage, gnotobiotische Ferkel zu infizieren (Eaton *et al.*, 1991, 1992; Tsuda *et al.*, 1994). Die unipolare Begeißelung und spiralförmige Gestalt von *H. pylori* ermöglicht es, unter die schützende Schleimschicht zu gelangen, wo ein karbonatgepuffertes Milieu von pH6-7 vorherrscht (Hazell *et al.*, 1986). Die zwei bis sieben Flagellen bestehen aus einer Hauptkomponente, dem Flagellinprotein FlaA (53kDa) (Leying *et al.*, 1992), und der Untereinheit FlaB (54kDa), die hauptsächlich an der Flagellenbasis lokalisiert ist (Suerbaum *et al.*, 1993). Die Flagellen sind von einer Lipidschicht umgeben und so vor der depolymerisierenden Säureeinwirkung geschützt (Geis *et al.*, 1993). Auf seinem Weg zum Magenepithel produziert *H. pylori* große Mengen des Enzyms Urease, ein aus den Untereinheiten UreA und UreB aufgebautes Metalloprotein. Durch Urease kann im Magenlumen vorhandener Harnstoff zu Ammonium und Hydrogenkarbonat gespalten werden (Labigne *et al.*, 1991). Untersuchungen ergaben, dass die Urease hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist und lediglich zu ca. 10% auf der Bakterienoberfläche oder im Medium gefunden werden kann (Phadnis *et al.*, 1996). Die Regulation der Enzymaktivität erfolgt durch einen pH-kontrollierten Harnstoffkanal UreI, der in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert ist (Weeks *et al.*, 2000). Bei niedrigem pH-Wert kommt es durch Öffnen des Kanals zum Einstrom von Harnstoff, während unter neutralen Bedingungen der Kanal geschlossen wird.

Durch diesen Vorgang kann *H. pylori* einen konstant neutralen pH-Wert in seinem Zellinneren aufrechterhalten (Scott *et al.*, 1998; Rektorscheck *et al.*, 1998, 2000), der für den Aufbau eines Membranpotentials und somit für einen ungestörten Energiestoffwechsel im sauren Milieu essentiell ist. Tanahashi *et al.*, (2000) konnten mit Hilfe von kultivierten Mageneithelzellen zeigen, dass die Sekretion von Interleukin(IL)-6 und Tumornekrosefaktor(TNF)- α durch die lösliche Urease erhöht wird und somit das Enzym an der Auslösung einer Immunantwort beteiligt ist.

Kürzlich wurden weitere, essentielle Kolonisierungsfaktoren von Kavermann *et al.* (2003) beschrieben. Durch „signature tagged mutagenesis“ (STM) wurde das Genprodukt *hp0169* als essentiell für die Kolonisierung des Gerbils (*Meriones unguiculatus*) entdeckt. Es wurde gezeigt, dass es sich hierbei um eine Kollagenase handelt. Die genaue Aufgabe der Kollagenase ist bisher noch nicht bekannt. Es wird spekuliert, dass sie einerseits einer Heilung der chronischen Gastritis oder des Duodenalulkus entgegenwirkt, indem sie das vom Körper zur Heilung bereitgestellte Kollagen wieder zerstört (Gillesen *et al.*, 1995). Für das Bakterium könnte die Kollagenase auch eine Möglichkeit darstellen, durch den Kollagenabbau an bestimmte Aminosäuren oder Peptide für seinen eigenen Stoffwechsel zu gelangen. Als weitere Möglichkeit wurde eine Zerstörung von wichtigen Komponenten des angeborenen oder erworbenen Immunsystems diskutiert (Kavermann *et al.*, 2003).

Als weiterer, für die Kolonisierung des Gerbils essentieller Faktor wurde die putative ATPase ComB4 gefunden. ComB4 war bisher nur durch seine Rolle bei der natürlichen Transformationskompetenz bekannt, die mit dem Aufbau eines Typ IV-Sekretionsapparats assoziiert ist (Hofreuter *et al.*, 2001). Durch Deletionsmutanten, die keinen funktionellen Translokationsapparat für den DNA-Transport mehr aufbauen konnten, wurde gezeigt, dass die natürliche Kompetenz keinen Einfluss hat und somit nicht essentiell für die Kolonisierung ist. Somit wird vermutet, dass das Protein ComB4 zusätzlich zu seiner bisher bekannten Rolle bei der natürlichen Transformationskompetenz eine weitere bis heute noch unbekannt Funktion für das Überleben von *H. pylori* im Magen hat.

H. pylori siedelt sich hauptsächlich in den Krypten der Magenschleimhaut an, denn diese tiefen Einstülpungen der Antrumschleimhaut stellen einen gewissen Schutz vor Säure und Proteasen dar. Die Bakterien können sich frei in der Schleimschicht bewegen, und nur ein geringer Anteil von ca. 20% adhärirt an die Eithelzellen (Lee *et al.*, 1993). Die Adhärenz stellt einen Schutz vor Ausscheidung mit dem vom Körper immer wieder neu produzierten Schleim dar. Mehrere Faktoren wurden charakterisiert, die an der Adhärenz an die Magenmukosa beteiligt sind. Bisher sind einige Zielkomponenten des Wirtes bekannt, an die *H. pylori* adhäririeren kann. So kommt es zur Adhärenz an nicht-sialylierte Liganden, wie z.B.: Fibronektin, Typ IV-Kollagen,

Heparinsulfat, Sulphatid, Vitronektin (Ringner *et al.*, 1992) und Laminin (Trust *et al.*, 1991). Die fünf bakteriellen Proteine BabA, SabA, AlpA, AlpB und HopZ wurden inzwischen näher charakterisiert. Sie gehören alle zur OMP (outer membrane protein)-Familie, die aus 32 äußeren Membranproteinen besteht, und im sequenzierten *H. pylori*-Stamm 26695 identifiziert worden ist (Tomb *et al.*, 1997). Das Adhäsion BabA ist 78kDa groß, und durch Rezeptorstudien an Magenbiopsieschnitten wurde gezeigt, dass es an das fukosylierte Blutgruppenantigen Lewisb (Leb) bindet, welches auf der Oberfläche von Epithelzellen des Magens lokalisiert ist (Borén *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998). Gerhard *et al.*, (1999) konnten zeigen, dass die Produktion von BabA mit schwereren Krankheitsbildern korreliert ist. Es wird vermutet, dass es bei einer *H. pylori*-Infektion zunächst zur BabA-Bindung kommt. Während der persistierenden Infektion und der chronischen Inflammation (Gastritis) wird durch *H. pylori* eine vermehrte Sialyl-Lewis X-Antigen (sLeX-Antigen)-Produktion auf den Wirtszellen hervorgerufen. An diese sLeX-Antigene bindet das *H. pylori*-Protein SabA, was wiederum einen Schutz für das Bakterium darstellt. Diese Bindung führt zu einem sehr engen Kontakt zwischen Wirtszelle und Bakterium (Mahdavi, *et al.*, 2002). Bei Untersuchungen mit einer *H. pylori*-Mutantenbank auf Adhärenzdefekte wurden zwei Mutanten im *alpA*-Gen gefunden, deren Adhärenz an Magenepithelzellen verringert war (Odenbreit *et al.*, 1999). Durch genetische Analysen wurde festgestellt, dass *alpA* in einem Operon mit dem stromabwärts gelegenen homologen *alpB* organisiert ist. Mutationen innerhalb dieser Gene führen zu einem Lewis b-unabhängigen Adhärenzdefekt auf Kato III-Zellen und auf Magenbiopsieschnitten. Die jeweiligen Interaktionspartner auf Eukaryontenzellen konnten bisher nicht identifiziert werden. Ebenso wurde bisher kein eukaryontischer Rezeptor für das 73kDa große Protein HopZ beschrieben. Isogene Mutanten von HopZ zeigen eine deutliche Verringerung in ihrem Adhärenzverhalten (Peek *et al.*, 1999).

Als weitere potentielle Kolonisierungsfaktoren gelten die Enzyme Katalase, KapA (KatA-associated protein) und Superoxid-Dismutase (Hazell *et al.*, 1991; Spiegelhalter *et al.*, 1993; Ramarao *et al.*, 2000, Harris *et al.*, 2002). Mit diesen beiden Enzymen schützt sich *H. pylori* nicht nur vor Sauerstoffradikalen, die von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen während des „oxidative burst“ zur Keimabtötung ausgeschüttet werden, sondern auch vor dem von Phagozyten freigesetzten Wasserstoffperoxid.

Das Lipopolysaccharid (LPS) von *H. pylori* scheint ebenfalls eine Rolle bei der Kolonisierungsfähigkeit zu spielen. Vergleicht man die biologische Aktivität des LPS von *H. pylori* mit dem anderer Gram-negativer Bakterien, so ist diese zwar sehr gering (Nielsen *et al.*, 1994), es zeigte sich aber im Zusammenhang mit dem *H. pylori*-LPS ein deutlicher Anstieg der Apoptose in Magenepithelzellen (Piotrowski *et al.*, 1997).

Zusätzlich verhilft das *H. pylori*-LPS dem Bakterium zu einer molekularen Mimikry: Im *H. pylori*-LPS können entweder Lewisx-oder Lewisy-Epitope, oder beide zusammen auftreten. Diese bakteriellen Lewisantigene sind den Antigenen, die auf der Oberfläche von Magenepithelzellen präsentiert werden, sehr ähnlich, und es wird vermutet, dass sie so das Bakterium vor der Immunantwort des Wirts schützen bzw. im Rahmen einer Autoimmunantwort zur Pathogenität von *H. pylori* beitragen (Monteiro *et al.*, 1998; Appelmek *et al.*, 1997). Kawahara *et al.* (2001) und Su *et al.* (2003) zeigten, dass gereinigtes LPS von virulenten *H. pylori*-Stämmen die Transkription und Translation von Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) in verschiedenen gastrointestinalen Zellkulturen induziert. Außerdem wurde beschrieben, dass *H. pylori* bei einer TLR4-überproduzierenden Mutantenzelllinie, das Membranprotein TLR4 als Rezeptor für die Adhärenz benutzt.

Zwei weitere Virulenzfaktoren sind das Neutrophile aktivierende Protein NAP und das vakuolisierende Zytotoxin VacA. NAP ist ein oligomeres 150kDa Protein, das aus 10-12 Kopien eines 17kDa-Polypeptids aufgebaut ist und eine Homologie zu eisenbindenden Proteinen aufweist. NAP wird an das Medium abgegeben und bindet an die bakterielle Oberfläche, wo es als Adhäsion an z.B. Mucin oder Sphingomyelin binden kann. NAP aktiviert Neutrophile und ist wahrscheinlich beim Einwandern dieser Zellen in die Mukosa beteiligt, wo die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen induziert wird. NAP wirkt also bei der inflammatorischen Antwort mit (Evans *et al.*, 1995, Teneberg, *et al.*; 1997; Tonello *et al.*; 1999, Montecucco & Bernard, 2003).

Das Protein VacA gehört zur Familie der Autotransporter und wird in das extrazelluläre Milieu sekretiert (Fischer *et al.*, 2001). Alle *H. pylori*-Stämme, die bisher untersucht wurden, besitzen eine Kopie des genetisch variablen Gens *vacA*. Atherton *et al.*, (1995) konnten zeigen, dass das Vorhandensein unterschiedlicher Allele mit einem unterschiedlichen Grad an Zytotoxizität einhergeht. VacA ist ein sogenanntes Protein-Toxin und wird mit einer Zerstörung des Magenepithels in Zusammenhang gebracht (Telford *et al.*, 1994). Im Mongolian Gerbil-Modell wurde gezeigt, dass VacA eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Ulzera spielt (Ogura *et al.*, 2000). Aus Experimenten mit *H. pylori*-Mutanten, die kein aktives VacA mehr produzierten, ging hervor, dass VacA die Kolonisierung von Mäusen begünstigt (Salama, *et al.*, 2001). In der Literatur wurden viele *in vitro*-Effekte, die vom Protein VacA hervorgerufen werden, beschrieben. Czajkowsky *et al.*, (1999) und Szabo *et al.*, (1999) berichten über die Ausbildung eines Anionen-selektiven Kanals, und es konnte eine Verminderung der transepithelialen Resistenz im Wirt gemessen werden (Pelicic *et al.*, 1999). VacA stört neben der Antigenpräsentation (Molinari *et al.*, 1998) auch den intrazellulären Vesikeltransport (Satin *et al.*, 1997), indem es möglicherweise mit einem Vimentin-bindenden Protein interagiert (De Bernard *et al.*, 2000). Außerdem

wurde von einer Apoptoseinduktion durch VacA berichtet (Satin *et al.*, 1997). Kürzlich wurde gezeigt, dass VacA die Aktivierung von T-Lymphozyten verhindert, indem es in den Ca²⁺-Calmodulin-abhängigen Signalweg eingreift (Gebert *et al.*, 2003). Die *in vivo*-Funktion von VacA bei einer Interaktion von Wirt und Pathogen ist derzeit noch unklar.

Weitere bedeutende Virulenzfaktoren sind die *cag* Pathogenitätsinsel und das von ihr kodierte Protein CagA. Auf diese beiden Faktoren wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

3 Die *cag* Pathogenitätsinsel

Ein großer genetischer Unterschied bei verschiedenen *H. pylori*-Isolaten in Bezug auf ihre Pathogenität ist die Anwesenheit oder Abwesenheit einer sogenannten Pathogenitätsinsel (PAI). *H. pylori*-Stämme, die eine PAI und ein aktives VacA-Zytotoxin besitzen, werden als Typ I-Stämme bezeichnet und mit der Ausbildung von schwereren Krankheitsbildern assoziiert (Censini *et al.*, 1996). Typ II-Stämme weisen keine PAI auf und produzieren weniger oder inaktives bzw. nur für bestimmte Zelllinien aktives VacA (Pagliaccia *et al.*, 1998). Pathogenitätsinseln, die auch in vielen anderen bakteriellen Pathogenen wie *Salmonella*, *Yersinia* und *Escherichia coli* (*E. coli*) vorhanden sind, kodieren für Gengruppen, die mit Virulenz assoziiert werden. Sie werden durch horizontalen Gen-Transfer erworben und verleihen einen selektiven Vorteil. Von einigen PAIs ist bekannt, dass sie für Sekretionssysteme kodieren (Shea *et al.*, 1996). Manche PAIs sind von direkten Wiederholungssequenzen flankiert (Hacker *et al.*, 1990) oder besitzen IS-Elemente (Fetherston *et al.*, 1992). Letzteres führt zu Neuarrangements innerhalb der Sequenz, was für den teilweisen bzw. völligen Verlust der PAI bei *H. pylori* verantwortlich (Censini *et al.*, 1996) ist. Typische Merkmale einer PAI sind der unterschiedliche GC-Gehalt und eine abweichende „codon usage“ im Vergleich zum restlichen Genom (Lee, 1996; Hacker *et al.*, 1997).

Die PAI von *H. pylori* ist eine 37kb große Sequenz und enthält 27 putative Gene. Eines dieser Gene ist das Zytotoxin-assoziierte Gen *cagA*, welches namensgebend für die PAI von *H. pylori* war (→ *cag* PAI). Die PAI ist in das Gen für die chromosomale Glutamyltransferase inseriert und wird von zwei 31bp langen direkten Wiederholungssequenzen begrenzt. Eine mobile Sequenz IS605, die für zwei Transposasen kodiert, wurde in einigen TypI-Stämmen als zusätzlich integriertes Element gefunden (Censini *et al.*, 1996). Im *H. pylori*-Stamm NCTC11638 (= CCUG17874) ist die PAI durch eine ca. 500kb DNA-Sequenz, die von IS605-Elementen flankiert wird und auch in TypII-Stämmen vorhanden ist, in die Abschnitte *CagI* und *CagII* geteilt (siehe Abb. I.2).

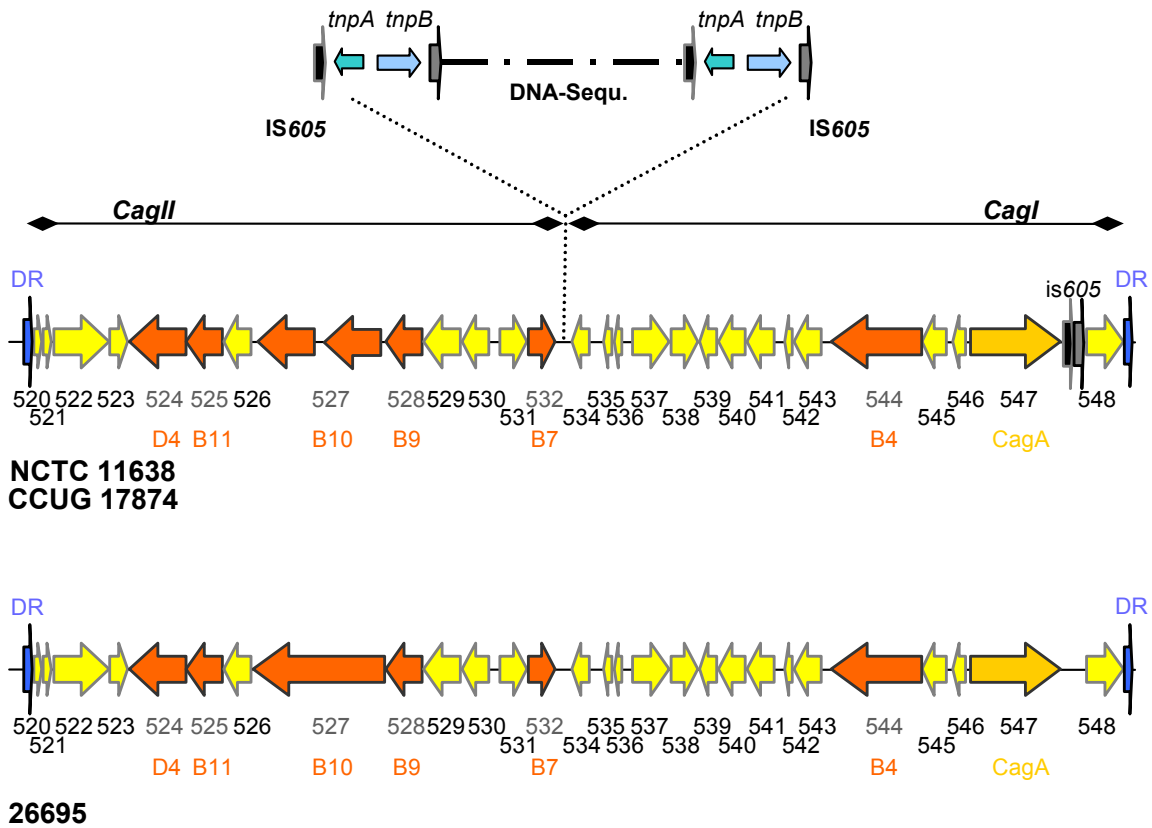


Abb. I.2: Schematische Darstellung der Pathogenitätsinseln der *H. pylori*-Stämme NCTC 11638 (= CCUG17874) und 26695. Jeder Pfeil stellt einen offenen Leserahmen (ORF) dar. Die Nummerierungen von 520-548 der einzelnen ORF, entsprechen der Sequenzanordnung des Stammes 26695. Die Genprodukte von *hp520-hp548* werden im Folgenden HP520-HP548 genannt. Als blaue Pfeile sind die flankierenden direkten Wiederholungen (DR) dargestellt. Dunkelorange Pfeile demonstrieren ORFs, die eine Homologie zu den *virB/D*-Genen von *A. tumefaciens* aufweisen, in orange ist das *cagA*-Gen dargestellt. In vier verschiedenen ORFs wurden Größenunterschiede bei den beiden Stämmen festgestellt. Die ORFs *hp520/521* sind bei NCTC 11638 länger (148 statt 115AS / 116 statt 80 AS; nicht dargestellt), wohingegen *hp523* kürzer ist (94 statt 168 AS; nicht dargestellt). Außerdem teilt sich bei NCTC 11638 der ansonsten durchgängige Leserahmen *hp527* durch einen Rastersprung in zwei getrennte ORFs. Als weitere Besonderheit besitzt der Stamm NCTC 11638 zwei kurze Sequenzen zwischen *hp547* und *hp548*, die eine Homologie zu IS605-Elementen aufweisen. Beim Vergleich dieser beiden mit der *cag* PAI vom Stamm *H. pylori* J99 wurde festgestellt, dass die J99 PAI im Wesentlichen mit der PAI von 26695 übereinstimmt (nicht dargestellt) (Alm *et al.*, 1999).

Kersulyte *et al.*, (1999) zeigten, dass es zu einem Verlust der PAI kommen kann, wenn sie durch die homologe Rekombination mit chromosomaler DNA eines TypII-Stammes ersetzt wird.

Sechs der 27 *cag*-ORFs weisen Homologien zu bekannten Genen von *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), *E. coli* und *Brucella suis* (*B. suis*) auf. Diese in Operons organisierten Gene kodieren für einen Typ IV-Sekretionsapparat, der auf den Transfer verschiedener molekularer Komplexe durch die bakteriellen Membranen in die extrazelluläre Umgebung oder in andere Zellen spezialisiert ist. Für *H. pylori* wurde gezeigt, dass das vom *cagA*-Gen kodierte Protein CagA in kultivierte Magenepithelzellen transloziert wird (Segal *et al.*, 1999; Asahi *et al.*, 2000; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000). Das translozierte CagA lagert sich im inneren der Plasmamembran an und wird durch eine Protein-Tyrosin-Kinase der Src-Familie an einer oder mehreren Tyrosinphosphorylierungsmotiven (CagA^{P-tyr}) aktiviert (Backert *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002; Püls *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Translokation von CagA zur Dephosphorylierung von Wirtzellproteinen wie Kortaktin (Selbach *et al.*, 2002) führt. CagA wird *in vitro* auch in phagozytische Zellen wie Granulozyten und Makrophagen injiziert. Dort wird es in ein C-terminales, stabiles 35-45kDa großes Fragment, das tyrosinphosphoryliert ist, gespalten (Odenbreit *et al.*, 2001). CagA^{P-tyr} ist mit der Induktion einer Strukturveränderung des Aktinzytoskeletts von Epithelzellen assoziiert. Die Epithelzellen verlieren dabei ihren Zell-Zell-Kontakt, wandern auseinander und bilden anschließend längliche Ausläufer (Scattering-, Hummingbird-Phänotyp) (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001; Churin *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass CagA mit dem Adapterprotein Grb2 *in vivo* und *in vitro* interagiert (Mimuro *et al.*, 2002). Diese Interaktion führt durch die Aktivierung des Ras/Mek/Erk Signaltransduktionsweges zum „Scattering“ und zur Proliferation.

Eine weitere wichtige Funktion der *cag*-PAI ist die Induktion von Chemokinen, wie IL8, Rantes und Ena78, die von Epithelzellen sekretiert werden. Außerdem werden Faktoren wie GM-CSF (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor) oder TNF α (tumor necrosis factor α) in Magenepithelzellen induziert (Foryst-Ludwig und Naumann, 2000). Eine Induktion von Chemokinen setzt den direkten Kontakt zwischen Bakterium und Wirt voraus (Rieder *et al.*, 1997). Der Mechanismus dieser Induktionen wurde bisher nur teilweise geklärt, aber es zeigte sich, dass einige Gene der *cag* PAI bzw. Komponenten des TypIV-Sekretionsapparats beteiligt sind, indem sie AP1 (Naumann *et al.*, 1999) und NF κ B aktivieren (Censini *et al.*, 1996; Münzenmaier *et al.*, 1997; Segal *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Covacci und Rappuoli, 2000). Das translozierte Protein CagA konnte bisher nicht mit diesen Effekten in Zusammenhang

gebracht werden (Crabtree *et al.*, 1995; Rieder *et al.*, 1997). Weiterhin ist unklar, ob es weitere translozierte Effektorproteine gibt, oder ob der Apparat selbst an einen Rezeptor binden kann, und auf diese Weise die oben beschriebenen Phänotypen auslöst.

4 Typ IV-Proteinsekretionssysteme

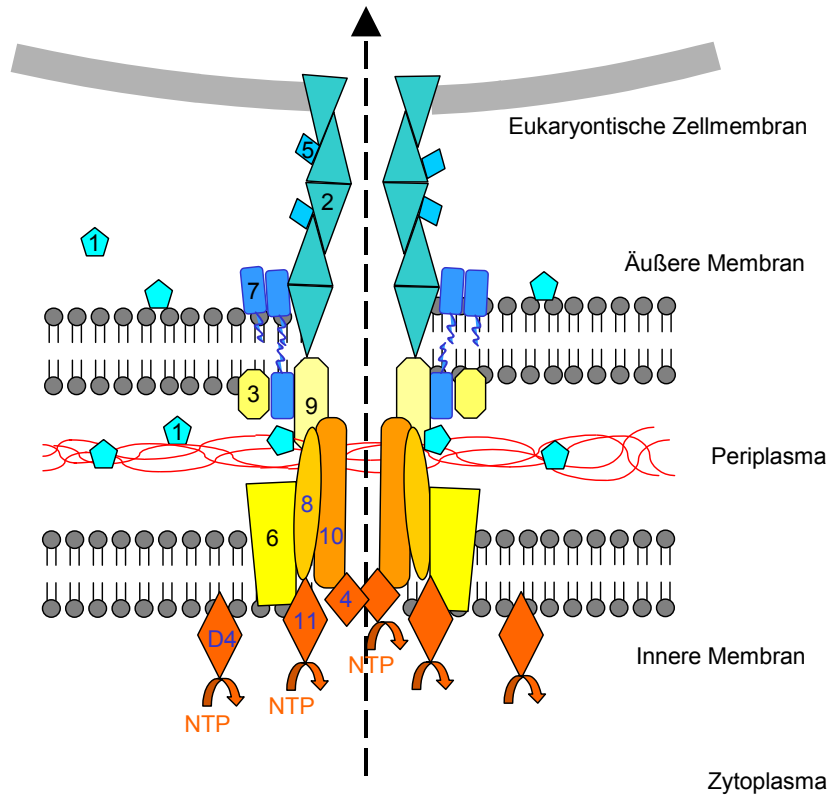
Viele Gram-negative bakterielle Pathogene benutzen Sekretionssysteme, um DNA und/oder Proteine aus ihrem Zytoplasma durch die bakteriellen Membranen hindurch in das äußere Milieu oder aber durch die Membran einer eukaryontischen Zelle zu schleusen. Sekretionssysteme, die sich evolutionär von den Konjugationssystemen ableiten, werden in die Gruppe der Typ IV-Sekretionssysteme zusammengefasst. Diese Gruppe setzt sich aus a) Konjugationssystemen, die für den DNA-Transfer in eine Rezipientenzelle verantwortlich sind (z.B. T-DNA/*A.tumefaciens*; F-Faktor/*E.coli*) b) aus Systemen die Effektorproteine während einer Infektion in eine eukaryontische Zelle transportieren (z.B. Cag/*H.pylori*; Ptl/*B.pertussis*) und c) aus Systemen die für DNA-Aufnahme bzw. Abgabe aus oder ins extrazelluläre Milieu (z.B. Com/*H.pylori*; Vir/*Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*)), zusammen. Diese Typ IV-Sekretionssysteme differenzieren sich von anderen bakteriellen Sekretionssystemen wie den ABC-(ATP-binding cassette) oder Typ I-Transportern (Binet *et al.*, 1997), den Sec-abhängigen Typ II-Sekretionssystemen (Sandkvist, 2001), den zu Flagellenexportsystemen homologen Typ III-Sekretionssystemen (Plano *et al.*, 2001) und den Typ V-Sekretionssystemen, die auch Autotransporter (AT)-Sekretionssysteme genannt werden (Henderson *et al.*, 2000).

Das Standardmodell unter den Typ IV-Sekretionssystemen ist das VirB-System von *A. tumefaciens*. Mit Hilfe des Typ IV-Apparats exportiert *A. tumefaciens* ein großes, einzelsträngiges, Ti-plasmidkodiertes (pTi, Tumor induzierendes Plasmid) DNA-Molekül, das T-DNA (transferierte DNA) genannt wird. Die T-DNA wird durch zwei bakterielle und eine pflanzliche Membran transportiert und integriert im Zellkern der Pflanzenzelle in das Genom, wodurch die Bildung von Tumoren induziert wird (Zupan *et al.*, 2000). Zusätzlich werden die Proteine VirE2, VirE3 und VirF in die Pflanzenzelle transloziert (Ward *et al.*, 2001; Schrammeijer *et al.*; 2003; Vergunst *et al.*; 2000). Der *virB*-Lokus besteht aus 11 Genen, deren Produkte einen Kanal bilden (siehe Abb. 1.3), welcher den Weg vom Zytoplasma bis zur Zielzelle öffnet. Die Proteine, die am Aufbau des Apparats beteiligt sind, lassen sich in drei funktionelle Gruppen unterteilen. Im Zytoplasma befinden sich membranassoziierte ATPasen, die für die Energiebereitstellung nötig sind. Darauf folgen die Proteine, die einen Sekretionskanal zwischen innerer und äußerer Membran ausbilden, an den sich exozelluläre

Strukturen wie der T-Pilus anschließen, die wahrscheinlich für eine Adhäsion an den Wirt und die Injektion von bakteriellen Substanzen benötigt werden. Das humanpathogene Bakterium *B. pertussis* benützt ein Typ IV-System, um darüber das Pertussis-Toxin in das extrazelluläre Milieu zu transportieren (Winans *et al.*, 1996). Von einigen intrazellulären Pathogenen wie *Brucella spp.* (Sieira *et al.*, 2000; Foulongne *et al.*, 2000) oder *Bartonella spp.* (Schmiederer und Anderson, 2000) wird vermutet, dass sie bisher unbekannte Effektoren mit Hilfe des Typ IV-Systems in ihre Zielzellen (Makrophagen, Erythrozyten) transportieren, um als Folge davon dort überleben zu können. Beim intrazellulären Pathogen *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) wurden die Effektorproteine DotA, RalF und LidA beschrieben, die vom Dot/Icm-TypIV Sekretionssystem transloziert werden. DotA ist ein Protein, welches mit mehreren Transmembrandomänen vorhergesagt wird (Nagai *et al.*, 2001). Bisher ist ein möglicher Weg für die Translokation eines Transmembranproteins in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Als mögliche Funktion von DotA wird die Porenbildung in die eukaryontische Membran postuliert (Nagai *et al.*, 2001). LidA wird in die Membran der Phagosomen transloziert (Conover *et al.*, 2003). Im Bakterium soll LidA zunächst die Zusammensetzung des Typ IV-Sekretionsapparats regulieren und nach der Translokation eine Funktion in der Vakuolenbiogenese übernehmen (Conover *et al.*, 2003). Das dritte translozierte Protein RalF soll zur Aktivierung von ARF1, einem Mitglied der ADP-ribosylierenden-Faktoren-Familie der GTPasen, führen. Dies verhindert eine effektive Bildung der replikativen Vakuolen (Nagai *et al.*, 2002).

In Abb. I.3 B sieht man die ermittelten Protein-Homologien zwischen Bakterien mit einem Typ IV-Sekretionsapparat. Bakterielle Typ IV-Sekretionssysteme weisen grundsätzlich nicht zu allen Proteinen, die in den Prototypen dem pKM101-plasmidkodierten konjugativen Apparats von *E. coli* und des Ti-plasmidkodierten T-DNA Transferapparats von *A. tumefaciens* vorkommen, Homologe auf. Bei *B. pertussis* fehlen z.B. VirB5- und VirD4-Homologe, bei *B. suis* z.B. VirB1. Bei *H. pylori* wurden bisher keine homologen Proteine zu VirB1, VirB2, VirB3, VirB5, VirB6 beschrieben, d.h. nur sieben (HP524, HP525, HP527, HP528, HP529, HP532, HP544) der putativen 27 *cag* PAI-kodierten Proteine zeigen Homologie zu den VirB/D-Proteinen. Die Aufgaben aller anderen Genprodukte, die von der *cag* PAI kodiert werden, sind noch unklar. Für die meisten Systeme ist es noch unbekannt, ob die fehlenden Proteine samt ihrer Funktion im System von anderen nicht homologen Proteinen übernommen werden. Die Sequenzähnlichkeiten und Genanordnungen lassen den Schluss zu, dass die *virB/D*-ähnlichen Gene über horizontale Transmission erworben worden sind und im Laufe der Evolution ihre Rolle in der Sekretion pathogener Faktoren erhalten haben.

A



B

Organismus	System	Proteine											
<i>A. tumefaciens</i>	Vir	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	D4
<i>H. pylori</i>	Cag				544			532	529	528	527	525	524
<i>B. pertussis</i>	Ptl		A	B	C		D	I	E	F	G	H	
<i>B. suis</i>	Vir		B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
<i>E. coli/ pKM101</i>	Tra	L	M	A	B	C	D	N	E	O	F	G	J
<i>L. pneumophila</i>	Dot-/lcm										lcME	DotE	
<i>R. prowazekii</i>	RP ORF								287	290	291	292	293

Abb. I.3: Modell des Typ IV-Sekretionsapparats von *A. tumefaciens* und Aufstellung möglicher homologer und analoger Gene von verschiedenen Bakterien (nach Covacci et al., 1999). A Mögliche Anordnung der Proteine VirB1-VirB11 und VirD4 im Typ IV-Sekretionsapparat von *A. tumefaciens*. Die Proteine VirD4, VirB4 und VirB11 besitzen Walker A-Motive, die für ATPasen charakteristisch sind. B Tabelle mit homologen Typ IV-Sekretionsapparats-Proteinen der Organismen *A. tumefaciens* (Vir-Proteine), *B. pertussis* (Ptl-Proteine), *B. suis* (Vir-Proteine), *E. coli* (Tra-Proteine), *H. pylori* (*cag* PAI-kodierte Proteine), *L. pneumophila* (Dot/lcm-Proteine), *Rickettsia prowazekii* (*R. prowazekii*; RP-Proteine).

5 Zielsetzung

Die *cag* Pathogenitätsinsel stellt einen ernstzunehmenden Virulenzfaktor bei der *H. pylori*-Typ1-Infektion dar. Ohne die *cag* PAI verläuft eine Infektion in den meisten Fällen über Jahrzehnte symptomlos. Ziel dieser Arbeit war die genetische und biochemische Charakterisierung der *cag* PAI, um ein größeres Verständnis für Pathogenität, die von dieser Insel ausgeht, zu erlangen.

Das von der *cag* PAI kodierte Typ IV-Sekretionssystem ist für die Translokation des Proteins HP547 (CagA) notwendig, das in der Wirtszelle durch eine Src-Kinase tyrosinphosphoryliert wird (CagA^{P-tyr}). Die Induktion von Chemokinen, wie z.B. IL8, ist zwar unabhängig von der Translokation von CagA, aber ebenfalls direkt abhängig von der Funktion des *cag* PAI-kodierten Typ IV-Sekretionssystems. Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob es einen weiteren translozierten Faktor gibt, der die IL8-Synthese induziert (Translokations-Hypothese), oder ob eine Struktur am Apparat selbst zur Bindung an einen Rezeptor der Epithelzelle fähig ist und so die Signaltransduktion in Gang gesetzt werden kann (Rezeptor-Hypothese). Von großem Interesse ist, welche Genprodukte regulierend auf die Expression anderer *cag* PAI-Gene einwirken können und aus welchen Proteinen und in welcher Form sich der eigentliche Apparat zusammensetzt. Von Bedeutung ist auch die Frage nach der Bereitstellung von Energie für die einzelnen Prozesse wie z.B. dem Aufbau des Apparats. Schließlich ist über den eigentlichen Translokationsablauf von CagA ebenso wenig bekannt wie über das Vorhandensein weiterer Effektorproteine. Durch die Mutagenisierung aller *cag* PAI-Gene und durch einen Vergleich der Phänotypen der einzelnen Mutanten soll zunächst ein wesentlicher Schritt zur Klärung dieser Fragen geleistet werden.

Die Herstellung von Antikörpern gegen eine Reihe von putativen Komponenten des Typ IV-Apparats ist für die Untersuchung von Expressionsregulationen und putativen Interaktionen sowie für Lokalisationsstudien z.B. mit verschiedenen mikroskopischen Techniken notwendig.

Weiterhin sollen durch Mutationen von *cag* PAI-Genen mit Reporteragen-tragenden Transposons translationale Reporterfusionen generiert werden, die eventuelle Rückschlüsse auf die vorhergesagten Topologiestrukturen zulassen.

Durch die Komplementation einer Deletionsmutanten mit unterschiedlichen Punktmutations-Derivaten eines *cag* PAI-kodierten Proteins soll eine Methode evaluiert werden, die dabei hilft Aussagen über die für die Aktivität oder Funktion essentiellen Bereiche eines Proteins machen zu können.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Bakterienstämme

1.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

DH5 α (E142)	F ⁻ , (Φ 80dlacZ Δ M15) Δ (lacZYAargF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Gibco, BRL)
DH5 α ' (E131)	F ⁻ , (Z Δ 80dlacZDM15) Δ (lacZYAargF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ -CH616 (Haas <i>et al.</i> , 1993a)
DH5 α Rif (E142rif ^R)	DH5 α (E142), auf spontane Rifampicinresistenz selektioniert
HB101' (E141)	F ⁻ , <i>lacY1</i> , <i>recA13</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>leuB</i> , <i>galk2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> (Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
HB101' (E181)	F ⁻ , <i>lacY1</i> , <i>recA13</i> , <i>hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>leuB</i> , <i>galk2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , λ -CH616
TOP10	F ⁻ , ϕ lacZ Δ M15 Δ (lacZYH-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galk</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen)
2136	<i>araD139</i> , Δ (<i>lac</i>)U169, <i>strA</i> , <i>thi-1</i> , cl ₈₅₇ auf λ -Prophagen (Casadaban, 1976)
CC118	Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, Δ lacX74, Δ phoA20, <i>galE</i> , <i>galk</i> , <i>thi</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>argE</i> (am), <i>recA1</i>

1.1.2 *Helicobacter pylori*-Stämme

P1	Klinisches Isolat 69A der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie“ der Universität Amsterdam (Haas <i>et al.</i> , 1993a)
P12	Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie und Immunologie“ der Universität Hamburg (Schmitt und Haas, 1994)
CCUG178774	entspricht NCTC11638, typisierter Referenzstamm (Xiang <i>et al.</i> , 1995)

26695	komplett sequenzierter Stamm (Tomb <i>et al.</i> , 1997); 3 Bezugsquellen: (1) K. Melchers, Konstanz, (2) T. Borén, Uméa, (3) American Type Culture Collection ATCC		
J99	komplett sequenzierter Stamm (Alm <i>et al.</i> , 1999)		
RBP2	26695 Δ hp520,	Cam ^R ,	hergestellt mit pRB20
RBP3	26695 Δ hp521,	Cam ^R ,	hergestellt mit pRB21
RBP4	26695 Δ hp529,	Cam ^R ,	hergestellt mit pRB22
RBP8	26695 Δ hp525,	Cam ^R ,	hergestellt mit pRB24
RBP9	26695 Δ hp526,	Cam ^R ,	hergestellt mit pRB25
RBP10	26695 Δ hp530,	Cam ^R ,	hergestellt mit pRB26
RBP12	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB34
RBP13	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB39
RBP14	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB43
RBP15	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB40
RBP16	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB35
RBP17	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB41
RBP18	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB42
RBP19	26695 Δ hp525;	Kan ^R ,	hergestellt mit pRB38
JPP83	26695 Δ cag PAI,	Kan ^R ,	hergestellt mit pJP46 (J. Püls)
JPP84	26695 Δ cagA,	Kan ^R ,	hergestellt mit pJP52 (J. Püls)
JPP103	26695 Δ hp527,	Cam ^R ,	hergestellt mit pJP89 (J. Püls)
JPP104	26695 Δ hp528,	Cam ^R ,	hergestellt mit pJP90 (J. Püls)
JPP106	26695 Δ hp524,	Cam ^R ,	hergestellt mit pJP93 (J. Püls)
JPP107	26695 Δ hp523,	Cam ^R ,	hergestellt mit pJP94 (J. Püls)
JPP108	26695 Δ hp532,	Cam ^R ,	hergestellt mit pJP95 (J. Püls)
WSP188	26695 Δ hp531,	Cam ^R ,	hergestellt mit pWS139 (W. Fischer)
WSP191	26695 Δ hp522,	Cam ^R ,	hergestellt mit pWS145 (W. Fischer)
SOP257	26695hp534 ⁻ ,	TnMax5-Mutante,	Cam ^R , hergestellt mit pJP16::Tn23 (S. Odenbreit)
SOP258	26695hp535 ⁻ ,	TnMax5-Mutante,	Cam ^R , hergestellt mit pJP16::Tn4 (S. Odenbreit)
SOP259	26695hp536 ⁻ ,	TnMax5-Mutante,	Cam ^R , hergestellt mit pSO169::Tn1 (S. Odenbreit)
SOP264	26695hp539 ⁻ ,	TnMax5-Mutante,	Cam ^R , hergestellt mit pJP29::Tn7 (S. Odenbreit)
SOP265	26695 Δ hp540,	Cam ^R ,	hergestellt mit pSO171 (S. Odenbreit)

SOP266	26695 Δ hp541, Cam ^R , hergestellt mit pSO172 (S. Odenbreit)
SOP267	26695 Δ hp542, Cam ^R , hergestellt mit pSO173 (S. Odenbreit)
SOP268	26695 Δ hp543, Cam ^R , hergestellt mit pSO174 (S. Odenbreit)
SOP269	26695 Δ hp545, Cam ^R , hergestellt mit pSO176 (S. Odenbreit)
SOP266	26695 Δ hp541, Cam ^R , hergestellt mit pSO172 (S. Odenbreit)
SOP267	26695 Δ hp542, Cam ^R , hergestellt mit pSO173 (S. Odenbreit)
SOP268	26695 Δ hp543, Cam ^R , hergestellt mit pSO174 (S. Odenbreit)
SOP269	26695 Δ hp545, Cam ^R , hergestellt mit pSO176 (S. Odenbreit)
BGP55	26695 Δ hp537, Cam ^R , hergestellt mit pBG11 (B. Gebert)
BGP56	26695 Δ hp538, Cam ^R , hergestellt mit pBG10 (B. Gebert)
BGP57	26695 Δ hp544, Cam ^R , hergestellt mit pBG17 (B. Gebert)
BGP58	26695 Δ hp546, Cam ^R , hergestellt mit pBG16 (B. Gebert)

