

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

Die genetische Variabilität von *Helicobacter pylori*:
Identifizierung neuer Gene für die DNA-Aufnahme und
funktionelle Charakterisierung der Proteine

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

vorgelegt von
Johanna Maria Roßkopf
aus Regensburg

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Haas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gabriele Rieder
PD Dr. Dimitrios Frangoulidis

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Wolfgang Fischer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2023

Eidesstattliche Versicherung

Johanna Maria Roßkopf

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die genetische Variabilität von Helicobacter pylori: Identifizierung neuer Gene für die DNA-Aufnahme und funktionelle Charakterisierung der Proteine

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

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

Buckenhof, den 19.12.2024

Ort, Datum

Johanna Maria Roßkopf

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Das Bakterium <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.1.1 Entdeckung	7
1.1.2 Physiologie und Pathogenitätsfaktoren.....	7
1.1.3 Pathogenese von assoziierten Krankheiten.....	9
1.1.4 Diagnostik und Therapie von <i>Helicobacter pylori</i> -Infektionen	10
1.1.5 Epidemiologie.....	12
1.2 Genetische Variabilität von <i>Helicobacter pylori</i>	13
1.2.1 Merkmale der genetischen Variabilität von <i>H. pylori</i>	13
1.2.2 Geschichtliche Entwicklung von <i>H. pylori</i>	14
1.2.3 Horizontaler Gentransfer, Rekombination, Reparaturmechanismen und Restriktions-Modifikations-Systeme.....	14
1.2.3.1 Natürliche Transformation.....	16
1.2.3.2 Konjugation.....	19
1.2.3.3 Elektroporation	20
1.2.4 Kandidatengene des DNA-Aufnahmemechanismus von <i>H. pylori</i>	21
1.2.4.1 Kandidatengen <i>hp1473/hpp12_1451</i>	21
1.2.4.2 Kandidatengen <i>hp0506</i>	21
1.3 Transposon-Mutagenese.....	22
1.4 Zielsetzung.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Verwendete Bakterienstämme	24
2.1.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	24
2.1.1.2 <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme.....	24

2.1.2	Plasmide	26
2.1.3	Oligonukleotide	27
2.1.4	Antikörper.....	30
2.1.5	Nährmedien für Bakterien	30
2.1.6	Hemmstoffe und Medienzusätze	31
2.1.7	Enzyme und Proteine	31
2.1.8	Chemikalien	32
2.1.9	Lösungen und Puffer	32
2.1.10	Kommerziell erhältliche Kits	34
2.1.11	Molekulargewichtsmarker.....	34
2.1.12	Geräte und Apparaturen.....	34
2.1.13	Verbrauchsmittel	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	36
2.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	36
2.2.1.2	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Helicobacter pylori</i>	36
2.2.1.3	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien	36
2.2.1.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (Hanahan, 1983).....	36
2.2.1.5	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (Sambrook <i>et al.</i> , 2001).....	37
2.2.1.6	Transformation von <i>H. pylori</i>	37
2.2.1.7	Elektroporation von <i>H. pylori</i> (Segal und Tompkins, 1993).....	37
2.2.1.8	Konjugation von Plasmiden zwischen <i>H. pylori</i> -Stämmen.....	38
2.2.2	Genetische und molekularbiologische Methoden	39
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
2.2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>H. pylori</i>	39
2.2.2.3	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>H. pylori</i>	40
2.2.2.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	40
2.2.2.5	Restriktion von DNA	41
2.2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.2.7	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen..	42

2.2.2.8	Ligation von DNA.....	42
2.2.2.9	Sequenzierung von DNA	42
2.2.2.10	<i>In silico</i> Klonierung	43
2.2.2.11	EZ-Tn5-Transposonmutagenese.....	43
2.2.2.11.1	Erstellung des Transposons	43
2.2.2.11.2	<i>In vitro</i> -Transposition.....	43
2.2.2.11.3	<i>In vivo</i> -Transposition	44
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	44
2.2.3.1	Herstellung von Bakterienlysaten.....	44
2.2.3.2	Zellfraktionierung von <i>H. pylori</i> durch Ultraschall und Ultrazentrifugation.....	44
2.2.3.3	Proteinfällung (Wessel und Flügge, 1984)	45
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.2.3.5	Western-Blot.....	45
2.2.4	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Untersuchung des Kandidatengens <i>hpp12_1451</i>	47
3.1.1	Allgemeines zu <i>hpp12_1451</i> und <i>hp1473</i>	47
3.1.2	Erstellung der Deletionsmutante P12Δ <i>hpp12_1451</i>	49
3.1.3	Untersuchung der Deletionsmutante auf Transformationsfähigkeit.....	52
3.1.4	Komplementation des Gens <i>hpp12_1451</i>	52
3.1.4.1	Erstellen der Komplementationsplasmide pJR4, pJR5, pJR6 und pJR7	52
3.1.4.2	Einbringen der Komplementationsplasmide	55
3.1.5	Untersuchung der verschiedenen Mutanten bezüglich ihrer Transformationsfähigkeit	58
3.1.6	Untersuchung der Mutanten bezüglich Elektroporation	60
3.1.7	Untersuchung der Mutanten bezüglich Konjugation	61
3.1.8	Untersuchung des Proteins HPP12_1451	64
3.1.9	Untersuchung des Kandidatengens im Stamm PMSS1	66
3.2	Untersuchung des Kandidatengens <i>hp0506</i>	68
3.2.1	Allgemeines zu <i>hp0506</i>	68

3.2.2	Transformationseffizienz der Deletionsmutante P12 Δ hp0506	69
3.3	Versuch der Etablierung eines <i>in vivo</i> -Transposonmutagenese-Systems für <i>H. pylori</i>	73
3.3.1	Allgemeines zur Erstellung der <i>in vivo</i> -Transposonmutagenese-Datenbank ...	73
3.3.2	Suche nach einem Screeningverfahren von transformationsdefizienten Mutanten	75
3.3.3	Versuch der Etablierung einer <i>in vivo</i> -Transposonmutagenese-Datenbank.....	78
4	Diskussion	80
4.1	Beteiligung von <i>hpp12_1451</i> an der natürlichen Transformation	80
4.2	Beteiligung von <i>hp0506</i> an der natürlichen Transformation	85
4.3	Etablierungsversuch einer <i>in vivo</i> -Mutantenbank von <i>H. pylori</i>	88
4.3.1	Etablierungsversuch eines Screeningverfahrens transformationsdefizienter Mutanten von <i>H. pylori</i>	88
4.3.2	Etablierungsversuch der <i>in vivo</i> -Mutagenese in <i>H. pylori</i>	91
	Literaturverzeichnis	95
	Abkürzungsverzeichnis	105
	Abbildungsverzeichnis	107
	Tabellenverzeichnis	109
	Danksagung	110

Zusammenfassung

Für das Bakterium *H. pylori* ist eine hohe genetische Variabilität beschrieben. Diese Variabilität kommt durch die natürliche Transformationskompetenz, der Fähigkeit freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen, und einer hohen Rekombinationsrate zustande. Die genetische Vielfalt zeigt sich dadurch, dass das Bakterium sein Genom im Laufe einer Infektion verändert und an den Wirt anpasst, sodass jeder Mensch seinen eigenen *H. pylori*-Stamm besitzt (Suerbaum und Josenhans, 2007). Änderungen des Genoms bewirken z.B. Veränderungen der Oberflächenproteine oder die Aufnahme und Verbreitung von Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen (Dorer *et al.*, 2009). *H. pylori* besitzt zur DNA-Aufnahme das Typ-IV-Sekretionssystem ComB und unterscheidet sich mit seinem Transformationsmechanismus von anderen Bakterien (Hofreuter *et al.*, 2001). Weitere Gene und deren Proteine, die für den Transformationsmechanismus eine Rolle spielen, wurden bereits identifiziert, der vollständige Mechanismus der natürlichen Transformation ist jedoch noch nicht verstanden (Stingl *et al.*, 2010). Das Ziel dieser Arbeit war, neue Erkenntnisse über den Ablauf der natürlichen Transformation von *H. pylori* zu erwerben.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Kandidatengen *hpp12_1451/hp1473*, welches zu den konservierten Genen von *H. pylori* gehört, und sein Protein HPP12_1451/ComFC auf seine Beteiligung an der natürlichen Transformation untersucht. HPP12_1451 zeigte sich für den Erhalt der natürlichen Transformationskompetenz als essentiell. Zusätzlich war auch der Gentransfer über Konjugation und Elektroporation in die Deletionsmutante nicht möglich. Gegen eine ausschließliche Beteiligung von HPP12_1451 an der homologen Rekombination spricht, dass auch die Aufnahme von Shuttle-Plasmiden, die nicht ins Chromosom integrieren, nicht mehr möglich war. Weitere Ergebnisse dieser Arbeit, auch verglichen mit den Ergebnissen von Damke *et al.* (2022), sprechen für das Vorhandensein des Proteins im Cytoplasma und einer Assoziation mit der inneren Membran. Daraus kann die Vermutung aufgestellt werden, dass HPP12_1451 die aufgenommene DNA vor dem Abbau schützt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Kandidatengen *hp0506* und sein Protein auf seine Beteiligung am Transformationsmechanismus untersucht. HP0506, auch genannt HdpA oder Csd3, besitzt eine Endopeptidase-Aktivität, die zur lokalen Peptidoglykan-Hydrolyse führt und somit am Transport von DNA-Fragmenten eine Rolle spielen könnte (Bonis *et al.*, 2010). HP0506 zeigte sich in den Versuchen dieser Arbeit als nicht essentiell für die Transformation. Bei der Transformation eines kleineren Fragmentes in die Deletionsmutante war die Abnahme der Effizienz gegenüber dem Wildtyp nur gering ausgeprägt, während die Reduktion der Effizienz bei der Transformation eines größeren Fragmentes höher war. Dies kann als ein

Hinweis auf eine Beteiligung von HP0506 am Transformationsmechanismus, insbesondere bei der Aufnahme von größeren DNA-Fragmenten, gesehen werden. Dieser Effekt kann jedoch auch durch das langsamere Wachstum und die Formveränderung der Deletionsmutante erklärt werden (Bonis *et al.*, 2010), sodass weitere Experimente und Untersuchungen benötigt werden, um die Beteiligung von HP0506 am Transformationsmechanismus nachzuweisen.

Um weitere Gene von *H. pylori* zu identifizieren, die am Mechanismus der natürlichen Transformation beteiligt sind, sollte eine *in vivo*-Mutantenbank erstellt werden, in der jedes Gen mit dem jeweiligen Defekt abgebildet wird. Der Versuch, das EZ-Tn5-Mutagenesesystem für die *in vivo*-Mutagenese zu etablieren, war nicht erfolgreich. Ein Erklärungsansatz hierfür sind die verschiedenen Restriktions-Modifikations-Systeme von *H. pylori*, die die Aufnahme von DNA beeinflussen können.

Um die transformationsdefizienten Mutanten zu identifizieren, sollte das Screeningverfahren von *C. jejuni* (Wiesner *et al.*, 2003) an *H. pylori* angepasst werden. Eine geeignete Antibiotikaresistenzkassette, die notwendige DNA-Menge und die passende Inkubationsdauer der Bakterien wurden für *H. pylori* gefunden, wobei keine ausreichende Effizienz des Systems erreicht werden konnte. Somit kann das Screeningverfahren zwar zur Vorselektion von transformationsdefizienten Mutanten verwendet werden, jedoch müssen solche Mutanten in nachfolgenden Schritten durch einzelne Transformationsexperimente bestätigt werden.

Die verschiedenen einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit liefern so einen Beitrag zu einem besseren Verständnis über den Transformationsmechanismus von *H. pylori*.

1 Einleitung

1.1 Das Bakterium *Helicobacter pylori*

1.1.1 Entdeckung

Im Jahr 1984 veröffentlichten B.J. Marshall und J.R. Warren die Entdeckung des Bakteriums *Campylobacter pyloridis* im menschlichen Magen (Marshall und Warren, 1984). 1989 wurde es als neue Spezies in *Helicobacter pylori* umbenannt (Goodwin *et al.*, 1989). Bereits zuvor wurde mehrfach von spiralförmigen Bakterien in Biopsien im Zusammenhang mit gastroduodenalen Ulzera berichtet. Jedoch wurde angenommen, dass der Magen aufgrund seiner Azidität kein Lebensraum für Bakterien sein kann und die Funde wurden für Verunreinigungen gehalten. Marshall und Warren gelang erstmalig die Kultur des Bakteriums aus Biopsien von Patienten mit chronischer Gastritis. Im Selbstversuch wurden die „Koch’schen Postulate“ erfüllt, indem Marshall eine hohe Anzahl an *Helicobacter pylori*-Bakterien oral zu sich nahm. Als Folge entwickelte er eine aktive Gastritis und konnte diese durch die Einnahme eines Antibiotikums therapieren (Marshall *et al.*, 1985). Aufgrund der Bedeutung für die Entstehung von Gastritis, gastroduodenalen Ulzera und Magenkarzinomen, beschrieben durch das *National Institute of Health*, wurde *Helicobacter pylori* von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Klasse I Karzinogen eingestuft (NIH, 1994). Letztendlich wurden Warren und Marshall im Jahr 2005 für ihre Forschungen mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

1.1.2 Physiologie und Pathogenitätsfaktoren

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, mikroaerophiles, stäbchenförmiges Bakterium, welches im menschlichen Magen lebt und zur Familie der Helicobacteraceae, Ordnung der Campylobacterales und Klasse der ϵ -Proteobakterien gehört.

Das Bakterium *H. pylori* ist 2,5 – 4,0 μm lang, 0,5 – 1 μm breit und spiralförmig gebogen. Bei zu langer Kultivierung oder dem Einfluss ungünstiger Umweltbedingungen, wie Nährstoffmangel, Austrocknung und Kontakt mit antimikrobiellen Wirkstoffen, kann *H. pylori* eine kokkoide Form annehmen. Hier wird die Stoffwechselaktivität des Bakteriums zwar aufrechterhalten, jedoch ist es nicht mehr kultivierbar (Goodwin und Armstrong, 1990; Quaglia und Dambrosio, 2018).