1.2 Zelllinie

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

1.3 Plasmide

pBluescript II KS+	<i>ori</i> _{colE1} , <i>ori</i> _{f1(+)} , <i>lacZ</i> , M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen, Amp ^R (Stratagene)
pDH59	pMin1, <i>cat</i> _{GC} , Tet ^R /Cam ^R , (Fischer <i>et al.</i> , 1999)
pCR2.1-TOPO	<i>ori</i> _{colE1} , <i>ori</i> _{f1} , <i>lacZ</i> , M13 forward-, reverse- und T7-Promotor-Primerbindungsstellen, Amp ^R , Kan ^R (Invitrogen)
pMin1	<i>ori</i> _{colE1} , <i>oriT</i> , Tet ^R (Kahrs <i>et al.</i> , 1995)
pBA	<i>ori</i> _{colE1} , Tet ^R , Amp ^R (Halter <i>et al.</i> , 1984)
pTnMax5	<i>ori</i> _{fd} , <i>P</i> _{trc} , <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , <i>lacI</i> ^q , IR, <i>res</i> , <i>cat</i> _{GC} , M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen (Kahrs <i>et al.</i> , 1995)
pTnMax6	<i>ori</i> _{fd} , <i>P</i> _{trc} , <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , <i>lacI</i> ^q , IR, <i>res</i> , <i>cat</i> _{GC} , <i>phoA</i> , M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen, (Kahrs <i>et al.</i> , 1995)
pTnMax7	<i>ori</i> _{fd} , <i>P</i> _{trc} , <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , <i>lacI</i> ^q , IR, <i>res</i> , <i>cat</i> _{GC} , M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen, (Kahrs <i>et al.</i> , 1995)
pTnMax8	<i>ori</i> _{fd} , <i>P</i> _{trc} , <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , <i>lacI</i> ^q , IR, <i>res</i> , <i>aphA</i> -3, M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen (Kahrs <i>et al.</i> , 1995)
pTnMax9	<i>ori</i> _{fd} , <i>P</i> _{trc} , <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , <i>lacI</i> ^q , IR, <i>res</i> , <i>cat</i> _{GC} , <i>blaM</i> M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen, (Kahrs <i>et al.</i> , 1995)
pTnMax12	pTnMax5 mit <i>gfp</i> , Cam ^R (E. Erlenfeld)

pTnMax14	<i>ori_{fd}</i> , <i>P_{trc}</i> , <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , <i>lacI_q</i> , IR, <i>res</i> , <i>cat_{GC}</i> , <i>lacZ</i> M13 forward- und reverse-Primerbindungsstellen, (Buhrdorf et al., 2003)
p8A/13(3)	pJP28 (<i>hp544::TnMax13</i>), Amp ^R , Kan ^R
pRB34	pJP99 mit <i>hp525</i> R240E aus pWP4760R240E, Kan ^R
pRB35	pJP99 mit <i>hp525</i> K184A aus, pWP4760K184A, Kan ^R
pRB38	pJP99 mit <i>hp525</i> aus <i>H. pylori</i> 26695, Kan ^R
pRB39	pJP99 mit <i>hp525</i> W57A aus pWP4760W57A, Kan ^R
pRB40	pJP99 mit <i>hp525</i> R133E aus, pWP4760R133E, Kan ^R
pRB41	pJP99 mit <i>hp525</i> R113E aus, pWP4760R113E, Kan ^R
pRB42	pJP99 mit <i>hp525</i> R18A aus, pWP4760R18A, Kan ^R
pRB43	pJP99 mit <i>hp525</i> R113E/R133E aus pWP4760R113E+R133E, Kan ^R
pJP1	pCR2.1-TOPO mit Cag1-Region (546828-550595) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP2	pCR2.1-TOPO mit Cag2-Region (549720-554568) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP3	pCR2.1-TOPO mit Cag3-Region (553709-560489) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP4	pCR2.1-TOPO mit Cag4-Region (559507-564495) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP5	pCR2.1-TOPO mit Cag5-Region (563881-566412) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP6	pCR2.1-TOPO mit Cag6-Region (565538-568799) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP7	pCR2.1-TOPO mit Cag7-Region (568223-571285) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP8	pCR2.1-TOPO mit Cag8A-Region (574656-579587) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP9	pCR2.1-TOPO mit Cag8B-Region (570373-575776) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP10	pCR2.1-TOPO mit Cag9-Region (579021-584934) aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R , Kan ^R
pJP11	pMin1 mit Cag1-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP12	pMin1 mit Cag2-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP13	pMin1 mit Cag3-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP14	pMin1 mit Cag4-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP15	pMin1 mit Cag5-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP16	pMin1 mit Cag6-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP17	pMin1 mit Cag7-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R

pJP18	pMin1 mit Cag8A-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP19	pMin1 mit Cag8B-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP20	pMin1 mit Cag9-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Tet ^R
pJP21	pBA mit Cag1-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP22	pBA mit Cag2-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP23	pBA mit Cag3-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP24	pBA mit Cag4-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP25	pBA mit Cag5-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP26	pBA mit Cag6-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP27	pBA mit Cag7-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP28	pBA mit Cag8A-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP29	pBA mit Cag8B-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP30	pBA mit Cag9-Region aus <i>H. pylori</i> 26695, Amp ^R
pJP54	pHel2 mit am 3'-Ende FIAG-markiertem <i>cagA</i> aus <i>H. pylori</i> 26695, Cam ^R
pJP52	pJP51 mit <i>aphA-3</i> zwischen <i>cagA</i> -Aufwärts- und –Abwärts-Region, Amp ^R , Kan ^R
pJP55	pHel2 mit <i>cagA</i> aus <i>H. pylori</i> 26695, Cam ^R
pJP46	pJP44 mit <i>aphA-3</i> zwischen <i>cag</i> PAI-Aufwärts und –Abwärts-Region, Amp ^R , Kan ^R
pJP89	pJP13 (<i>hp527::cat_{GC}</i> aus TnMax5), Cam ^R , Tet ^R
pJP90	pJP24 (<i>hp528::cat_{GC}</i>), Amp ^R , Cam ^R
pJP93	pJP12 (<i>hp524::cat_{GC}</i> aus TnMax5), Tet ^R , Cam ^R
pJP94	pJP21 (<i>hp523::cat_{GC}</i>), Amp ^R , Cam ^R
pJP95	pJP25 (<i>hp532::cat_{GC}</i>), Amp ^R , Cam ^R
pJP99	pJP91 mit <i>aphA-3</i> und Polylinker (partial) aus pHel3, Amp ^R , Kan ^R
pWS47	pBluescript mit <i>recA</i> (partial) Aufwärts- und Abwärts-Region von <i>H. pylori</i> P1 (getrennt durch <i>Bam</i> HI-Schnittstelle) (Schmitt <i>et al.</i> , 1995)
pWS30	pBluescript mit <i>cagA::cat_{GC}</i> von <i>H. pylori</i> 185-44 (W.Fischer)
pWS186	pMin2 mit <i>hp530</i> , Tet ^R

1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Name	Sequenz (5' → 3')
RB7	CGACCGACCGCTCGAGAAATGCCTGCCCCATCAACAA
RB8	GCTGCTGCGTGGATCCGTCGACCCTCTTGTCAGAGATAAATAA
RB23	CGGGATCCTACCTGTGTTTGATATAAAAATTCA
WS11	CCGCTCGAGCTGCAGCTAGAAAGATCTTGAAAAATC
WS150	ATAAGGTAGCGGCCGCTGACCATGATTACGGATTC
WS151	GAAGATCTTTATTTTTGACACCAGACC
WS156	ACCGCTCGAGCTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGAAGACA GATTGA
WS187	ACCGCTCGAGCTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTAGGGAA AAAAACG
M13 _{fwd}	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 _{rev}	GGAAACAGCTATGACCATG
HK3	CGGGATCCGTCGACTTAAGATTTTTGGAAACCAC
JP1	ACCGCTCGAGTAAAATTGTGCTTTTTTTG
JP2	CGGGATCCAACCTTTCTAAGGTATTAG
JP3	CGGGATCCATGTGCAGAACGCTCATC
JP4	ACCGCTCGAGATAGCTTCTTGCAAACCTG
JP5	CGGGATCCTCACACATGAAATTATTG
JP6	ACCCGCTCGAGCAACAAAGAAAAAATAAG
JP7	ATGGATCCATTGGCTTCTGTTGCTTC
JP8	ACCGCTCGAGTCCCTTTAGGATATAATG
JP9	ACCGCTCGAGAAGCCCTTTTGAAAGTCC
JP10	CTGGATCCGCAGAGAATCCTAATTTT
JP11	CGGGATCCGAAGTCAGCCAATGCTAG
JP12	ACCGCTCGAGAATGAACCAAACCTGCTCC
JP13	ACCGCTCGAGTATTTATCTAAATGTTTG
JP14	CGGGATCCCAAACCTTATATGTCTAG
JP15	CGGGATCCCAATGAGTGTATTATTC
JP16	ACGTCTCGAGATGCAAGGTGAGTGCATG

JP17 ACCGCTCGAGTTACACTAGCCCTAAAG
JP18 CGGGATCCTAGCCDACTTCTCTTTTTG
JP19 CCGGATCCATCTGAGAATCCTATACG
JP21 ACCGCTCGAGATAATAAAGCAACGGATC
JP22 GGGGTACCTTACCGGCTTTATTAATG
JP23 GAAGATCTAAGGATCTGACATGTTTA
JP24 GAAGATCDTATCGATTATTTTATTAGCGTTAC
JP25 ACCGCTCGAGCTGCAGCCCAAGAATTCAAACGAC
JP26 GAAGATCTATCGATACCTAGTTTCATACTATC
JP28 ACCGCTCGAGGGTAAAAATGTGAATCGT
JP29 GAAGATCTCCCTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTTTCTGAGCTTT
TTCACCA
JP32 CGGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCAGATTTTTGGA
AACCACCTT
JP33 GGATCGATGGATTAAGGAATACCAAA
JP41 CGGAATTCTGCAGAGAAATGGATTGGTCTG
JP42 ACCGCTCGAGTTATTCGTTGTATCGCAC
JP43 CGGAATTCTGCAGAAGAAAACGATAAACTTG
JP44 ACCGCTCGAGTTGAAGTTTTTTGTCTTT
JP45 CGGAATTCTGCAGATCAGATGAAAAAGACT
JP46 ACCGCTCGAGATTTTGGATTTCTTGGAT
JP47 CGGAATTCTGCAGAAGACTTTTTGTATAAC
JP48 ACCGCTCGAGTCACAGTTCGCTTGAACC
JP49 CGGAATTCTGCAGCGAAAAAAGTGGTGAAA
JP50 ACCGCTCGAGTCACTTACCACTGAGCAA
JP51 CGGAATTCDTGCAGAAGATATAACAAGCGGC
JP52 ACCGCTCGAGTCATTTAACAATGATCCTT
JP55 CCATCGATCATTGATCTAGGTTGTC
JP56 CCATCGATAAGCTCAAAGATTCTACAAAATACDAATGTTGTG
JP57 CGGAATTCDTGCDAGAAGATAAGAGTGGCGAC
JP59 CTGAAGATCTCGCGAAAGCTAGCTTGCA
JP60 ACCGCTCGAGAACTTTAACTTACTTGA
JP61 CGGGATCCAGCATACTCATTTTATAA
JP62 ACCGCTCGAGTGTTGTTTCTCCTTATTG
JP63 CGGGATCCDTTGAAAGAAAAGGAGAGA
JP65 TCGAAGATCTAAAACAATTCATCCAG

1.5 Antikörper

1.5.1 Primäre Antikörper

α -547	α -CagA, Polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen CagA-Bereich von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer)
α -RecA	Polyklonales Antiserum gegen RecA von <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen) (W. Fischer)
α -HP523	Polyklonales Antiserum gegen HP523 (aa 1-169) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (J. Püls)
α -HP524C	Polyklonales Antiserum gegen HP524 (aa 433-748) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (J. Püls)
α -HP525	Polyklonales Antiserum gegen HP525 (Kaninchen) (natives Protein von E. Lanka erhalten)
α -HP527	Polyklonales Antiserum gegen HP527 (aa 351-1311) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen) (J. Püls)
α -HP528	Polyklonales Antiserum gegen HP528 (aa 37-522) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen)
α -HP532	Polyklonales Antiserum gegen HP532 (aa 25-280) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen)
α -HP534	Polyklonales Antiserum gegen HP534 (aa 2-196) von <i>H. pylori</i> 26659 (Kaninchen)
α -HP537	Polyklonales Antiserum gegen HP537 von <i>H. pylori</i> 26695 (Kaninchen) (N. Lehn, Regensburg)
α -HP546	Polyklonales Antiserum gegen Hp546 von <i>H. pylori</i> 26695 (Kaninchen)
α -IL8 (G265-5)	Monoklonaler Antikörper (IgG _{2b}) gegen humanes Interleukin8 (Maus) (Pharmingen)
α -P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper (IgG _{2b}) gegen Phosphotyrosin (Maus) (Santa Cruz Biotechnologies)

1.5.2 Sekundäre Antikörper

Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova)

Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen) (Dianova)

Fluorescein (FITC)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova)

Rhodamin (TRITC)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege) (Dianova)

G265-8 Biotin-gekoppelter monoklonaler Antikörper (IgG_{2b}) gegen humanes IL8 (Maus) (Pharmingen)

1.6 Enzyme und Proteine

StreptAB-Komplex/AP (alkalische Phosphatase) (DAKO); Chymotrypsin (Rinderpankreas), Expand Taq Polymerase, IgA-Protease, ProteinG-Agarose, Restriktionsenzyme, Trypsin (Rinderpankreas), T4-DNA-Ligase, RNase, Lysozym, (Roche); AP-gekoppeltes Protein A, Poly-L-Lysin (Sigma); ProteinA-Gold-Komplexe (British BioCell); Rinderserumalbumin (BSA) (Biomol); fötales Kälberserum (FCS), Trypsin/EDTA-Lösung (10x) (Gibco BRL); Proteinase K (Merck), Pferdeserum (PAA); AP-gekoppelte Nickel-Nitrilotriessigsäure (NTA) (QIAGEN), humanes IL8 (Pharmingen)

1.7 Molekulargewichtsmarker

DNA-Gelelektrophorese:	Biosizer VI [SPP1(<i>EcoRI</i>)-Standard] (Hybaid-AGS)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese:	Prestained Low Range (Bio-Rad)
	Prestained High Range (Bio-Rad)
	Low Molecular Weight

1.8 Nährmedien und Platten

Brucella-Medium	10g/l Bacto-Trypton, 10g/l Bacto-Peptamin, 1g/l Bacto-Dextrose, 2g/l Bacto-Hefeextrakt, 8,5mM NaCl, 1mM NaHSO ₃
LB-Medium	20g/l Lennox-L-Broth (Gibco), autoklaviert
LB-Platten	32g/l Lennox-L-Agar (Gibco), autoklaviert
RPMI-Medium	RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco BRL)
Serumplatten	36g/l GC-Agar-Base, autoklaviert, danach Zugabe von 8% (v/v) Pferdeserum (PAA), 1% (v/v) Vitaminmix, 10mg/l Vancomycin, 5mg/l Trimethoprim und 1mg/l Nystatin
Vitaminmix	0,01g/l Vitamin B12, 1g/l Adenin, 0,03g/l Guanin, 10g/l L-Glutamin, 0,1g/l Cocarboxylase, 0,03g/l Thiamin, 25,9g/l L-Cystein, 1,1g/l L-Cystin, 0,15g/l L-Arginin, 0,5g/l Uracil, 0,02g/l

Fe(NO₃)₃, 0,25g/l NAD⁺, 0,013g/l p-Aminobenzoesäure, 100g/l Dextrose, sterilfiltriert

1.9 Antibiotika und Zusätze in Selektivmedien und -platten

Ampicillin (Amp)	LB-Medium/-Platte	100mg/l
Chloramphenicol (Cam)	LB-Medium/-Platte	30mg/l
	Serumplatte	6mg/l
Kanamycin (Kan)	LB-Platte	50mg/l
	Serumplatte	8mg/l
Tetracyclin (Tet)	LB-Medium/-Platte)	15mg/l
5-Brom-3-Chlor-3-Indolyl- β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	LB-Platte	40mg/l
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- phosphat (BCIP)	LB-Platte	40mg/l

1.10 Puffer und Lösungen

Allgemeine Lösungen

PBS	0,2g/l KCl, 8g/l NaCl, 0,2g/l KH ₂ PO ₄ , 1,44g/l Na ₂ HPO ₄
PBS*	PBS mit Inhibitor-Mix
Inhibitor-Mix	1mM Na-Orthovanadat, 1mM PMSF, 1μM Leupeptin, 1μM Pepstatin

Puffer zur Herstellung von kompetenten Zellen

TFBI	30mM Kaliumacetat, 100mM RbCl, 10mM CaCl ₂ , 50mM MnCl ₂ ; 15% Glyzerin; pH5,2 mit 0,2M Essigsäure eingestellt; sterilfiltriert
TFBII	10mM MOPS, 75mM CaCl ₂ , 10mM RbCl; 15% Glyzerin; pH6,5 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert

Puffer und Lösungen für DNA-Präparationen

STET-Puffer	50mM Tris-HCl pH8,0, 50mM EDTA, 8% (w/v) Saccharose, 5% (v/v) Triton X-100, pH8,0
TE-Puffer	10mM Tris-HCl pH8,0, 1% SDS
P1-Puffer	50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100mg/ml RNase A, pH8,0
P2-Puffer	200mM NaOH, 1% (w/v) SDS
P3-Puffer	3M Kaliumacetat-Essigsäure, pH4,8
QBT-Puffer	50mM MOPS-NaOH, 750mM NaCl, 15% (v/v) Ethanol, 0,15% (v/v) TritonX-100, pH7,0
QC-Puffer	50mM MOPS-NaOH, 1M NaCl, 15% (v/v) Ethanol, pH7,0
QF-Puffer	50mM Tris-HCl, 1,25M NaCl, 15% (v/v) Ethanol, pH8,5

Puffer für Gelelektrophoresen

GEBS-Puffer	50mM EDTA, 20% (v/v) Glyzerin, 0,5% (w/v) N-Laurylsarkosin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH7,5
TBE-Puffer	10mM Tris-HCl, 10mM Borsäure, 0,25mM EDTA, pH8,5
Ethidiumbromidstammlösung	10mg/ml Ethidiumbromid in Wasser
Ethidiumbromidfärbebad	1mg/l Ethidiumbromid in Wasser

Puffer für Enzymreaktionen

10x A-Puffer (Roche)	33mM Tris-Acetat, 10mM Magnesiumacetat, 66mM Kaliumacetat, 0,5mM DTT, pH7,9
10x B-Puffer (Roche)	10mM Tris-HCl, 5mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 1mM 2-Mercaptoethanol, pH8,0
10x H-Puffer (Roche)	50mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 1mM DTE, pH7,5
10x M-Puffer (Roche)	100mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM MgCl ₂ , 500mM NaCl, 10mM DTT

10x L-Puffer (Roche)	10mM Tris-HCl pH7,5, 10mM MgCl ₂ , 10mM DTT
Ligationspuffer	66mM Tris-HCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM DTT, 1mM ATP, pH7,5
CIP-Puffer	10mM Tris-HCl pH8,3, 1mM ZnCl ₂ , 1mM MgCl ₂
PCR-Puffer	OptiPerform TM Buffer II (10x): 500mM OptiPerform-KOH, 160mM(NH ₄)SO ₄ , 0,1% Tween

Puffer und Lösungen für Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Probenpuffer	50mM Tris-HCl pH6,8, 100mM DTT, 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Acrylamidlösung	29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngelpuffer	375mM Tris-HCl pH8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04-0,06% TEMED
Sammelgelpuffer	125mM Tris-HCl pH6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED
Laufpuffer	25mM Tris-Base, 250mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH8,3
Coomassie-Färbelösung	0,275% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure,
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Ethanol, 7,5% (v/v) Essigsäure
Transferpuffer	25mM Tris-Base, 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol, pH8,3
TBS	20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7,5
Detektionslösung	0,1M Tris-HCl, 7mM MgCl ₂ , 0,1g/l NBT, 50mg/l BCIP, pH9,6
Waschpuffer	0,9% NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7,4, 0,2% Tween20,
Absättigungspuffer	50mM Tris-HCl, pH7,4, 200mM NaCl, 0,1% Tween, 5% Magermilchpulver
Anodenpuffer 1	10% (v/v) Methanol, 0,3M Tris-HCl, pH10,4
Anodenpuffer 2	10% (v/v) Methanol, 25mM Tris-HCl, pH10,4

Kathodenpuffer 10% (v/v) Methanol, 40mM 6-Amino-n-Caprinsäure oder Glycin, 25mM Tris-HCl, pH9,4

Puffer und Lösungen für die Aufreinigung von Fusionsproteinen

Saccharosepuffer 10mM Tris-HCl pH8,0, 750mM Saccharose, 1mM PMSF

Puffer A 100mM NaH₂O₄-NaOH, 10mM Tris, 6M Guanidiniumchlorid, pH8,0

Puffer B 100mM NaH₂PO₄-NaOH, 10mM Tris, 8M Harnstoff, pH8,0

Puffer C 10mM Tris-HCl, 100mM NaH₂PO₄, 8M Harnstoff, pH6,3

Puffer D wie Puffer C, pH5,9

Puffer E wie Puffer C, pH4,5

Lösung F 6M Guanidiniumchlorid, 200mM Essigsäure

Puffer und Lösungen für die Aufreinigung rekombinanter Proteine

Puffer W 100mM Tris-HCl pH8,0, 1mM EDTA

Puffer E = Puffer W mit 2,5mM Desthiobiotin

Puffer R = Puffer W mit 1mM HABA

Puffer für die Mikroskopie

Blockierungspuffer 3% (w/v) BSA in PBS

TE-Puffer 1mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH6,9

PBS-Puffer 50mM Na₂HPO₄, 50mM KH₂PO₄, 150mM NaCl pH6,9

PFA 3% Paraformaldehyd in PBS

1.11 Chemikalien

Agarose (SeaKem), Brucella Medium (Becton Dickinson); Fluoroprep (BioMerieux); Coomassie Brilliant Blue R250 (Biomol); GC-Agar (Creatogen); 4-Nitrophenylphosphat-di-Natriumsalz (PNPP) (Fluka); Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%), Lennox-L-LB-Agar, Lennox-L-LB-Medium, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED), PBS Dulbecco's, RPMI 1640-Medium mit L-

Glutamin (Gibco BRL); Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-)Mix (MBI Fermentas); Chloramphenicol, Methylenblau, Nystatin, PMSF (Merck); Sephadex G-50 (Pharmacia); 5-Brom-3-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP), Guanidin-HCl, Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT) (Roth); Bromphenolblau (Serva); Agarose, Ampicillin, DAP, Ethidiumbromid, Formalin 37%, Glutaraldehyd 25%, Kanamycin, Leupeptin, Natrium-Orthovanadat, PFA, Pepstatin, Saponin, Tetracyclin, Trimethoprim, TritonX-100, Tween20, Vancomycin, X-Gal (Sigma).

Alle weiteren Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse p.a.“ von Merck, Roth oder Sigma bezogen.

1.12 Geräte und Apparaturen

Brutschränke (Binder); SpeedVac (Savant); Agarosegelkammern, PAA-Minigel-Apparaturen und Gene Pulser (Biorad); Elektroporationsküvetten (Eurogentec); Heizblöcke (Techne); Filterpapiere (Whatman); Magnetrührer (Heidolph); pH-Meter (WTW); Zentrifugen (Heraeus, Beckman, Sorvall); Waagen (Fischer); PCR-Gerät (Perkin Elmer Cetus); Fluoreszenzmikroskope (Leica); Schüttler (Eppendorf); Wasserbäder Schüttelinkubatoren (GFL); Mikrowelle (AEG); Vortex (Scientific Industries); Photometer (Hach); Magnetrührer (Heidolph); Spannungsquellen (Biotec Fischer und Delta Elektronik); Sterile Werkbank (BDK); Anaerobentöpfe (Fritz Gössner GmbH); Dialyseschläuche (Medicell). PVDF-Membran (BioRad). Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schüll); Zellkulturflaschen/-platten (Nunc); Zellschaber (Falcon); Röntgenfilme und Expositionskassetten (Fudji und Kodak); Ultraschallgerät (Branson); Video-Geldokumentationsanlage (Herolab); Elektroblobtapparatur (Biotec Fischer); Einfrierröhrchen (Nalgene).

2 Methoden

2.1 Bakterien- und Zellkulturen

2.1.1 Kultivierung von Bakterien

E. coli wurde auf LB-Platten kultiviert, die bei Bedarf entsprechende Antibiotika enthielten. Platten- und Flüssigkulturen wurden bei 37°C über Nacht im Brutschrank bzw. Schüttelinkubator angezogen. Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer halben Platte in 1ml LB-Medium mit 20% Glycerin resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

H. pylori wurde auf Serumplatten oder antibiotikahaltigen Serum-Selektivplatten unter mikroaerophilen Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) ein bis zwei Tage im Anaerobentopf kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden die Bakterien in FCS-haltigem (10%) Brucella-Medium angezogen.

Aus der Stammkultur (-70°C) wurden die Bakterien auf Serumplatten ausgestrichen und 3 Tage bei 37°C bebrütet. Nach Überimpfen auf neue Platten wurden die Bakterien weitere ein bis zwei Tage kultiviert, bevor sie für das entsprechende Experiment eingesetzt wurden.

Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial von einer dicht bewachsenen Platte in 1ml Brucella-Medium mit 20% Glycerin und 10% FCS suspendiert und bei -70°C eingefroren.

2.1.2 Messen der optischen Dichte von Flüssigkulturen

Die Bakterien wurden von einer Platte abgenommen und im gewünschten Medium resuspendiert. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=550\text{nm}$ (OD₅₅₀) gegen das unbeimpfte Medium.

2.1.3 Transformation von Bakterien

2.1.3.1 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode

Nach Hanahan (1983), und Messing *et al.*, 1982 wurden zur Herstellung von Zellen für die chemische Transformation 100ml LB-Medium mit 5ml Übernacht-Kultur von *E.coli* angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 5min auf Eis gekühlt und danach durch Zentrifugation (2300xg, 15min, 4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde in 20ml TFB I resuspendiert und 5min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (2300xg, 15min, 4°C), in 4ml TFB II resuspendiert und nach 15min Inkubation auf Eis in Aliquots von 50-100µl abgefüllt, auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.1.3.2 Chemische Transformation von *E. coli*-Zellen nach der Rubidium-Chlorid-Methode

Zur chemischen Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen von -70°C auf Eis aufgetaut, 3-5µl Ligationsansatz oder 1-2µl Plasmid-DNA zugefügt und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 90s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend 1min auf Eis inkubiert. Zu dem Transformationsansatz wurden

500µl LB zugegeben und 1h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden geeignete Mengen des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.3.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von Zellen für die Elektroporation wurde 1l LB-Medium mit 10ml einer *E. coli*-Vorkultur angeimpft und auf einem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 15min auf Eis gestellt und durch Zentrifugation (4°C, 2300g, 15min) sedimentiert. Danach wurden die Zellen in einem Liter eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500ml eiskaltem H₂O resuspendiert und wieder zentrifugiert. Nach erneutem Waschen in 20ml 10%iger eiskalter Glycerinlösung wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 3-4ml in 10%iger eiskalter Glycerinlösung resuspendiert. Davon wurden Aliquots von 40µl auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.1.3.4 Elektroporation von *E. coli*-Zellen

Zur Elektroporation wurden 40µl der Zellsuspension mit 1µl DNA-Lösung gemischt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde in einem Gene Pulser Apparatur bei 2,5kV, einer Kapazität von 25µF und einem Widerstand von 200 Ohm durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 1ml LB-Medium suspendiert und 1h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden geeignete Mengen des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.3.5 Transformation von superkompetenten *E. coli* TOP10-Zellen

Die käuflichen superkompetenten *E. coli* TOP10-Zellen (Invitrogen) wurden dann verwendet, wenn eine erhöhte Transformationseffizienz erwünscht war. Die Transformation erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.1.3.6 Transformation von *H. pylori* (Haas et al., 1993a)

H. pylori-Zellen besitzen eine natürliche Transformationskompetenz. Aus diesem Grund müssen die Bakterien vor der Transformation nicht speziell präpariert werden. Für den Transformationsansatz wurden die Bakterien von Platte mit einem Wattestäbchen in Brucella-Medium/10% FCS resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 0,2-0,3 eingestellt. Für jeden Ansatz wurde 1ml dieser Suspension in einen Napf einer 24-Napf-Zellkulturschale pipettiert. Anschließend wurden 1-3µg DNA zugegeben und 4-8h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf

entsprechende Serum-Selektivplatten ausplattiert und unter Standardbedingungen inkubiert (4-10 Tage).

2.1.4 Konjugation von Bakterien

2.1.4.1 Konjugation von *E. coli*-Zellen

Zur Konjugation eines Plasmids von einem *E. coli*-Stamm in einen anderen *E. coli*-Stamm wurden Donor-, Mobilisator- und Akzeptor-Stamm auf geeignete LB-Selektionsplatten ausgestrichen und 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Nachdem die Bakterien in 1ml LB-Medium resuspendiert worden sind, wurde eine OD₅₅₀ von 10 eingestellt und die Bakteriensuspensionen im Verhältnis 1:1:2 (Donor-: Mobilisator-: Empfänger-Stamm) gemischt (je 25µl des Donor- und des Mobilisatorstammes sowie 50µl des Akzeptorstammes). Der Ansatz wurde 2min bei 6000xg zentrifugiert und der Überstand bis auf 30µl verworfen. Die Bakteriensuspension wurde auf einen Nitrozellulose-Filter, der auf einer antibiotikafreien LB-Platte lag, pipettiert. Nach 3h Inkubation bei 37°C wurde der Filter in ein steriles 10ml Röhrchen überführt und die Zellen mit 1ml LB-Medium vom Filter abgespült. Danach wurden geeignete Mengen des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Mobilisator wurde der Stamm HB101 (Boyer und Roulland-Dussiox, 1969), als Akzeptor der Stamm DH5αRif (ein spontan Rifampicin-resistent gewordenes Derivat von DH5α) eingesetzt. Der Mobilisator überträgt sein Plasmid mit den *tra*-Genen auf den Donorstamm, dessen Plasmid nur einen Mobilisierungsursprung enthält. Daraufhin ist es dem Donorstamm möglich, sein Plasmid in den Akzeptorstamm zu übertragen.

2.1.5 Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese mit den Transposons TnMax6, TnMax9 und TnMax14 wurde nach der Standardmethode nach Haas *et al.*, (1993b) durchgeführt. Die mutagenisierten Plasmide wurden jedoch entweder durch Konjugation in den Stamm DH5αRif (für die Mutagenese mit TnMax9) oder durch Transformation in den *E. coli*-Stamm CC118 (für die Mutagenese mit TnMax6 und TnMax14) überführt. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten, die mit Ampicillin, X-Gal oder BCIP supplementiert waren. Plasmide von Ampicillin-resistenten bzw. blauen Kolonien wurden isoliert und die Positionen der Transposoninsertionen durch Restriktionsanalyse kartiert. Zur Sequenzierung (siehe II 2.2.13) wurden die Plasmide, die eine Transposoninsertion aufwiesen, mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und als Matrize in der

PCR eingesetzt. Als Primerbindungsstelle wurde die interne M13-Rp1 Stelle benutzt, die bei allen TnMax-Transposons vorhanden ist.

2.1.6 Zellsubfraktionierung von *H. pylori*

2.1.6.1 Isolierung der Gesamtmembranfraktion von *H. pylori*

Das Bakterienmaterial von 5-10 gut bewachsenen Serumplatten wurde mit einem Wattestäbchen abgenommen und in 3ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis mit einem Ultraschallgerät (5 Pulse \times 1min bei 100 Watt) oder mit der „French Press“ aufgeschlossen. Danach wurden die nicht aufgeschlossenen Zellen und Zellbruchstücke durch Zentrifugation sedimentiert (12000xg, 15min, 4°C). Der Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (100000xg, 1h, 4°C), um dadurch die Gesamtmembranfraktion von der Zytoplasmafraktion abzutrennen. Dabei sedimentierten die Membranfraktionen, die Zytoplasmafraktion befand sich im Überstand. Das Sediment wurde in 200 μ l PBS resuspendiert.

2.1.6.2 Osmotischer Schock

Das Zellmaterial einer *H. pylori*-Platte wurde in 1ml 10mM Tris-HCl, pH8,0 gewaschen und zentrifugiert (6000xg, 3min). Die Zellen wurden in 1ml 25% (w/v) Saccharose, 10mM EDTA resuspendiert und bei Raumtemperatur 10min gerüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 3000xg 3-5min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen zügig in 1ml eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert. Nach zehnmütigem Rütteln der Zellen bei 4°C wurde erneut 5min zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine des Periplasmas enthielt, wurde sterilfiltriert und das Sediment in PBS resuspendiert. Anschließend wurde das Sediment noch zusätzlich einer Proteasebehandlung (siehe II 2.1.6.3) unterzogen oder zusammen mit dem Überstand direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe II 2.3.2.2).

2.1.6.3 Proteasebehandlung von Bakterien

Bakterien einer Serumplatte, bzw. Zellen, die bereits osmotisch geschockt worden sind (siehe II 2.1.6.2), wurden in PBS resuspendiert. Es wurde eine OD₅₅₀ von 5,0 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 100 μ l mit 1 μ l Trypsin (5-10mg/ml) versetzt und das Gemisch 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien wurden 1min bei 3000xg zentrifugiert und zur Blockierung der Proteasen wurde das Sediment mit PBS/10% FCS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und auf ein SDS-Gel (siehe II 2.3.2.2) aufgetragen.

2.1.7 Kultivierung von Zellkulturen

Epithelzelllinien wurden in 75cm²-Zellkulturflaschen in RPMI-Medium, das mit 10% FCS supplementiert war, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine konfluent gewachsene Kultur wurde nach Entfernen des alten Kulturmediums mit 5ml PBS-Dulbecco's gewaschen und anschließend mit 2ml Trypsin-EDTA-Lösung (1x) versetzt. Das Ablösen der Zellen nach etwa 10min Inkubation bei 37°C wurde mikroskopisch kontrolliert. Zur Inaktivierung der Protease wurden 2ml RPMI-Medium zugesetzt. AGS-Zellen haben in etwa eine Verdopplungszeit von 24h, deshalb wurde in einer neuen 75cm²-Zellkulturflasche 1ml einer frischen Zellsuspension mit 10ml frischem Zellkulturmedium versetzt. Die Kultur wurde zwei Tage inkubiert.

AGS-Zellen, die für Infektionsexperimente benötigt wurden, wurden je nach Bedarf in 6-Napf-Zellkulturschalen (10cm² Grundfläche und 2ml Medium pro Napf), 24-Napf-Zellkulturschalen (2cm² Grundfläche und 1ml Medium pro Napf) oder 175 cm²-Zellkulturflaschen (25ml Medium) angezogen. Die Zellsuspension wurde mit dem Zellkulturmedium entsprechend der benötigten Gesamtgrundfläche, Mediumvolumen und gewünschter Zelldichte gemischt und in die verschiedenen Nöpfe pipettiert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ bis zum gewünschten Prozentsatz an Konfluenz inkubiert.

2.1.8 Infektionsexperimente mit *H. pylori*

H. pylori-Zellen wurden von einer gut bewachsenen Platte mit einem Wattestäbchen abgenommen und in Brucella-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte OD₅₅₀ bestimmt. Vor Infektion der eukaryontischen Zellen mit den Bakterien wurde das alte Zellkulturmedium durch frisches ersetzt.

2.1.8.1 Infektion für Phosphotyrosin-Assay

Für die Infektion im Phosphotyrosin-Assay wurden die AGS-Zellen in einer 6-Napf-Zellkulturschale bis zu einer 90%igen Konfluenz kultiviert (ca. 1x10⁶ Zellen pro Napf). Die Zellen wurden dann mit der *H. pylori*-Suspension mit einer OD₅₅₀ von 0,1 infiziert, d.h. mit einer m.o.i. (multiplicity of infection) von etwa 100. Die Infektion wurde nach 4h bei 37°C und 5% CO₂ auf Eis gestellt und jeder Napf 4x mit 1ml PBS gewaschen. Anschließend wurde jeder Napf mit 1ml PBS* versetzt und die Zellen mit einem Zellkulturschaber abgelöst. Die infizierten AGS-Zellen wurden bei 3000xg, 10min und 4°C zentrifugiert, das Sediment wurde in 30µl PBS* resuspendiert und durch SDS-PAGE und Western-Blot (siehe II 2.3.2.2; II 2.4.1.1) analysiert.

2.1.8.2 Infektion für Mikroskopie

Für die Infektion zur anschließenden Mikroskopie wurden die AGS-Zellen auf Deckgläsern in einer 24-Napf-Zellkulturschale bis zu einer 50%igen Konfluenz kultiviert (ca. 1×10^5 Zellen pro Deckglas). Die Zellen wurden mit einer *H. pylori*-Suspension mit einer OD₅₅₀ von 0,05, mit einer m.o.i. von etwa 100, infiziert. Die Infektionszeit betrug je nach Experiment zwischen 30-180min bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die infizierten Zellen 4x mit PBS gewaschen und für die jeweilige Mikroskopie (siehe II 2.5) weiter präpariert.

2.1.9 Herstellung bakterieller Zellysate

Zur Herstellung von Lysaten wurden Bakterien in PBS suspendiert und auf eine OD von 1 eingestellt. 1ml dieser Suspension wurde 2min bei 6000xg zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zum Auftragen auf SDS-Polyacrylamidgele (siehe II 2.3.2.2) in 125µl 2x Probenpuffer aufgenommen, vor dem Auftragen 5-10min bei 95°C aufgeköcht und 2min bei 12000xg zentrifugiert.

2.2 Arbeiten mit DNA

Für die meisten DNA-Arbeiten wurden die in Sambrook *et al.*, 1989 beschriebenen Methoden angewandt.

2.2.1 Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

2.2.1.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA nach der Kochmethode

(Holmes und Quigley, 1981) Diese Methode eignet sich besonders für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *endA1*-*E.coli*-Stämmen. Bei *endA*⁺-Stämmen kann die isolierte Plasmid-DNA für anschließende Transformationen, aber nicht zur Restriktionsanalyse eingesetzt werden.

Eine Einzelkolonie wurde auf eine antibiotikahaltige LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C oder 28°C inkubiert. Davon wurde eine Impföse Zellmaterial in 300µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15µl Lysozymbilösung (10mg/ml in STET-Puffer) wurde der Ansatz 5min auf Eis gestellt. Durch einminütiges Kochen bei 100°C wurden die Zellen lysiert, und anschließend wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA durch 10minütige Zentrifugation bei 12000xg sedimentiert. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der wässrige Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde mit 200µl Isopropanol versetzt und 10min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 10min bei 12000xg zentrifugiert, der

Überstand verworfen und der Niederschlag einmal mit 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen. Nach 5min Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA in einer Vakuumzentrifuge 15min getrocknet und danach in 50µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Von der isolierten Plasmid-DNA wurden, je nach Kopienzahl des Plasmids pro Zelle, 1-5µl auf einem TBE-Agarosegel (siehe II 2.2.4) getestet.

2.2.1.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem „Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN)

Die Reinigung und Anreicherung von Plasmid-DNA, z.B für Sequenzierungszwecke (siehe II 2.2.13) wurde mit dem „Plasmid Midi Kit“ von QIAGEN nach Gebrauchsanweisung durchgeführt.

2.2.1.3 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem „QIAprep[®] Miniprep“ (QIAGEN)

Wenn Plasmid-DNA aus *endA*⁺-Stämmen oder von größerer Reinheit (etwa zur Sequenzierung (siehe II 2.2.13) benötigt wurden, wurde das „QIAprep[®] Miniprep“ von Qiagen zur Isolierung benutzt.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *H. pylori*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori* wurde das „Wizard Plus SV Minipreps[™] Purifikationssystem“ von Promega verwendet.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori*

Zur Präparation von chromosomaler DNA aus *H. pylori* wurde das „QIAamp Tissue Kit“ von QIAGEN verwendet.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.4 Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA

Für analytische Zwecke wurden Agaroseflachbettgele (11,5x15cm²) mit einer Agarosekonzentration, je nach gewünschtem Auftrennungsbereich, zwischen 0,8% und 2,0% (w/v) eingesetzt. Als Gel- und Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit ¼ Volumen GEBS versetzt. Nach erfolgter Auftrennung bei 100V wurde das Gel 10-15min in einer Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) gefärbt und die DNA unter UV-Licht (260nm) sichtbar gemacht. Mit einem

Videosystem der Firma Polaroid/Intas erfolgte die Dokumentation.

Für präparative Gelelektrophoresen wurden ebenfalls Agaroseflachbettgele verwendet, jedoch mit 1xTAE als Gel- und Laufpuffer. Die DNA wurde durch 10minütiges Schwenken des Gels in einer 0,1% (w/v) Methylenblau-Lösung und anschließendes Wässern angefärbt. Die DNA-Banden wurden auf einem Durchlichttisch ausgeschnitten und die DNA aus der Agarose durch das „Ultra Clean TM15 Kit“ von Dianova isoliert (siehe 2.2.5).

2.2.5 DNA-Fragmentisolierung

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten (0,1-10 kb) aus TAE-Agarosegelen (siehe 2.2.4) wurde das „Ultra Clean TM15 Kit“ von Dianova verwendet.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.6 Restriktion

Die Restriktion von DNA wurde standardmäßig für analytische Zwecke in einem Volumen von 10µl bzw. für präparative Zwecke in einem 50-80µl Volumen durchgeführt. Puffer- und Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen richteten sich nach den Angaben des jeweiligen Herstellers. Die DNA-Menge betrug 0,1-1µg, die Enzymmenge etwa 1-2U/µg DNA. Bei Restriktionen mit mehreren Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigten, wurde zwischen den einzelnen Reaktionsschritten eine Zentrifugationsentsalzung (siehe II 2.2.8) durchgeführt. Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von ¼ Volumen GEBS-Puffer und 10minütiges Erhitzen bei 65°C abgestoppt und danach auf analytische oder präparative Agarosegele aufgetragen (siehe II 2.2.4).

2.2.7 Dephosphorylierung von linearer DNA

Zur Erhöhung der Ligationseffizienz von DNA-Fragmenten mit Vektoren, die nur mit einem Enzym linearisiert worden sind, wurde durch Dephosphorylierung der 5'-Enden des Vektors die Rückligationsrate stark vermindert. Für die Reaktion wurden in einem 30µl-Ansatz 20µl der geschnittenen Vektor-DNA mit CIP-Puffer und 1U CIP (alkalische Phosphatase) 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5mM EDTA und 0,5% (w/v) SDS beendet. Die Phosphatase wurde anschließend mit 0,1mg Proteinase K (30min, 56°C) verdaut. Der Ansatz wurde mit 10µl GEBS versetzt und 10min bei 65°C inaktiviert. Nachdem eine Zentrifugationsentsalzung (siehe II 2.2.8) durchgeführt worden war, wurde der Vektor für die Ligation eingesetzt (siehe II 2.2.9).

2.2.8 Zentrifugationsentsalzung

Zur schnellen Abtrennung von Salzen, Nukleotiden sowie kurzen DNA-Fragmenten von größeren DNA-Molekülen wurde die Zentrifugationsentsalzung als ausschlusschromatographisches Verfahren eingesetzt. Sephadex G-50 wurde als Säulenmaterial verwendet, das in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert wurde, dessen Boden mit einer Kanüle durchbohrt worden war. Zur Abdichtung des Loches diente ein Tropfen einer Suspension silikonisierter Glasperlen. Die Säule wurde durch Zentrifugation (2min, 2700xg) und einmaligem Waschen mit 100µl H₂O_{dest} gepackt. Die DNA wurde mit ¼ Volumen GEBS-Puffer versetzt und dann auf die Säule aufgetragen. Durch erneute Zentrifugation (2min, 2700xg) wurde die DNA salzfrei in einem frischen Eppendorf-Gefäß aufgefangen.

2.2.9 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in einem Gesamtvolumen von 10µl bei einer Temperatur von 4°C über Nacht oder 4h bei 14°C durchgeführt. Üblicherweise wurden 10-50ng der geschnittenen Vektor-DNA zusammen mit einem vierfachen Überschuss an zu klonierendem DNA-Fragment mit 1U T4-DNA-Ligase und 1µl Ligationspuffer (10x) in einem Volumen von 10µl inkubiert.

2.2.10 DNA-Fällung mit Ethanol

Die Ethanolfällung wurde zur Aufkonzentrierung und Entsalzung DNA-haltiger Lösungen benutzt. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen einer 3M Natriumacetat-Lösung und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und das Gemisch 30min bei -70°C inkubiert. Durch zehninütige Zentrifugation wurde die DNA bei 12000xg sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in dem gewünschten Volumen H₂O_{dest} aufgenommen.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) erlaubt die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide, die als Primer für DNA-Polymerasen thermophiler Bakterien dienen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Amplifikation von Fragmenten eingesetzt, die zur Klonierung und zur Sequenzierung (siehe II 2.2.13) nötig waren. Üblicherweise enthielt ein 100µl-Ansatz 1-2ng der Matrizen-DNA, je 100pmol der als 5'- und 3'-Primer verwendeten Oligonukleotide, 200µM dNTPs, PCR-Puffer und 1-2U *Taq*-DNA-Polymerase. Normalerweise wurde

folgender Reaktionszyklus verwendet: Denaturierung der DNA 1min bei 94°C, Hybridisierung der Oligonukleotide 2min bei 42-52°C, und Polymerisation 2min bei 72°C. Die Reaktion wurde nach 25 Zyklen abgebrochen. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf einem TBE-Agarosegel (siehe II 2.2.4) analysiert. Über präparative Agarosegele (siehe II 2.2.4) wurden die PCR-Fragmente, die für die Klonierung eingesetzt werden sollten, aufgereinigt.

Für die Klonierung wurden die verwendeten Oligonukleotide mit einer Verlängerung am 5' Ende versehen, die eine geeignete Erkennungssequenz enthielt. Die gereinigten PCR-Fragmente wurden dann 4h mit den entsprechenden Enzymen geschnitten. Danach wurde eine Zentrifugationsentsalzung (siehe II 2.2.8) durchgeführt und das Fragment in einen geeigneten Vektor ligiert.

2.2.12 Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning®

PCR-Produkte, die sehr lang und damit schwerer zu klonieren waren, wurden mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning®-Kits mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) ligiert. Da die Taq-Polymerase eine Sequenz-unspezifische terminale Transferase-Aktivität besitzt, wird bei jeder Kettenverlängerung ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts angehängt. Der linearisierte pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt einen überhängenden 3'-Desoxythymidin (T)-Rest und eine kovalent gebundene Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus, wodurch eine effektive Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor vermittelt wird. Zusätzlich enthält das Kit superkompetente TOP10-*E.coli*-Zellen (siehe II 2.1.3.5), die sehr effizient transformierbar sind.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter DNA wurde in Zusammenarbeit mit den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) sowie im Max von Pettenkofer-Institut durchgeführt. Die zur Sequenzierung eingesetzte Plasmid-DNA wurde über Qiagen-Säulen (siehe II 2.2.1.2; II 2.2.1.3) gereinigt und isoliert.

2.3 Arbeiten mit Protein

2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur schnellen Abschätzung der Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurde der Farbbindingstest nach Bradford (1976) in der von Friedenauer und Berlet (1989) modifizierten Form angewendet.

Dafür wurden 100µl der proteinhaltigen Probe mit 1ml Bradford-Reagenz versetzt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Probe gegen einen entsprechenden Blindwert bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit BSA aufgenommen.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.3.2.1 Vorbereitung von Proteinproben

Zur Vorbereitung von Proteinproben für die Gelelektrophorese wurden diese nach einer modifizierten Methode von Wessel und Flügge (1984) behandelt. Dazu wurden 300µl der proteinhaltigen Lösung mit 600µl Methanol und 200µl Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde zunächst 1min und nach Zugabe von 200µl Wasser erneut 1min gerüttelt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 12000g wurde die wässrig-methanolische Phase vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde 1ml Methanol zugegeben, erneut gerüttelt und nach 2minütiger Zentrifugation bei 12000xg das Lösungsmittel vom Niederschlag abgetrennt. Der Niederschlag wurde in 10µl Probenpuffer aufgenommen. Die Probe wurde 30min gerüttelt, 10min bei 95°C inkubiert und danach 2min bei 12000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe II 2.3.2.2).

2.3.2.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Analytische Gelelektrophoresen wurden mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-ProteinIII™ von BioRad durchgeführt. Aus einer 30%igen (w/v) Acrylamidlösung wurden standardmäßig 6-12%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele gegossen. Trenn- und Sammelgele wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt. Das Trenngel wurde bis 3cm unter den Rand in die Glaskassette gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das überstehende H₂O abgezogen und das zuvor angesetzte Sammelgel eingefüllt. Zur Ausbildung von Geltaschen wurde ein Kamm eingesetzt, der nach erfolgter Polymerisation entfernt wurde. Die Gelkassette wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Standardmäßig wurden 5-10µl der in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteinproben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde ca. 2h bei einer Spannung von 120V durchgeführt.

2.3.2.3 Anfärbung der aufgetrennten Proteine

Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde 15min in Coomassie-Lösung angefärbt und danach so lange in Entfärbelösung geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

2.3.3 Fällung von Proteinen

2.3.3.1 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

siehe II 2.3.2.1

2.3.3.2 Ammoniumsulfatfällung

Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung wurde unter Rühren auf Eis im Verhältnis 1:1 zur Proteinprobe tropfenweise zugegeben und zwei Stunden auf Eis gerührt. Anschließend wurde das Präzipitat in SS34-Rotor 30min bei 20000xg und 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 5ml PBS gelöst, in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht gegen PBS dialysiert.

2.3.4 His₆-markierte Proteine

2.3.4.1 Herstellung und Aufreinigung der Fusionsproteine

Zur Herstellung von Fusionsproteinen wurde das pEV40-Expressionssystem verwendet (Pohlner *et al.*, 1993). Es wurden Fusionen erzeugt, die unter der Kontrolle des λ_{PL} -Promotors stehen. Die Fusionen bestehen aus dem N-terminalen Teil der RNA-Polymerase des Phagen MS2 und 6 Histidinresten (His₆) vor dem N-Terminus des gewünschten (Teil-)Proteins. Die Genfusion wurde durch Ligation des entsprechenden Genabschnittes in den passenden Expressionsvektor pEV40 (Leserahmen a, b, c) erhalten. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* 2136 elektroporiert. Dieser Stamm exprimiert den temperatursensitiven $\lambda_{cl_{ts}}$ -Repressor. Die Klone wurden zunächst bei 28°C kultiviert, um toxischen Effekten des Fusionsproteins vorzubeugen. Nachdem Plasmide isoliert und durch Restriktionsanalyse überprüft worden sind, wurde ein entsprechender richtiger Klon in 50ml LB-Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 28°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde als Negativkontrolle ein geringes Volumen entnommen, die restliche Kultur in 450ml auf 44°C vorgewärmtes LB-Amp-Medium angeimpft. Diese Hauptkultur wurde 2-3h bei 42°C geschüttelt. Bei dieser Temperatur wird der

Repressor inaktiviert und das Fusionsprotein kann produziert werden. Nach 2-3 Stunden wurde ein geringes Volumen als Positivkontrolle entnommen. Positiv- und Negativkontrolle wurden in einer SDS-PAGE (siehe II 2.3.2.2) daraufhin überprüft, ob eine Fusionsproteinbande nach Erhöhung der Temperatur (Positivkontrolle) auftritt. Die Bakterienkultur wurde 15min auf Eis gestellt und 15min bei 2300xg und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde das Bakteriensediment zur Isolierung des Fusionsproteins nach Strebel *et al.*, 1986 verwendet.

Im Allgemeinen ist das gebildete Fusionsprotein im Zytoplasma der Bakterienzelle unlöslich und fällt in aggregierter Form als sogenannte „inclusion bodies“ aus. Diese Einschlüsse können in einem ersten Reinigungsschritt von den übrigen Zellproteinen größtenteils abgetrennt werden. Hierfür wurde das Bakteriensediment in 5ml Saccharose-Puffer resuspendiert und 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 5ml eiskalte 20mM EDTA-Lösung zugegeben (15min auf Eis). Nach Zugabe von 125µl 20% (v/v) TritonX-100 und 200µl 100mM PMSF-Lösung, Inkubation 30min bei 37°C sowie einer Ultraschallbehandlung (5 Pulse á 1min, 100 Watt) lysierten die Zellen. Das Lysat wurde 15min bei 15000xg und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 5ml Puffer A resuspendiert (Gn-Lysat).

Im zweiten Schritt erfolgte eine Aufreinigung der Fusionsproteine durch eine Metall-Chelat-Chromatographie. Hierbei bildet sich ein Komplex zwischen den sechs Histidinresten (His6-) des Fusionsproteins und den Ni²⁺-Ionen der Ni²⁺-NTA-Agarose. Zur Vorbereitung des Chromatographiematerials wurden 4ml der Ni²⁺-NTA-Agarose in ein 50ml-Röhrchen gefüllt, zentrifugiert (50xg, 5min, 4°C), und das Agarose-Sediment wurde zweimal mit 20ml Puffer A gewaschen. Anschließend wurde das Gn-Lysat dazugegeben und die Suspension 3h bei 4°C unter ständigem Mischen zum Binden des Fusionsproteins inkubiert. Darauf wurde der Ansatz zentrifugiert und der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen verworfen. Nach drei Waschschritten mit je 4ml Puffer B folgten 2 Waschschrritte mit je 4ml Puffer C. Zur ersten Elution des Fusionsproteins von der Ni²⁺-NTA-Agarose wurden 3ml Puffer D zugegeben und anschließend zentrifugiert (ED-Fraktion). Im zweiten Elutionsschritt wurde dasselbe mit 3ml Puffer E wiederholt (EE-Fraktion). Es wurden von jedem Reinigungsschritt 5µl Aliquots entnommen, mit Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (siehe II 2.3.2.2) auf enthaltenes Fusionsprotein getestet. Die Fraktion mit der größten Proteinkonzentration wurde zweimal gegen PBS dialysiert und bei -80°C gelagert.

2.3.4.2 Immunisierung von Kaninchen

Zur Gewinnung von polyklonalen Antisera wurden Kaninchen mit den His₆-markierten Fusionsproteinen, nativen Protein (je 200-400µg), oder Peptiden

immunisiert. Die Immunisierung wurde bei Dr. Pineda-Antikörper-Service, Berlin, im Max von Pettenkofer-Institut oder bei EUROGENTEC nach einem Basisprotokoll (2 Monate) in Auftrag gegeben. Am Tag 1 wurde dem Tier Präimmunserum entnommen und eine 1. Immunisierung (50µg Protein in Freundschem kompletten Adjuvanz, intradermal) durchgeführt. Zwanzig Tage später erfolgte eine 2. Immunisierung (50µg Protein in Freundschem kompletten Adjuvanz, subkutan), am Tag 30 eine 3. Immunisierung (50µg Protein in Freundschem inkompletten Adjuvanz, intradermal) und am Tag 40 eine 4. Immunisierung (50µg Protein in Freundschem inkompletten Adjuvanz, subkutan). Am 61. Tag wurde Blut entnommen, und das gewonnene Antiserum wurde im Western Blot (siehe II 2.4.1.1) im Vergleich zum Präimmunserum mit den entsprechenden Bakterienlysaten getestet. Wenn spezifische Antikörper gegen das Fusionsprotein vorhanden waren, wurde das Kaninchen ausgeblutet und das Antiserum gewonnen. Ansonsten fand eine weitere Immunisierung (50µg Protein in Freundschem inkompletten Adjuvanz, intramuskulär) statt, und die Ausblutung wurde am 90. Tag durchgeführt.

2.4 Arbeiten mit Antikörpern

2.4.1 Western Blot und immunologischer Nachweis eines Antigens

Für den Blot wurde eine Methode nach Towbin *et al.*, (1979) angewendet. Hierbei werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe II 2.3.2.2) vom Polyacrylamidgel auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen übertragen. Bei dieser Methode erfolgt der Transfer mittels eines Semi-Dry-Graphitplattensystems. Anschließend erfolgt die Detektion einzelner Proteine mit spezifischen Antikörpern.

2.4.1.1 Western Blot

Nach der Elektrophorese (siehe II 2.3.2.2) wurde das Gel aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und das Sammelgel entfernt. Auf einer Graphitanode wurde ein Stapel aus zwei dicken und zwei dünnen Filterpapieren, einem Nitrozellulosefilter, dem Gel und wiederum zwei dünnen und zwei dicken Filterpapieren aufgeschichtet. Alle Filterpapiere und der Nitrozellulosefilter waren mit Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde die Graphitkathode auf den Stapel gelegt. Der Proteintransfer erfolgte 1h bei 1mA/cm². Zur Absättigung wurde die Nitrozellulosmembran 1h bei Raumtemperatur in TBS, 3% (w/v) BSA geschwenkt. Danach wurde das jeweilige Antiserum in variabler Menge zugegeben, und die Membran wurde mindestens 2h oder über Nacht bei Raumtemperatur in der

verdünnten Antikörperlösung geschwenkt. Anschließend wurde der Filter 3x je 5min in TBS, 0,5% (v/v) Tween 20 gewaschen. Zur Kopplung wurde der Filter mit einem Konjugat aus Protein A (AP-gekoppelt) bzw. der zweite Antikörper (POX-gekoppelt) in einer Konzentration von 1:2500 in 5ml TBS, 3% (w/v) BSA 1h inkubiert. Dann wurde der Filter 3mal je 5min in TBS, 0,5% (v/v) Tween 20 gewaschen.

Entwicklung mit AP-Konjugaten

Diese Methode wurde standardmäßig angewendet, andernfalls wurde auf eine andere Methode verwiesen. Die Membran wurde in einer Plastikschiene in 10ml Detektionslösung geschwenkt. Sobald die Proteinbanden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion mit H₂O gestoppt.

Entwicklung mit POX-Konjugaten

Die Verwendung von POX-Konjugaten ermöglicht die Entwicklung mit ECLTM Western Blot Detektionsreagenzien (Amersham), die eine sensitivere Detektion von Proteinbanden über Chemilumineszenz ermöglichen. Die Auswertung erfolgt auf Röntgenfilmen.

Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.4.1.2 Phosphotyrosin-Blot

Die Detektion von tyrosinphosphorylierten Proteinen erfolgte mit dem Antikörper α -P-Tyr mAK PY99. Hierbei entspricht der eigentliche Blotaufbau dem in II 2.4.1.1 beschriebenen. Jedoch sind die unteren dicken Filterpapiere in Anodenpuffer I getränkt, die folgenden dünnen Filterpapiere und die PVDF-Membran (vorher in Methanol getränkt) in Anodenpuffer II. Die oberen Lagen von dünnen und dicken Filterpapieren wurden in Kathodenpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte 1½h bei 1mA/cm².

Die Membran wurde über Nacht in 5ml Absättigungspuffer auf dem Rollmischer inkubiert. Danach wurde der Puffer verworfen und PY99 1:1000 in 5ml Hybridisierungspuffer verdünnt zur Membran gegeben. Nach 1½h Inkubation wurde 2h gewaschen, wobei der Waschpuffer alle 15min gewechselt wurde. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper α -Maus-IgG-POX (1:2500 in 5ml Verdünnungspuffer) 1h inkubiert. Danach wurde dreimal je 10min gewaschen und schließlich mit dem Renaissance[®]-Kit von NEN nach Gebrauchsanweisung entwickelt.

2.4.1.3 Ni²⁺-NTA-Blot

Die Bildung von His₆-markierten Fusionsproteinen (siehe II 2.3.4) kann detektiert werden, indem die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und dort mit einem Ni²⁺-NTA-AP-Konjugat hybridisiert werden.

Der Aufbau des Blots und die Transferbedingungen entsprechen den in siehe II 2.4.1.1 beschriebenen. Nachdem die Membran mit 5ml TBS/3% (w/v) BSA blockiert worden ist, folgten 3 Waschriffe à 10min mit 10ml TBS/0,05% Tween20. Dann wurde das Konjugat 1:1000 in 5ml Waschpuffer zur Membran gegeben. Nach 1h Inkubation erfolgten drei Waschriffe. Die Entwicklung erfolgte wie unter II 2.4.1.1 für AP-Konjugate beschrieben.

2.4.2 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von IL8

ELISA dienen zum spezifischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper (Engvall *et al.*, 1971). Im Sandwich-ELISA (Yolken *et al.*, 1977) wird ein sogenannter Fangantikörper in den Polystyrolnäpfen einer Mikrotiterplatte immobilisiert, der das entsprechende Antigen selektiv in komplexen Proteinlösungen erkennen und binden kann. Die Detektion erfolgt über einen direkt oder indirekt markierten Sekundärantikörper, der gegen ein anderes Antigenepitop als der Fangantikörper gerichtet ist.

Hier soll das Chemokin IL8, das von vielen Zellen nach verschiedenartigen Stimuli sekretiert wird, im AGS-Zellkulturüberstand quantifiziert werden. Dazu wurden je 50µl des α-IL8-Fangantikörper G265-5 (3µg/ml in 100mM Na₂HPO₄) in die Näpfe einer ELISA-96-Napf-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Bindung des Antikörpers an die Plastikunterlage erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach viermaligem Waschen mit 200µl ELISA-Puffer pro Napf wurden unbesetzte Bindungsstellen mit 200µl Blockierungspuffer 2-4h bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100µl der Zellkulturüberstände in die Näpfe gegeben. Als Standard wurden Doppelproben von je 100µl Zellkulturmedium mit 800/400/200/100/50/25/12,5/0pg/ml rekombinantem humanen IL8 pipettiert. Über Nacht wurde bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden je 100µl des Biotin-gekoppelten α-IL8 Sekundärantikörper G265-8 (0,5µg/ml in Blockierungspuffer/10% FCS) in die Näpfe gegeben und es folgte eine Inkubation 1-2h bei Raumtemperatur. Kurz vor der Verwendung wurde das Streptavidin-AP-Konjugat hergestellt. Dazu wurden je 4,5µl von Reagenz A und B in 0,5ml 50mM Tris-HCl pH7,6 zusammenpipettiert und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Konjugat wurde zu 25ml 50mM Tris-HCl pH7,6 gegeben und von dieser Lösung wurden je 50µl nach viermaligem Waschen mit

ELISA-Puffer in die Näpfe übertragen. Die Platte wurde 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde viermal gewaschen und je 50µl der Substratlösung zugegeben. Bei 37°C wurde 20min im Dunkeln inkubiert, bevor die Absorption in den Näpfen bei 405nm (gegen die Referenzwellenlänge 490nm) im ELISA-Messgerät bestimmt wurde.

ELISA-Puffer	PBS/0,05% (v/v) Tween20
Blockierungspuffer	PBS/10% FCS
Karbonatpuffer	50mM NaHCO ₃ pH8,0 und Na ₂ CO ₃ pH11,3 mischen bis pH 9,8, 1mM MgCl ₂
Substratlösung	1mg/ml PNPP in Karbonatpuffer

2.4.3 Auftrennung von Antikörpern über HiTrap ProteinG-Säulen

Protein G bindet spezifisch die Fc-Teile von IgG-Antikörpern z.B. aus Kaninchen. Damit können durch Bindung der IgG-Antikörper an die HiTrap ProteinG-Säule und anschließender Elution die IgG-Antikörper von anderen Serumproteinen abgetrennt werden.

Die Säule wurde mit 5ml 20mM Na-Phosphatpuffer pH7,0 gewaschen und mit weiteren 2ml äquilibriert. Nachdem das dialysierte Antiserum durch eine Ammoniumsulfatfällung präzipitiert worden war (siehe II 2.3.3.2), wurde es auf die Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 10ml Phosphatpuffer gewaschen und der gebundene Antikörper mit 4ml 0,1M Glycin/HCl pH2,7 eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 200µl 1M Tris-HCl pH9 neutralisiert und wiederum über Nacht gegen PBS dialysiert.

2.4.4 Absättigen von kreuzreagierenden Antikörpern gegen Nullmutanten

Es kommt vor, dass polyklonale Antiseren Antikörper enthalten, die unerwünschte Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen als dem eigentlichen Antigen zeigen. Dies ist vor allem bei Mikroskopie-Arbeiten siehe II 2.5 von großem Nachteil für die Auswertung.

Bakterien, die das Protein nicht herstellen, wogegen das Antiserum gerichtet ist, sind sogenannte Nullmutanten. Wenn man den polyklonalen Antikörper mit den Nullmutanten inkubiert, binden kreuzreagierende Antikörper an das Bakterium. Diese Bakterien/Antikörper-Komplexe können durch Zentrifugation von den restlichen Antikörpern abgetrennt werden.

Zwei OD₅₅₀-Einheiten der Nullmutanten wurden in einem 15ml-Röhrchen zentrifugiert

(6000xg, 2min), und das Sediment wurde in 2ml der aufgereinigten Antikörper-Lösung (siehe II 2.4.3) resuspendiert. Nach 2h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer erfolgte eine Zentrifugation bei 6000xg, 3min. Der Überstand wurde anschließend in einer Ultrazentrifuge 2h bei 100000xg und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand als IgG-gereinigtes und abgesättigtes Antiserum eingesetzt.

2.4.5 Enzymtests

Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase (PhoA)-Fusionen, die durch die Transposonmutagenese (siehe II 2.1.5) mit *TnMax6* erhalten worden sind, wurden entsprechend der Vorschrift von Manoil (1991) gemessen. Die Aktivitäten der β -Galaktosidase (LacZ)-Fusionen, die durch die Transposonmutagenese mit *TnMax14* (siehe II 2.1.5) entstanden sind, wurden entsprechend der Vorschrift von Miller (1972) gemessen.

2.5 Mikroskopie-Arbeiten

2.5.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

2.5.1.1 Immunfluoreszenz mit ganzen Bakterien

Für die Immunfluoreszenz wurden zunächst runde Deckgläser in die einzelnen Näpfe einer 24-Napf-Zellkulturschale gelegt. Jeder Napf wurde mit 1ml einer Bakteriensuspension in PBS ($OD_{550} = 0,01$) versehen. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf die Deckgläser zentrifugiert (3000xg, 5min). Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und die Bakterien durch Zugabe von 3% (w/v) PFA (in PBS) 30min fixiert. Nach 3 Waschrissen mit 1ml PBS erfolgte die Zugabe von 1ml Blockierungslösung (3% (w/v) BSA in PBS). Nach 15min Inkubation (RT) wurden die Deckgläser mit einer Pinzette aus den Näpfen entnommen und auf je einen 50 μ l-Tropfen des 1. Antikörpers (α -HP527, α -HP532, α -HP537, α -HP546 pAK 1:100 in Blockierungslösung) mit der Bakterienseite in die Flüssigkeit hineingelegt. Hierfür wurde auf einem Parafilmstreifen gearbeitet und während der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit einer Schachtel abgedeckt. Danach wurden die Deckgläser dreimal auf einen 250 μ l Tropfen PBS gewaschen und schließlich auf einen 50 μ l Tropfen des 2. Antikörpers (TRITC-gekoppelter α -Kaninchen-IgG pAK 1:500 in Blockierungslösung) gebracht (1h, RT, abgedeckt). Nach weiteren drei Waschrissen wurden die Deckgläser mit der Bakterienseite nach unten auf je einen kleinen Tropfen Fluoprep auf einem

Glasobjektträger gelegt. Nach ca. 1h bei Raumtemperatur im Dunklen erfolgte die Auswertung mittels eines Immunfluoreszenz-Mikroskops (Leica) mit Kameraaufsatz.

2.5.1.2 Doppelimmunfluoreszenz mit *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen

Mit Hilfe von Doppelimmunfluoreszenz können verschiedene Proteinstrukturen gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Hierbei reagieren zwei unterschiedlich spezifische Antikörper mit verschiedenen Proteinepitopen, was durch Verwendung von z.B. TRITC-vermittelter roter Fluoreszenz und FITC-vermittelter grüner Immunfluoreszenz unterschieden werden kann. Dabei ist zu beachten, aus welchem Tier die Antikörper gewonnen worden sind. Stammen sie aus dem gleichen Tier, müssen die Inkubationen der einzelnen Antikörper nacheinander durchgeführt werden, bei verschiedenen Tieren kann die Inkubation in einem Ansatz erfolgen.

Nachweis bakterieller Membranstrukturen

AGS-Zellen, die auf Deckgläsern gewachsen waren (siehe II 2.1.7), wurden 90min mit *H. pylori* infiziert. Danach wurden nicht-adhärenente Bakterien mit 3 x 1ml PBS entfernt und die infizierten Zellen mit 0,5ml 1% (v/v) Formaldehyd-Lösung fixiert (1h, 4°C). Anschließend erfolgten drei Waschschrirte mit je 1ml PBS, danach wurden die Deckgläser auf mit H₂O befeuchtete Filterpapiere (in einer Petrischale) platziert und mit 50µl einer 1:200 Verdünnung des α -*H. pylori* pAK inkubiert (1h, 30°C). Zum Waschen wurden die Deckgläser mehrmals in PBS eingetaucht. Danach wurden die gebundenen Antikörper durch Behandlung mit 50µl einer 1:400 Verdünnung von Alexa-Rot-gekoppelten α -Kaninchen-IgG pAK sichtbar gemacht (30min, 30°C). Nach einem Waschschrirte mit PBS erfolgte die Inkubation mit 50µl einer 1:20 Verdünnung von α -HP527 pAK, α -HP532 bzw. α -HP546 pAK (1h, 30°C). Die Deckgläser wurden wiederum durch mehrmaliges Eintauchen in PBS gewaschen. Danach wurden die Proben mit 50µl einer 1:400 Verdünnung von Alexa-Grün-gekoppelten α -Kaninchen-IgG pAK behandelt (30min, 30°C) und mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden in Mowiol mit n-Propylgallat eingebettet und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die konfokalen Aufnahmen wurden mit einem BioRad 1024UV-System unter Verwendung eines Krypton-Argon-Lasers und den Filtersätzen E1/T2 gemacht. Die Bilder wurden digital abgespeichert und bearbeitet.

2.5.2 Elektronenmikroskopie

2.5.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

AGS-Zellen, die auf Deckgläsern gewachsen waren (siehe II 2.1.7), wurden 90min mit *H. pylori* infiziert. Danach wurden alle nicht-adhärenenten Bakterien mit 3 x 1ml

PBS entfernt und der Rest mit 0,5ml 1% (v/v) Formaldehyd-Lösung fixiert (1h, 4°C). Danach wurde dreimal mit je 1ml PBS und einmal mit je 1ml TE-Puffer gewaschen. Die Proben wurden durch eine ansteigende Acetonreihe [10/30/50/70/100% (v/v)] entwässert, wobei jeweils 15min auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur erwärmt und nochmals 30min in 100% Aceton entwässert. Die „Kritische-Punkt-Trocknung“ wurde mit flüssigem CO₂ durchgeführt (CPD 030, Bal-Tec). Zum Schluss wurden die Proben mit einem etwa 10nm dicken Goldfilm besputtert (SCD 040, Balzers Union). Die Auswertung erfolgte in einem Zeiss Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop DSM 962 Gemini bei 5kV sowie dem Everhart-Thornley SE-Detektor und dem Inlens SE-Detektor in einem Signalverhältnis von 50:50. Die Bilder wurden digital gespeichert und bearbeitet.

2.5.2.2 Immuno-Rasterelektronenmikroskopie

Zelluläre Proteinstrukturen können mit Hilfe von Immunogold-Komplexen markiert und im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. In diesem Fall wurden Antikörper aus Kaninchen zusammen mit ProteinA-Gold-Komplexen eingesetzt.

a) mit ganzen *H. pylori*-Zellen

Die Bakterien wurden von einer gut bewachsenen Serumplatte abgenommen und in PBS resuspendiert. 1ml einer Batersuspension ($OD_{550} = 1$) wurde zentrifugiert und das Pellet in 0,5ml PBS aufgenommen. Anschließend wurde 0,5ml 2% (v/v) Formaldehyd-Lösung zugegeben und 1h auf Eis fixiert. Zur Absättigung freier Aldehydgruppen wurde dreimal mit 1ml 10mM Glycin (in PBS-Puffer) gewaschen. Die fixierten Bakterien wurden zentrifugiert und das Sediment in 200µl PBS-Puffer resuspendiert. In einem Thermoblock wurde die Probe auf 30°C erhitzt und mit 40µl Antikörper-Lösung inkubiert (1h, 30°C). Nach drei Waschschritten mit 1ml PBS erfolgte die Behandlung mit ProteinA-Gold-Komplexen (15nm Durchmesser) zur Markierung der gebundenen Antikörper (1h, 30°C). Danach folgten 3 Waschschrritte mit 1ml PBS, ein 3minütiger Fixierungsschritt mit 3% (v/v) Glutaraldehyd-Lösung und erneut drei Waschschrritte. Es wurden Deckgläser (12mm Durchmesser) mit Poly-L-Lysin beschichtet, und je 50µl der markierten Bakterien wurden 5min auf Deckgläser gegeben. Danach wurden die Deckgläser in 24-Napf-Zellkulturschalen überführt und mit 1ml 3% (v/v) Glutaraldehyd-Lösung bei RT fixiert. Nach drei Waschschrritten mit 1ml TE-Puffer wurden die Proben, wie unter II 2.5.2.1 beschrieben, mit einer ansteigenden Acetonreihe entwässert und Kritisch-Punkt-getrocknet. Am Schluss wurde mit einer dünnen Kohleschicht bedampft (MED 020, Bal-Tec). Die Auswertung erfolgte in einem Zeiss Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop DSM 962 Gemini

bei 1,5-2,5kV mit dem Everhart-Thornley SE-Detektor. Bilder wurden digital gespeichert und bearbeitet.

b) mit *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen

AGS-Zellen, die auf Deckgläsern gewachsen waren (siehe II 2.1.7), wurden 90min mit *H. pylori* infiziert. Danach wurden alle nicht-adhärenenten Bakterien mit 3x 1ml PBS entfernt und der Rest mit 0,5ml 1% (v/v) Formaldehyd-Lösung fixiert (1h, 4°C). Zur Absättigung freier Aldehydgruppen wurde dreimal mit 1ml 10mM Glycin (in PBS-Puffer) gewaschen. Die Proben wurden mit einer 1:5 Verdünnung von α -HP527 pAK in PBS inkubiert (2h, 30°C). Nach drei Waschschrinen mit PBS wurden die gebundenen Antikörper mit ProteinA-Gold-Komplexen (10nm Durchmesser) markiert. Die weiteren Präparationsschritte entsprechen den unter a) beschriebenen.

III Ergebnisse

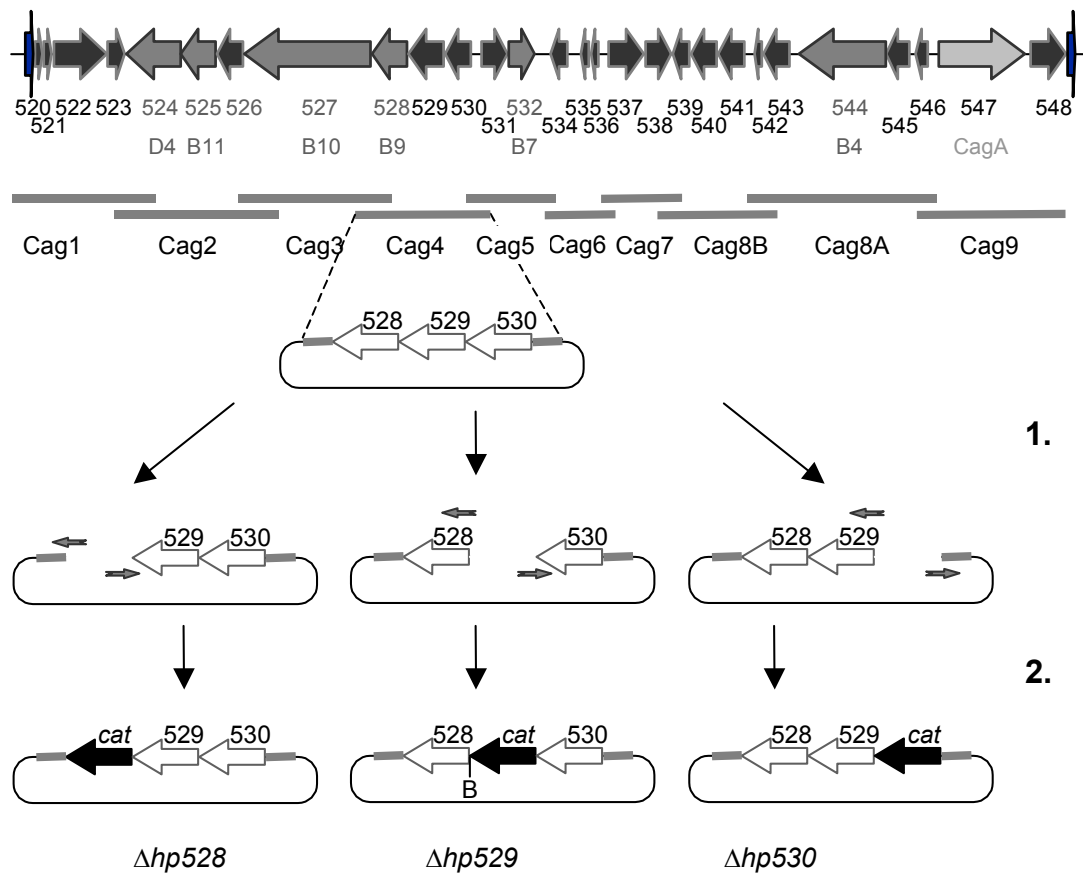
1 Systematische Mutagenese der *cag* PAI

Die *cag* PAI kodiert für ein Typ IV-Sekretionssystem, das für die Translokation vom Effektorprotein CagA benötigt wird, außerdem eine Rolle bei der Induktion von IL8 spielt. Um Rückschlüsse auf die Funktionen und Effekte der einzelnen *cag* PAI-Gene ziehen zu können, wurde im Folgenden die systematische Mutagenese aller Gene der *cag* PAI und die daraus resultierenden Folgen für die CagA-Translokation und IL8-Induktion beschrieben.

1.1 Etablierung einer Methode zur Vermeidung von polaren Effekten bei der Mutagenese

Oft werden zur Mutagenisierung von Genen Transposons herangezogen. Insetiert ein Transposon in ein Gen, kann es jedoch sein, dass in polycistronischen Transkriptionseinheiten die Transkription von nachfolgenden Genen mit betroffen ist (polarer Effekt). Ein Grund hierfür kann beispielsweise eine mit der Resistenzkassette des Transposons eingeführte Terminatorstruktur oder auch die „inverted repeats“ sein, die folglich einen negativen Einfluss auf die Transkription (oder die Translation von mRNA-Bereichen) hinter der Insertionsstelle haben. In der vorliegenden Arbeit soll jedem einzelnen Gen der *cag* PAI eine Funktion zugeordnet werden. Da meistens mehrere *cag* PAI-Gene in gleicher Orientierung hintereinander liegen (siehe Abb. III.1) und die Struktur und Regulierung der möglichen Operons bisher unklar ist, müssen die eben beschriebenen polaren Effekte vermieden werden.

Eine terminatorlose *cat*-Resistenzkassette mit vorgeschaltetem Opaque-Promotor aus Gonokokken (*cat_{GC}*) wurde verwendet (Stern *et al.*, 1986), um die Transkription nicht vorzeitig zu beenden. Durch PCR wurden Bereiche von 3-6kb der *cag* PAI vom Stamm *H. pylori* 26695 amplifiziert und in das Plasmid pBA kloniert (Halter *et al.*, 1984). Auf diese Weise wurden zehn Plasmid-Klone erhalten, die für die eigentliche Mutagenese verwendet wurden (*cag1-cag9*). Wie in Abb. III.1 zu sehen ist, wurden PCR-Primer gewählt, die eine Amplifikation der angrenzenden Sequenzen eines jeden ORFs und des Klonierungsvektors ermöglichte.



- 1.: Präzise Deletion eines Gens durch inverse PCR
 2.: Insertion einer terminatorlosen *cat*_{GC}-Kassette (*cat*) (*Sall/Bam*HI)

Abb III.1: Schaubild zur Konstruktion von Plasmiden für die präzise und unipolare Mutagenese aller *cag* PAI-Gene. Gezeigt ist die *cag* PAI des Stammes *H. pylori* 26695. Gene, die eine Sequenzhomologie zu *virB/D* Genen aufweisen, sind als graue Pfeile dargestellt, und darunter entsprechend bezeichnet. Das Schema zeigt beispielhaft die Konstruktion von Plasmiden, mit welchen eine unipolare Mutation der Gene *hp528*, *hp529* und *hp530* durchgeführt werden kann. Für die Durchführung einer inversen PCR wurden pBA-Plasmide als Matrize verwendet, auf welchen die *cag* PAI-Regionen Cag1-9 kloniert worden waren. Es wurden Primer hergestellt, deren Bindungsstellen direkt vor dem Start- bzw. direkt nach dem Stop-Kodon lagen. Da die Primer mit einer *Xho*I- und einer *Bam*HI-Schnittstelle versehen wurden, konnte das geschnittene PCR-Produkt mit einer terminatorlosen *cat*_{GC}-Kassette ligiert werden, die aus dem Plasmid pWS135 über die Schnittstellen *Sall/Bam*HI isoliert worden war.

Das PCR-Produkt, dem das jeweilige Gen fehlte, wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Bam*HI nachgeschnitten und mit der bereits beschriebenen *cat*-Resistenzkassette (*Sall/Bam*HI) in Leserichtung des deletierten Gens ligiert.

1.2 Herstellung von *H. pylori* 26695 Mutanten in allen *cag* PAI-Genen

Aufgrund der großen Anzahl von *cag* PAI-Genen wurde dieser Versuchsteil in Zusammenarbeit mit W. Fischer, B. Gebert, S. Odenbreit und J. Püls durchgeführt. Da der kurze Leserahmen (87bp) *hp533* sowie das Gen *hp548*, das nur in manchen Stämmen als Teil der *cag* PAI vorhanden ist, nicht berücksichtigt wurden, besteht die *cag* PAI des Stammes *H. pylori* 26695 aus 27 ORFs. Für die Mutagenese wurde das letzte Gen eines jeweiligen putativen Operons oder ein einzelnes Gen durch Insertion eines Transposons mutagenisiert, da hier ein polarer Effekt ausgeschlossen werden konnte. Für die Gene *hp534*, *hp535*, *hp536* und *hp539* wurde ein TnMax5-Transposonmutagenese-Protokoll (Haas *et al.*, 1993) angewendet. Es wurden dafür die pMin1-Abkömmlinge pJP16 bzw. pJP19 verwendet. Das Gen *hp524*, welches ebenfalls am Ende eines putativen Operons liegt, wurde durch die Insertion einer *cat*_{GC}-Kassette mutagenisiert. Dafür wurde das Plasmid pJP12 (pMin1-Derivat) über *Hind*III mit einer aus pTnMax5 ausgeschnittenen *cat*_{GC}-Kassette ligiert. Die Mutation des Gens *hp527* erfolgte mit dem Plasmid pJP13 auf die gleiche Weise, denn vom GCG-Sequenzbearbeitungsprogramm TERMINATOR wurde zwischen *hp526* und *hp527* ein Terminator vorausgesagt, d.h. ein polarer Effekt war nicht zu erwarten. Mit dem Plasmid pJP52 wurde das Gen *hp547* (*CagA*) deletiert. Auf diese Weise wurden die in der Tab.III.1 aufgelisteten, isogenen Mutanten für die gesamte *cag* PAI erhalten.

Tab. III.1: Auflistung der einzelnen Verfahren zur Mutagenese der *H. pylori* 26695 *cag* PAI-Gene.

<i>cag</i> PAI-Gen	<i>H. pylori</i> -Mutante	Verfahren zur Mutagenese
<i>hp520</i>	RBP2	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette (WS102/103)
<i>hp521</i>	RBP3	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette (WS117/118)
<i>hp522</i>	WSP145	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp523</i>	JPP107	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp524</i>	JPP106	partielle Deletion, <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp525</i>	RBP8	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette (WS121/122)
<i>hp526</i>	RBP9	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette (WS119/120)
<i>hp527</i>	JPP103	partielle Deletion, <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp528</i>	JPP104	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette (WS110/111)
<i>hp529</i>	RBP4	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette (WS108/109)
<i>hp530</i>	RBP10	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette (WS106/107)
<i>hp531</i>	WSP188	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp532</i>	JPP108	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp534</i>	SOP257	Tn <i>Max5</i> -Insertion
<i>hp535</i>	SOP258	Tn <i>Max5</i> -Insertion
<i>hp536</i>	SOP259	Tn <i>Max5</i> -Insertion
<i>hp537</i>	BGP55	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp538</i>	BGP56	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp539</i>	SOP264	Tn <i>Max5</i> -Insertion
<i>hp540</i>	SOP265	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp541</i>	SOP266	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp542</i>	SOP267	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp543</i>	SOP268	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp544</i>	BGP57	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp545</i>	SOP269	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp546</i>	BGP58	präzise Deletion, terminatorlose <i>cat</i> _{GC} -Kassette
<i>hp547</i>	JPP84	präzise Deletion, <i>aphA</i> -3-Kassette

Aus der Tabelle gehen die Bezeichnungen der *cag* PAI-Mutanten und das dazugehörige Mutageneseverfahren hervor. In Klammern befinden sich die Bezeichnungen für die Primer, die im Rahmen dieser Arbeit für die inverse PCR verwendet wurden (weitere Erläuterungen siehe Text.)

1.3 Untersuchungen zur Entstehung von polaren Effekten

Nach der Mutagenese wurde untersucht, ob der präzise Austausch eines bestimmten Gens eines Operons gegen die terminatorlose *cat*_{GC}-Kassette einen polaren Effekt auf die Transkription (und Translation) stromabwärtsliegender Gene hervorruft. Dafür wurden *cag* PAI-Gene herangezogen, mit denen durch die Bildung eines Fusionsproteins in einem *E. coli*-pEV40-Expressionssystem (siehe II 2.3.4.1) definierte Antiseren (siehe III 1.6) hergestellt worden waren.

Durch den Vergleich von *hp541*-Mutanten, die entweder durch den Austausch des Gens mit der *cat_{GC}*-Kassette, oder durch die Insertion eines Transposons entstanden waren, wurde gezeigt, dass die Art der Mutation einen Einfluss auf die Expression stromabwärtsliegender Gene hat. Die Insertion des Transposons *TnMax5gfp* ins Gen *hp541* führte zum Verlust der Expression des stromabwärtsliegenden Gens *hp539* (siehe Abb. III.2). Im Gegensatz dazu beeinflusste der Genaustausch durch die terminatorlose *cat_{GC}*-Kassette die Expression von *hp539* kaum, da die produzierte Menge an HP539-Protein der Menge des Wildtyps entspricht (siehe Abb. III.2).

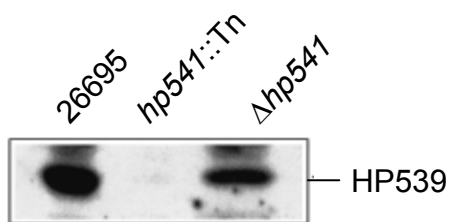


Abb. III.2: Vergleich des Einflusses einer Mutation mittels Transposon bzw. durch Genaustausch auf die Expression stromabwärts gelegener Gene eines Operons. Lysate des Wildtyp *H. pylori*-Stammes 26695, des isogenen Mutantenstammes in *hp541* (entstanden durch Transposonmutagenese) und des Mutantenstammes mit einer Mutation in *hp541* (entstanden durch Genaustausch) wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Immunoblot wurde mit α -HP539 gefärbt.

Dies spricht dafür, dass der Austausch zwischen Gen und *cat_{GC}*-Kassette in der hier angewandten *cag* PAI-Mutagenese nur die Expression des mutierten Gens beeinflusst. Somit ist eine Zuweisung eines bestimmten Phänotyps einer definierten *cag* PAI-Mutanten zu dem korrespondierenden Gen, das nicht mehr vorhanden ist bzw. dessen Produkt nicht mehr gebildet wird, möglich.

1.4 Identifizierung von Genen der *cag* PAI, die für die CagA-Translokation essentiell sind

Als nächstes wurden alle Mutantenstämme darauf getestet, ob sie noch in der Lage sind, das Effektorprotein CagA in die Zielzelle zu translozieren. Hierfür gibt es nur die Möglichkeit eines indirekten Beweises, da die Translokation selbst bislang nicht überprüft werden kann. Mit Hilfe des Phosphotyrosin-Immunoblots (siehe II 2.4.1.2) (Odenbreit *et al.*, 2000) kann nachgewiesen werden, ob ein CagA-Transport in die Zelle stattgefunden hat, da nur in der Zielzelle eine Tyrosinphosphorylierung von CagA erfolgt. Zu diesem Zweck wurde die Magenkarzinom-Zelllinie AGS mit den jeweiligen Mutantenstämmen sowie zur Kontrolle mit Wildtypstamm *H. pylori* 26695 infiziert. Nach der Zellernte wurde die Tyrosinphosphorylierung von CagA im Phosphotyrosin-Immunoblot getestet (siehe Abb. III.3). Dadurch konnte das komplette Set der mutierten *cag*-Gene in drei Gruppen eingeteilt werden (siehe Tab. III.2): Zur ersten

Gruppe gehören achtzehn von siebenundzwanzig möglichen Genen, die absolut essentiell für den Transport von CagA in die Epithelzelle sind. Durch die Deletion von Genen der zweiten Gruppe verringerte sich die Menge an phosphoryliertem CagA im Vergleich zum Wildtyp *H. pylori* 26695. Wahrscheinlich leisten diese Gene oder deren Genprodukte nur einen Beitrag zum Translokationsprozess, der aber nicht essentiell ist. Zur dritten Gruppe zählen die Gene bei deren Deletion kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden konnte, was darauf schließen lässt, dass die korrespondierenden Genprodukte weder für den Aufbau eines intakten Translationsapparates noch für die CagA-Translokation nötig sind.