Die optimalen Wachstumsbedingungen für den mikroaerophilen und kapnophilen Organismus liegen bei einem Sauerstoffgehalt zwischen 2 und 5 %, einem Kohlenstoffdioxidgehalt zwischen 5 und 10 % und einer Temperatur von 37 °C. Der pH-Wert sollte zwischen 4,5 und 7,3 liegen, wobei das Optimum für das Wachstum 5,5 beträgt (Kusters *et al.*, 2006; Quaglia und Dambrosio, 2018). Nachdem *H. pylori* selbst nicht säurefest ist, hat sich das Bakterium

mit verschiedenen Mechanismen an die saure Umgebung im menschlichen Magen angepasst. Die Motilität des Bakteriums wird durch seine Spiralf orm und 2 bis 6 unipolare Flagellen, bestehend aus Flagellinen FlaA und FlaB, ermöglicht. Hierdurch ist *H. pylori* in der Lage, in die Mukusschicht, die dem Magenepithel aufliegt und vor der Magensäure schützt, einzudringen. Die Motilität von *H. pylori* ist ein essentieller Faktor für die Kolonisierung (Eaton *et al.*, 1996). Die Orientierung erfolgt chemotaktisch über den pH-Gradient (Schreiber *et al.*, 2004). Des Weiteren besitzt *H. pylori* das Enzym Urease, das Harnstoff aus dem Magensaft in Kohlenstoffdioxid und Ammoniak umsetzt, und so die Säure in der Umgebung des Bakteriums neutralisiert ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$). Der Harnstofftransport in die Zelle wird dabei über einen Protonen-abhängigen Kanal reguliert (Dunn und Phadnis, 1998). Die Urease wurde ebenso als essentiell für die Kolonisierung (Eaton *et al.*, 1991; Kavermann *et al.*, 2003) beschrieben.

Weitere Enzyme von *H. pylori* sind die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase, die der Neutralisation von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, freigesetzt durch neutrophile Granulozyten und das mononukleäre Phagozytensystem, dienen (Goodwin und Armstrong, 1990).

Verschiedene Oberflächenproteine von *H. pylori* (OMPs - *outer membrane proteins*) ermöglichen die Adhäsion an die Epithelzellen des Magens. Zu den wichtigsten Adhäsinen gehören AlpA, AlpB, BabA, SabA, HopZ und HopQ (Odenbreit *et al.*, 2009).

Ein Teil der *H. pylori*-Stämme besitzt in seinem Genom eine sogenannte *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) mit einer Größe von ca. 37 kBp. Dieser Abschnitt codiert unter anderem ein Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) und das Cytotoxin-assoziierte Gen A (CagA). Durch das Sekretionssystem wird das Protein CagA in die Wirtszelle transloziert und dort aufgrund seiner EPIYA-Motive, welche in Art und Anzahl variieren können, phosphoryliert (Odenbreit *et al.*, 2000; Fischer, 2011). Es sind insgesamt über 25 verschiedene Wege bekannt, wie die unterschiedlichen Formen des CagA in den Stoffwechsel der Wirtszelle eingreifen können. Dies führt in der Wirtszelle unter anderem zu einer proinflammatorischen Antwort, Stimulierung der Zellproliferation, Änderung der Zellverbindungen, Zellpolarität, Veränderungen des Zellzyklus und einer sowohl anti-apoptischen als auch proapoptischen Wirkung (Backert und Blaser, 2016). *H. pylori*-Stämme, die die *cag*-PAI enthalten, werden als sogenannte Typ-I-Stämme bezeichnet und sind stärker mit *H. pylori*-bedingten Gastroduodenalkrankheiten assoziiert, als Stämme ohne *cag*-PAI (Typ-II-Stämme) (Covacci *et al.*, 1997). Weltweit besitzen ca. 60 % der *H. pylori*-Stämme die *cag*-PAI, wobei die Verteilung geographisch sehr unterschiedlich ausfällt. Eine fast vollständige Präsenz findet sich in Ostasien, dagegen fehlt sie in bestimmten afrikanischen Gruppen (Hatakeyama, 2014). Ein weiterer Pathogenitätsfaktor ist das sogenannte *VacA* (*vacuolating cytotoxin*). Das codierende Gen *vacA* ist in allen *H. pylori*-Stämmen vorhanden, was darauf hindeutet, dass

es eine wichtige Rolle in der Kolonisierung oder Persistenz spielt. VacA ist in der Lage, an der Wirtszelle zu binden und anionenselektive Kanäle in die Zellmembran zu formen, was zur Bildung von Vakuolen aus endosomalen Kompartimenten führt (Cover *et al.*, 1990). Des Weiteren bewirkt VacA eine Änderung der Membranpermeabilität in Mitochondrien, die in Zusammenhang mit Schäden des Zellzyklus und Apoptose der Wirtszelle gebracht wird. Auch wird die Produktion von IL-2 inhibiert, wodurch die Lebensfähigkeit und Proliferation von T-Lymphozyten beeinträchtigt wird. Zusätzlich werden verschiedene proinflammatorische Signalwege aktiviert, z.B. durch die Produktion von Zytokinen, wie TNF- α und IL-6 durch Mastzellen, oder der Cyclooxygenase-2 durch neutrophile Granulozyten (Cover und Blanke, 2005).

1.1.3 Pathogenese von assoziierten Krankheiten

Die akute Infektion durch *H. pylori* verursacht unspezifische Symptome, die in Form von Übelkeit, Erbrechen, Völlegefühl und Oberbauchbeschwerden auftreten können. Im Verlauf entwickelt sich eine chronisch-aktive Gastritis, die histologisch aus einer Ansammlung von Plasmazellen, Granulozyten und Lymphozyten besteht und in 80 bis 90 % der Fälle keine Symptome aufweist (Suerbaum und Michetti, 2002). Die weitere Entwicklung der chronischen Gastritis, die aufgrund der bakteriellen Infektion als B-Gastritis bezeichnet wird, ist einerseits abhängig vom Säuregehalt im Magen des Patienten, andererseits auch von Umweltfaktoren, Virulenzfaktoren des Stammes und genetischen Faktoren des Wirtes (Atherton, 2006). Bei übermäßiger oder normaler Säuresekretion findet die Kolonisierung insbesondere im Magenantrum statt, da hier die Säure-produzierenden Parietalzellen in geringerer Anzahl ausgeprägt sind. Die Folge davon ist eine Antrumgastritis, deren mögliche Komplikation das Duodenalulkus ist.

Ein geringerer Säuregehalt führt dagegen zu einer Infektion des gesamten Magens, der sogenannten Pangastritis, die mit einem erhöhten Risiko für ein Magenulkus, häufig an der kleinen Kurvatur des Magens, einhergeht (Kusters *et al.*, 2006). Im Gegensatz zum Duodenalulkus, das meistens mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert ist, kommen für das Magenulkus auch andere Ursachen, wie z.B. die Einnahme von NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) in Betracht.

Durch die Chronifizierung der Gastritis im Corpus kann es zum Verlust von Parietalzellen kommen, wodurch die Säureproduktion im Magen weiter abnimmt. Diese Entwicklung wird atrophische Gastritis genannt. Als Folge steigt das Risiko, dass über die intestinale Metaplasie und Dysplasie ein Adenokarzinom des Magens entsteht.