Tab. III.2: Gruppierung der *cag* PAI-Gene nach ihrer Funktion bei der CagA-Translokation.

Gruppe I (essentielle Gene)	Gruppe II (partiell beitragende Gene)	Gruppe III (nicht-essentielle Gene)
<i>hp522 hp523 hp524</i> <i>hp525 hp527 hp528</i> <i>hp529 hp530 hp531</i> <i>hp532 hp537 hp539</i> <i>hp540 hp541 hp542</i> <i>hp543 hp544 hp546</i>	<i>hp538 hp542 hp545</i>	<i>hp520 hp521 hp534</i> <i>hp535 hp536</i>

Aus der Tabelle gehen die Gene hervor, die essentiell, nur teilweise nötig oder nicht-essentiell für die CagA-Translokation sind.

Als Kontrolle wurde zusätzlich, wie in Abb. III. 3 zu sehen ist, die *cagA*-Expression im Western Blot (siehe II 2.4.1.1) untersucht. Auf diese Weise sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass es durch eine weitere Mutation im *cagA*-Gen oder durch ein Ausschalten eines *cagA*-Regulators auf der *cag* PAI zu einem Signalverlust im Phosphotyrosin-Immunoblot kommt. Es zeigte sich aber, dass alle Mutanten mit Ausnahme der *cag* PAI-Deletionsmutanten und der *hp547-(cagA)* Deletionsmutanten *cagA* exprimieren konnten (siehe Abb. III.3).

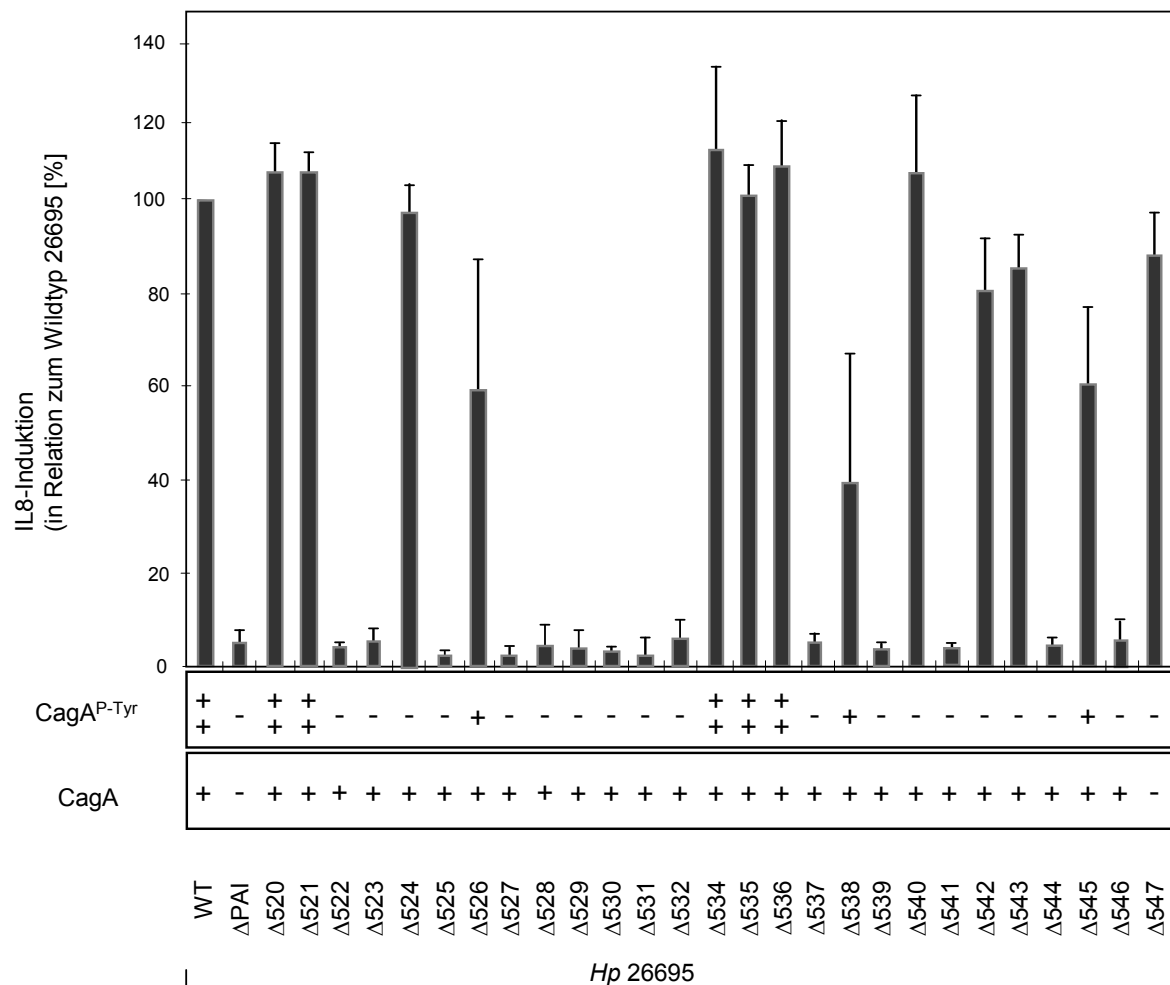


Abb. III.3: Darstellung der Ergebnisse von IL8-Induktion, CagA-Tyrosinphosphorylierung und *cagA*-Expression. Die Induktion von IL8 durch den Wildtypstamm *H. pylori* 26695 wurde mit 100% festgelegt. Die entsprechenden Induktionen durch Infektion mit den individuellen Mutanten ($\Delta 520$ - $\Delta 547$) wurden ins Verhältnis zum Wildtypwert gesetzt. Der Mutantenstamm *H. pylori* 26695 Δ PAI, der die gesamte PAI durch Deletion verloren hat (Odenbreit *et al.*, 2001), wurde als Negativkontrolle verwendet. (Die IL8-Messungen im Sandwich-ELISA wurden von Jürgen Püls durchgeführt.)

Die Fähigkeit der verschiedenen Stämme zur Translokation von CagA in AGS-Zellen wurde durch den Nachweis einer tyrosinphosphorylierten Bande im Phosphotyrosin-Experiment getestet. (Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Wolfgang Fischer, Stefan Odenbreit und Jürgen Püls durchgeführt.) Tyrosinphosphorylierte Banden, die im Wildtyp gleich stark waren, sind mit (++) dargestellt. Entsprechend sind schwächere Banden mit (+) und nicht vorhandene Banden mit (-) gekennzeichnet.

Alle Werte resultieren aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Expression von *cagA* wurde im Immunoblot mit dem polyklonalem Antiserum (pAK) Δ -CagA untersucht. Eine Bande, die mit dem Wildtyp identisch war, wurde mit (+) dargestellt, entsprechend wurde mit (-) eine nicht vorhandene Bande gekennzeichnet.

1.5 Analyse der Effekte einzelner Gene der *cag* PAI auf die IL8-Induktion

Wie bereits erwähnt, ist das Cag Typ IV-Sekretionssystem für die Induktion von IL8 in Epithelzellen verantwortlich. Bisher war jedoch unklar, ob es erstens für die IL8-Induktion ein eigenes Effektorprotein gibt, und ob zweitens die gleichen Komponenten des Systems wie für die CagA-Translokation essentiell sind. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Überstände von AGS-Zellen gesammelt, die mit dem jeweiligen isogenen Mutantenstamm oder dem Wildtyp *H. pylori* 26695 für die Phosphotyrosin-Immunoblots infiziert worden sind. Mit diesen Überständen wurde ein Sandwich-ELISA (siehe II 2.4.2) mit zwei monoklonalen anti-IL8-Antikörpern (Schulte und Autenrieth, 1998) zur Quantifizierung der IL8-Sekretion durchgeführt. Da sowohl für die IL8-Bestimmungen als auch für die Phosphotyrosin-Immunoblots die gleichen Infektionen benutzt wurden, ist ein direkter Vergleich zwischen der Menge an sekretiertem IL8 und der produzierten Menge von tyrosinphosphoryliertem CagA möglich. Dies ist nötig, da ein mögliches Effektorprotein für die IL8-Induktion nur gefunden werden kann, wenn auszuschließen ist, dass die untersuchte Mutante einen Defekt im Typ IV-Sekretionsapparat hat und deswegen kein IL8 mehr induzieren kann. Das bedeutet, zum Auffinden eines Effektorproteins für die IL8-Induktion wird nach einer Mutante gesucht, die zwar CagA transloziert, aber keine Sekretion von IL8 mehr induzieren kann. Dies würde darauf schließen lassen, dass der Apparat intakt ist und ein Effektorprotein in die Zielzelle transportiert wurde, das für einen Eingriff in NF κ B/AP1-Signaltransduktionskaskaden verantwortlich ist.

Wie erwartet, sind die meisten Gene, die für die CagA-Translokation essentiell sind, auch absolut für die IL8-Induktion notwendig (siehe Abb. III.1). Die Deletionen in den Genen *hp520*, *hp521*, *hp524*, *hp534*, *hp535*, *hp536* und *hp540* üben keinen Effekt auf die IL8-Induktion aus, was heißt, dass die entsprechenden Genprodukte nicht an der IL8-Induktion in Epithelzellen beteiligt sind. Da diese Mutanten, mit Ausnahme von *hp524*, *hp540*, ebenfalls voll translokationskompetent sind, kann vermutet werden, dass diese Gene für weitere translozierte Proteine mit bisher unbekannter Funktion kodieren. Mutantenstämme mit einer Deletion in *hp526*, *hp538*, *hp542*, *hp543* und *hp545* bilden eine Zwischenstellung, da sie variable Raten der IL8-Induktion aufweisen. Als absolut essentiell für die IL8-Induktion stellten sich die Genprodukte von *hp522*, *hp523*, *hp525*, *hp527*, *hp528*, *hp529*, *hp530*, *hp531*, *hp532*, *hp537*, *hp539*, *hp541*, *hp544* und *hp546* heraus. Da keine Mutante gefunden wurde, die CagA translozieren kann, aber nicht mehr zur IL8-Induktion fähig ist, wird vermutet, dass zumindest auf der *cag* PAI kein Gen lokalisiert ist, das für ein Effektorprotein für die IL8-Induktion kodiert. Möglicherweise aktiviert der Typ IV-

Sekretionsapparat selbst durch Bindung an einen bisher unbekanntem Rezeptor die Signaltransduktionskaskade, was anschließend zur Sekretion von IL8 führt.

1.6 Gewinnung von Antikörpern gegen *cag* PAI-kodierte Proteine

Zur Klärung von Struktur und Funktion der *cag* PAI spielen Antikörper eine wichtige Rolle. Deshalb wurden einige *cag* PAI-Gene ausgewählt, um mit ihnen Fusionsproteine herzustellen, die zur Immunisierung von Kaninchen und anschließenden Gewinnung von Antisera verwendet wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene *hp521*, *hp525*, *hp526*, *hp528*, *hp529*, *hp534*, *hp541*, *hp544* und *hp546* ausgewählt. Wie bereits in III 1.4 erwähnt, sind die Proteine HP525 (VirB11-Homolog), HP528 (VirB9-Homolog), HP529, HP541, HP544 (VirB4-Homolog) und HP546 essentiell für den Translokationsprozess, während das Protein HP526 nur bedingt beteiligt ist. Für die Proteine HP521 und HP534 ist bisher noch keine Funktion bekannt.

1.6.1 Herstellung von His₆-markierten Fusionsproteinen

Zur Produktion von His₆-markierten Fusionsproteinen wurde das pEV40-System, das unter II 2.3.4.1 genau beschrieben wird, verwendet. Dieses System ermöglicht es, translationale Fusionen mit sechs Histidinresten (His₆) herzustellen, die für eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Ni²⁺-NTA-Agarose verwendet werden können. Da bekannt ist, dass große Proteine bzw. bestimmte Bereiche davon in *E. coli* instabil sein können bzw. toxische Effekte hervorrufen können, wurden längere Gene in kleinere Einheiten unterteilt (siehe Tab. III.2). Die putativen Signalsequenzen in HP528, HP529 und HP546 die wahrscheinlich für den Sec-abhängigen Export des Proteins ins Periplasma verantwortlich sind, wurden für die Expression weggelassen. Für die PCR-Amplifikation der Gene bzw. Genregionen diente chromosomale DNA der Stämme *H. pylori* J99 (*hp521*, *hp528*, *hp544*) bzw. *H. pylori* 26695 als Matrize. Den Oligonukleotiden wurden am 5'-Ende eine *EcoRI*- und *PstI*-, am 3'-Ende eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle hinzugefügt (vgl. Tab. III.2).

Nachdem die Genregionen amplifiziert und aufgereinigt waren, wurden die PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen *PstI/XhoI* geschnitten und mit dem *PstI/SalI* geschnittenen pEV40-Vektor (Leserahmen a) ligiert. Die Ansätze wurden in *E. coli* 2136 elektroporiert und die Plasmide durch Restriktionsanalyse überprüft. Mit den richtigen Klonen wurde eine Überexpression des Fusionsproteins durchgeführt. Eine erfolgreiche Produktion und Reinigung des Proteins wurde nach Coomassie-

Anfärbung im SDS-Gel (siehe Abb. III.4) sowie im Ni²⁺-NTA-Western Blot (siehe II 2.4.1.3) überprüft.

Tab. III.2: Angaben zu den *cag* PAI-kodierten Proteinen, die für die Herstellung von His₆-markierten Fusionsproteinen verwendet wurden.

PAI-Protein	Länge [AS]	Größe Protein [kDa]	Primerpaar	exprimierter Teil	Größe Fusionsprotein [kDa]	Expression in <i>E. coli</i>
HP521	220	25,4	RB14/15	AS 1-220	29,7	+
HP525	330	37,6	WS137/138	AS 2-330	41,7	-
HP526	199	23	RB16/17	AS 1-199	27,3	+
HP528	522	60,6	RB1/2	AS 37-522	60,9	+
HP529	535	57,7	WS139/140	AS 27-249	27,5	-
HP534	196	23,4	WS141/142	AS 2-196	27,5	+
HP541	370	39,4	WS143/144	AS 53-370	38,7	-
HP544	983	112	RB3/4	AS 3-324	43,5	+
HP544	983	112	RB5/6	AS 325-649	77	+
HP546	115	12	RB20/21	AS 33-115	12,7	+

Für die Gene *hp525*, *hp529* und *hp541* konnte keine Expression festgestellt werden. Für das Fusionsprotein HP546 trat zwar im Ni²⁺-NTA-Blot eine Bande der entsprechenden Größe auf, im Coomassie-angefärbten Polyacrylamidgel wurde aber keine entsprechende überproduzierte Bande erkannt (Daten nicht gezeigt). Das Fusionsprotein konnte nicht über die Bindung an Ni²⁺-NTA-Agarose, in ausreichender Menge für die Immunisierung aufgereinigt werden. Dagegen traten bei den Fusionen HP520, HP521, HP526, HP528, HP534, HP544 (RB3/4) und HP544 (RB5/6) sowohl im Coomassie-angefärbten Polyacrylamidgel als auch im Ni²⁺-NTA-Blot Banden in den entsprechenden Größen auf. Die Fusionsproteine konnten über die Bindung an Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt werden (siehe Abb. III.4). Nach erfolgter Dialyse fiel ein Teil des Proteins in unlöslicher Form aus, was für die nachfolgende Immunisierung jedoch keine Rolle spielte.

Von den Proteinen HP525 und HP546 war es nicht möglich, ein Fusionsprotein herzustellen. Deshalb wurde gereinigtes natives HP525-Protein von Erich Lanka (Krause *et al.*; 2000) zur Immunisierung eines Kaninchens zur Verfügung gestellt. Für die Gewinnung eines Antiserums gegen das Protein HP546 stellte die Firma EUROGENTEC zwei HP546-Peptide (10-16AS) her, mit welchen die Gewinnung von Antiseren möglich war.

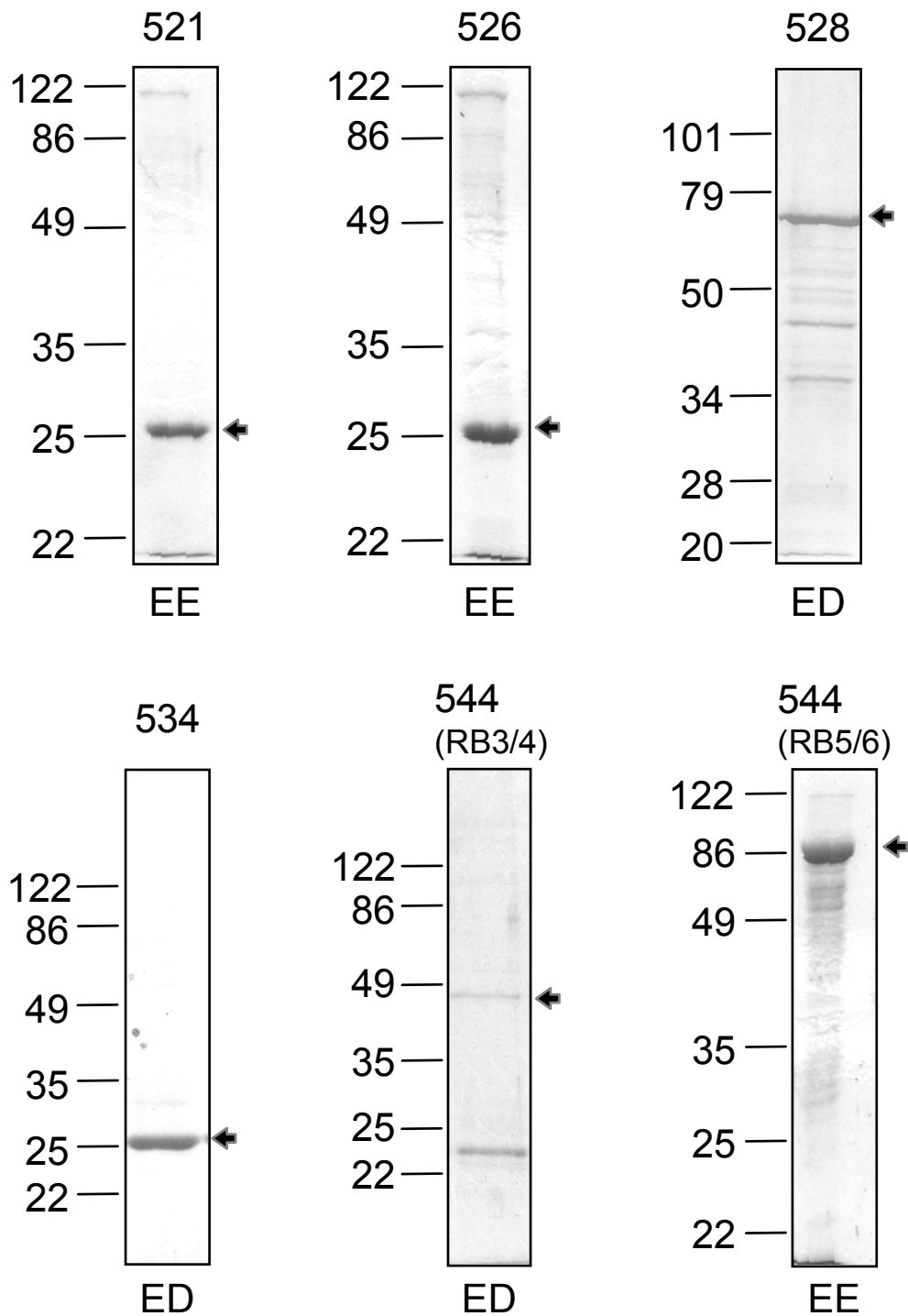


Abb. III.4: Aufreinigung der Fusionsproteine. Auf den Coomassie-angefärbten SDS-Gelen sind gereinigte Fraktionen der Fusionsproteine aufgetragen (Fraktion ED bzw. EE, dialysiert gegen PBS).

1.6.2 Austesten der Antiseren

Die Fusionsproteine HP521, HP526, HP528, HP534, HP544 (RB3/4), HP544 (RB5/6) und das native Protein HP525 wurden Kaninchen zur Immunisierung appliziert (siehe II 2.3.4.2). Nach dem 61. Tag erfolgte ein Vergleich zwischen Testimmunsereen und Präimmunsereum. Dafür wurden zunächst verschiedene *H. pylori*-Lysate in der SDS-PAGE (siehe II 2.3.2.2) aufgetragen. Die Auswertung der Seren erfolgte durch Analyse im Western-Blot (siehe Abb. III.5).

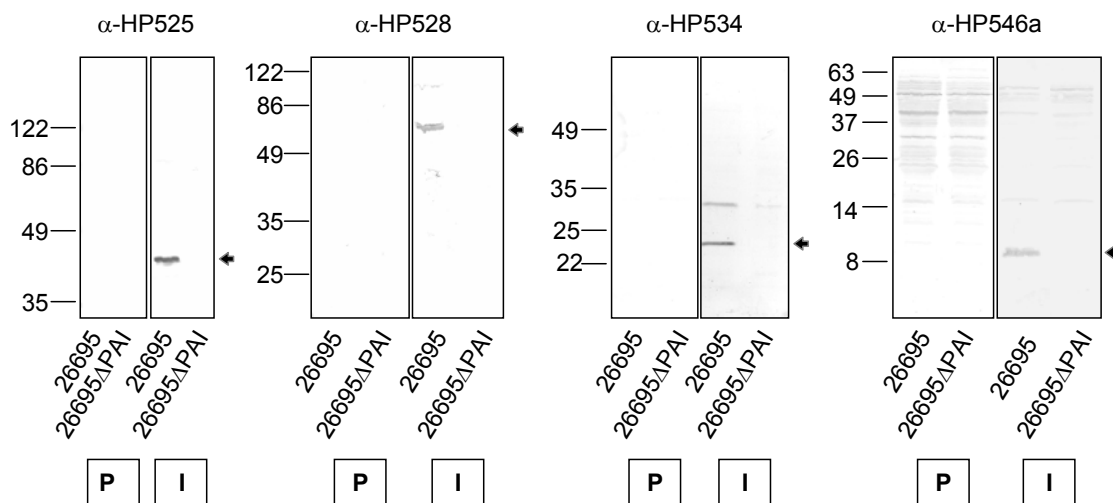


Abb. III.5: Vergleich zwischen Präimmunsereen und Immunsereen nach dem 61. Tag. Lysate von *H. pylori* 26695 und 26695 Δ PAI wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot mit den entsprechenden Präimmun- und Immunsereen analysiert. Präimmunsereum (P), Immunsereum (I), polyklonaler Antikörper der gegen das Fusionsprotein X gerichtet ist (α -HPX), Pfeile markieren die Bande mit entsprechender Größe des jeweiligen *H. pylori* *cag* PAI-kodierten Proteins.

Die polyklonalen Immunsereen α -HP525, α -HP528, α -HP534, α -HP546 erkannten spezifisch Proteine in der erwarteten Größe des jeweiligen *cag* PAI-kodierten Proteins. Das Immunsereum α -HP534, aber nicht das Präimmunsereum, zeigte mit weiteren, jedoch größeren Proteinen eine schwache Wechselwirkung. Es handelt sich dabei um kreuzreagierende Banden, die nicht von *cag* PAI-kodierten Proteinen stammen, da sie in der Mutante Δ PAI ebenfalls auftraten. Bei α -HP528 trat ebenso eine zusätzliche größere kreuzreagierende Bande auf, die vom Präimmunsereum nicht erkannt wurde. Bei den Immunsereen α -HP546a, b traten zahlreiche größere Banden auf, die auch schon bei den Präimmunsereen zu sehen waren (nur α -HP546a gezeigt). Mit den polyklonalen Immunsereen, α -HP521, α -HP526, α -HP544 (RB3/4) und α -HP544 (RB5/6) wurden im Western Blot keine Unterschiede zwischen den

entsprechenden Präimmun- und Immunseren beobachtet (Daten nicht gezeigt), d.h. es konnte keine spezifische Reaktion der Antikörper detektiert werden. Es wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen zur Immunogenität dieser Proteine durchgeführt.

1.7 Analyse des Einflusses definierter *cag* PAI-Mutationen auf die Expression oder Stabilität anderer Komponenten des Typ IV-Sekretions-systems

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Mutationen in einzelnen *cag* PAI-Genen einen direkten oder indirekten Effekt auf die Stabilität anderer Proteine des Typ IV-Sekretionssystems haben. Lysate aller Mutanten, die auf eine optische Dichte von $OD_{550} = 1$ in 100 μ l eingestellt worden waren, wurden einer SDS-PAGE unterzogen und im Western Blot mit den Antikörpern α -HP525, α -HP527, α -HP528, α -HP532, α -HP534, α -HP537, α -HP539, α -HP546, α -HP547 getestet. Die Proteine HP525, HP527, HP528, HP532, HP534, HP537, HP539, HP546 bzw. HP547 wurden alle unter *in vitro*-Bedingungen von *H. pylori* produziert.

Das Genprodukt von *hp525* (siehe Abb. III.6), ist das Homolog zur ATPase VirB11 von *A. tumefaciens* (Covacci *et al.*, 1999). Der Immunoblot (siehe Abb. III.6) zeigt, dass die meisten Mutanten keinerlei Effekt auf die Expression oder Stabilität von HP525 haben.

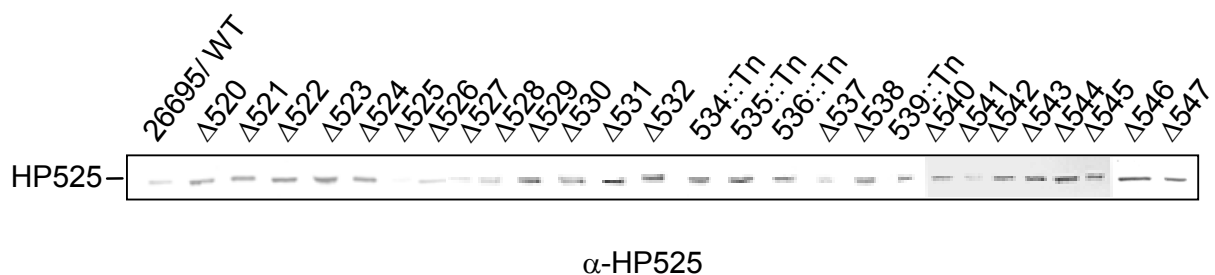


Abb. III.6: Effekt auf die Stabilität von HP525 durch Mutation der *cag* PAI-Gene. Lysate von *H. pylori* 26695 und von 26695 Deletionsmutanten, wurden im Immunoblot mit dem α -HP525 pAK getestet. Gleiche Mengen von den verschiedenen Zelllysaten wurden untersucht (weitere Erläuterungen siehe Text).

Die Mutation im Gen *hp526* führt jedoch zu einer geringeren Menge an produzierten HP525. Hier könnte es sich um einen leichten polaren Effekt handeln, der nicht vollständig zum Tragen kommt, da die Deletionsmutante Δ *hp526* noch HP525 produziert, außerdem zur IL8-Induktion bzw. CagA-Tyrosinphosphorylierung fähig ist

(siehe Abb. III.3). In der $\Delta hp527$ - und $\Delta hp541$ -Mutante zeigt sich im Immunoblot ebenfalls eine minimale Verringerung der produzierten Menge HP525.

Das Protein HP527 weist Homologie zum Protein VirB10 von *A. tumefaciens* auf (Covacci *et al.*, 1999).

Im Immunoblot zeigt sich, dass HP527 bei fast allen Mutanten unverändert gebildet werden kann (Daten nicht gezeigt). Wie in Abb. III.7 zu erkennen, zeigt sich jedoch bei den Mutanten $\Delta hp523$ und $\Delta hp539$ eine Veränderung. Das Protein HP527 erscheint im Immunoblot in der $\Delta hp523$ -Mutante als größere Bande im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu wird HP527 in der $hp539$ -Mutante prozessiert. Anstatt der Wildtypgröße von ca. 220kDa treten in der Mutante Abbaufragmente mit einer Größe von ca. 120 und 150kDa auf (siehe Abb. III.7).

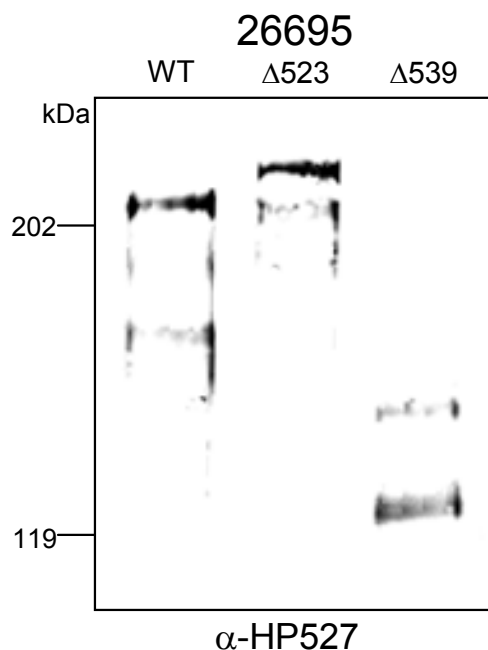


Abb. III.7: Effekt auf die Stabilität von HP527 nach Mutation der *cag* PAI-Gene *hp523* und *hp539*. Lysate von *H. pylori* 26695 und der 26695 Mutantenstämme $\Delta hp523$ und $\Delta hp539$, wurden im Immunoblot mit dem α -HP527 pAK getestet. Gleiche Mengen der verschiedenen Zelllysate wurden in einer 6% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (weitere Erläuterungen siehe Text).

Das Protein HP532 gilt als homolog zum Lipoprotein VirB7 von *A. tumefaciens* (Covacci *et al.*, 1999), das in der äußeren Membran lokalisiert ist. Im Immunoblot zeigt sich erneut, dass die meisten Deletionsmutationen keinen Effekt auf die Expression oder Stabilität des Proteins HP532 ausüben (siehe Abb. III.8). Die Deletion von *hp537* führt jedoch zum vollständigen Verlust von HP532.

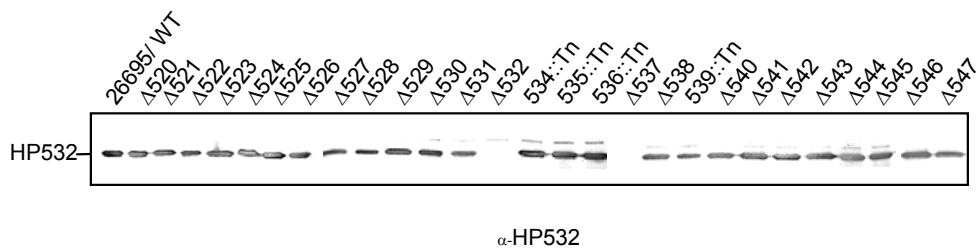


Abb. III.8: Effekt von Mutation der *cag* PAI-Gene auf die Stabilität von HP532. Lysate von *H. pylori* 26695 und von 26695 Mutantenstämmen, wurden im Immunoblot mit dem α -HP532 pAK getestet. Gleiche Mengen von den verschiedenen Zelllysaten wurden untersucht (weitere Erläuterung siehe Text).

Die Immunoblots mit α -HP528, α -HP534, α -HP537, α -HP539, α -HP546 a,b zeigen keinerlei Effekte der *cag* Gen-Deletionen auf die Expression oder Stabilität der entsprechenden Proteine (Daten nicht gezeigt).

2 Studien zur Lokalisation und Topologie von *cag* PAI-kodierten Proteinen

2.1 Topologievorhersagen

Cag PAI-kodierte Proteine von *H. pylori* 26695, die sich nach den in Abb. III.1 dargestellten Ergebnissen als essentiell für die Typ IV-Sekretion herausgestellt haben, wurden einer Sequenz-Analyse mit den Computerprogrammen PREDICTPROTEIN (<http://www.cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>) und TMPRED (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPREDform.html>) unterzogen. Damit kann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Transmembrandomänen und Signalsequenzen anhand der Aminosäuresequenz berechnet werden. In Abb. III.9 sind die Vorhersagen modellhaft veranschaulicht.

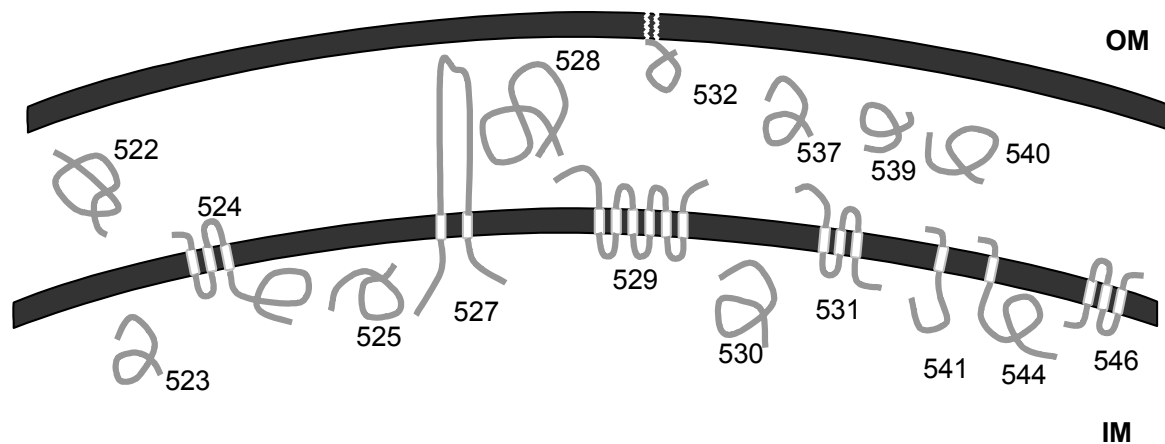


Abb. III.9: Darstellung einiger vorhergesagter Topologien von *cag* PAI-kodierten Proteinen. Gezeigt sind Proteine, die essentiell für die Typ IV-Sekretion sind. Die Vorhersagen wurden von den Computerprogrammen Predict Protein und TMPred für die jeweiligen Protein-/Aminosäure-Sequenzen von *H. pylori* 26695 erstellt. IM (innere Membran), OM (äußere Membran), (weitere Erläuterungen siehe Text).

Für die Proteine HP522, HP528, HP529, HP537, HP539 und HP540 wurde eine Signalsequenz mit Spaltstelle vorhergesagt. Das bedeutet, dass diese Proteine wahrscheinlich Sec-abhängig in das Periplasma transportiert werden können, woraufhin ihre Signalsequenz von einer Signalpeptidase abgespalten werden kann. Für HP546 wurde ebenfalls eine Signalsequenz, jedoch ohne putative Prozessierungsstelle vorhergesagt.

Das Protein HP532 besitzt eine putative Lipoproteinsignalsequenz, die eine Lokalisation in der äußeren Membran wahrscheinlich macht. Die Proteine HP524, HP527, HP529, HP531, HP541, HP544, HP546 wurden aufgrund von putativen membrandurchspannenden Domänen als innere Membranproteine vorausgesagt. Die Analysen ergaben für die Proteine HP522, HP523, HP525, HP528, HP530, HP537, HP539 und HP540 keine Transmembrandomänen. Die Voraussagen der beiden Programme stimmen bei fast allen untersuchten Proteinen überein. Für das Protein HP530 wurde jedoch von TMPRED eine Transmembrandomäne vorausgesagt, die bei PREDICTPROTEIN nicht berechnet wurde (siehe Kap. III 2.4.1).

2.2 Zellfraktionierung

Durch die Fraktionierung von Zellen soll die Frage geklärt werden, ob die Proteine membrangebunden vorliegen oder im Periplasma oder Zytoplasma lokalisiert sind. Zur Herstellung einer Gesamtmembranfraktion (siehe II 2.1.6.1), d.h. einer Fraktion, die sowohl aus innerer als auch aus äußerer Membran zusammengesetzt ist, wurden ganze Zellen des Stammes *H. pylori* 26695 in 10mM HEPES-Puffer (pH7,4) suspendiert und durch Behandlung mit einer „French Press“ aufgeschlossen. Anschließend wurde durch Zentrifugation nicht vollständig aufgeschlossenes Bakterienmaterial abgetrennt. Durch die Zentrifugation des erhaltenen Überstandes in einer Ultrazentrifuge erfolgte die Auftrennung der Suspension in eine Gesamtmembranfraktion (Sediment) und in eine zytoplasmatische/periplasmatische Fraktion (Überstand). Beide Fraktionen wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit den Antikörpern α -HP525, α -HP527, α -HP528, α -HP532, α -HP539 und α -HP546 analysiert. Die Immunoblots in Abb. III.10 zeigen, dass HP527 (VirB10-Homologes), HP528 (VirB9-Homolog) und HP532 (VirB7-Homolog) membranassoziiert sind, was nach den Vorhersagen von Abb. III.9 nur für die Proteine HP527 und HP532 zutreffen sollte.

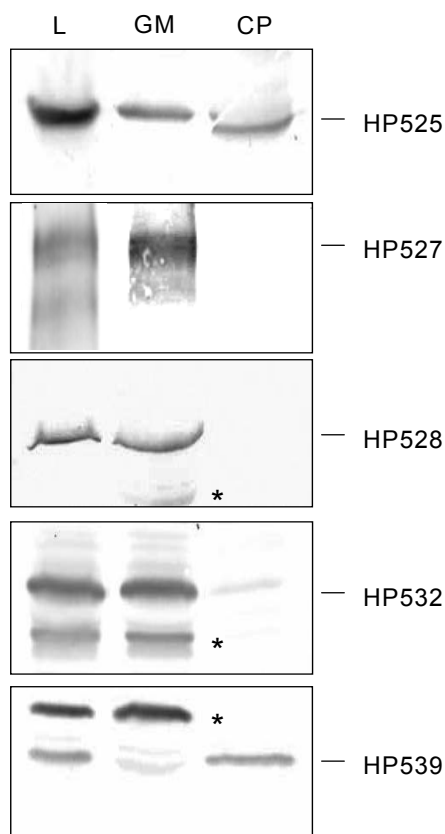


Abb. III.10: Lokalisation einiger Komponenten des Typ IV-Sekretionsapparates. Lysate von ganzen *H. pylori* 26695 Zellen (L), Gesamtmembranfraktionen (GM) sowie zytoplasmatische/ periplasmatische Fraktionen (CP), die nach Aufschluss mit der „French Press“ erhalten worden sind, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Kreuzreagierende Bande (*)

Das Protein HP528, das eigentlich als ein im Periplasma lokalisiertes Protein vorausgesagt worden ist, reicherte sich in der Gesamtmembranfraktion an. Das Protein HP539 scheint hauptsächlich in der löslichen Form vorzuliegen, wie es auch die Computervorhersagen berechnet hatten. Die ATPase HP525 (VirB11-Homolog) ist sowohl in der löslichen Fraktion als auch in der Gesamtmembranfraktion zu finden, was auf eine Lokalisation im Zytoplasma mit Membranassoziation hinweisen könnte. Das Protein HP546 wurde als inneres Membranprotein vorhergesagt (siehe Abb. III.9), wobei man im Immunoblot erkennen kann (siehe Abb. III.11 A; Spur 1-5), dass es sich sowohl in der löslichen Fraktion als auch in der Gesamtmembranfraktion befindet. Zur genaueren Bestimmung, um welche der beiden Membranen es sich handelt, wurde versucht, eine Auftrennung von äußerer und innerer Membran durch Extraktion mit N-Lauroylsarkosin (Sarkosyl) (Filip *et al.*, 1973) und Zwittergenz vorzunehmen. Sarkosyl führt zu einer Solubilisierung der inneren Membran, und durch Zentrifugation kann die äußere Membran im Sediment angereichert werden. Das Zwittergenz löst die äußere Membran auf, die innere Membran kann durch Sedimentation angereichert werden. Wie der Immunoblot zeigt (siehe Abb. III.11 A; Spur 6-9), kommt HP546 zu einem geringen Anteil in löslicher Form vor und scheint sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran lokalisiert zu sein. Auffällig ist, dass HP546 in der Gesamtmembranfraktion etwas höher, die lösliche Form etwas niedriger läuft, als es in den beiden Membranfraktionen der Fall ist. Als Kontrolle für die Trennung von innerer und äußerer Membran wurde die Verteilung des äußeren Membranproteins AlpB und des zytoplasmatischen Proteins RecA durchgeführt (siehe Abb III.11 B). Das Protein AlpB ist hauptsächlich in der äußeren Membranfraktion zu finden. Eine vollständige Trennung von innerer und äußerer Membran gelang nicht, da das äußere Membranprotein AlpB auch in geringer Menge in der inneren Membranfraktion zu finden ist. Das zytoplasmatische Protein RecA wurde jedoch nur in der inneren Membranfraktion und in löslicher Form erhalten.

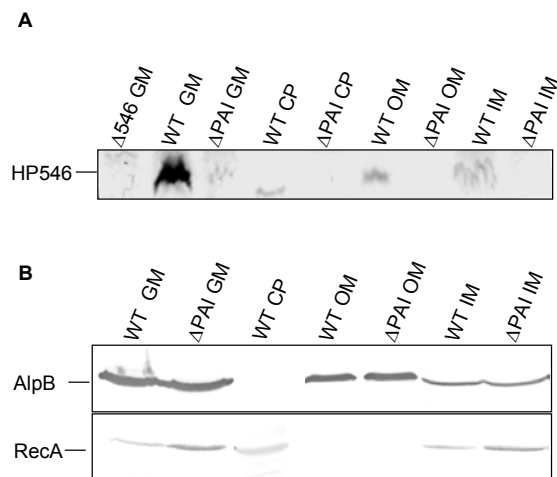


Abb. III.11: Lokalisation von HP546. A Gesamtmembranfraktionen der Stämme *H. pylori* 26695, Δ 546-Mutante und 26695 Δ PAI sowie zytoplasmatische /periplasmatische Fraktionen und Fraktionen nach Sarkosyl- und Zwittergenzbehandlung wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem α -HP546 pAK behandelt. B Western Blot mit α -AlpB und α -RecA behandelt. WT Wildtyp *H. pylori* 26695, L Lysat, GM Gesamtmembran, CP Zytoplasma-/Periplasma; OM äußere Membran; IM innere Membran.

2.3 Untersuchungen zum proteolytischen Abbau von *cag* PAI-kodierten Proteinen

Zur weiteren Lokalisierung der einzelnen Proteine wurde der proteolytische Abbau von Proteinen durch Trypsin untersucht (siehe II 2.1.6.3). Bereiche von Proteinen, die an der Oberfläche exponiert sind, sind für den Angriff einer Proteinase zugänglich. Deshalb wurden ganze Zellen von *H. pylori* 26695 mit unterschiedlichen Konzentrationen Trypsin behandelt. Einige Zellen wurden vor der Protease-Behandlung osmotisch geschockt (siehe II 2.1.6.2). Durch den osmotischen Schock soll gezeigt werden, dass die äußere Membran nicht von vorneherein für Trypsin durchlässig ist und somit kein Abbau periplasmatischer Proteine durch Trypsin möglich wäre. Dies wurde durch den Nachweis intakter Proteine nach osmotischem Schock, ohne Trypsinbehandlung, gezeigt (siehe Abb. III.12; Spur 2). Zusätzlich wurden intakte zytoplasmatische Proteine nachgewiesen (z.B. CagA; siehe Abb. III.12), um zu zeigen, dass der osmotische Schock nur die äußere Membran für das Enzym durchlässig macht und deshalb nur ein Abbau periplasmatischer Proteine möglich ist. Im Immunoblot (siehe Abb. III.12) zeigt sich, dass das Protein HP527 im Wildtyp vollkommen resistent gegen den Abbau durch Trypsin war.