Insgesamt besteht für *H. pylori*-infizierte Patienten ein Risiko von 10 bis 20 % für die Entwicklung von Ulzera und von 1 bis 2 % für Magenkarzinome (Kusters *et al.*, 2006). Die Inzidenz der Magenkarzinome ist somit mit der Prävalenz von *H. pylori*-Infektionen verknüpft,

wobei auch die verschiedenen Formen der Virulenzfaktoren CagA und VacA eine Rolle spielen, sodass die ostasiatischen Stämme eine stärkere Pathogenität besitzen (Suzuki und Mori, 2016). In den Industrieländern werden 60 bis 80 % der Magenkarzinome mit dem dauerhaften Vorhandensein von *H. pylori* in Verbindung gebracht (Kusters *et al.*, 2006). Eine weitere Komplikation ist das gastrale MALT-Lymphom (*mucosa associated lymphoid tissue*), ein Non-Hodgkin-Lymphom. Es ist in ca. 90 % der Fälle mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert (Eidt *et al.*, 1994). In Abbildung 1.1 sind die verschiedenen Entstehungswege der Folgekrankheiten von *H. pylori* dargestellt

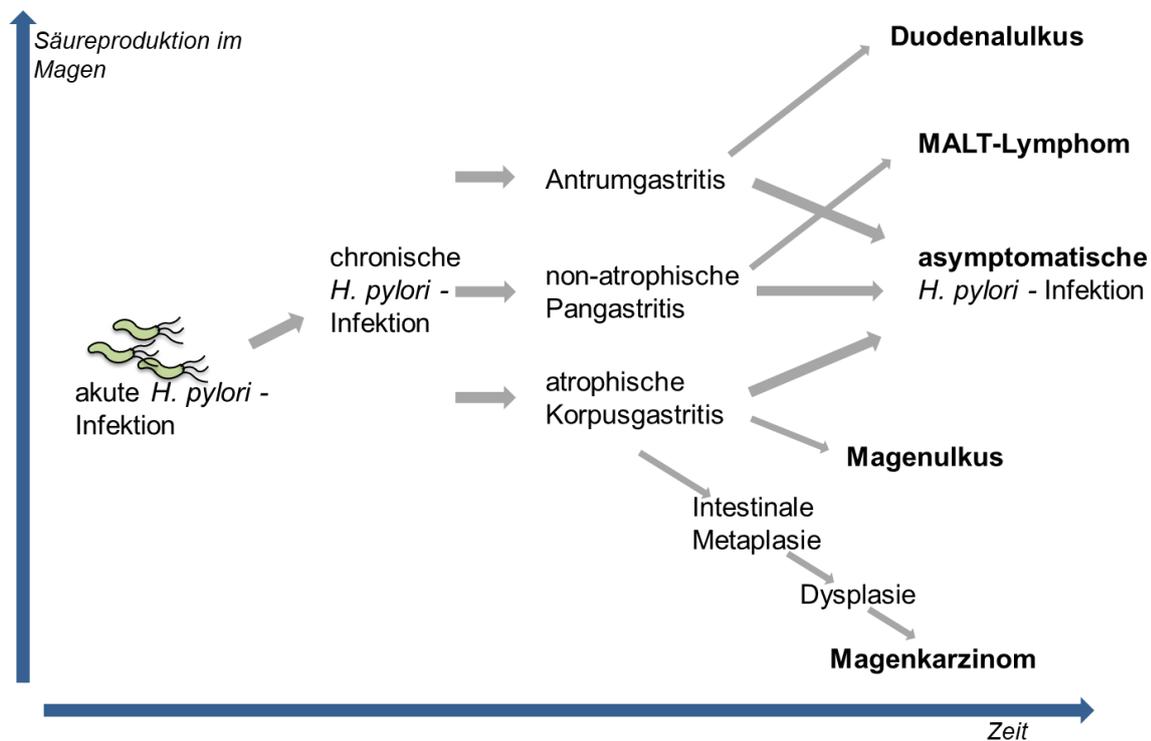


Abbildung 1.1: Entwicklung von *H. pylori*-assoziiierter Krankheitsverläufe

Die Abbildung zeigt die Folgekrankheiten im Verlauf der Zeit und Abhängigkeit der Magensäureproduktion (modifiziert nach Suerbaum und Michetti (2002)).

1.1.4 Diagnostik und Therapie von *Helicobacter pylori*-Infektionen

Zur Diagnostik von *Helicobacter pylori*-Infektionen stehen sowohl invasive Tests, welche im Voraus eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie mit Probenentnahme benötigen, als auch nicht-invasive Tests zur Verfügung. Als invasive Testungen dienen die kulturelle Anzucht von *H. pylori* aus der entnommenen Schleimhaut, der histologische Nachweis, der Urease-Schnelltest und die PCR als Nachweis von *H. pylori*-Bakterien. Die nicht-invasiven Tests bestehen aus dem Harnstoff-Atemtest, dem Stuhl-Antigentest und dem

IgG-Antikörpernachweis im Serum (Fischbach *et al.*, 2017). Welche Tests durchgeführt werden, ist von der jeweiligen klinischen Situation abhängig. Zur nicht-invasiven Diagnosestellung und zum Nachweis einer erfolgreichen Eradikation eignen sich insbesondere der Stuhl-Antigentest und der Harnstoff-Atemtest, der auf Kohlendioxid in der Atemluft reagiert. Die Urease von vorhandenen *H. pylori*-Bakterien spaltet dabei den Harnstoff in Kohlendioxid und Ammoniak. Die endoskopische Untersuchung mit invasiven Tests sollte bei Symptomen mit Alarmsignalen, wie Anämie, gastrointestinale Blutungen und Gewichtsverlust, oder bei einem Alter über 50 erfolgen. Die kulturelle Anzucht ist am aussagekräftigsten und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Resistenztestung, die spätestens bei Therapieversagen durchgeführt werden sollte (Suerbaum und Michetti, 2002; Fischbach und Malfertheiner, 2018).

In den aktuellen nationalen und internationalen Empfehlungen wird eine *H. pylori*-Infektion als Erkrankung des Magens anerkannt und der pathogene Charakter des Bakteriums betont. Die aktuelle deutsche Leitlinie besagt deshalb, dass jede diagnostizierte *H. pylori*-Infektion eine Indikation zur Eradikationstherapie darstellt. Des Weiteren wird empfohlen, dass vor der Diagnostik die Entscheidung für eine mögliche Eradikationstherapie erfolgen sollte. Beispiele zur Indikation einer Eradikationstherapie nach positiver Testung sind dyspeptische Beschwerden, ein peptischer Ulkus ventrikuli oder duodeni, eine symptomatische Gastritis, die idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP), das MALT-Lymphom oder bei erhöhtem Risiko für eine Ulkuskrankheit eine geplante Dauertherapie mit ASS, NSAR oder Antikoagulation (Fischbach *et al.*, 2022).

Die Effizienz der Eradikationstherapie hat in den letzten Jahren aufgrund der Zunahme an Antibiotikaresistenzen abgenommen. Für die Tripeltherapie, bestehend aus einem Protonenpumpeninhibitor (PPI) und Clarithromycin mit Metronidazol (italienisches Schema) oder Amoxicillin (französisches Schema) über 7 – 14 Tage, lag die Effizienz unter 80 % (Kim *et al.*, 2015). Savoldi *et al.* (2018) beschreiben in ihrem Übersichtsartikel, dass in Europa eine Clarithromycinresistenz von 32 % und eine Metronidazolresistenz von 38 % besteht. Des Weiteren berichten sie von einem Anstieg der Resistenzen in den letzten 20 Jahren. In Deutschland wurden Resistenzen von 23 % für Clarithromycin und 34 % für Metronidazol für den Zeitraum 2009-2015 berichtet (Regnath *et al.*, 2017).

Als Folge der abnehmenden Effizienz der Tripeltherapie wurden die Therapieempfehlungen im Rahmen der Aktualisierung der Leitlinie geändert: Als Erstlinientherapie wird nun eine Bismut-haltige Quadrupeltherapie, bestehend aus PPI, Bismut-Kalium-Salz, Tetracyclin und Metronidazol, für mindestens 10 Tage empfohlen.

Bei Therapieversagen sollte eine Resistenztestung durchgeführt werden. Im Anschluss sollte dann als Zweitlinientherapie eine testgerechte Standardtripeltherapie (italienisches oder französisches Schema) oder eine Fluorchinolon-Tripeltherapie (PPI, Amoxicillin und Levofloxacin oder Moxifloxacin) verwendet werden. Bei weiterem Versagen sollte die Therapie nach erneuter Resistenztestung durch einen Spezialisten bestimmt werden (Fischbach *et al.*, 2022).

1.1.5 Epidemiologie

Ungefähr die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* infiziert, wobei sich die Prävalenz in verschiedenen Regionen stark unterscheidet. Insbesondere weisen Entwicklungsländer mit bis zu über 80 % Infizierten höhere Raten auf als Industrienationen mit 20-50 % (Suerbaum und Michetti, 2002; Peleteiro *et al.*, 2014). Als Ursache werden ein niedriger sozioökonomischer Status, Familiengröße und Hygienefaktoren angegeben (Malaty und Graham, 1994).

Die Prävalenz von *H. pylori* ist in Deutschland mit 35 % verhältnismäßig niedrig (Fischbach *et al.*, 2022). Der genaue Übertragungsmechanismus dieses Bakteriums ist noch nicht geklärt. Angenommen wird jedoch eine oral-orale oder fäkal-orale Übertragung von Mensch-zu-Mensch (Feldman *et al.*, 1998). *H. pylori* konnte aus Erbrochenem, Speichel und Stuhlproben kultiviert werden (Parsonnet *et al.*, 1999). Die Infektion erfolgt meist im frühen Kindesalter innerhalb der Familie, besonders die vertikale Übertragung von Mutter auf Kind scheint eine wichtige Rolle zu spielen (Weyermann *et al.*, 2009). Hierfür spricht die stärkere genetische Übereinstimmung der *H. pylori*-Stämme zwischen Mutter und Kind als zwischen Geschwistern oder Vater und Kind (Han *et al.*, 2000). *H. pylori* wurde auch in Wasser und auf Lebensmitteln nachgewiesen, eine Infektion über diese Wege wird diskutiert (Quaglia und Dambrosio, 2018).

1.2 Genetische Variabilität von *Helicobacter pylori*

1.2.1 Merkmale der genetischen Variabilität von *H. pylori*

Fast jeder infizierte Mensch hat seinen eigenen *H. pylori*-Stamm (Suerbaum und Josenhans, 2007). Somit gehört *H. pylori* zu den genetisch vielfältigsten Bakterien. Die Grundlagen der hohen genetischen Variation sind die natürliche Transformationskompetenz, was die Fähigkeit zur Aufnahme freier DNA aus der Umgebung bedeutet, eine hohe Rekombinationsaktivität und eine hohe Mutationsrate.

Das Genom von *H. pylori* 26695 wurde 1997 als erster Stamm durch das *Institute for Genomic Research* sequenziert. Der Stamm besitzt 1 667 867 Basenpaaren und es wurden 1 590 Gene vorausgesagt (Tomb *et al.*, 1997).

Die genetische Vielfalt kann in die Mikrodiversität und die Makrodiversität unterteilt werden. Die Mikrodiversität beschreibt dabei den Unterschied der Sequenzen der einzelnen Gene zwischen den Stämmen. Der Grund hierfür wird der Mutation und der häufigen Rekombination zwischen den einzelnen Allelen zugeschrieben. Die Makrodiversität hingegen umfasst die unterschiedliche Anordnung von Genen und das Vorhandensein von verschiedenen Genen. Ursächlich sind z.B. Translokationen, Inversionen und wiederum die Rekombination (Jiang *et al.*, 1996; Suerbaum *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2001a). Der *H. pylori*-Stamm J99 besitzt ca. 6 – 7 % stammspezifische Gene im Vergleich zum Stamm 26695. Des Weiteren wurden Sequenzhomologien zwischen Plasmid und Chromosom beschrieben, was für einen genetischen Austausch spricht (Alm *et al.*, 1999).

Nach der Infektion eines Menschen passt sich der *H. pylori*-Stamm seinem Wirt an und verändert sich im Laufe der Zeit. Jeder Mensch besitzt somit seinen eigenen Stamm und es besteht eine genetische Varianz eines Stammes zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Israel *et al.*, 2001; Suerbaum und Josenhans, 2007).

Zusätzlich kann ein Mensch mit mehreren Stämmen gleichzeitig infiziert sein. Durch die Co-Infektion mit anderen Stämmen wird der genetische Austausch weiter gefördert und es werden neue Allele gebildet (Suerbaum *et al.*, 1998). Innerhalb von Familien wurde eine starke genetische Ähnlichkeit der *H. pylori*-Stämme aufgefunden, was für eine familiäre Übertragung und die genetische Weiterentwicklung der einzelnen Stämme spricht (Schwarz *et al.*, 2008).

Die genetischen Änderungen des Genoms sind abhängig von der Mutationsrate, der Rekombinationsrate und der Größe der DNA-Fragmente, die in das Genom aufgenommen werden. In der Zusammenschau führt die ungewöhnliche Aufnahme von kurzen DNA-Fragmenten zusammen mit der hohen Rekombinationsfrequenz zu Mosaikstrukturen und zu spezifischen Allelen jedes einzelnen Genes und damit zu einzigartigen Stämmen der einzelnen Patienten (Kraft und Suerbaum, 2005).

Der horizontalen DNA-Transfer ist der Grund für Erscheinungen, wie beispielsweise die Anpassung an den Wirt und die Verbreitung von Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen (Dorer *et al.*, 2009).