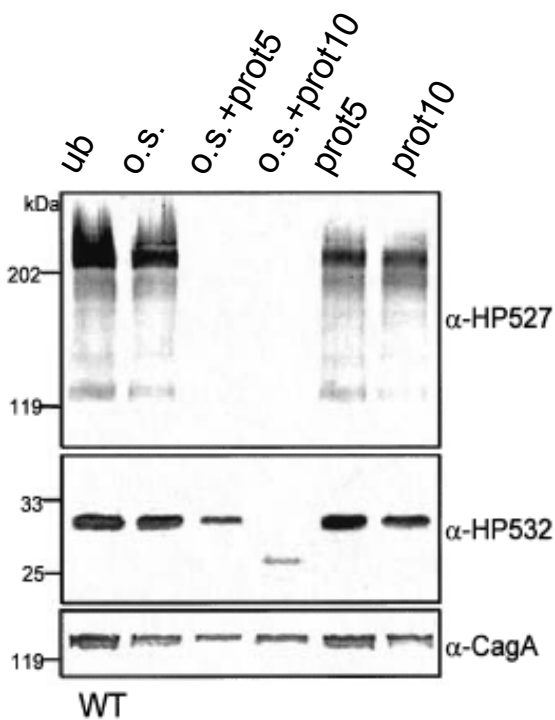


Abb. III.12: Charakterisierung von HP527 und HP532 durch Protease-Behandlung mit und ohne osmotischen Schock.

Lysate ganzer Zellen des Wildtypstamms *H. pylori* 26695 sowie Lysate von osmotisch geschockten Zellen und Lysate von trypsinbehandelten Zellen, ohne bzw. nach osmotischem Schock, wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Im Immunoblot wurde mit den pAK α -HP527, α -HP532 und α -CagA behandelt. ub unbehandelt, o.s. osmotischer Schock, o.s. + prot5/10 osmotisch geschockt und Behandlung mit 5 oder 10 μ g/ml Trypsin, prot5/10 Behandlung mit 5 oder 10 μ g/ml Trypsin.

Wurden die Zellen jedoch vor der Enzymbehandlung osmotisch geschockt, kam es zum vollständigen Abbau von HP527. Das Protein HP532 ließ sich nur teilweise von der Proteinase angreifen. Wurden die Zellen vorher osmotisch geschockt, entstand ein kleineres Fragment von ca. 25kDa. Das zytoplasmatische Protein CagA wurde unter den gleichen Bedingungen nicht proteolytisch angegriffen, was als positive Kontrolle für die Intaktheit der inneren Membran nach osmotischen Schock gewertet werden kann.

Diese Ergebnisse bestärken die bisherige Vorhersage von HP527, das vermutlich im Periplasma lokalisiert ist und somit dem Angriff von Trypsin nach osmotischen Schock zugänglich wird. Das Protein HP532 ist vor Proteolyse geschützt, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es hauptsächlich in die äußere Membran inseriert ist und nur mit einem kleinen Bereich in den periplasmatischen Raum ragt.

In III 1.8 wurde beschrieben, dass HP527 in der $\Delta hp523$ -Mutante, als größeres bzw. in der $\Delta hp539$ -Mutante als kleineres Fragment im Vergleich zum Wildtyp im Immunoblot zu sehen ist. Zur weiteren Charakterisierung der Lokalisation von HP527 und HP532 wurde mit den entsprechenden Mutantenstämmen ein Trypsinverdau mit und ohne osmotischen Schock durchgeführt (siehe Abb. III.13 A, B). Dabei zeigte sich, dass in der $\Delta hp523$ Mutante ein bestimmter Teil von HP527 (ca. 150-160kDa) nach osmotischen Schock gegen den proteolytischen Angriff geschützt ist.

In dem Stamm $\Delta hp539$ kommt das Protein HP527 nur in der prozessierten Form mit ca.125kDa vor (siehe Abb. III. 13 B). Die Proteine HP527 und HP532 werden nur nach osmotischem Schock von der Protease, aber dann vollständig abgebaut.

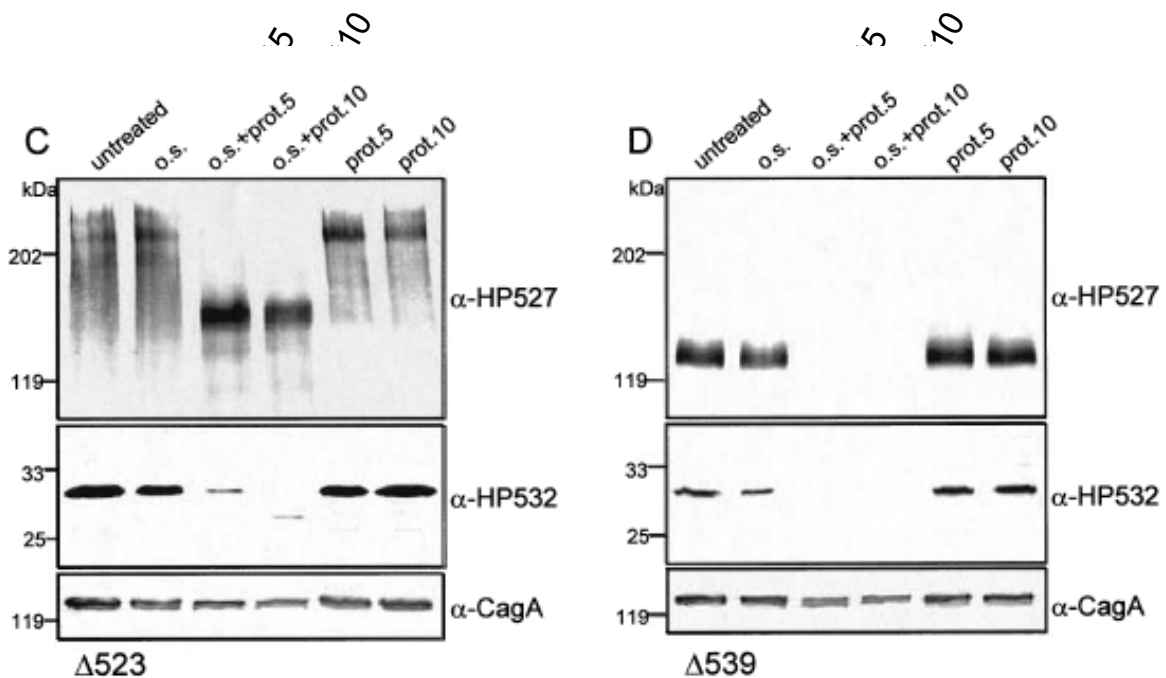


Abb. III.13: Charakterisierung der Topologie von HP527, HP532 durch Protease-Behandlung mit und ohne osmotischen Schock in den Mutantenstämmen *H. pylori* 26695 Δ 523 und Δ 539.

A Lysate ganzer Zellen der Mutante *H. pylori* 26695 Δ 523 sowie Lysate von osmotisch geschockten Zellen und Lysate von trypsinbehandelten 26695 Δ 523-Zellen, ohne bzw. nach osmotischem Schock, wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

B Lysate ganzer Zellen der Mutante *H. pylori* 26695 Δ 539 sowie Lysate von osmotisch geschockten Zellen und Lysate von trypsinbehandelten 26695 Δ 539-Zellen, ohne bzw. nach osmotischem Schock wurde auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Im Immunoblot wurde mit den pAK α -HP527, α -HP532 und α -HP532 behandelt. ub unbehandelt, o.s. osmotischer Schock, o.s. + prot5/10 osmotisch geschockt und Behandlung mit 5 oder 10 μ g/ml Trypsin, prot5/10 Behandlung mit 5 oder 10 μ g/ml Trypsin

Das Protein HP546 wird als inneres Membranprotein vorausgesagt (Abb. III.9). Bei der Zellfraktionierung wurde HP546 löslich und in beiden Membranfraktionen gefunden. Zur weiteren Aufklärung der Lokalisation von HP546 wurde ebenfalls ein proteolytischer Angriff vor und nach osmotischem Schock durchgeführt. Wie in Abb. III.14 zu sehen ist, ist das Protein HP546 vollständig gegenüber dem Angriff der Proteinase, mit und ohne osmotischen Schock resistent, was ein Hinweis auf Lokalisation in einer Membran sein könnte.

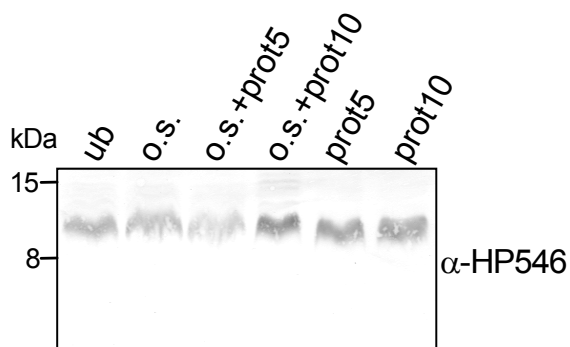


Abb. III.14: Charakterisierung von HP546 durch Protease-Behandlung mit und ohne osmotischen Schock. Lysate ganzer Zellen des Wildtypstamms *H. pylori* 26695 sowie Lysate von osmotisch geschockten Zellen und Lysate von trypsinbehandelten 26695 Zellen, ohne bzw. nach osmotischem Schock, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Immunoblot wurde mit α -HP546 pAK behandelt. ub unbehandelt, o.s. osmotischer Schock, o.s. + prot5/10 osmotisch geschockt und Behandlung mit 5 oder 10 μ g/ml Trypsin, prot5/10 Behandlung mit 5 oder 10 μ g/ml Trypsin.

2.4 Topologieanalysen

Das Standardmodell unter den Typ IV-Sekretionssystemen von *A. tumefaciens* besteht aus 11 *virB*-Genen (*virB1-11*) und 1 *virD* (*virD4*)-Gen. Interessanterweise wurden im *cag* System von *H. pylori* nicht zu jedem dieser *virB/D*-Gene Homologe identifiziert. Wie in Abb.III.3 zu sehen, stellten sich 14 Gene innerhalb der *cag* PAI als essentiell für den Sekretionsapparat heraus. Von diesen Genen zeigen jedoch nur fünf eine Sequenzähnlichkeit (*hp544*: *virB4*-Homolog, *hp532*: *virB7*-Homolog, *hp528*: *virB9*-Homolog; *hp527*: *virB10*-Homolog, *hp525*: *virB11*-Homolog, *hp524*: *virD4*-Homolog). Das Gen *hp532* kodiert für ein Lipoprotein, deshalb wird es als analog zu *virB7* betrachtet, dessen Genprodukt ebenfalls ein Lipoprotein ist. Zur Bestätigung der vorhergesagten Topologie (siehe Abb. III.9) von HP530 wurden Fusionsproteine mit PhoA, LacZ und BlaM hergestellt und hinsichtlich der Genexpression in einem photometrischen Test analysiert.

2.4.1 Identifizierung von HP530 als VirB8-Homolog

In der Literatur wurde das Gen *hp529* als ein putativ homologes Gen zu *virB8* beschrieben (Covacci und Rappuoli, 2000). Diese Annahme wurde jedoch nicht durch eine Sequenzähnlichkeit bestätigt. Wahrscheinlich fand diese Einteilung aufgrund der Lage von *hp529* statt, da es sich stromaufwärts von *hp528*, dem *virB9*-Homologen befindet. Von Das und Xie (1998) wurde gezeigt, dass VirB8 von *A. tumefaciens* ein bitopisches Membranprotein ist, dessen N-Terminus ins Zytoplasma und dessen C-Terminus ins Periplasma ragt. Bei der Berechnung von Transmembranhelices mit den Computerprogrammen PHDhtm (Rost *et al.*, 1995), TMHMM (Krogh *et al.*, 2001), Predict Protein und TMPred (siehe III 2.1) wurde für das Protein HP529 eine polytopische Konformation mit 4-6 transmembranen

Domänen vorausgesagt. Eine Vorhersage für nur eine Transmembrandomäne, wie im Fall von VirB8, wurde hingegen für die Proteine HP530, HP541, HP543, und HP544 mit dem Programm TMPred gemacht. Durch einen Sequenzvergleich dieser Proteine mit anderen VirB8-Homologen wurde festgestellt, dass nur HP530 die typischen mehr oder weniger konservierten Domänen eines VirB8-Homologen (Cao und Saier, 2001) aufweist (siehe Abb. III.15).

Atu VirB8	56	FTIATMVPLIRLVPVY	71...102	LWEYVRLRESYD	113...210	LRLTNPGGLVVTSYQ	224
Bpe PtlE	98	IAIATMLPLKTTIPYL	113...145	LTRYVAAREYD	156...254	QRWLNPLGFAVTSYR	268
Bab VirB8	60	IGIAGMLPLKQHVPLY	75...107	LSQYVIARETYD	118...216	ARLTNPLGFNVTSYR	230
Bhe VirB8	27	LAVAALTPLKTVPEPFV	42...74	ASKYVRAREGFQ	85...182	DRLINPLGFQVSEYR	196
Hpy ComB8	69	IVLISLLPLQKTEHHF	84...115	IGAYVLNRESIN	126...222	SMPKNPTGFKITRYIS	236
Hpy HP530	51	TSIVMMPLKKTDFV	66...98	TSKFSVLLFGYS	109...209	NLIINPFGFKVFDIQ	223

Abb. III.15: Sequenzvergleich konservierter Motive von VirB8-Homologen. Die Proteinsequenz von HP530 wurde mit den Proteinsequenzen von *A. tumefaciens* (Atu) VirB8, *B. pertussis* (Bpe) PtlE, *B. abortus* (Bab) VirB8, *B. henselae* (Bhe) VirB8, *H. pylori* ComB8 verglichen. Dargestellt sind drei konservierte Domänen, die in den untersuchten VirB8-Homologen hohe Konservierung zeigten. Aminosäuren, die mit mehr als 80% innerhalb der VirB8-Homologen konserviert waren, sind mit schwarz hinterlegt. Aminosäuren mit mehr als 70% Konservierung sind mit grau hinterlegt.

Die konservierten Motive sind innerhalb der VirB8-Homologen an unterschiedlichen Aminosäurepositionen zu finden. Allen gemein ist jedoch, dass die vorhergesagte transmembrane Helix immer direkt vor dem ersten Motiv gelegen ist. Dies ist auch beim Protein HP530 der Fall, wo sich die vorhergesagte Helix von AS38 bis zu AS57 erstreckt und das erste konservierte Motiv „PLK“ mit AS58 beginnt. Hinsichtlich dieser Ergebnisse sollte die vorhergesagte Struktur von HP530 durch Reporterfusionen bestätigt werden.

2.4.1.1 Herstellung von Plasmiden für die Transposonmutagenese

Für die spätere Insertion eines Transposons wurde das Plasmid pWS186 hergestellt (siehe Abb. III.16 A). Hierfür wurde das *H. pylori* 26695 *hp530*-Gen mit den Primern WS187 und WS188 amplifiziert. Der Primer WS187 besitzt die Shine-Dalgarno-Sequenz des T7-Phagengens 10. Das amplifizierte Gen wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Bgl*II geschnitten und mit dem entsprechend restringierten Minimalexpressionsvektor pMin2 (Kahrs *et al.*, 1995) ligiert. Auf diese Weise entstand das Plasmid pWS186, das das Gen *hp530* unter der Kontrolle des *iga* Promotors aus Gonokokken enthält.

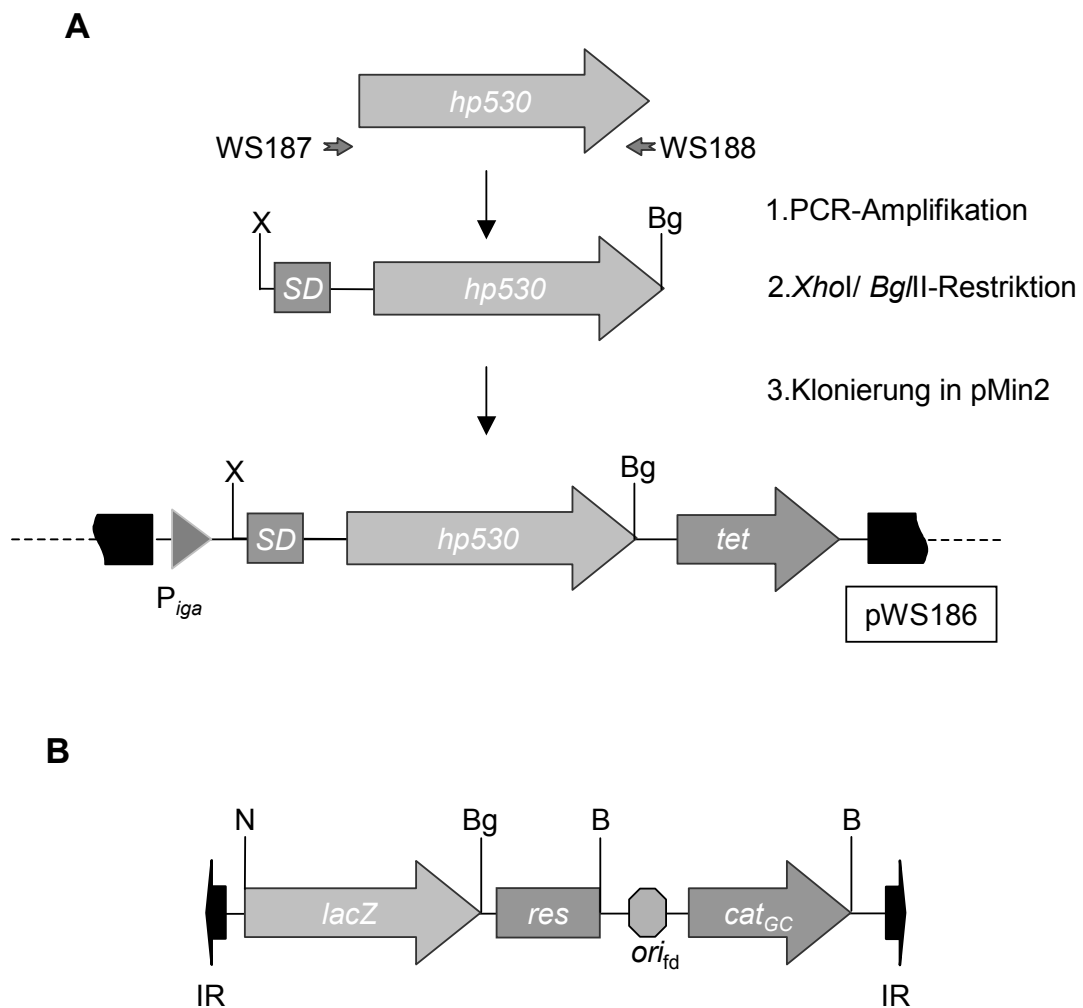


Abb. III.16: Schema zur Konstruktion von Plasmid pWS186 zur Einführung von Proteinfusionen für Topologie-Analysen. A Mit Hilfe des Primerpaares WS187/ WS188 und chromosomaler DNA aus *H. pylori* 26695 als Matrize wurde das *hp530*-Gen ampliziert. Durch den Primer WS187 wurde eine T7-Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) eingeführt. Das PCR-Fragment wurde über die Schnittstellen *XhoI*/ *BglII* in den pMin2-Vektor ligiert (pWS186). B Lineare Darstellung von TnMax14 (4,58kb). IR inverted repeats, N *NotI*, Bg *BglII*, B *BamHI*, X *XhoI*.

Zur Herstellung von translationalen LacZ-Fusionen wurde ein TnMax-Transposon konstruiert. Zunächst wurde das *lacZ*-Gen ohne ribosomale Bindestelle und ohne Startkodon mit den Primern WS150 und WS151 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in die *NotI*- und *BglII*-Schnittstelle eines pTnMax7-Derivates (Kahrs *et al.*, 1995), bei dem eine *NotI*-Schnittstelle deletiert war, ligiert (= pTnMax14).

2.4.1.2 Mutagenisierung des Gens *hp530*

Ziel dieses Versuchteils war es, das Gen *hp530* mit den Transposons Tn*Max*6, 9 und 14 zu mutagenisieren. Tn*Max*6 soll bei entsprechender Orientierung zum Zielgen eine translationale Fusion mit alkalischer Phosphatase (PhoA) vermitteln, Tn*Max*9 entsprechend eine translationale Fusion mit β -Laktamase (BlaM). Das, wie unter III. 2.4.1.1 beschrieben, hergestellte Transposon Tn*Max*14 soll zu einer translationalen Fusion mit dem *lacZ*-Gen führen. Die Mutagenese erfolgte nach einem modifizierten Mutagenese Protokoll von Haas *et al.* (1993b). Die mutagenisierten Plasmide wurden entweder durch Konjugation in den Stamm DH5 α Rif (bei Mutagenese mit Tn*Max*9) übertragen oder in den *E. coli*-Stamm CC118 transformiert (bei Mutagenese mit Tn*Max*6, Tn*Max*14). Anschließend wurde eine „Blau-Weiß-Selektion“ durchgeführt (bei Mutagenese mit Tn*Max*6, Tn*Max*14) bzw. auf Ampicillin-Resistenz selektioniert. Die Integrationsstelle und die Orientierung von Transposons blauer bzw. ampicillinresistenter Kolonien wurden durch Restriktionsanalysen und PCR-Amplifikation über die enthaltenen M13_{forward}- und M13_{reverse}-Primerbindungsstellen überprüft. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Durch die BlaM-Mutagenese (Tn*Max*9) wurden nur wenige voneinander unabhängige Klone erhalten, die eine Ampicillinresistenz aufwiesen (siehe Abb. III.17 A). Tn*Max*9 inserierte hinter den Kodons für AS-Positionen 67, 80 und 164, die alle innerhalb des vorhergesagten periplasmatischen Bereichs liegen. Durch die Mutagenese mit Tn*Max*6 wurden viele voneinander unabhängige Klone erhalten. Auffällig war, dass es zu einer vermehrten Insertion direkt C-terminal von der vorhergesagten Transmembrandomäne gelegen kam, wohingegen nur wenige Fusionen am N-Terminus lagen.

Generell sind Fusionen mit dem LacZ-Protein topologisch komplementär zu PhoA-Fusionen. LacZ-Fusionen, die in den periplasmatischen Raum transportiert werden, werden solange toleriert, wie ihr Produktionslevel niedrig ist. Eine hohe Expression des Gens führt häufig zum Verschluss des Transportkanals durch das Fusionsprotein (Lee *et al.*, 1989). Die Mutagenese von pWS186 mit dem Transposon Tn*Max*14 führte zur Entstehung blauer Kolonien mit einer Häufigkeit von ungefähr 1:10. Durch die Bestimmung der Tn-Insertionsstellen im Gen wurden Reporterinsertionen im vorhergesagten zytoplasmatisch lokalisierten Bereich genauso wie im putativen periplasmatischen Bereich des Proteins festgestellt. Die Transposon-Integrationsorte, die durch Sequenzierung überprüft und deren Klone schließlich für die Aktivitätstests verwendet wurden sind (siehe Abb. III.17 B), sind in Abb. III.17 A dargestellt.

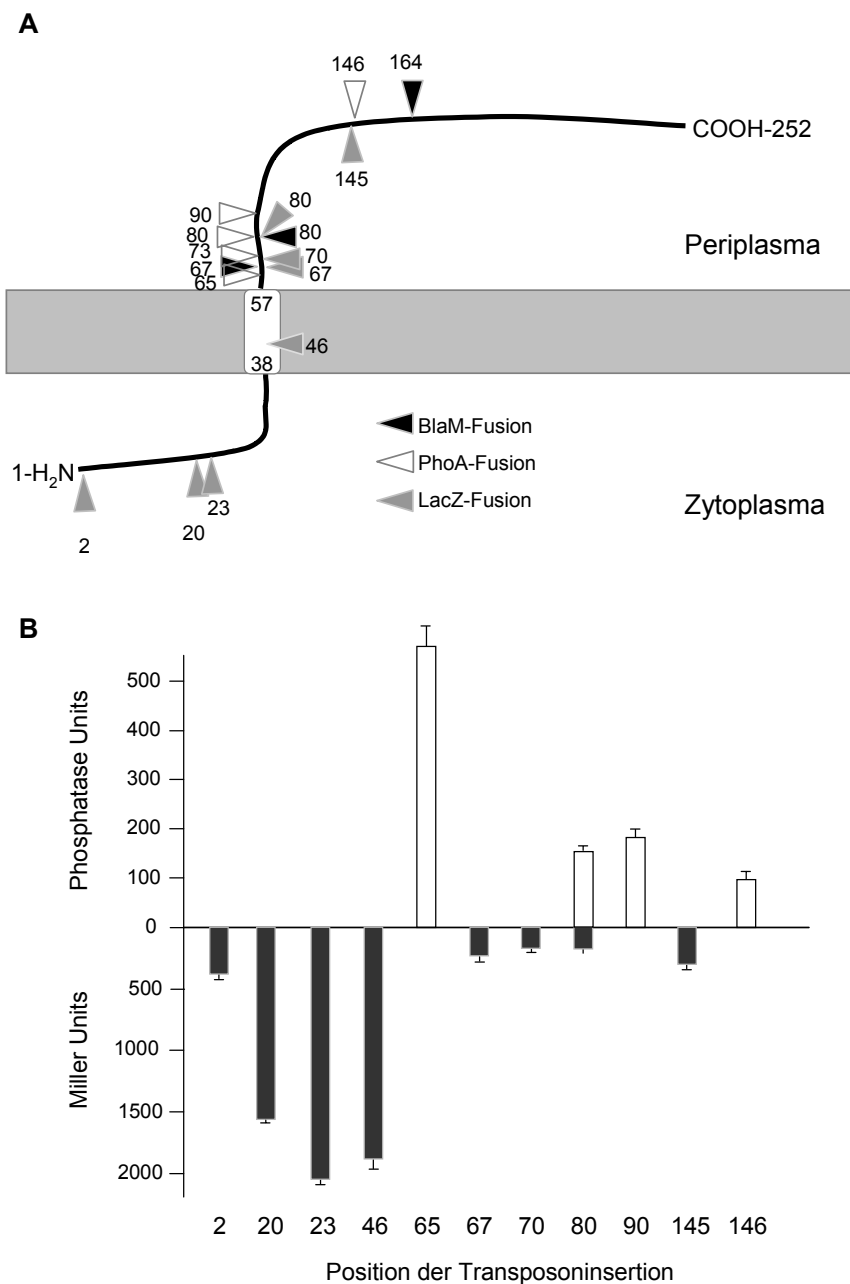


Abb. III.17: Membrantopologie des Proteins HP530 und Aktivitäten der Reporterfusionsproteine.

A Dargestellt ist ein Modell von Protein HP530, wie es von den Computerprogrammen TMPred oder TMHMM vorhergesagt wurde. Für das Protein HP530 wurde eine transmembrane Helix zwischen der Aminosäure 38 und 57 vorhergesagt. Die Positionen einer BlaM-Fusion sind mit dunkelgrauen Pfeilspitzen, einer PhoA-Fusion mit weißen Pfeilspitzen und einer LacZ-Fusion mit hellgrauen Pfeilspitzen dargestellt. Die Zahlen an den Pfeilspitzen geben die entsprechende AS-Position wieder.

B Quantitative Messung der PhoA- und LacZ-Aktivitäten. Die Werte (Standardabweichungen) resultieren aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

2.4.1.3 Messung der LacZ- und PhoA-Aktivitäten von HP530-Reporterfusionen

Um herauszufinden welche der Transposonintegrationen zu einer aktiven Fusion führen, wurden die LacZ- und PhoA-Aktivitäten quantitativ gemessen. Für die Messung der Aktivität von PhoA-Fusionsproteinen wurde die Methode von Manoil (1991) angewendet. Die Aktivitätsmessung von LacZ-Fusionsproteinen erfolgte wie bei Miller (1972) beschrieben. In Abb. III.17 A sind die Insertionsorte der Klone abgebildet, deren Insertion im richtigen Leserahmen sind und die im Aktivitätstest positiv waren (siehe Abb. III.17 B). Die Daten aus dem Aktivitätstest zeigen, dass die Aktivitäten der LacZ-Fusionen, die im putativen periplasmatischen Bereich liegen, relativ niedrig sind im Vergleich zu Fusionen, die im zytoplasmatischen Teil lokalisiert sind. Die Messung der Aktivität von PhoA-Fusionen zeigt ein komplementäres Bild. Eine hohe Aktivität wurde im Bereich direkt nach der putativen transmembranen Helix gemessen. In diesem Bereich wurden auch viele Ampicillin-resistente BlaM-Fusionen gefunden, was eine Bestätigung für die hohen PhoA-Aktivitäten darstellt. Auffällig war, dass weder durch die PhoA- noch durch die BlaM-Mutagenese aktive Fusionen nach der Position AS164 gefunden werden konnten, obwohl Transposoninsertionen in diesem Bereich kartiert wurden (Daten nicht gezeigt). Da die Aktivitäten der PhoA-Fusionen in HP530 von N-terminal nach C-terminal fallen, wird vermutet, dass eine Fusion mit PhoA und BlaM, je näher sie sich C-terminalen Ende befindet, zu einer größeren Instabilität des Fusionsproteins führt. Insgesamt wurde durch die gemessenen Aktivitäten die Annahme experimentell bestätigt, dass HP530 die gleiche Membrantopologie wie VirB8 besitzt. Damit konnte ein strukturell und funktionell unbekanntes Protein (HP530) erstmals als funktionell VirB8-analoges Protein, definiert werden.

3 Mikroskopische Untersuchungen zur Oberflächenbeschaffenheit von *H. pylori* in Bezug auf den Aufbau des Typ IV-Sekretionsapparats

Aus Arbeiten über Typ III-Sekretionssysteme und über *A. tumefaciens* als das Standardmodell für Typ IV-Sekretionssysteme ist bekannt, dass Sekretionssysteme sehr komplex aufgebaut sind. Ihre Apparatsproteine erstrecken sich durch die Bakterienmembranen bis zur bakteriellen Oberfläche, wo sie zumeist einen Pilus-artigen Fortsatz ausbilden. Die bisherigen biochemischen und genetischen Ergebnisse dieser Arbeit deuten ebenfalls auf einen Komplex mit Oberflächenexposition an. Deshalb wurde im Folgenden versucht, durch die Anwendung verschiedener Mikroskopietechniken und Antikörper, das Typ IV-Sekretionssystem von *H. pylori* näher zu charakterisieren.

3.1 Absättigung der Antikörper für die Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenz- bzw. Immunelektronenmikroskopie wurden die polyklonalen Kaninchen-Antiseren α -HP527, α -HP532, α -HP537, α -HP539 und α -HP546 verwendet. Diese Antiseren wurden bereits auf ihre Spezifität gegen das entsprechende Protein getestet (siehe Abb. III.5). Von den Proteinen HP527, HP532, HP537, HP539 und HP546 ist bekannt, dass sie am Aufbau des Sekretionsapparats beteiligt sind, da sie für die CagA-Translokation und IL8-Induktion essentiell sind (siehe Abb. III.3). Aus den Vorhersagen und den Proteinaseverdauen geht hervor, dass das VirB10-Homolog HP527 aufgrund seiner putativen membrandurchspannenden Domänen hauptsächlich in der inneren Membran und im Periplasma lokalisiert ist. Das Protein HP532 könnte aufgrund seiner Lipoproteinsignalsequenz in der äußeren Membran lokalisiert sein, wohingegen HP537 und HP539 als periplasmatische Proteine vorausgesagt sind. HP546 ist ein putatives inneres Membranprotein.

Für die Mikroskopie wurden die Antikörper zunächst einer ProteinG-Aufreinigung (siehe II 2.4.3) unterzogen. Bei der Immunfluoreszenz mit den Antikörpern α -HP527, α -HP532 und α -HP537 konnte beim Vergleich ganzer Zellen vom Wildtyp *H. pylori* 26695 mit entsprechenden *cag* PAI-Deletionsmutanten kein starker Unterschied in der Fluoreszenzstärke festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da mit den Antikörpern im Immunoblot neben den entsprechenden spezifischen Proteinbanden noch zusätzliche Banden auftraten, wurde vermutet, dass in den Antiseren zusätzliche Antikörper vorhanden sind, die mit Proteinen der Bakterienoberfläche kreuzreagieren können. Deshalb wurde zur Entfernung dieser unspezifisch bindenden Antikörperfraktion die IgG-Fraktion, die bei der ProteinG-Aufreinigung erhalten wurde, gegen die *H. pylori* 26695 *cag* PAI-Deletionsmutante präadsorbiert (siehe II 2.4.4). Bei diesem Vorgang binden unspezifische Antikörper an die Bakterien und werden anschließend durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge abgetrennt. Zur Überprüfung der aufgereinigten Antikörper wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die Antikörperfraktion vor und nach der Präadsorption wurde in gleicher Verdünnung eingesetzt, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen (siehe Abb. III. 18). Im Immunoblot zeigt sich, dass die Präadsorption für die Seren α -HP527, α -HP532 und α -HP537 erfolgreich war, da unspezifische Banden wegfallen.

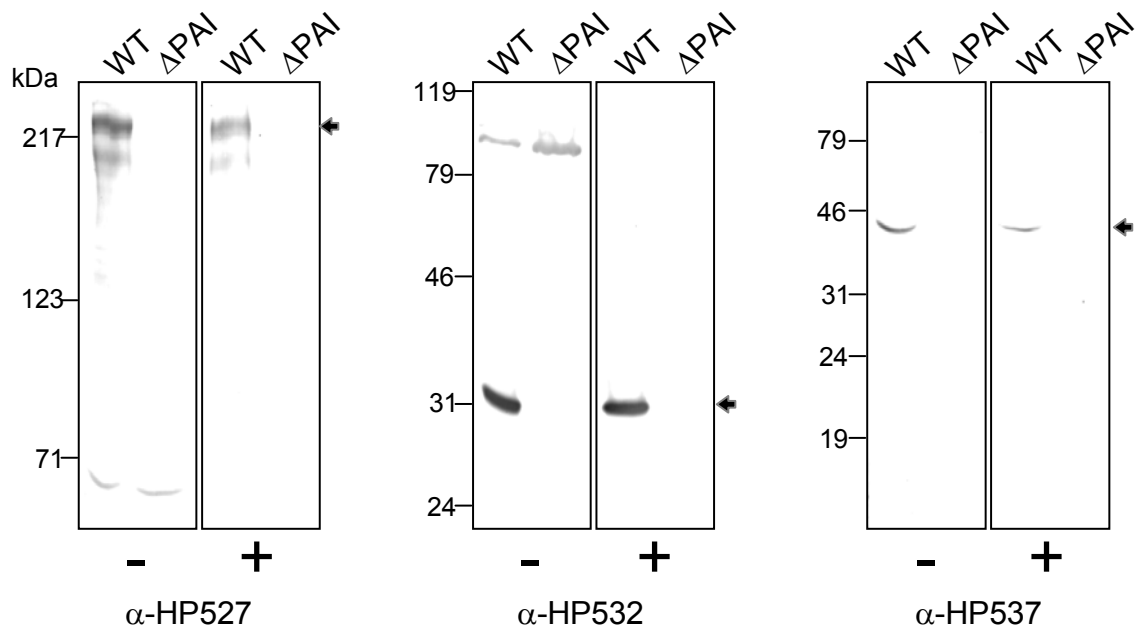


Abb. III.18: Vergleich der IgG-Fractionen vor und nach der Präadsorption. Lysate von ganzen Zellen *H. pylori* 26695 (WT) sowie von ganzen Zellen der Mutante *H. pylori* 26695 Δ PAI wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurde eine Behandlung mit α -HP527 pAK, α -HP532 pAK und α -HP537 pAK durchgeführt. (-) ProteinG-aufgereinigte IgG-Fraktion, (+) ProteinG-aufgereinigte und gegen die *cag* PAI-Deletionsmutante präadsorbierte IgG-Fraktion. Die Pfeile zeigen die vom entsprechenden Antikörper spezifisch erkannte Bande des entsprechenden *H. pylori*-Proteins.

Nach der Präadsorption treten nur noch spezifische Banden mit den Größen 220kDa (HP527), 32kDa (HP532) und 43kDa (HP537) auf (siehe Abb. III.18). Für alle weiteren mikroskopischen Studien wurden die präadsorbierten IgG-Fractionen eingesetzt. Die Antiseren α -HP546 a und b, welche gegen das Protein HP546 gerichtet sind, wurden ebenfalls präadsorbiert (Daten nicht gezeigt), wobei jedoch die gleichen zahlreichen kreuzreagierenden Banden detektiert wurden wie vorher. Es tritt jedoch in allen Fällen eine spezifische HP546-Proteinbande mit der Größe von ca. 12kDa auf.

3.2 Untersuchungen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop

Zur zellulären Lokalisierung der Typ IV-Komponenten von *H. pylori* wurden präadsorbierte IgG-Fractionen der Antikörper α -HP527, α -HP532, α -HP537 und α -HP546 in der Immunfluoreszenz eingesetzt. Dafür wurden ganze Bakterien auf Objektträger fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Nachdem die

Proben mit TRITC-gekoppelten α -Kaninchen-IgG pAK angefärbt worden waren, erfolgte die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop.

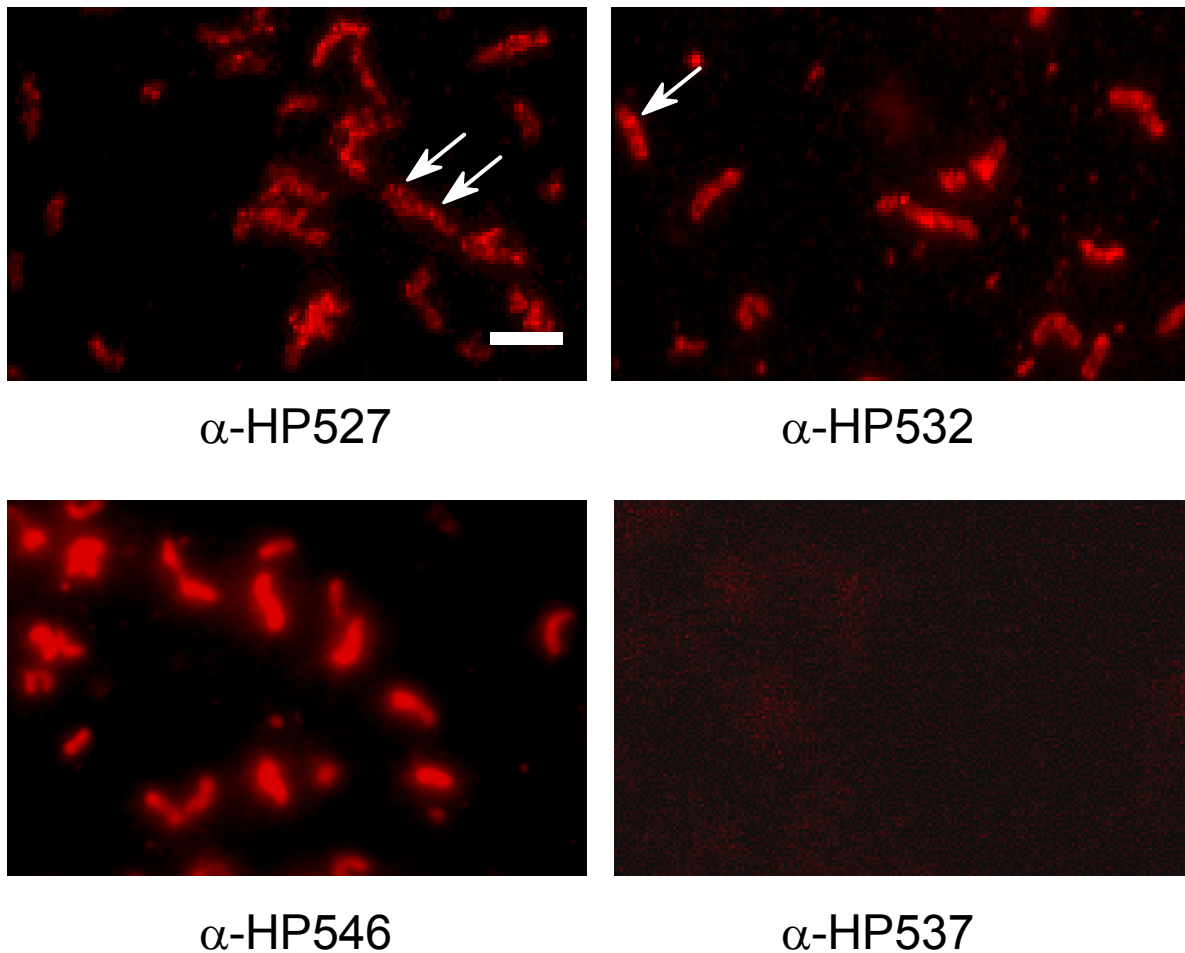


Abb. III.19: Immunfluoreszenz mit den präadsorbierten Antikörpern α -HP527, α -HP532, α -HP537 und α -HP546. Ganze Bakterienzellen vom Stamm *H. pylori* 26695 wurden fixiert und mit den präadsorbierten (siehe III. 3.1) Antikörpern α -HP527, α -HP532, α -HP537 und α -HP546 behandelt. Anschließend wurde mit einem zweiten TRITC-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die auffallenden roten punktförmigen fluoreszierenden Stellen wurden mit einem Pfeil markiert.

Es wurden stets Bakterien vom Wildtypstamm *H. pylori* 26695 mit dem Mutantenstamm 26695 Δ PAI verglichen. Die Antikörper α -HP527, α -HP532 und α -HP546 zeigten eine starke Reaktion mit dem Wildtyp (siehe Abb. III.19). Es konnten fluoreszierende Bakterien detektiert werden. Mit dem Antikörper α -HP537, der gegen das Protein HP537 gerichtet ist, tritt keine Fluoreszenz von Wildtypbakterien auf (siehe Abb. III.19). Dies ist ein Hinweis darauf, dass HP537, wie vorhergesagt, im Periplasma lokalisiert sein könnte. Der Antikörper kann nicht über die äußere

Membran ins Periplasma einwandern. Keiner der Antikörper reagierte mit dem Mutantenstamm 26695 Δ PAI (Daten nicht gezeigt). Die Präadsorption (siehe III. 3.1) war also nicht nur für die Analyse im Immunoblot, sondern auch für die Mikroskopie erfolgreich. Die Ergebnisse sind überraschend, denn sie lassen vermuten, dass die Proteine HP527, HP532 und HP546 zumindest teilweise auf der Oberfläche der Bakterien exponiert sind. Die Proteine besitzen vermutlich Epitope, die auf der Oberfläche lokalisiert sind und somit vom Antikörper erkannt werden können.

Bei genauerer Betrachtung aller Präparate fiel auf, dass die Fluoreszenz sich mit den pAK α -527 und α -532 nicht gleichmäßig über die Bakterien verteilt. Die Fluoreszenz tritt gehäuft, punktförmig über das Bakterium verteilt auf, was ein Hinweis auf eine spezifische Ansammlung einzelner Typ IV-Apparate sein könnte (siehe Abb. III.19).

3.3 Studien mit dem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop

Für die weitere Untersuchung der *H. pylori* Oberfläche wurde ein konfokales Laser Scanning-Mikroskop hinzugezogen. Dieses Mikroskop ermöglicht eine höhere und detailliertere Auflösung als das Fluoreszenz-Mikroskop. Da die Vermutung nahe liegt, dass die Bakterien Typ IV-Sekretionsapparate vermehrt ausbilden, wenn sie die Möglichkeit zum Kontakt mit einer Eukaryontenzelle erhalten, wurden AGS-Zellen 90min mit *H. pylori* 26695 oder *H. pylori* 26695 Δ PAI infiziert und anschließend fixiert. Von Dr. M. Rohde (GBF, Braunschweig) wurden die weiteren Markierungsschritte und mikroskopischen Auswertungen durchgeführt. Nachdem die Präparate mit einem Antiserum (α -Hp pAK), welches gegen ganze *H. pylori*-Zellen gerichtet war, behandelt worden sind, wurden sie mit Alexa-Rot-markiertem Sekundärantikörper behandelt, um die Bakterien durch rote Fluoreszenz zu markieren. Für eine weitere Reaktion wurden die Präparate mit dem α -HP527 pAK bzw. α -HP532 pAK sowie mit Alexa-Grün-markiertem Sekundärantikörper behandelt, um Proteine des Typ IV-Apparats grün anzufärben.