1.2.2 Geschichtliche Entwicklung von *H. pylori*

Moodley *et al.* (2012) gehen davon aus, dass das Bakterium *H. pylori* die Menschheit seit ca. 100 000 Jahren begleitet. Durch die stetige Veränderung der Gene von *H. pylori* und der daraus resultierenden hohen genetischen Variabilität konnte auf Völkerwanderungen der Menschheit, z.B. die Bewegung aus Afrika vor 58 000 Jahren (Linz *et al.*, 2007), rückgeschlossen werden (Falush *et al.*, 2003; Suerbaum und Josenhans, 2007). Auch in der Gletschermumie „Ötzi“, die vor ca. 5300 Jahren lebte, wurde *H. pylori* nachgewiesen und dessen Genom rekonstruiert, welches auf einen asiatischen Bakterienstamm hindeutet (Maixner *et al.*, 2016). Aktuelle genetische Stammbäume zeigen eine enge Verwandtschaft der *H. pylori*-Stämme aus den gleichen geographischen Regionen (Fischer *et al.*, 2014)

1.2.3 Horizontaler Gentransfer, Rekombination, Reparaturmechanismen und Restriktions-Modifikations-Systeme

Die horizontale Genübertragung bei Bakterien kann grundsätzlich über die Mechanismen der natürlichen Transformation, Konjugation und Transduktion erfolgen. Die beiden Wege, natürliche Transformation und Konjugation bei *H. pylori*, werden in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert.

Die Transduktion beschreibt die Übertragung von DNA über Bakteriophagen. Inwieweit dies bei *H. pylori* eine Rolle spielt, ist eine aktuelle Forschungsfrage. Es sind mehrere Phagen in *H. pylori* beschrieben und verschiedene Sequenzen von Prophagen, die im Genom des Bakteriums *H. pylori* integriert sind, identifiziert worden (Taylor und Rose, 1988; Fernandez-Gonzalez und Backert, 2014).

Des Weiteren kann über die Elektroporation, ein technisches Verfahren, DNA in eine Zelle eingebracht werden. Auf dieses Verfahren wird in einem der nachfolgenden Abschnitte (s. Abschnitt 1.2.3.3) näher eingegangen.

Die verschiedenen Mechanismen des horizontalen Gentransfers sind abhängig von der Rekombination. Aufgenommene DNA wird durch homologe Rekombination entweder ins Chromosom inseriert oder als Plasmid-DNA vervielfältigt. Die homologe Rekombination ist somit an der genetischen Vielfalt eines Stammes beteiligt, stellt jedoch auch eine genetische Barriere zwischen zwei Spezies dar, da eine ausreichende Homologie der Allele benötigt wird.

Des Weiteren spielt die Rekombination auch eine wichtige Rolle für die DNA-Reparatur oder nach der Replikation von DNA (Fischer *et al.*, 2001a).

Der genaue Ablauf der homologen Rekombination in *H. pylori* wurde noch nicht vollständig nachgewiesen, es wird ein mehrstufiges System angenommen (Ailloud *et al.*, 2022). Die aufgenommene Einzelstrang-DNA (ssDNA) wird mit RecA (Schmitt *et al.*, 1995) und DprA (Smeets *et al.*, 2000) beladen. In Folge formt sich ein präsynaptischer Komplex, der entlang des Doppelstranges nach der Sequenzhomologie sucht und nach Zugriff auf die Zielsequenz eine Verdrängungsschleife (D-Loop) bildet. Die Seitenarme der Schleife werden über Replikation und dem Austausch der Basenpaare der homologen DNA-Stränge (*branch migration*), vermittelt durch die Helikase RecG, erweitert. Aufgelöst wird der Verbindungspunkt (*holliday junction*) von der Endonuklease RuvC (Dorer *et al.*, 2011; Ailloud *et al.*, 2022)

H. pylori-Mutanten, in welchen *recA* deletiert wurde, zeigten einen Defekt im Transformationsmechanismus und der DNA-Reparatur. Chromosomale DNA und Plasmid-DNA, die ins Genom integriert, konnte nicht transformiert werden, während die Aufnahme von Shuttle-Plasmiden weiterhin möglich war (Schmitt *et al.*, 1995).

Über die chromosomale Integration nach natürlicher Transformation ist eine bimodale Verteilung der DNA-Längen bekannt. Die durchschnittlichen Längen der importierten DNA-Abschnitte betragen 28 Basenpaare bzw. 1645 Basenpaare (Bubendorfer *et al.*, 2016).

Für die erfolgreiche Transformation und Rekombination von Antibiotikaresistenzkassetten wird angenommen, dass flankierende Bereiche mit einer Größe von ca. 150 Basenpaaren ausreichend sind. Für Antibiotikaresistenzen mit Punktmutation genügen 5 Basenpaare (Lin *et al.*, 2009).

Bakterielle DNA-Reparaturmechanismen sind nötig, um DNA-Schäden wie Fehler der Struktur, Mismatch oder Doppelstrangbrüche z.B. durch äußere Faktoren oder in Folge der Replikation zu beheben. Für *H. pylori* wurden verschiedene Reparaturmechanismen identifiziert, z.B. das Basen-Exzisions-Reparatur-System (BER) und das Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System (NER). Auffällig ist, dass bekannte Reparatursysteme von *E. coli* in *H. pylori* fehlen, wie beispielsweise das Mismatch-Reparatur-System (MMR mit den Genen *mutH*, *mutS*, *mutL*) oder das *very-short-patch-repair*-System (VSR) (Fischer *et al.*, 2001a; Kraft und Suerbaum, 2005).

Auf die Schädigung seiner DNA reagiert *H. pylori* des Weiteren mit der Transkription und Translation von Genen der natürlichen Kompetenz (s. Abschnitt 1.2.3.1), wie das Typ-IV-Sekretionssystem ComB. Dies führt zu einer Steigerung der Transformationsfrequenz. Daneben setzt *H. pylori* ein Lysozym-ähnliches Protein frei, was die DNA-Freisetzung aus anderen *H. pylori*-Zellen fördert. Bei der gleichzeitigen Infektion mit verschiedenen Stämmen kann die DNA-Schädigung zu einer Steigerung des genetischen Austausches und einer

Neuanordnung der Allele führen. Dies könnte z.B. zu einer Verbreitung von Antibiotikaresistenzen führen (Dorer *et al.*, 2010).

H. pylori besitzt verschiedene Restriktions-Modifikations-Systeme (R-M-Systeme), die in den unterschiedlichen Bakterienstämmen variieren und eine große Vielfalt an Modifikationsmustern der chromosomalen DNA generieren. R-M-Systeme bestehen aus einer Restriktionsendonuklease, die spezifische Genomsequenzen erkennt und spaltet, und einer Methyltransferase, die die eigene DNA methyliert und dadurch vor dem Abbau schützt. (Ando *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2000). R-M-Systeme behindern die genomische Integration von neuen (heterologen) Sequenzen, während der Import von homologer DNA, unabhängig von ihrem Methylierungsgrad, nicht limitiert wird (Bubendorfer *et al.*, 2016). Jedoch konnte gezeigt werden, dass nach *in vitro*-Methylierung die Transformationsraten von verschiedenen Plasmiden gesteigert werden konnten (Zhao *et al.*, 2018).

Experimentell gab es unterschiedliche Transformationsraten. Plasmid-DNA, die aus dem gleichen Stamm isoliert wurde, war deutlich besser zu transformieren, als Plasmid-DNA eines anderen Stammes, sodass die R-M-Systeme als Kontrollmechanismus der natürlichen Transformation angenommen wurden (Wang *et al.*, 1993).

1.2.3.1 Natürliche Transformation

Die natürliche Kompetenz ist die Fähigkeit, DNA aus der Umgebung aufzunehmen und zu rekombinieren. Der Begriff der natürlichen Transformation beschreibt die genetische Änderung des Bakteriums, die durch die natürliche Kompetenz verursacht wurde. Für *H. pylori* wurde die natürliche Transformation als erstes von Nedenskov-Sorensen *et al.* (1990) beschrieben.

Die meisten gramnegativen Bakterien benutzen zur Transformation sogenannte Typ-IV-Pili, haarähnliche Fortsätze des Bakteriums, die auch an Wirtszellen anheften können. Im Gegensatz dazu besitzt *H. pylori* keine Typ IV Pili, sondern das Typ-IV-Sekretionssystem ComB (Hofreuter *et al.*, 1998; Hofreuter *et al.*, 2001).

Eine Vielzahl an Genen, die am Transformationsmechanismus von *H. pylori* beteiligt sind, wurden mittlerweile identifiziert. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht vollständig geklärt und es werden weitere beteiligte Gene vermutet.

Durch die Aufnahme von fluoreszenzmarkierter DNA wurden die DNA-Bindungsstellen lokalisiert. Die Aufnahme erfolgt an den Polen des Bakteriums, nachfolgend an seinen Septen. Dabei sind auch mehrere Bindungsstellen zeitgleich möglich. Die dsDNA wird mit geringer Spezifität ins Periplasma aufgenommen (Stingl *et al.*, 2010).

Der Vorgang der natürlichen Transformation findet in einem zweistufigen Prozess statt, wobei beide Stufen voneinander unabhängig, auch zeitlich gesehen, sind (s. Abbildung 1.2.) In der ersten Stufe wird die DNA als Doppelstrang über die äußere Membran ins Periplasma

transportiert. In der zweiten Stufe gelangt die DNA vom Periplasma ins Cytoplasma und wird dabei in einen DNA-Einzelstrang (ssDNA) umgewandelt (Stingl *et al.*, 2010).

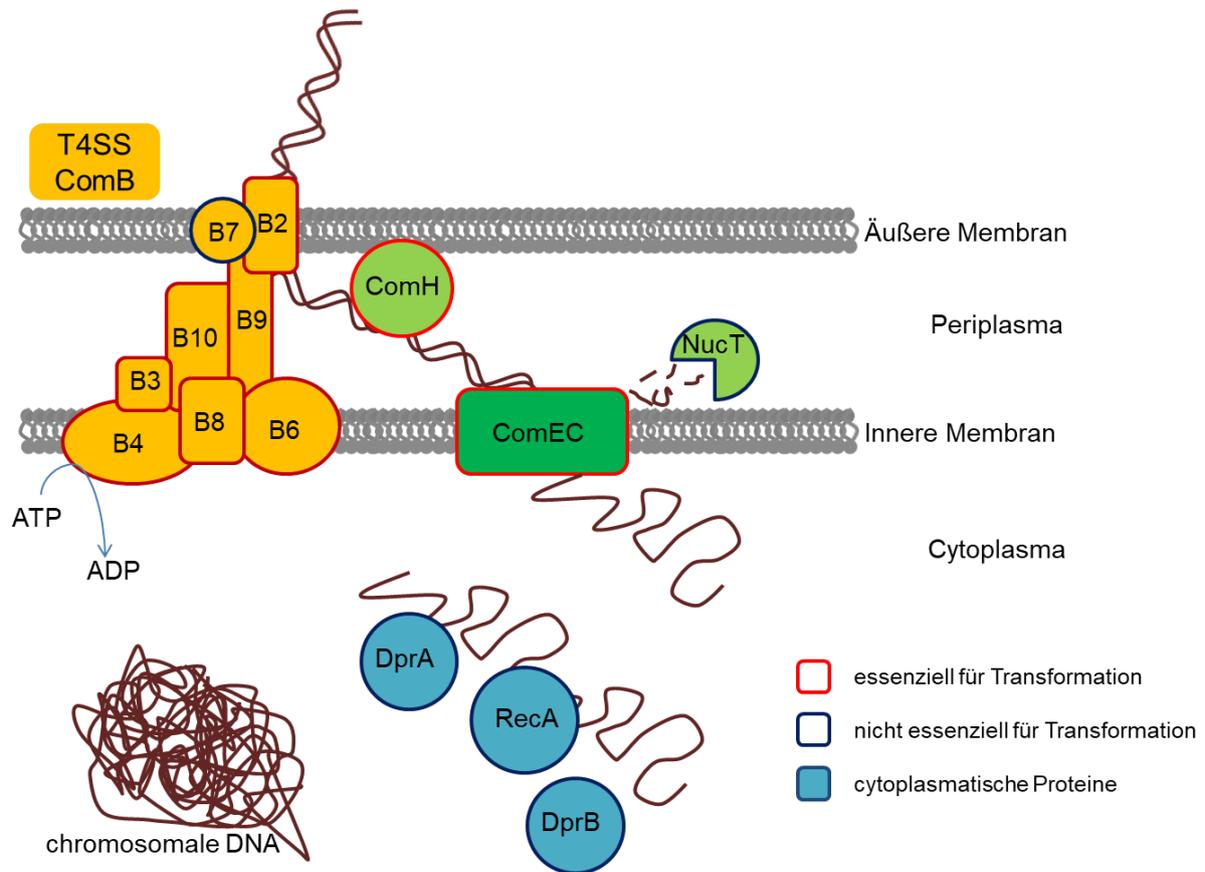


Abbildung 1.2: Modell der Transformation von *H. pylori*, modifiziert nach Stingl *et al.* (2010)

Der Ablauf der natürlichen Transformation von *H. pylori* findet in einem zweistufigen Prozess statt. Das Typ-IV-Sekretionssystem ComB (orange dargestellt) ist für die DNA-Bindung und den Transport der Doppelstrang-DNA durch die äußere Membran in das Periplasma verantwortlich. ComH dient dabei als periplasmatischer Rezeptor für die zu transformierende DNA. Vermittelt durch ComEC wird im zweiten Schritt die DNA als Einzelstrang in das Cytoplasma transportiert, unabhängig von der DNA-Aufnahme ins Periplasma. Die Endonuklease NucT spaltet vermutlich den DNA-Strang, der nicht ins Cytoplasma eintritt. Weitere Proteine, wie DprB, DprA und RecA sind am Transformationsmechanismus und der homologen Rekombination beteiligt.

Für die erste Stufe ist dabei das Typ-IV-Sekretionssystem ComB verantwortlich. Das Typ-IV-Sekretionssystem ComB ist im Genom auf zwei separaten Operonen codiert, *comB2* – *comB4* und *comB6* – *comB10*. Die Benennung der einzelnen *comB*-Gene orientierte sich dabei an den orthologen Genen des *virB*-Systems des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* (Hofreuter *et al.*, 2001; Karnholz *et al.*, 2006).

Das ComB-System durchspannt das Periplasma und bildet eine Brücke zwischen der äußeren und inneren Membran. Für die natürliche Kompetenz waren alle Proteine des ComB-Systems, abgesehen von ComB7, essentiell. Dabei wurden die einzelnen Deletionsmutanten mit chromosomaler DNA und Plasmid-DNA, die ins Chromosom integriert wurde, getestet.