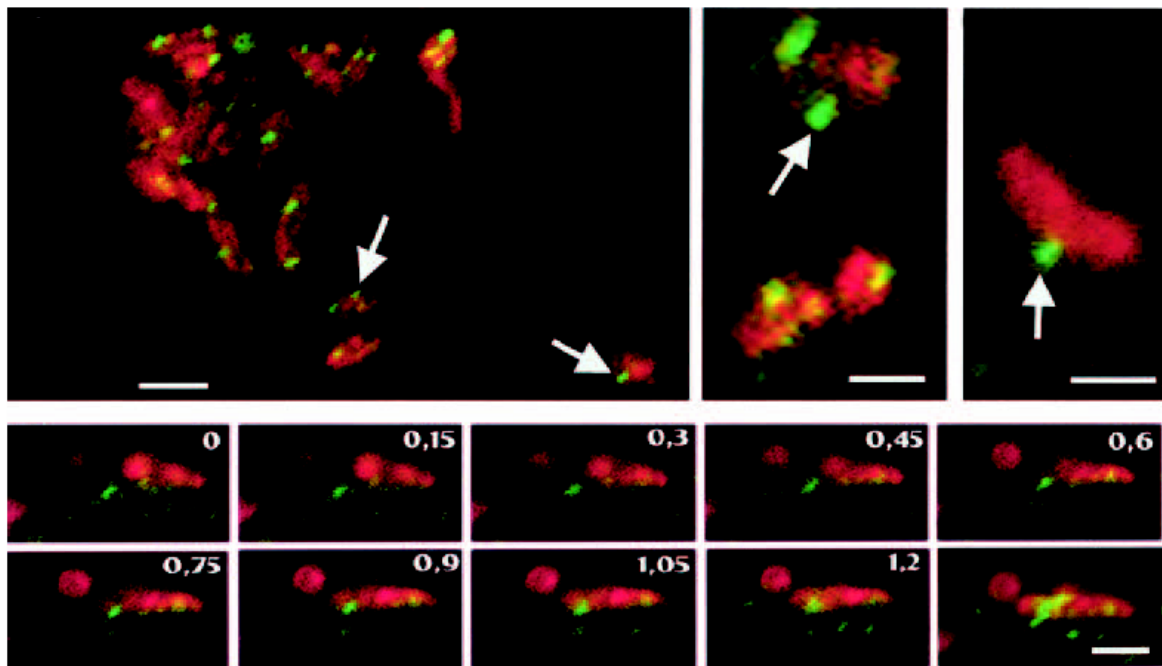
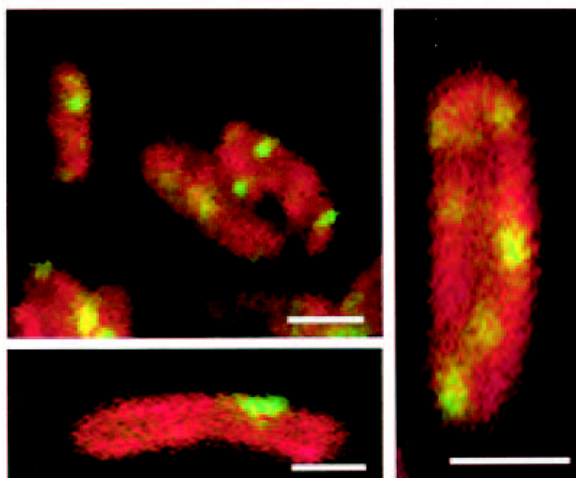
 α -HP527 α -HP532

Abb. III.20: Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie mit den Antikörpern α -HP527 und α -HP532. AGS-Zellen wurden auf Deckgläsern angezogen und mit *H. pylori* 26695 infiziert. Nach der Fixierung wurden die Bakterien mit α -Hp pAK (rot) und anschließend mit α -HP527 oder α -HP532 (grün) markiert (weitere Erläuterungen siehe Text).

Die Färbung der ganzen Bakterien (Wildtyp und *cag* PAI-Deletionsmutante) mit dem α -Hp pAK war erfolgreich (siehe Abb. III.20), da die Bakterienmembran gleichmäßig rot angefärbt wurde. Auffallend ist hier wiederum das Auftreten einer punktuellen Färbung, wie es bereits im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden konnte mit den beiden pAK α -HP527 und α -HP532. Gelbe Fluoreszenz erhält man in den Arealen, bei denen es zu einer Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz durch die Bindung beider Antikörper-Komplexe kommt. Der α -Hp pAK wurde durch die Immunisierung mit dem Typ I-*H. pylori*-Stamm P1 gewonnen, deshalb erkennt der

Antikörper auch Komponenten des Typ IV-Apparates. Interessanterweise sieht man grün fluoreszierende Bereiche, die sich als länglicher Fortsatz von der Bakterienmembran abheben. Solche Fortsätze sind vollständig mit dem α -527-Komplex angefärbt und können in einer Z-Serie konfokaler Schnitte durch diese längliche Strukturen dokumentiert werden. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte mit dem α -HP532 pAK nur eine grüne Fluoreszenz betrachtet werden, die sich auf die bakterielle Oberfläche beschränkte. Es wurden keine Fortsätze detektiert. Um die Struktur der Fortsätze genauer studieren zu können, wurde im Folgenden ein Rasterelektronenmikroskop hinzugezogen.

3.4 Beobachtungen mit dem Rasterelektronenmikroskop

Mit einem Rasterelektronenmikroskop kann, im Vergleich zur Laser Scanning-Mikroskopie eine höhere, insgesamt bis zu einer 300000-fachen Vergrößerung erreicht werden. Dadurch eignet es sich besonders dafür, die Oberfläche eines Objekts realistisch und dreidimensional abzubilden, indem die Oberfläche der Probe schrittweise mit einem stark gebündelten Elektronenstrahl abgetastet wird. Durch die zusätzliche Anwendung der Immunogold-Technik können einzelne Proteine durch deren spezifische Interaktion mit Antikörper-gekoppelten Goldpartikeln sichtbar gemacht werden. Für die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde der Bakterienstamm *H. pylori* 26695 verwendet, da dieser natürlicherweise keine Flagellen aufweist (Josenhans *et al.*, 2000). Somit konnte eine Verwechslung zwischen pilusartigen Fortsätzen und Flagellen ausgeschlossen werden. Die Antikörperbindung und die mikroskopischen Auswertungen, die nach der Fixierung erfolgten, wurden von Dr. M. Rohde an der GBF in Braunschweig durchgeführt.

3.4.1 Mikroskopie einzelner Bakterien nach der Behandlung mit Immunogold

3.4.1.1 Markierung mit α -HP527 pAK

H. pylori-Bakterien wurden zunächst von der Agar-Platte in PBS resuspendiert und fixiert. Nach Inkubation mit α -HP527 pAK erfolgte eine Behandlung mit Protein A-gekoppelten Goldpartikeln.

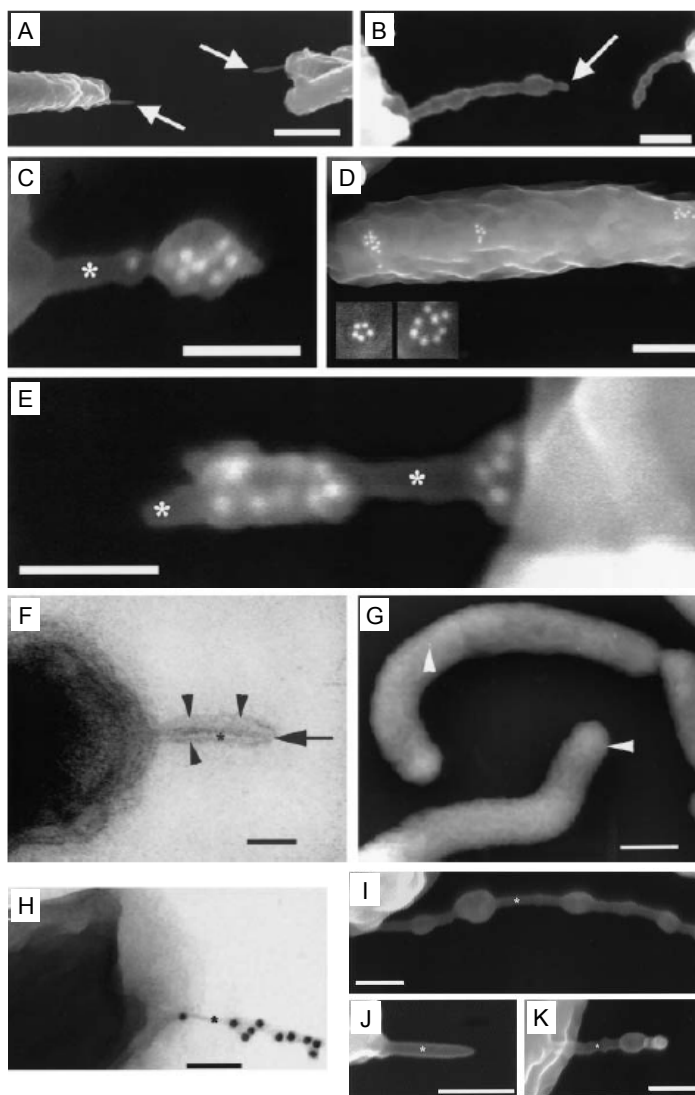


Abb. III.21: Aufnahmen von *H. pylori* 26695 mit dem Raster-elektronen-Mikroskop nach der Behandlung mit α -HP527-Immunogold. Wildtyp-Bakterien *H. pylori* 26695 und Δ PAI-Mutante (G) wurden mit α -HP527-Immunogold behandelt und mikroskopiert. Balken repräsentieren 0,5 μ m in G, 0,25 μ m in D und 0,1 μ m in allen weiteren Bildern (weitere Erläuterungen siehe Text).

Bei etwa 20% der Wildtyp-Bakterien wurden längliche Fortsätze beobachtet, die hauptsächlich am Bakterienpol lokalisiert waren und am Ende eine zentrale nadelähnliche Struktur aufwiesen (siehe Abb. III.21 A, B, weiße Pfeile). Oft scheint es, als wäre die Nadel von einem Proteinmantel umhüllt, was sich an einer unregelmäßigen Dicke des Fortsatzes zeigt (siehe Abb. III.21 B, Pfeil). Interessanterweise reagiert der α -HP527 pAK mit diesem Proteinmantel (siehe Abb. III.21 C-E), jedoch nicht mit der nadelähnlichen Struktur an der Spitze des Filaments (siehe Abb. III.21 E, Stern). An Stellen wo keine Filamentstrukturen zu finden sind, reagiert der α -HP527 pAK direkt mit der Bakterienoberfläche, und zwar meistens in einer ringförmigen Anordnung (siehe Abb. III.21 D). Die Abb. III.21 E zeigt die Markierung des Proteins HP527 mit Immunogold entlang eines Fortsatzes. Deutlich sieht man sowohl die ringförmige Anordnung an der Basis des Filaments als auch die Anordnung des Proteins entlang des Filaments. Keine dieser Beobachtungen konnte

in Präparationen mit der *cag* PAI-Deletionsmutante oder der $\Delta hp527$ -Mutanten gemacht werden (siehe Abb. III.21 G; weiße Pfeilspitzen markieren einzelne Goldpartikel), was den Schluss zulässt, dass der Antikörper das Protein HP527 der *cag* PAI spezifisch bindet. Als weitere Kontrolle wurden fixierte *H. pylori* Bakterien von Agarplatte gleich mit Goldpartikeln behandelt, ohne eine vorherige Inkubation mit α -HP527 pAK. In Abb. III.21 I-K kann deutlich die Filamentstruktur erkannt werden, jedoch ohne jegliche Markierung durch Goldpartikel. Gelegentlich wurden nadelähnliche Strukturen beobachtet, die nicht mit einem Proteinmantel umgeben waren (siehe Abb. III.21 J). Diese Nadeln konnten nicht mit dem α -HP527 pAK markiert werden.

In Abb. III.21 F ist die nadelförmige Struktur erneut zu sehen, diesmal mittels Negativ-Markierung durch Uranyl-Acetat von HP527-markierten Bakterien. Wird ein Ultradünnschnitt durch eine solche Nadel angefertigt (siehe Abb. III.21 H), zeigt sich ein zentraler Kanal, der in etwa 12nm im Durchmesser besitzt. Dieser innere Kanal ist Teil der zentralen Nadelstruktur, die einen ungefähren Durchmesser von 45 nm besitzt. Auch hier ist die Ummantelung der Nadelstruktur mit Protein wieder sehr deutlich zu sehen, und es scheint sich hierbei nicht um eine typische Membranstruktur zu handeln. Der Durchmesser der vollständigen Struktur, also Nadel mit innerem Kanal und Ummantelung, beträgt ungefähr 70nm, was im Einklang mit den anderen Aufnahmen steht.

3.4.1.2 Markierung mit α -HP532 pAK

Bei Aufnahmen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop konnte das Protein HP532 auf der bakteriellen Oberfläche gefunden werden (siehe Abb. III.20). Zur detaillierteren Untersuchung wurde das Rasterelektronenmikroskop herangezogen. Bei der Behandlung von fixierten *H. pylori* Bakterien von Platte mit α -HP532 pAK und Immunogold zeigt sich ein ähnliches Muster, wie es bereits von dem α -HP527 pAK bekannt war (siehe Abb. III.22). Der Antikörper bindet direkt an der bakteriellen Oberfläche in einer ringförmigen Anordnung (siehe Abb. III.22 A), wenn kein nadelförmiges Filament vorhanden ist. Eine Markierung des Filaments selbst konnte nie beobachtet werden (siehe Abb. III.22 B, C, Stern), stattdessen reagierte der Antikörper stets mit der Basis der Nadel (siehe Abb. III.22 B, C).

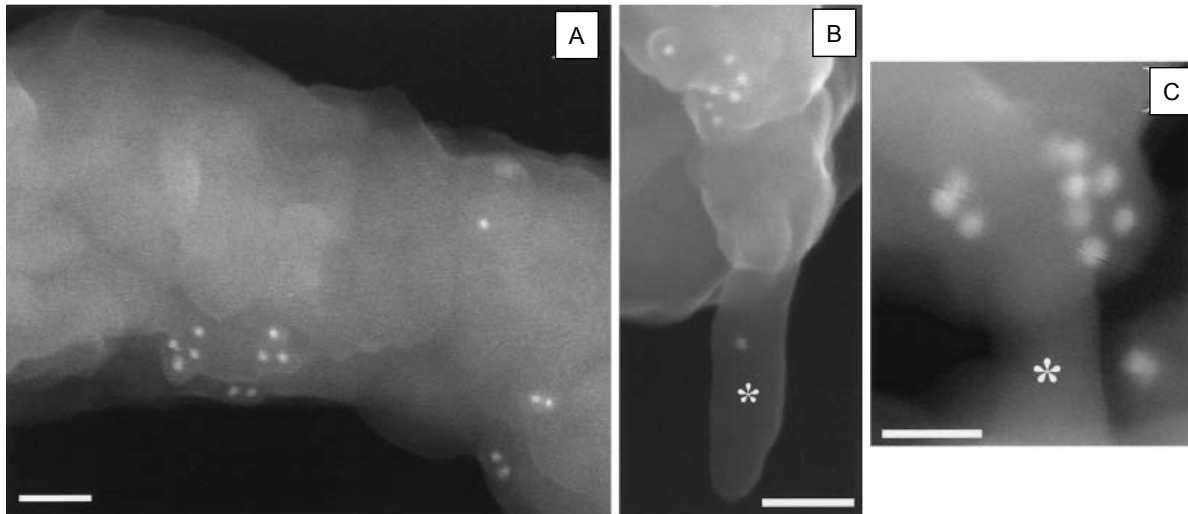


Abb. III.22: Aufnahmen von *H. pylori* 26695 mit dem Rasterelektronen-Mikroskop nach der Behandlung mit α -HP532-Immungold. Wildtyp-Bakterien *H. pylori* 26695 wurden mit α -HP532-Immungold behandelt und mikroskopiert (weitere Erläuterungen siehe Text).

3.4.1.3 Doppel-Markierung mit α -HP532 pAK und α -HP527 pAK

Durch die Behandlung mit jeweils einem Antikörper (α -HP527, III. 3.4.1.1; α -HP532, III. 3.4.1.2) wurde eine Markierung der bakteriellen Oberfläche sowie eine Markierung in Assoziation mit einer nadelförmigen Struktur beobachtet. Jetzt war es von großem Interesse, ob es sich bei der Markierung beider Proteine um Moleküle des selben Filaments handelt. Aus diesem Grund wurde eine Doppel-Markierung mit beiden Gold-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Für die spätere Unterscheidung wurden für die Markierung von HP527 kleine Goldpartikel verwendet und größere Goldpartikel für die Markierung HP532. In Abb. III.23 zeigt sich, dass es zu einer Anhäufung von großen Goldpartikeln an der Basis eines Filaments kommt. Die kleinen Goldpartikel ordnen sich entlang des gleichen Filaments an (Stern). Diese Anordnung demonstriert, dass die beiden Proteine HP527 und HP532 Teile einer gemeinsamen Struktur sind, die vermutlich an der Typ IV-Sekretion beteiligt ist.

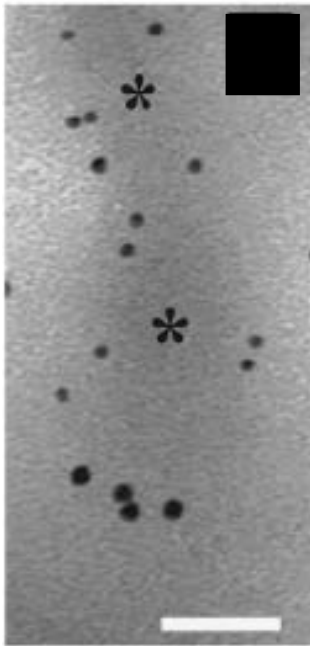


Abb. III.23: Aufnahmen von *H. pylori* 26695 mit dem Rasterelektronen-Mikroskop nach der Behandlung mit α -HP527-Gold (kleine Goldkörner) und α -HP532-Gold (große Goldkörner). Wildtyp-Bakterien *H. pylori* 26695 wurden mit α -HP527-Immunogold und α -HP532-Immunogold behandelt und mikroskopiert (weitere Erläuterungen siehe Text).

3.5 Mikroskopie von Bakterien mit AGS-Zellkontakt

Bisher wurden Bakterien mikroskopiert, die auf Agarplatten gewachsen waren und somit nur in Kontakt mit der Oberfläche des Agars, sowie untereinander standen. Zur Imitation einer *in vivo* ähnlicheren Situation wurden AGS-Zellen für 90min mit *H. pylori* 26695 (Wildtyp, *cag* PAI-Deletionsmutante) Bakterien infiziert. Zunächst erfolgte eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung ohne Immunogold.

In Abb. III.24 A, F, G zeigt sich, dass *H. pylori* seine Aufnahme in die Wirtszelle induziert. Es konnten zwei unterschiedliche Aufnahmemechanismen identifiziert werden. Einerseits werden Bakterien, die der Länge nach an die Zellen adhären, durch fingerähnliche Gebilde umschlossen und so von der Wirtszelle eingeschlossen (siehe Abb. III.24 A, B). Dieser Mechanismus wurde lediglich bei Bakterienstämmen beobachtet, deren *cag* PAI vollständig vorhanden war. Andererseits konnte ein Zipper-ähnlicher Aufnahmemechanismus wie in Abb. III.24 F, G zu sehen ist, beobachtet werden. Die Aufnahme des Bakteriums erfolgt hierbei über den Bakterienpol. Dieser Mechanismus scheint *cag* PAI-unabhängig zu sein.

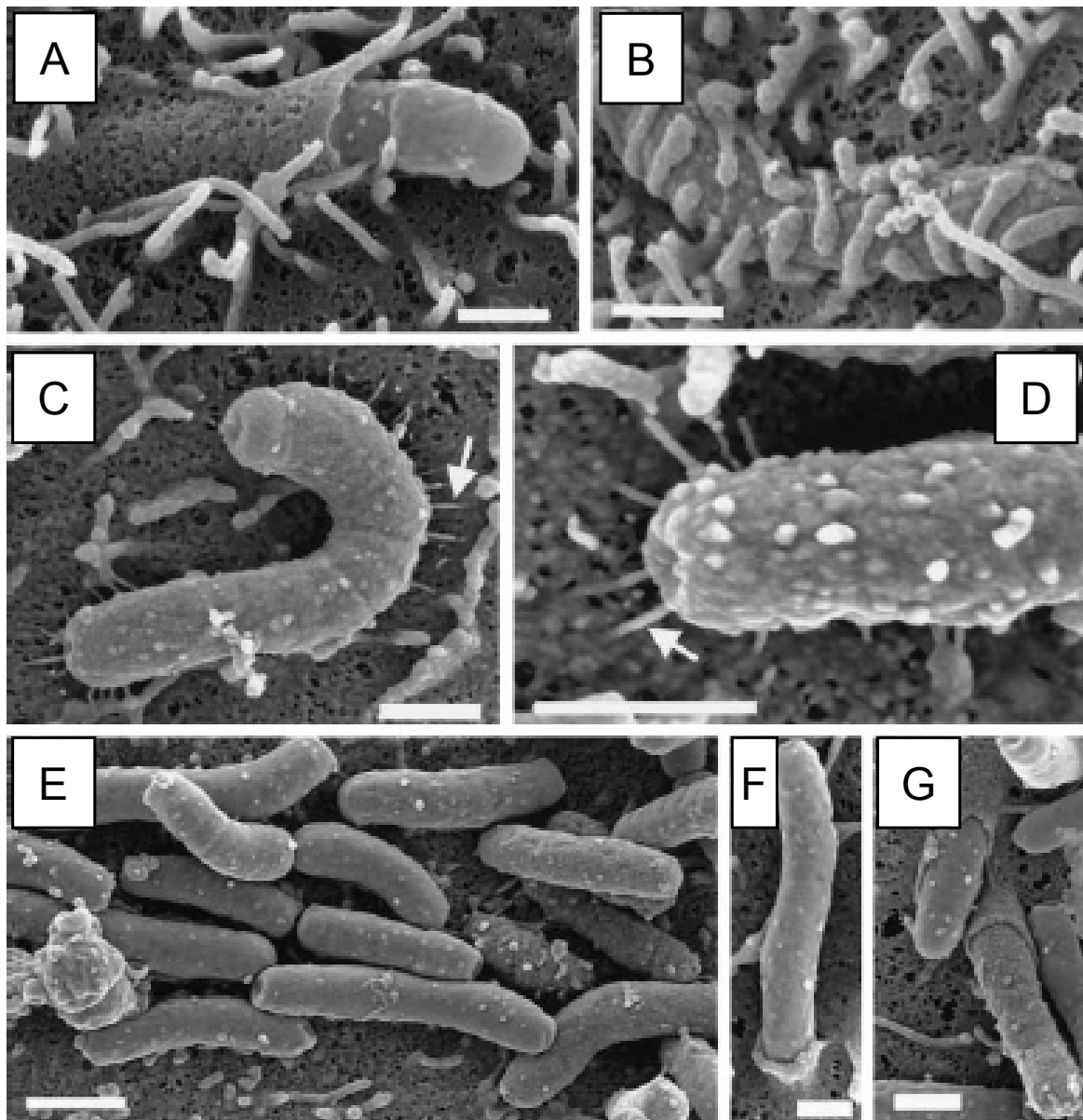


Abb. III.24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp *H. pylori* 26695 und der Mutante *Hp* 26695 Δ PAI nach Infektion von AGS-Zellen. AGS-Zellen wurden auf Deckgläsern angezogen und mit *H. pylori* 26695 und 26695 Δ PAI infiziert. Nach der Fixierung wurden die Bakterien mit dem Rasterelektronenmikroskop analysiert (weitere Erläuterungen siehe Text).

Auffällig war die Ausbildung von bakteriellen Oberflächenstrukturen bei Wildtypstämmen, die zu einer starken Adhärenz zwischen Bakterium und Zelle führten (siehe Abb. III.24 C, D). Diese Strukturen wurden bei *cag* PAI-Deletionsmutanten nicht beobachtet (siehe Abb. III.24 E), und vermutlich handelt es sich hierbei um die gleichen nadelförmigen Filamente wie in Abb. III.21 handelt. Deshalb wurden *H. pylori* infizierte AGS-Zellen mit immunogoldgekoppelten α -HP527 pAK inkubiert (siehe Abb. III.25).

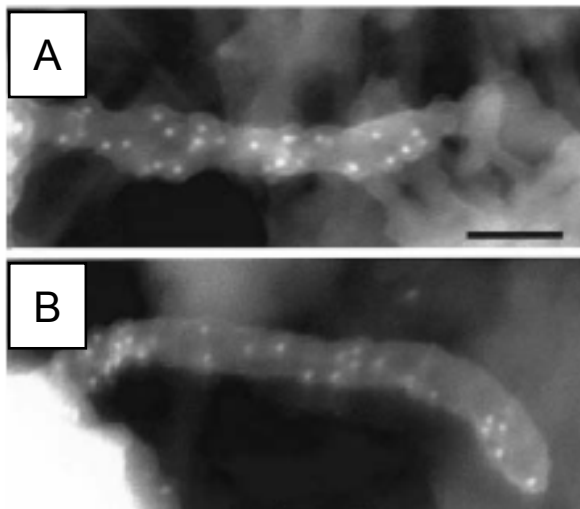


Abb. III. 25: Aufnahmen von *H. pylori* 26695 mit dem Rasterelektronenmikroskop nach der Infektion von AGS-Zellen und der Behandlung mit α -HP527-Immungold. AGS-Zellen wurden auf Deckgläsern angezogen und mit *H. pylori* 26695 infiziert. Nach der Fixierung wurden die Bakterien mit α -HP527-Immungold behandelt und mit dem Rasterelektronenmikroskop analysiert (weitere Erläuterungen siehe Text).

Nach Kontakt zwischen Bakterium und AGS-Zelle kommt es zur Ausbildung der bereits beobachteten nadelförmigen Filamente (siehe Abb. III.25). Die Strukturen bilden sich an den Oberflächenseiten des Bakteriums aus, die in direkten Kontakt mit der Zelloberfläche treten. Im Unterschied zu den Bildern in Abb. III.21, wo Bakterien alleine ohne AGS-Zellen abgebildet sind, wird die Nadel vom Protein HP527 viel gleichmäßiger und ohne Unterbrechungen ummantelt. Die mantelartige Struktur verbindet das Bakterium mit der AGS-Zelle. Der Durchmesser der zentralen Nadel wird auf ungefähr 45nm, der gesamte Durchmesser des Filaments (mit HP527-Mantel) auf ungefähr 70nm geschätzt.

4 Untersuchungen zur Komplementation der *hp525*-Deletionmutanten

Ein Sekretionssystem ist aus vielen löslichen oder membranassoziierten Proteinen zu einem funktionellen Komplex zusammengesetzt. Für den eigentlichen Zusammenbau des Apparats, aber auch für die Translokation eines Substrats wird Energie benötigt, die NTPasen, hauptsächlich ATPasen bereitstellen. Bisher sind ihre spezifische Rollen und ihre Funktionsweisen noch völlig unklar.

Das Proteine HP525 ist homolog zu VirB11 von *A. tumefaciens* (Christie *et al.*, 2000), wobei beide Proteine in die Gruppe der VirB11-ATPasen eingeteilt werden. VirB11-ATPasen unterscheiden sich durch ihre unterschiedlichen Ansprüche an ein Substrat. ATP stellte sich als das bevorzugte Substrat von HP525 heraus (Krause *et al.*, 2000). Alle VirB11-ATPasen sind im Zytoplasma lokalisiert und weisen eine partielle Assoziation mit der inneren Membran auf. Für das Protein HP525 konnte die Kristallstruktur bestimmt werden (Yeo *et al.*, 2000). HP525 ist ein homohexameres Protein.

Zur Aufklärung von molekularen und strukturellen Besonderheiten, die letztendlich zur Aktivitätssteigerung oder zum –verlust des HP525-Hexamers führen, wurden eine Reihe von strukturellen Studien mit dem Protein HP525 durchgeführt.

Durch den Austausch von bestimmten Aminosäuren von HP525 wurden zunächst verschiedene HP525-Punktmutanten hergestellt. Die Erzeugung der Mutanten R18A, W57A, R113E, R133E, K184A, R240E und der Doppelmутanten R11E/R133E wurde von Erich Lanka (Max-Planck-Institut für Genetik, Berlin) durchgeführt. Dort wurden ebenso die Untersuchungen zur Fähigkeit der Mutanten, ein Hexamer auszubilden, Nukleotide zu binden und Studien zu deren ATPase-Aktivität durchgeführt.

Die funktionelle Bedeutung der orts-spezifischen HP525-Mutanten *in vivo* wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es war von großem Interesse, ob die entsprechenden mutierten Genprodukte fähig sind, die Funktion der VirB11-ATPase, in einer $\Delta hp525$ -Mutante zu komplementieren.

4.1 Erzeugung von Plasmiden für die Komplementation von $\Delta hp525$

Zur Herstellung von Plasmiden, die eine Übertragung der veränderten *hp525*-Gene in eine $\Delta hp525$ -Mutante ermöglichen, wurde zunächst eine PCR mit den Primern WS156 (mit T7-Gen10 SD-Sequenz) und RB23 durchgeführt. Als Matrize wurden die Plasmide pWP4760R240E, pWP4760W57A, pWP4760R113+R133E, pWP4760R133E, pWP4760K184A, pWP4760R113E und pWP4760R18A verwendet, die unterschiedlichen *hp525*-Derivate (AS-Austausch) enthielten. Außerdem diente chromosomale DNA von *H. pylori* 26695 als Matrize, um ein Wildtyp *hp525*-Gen zu amplifizieren. Anschließend wurden die amplifizierten Fragmente mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Bam*HI geschnitten und in den Vektor pJP99 (*Sal*I/*Bam*HI) (Püls *et al.*, 2002; siehe Abb. III.26 A) ligiert. Auf diese Weise wurden die amplifizierten Genfragmente zwischen partielle 5'- und 3'-Bereiche des *recA*-Gens positioniert. Es wurden die Plasmide pRB34 (R240E), pRB35 (K184A), pRB38 (*hp525*-WT), pRB39 (W57A), pRB40 (R133E), pRB41 (R113E), pRB42 (R18A) und pRB43 (R113E1 R133E) erhalten, die durch Restriktionsanalyse überprüft wurden.

4.2 Komplementation der *H. pylori* Mutante 26695 $\Delta hp525$

Mit den Plasmiden pRB34, 35, 38, 39-43 wurde eine Transformation (siehe II 2.1.3.6) in *H. pylori* 26695 $\Delta hp525$ durchgeführt. Durch homologe Rekombination sollte es zu einer chromosomalen Integration der entsprechenden Sequenzen und der *aphA*-3-Resistenzkassette in den *recA*-Lokus des *H. pylori*-Chromosoms kommen (siehe

Abb. III.26). Die Selektion erfolgte auf Serumplatten, die mit Kanamycin supplementiert waren. Anschließend wurden Lysate der erhaltenen Klone im Immunoblot mit dem Antiserum α -RecA getestet. Bei Klonen, in denen eine vollständige und richtige homologe Rekombination stattgefunden hat, sollte der *recA*-Lokus im *H. pylori*-Chromosom durch Insertion der entsprechenden Sequenz unterbrochen worden und somit eine Expression von *recA* nicht mehr möglich sein. Es wurden die *H. pylori*-Transformantenstämme RBP12 (R240E), RBP13 (W57A), RBP14 (R113E1 R133E), RBP15 (R133E), RBP16 (K184A), RBP17 (R113E), RBP18 (R18A) und RBP19 (*hp525*-WT) erhalten, die kein RecA mehr herstellen konnten (Daten nicht gezeigt).

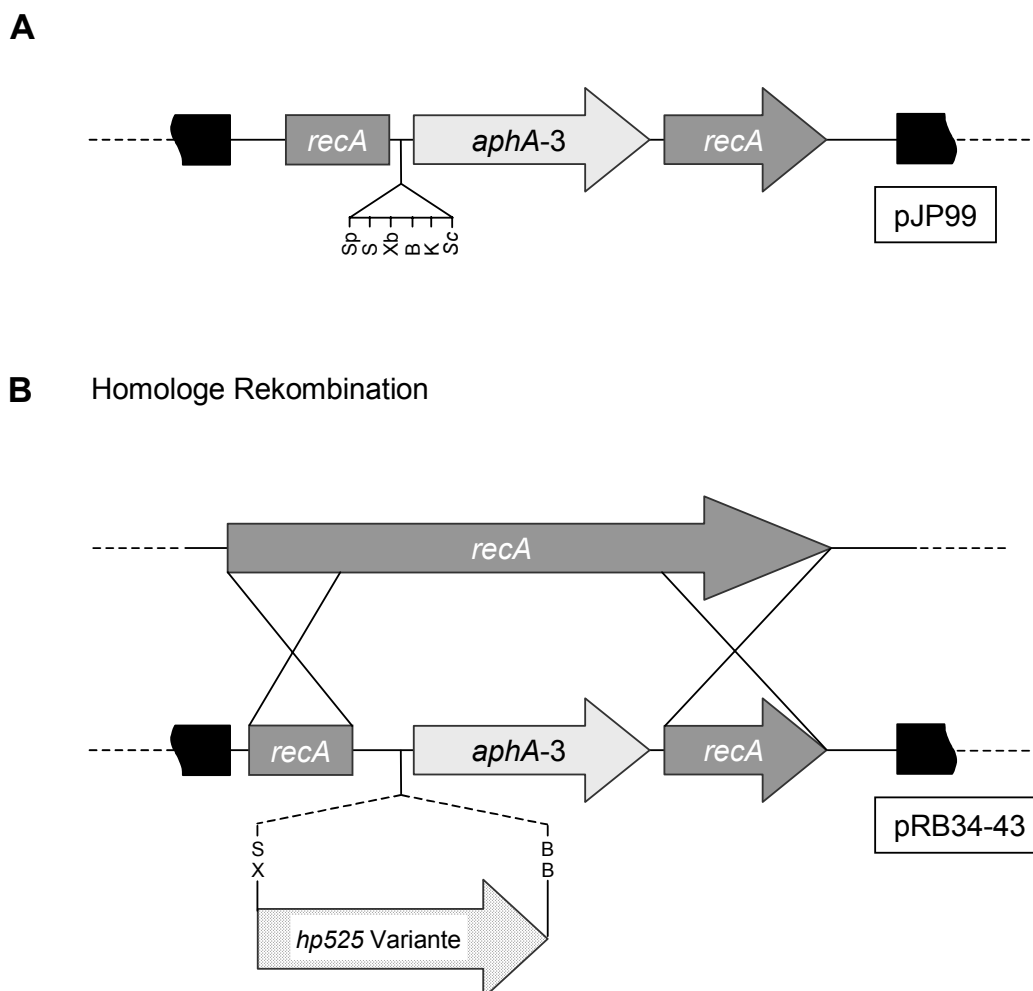


Abb. III. 26: Schema der homologen Rekombination zwischen pRB/JP99-Varianten und chromosomalem *recA*-Lokus. A pJP99 mit partiellem *recA*-Gen, *aphA-3*-Kassette und Polylinker. B pJP99-Varianten (pRB34-43), die durch die Ligation des entsprechenden PCR-Fragments über *Xho*I (X)/ *Sal*I (S) und *Bam*HI (B) entstanden sind. Durch homologe Rekombination wird das chromosomale *recA*-Gen von *H. pylori* 26695 Δ *hp525* durch die *hp525*-Varianten und die *aphA-3*-Kassette ersetzt.

Im Gegensatz zeigt der Immunoblot in Abb. III.27, eine stabile Produktion von mutierten HP525 Proteinen. Somit haben Komplementationen des *H. pylori* Mutantenstammes 26695 $\Delta hp525$ mit den mutierten Genen erfolgreich stattgefunden.

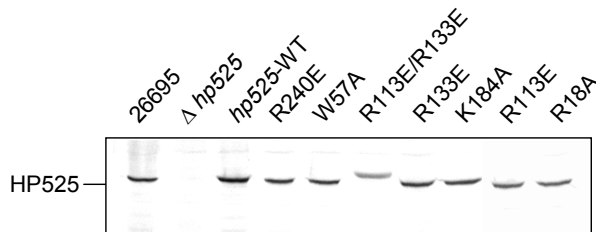


Abb. III.27: Stabile Produktion von HP525. Lysate aus ganzen Zellen der *H. pylori*-Stämme 26695, 26695 $\Delta hp525$, RBP19 (*hp525*-WT) RBP12 (R240E), RBP13 (W57A), RBP14 (R113E1 R133E), RBP15 (R133E), RBP16 (K184A), RBP17 (R113E), RBP18 (R18A) und wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit α -HP525 pAK behandelt (weitere Erläuterungen siehe Text).

4.3 Untersuchung der CagA-Translokation

Als nächstes wurden alle Mutantenstämme darauf getestet, ob sie noch in der Lage sind, das Effektorprotein CagA in die Zielzelle zu translozieren. Wie unter III 1.4 bereits beschrieben, gibt es lediglich den indirekten Beweis für die CagA-Translokation über einen Phosphotyrosin-Immunoblot (siehe II. 2.4.1.2). Hierfür wurde die Zelllinie AGS mit den jeweiligen Mutantenstämmen und zur Kontrolle mit einem *H. pylori*-Wildtypstamm infiziert. In Abb. III.28 ist zu erkennen, dass lediglich der Wildtyp und die Komplementationsmutante RBP19, die das Wildtyp-HP525-Protein produziert, zur Tyrosinphosphorylierung von CagA fähig ist. Diese Komplementationsstudien bestätigen damit, dass die als kritisch für die Struktur bzw. Funktion des ATPase-Komplexes vorhergesagten AS tatsächlich essentiell für die Funktion des HP525 Hexamers sind.

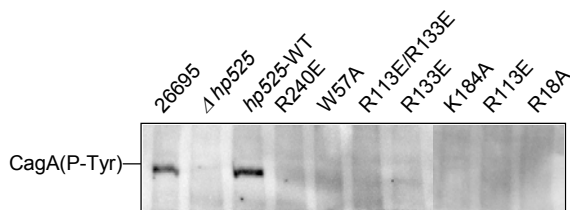


Abb. III.28: Nachweis der Fähigkeit der komplementierten Mutanten zur CagA-Translokation. AGS-Zellen wurden mit den *H. pylori* Stämmen 26695, 26695 $\Delta hp525$, RBP12 (R240E), RBP13 (W57A), RBP14 (R113E1 R133E), RBP15 (R133E), RBP16 (K184A), RBP17 (R113E), RBP18 (R18A) und RBP19 (*hp525*-WT) infiziert und einem Phosphotyrosin-Western-Blot unterzogen (weitere Erläuterungen siehe Text).

IV Diskussion

Typ IV-Sekretionssysteme leisten einen großen Beitrag in der Virulenz von pathogenen Bakterien. Sie ermöglichen den genetischen Austausch und den Transport von Effektormolekülen in eukaryotische Zielzellen. Der Erwerb eines neuen Gens spielt eine wichtige Rolle bei der Anpassung des Bakteriums an wechselnde Umweltbedingungen und die Interaktion zwischen Effektor- und Wirtsmolekül kann zur Unterdrückung der Wirtsabwehr führen. Folglich wird dem Bakterium mit Hilfe der Typ IV-Sekretion die Invasion des Wirts, das intrazelluläre Wachstum und die Induktion der Synthese von Nährstoffen, die für eine bakterielle Kolonisation nötig sind erleichtert. In der Literatur werden viele verschiedene Organismen beschrieben, die ein Typ IV-Sekretionssystem besitzen. Trotz eines gemeinsamen Ursprungs aus dem Konjugationssystem, zeigt sich eine große Mannigfaltigkeit in der Funktion der einzelnen Typ IV-Sekretionssysteme, was sie für die Forschung sehr attraktiv macht. Derzeit laufen viele vergleichende Studien, die zu einem besseren Verständnis der Strukturen und der Funktionen der verschiedenen Typ IV-Sekretionsmaschinen führen sollen. Auch aus medizinischer Sicht ist es von großem Interesse herauszufinden, wie der Transfer eines Effektormoleküls zur Pathogenese beiträgt. Eine genaue Kenntnis dieses Mechanismus kann eventuell genutzt werden, um maßgeschneiderte Inhibitoren für das entsprechende Sekretionssystem zu generieren.

1 Aufbau des Cag PAI Typ IV-Sekretionsapparates

TypI-Stämme von *H. pylori* unterscheiden sich von den TypII-Stämmen durch die Anwesenheit der *cag* PAI. Ist die *cag* PAI intakt, korreliert dies oft mit der Entstehung ernster Krankheitsbilder, wie Ulkus, MALT-Lymphom oder Adenokarzinom. Deshalb ist es sehr interessant, welche Rolle die *cag* PAI bei der Entwicklung der verschiedenen Krankheitsbilder spielt. Durch Sequenzvergleiche wurde herausgefunden, dass die *cag* PAI für ein Typ IV-Sekretionssystem kodiert. Mit Hilfe dieses Systems kann *H. pylori* das Effektorprotein CagA in eukaryontische Zielzellen schleusen und die Sekretion des Chemokins IL8 in Epithelzellen induzieren. Das translozierte CagA führt durch die Bindung mit dem Protein Grb2 zu strukturellen Veränderungen im Zytoskelett. Ebenso bewirkt die Tyrosinphosphorylierung von CagA durch die eukaryontische Src-Kinase eine Umorganisation des Zytoskeletts, außerdem kann eine Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen beobachtet werden.

Die IL8-Ausschüttung der Epithelzellen wirkt als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten und führt zu einer starken inflammatorischen Antwort während einer chronischen Infektion der menschlichen Magenmukosa.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente zum Aufbau des Typ IV-Sekretionsapparates durchgeführt. Mittels einer systematischen Mutagenese aller *cag* PAI-Gene wurden die verschiedenen Aufgaben der einzelnen Proteine im Typ IV-Sekretionsprozess untersucht. Die Lokalisation einiger *cag* PAI-Genprodukte erfolgte durch Zellfraktionierungen, Proteasebehandlung und Topologiestudien. Außerdem wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-, konfokalen Laser Scanning-Mikroskopie sowie der Rasterelektronenmikroskopie versucht den Typ IV-Sekretionsapparat an der Oberfläche von *H. pylori* durch Anfärbung einzelner *cag* PAI-kodierter Proteine sichtbar zu machen.

1.1 Essentielle *cag* PAI-Gene für die Tyrosinphosphorylierung von CagA und für die Induktion von IL8

Für die Mutagenese jedes einzelnen *cag* PAI-Gens wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Gene, die am Ende eines möglichen Operons positioniert sind, wurden durch die Insertion eines TnMax5-Transposons mutagenisiert. Zur Vermeidung polarer Effekte, die durch das Einführen von Terminatoren bei der Insertion eines Transposons entstehen können, wurde bei Genen, die sich innerhalb oder am Anfang eines möglichen Operons befinden, eine spezielle Mutagenese-Strategie entwickelt. Wie in Abb. III.1 dargestellt, wurden solche Gene, die in die pBA-Vektoren Cag1-9 subkloniert waren, durch eine inverse PCR deletiert und anschließend durch eine terminatorlose *cat*_{GC}-Kassette ersetzt. Durch die Transformation der erhaltenen Suizid-Plasmide in den *H. pylori*-Stamm 26695 fand durch homologe Rekombination ein Austausch der entsprechenden Gene mit der terminatorlosen *cat*_{GC}-Kassette statt. Es war möglich, mit diesem Verfahren unpolare Mutanten herzustellen, was durch die Analyse zweier unterschiedlich hergestellter Mutanten im Western Blot gezeigt werden konnte (siehe Abb. III.2). Die Insertion des TnMax5-Transposons im Gen *hp541* führte zu einem vollständigen Verlust des Genprodukts des stromabwärts gelegenen Gens *hp539*. Die Einführung der Resistenzkassette anstelle des entsprechenden Gens beeinträchtigte die Expression von *hp539* nicht, jedoch fiel die Menge an Protein im Vergleich zum Wildtyp etwas geringer aus. Diese Reduktion scheint aber keine Auswirkung auf die Biogenese des Sekretionssystems zu haben, denn die Mutation im Gen *hp540* hat keinen negativen Effekt auf die IL8-Induktion, wohingegen die Δ *hp539*-Mutante eine starke Reduktion in ihrer Fähigkeit zur IL8-Induktion zeigt.

Da in dieser Arbeit ein bestimmter Phänotyp mit jeweils einem Gen in Verbindung gebracht werden soll, ist es unerlässlich, polare Effekte zu vermeiden. Wahrscheinlich können Differenzen, die zwischen den Daten dieser Arbeit und der Resultate von Covacci und Rappuoli, (2000), die alle bisherigen Ergebnisse zur CagA-Translokation und IL8-Induktion von *H. pylori* G27 *cag* PAI-Mutanten zusammengefasst haben, auch durch polare Effekte erklärt werden. Denn die G27 *cag* PAI-Mutanten wurden durch eine Transposonmutagenese mit miniTn3-Km generiert (Suerbaum *et al.*, 1993), wovon viele einen negativen Effekt zeigten. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch generell mehr Mutanten gefunden, die nur einen partiellen (*hp545*, *hp543*, *hp542*) oder gar keinen Effekt (*hp540*, *hp534*, *hp521*) auf die IL8-Sekretion oder CagA-Translokation zeigten. Die Beobachtungen bei Covacci und Rappuoli können mit Ausnahme von *hp534* mit einem polaren Effekt auf essentielle Gene, stromabwärts im gleichen Operon gelegen, erklärt werden. Der Grund, warum die G27 *H. pylori* *hp534*-Mutante im Gegensatz zur hier erzeugten *H. pylori* 26695-Mutante kein IL8 induziert, bleibt unklar. Vielleicht sind stammspezifische Unterschiede dafür verantwortlich.

Zunächst wurde überprüft, ob die einzelnen Mutationen einen Einfluss auf die Expression von *cagA* ausüben. Dafür wurden alle *cag* PAI-Mutanten im Western Blot analysiert (siehe Abb. III.3). Es stellte sich heraus, dass es nur in der Δ *hp547*-Mutante, bei der *cagA* selbst betroffen ist, zu keiner *cagA*-Expression mehr kam. In allen anderen Mutanten traten Banden auf, deren Stärke der Wildtyp-Bande entsprach. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich auf der *cag* PAI weder ein Regulator für die *cagA*-Transkription noch ein CagA-Chaperon, dass für die Stabilität von CagA essentiell wäre, befindet.

Daraufhin wurde jede einzelne Mutante in der jeweils ein einzelnes Gen der *cag* PAI ausgeschaltet war, auf ihre Fähigkeit hin getestet:

- a) das Effektorprotein CagA in AGS-Zellen zu translozieren und
- b) die Produktion von IL8 in AGS-Zellen zu induzieren.

Um beiden Fragestellungen nachzugehen, wurden Phosphotyrosin- und IL8-Experimente durchgeführt. Mit den Ergebnissen aus diesen beiden Tests sollten Aussagen darüber gemacht werden, welche *cag* PAI-Gene essentiell für die Translokation und welche Gene notwendig für die Induktion von IL8 sind. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob es ein transloziertes Effektorprotein für die IL8-Induktion (Effektortheorie) gibt, oder ob eine Komponente des Typ IV-Apparates z.B. an einen eukaryontischen Rezeptor bindet und damit eine IL8-induzierende Signaltransduktionskaskade via einen der beiden für die IL8-Induktion bekannten Wege, in Gang setzt (Rezeptortheorie). An den Signaltransduktionskaskaden sind Rho-GTPasen, PAK, MKK4 und JNK, PAK, NIK und I κ B Kinasen beteiligt, an deren

Ende die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF κ B steht, was wiederum zur Induktion der Transkription vom Chemokinen führt (Naumann *et al.*, 1999). Für die Beantwortung der Frage nach der Effektortheorie wurde eine Mutante gesucht, die CagA translozieren kann, aber nicht mehr in der Lage ist IL8 zu induzieren. Tritt solch ein Fall nicht auf, so spricht das entweder für die Rezeptortheorie oder aber für ein Effektorprotein, das im Genom, außerhalb der *cag* PAI, kodiert ist.

Auch der Frage nach weiteren unbekanntenen Effektorproteinen mit noch unbekannter Funktion wurde nachgegangen. Als putative weitere Effektoren kommen jene Genprodukte in Frage, deren Mutanten sowohl in der Lage sind CagA zu translozieren als auch IL8 zu induzieren. Die Ergebnisse aus den Phosphotyrosin- und IL8-Experimenten (siehe Abb. III.3) wurden in Abb. IV.1 graphisch zusammengefasst.

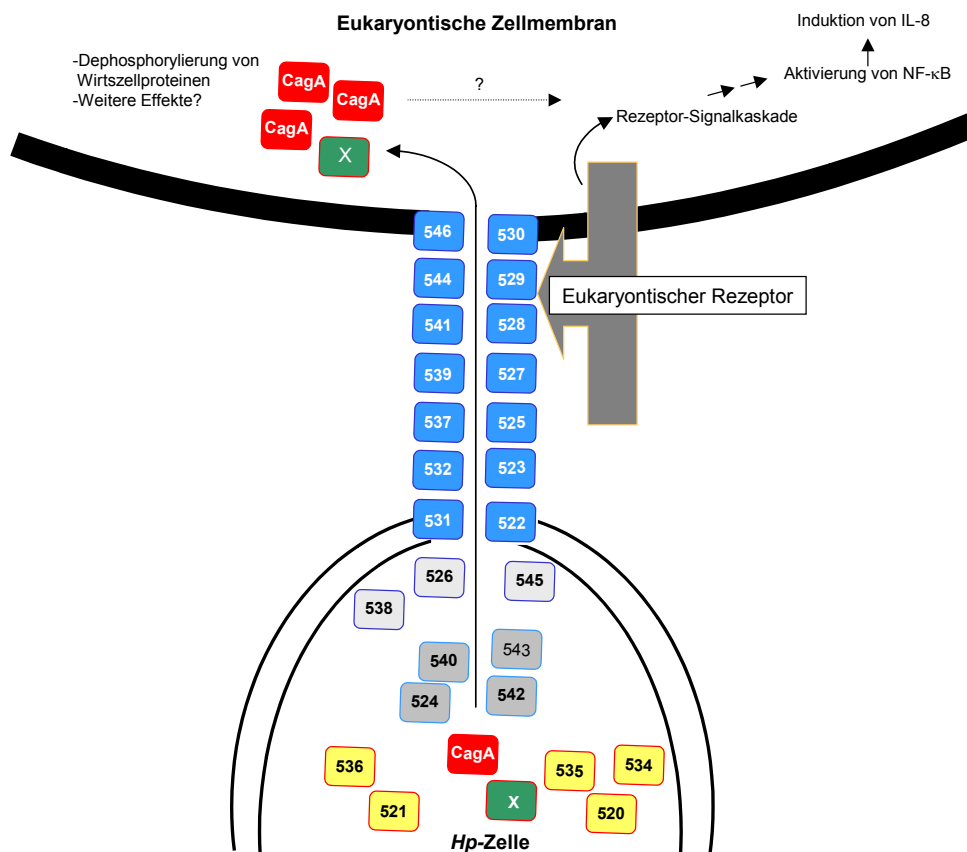


Abb. IV.1: Modell des *cag* Typ IV-Sekretionssystems. In der Abbildung sind die Translokation von CagA und zwei mögliche Mechanismen für die Induktion von IL8 (Effektor-Rezeptortheorie) dargestellt. Die verschiedenen Proteingruppen der *cag* PAI wurden nicht nach ihrem tatsächlichen Lokalisationsort, sondern nur schematisch eingezeichnet. Die Farbgebung spiegelt ihre Funktion wider: gelb, nicht essentielle, mögliche Effektorproteine; grünes X, unbekanntes, nicht *cag* PAI-lokalisiertes Effektorprotein für die IL8-Induktion; rot, CagA-Effektorprotein; dunkelgrau, teilweise essentielle Proteine; hellgrau, nur essentiell für CagA-Translokation; blau, essentielle Proteine (weitere Erläuterungen siehe Text).

Der eigentliche Apparat ist mit blauen Proteinen dargestellt. Hierbei handelt es sich um die *cag* PAI-kodierten Proteine HP522, HP523, HP525, HP527-532, HP537, HP539, HP541, HP544 und HP546, die sowohl für die CagA-Translokation als auch für die Induktion von IL8 essentiell sind, also direkte Komponenten des Apparates sein müssen. Die Mutation der Proteine HP526, HP538 und HP545 (hellgrau) führte zur starken Herabsetzung der IL8-Induktion um fast die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp, was aber von Experiment zu Experiment enorm variierte (hohe Standardabweichung). Außerdem wurde bei diesen Mutanten eine schwächere Phosphotyrosinbande gefunden. Diese Daten weisen darauf hin, dass diese Proteine zwar Komponenten des Systems darstellen, ihre Funktion jedoch nicht von großer Bedeutung für die Typ IV-Sekretion sein kann. Vorstellbar wäre eine Art stabilisierende Wirkung auf die eigentlichen Proteine des Sekretionskanals, sowie eine unterstützende Funktion für die Translokation und IL8-Induktion.

Die dunkelgrau dargestellten Proteine HP524, HP540, HP542 und HP543 werden ausschließlich für die Translokation von CagA benötigt, da ihre Mutation keinen Einfluss auf die IL8-Induktion nimmt. Somit sind diese Proteine wahrscheinlich keine strukturellen Komponenten des Apparates, sondern an den spezifischen Aufgaben bei der CagA-Translokation beteiligt. Diese Annahme wird durch die Tatsache bestärkt, dass HP524 das Homolog zu VirD4 von *A. tumefaciens* ist. VirD4 ist als Kopplungsprotein bekannt, welches eine Art Brücke zwischen dem Effektorprotein VirE2 und dem Sekretionskanal bildet, indem es mit beiden interagieren kann (Atmakuri *et al.*, 2003). HP524 stellt vermutlich ebenfalls ein Kopplungsprotein zwischen CagA und dem Sekretionsapparat dar. Von Crabtree *et al.* wurde 1999 eine *H. pylori* 26695-Mutante im *hp524*-Gen beschrieben, die eine höhere IL8-Induktion bewirkte als der Wildtyp. Sie vermuteten, dass das VirD4-homologe Protein HP524 ein möglicher Regulator für die IL8-Induktion sein könnte. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Durch die Untersuchungen von Fischer *et al.*, (2001) konnte gezeigt werden, dass sich durch Spontanmutation unterschiedliche *H. pylori* 26695-Passagestämme entwickelt haben, die einen partiellen oder sogar kompletten Verlust der Fähigkeit zur IL8-Induktion aufweisen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Resultate bei Crabtree *et al.* und den Daten dieser Arbeit sein. Eventuell wurde bei Crabtree *et al.* eine Spontanmutante als Wildtypstamm verwendet, deren IL8-Induktion von Anfang an sehr viel niedriger war als ohne Mutation.

Die Proteine HP520, HP521, HP534, HP535 und HP536 die in gelber Farbe dargestellt sind (siehe Abb. IV.1), sind weder für die CagA-Translokation noch für die Induktion von IL8 essentiell. Sie stellen also keine Komponenten des Typ IV-Sekretionssystems dar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um weitere,

translozierbare Proteine, deren Funktionen bisher unbekannt sind.

Interessanterweise wurde kein Protein ermittelt, das nur für die Induktion von IL8 benötigt wird. Dies deutet darauf hin, dass auf der *cag* PAI kein Gen liegt, das für ein Effektorprotein (grünes X) kodiert, welches in die Epithelzelle transloziert würde, um dort eine IL8-induzierende-Signaltransduktionskaskade anzuschalten. Sollte kein Effektorprotein gefunden werden, das außerhalb der *cag* PAI kodiert ist, würde dies die Rezeptortheorie bekräftigen. Hierbei würde die bakterielle Apparatsstruktur mit einem bisher unbekanntem eukaryontischen Rezeptor (grau) reagieren. Solch eine Interaktion könnte zur Stimulation einer Signaltransduktionskaskade führen und über die Aktivierung von NF κ B und AP1 schließlich die Ausschüttung von IL8 bewirken. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für *Yersinia spp.* beschrieben. Bei diesen Bakterien interagiert das *Yersinia*-Protein Invasin mit dem eukaryontischen Membranrezeptor α 5 β 1-Integrin. Diese Interaktion induziert sowohl die Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle als auch die Aktivierung der IL8-Sekretion über NF κ B (Schulte *et al.*, 2000). Vielleicht spielen Integrine auch bei der *H. pylori* vermittelten IL8-Induktion eine Rolle, da eine Adhärenz der Bakterien an diese Membranproteine von Su *et al.*, (1999) demonstriert werden konnte. Von Hayashi *et al.*, (2001) wurde berichtet, dass gereinigtes *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* FliC-Flagellin über die Bindung mit TLR5 die Induktion von IL8 in den Zelllinien AGS und MKN28 aktivieren kann. Die Flagellen von *H. pylori* binden jedoch nicht an TLR5 und damit können die Flagellen-Proteine über diesen Signaltransduktionsweg auch kein IL8 induzieren (Lee *et al.*, 2003). Auch bei Gram-positiven Bakterien wurde eine IL8-Induktion in Wirtszellen beobachtet. Das Alpha-Toxin (α -Toxin) von *Staphylococcus aureus* verursacht über die Aktivierung von NF κ B eine Induktion von IL8 in THP-1- und ECV304-Zellen (Dragneva *et al.*, 2001).

1.2 Analyse von Stabilitätseffekten

Von weiterem Interesse war die Frage, wie sich die einzelnen Apparatsproteine gegenseitig beeinflussen. Bei *A. tumefaciens* wurde gezeigt, dass das Protein VirB6 einen Einfluss auf die Stabilisierung von VirB3 und VirB5 hat, außerdem für die Bildung eines VirB7-Homodimers benötigt wird. Die Abwesenheit von VirB6 führte zu einer reduzierten Menge an den Proteinen VirB3 und VirB5, die wahrscheinlich für bei der Bildung des T-Pilus eine Rolle spielen. Außerdem waren die Mengen an zellgebundenen VirB7-Monomeren und VirB7-9-Heterodimeren geringer und es konnten keine VirB7-Homodimere gefunden werden (Hapfelmeier *et al.*, 2000). Zur Untersuchung, ob bei *H. pylori* ebenfalls solche Stabilitätseffekte zu beobachten sind, wurden, wie in III.1.6 beschrieben, zunächst einige Antikörper gegen verschiedene *cag* PAI-kodierte Proteine hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine

HP525 (VirB11-Homolog), HP528 (VirB9), HP529, HP541, HP544 (VirB4-Homolog) und HP546 ausgewählt, da sie essentiell für den Translokationsprozess sind. Außerdem wurden das Protein HP526, das nur bedingt am Translokationsprozess beteiligt ist, und die Proteine HP521, HP535, HP534, deren Funktion bisher unbekannt ist, ausgesucht. Nach der Immunisierung von Kaninchen und Testen der gewonnenen Antiseren im Western Blot auf Reaktion mit *H. pylori*-Lysat wurden immunisierungsspezifische Banden nur bei den HP525-, HP528-, HP534- und HP546a,b-Fusionsproteinen detektiert (siehe Abb. III.5). Die polyklonalen Antiseren, die gegen die Proteine HP521, HP526 und HP544 (RB3/4) gerichtet sein sollten, erkannten keine spezifischen Banden. Da jedoch die Fusionsproteine von den Antiseren erkannt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die getesteten Bakterien zu wenig von dem jeweiligen Protein synthetisieren, um es zu detektieren. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Transkription des entsprechenden Gens unter den gegebenen Bedingungen nicht angeschaltet war.

Die Immunoblots mit α -HP528, α -HP534, α -HP537, α -HP539 und α -HP546 a,b ergaben, dass keine der spezifischen Mutationen in den *cag* PAI-Genen einen Einfluss auf die Expression der Gene oder Stabilität der jeweils getesteten Proteine hatte. Auch das Protein HP525 ist in den meisten Mutantenstämmen stabil (siehe Abb. III.6). Die im Vergleich zum Wildtyp etwas dünnere Bande für HP525 in der $\Delta hp526$ -Mutante lässt sich durch einen geringen polaren Effekt der Mutation im Gen *hp525* erklären. Eventuell ist der Promotor der Resistenzkassette (siehe III.1.1) schwächer als der natürlich vorkommende. Die Auswirkung des polaren Effekts hält sich jedoch in Grenzen, da die Mutante $\Delta hp526$ sowohl in der Lage ist, das Effektorprotein CagA zu phosphorylieren, als auch die Sekretion von IL8 zu stimulieren (siehe Abb. III.3). Eine Mutation in den Genen *hp527* und *hp541* scheint einen schwachen, bisher ungeklärten Einfluss auf die Menge von HP525 zu nehmen, denn die entsprechende Bande für das HP525-Protein fällt, im Vergleich zu den anderen Mutanten, etwas schwächer aus. Da alle drei Proteine für die Translokation von CagA und auch für die IL8-Induktion essentiell sind, wird davon ausgegangen, dass sie am Aufbau des Sekretionskanals beteiligt sind. Es wäre möglich, dass durch den Verlust von HP527 oder HP541 ein Proteinkomplex instabil wird und somit auch zur Instabilität von HP525 führt, oder aber dass eine regulierende Funktion von HP527, HP541 auf HP525 ausgeht.

Die Untersuchung von HP532 zeigte eine unveränderte Stabilität des Proteins in den einzelnen *cag* PAI-Mutanten. Die Ausnahme bildet die $\Delta hp537$ -Mutante, die nicht mehr in der Lage ist ein HP532 zu produzieren. Dies lässt die Vermutung zu, dass das entsprechende Genprodukt von *hp537* ein Chaperon für HP532 darstellt. Alternativ könnte HP537 aber auch ein Regulator der Expression von *hp532* oder

ebenfalls eine Komponente eines Proteinkomplexes sein, bei dessen Abwesenheit es zu einer Instabilität kommen könnte.

Chaperone dienen generell zur Stabilisierung einer oder mehrerer Substrate und/oder verhindern die Interaktion eines Proteins mit sich selbst oder mit anderen Proteinen. Darüberhinaus können Chaperone eine Rolle bei der Faltung eines Proteins spielen. Einige bekannte Chaperone sind: SecB, das in den Proteinexport über die Sec-Translokase involviert ist (Driessen et al., 2001), SycE und SycT von *Yersinia*, die mit den Effektorproteinen YopE und YopT interagieren und die *Salmonella* Chaperone SicP und SigE, deren Interaktionspartner SptP und SigD sind (Page und Parsot (2002)). In Typ IV-Sekretionssystemen wurde bei *A. tumefaciens* das Protein VirE1 als Sekretionschaperon für das Effektorprotein VirE2 beschrieben (Zhao et al., 2001) und Duménil und Isberg (2001) postulieren, dass das *L. pneumophila*-Protein IcmR ein Chaperon für IcmQ ist.

Mit dem Protein HP527 zeigte sich im Western Blot eine Überraschung. Das Protein HP527 wurde zwar in den meisten Mutanten stabil gebildet, aber in den Mutanten $\Delta hp523$ und $\Delta hp539$ traten unterschiedliche Größen von HP527 im Vergleich zum Wildtyp auf (siehe Abb. III.7). In der $\Delta hp523$ -Mutante konnte ein größeres HP527-Protein detektiert werden, während es in der $\Delta hp539$ -Mutante in prozessierten Formen von ca. 120 und 125kDa vorlag. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass sich Vorstufen des HP527-Proteins erst durch Prozessierung und Faltungsprozesse zur eigentlichen Endform von HP527 entwickeln. Bei dem Protein HP523 handelt es sich wahrscheinlich um ein homologes Protein zu VirB1, da eine lytische Transglykosylase-Aktivität festgestellt werden konnte (persönliche Mitteilung G. Koraimann, Graz/Österreich). Die Beobachtung, dass HP527 in der $\Delta hp523$ -Mutante größer erscheint, lässt vermuten, dass HP527 nur mit Hilfe von HP523 das Peptidoglykan passieren kann, worauf es dann zu seiner eigentlichen Größe prozessiert oder gefaltet wird. Ob die Prozessierung selbst zu den Aufgaben von HP523 gehört, oder ob nur seine putative lytische Transglykosylase-Aktivität notwendig ist, bleibt noch unklar. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich das prozessierende Enzym zwischen Peptidoglykanschicht und äußerer Membran befindet, da HP527 vor der Prozessierung geschützt ist, wenn es das Peptidoglykan nicht durchqueren kann. Welche Rolle dabei das Protein HP539 spielt, ist unklar. Vielleicht schützt es HP527 während seines Transfers durch den Mureinsacculus vor dem Angriff von Proteasen oder stabilisiert es während der Faltung zu seiner Endform.

1.3 Zellfraktionierung und proteolytische Experimente

Untersuchungen von verschiedenen Zellfraktionen und proteolytische Experimente sollten zur weiteren Charakterisierung der Position eines Proteins im Sekretionsapparat führen. Die Zellfraktionierung von ganzen *H. pylori*-Bakterien ergab eine Ansammlung von HP527 in der Gesamtmembranfraktion. Da durch die Untersuchung im Western Blot in den Mutanten $\Delta hp523$ und $\Delta hp539$ eine Lokalisation von HP527 im Periplasma oder auch in der äußeren Membran wahrscheinlich ist, wurde durch proteolytische Experimente die Lokalisation von HP527 näher bestimmt. Die Behandlung von ganzen *H. pylori*-Bakterien mit Trypsin in unterschiedlichen Konzentrationen sowie osmotischer Schock, lässt den Schluss zu (siehe Abb. III.12), dass große Regionen von HP527 im Periplasma lokalisiert sind. Bei der gleichen Behandlung von ganzen $\Delta hp523$ -Mutanten-Zellen zeigte sich, dass ein bestimmter Bereich des Proteins HP527 (150-160kDa) vor proteolytischen Abbau geschützt ist (siehe Abb. III.13 A). Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, dass das Protein bei Abwesenheit der putativen lytischen Transglykosylase HP523 das Peptidoglykan nicht korrekt durchqueren kann, und danach auch nicht prozessiert oder gefaltet wird, wie es im Wildtyp der Fall ist. Bei der Behandlung von $\Delta hp539$ -Mutanten, in denen HP527 mit 125kDa in einer prozessierten Form vorliegt (siehe Abb. III.13B), wurde das Protein nach osmotischem Schock von der Proteinase vollständig degradiert. Dieses Ergebnis trägt zur Vermutung bei, dass HP539 eine mögliche Chaperonfunktion im periplasmatischen Raum für HP527 übernimmt und somit als Schutz des Proteins vor proteolytischem Abbau auf seinem Weg in die äußere Membran notwendig ist. Durch die Fraktionierung von ganzen *H. pylori*-Zellen zeigte sich, dass das Protein HP539 hauptsächlich in löslicher Form vorliegt (siehe Abb. III.10). Da für HP539 eine Signalsequenz vorhergesagt wird, die einen Sec-abhängigen Transport ins Periplasma ermöglicht, wird vermutet, dass HP539 ein periplasmatisches Protein ist.

Durch die Behandlung der $\Delta hp539$ -Mutante mit Trypsin ergab sich jedoch noch ein weiterer wichtiger Aspekt. Das Protein HP532, welches aufgrund seiner Vorhersage als Lipoprotein als VirB7-Homolog betrachtet wird, wird in der $\Delta hp539$ -Mutante durch die Behandlung mit Trypsin nach osmotischem Schock vollständig abgebaut. In *H. pylori* Wildtyp und auch in der $\Delta hp523$ -Mutante ist dies nicht der Fall. Das Protein HP532 war teilweise resistent gegen den proteolytischen Angriff und wurde lediglich zu einem kleineren Fragment von ca. 25kDa degradiert, wenn der Zusatz von Protease nach osmotischem Schock erfolgte (siehe Abb. III.13). Dies deutet zunächst darauf hin, dass HP532 bei seiner Passage durch die Peptidoglykanschicht von der putativen lytischen Transglykosylase HP523 unabhängig ist. Außerdem wird durch dieses Ergebnis einerseits unterstützt, dass HP532 teilweise in der äußeren

Membran lokalisiert ist, wie es von einem Lipoprotein erwartet wird. Andererseits scheint HP532 aber auch auf der periplasmatischen Seite der äußeren Membran lokalisiert zu sein, was sich durch den Abbau zu einem kleineren Protein nach osmotischen Schock durch Trypsin zeigt. Der vollständige Abbau von HP532 in der $\Delta hp539$ -Mutante könnte sich, wie schon bei HP527, durch eine Chaperonfunktion von HP539 erklären lassen. Die Schlussfolgerung daraus wäre, dass durch Abwesenheit von HP539 könnte die partielle Integration von HP532 in der äußeren Membran verhindert wird und somit das gesamte Protein dem proteolytischen Angriff ist.

Durch Untersuchung verschiedener Fraktionen von *H. pylori*-Zellen wurde versucht, die Lokalisierung noch anderer *cag* PAI-kodierte Proteine zu charakterisieren. Das VirB9-homologe Protein HP528 besitzt eine Signalsequenz, aber keine vorhergesagten transmembranen α -Helices. Dies würde für eine Lokalisation im periplasmatischen Raum sprechen. Bei *A. tumefaciens* ist VirB9 als ein äußeres Membranprotein beschrieben, das mit den Proteinen VirB1, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10 und VirB11 interagiert (Das *et al.*; 1997; Beaupré *et al.*; 1997; Das *et al.*; 2000; Ward *et al.*; 2002; Krall *et al.*; 2002; Jakubowski *et al.*; 2003). Biochemische Analysen bestätigten die Interaktion mit VirB7, VirB9 und VirB10 und deuten zusätzlich auf einen Kontakt mit VirB6 hin. Als vermutliche Funktion wird die Bildung einer Pore in der äußeren Membran vorgeschlagen (Sekretin). Durch Fraktionierung von *H. pylori*-Zellen häufte sich das Protein HP528 in der Gesamtmembranfraktion an (siehe Abb. III.10). Dies könnte bei *H. pylori* ebenfalls eine Lokalisierung von HP528 in der äußeren Membran bedeuten, wie es für VirB9 postuliert ist. Durch die Western Blot-Analyse aller Mutanten mit α -HP528 konnten keine Einflüsse von anderen *cag* PAI-kodierten Proteinen auf HP528 festgestellt werden, was auf eine stabile Integration in der äußeren Membran hinweisen könnte.

Das Protein HP546 kommt als putativer Vorläufer für ein Pilin in Frage. Solche Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie hydrophobe Polypeptide sind, die aus weniger als 150 AS-Resten bestehen. Sie besitzen am aminoterminalen Ende eine Signalsequenz mit einer Länge von 25-50 Resten und zwei vorhergesagte transmembranen α -Helices in der Kern-Region (Kalkum *et al.*; 2002). Für das aus 115-Aminosäureresten bestehende HP546-Protein ist eine Signalsequenz vorhergesagt, die aber wahrscheinlich nicht abgespalten werden kann, da es kein offensichtliches Spaltsignal gibt. Auch die beiden α -Helices, die kennzeichnend für ein Vorläuferprotein des Pilins sind, werden mit einer zusätzlichen, putativen, dritten α -Helix vorhergesagt. HP546 stellte sich als essentielles Protein für die Typ IV-Sekretion heraus, seine Stabilität wird jedoch in keiner Weise durch die Mutation eines *cag* PAI-Proteins beeinflusst. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es

nicht in einem Protein-Komplex im Periplasma lokalisiert, sondern als Pilus an der Oberfläche positioniert ist. Die Untersuchung von Membranfraktionen und löslicher Fraktion ganzer *H. pylori*-Zellen war nicht eindeutig. Vermutlich befindet sich jedoch der Hauptteil des Proteins in der äußeren Membran, was auch den vollständigen Schutz vor proteolytischem Angriff durch Trypsin nach bzw. ohne osmotischen Schock erklären könnte.

1.4 Lokalisierungsstudien mit dem Mikroskop

Mittels verschiedener Mikroskope und unterschiedlichen Methoden der Mikroskopie wurde versucht, die Oberflächenstruktur des Typ IV-Sekretionssystems sichtbar zu machen. Hierfür wurden die Antiseren α -HP527, α -HP532, α -HP537 und α -HP546 zunächst in der Immunfluoreszenz mit ganzen *H. pylori* 26695 Bakterien bzw. der entsprechenden Δcag PAI-Mutanten eingesetzt. Die Antiseren wurden zunächst gegen die *H. pylori* 26695 *cag* PAI-Deletionsmutante abgesättigt, um Antikörper, die unspezifisch mit der bakteriellen Oberfläche der Deletionsmutanten kreuzreagierten, zu entfernen (siehe Abb. III.18). Bei der Untersuchung mit dem Immunfluoreszenzmikroskop wurden mit α -HP527, α -HP532 und α -HP546 ausschließlich Wildtyp-Bakterien angefärbt (siehe Abb. III.19). Die Fluoreszenz bei der Behandlung mit α -HP527 und α -HP532 war jedoch nicht gleichmäßig über die Bakterien verteilt, sondern es war ein punktförmig, fluoreszierendes Muster erkennbar, das sich spiralig über das Bakterium verteilte und vermutlich aufgrund der Anordnung einzelner Typ IV-Sekretionsapparate zustande kommt.

In der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper α -HP546 war eine gleichmäßige, fluoreszenzmarkierte bakterielle Oberfläche detektierbar. Dies unterstützt die Daten aus der Membranfraktionierung und spricht wiederum für eine Lokalisation von HP546 in der äußeren Membran und auf der Oberfläche (vgl. Abb. IV.3). Die Hypothese, dass das Protein am Aufbau einer Pilusstruktur beteiligt oder aber mit dieser Struktur assoziiert ist, müsste in zukünftigen Experimenten durch Studien mit höher auflösenden Mikroskopen bestätigt werden.

Mit dem Antikörper α -HP537 konnte weder der Wildtyp noch die Mutante angefärbt werden. Für das Protein HP537 sind keine transmembranen α -Helices vorausgesagt, aber es besitzt eine putative Signalsequenz. Somit ist es wahrscheinlich, dass es Sec-abhängig ins Periplasma transportiert wird, um dort seiner möglichen Funktion als Chaperon für HP532 nachzukommen (siehe IV.1.2). Da periplasmatische Proteine für Antikörper unzugänglich sind, weil die AK die äußere Membran nicht passieren können, unterstützt dieser Befund die Lokalisation des Proteins im Periplasma wie die Computervorhersagen zeigen.

Für eine detailliertere Ansicht wurde das konfokale Laser Scanning-Mikroskop verwendet. Dabei wurden ganze Bakterien mit α -HP527 oder α -HP532 und zusätzlich mit einem Antikörper, der gegen das gesamte Bakterium gerichtet ist, behandelt. Auch mit dieser Methode zeigte sich die punktförmige, spiralförmige angeordnete Fluoreszenz nur im Wildtyp. Im Falle von α -HP527 wurden teilweise fluoreszierende Ausläufer beobachtet (siehe Abb. III.20), die in einer Z-Serie von konfokalen Schnitten dokumentiert werden konnten.

Durch Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unter Einsatz von Immunogold zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der konfokalen Laser Scanning-Mikroskopie. Die Goldpartikel ordneten sich punktförmig (5-6 Goldpartikel) auf der Oberfläche der Bakterien an (siehe Abb. III.21 D). Erneut konnten feine Ausläufer mit mehr oder weniger unregelmäßiger Struktur beobachtet werden, die nur mit α -HP527-gekoppelten Immunogoldpartikeln bedeckt sind. Allein Filamente, die eine unregelmäßige, mantelartige Struktur besaßen, zeigten eine Markierung mit α -HP527 (vgl. Abb. III.21 J).

Bei einer Doppel-Markierung mit α -HP527 und α -HP532 pAK, die mit unterschiedlich großen Goldpartikeln gekoppelt waren, zeigte sich, dass es zu einer Anhäufung von HP532 an der Basis eines Filaments kommt (siehe Abb. III.23). Entlang des gleichen Filaments bindet HP527, das sich gleichmäßig von der Basis bis zur Spitze des Filaments anordnet. Diese Bilder demonstrieren, dass die beiden Proteine HP527 und HP532 mit der pilusähnlichen Struktur assoziiert sind, die vermutlich als putativer Pilus an der Typ IV-Sekretion oder auch nur an der Kontaktaufnahme oder Adhärenz beteiligt ist.

Im Unterschied zu den Bildern in Abb. III.21, wo Bakterien alleine ohne AGS-Zellen abgebildet sind, wird die Nadel bei AGS-Zellkontakt vom Protein HP527 viel gleichmäßiger ohne Unterbrechungen ummantelt. Dies könnte durch eine mögliche Hochregulierung von *cag* PAI-Genen bei Zellkontakt erklärt werden. Die mantelartige Struktur verbindet das Bakterium mit der AGS-Zelle.

In Ultradünnschnitt-Untersuchungen (siehe Abb. III.21 H) zeigt sich ein innerer, zentraler Kanal mit ca. 12nm Durchmesser. Der Durchmesser der gesamten Nadelstruktur beträgt ca. 45nm und ca. 70nm zusammen mit der Ummantelung. Oberflächen-Organellen, die z.B. von *S. typhimurium* und enteropathogenen *E. coli* gereinigt wurden und eine Verbindung zwischen Bakterium und Zielzelle herstellen, zeigen Durchmesser von 50nm (Ginocchio *et al.*, 1994; Ebel *et al.*, 1998, Knutton *et al.*, 1998). Sehr viel kleinere Durchmesser besitzen die Nadelstruktur von *Yersinia* mit einem ungefähren Durchmesser von nur 2nm (Hoiczky and Blobel, 2001), der Pilus von *Pseudomonas syringae*, der mit einem Durchmesser von 6-8nm eine ca. 200nm dicke Pflanzenzellwand durchdringt und der Pilus von *A. tumefaciens* mit nur

3,8nm (Fullner *et al.*, 1996). Die unterschiedlichen Durchmesser der Strukturen korrelieren mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Typ IV-Sekretionssysteme in den entsprechenden Organismen.

HP532 hat keine homologen Sequenzen zu bekannten Typ IV-Sekretionsproteinen, besitzt aber eine Lipoproteinsequenz und wird daher als (Funktions-)Analog zu VirB7 betrachtet. Dabei sollte erwähnt werden, dass sich die beiden Proteine sehr in ihren Größen (5,8kDa für VirB7 und 32,4kDa für HP532) unterscheiden und auch ihre Sequenzen sich nur zu ca. 20% im Bereich des Signalpeptids entsprechen. Lipoproteine zeichnen sich häufig durch eine Lokalisation in der äußeren Membran aus, wobei Teile des Proteins in den periplasmatischen Raum reichen, und einen Kontakt zur meso-Diaminopimelinsäure des Mureinsacculus herstellen (Schlegel 1992). In *A. tumefaciens* interagiert VirB7 mit den Proteinen VirB9, VirB2, VirB6, VirB10 und mit sich selbst (Das *et al.*; 1997; Beaupré *et al.*; 1997; Das *et al.*; 2000; Ward *et al.*; 2002; Krall *et al.*; 2002; Jakubowski *et al.*; 2003). Der VirB7-VirB9 Komplex soll dabei die Hauptkomponente des Apparates im periplasmatischen Raum bilden und zur Stabilisierung von anderen VirB-Proteinen beitragen. VirB7-Monomere und -Homodimere, die über Disulfidbrücken verbunden sind, werden mit einer stabilisierenden Funktion für den Pilus, der aus VirB2-Proteinen aufgebaut ist, in Verbindung gebracht. Die mikroskopischen Ergebnisse legen nahe, dass HP532 Oberflächenexponiert und mit der Pilusstruktur assoziiert ist. Da keine Ausläufer mit dem Antikörper markiert wurden und es zu einer Anhäufung von Goldpartikeln bei der Doppel-Markierung an der Basis eines Filaments kam, kann der Schluss gezogen werden, dass HP532 die Pilusbasis in der äußeren Membran bildet. Seine Integration in die äußere Membran wird dabei wahrscheinlich vom Protein HP539 unterstützt, wie es aus den proteolytischen Experimenten hervorgeht (siehe Abb. III.13).

1.5 Strukturelle und funktionelle Besonderheiten von HP527

Im Gegensatz zu HP532 scheint das Protein HP527 nicht nur an der Basis mit der Pilusstruktur in Verbindung zu stehen. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen HP527 sowohl auf der bakteriellen Oberfläche als auch entlang der nadelförmigen Pilusstruktur. Dieses Ergebnis widerspricht den bisherigen Erkenntnissen über das homologe Protein VirB10, welches in *A. tumefaciens* eine membrandurchspannende Domäne besitzt und als inneres Membranprotein vorhergesagt wird. Es reagiert mit den Proteinen VirB7, VirB8, VirB9 und mit sich selbst und bildet eine mögliche Brücke zwischen Komplexen an der inneren und äußeren Membran (Das *et al.*; 1997; Beaupré *et al.*; 1997; Das *et al.*; 2000; Ward *et al.*; 2002; Krall *et al.*; 2002;

Jakubowski *et al.*; 2003). Betrachtet man die Sequenz, so sieht man, dass HP527 zwei putative Transmembrandomänen besitzt. Die erste Transmembrandomäne soll am N-Terminus (AS 342-362) und die andere nahe dem C-Terminus (AS1798-1818) liegen (Tomb *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999). Das entsprechende Gen *hp527* kann in fünf Regionen eingeteilt werden (siehe Abb. IV.2). Es gibt einen FCR-Teil (5'-konservierte Region) und einen TCR-Teil (3'-konservierte Region). Der C-Terminus (VHR) besteht aus einer Sequenz mit einer Identität von 29% zu VirB10 von *A. tumefaciens*. Die beiden weiteren Regionen sind Repeat-Region I (5'-Repeat-Region oder FRR) und II (mittlere Repeat-Region oder MRR). Die anschließende 5'-Repeat-Region besteht aus einer wiederholten Abfolge von 130 AS und der einmaligen Abfolge von 57 AS. Repeat II ist aus 74 Segmenten aufgebaut, die aus sechs verschiedenen Konsensus-Sequenzen (5-15AS) bestehen. Innerhalb der 74 Segmente treten 58 Cystein-Reste auf, die wahrscheinlich zur Bildung eines geordneten Netzwerkes durch die Verknüpfung von intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken beitragen (Liu *et al.*, 1999; Aras *et al.*, 2003).

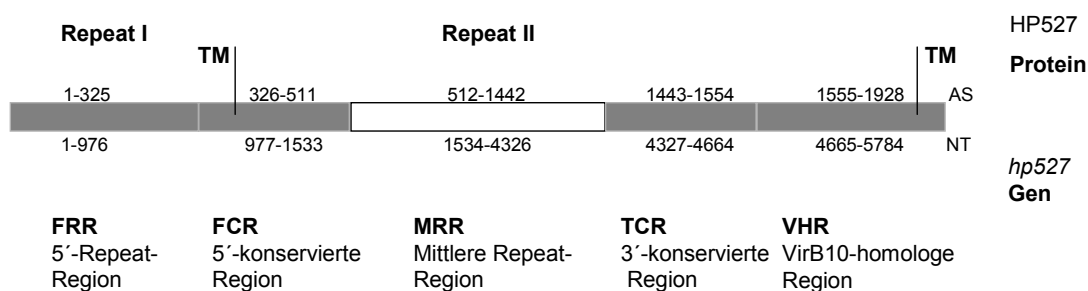


Abb. IV.2: Struktur von HP527. HP527 lässt sich in fünf Domänen einteilen. AS, Aminosäure; TM, Transmembran-Domäne (weitere Erläuterungen siehe Text).

Die Repeat-Region II weist in manchen Bereichen eine Identität von 29% zum Axonema-assoziierten Protein Mst101(2) von *Drosophila hydei* auf (Neesen *et al.*, 1994b). Von diesem Spermischwanz-spezifischen, Axonema-assoziierten Protein Mst101(2) ist bereits bekannt, dass es Netzwerke aus Cystein-enthaltenden 16-Aminosäuren-Motiven aufbaut. Die Verknüpfung von α -helikalen Proteinstäben der extrem verlängerten Spermatozoen soll zur Stabilität der Spermatozoen-Hülle beitragen (Neesen *et al.*, 1994). Da die Homologie von HP527 zu VirB10 nur einen kleinen Teil des Proteins betrifft, die Größen der beiden Proteine wesentlich voneinander abweichen, in der Sequenz zwei Transmembrandomänen für HP527 vorhergesagt sind und außerdem unterschiedliche Vorstufen des Proteins vermutet werden lässt jedoch den Schluss zu, dass die zusätzlichen Domänen von HP527 zu

einer anderen Faltungsweise und somit anderen Lokalisation mit weiteren Funktionen im Typ IV-Sekretionssystem führen könnte. Durch eine Rekombination zwischen den Wiederholungssequenzen von Repeat-Region II (MRR) ist es möglich unterschiedlich große Deletionen in diesem Bereich auszubilden. Auf diese Weise erklärt sich die Beobachtung variabler Größen von HP527-Proteinen in verschiedenen *H. pylori*-Zellpopulationen, die aus unterschiedlichen Wirten isoliert worden sind. Durch die Möglichkeit von *H. pylori*, variable HP527-Proteine zu präsentieren (Antigenvariation), wird die Immunantwort des Wirts beeinflusst (Aras *et al.*, 2003). Der Wirt ist nicht mehr in der Lage, ausreichend geeignete Antikörper gegen die jeweiligen HP527-Proteinformen herzustellen. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass HP527 den *cag* PAI-Typ IV-Pilus ummantelt, um ihn vor einer Antikörperantwort des Wirts während einer Infektion zu schützen.

In Abb. IV.3 sind die bisherigen Ergebnisse für HP527 und HP532 schematisch als Modell zusammengefasst. Für das Protein HP527 ist eine Verankerung in der zytoplasmatischen Membran durch zwei putative membrandurchspannende Domänen vorausgesagt. Aufgrund seiner Größe und seiner Faltung ist es wahrscheinlich, dass HP527 zur Durchquerung der Peptidoglykanschicht, die Hilfe der putativen lytischen Transglykosylase HP523 benötigt, da das Protein HP527 in der $\Delta hp523$ -Mutante das Peptidoglykan nicht passieren kann und nur teilweise vor dem proteolytischen Abbau durch Trypsin geschützt ist. Nachdem HP527 das Peptidoglykan durchquert hat, wird es durch eine bisher unbekannte Protease prozessiert oder aber durch ein Chaperon bei der Neufaltung unterstützt. Anschließend inseriert die neue Form von HP527 so in die äußere Membran, dass es zu einer Reaktion mit dem Antikörper auf der bakteriellen Oberfläche kommen kann. Vermutlich werden Teile von HP527, während der Ausstülpung der nadelförmigen Pilus-Struktur mittransportiert und als eine Art Schutzmantel um den Pilus herum angelagert. Das Protein HP532, das sich an der Basis des herausragenden Pilus befindet, könnte möglicherweise als Austrittsort (Sekretin) für den Pilus und/oder für das Protein HP527 dienen.

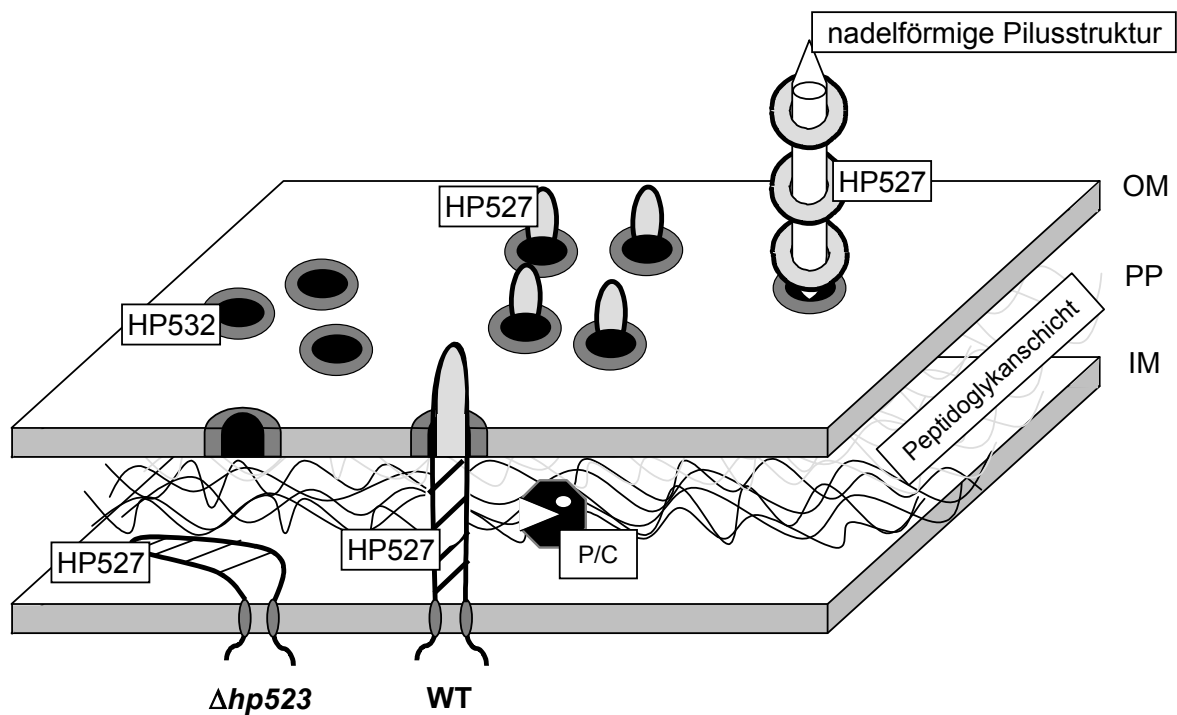


Abb. IV.3: Modell der unterschiedlichen Strukturen und Sekretion von HP527. OM, äußere Membran; PP, Periplasma; IM, innere Membran; P/C Protease, Chaperon (weitere Erläuterungen siehe Text).

Die HP527-Mutante zeigt keine CagA-Translokation, keine IL8-Induktion und auch keine nadelförmigen Pilusstrukturen (Daten nicht gezeigt). Dies macht deutlich, dass HP527 eine Rolle in beiden biologischen Prozessen spielt. Die zentrale Nadel könnte als Kanal oder eine Art Schiene für den Transport von CagA dienen, wie es für die Proteine Hrp und Avr des Typ III Hrp-Pilus von *Erwinia amylovora* und *Pseudomonas syringae* (Jin *et al.*, 2001) postuliert wurde. Zusätzlich könnte das auf der Oberfläche exponierte HP527-Protein an einen zellulären Rezeptor binden und somit die IL8-Ausschüttung induzieren (Rezeptortheorie).

Tanaka *et al.*, (2003) berichten ebenfalls von *H. pylori* Filamentenstrukturen auf der bakteriellen Oberfläche, die eine Verbindung zum Typ IV-Sekretionsapparat zeigen. In Immunogold elektronenmikroskopischen Aufnahmen fanden sie eine Assoziation zwischen Filamentstrukturen und den Proteinen HP532 oder HP528.

1.6 Topologische Analyse von HP530 als VirB8-Homolog

Durch den Vergleich charakteristischer konservierter Motivsequenzen von VirB8-Homologen (siehe Abb III.15) wurde HP530 in dieser Arbeit als putatives VirB8-Homolog von *H. pylori* ermittelt. Zur Bestätigung der vom TMPred- und TMHMM-Programm vorhergesagten Topologie mit einer putativen Transmembrandomäne, wurde eine Methode der Transposonmutagenese durchgeführt, die zur potentiellen Genfusion mit *phoA*, *blaM* und *lacZ* führte (siehe Abb. III.17). Insertionen von TnMax9 (BlaM), die in den HP530-Aminosäurepositionen 67, 80 und 164 festgestellt wurden, befanden sich alle in der putativen periplasmatischen Domäne des Proteins. Diese Daten bestätigten sich durch die Insertionen von TnMax6 (PhoA), da einige unabhängige aktive Fusionen identifiziert werden konnten. Obwohl es Insertionen von TnMax6 und TnMax9 nach der Aminosäureposition 146 gab, konnten hier keine aktiven Fusionen gefunden werden. Da die Aktivitäten (siehe Abb. III.17) der PhoA-Fusionsproteine kurz nach der putativen Transmembrandomäne sehr hoch sind, aber im Verlauf zum C-Terminus stetig niedriger werden, kann vermutet werden, dass eine Fusion mit PhoA und eventuell auch mit BlaM instabiler wird, je weiter sie sich C-terminal im Protein befindet.

Die Mutagenese von HP530 mit TnMax14 (LacZ) unterstützt die Topologievorhersage für HP530, indem die erhaltenen Aktivitäten komplementär zu den PhoA- und BlaM-Werten sind. LacZ-Fusionen, die sich im vorhergesagten putativen periplasmatischen Raum befanden, zeigen relativ niedrige Aktivitäten im Vergleich zu höheren Werten von im Zytoplasma gelegenen Fusionen (siehe Abb. III.17). Es konnte also gezeigt werden, dass das *cag* PAI-Protein HP530 die gleiche Membrantopologie wie VirB8 von *A. tumefaciens* besitzt und einige charakteristische Sequenzmotive mit VirB8 gemein hat. Deshalb wird für HP530 eine analoge VirB8-Funktion im Typ IV-Sekretionsapparat postuliert. Vom *A. tumefaciens*-Protein-VirB8 ist bekannt, dass es eine Komponente des VirB9-10-Proteinkomplexes ist, der sich über den periplasmatischen Raum erstreckt (Das und Xie, 2000) und vielleicht als eine Art „Startprotein“ (Nukleator) für den Aufbau des Typ IV-Sekretionsapparates fungiert (Kumar *et al.*, 2000).

1.7 Funktionelle Bedeutung von Punktmutationen im *hp525*-Gen

Typ IV-Sekretionssysteme haben die Aufgabe Substanzen vom Zytoplasma über die beiden Membranen hindurch ins extrazelluläre Medium oder durch die Wirtszellmembran zu schleusen. Diese Systeme, die sich aus vielen einzelnen Proteinen zu einem Transportapparat zusammensetzen, benötigen Energie nicht nur für den Translokations-Schritt, sondern auch für die Bildung des Apparats. Das Protein HP525 ist homolog zur VirB11-ATPase von *A. tumefaciens* und mit der inneren Membran assoziiert. HP525 bildet ein Homohexamer aus, wobei jedes Monomer aus zwei Domänen besteht, die von der N- und C-terminalen Hälfte des Proteins gebildet wird. An dem Berührungspunkt der beiden Domänen wird ADP gebunden. In der hexameren Form bilden die N- und C-terminalen Domänen zwei Ringe aus, die zusammen einen Hohlraum bilden, der auf einer Seite offen (Ringstruktur gebildet aus N-terminaler Domäne) und auf der anderen Seite (Ringstruktur gebildet aus C-terminaler Domäne) geschlossen ist (Röntgenkristallstruktur siehe Abb. IV.4).

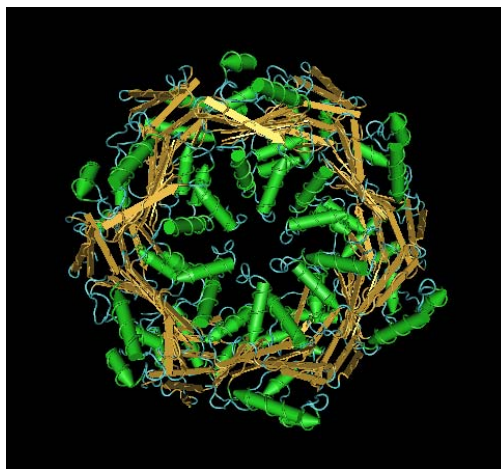


Abb. IV.4: 3D-Struktur des HP525-Hexamers. (nach Yeo *et al.*, 2000)

Der Hohlraum ist mit ca. 60000\AA^3 groß genug um ein großes Protein (ca. 50kDa) oder zumindest eine Proteindomäne unterzubringen. Die Struktur eines HP525-ADP-gebundenen Hexamers besitzt einen äußeren Durchmesser von 100\AA und einen internen Durchmesser von 50\AA . Die Kanalöffnung ist mit ca. 10\AA sehr schmal. Basierend auf dieser Kristallstruktur wird postuliert, dass die VirB11-Familie der ATPasen als hexamere Poren fungieren, deren Öffnung und Schließung durch das Binden und Freisetzen von ATP/ADP reguliert wird. Wahrscheinlich ist der hauptsächlich hydrophobe Ring, der von der N-terminalen Domäne gebildet wird mit

der zytoplasmatischen Membran assoziiert. Kürzlich bestätigten Savvides *et al.*, (2003) die vorhergesagte dynamische Struktur dieser ATPasen durch Studien die zeigten, dass die Bindung von Nukleotiden zu einer Umwandlung der hexameren Struktur in eine symmetrischere und kompaktere Struktur führt. In Abwesenheit von Nukleotiden zeigen die N-terminalen Domänen eine Kollektion von „rigid-body“ Konformationen. Es wird postuliert, dass VirB11-Proteine die mechanische Hebelkraft, die durch solche Nukleotid-abhängigen Konformationsänderungen entsteht, benutzen um den Export von Substraten oder den Aufbau des Typ IV-Sekretionsapparates zu erleichtern.

HP525 ist für die CagA-Translokation essentiell (siehe Abb. III.3). Durch Komplementationen der *H. pylori*-Mutante 26695 $\Delta hp525$ mit den Plasmiden pRB34, 35, 38, 39, 40, 41, 42 und 43 wurden *H. pylori*-Stämme erzeugt, in deren HP525-Protein durch entsprechende Punktmutationen, ausgewählte Aminosäuren ausgetauscht waren. Keines dieser mutierten HP525-Moleküle war jedoch imstande CagA zu translozieren (siehe Abb. III.28). Nur im Kontrollstamm RBP19, eine mit dem *hp525*-Wildtypgen komplementierte $\Delta hp525$ -Mutante, konnte im Phosphotyrosin-Blot eine CagA(P-Tyr)-Bande detektiert werden. Das mutierte HP525-Protein mit dem Aminosäureaustausch R18A, das nicht mehr zur Unterstützung der CagA-Translokation fähig war, zeigte eine instabile Ausbildung der Hexamerstruktur bei einer gesteigerten ATPase-Aktivität (Savvides *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht nur die volle ATPase-Aktivität, sondern auch die Ausbildung der Ringstruktur für die volle Funktion der VirB11-homologen ATPase HP525 notwendig ist.

In Abb IV.5 wurden die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse als Modell für eine Cag Typ IV-Sekretionsmaschine zusammengefasst. Die Positionen der einzelnen Proteine beruhen auf den Ergebnissen aus den Lokalisationsstudien.

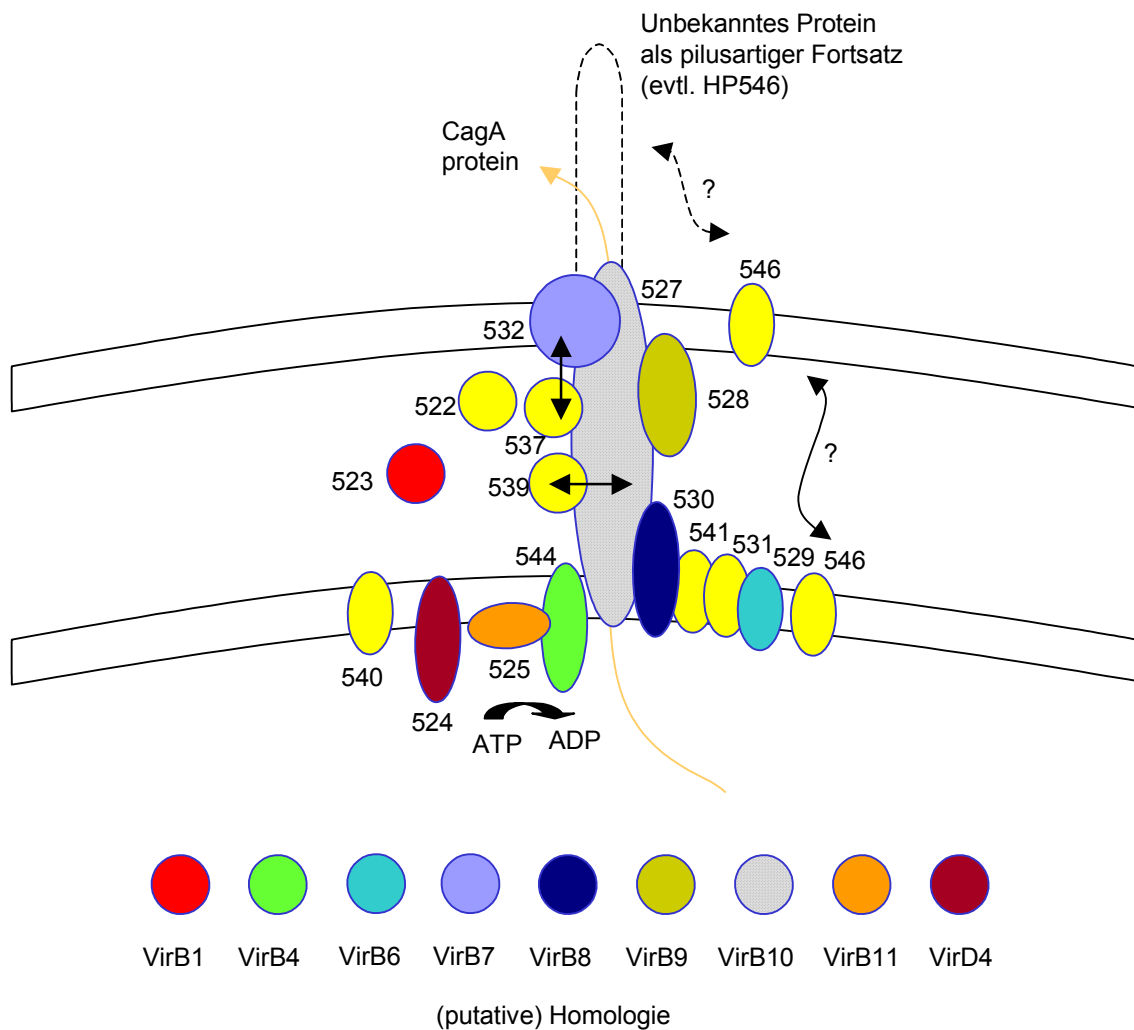


Abb. IV.5: Modell des Cag Typ IV-Sekretionssystems. Der Cag Typ IV-Sekretionsapparat setzt sich aus 14 verschiedenen Proteinen zusammen, wobei drei weitere Proteine (HP524, HP526 und HP4540) für die Translokation von CagA notwendig sind. Die meisten Apparatsproteine sind mit einer der beiden Membranen assoziiert oder bilden mit den Membran-assoziierten Komponenten Komplexe aus. Durch Immunfluoreszenzstudien wird eine Lokalisation in der äußeren Membran von HP546 vermutet. Stabilisierende Effekte zwischen HP527 und HP539 sowie zwischen HP532 und HP537 weisen auf Protein-Protein Interaktionen hin. Durch Sequenzvergleiche, Topologievorhersagen und PhoA/BlaM-Mutagenese Resultaten kann HP530 als VirB8 Homologes bestimmt werden.

V Zusammenfassung

Helicobacter pylori (*H. pylori*) Typ I-Stämme zeichnen sich durch das Vorhandensein der *cag* Pathogenitätsinsel (*cag* PAI) aus und sind mit der Ausbildung schwerer Entzündungsreaktionen im Magengewebe assoziiert. Da Homologien zwischen *cag* PAI-Genen und Genen, die für Typ IV Sekretionssysteme kodieren, gefunden wurden, wird vermutet, dass *H. pylori* ebenfalls einen Typ IV-Sekretionsapparat aufbaut, mit dessen Hilfe er das immunodominante Effektorprotein CagA in die Zielzelle transloziert. In der vorliegenden Arbeit wurde den Fragen nachgegangen, wie das *cag* Typ IV-Sekretionssystem aufgebaut ist, welche Funktionen dabei von den einzelnen *cag* PAI-Genen bzw. Genprodukten übernommen werden, sowie welche weiteren Effektoren damit transloziert werden.

Durch die systematische Mutagenese aller *cag* PAI-Gene konnten die Funktionen der einzelnen Gene in den *cag* PAI-abhängigen Prozessen der Induktion der Interleukin(IL)8-Sekretion aus AGS-Zellen sowie der CagA-Translokation aufgeklärt werden. Es wurden *cag* PAI-Proteine identifiziert, die essentiell bzw. nicht-essentiell für beide Prozesse waren, außerdem wurden Genprodukte gefunden, die nur für die CagA-Translokation benötigt werden. Es konnten jedoch keine nur für die IL8-Induktion verantwortlichen Gene identifiziert werden. Diese Resultate unterstützen die Rezeptortheorie, die davon ausgeht, dass es kein *cag* PAI-kodiertes IL8-induzierendes Effektorprotein gibt, sondern ein Teil des Typ IV-Sekretionsapparates mit einem noch unbekanntem eukaryontischen Rezeptor in Verbindung tritt. Diese Interaktion führt somit zu einer Auslösung von Signaltransduktionskaskaden, die schließlich zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL8 führt.

Nach der Herstellung von Antikörpern gegen verschiedene *cag* PAI-Proteine wurden Studien zur Lokalisation und Stabilität entsprechender Proteine gemacht. Durch Zellfragmentierung, Protease-Behandlung und Mikroskopiestudien wurde gezeigt, dass die Proteine HP527 und HP532 oberflächenexponierte Epitope besitzen und Komponenten einer erstmals entdeckten nadelförmigen Pilusstruktur sind. Mit Hilfe verschiedener mikroskopischer Techniken wurde gezeigt, dass HP527 den Typ IV-Pilus umhüllt. Außerdem konnten funktionelle Wechselwirkungen zwischen den Proteinen HP527, HP532 und HP539, sowie Abhängigkeiten zwischen den Proteinen HP527 und HP523 und HP532 und HP539 gezeigt werden.

Durch Sequenzvergleiche konnten konservierte VirB8-Motive innerhalb des *cag* PAI-kodierten Apparatsproteins HP530 gefunden werden. Mittels Transposonmutagenese mit TnMax6, 9, und 14 wurde gezeigt, dass HP530 in *E. coli* eine für

VirB8 und funktionell homologen Proteine typische Topologie aufweist, für die eine Transmembrandomäne charakteristisch ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer Analogie zwischen Hp530 und den VirB8-Homologen.

Die *H. pylori* 26695 Δ 525-Mutante konnte mit *hp525*-Derivaten, die unterschiedliche Punktmutationen aufwiesen, komplementiert werden. Aus *in vivo* Studien mit den verschiedenen Komplementationsmutanten ging hervor, welche AS für die biologische Funktion der ATPase HP525 essentiell sind.

VI Literaturverzeichnis

- Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. & Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**, 176-180.
- Appelmek, B.J., Negrini, R., Moran, A.P. & Kuipers, E.J. (1997) Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends.Microbiol.* **5**, 70-73.
- Aras, R.A., Fischer, W., Perez-Perez, G.I., Crosatti, M., Ando, T., Haas, R., and Blaser, M.J. (2003) Plasticity of Repetitive DNA Sequence within a Bacterial (Type IV) Secretion System Component. *J.Exp.Med.* **198**, 1349-13460.
- Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T. & Sasakawa, C. (2000) *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J.Exp.Med.* **191**, 593-602.
- Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M.J., Tummuru, M.K., Blaser, M.J. & Cover, T.L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J.Biol.Chem.* **270**, 17771-17777.
- Atmakuri, K., Ding Z., Christie P.J. (2003) VirE2, a Type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol.Microbiol.* **49**, 1699-1713.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M. & Meyer, T.F. (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell.Microbiol.* **2**, 155-164.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., and Meyer, T.F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol.Microbiol.* **42**, 631-644.
- Baron, C., O'Callaghan, D. & Lanka, E. (2002) Bacterial secrets of secretion processes. *Mol.Microbiol.* **43**, 1359-1365.
- Beaupré, C.E., Bohne, J., Dale, E.M. & Binns, A.N. (1997) Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J.Bacteriol.* **179**, 78-89.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P., Wandersman, C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters. *Gene* **192**, 7-11.
- Bizzozero, G. (1893) Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch.Mikr.Anat.* **42**, 82.
- Blaser, M.J. (1993) *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. *Trends.Microbiol.* **1**, 255-260.
- Blaser, M.J. & Parsonnet, J. (1994) Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J. Clin. Invest.* **94**, 4-8.
- Borén, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G. & Normark, S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**, 1892-1895.
- Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **41**, 459-472.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Cao, T.B., Saier, M.H., Jr. (2001) Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology* **147**, 3201-3214.

- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J.Mol.Biol.* **104**, 541-555.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I- specific and disease-associated virulence factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 14648-14653.
- Christie, P.J. (1997) The *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J.Bacteriol.* **179**, 3085-3094
- Christie, P.J. & Vogel, J.P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends.Microbiol.* **8**, 354-360.
- Churin, Y., Kardalidou, E., Meyer, T.F., and Naumann, M. (2001) Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection. *Mol.Microbiol.* **40**, 815-823.
- Conover, G.M., Derre, I., Vogel, J.P. & Isberg, R.R. (2003) The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol.Microbiol.* **48**, 305-321.
- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. & Rappuoli, R. (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**, 1328-1333.
- Covacci, A. & Rappuoli, R. (2000) Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J.Exp.Med.* **191**, 587-592.
- Craanen, M.E., Dekker, W., Blok, P., Ferwerda, J. & Tytgat, G.N. (1992) Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. *Gut.* **33**, 16-20.
- Crabtree, J.E., Xiang, Z., Lindley, I.J., Tompkins, D.S., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1995) Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J.Clin.Pathol.* **48**, 967-969.
- Crabtree, J.E., Kersulyte, D., Li, S.D., Lindley, I.J. & Berg, D.E. (1999) Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by *cag* PAI encoded VirD4 homologue. *J.Clin.Pathol.* **52**, 653-657.
- Czajkowsky, D.M., Iwamoto, H., Cover, T.L., and Shao, Z. (1999) The vacuolating toxin form *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Roc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 2001-2006.
- Das, A., Anderson, L.B. & Xie, Y.H. (1997) Delineation of the interaction domains of *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 by use of the yeast two-hybrid assay. *J.Bacteriol.* **179**, 3404-3409.
- Das, A., Xie, Y.H. (1998) Construction of transposon Tn3phoA: its application in defining the membrane topology of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer proteins. *Mol.Microbiol.* **27**, 405-414.
- Das, A. & Xie, Y.H. (2000) The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another. *J.Bacteriol.* **182**, 758-763.
- De Bernard, M., Moschioni, M., Napolitani, G., Rappuoli, R., and Montecucco, C. (2000) The VacA toxin of *Helicobacter pylori* identifies a new intermediate filament-interacting protein. *EMBO J.* **19**, 48-56.
- Dragneva, Y., Anuradha, C.D., Valeva, A., Hoffmann, A., Bhakdi, S., and Husmann, M., (2001) Subcytotoxic attack by staphylococcal alpha-toxin activates NF- κ B and induces interleukin-8 production. *Infect.Immun.* **69**, 2630-2635.
- Driessen, A.J., Manting, E.H., and van der Does, C. (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat.Struct.Biol.* **8**, 492-498.
- Drumm, B., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. & Sherman, P.M. (1990) Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N.Eng.J.Med.* **322**, 359-363.
- Dunn, B.E., Cohen, H. & Blaser, M.J. (1997) *Helicobacter pylori*. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**, 720-741.

- Eaton, K.E., Brooks, C.L., Morgan, D.R., und Krakowka, S. (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect.Immun.* **59**, 2470-2475.
- Ebel, F., Podzadel, T., Rohde, M., Kresse, A.U., Kramer, S., Deibel, C., *et al.* (1998) Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol.Microbiol* **30**, 147-161.
- Elitssur, Y., Adkins, L., Saeed, D. & Neace, C. (1999) *Helicobacter pylori* antibody profile in household members of children with *H. pylori* infection. *J.Clin.Gastroenterol.* **29**, 178-182.
- Engvall, E., Jonsson, K. & Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim.Biophys.Acta.* **251**, 427-434.
- Evans, D.J. Jr. *et al.*, (1995) Characterisation of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect.Immun.* **63**, 2213.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J.L & Earhart, C.F. (1973) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-laurylsarcosinate. *J.Bacteriol.* **115**, 717-722.
- Fischer, W., Schwan, D., Gerland, E., Erlenfeld, F.E., Odenbreit, S. & Haas, R. (1999) A plasmid-based vector system for the cloning and expression of *Helicobacter pylori* genes encoding outer membrane proteins. *Mol.Gen.Genet.* **262**, 501-507.
- Fischer, W., Buhrdorf R., Gerland, E. & Haas, R. (2001) Outer Membrane Targeting of Passenger Proteins by the Vacuolating Cytotoxin Autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect.Immun.*, **69** 6769-6775.
- Fetherston, J.D., Schuetze, P. & Perry, R. D. (1992) Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol.Microbiol.* **6**, 2693-2704.
- Foryst-Ludwig, A. & Naumann, M. (2000) p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *J.Biol.Chem.* **275**, 39779-39785.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazevielle, C., Michaux-Charachon, S. & O'Callaghan, D. (2000) Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect.Immun.* **68**, 1297-1303.
- Friedenauer, S., and Verlet, H.H. (1989) Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal.Biochem.* **178**, 263-268.
- Fullner, K:J. Lara, J.C., Nester, E.W. (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transfer genes. *Science* **273**, 1107-1109.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas R. (2003) *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Inhibits T Lymphocyte Activation. *Science* **301**, 1099-1102.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H., und Opferkuch, W. (1993) Ultrastructure and biochemical studies of *Helicobacter pylori* flagellar sheath. *J.Med.Microbiol.* **38**, 371-377.
- Genta, R.M., Hamner, H.W. & Graham, D.Y. (1993) Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum.Pathol.* **24**, 577-583.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Borén, T., Rad, R., Schepp, W., Miehke, S., Classen, M. & Prinz, C. (1999) Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 12778-12783.
- Gillessen, A., Shahin, M., Pohle, T., Foerster, E., Krieg, T.H., and Domschke W. (1995) Evidence of de novo collagen synthesis in healing human gastric ulcers. *Scand.J.Gastroenterol.* **30**, 515-518.
- Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., and Galan, J:E. (1994) Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* **76**, 717-724.

- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnel, W. & Harper, W.E.S. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **39**, 397-405.
- Haas, R., Kahrs, A.F., Facius, D., Allmeier, H., Schmitt, R. & Meyer, T.F. (1993a) TnMax -a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene* **130**, 23-31.
- Haas, R., Meyer, T.F. & van Putten, J.P. (1993b) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol.Microbiol.* **8**, 753-760.
- Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. & Goebel, W. (1990) Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb.Pathog.* **8**, 213-225.
- Hacker, J., Blum, O.G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol.Microbiol.* **23**, 1089-1097.
- Halter, R., Pohlner, J. & Meyer, T.F. (1984) IgA protease of *Neisseria gonorrhoeae*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *EMBO J.* **3**, 1595-1601.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, C., and Baron, C. (2000) VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation for VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **182**, 4505-4511.
- Harris, A.G., Hinds F.E., Beckhouse A. G., Kolesnikow T., Hazell S.L. (2002) Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated 'KatA-associated protein', KapA (HP0874). *Microbiology*, **148**, 3813-3825.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103.
- Hazell, S.L., Lee, A., Brady, L., und Hennessy, W. (1986) *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J.Infect.Dis.* **153**, 658-663
- Hazell, S.L., Evans, D.J.J. & Graham, D.Y. (1991) *Helicobacter pylori* catalase. *J.Gen.Microbiol.* **137** (Pt 1), 57-61.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2001) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**, 683-686.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamakzaki, S., Asaka, M., Azuma, T., and Hatakeyama, M. (2002) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 14428-14433.
- Henderson, I.R., Cappello, R., Nataro, J.P. (2000) Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. *TrendsMicrobiol.* **8**, 529-532.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., and Haas, R. (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol.Microbiol.* **41**, 379-391.
- Hoiczky, E. & Blobel, G. (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**, 4669-4674.
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* **114**, 193-197.
- IARC (1994) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans **61**. WHO, Lyon.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L. & Boren, T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**, 373-377.

- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V. & Christie, P.J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. *J.Bacteriol.* **185**, 2867-2878.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L. & He, S.Y. (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol.Microbiol.* **40**, 1129-1139.
- Josenhans, C., Eaton, K.A., Thevenot, T., and Suerbaum, S. (2000) Switching of flagellar motility in *Helicobacter pylori* by reversible length variation of a short homopolymeric sequence repeat in flIP, a gene encoding a basal body protein. *Infect.Immun* **68**, 4598-4603.
- Kahrs, A.F., Odenbreit, S., Schmitt, W., Heuermann, D., Meyer, T.F. & Haas, R. (1995) An improved TnMax mini-transposon system suitable for sequencing, shuttle mutagenesis and gene fusions. *Gene* **167**, 53-57.
- Kalkum, M., Eisenbrandt, R., Lurz, R., and Lanka, E. (2002) Tying rings for sex. *TrendsMicrobiol.* **10**, 382-387
- Kavermann, H., Burns, B.P., Angermüller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K., and Haas, R., (2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J.Exp.Med.* **197**, 813-822.
- Kawahara, T., Teshima, S. Oka, A. Sugiyama, T. Kishi, K. and Rokutan, K. (2001) Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates Toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect.Immun.* **69**, 4382-4389.
- Kersulyte, D., Chalkauskas, H. & Berg, D.E. (1999) Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol.Microbiol.* **31**, 31-43.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. & Frankel, G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* **17**, 2166-2176.
- Krall, L. *et al.* (2002) Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 11405-11410.
- Krause, S., Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F., and Lanka, E. (2000) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J.Bacteriol.* **182**, 2761-2770.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J.Mol.Biol.* **305**, 567-580.
- Kumar, R. B., Xie, Y.H., Das, A. (2000) Subcellular localization of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. *Mol.Microbiol.* **36**, 608-617
- Labigne, A., Cussac, V. & Courcoux, P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J.Bacteriol.* **173**, 1920-1931.
- Lee, C.A., Li, P., Inouye, H., Brickman, E.R., Beckwith, J. (1989) Genetic studies on the inability of b-galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J.Bacteriol.* **171**, 4609-4616.
- Lee, C.A., Fox, J., and Hazell, S. (1993) Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect.Immun.* **61**, 1601-1610.
- Lee, C.A. (1996) Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect.Agents Dis.* **5**, 1-7.
- Lee, S.K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.I., Suerbaum, S., Josenhans, C., (2003) *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *MicrobesInfect.* **5**, 1345-1356.
- Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., und Haas, R. (1992) Characterization of flaA, a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol.Microbiol.* **6**, 2863-2874.

- Li, S.D., Kersulyte, D., Lindley, I.J., neelam, B., Berg, D.E., and Crabtree, J.E. (1999) Multiple genes in the left half of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for tyrosine kinase-dependent transcription of interleukin-8 in gastric epithelial cells. *Infect.Immun.* **67**, 3893-3899.
- Liu, G., McDaniel, T.K., Falkow, S. & Karlin, S. (1999) Sequence anomalies in the Cag7 gene of the *Helicobacter pylori* pathogenicity island. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 7011-7016.
- Mahdavi, J., Sondén, V., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist, A., Hammarström, L., Borén, T. (2002) *Helicobacter pylori* SabA Adhesin in Persistent Infection and Chronic Inflammation. *Science* **297**, 573-578.
- Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori*-Von der Grundlage zur Therapie (Georg Thieme Verlag, Stuttgart).
- Manoil, C. (1991) Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and β -galactosidase gene fusions. *MethodsCellBiol.* **34**, 61-75
- Marshall, B.J. & Goodwin, C.S. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **37**, 68.
- Messing, J. & Vieira, J. (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments. *Gene* **19**, 269-276.
- Miller, J.H.: Assay of β -galactosidase. In: Experiments in Molecular Genetics, pp.352-355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1972.
- Mimuro, H., Suzuki, T., Tanaka, J., Asahi, M., Haas, R., and Sasakawa, C. (2002) Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol.Cell.* **10**: 745-755.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco C. (1998) Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J.Exp.Med.* **187**, 135-140.
- Montecucco, C., & de Bernard, M. (2003) Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Mic.Inf.* **5**, 715-721.
- Monteiro, M.A., Chan, K.H., Rasko, D.A., Taylor, D.E., Zheng, P.Y., Appelmelk, B.J., Wirth, H.P., Yang, M., Blaser, M.J., Hynes, S.O., Moran, A.P., Perry, M.B. (1998) Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharide and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol.Chem.* **273**, 11533-11543.
- Münzenmaier, A., Lange, C., Glocker, E., Covacci, A., Moran, A., Bereswill, S., Baeuerle, P.A., Kist, M. & Pahl, H.L. (1997) A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J.Immunol.* **159**, 6140-6147.
- Nagai, H. & Roy, C.R. (2001) The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J.* **20**, 5962-5970.
- Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A. & Roy, C.R. (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**, 679-682.
- Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R. & Meyer, T.F. (1999) Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island. *J.Biol.Chem.* **274**, 31655-31662.
- Neesen, J., Padmanabhan, S. & Bunemann, H. (1994) Tandemly arranged repeats of a novel highly charged 16-amino-acid motif representing the major component of the sperm-tail-specific axoneme-associated protein family Dhms101 form extended alpha-helical rods within the extremely elongated spermatozoa of *Drosophila hydei*. *Eur.J.Biochem.* **225**, 1089-1095.
- Nielsen, H., Birkholz, S., Andersen, L.P. & Moran, A.P. (1994) Neutrophil activation by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. *J.Infect.Dis.* **170**, 135-139.

- Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G. & Haas, R. (1999) Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol.Microbiol.* **31**, 1537-1548.
- Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. & Haas, R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**, 1497-1500.
- Odenbreit, S., Gebert, B., Püls, J., Fischer, W. & Haas, R. (2001) Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *CellMicrobiol.* **3**, 21-31.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y. & Omata, M. (2000) Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J.Exp.Med.* **192**, 1601-1610.
- Page, A-L., and Parsot, C. (2002) Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol.Microbiol.* **46**, 1-11.
- Pagliaccia, C., de Bernard, M., Lupetti, P., et al. (1998) The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 10212-10217.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H. & Friedman, G.D. (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N.Engl.J.Med.* **330**, 1267-1271.
- Peek, R.M.J., Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y., Krishna, U. & Pietsenpol, J.A. (1999) *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *CancerRes.* **59**, 6124-6131.
- Pelicic, V., Reyrat, J.M., Sartori, L., Pagliaccia, C., Rappuoli, R., Telford, J.L., Montecucco, C., and Papini E. (1999) *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology* **145**, 2043-2050
- Phadnis, S.H., Parlow, M.H., Levy, M., Ilver, D., Caulkins, C.M., Connors, J.B. & Dunn, B.E. (1996) Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect.Immun.* **64**, 905-912.
- Piotrowski, J., Piotrowski, E., Skrodzka, D., Slomiany, A. & Slomiany, B.L. (1997) Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Scand.J.Gastroenterol.* **32**, 203-211.
- Plano, G.V., Dady, J.B., Ferracci, F. (2001) Type II export: new uses for an old pathway. *Mol.Microbiol.* **40**, 284-293.
- Pohlner, J., Kramer, J. & Meyer, T.F. (1993) A plasmid system for high-level expression and *in vitro* processing of recombinant proteins. *Gene* **130**, 121-126.
- Püls, J., Fischer, W., and Haas, R. (2002) Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells. *Mol.Microbiol.* **43**, 961-969.
- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Backert, S. & Meyer, T.F. (2000) *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Mol.Microbiol.* **37**, 1389-1404.
- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D. & Meyer, T.F. (2000) *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. *Mol.Microbiol.* **38**, 103-113.
- Rektorschek, M., Weeks, D., Sachs, G. & Melchers, K. (1998) Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**, 628-641.
- Rektorschek, M., Buhmann, A., Weeks, D., Schwan, D., Bensch, K.W., Eskandari, S., Scott, D., Sachs, G. & Melchers, K. (2000) Acid resistance of *Helicobacter pylori* depends on the Urel membrane protein and an inner membrane proton barrier. *Mol.Microbiol.* **36**, 141-152.
- Rieder, G., Hatz, R.A., Moran, A.P., Walz, A., Stolte, M. & Enders, G. (1997) Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*- associated gastritis. *Infect.Immun.* **65**, 3622-3630.

- Ringner, M., Paulsson, M., Wadstrom, T. (1992) Vitronectin binding by *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **5**, 219-24.
- Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P., Sander, C. (1995) Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *ProteinSci.* **4**, 521-533.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salama, N.R., Otto, G., Tompkins, L., Falkow, S. (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect.Immun.* **69**, 730.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sandkvist, M. (2001) Biology of type II secretion. *Mol.Microbiol.* **40**, 271-283.
- Satin, B., Norais, N., Telford, J., Rappuoli, R., Murgia, M., Mentecucco, C., and Papini, E. (1997) Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J.Biol.Chem.* **272**, 25022-25028.
- Savvides, S.N., Yeo, H.J., Beck, M.R., Baesing, F., Lurz, R., Lanka, E., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R., and Waksman, G. (2003) VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J.* **22**, 1969-1980.
- Schlegel, H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart.* **7**, 58.
- Schmiederer, M. & Anderson, B. (2000) Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. *DNACellBiol.* **19**, 141-147.
- Schmitt, W. & Haas, R. (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol.Microbiol.* **12**, 307-319.
- Schmitt, W., Odenbreit, S., Heuermann, D. & Haas, R. (1995) Cloning of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and functional characterization of its product. *Mol.Gen.Genet.* **248**, 563-572.
- Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., Vergunst, A.C., Jurado Jacome, E. & Hooykaas, P.J. (2003) Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucl.AcidsRes.* **31**, 860-868.
- Schulte, R., and Autenrieth, I.B. (1998) *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect.Immun.* **66**, 1216-1224.
- Schulte, R., Grassl, G.A., Preger, S., Fessele, S., Jacobi, C.A., Schaller, M., Nelson, P.J. & Autenrieth, I.B. (2000) *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* **14**, 1471-1484.
- Scott, D.R., Weeks, D., Hong, C., Postius, S., Melchers, K. & Sachs, G. (1998) The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **114**, 58-70.
- Segal, E.D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L.S. & Falkow, S. (1997) Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 7595-7599.
- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S. & Tompkins, L.S. (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 14559-14564.
- Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer, T.F., and Backert, S. (2002) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* **22**, 515-528.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D. (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 2593-2597.
- Sieira, R., Comerci, D.J., Sanchez, D.O. & Ugalde, R.A. (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J.Bacteriol.* **182**, 4849-4855.

- Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E. & Kist, M. (1993) Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect.Immun.* **61**, 5315-5325.
- Stein, M., Rappuoli, R. & Covacci, A. (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 1263-1268.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J., and Covacci, A. (2002) C-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPYIA motifs. *Mol.Microbiol.* **43**, 971-980.
- Strebel, K., Beck, E., Strohmaier, K. & Schaller, H. (1986) Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion protein. *J.Virol.* **57**, 983-991.
- Stern, A., Brown, M., Nickel, P. & Meyer, T.F. (1986) Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell* **47**, 61-71.
- Su, B., Johansson, S., Fallman, M., Patarroyo, M., Granstrom, M. & Normark, S. (1999) Signal transduction-mediated adherence and entry of *Helicobacter pylori* into cultured cells. *Gastroenterology* **117**, 595-604.
- Su, B., Ceponis, P.J.M., Lebel, S., Huynh, H., and Sherman, P.M. (2003) *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect.Immun.* **71**, 3496-3502.
- Suerbaum, S., Josenhans, C. & Labigne, A. (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J.Bacteriol.* **175**, 3278-3288.
- Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E. & Zoratti, M. (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* **18**, 5517-5527.
- Tanahashi, T., Kita, M., Kodama, T., Yamaoka, Y., Sawai, N., Ohno, T., Mitsufuji, S., Wei, Y.P., Kashima, K. & Imanishi, J. (2000) Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infect.Immun.* **68**, 664-671.
- Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., Sasakawa, C. (2003) Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell.Microbiol.* **5**, 395-404.
- Teneberg, S., Miller-Podraza, H., H., Lampert, H.C., et al. (1997) Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J.Biol.Chem.* **272**, 19067-19071.
- Telford, J.L., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M.F., Censini, S., Covacci, A. & Xiang, Z. (1994) Gene structure of the *H. pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J.Exp.Med.* **179**, 1653-1658.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M. & Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.
- Tonello, F., Dundon, W.G., Satin, B., et al. (1999) The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol.Microbiol.* **34**, 238-246.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Trust, T.J., Doig, P., Emody, L., Kienle, Z., Wadstrom, T., O'Toole, P. (1991) High affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect.Immun.* **59**, 4398-4404.
- Tsuda, M., Karita, M., Mizote, T., Morshed, M.G., Okita, K. & Nakazawa, T. (1994) Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur. J. Gastroenterol.Hepatol.* **6 Suppl 1**, 49-52.

- Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J. & Hooykaas, P.J. (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**, 979-982.
- Walker, M.M. & Dixon, M.F. (1996) Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **10 Suppl 1**, 119-128.
- Ward, D.V. & Zambryski, P.C. (2001) The six functions of *Agrobacterium* VirE2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**, 385-386.
- Ward, D.V., Draper, O., Zupan, J.R. & Zambryski, P.C. (2002) Peptide linkage mapping of the *Agrobacterium tumefaciens* vir-encoded type IV secretion system reveals protein subassemblies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 11493-11500.
- Warren, J.R. & Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **i**: 1273-1275.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R. & Sachs, G. (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**, 482-485.
- Wessel, D. & Flügge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal.Biochem.* **138**, 141-143.
- Winans, S.C., Burns, D.L. & Christie, P.J. (1996) Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends.Microbiol.* **4**, 64-68.
- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P.F., Telford, J.L., Figura, N., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1995) Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect.Immun.* **63**, 94-98.
- Yeo, H.-J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E. & Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV system. *Mol.Cell.* **6**, 1461-1472.
- Yolken, R.H., Greenberg, H.B., Merson, M.H., Sack, R.B. & Kapikian, A.Z. (1977) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J.Clin.Microbiol.* **6**, 439-444.
- Zhao, Z., Sagulenko, E., Ding, Z., and Christie, P. (2001) Activities of *virE1* and the VirE1 secretion chaperone in export of the multifunctional VirE2 effector via an *Agrobacterium* type IV secretion pathway. *J.Bacteriol.* **183**, 3855-3865.
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O. & Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* **23**, 11-28.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich an keiner Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

München, Januar 2004

Renate Buhrdorf

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. K.H. Schleifer, Prof. Dr. R. Haas und Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Ermöglichung, Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Manfred Rohde, als sehr wichtiger Kooperationspartner, danke ich für seine Mikroskopiestudien, ohne die wir immer noch keine Ahnung hätten, wie die Oberfläche von *H. pylori* gestaltet ist.

Ein riesiger Dank geht an Dr. Wolfgang Fischer, Dr. Jürgen Püls und Dr. Imke Hansen-Wester, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir auch zuletzt mit ihrer kritischen Durchsicht des Manuskripts hervorragend halfen.

Allen „alten“ und „neuen“ Kollegen und Kolleginnen aus dem Labor: Holger, Klaus, Dirk, Brendan, Conny, Katrin, Sabine, Arno, Gaby, Herbert, Sarika, Marianne, Kirstin, Claudia, Luisa, Isabelle und Anja möchte ich danken, dass sie mir ein schönes Arbeitsklima geschaffen haben. Ein extra DANKE geht an Stefan, Evelyn, Kristin, Friedericke, Moni und Tina (Formatvorlage!) die während meiner gesamten Zeit am Pettenkofer-Institut ein offenes Ohr für mich hatten.

Ganz herzlich möchte ich mich noch am Schluss bei meinem Freund Thomas und meiner Mama bedanken, die immer für mich da gewesen sind.