Komplementationsplasmide wurden erfolgreich entweder über Elektroporation oder über Konjugation mit Shuttle-Plasmiden in *comB*-Deletionsmutanten inseriert. Die Aufnahmefähigkeit von DNA durch Elektroporation wurde nicht vollständig in allen Deletionsmutanten getestet. In der Deletionsmutante *comB6* war sie z.B. weiterhin erhalten (Hofreuter *et al.*, 2001; Karnholz *et al.*, 2006).

Das Protein ComB4 wurde als ATPase identifiziert und zeigte sich für die natürliche Kompetenz und ebenso für die Kolonisierung im Tiermodell als essentiell (Hofreuter *et al.*, 2001; Kavermann *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass ComB4 durch die Hydrolyse von ATP die Energie für den DNA-Transport durch die äußere Membran liefert (Stingl *et al.*, 2010).

Ebenso essentiell für die Transformation von chromosomaler und Plasmid-DNA erwies sich das Protein ComH. Die Elektroporation von DNA in die Deletionsmutante war jedoch weiterhin möglich (Smeets *et al.*, 2000). ComH dient als periplasmatischer Rezeptor für die zu transformierende DNA. Das C-terminale Ende von ComH besitzt eine starke Affinität für dsDNA und ist für den Import der DNA ins Periplasma notwendig. Das N-terminale Ende erlaubt die Interaktion von ComH mit der periplasmatischen Domäne des Kanals der inneren Membran ComEC. Somit ist ComH am Transport der DNA ins Periplasma und Anlieferung der DNA zu ComEC beteiligt (Damke *et al.*, 2019).

ComEC ist ein Kanalprotein der inneren Bakterienmembran und vermittelt in der zweiten Stufe der Transformation den Transport der DNA als Einzelstrang vom Periplasma ins Cytoplasma (Stingl *et al.*, 2010). Für die Transformation von chromosomaler und Plasmid-DNA, auch von Shuttle-Plasmiden, ist ComEC essentiell (Yeh *et al.*, 2003). Unterschiedliche Aussagen gibt es für die Notwendigkeit von ComEC für erfolgreiche Elektroporationen. Laut Yeh *et al.* (2003) ist die Elektroporation von DNA in die Deletionsmutante nicht möglich, Damke *et al.* (2019) zeigten das Gegenteil. Des Weiteren wird angenommen, dass ComEC am konjugativen Transfer beteiligt ist. (Weiss *et al.*, 2019).

Ein weiteres Protein, was am Mechanismus der natürlichen Transformation beteiligt ist, ist NucT. NucT befindet sich membranassoziiert im Periplasma und spaltet als Endonuklease DNA mit einer stärkeren Präferenz für einzelsträngige DNA als für doppelsträngige DNA. Es wird davon ausgegangen, dass NucT an der Aufbereitung von Purinen beteiligt ist. Das Fehlen von NucT bewirkt eine 10- bis 100-fache Reduktion der Transformationsfrequenz, sowohl bei der Transformation von chromosomaler DNA, als auch von Plasmiden, die sich selbst replizieren (O'Rourke *et al.*, 2004). Da NucT jedoch nicht essentiell für die natürliche Transformation ist und das Fehlen lediglich zu einer Abschwächung führt, wird vermutet, dass NucT beim Abbau des transformierten DNA-Stranges, der nicht ins Cytoplasma übertritt, beteiligt ist (Celma *et al.*, 2017).

Nach Erreichen des Cytoplasmas wird die DNA über homologe Rekombination ins Chromosom integriert oder als Shuttle-Plasmid vervielfältigt. Der Ablauf der homologen Rekombination wurde bereits im vorherigen Abschnitt 1.2.3 beschrieben. Das Fehlen verschiedener cytoplasmatischer Proteine der homologen Rekombination, wie RecA und DprA, beeinflusst auch die Effizienz der natürlichen Transformation.

Deletionsmutanten von *recA* sind transformationsdefizient bezüglich chromosomaler und Plasmid-DNA, mit der Ausnahme von Shuttle-Plasmiden, die nicht ins Genom integrieren (Schmitt *et al.*, 1995).

Das Fehlen von DprA reduziert die Effizienz der Transformation von chromosomaler und Plasmid-DNA (Ando *et al.*, 1999). DprA fördert das Beladen der ssDNA mit RecA im Prozess der homologen Rekombination. Des Weiteren schützt DprA die DNA vor dem Abbau durch Exonucleasen und Typ-II-Restriktionsenzyme und durch Stimulation von Methyltransferasen (Dwivedi *et al.*, 2013). Auch das cytoplasmatische Protein DprB ist an der Rekombination beteiligt und sein Fehlen zeigte eine Abnahme der Transformationseffizienz (Zhang und Blaser, 2012).

Am stärksten ist die natürliche Kompetenz vor Beginn der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien ausgeprägt (Israel *et al.*, 2000). Die Transformationsfrequenzen von *H. pylori* werden in Größenordnungen von 10^{-3} bis 10^{-6} angegeben und variieren in Bezug auf die verschiedenen Bakterienstämme und Resistenzmarker (Wang *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2001a; Corbinais *et al.*, 2017). Weiterhin wird die natürliche Kompetenz durch oxidativen Stress und pH-Werten größer als 6,5 gesteigert, weshalb auch verschiedene Laborbedingungen zu unterschiedlichen Transformationsraten führen können (Krueger *et al.*, 2016). Zusätzlich führt die Schädigung der DNA zu gesteigerten Transformationsfrequenzen (s. Absatz 1.2.3), was wiederum den genetischen Austausch fördert (Dorer *et al.*, 2010).

1.2.3.2 Konjugation

Ein weiterer Mechanismus der DNA-Übertragung ist die bakterielle Konjugation, bei der der Austausch von chromosomaler oder Plasmid-DNA über direkten Zellkontakt von dem Donor auf den Rezipienten erfolgt.

Für *H. pylori* wurde ein konjugationsähnlicher Mechanismus erstmals 1998 (Kuipers *et al.*) beschrieben, der in Anwesenheit von DNase I stattfand, um den DNA-Austausch über Transformation auszuschließen.

Im Allgemeinen werden mobile genetische Elemente aus dem Chromosom, genannt ICEs (*integrating and conjugative elements*), im horizontalen Gentransfer über ein mehrstufiges System übertragen. Zuerst wird das Element durch eine Rekombinase geschnitten und nimmt eine zirkuläre Form an und wird im Anschluss auf den Rezipienten durch Konjugation

überführt. Über ortsspezifische oder unspezifische Rekombination wird das ICE ins Chromosom des Rezipienten integriert (Hoeffler *et al.*, 2004; Wozniak und Waldor, 2010).

Es wird angenommen, dass die Typ-IV-Sekretionssysteme Tfs3 und Tfs4 am konjugativen DNA-Transfer von *H. pylori* beteiligt sind (Fischer *et al.*, 2020). Die Genominseln *tfs3* und *tfs4* beinhalten Gene, die die Relaxasen der Konjugation, mögliche *oriT* (*origin of transfer*) und die Xer-Rekombinase kodieren, weshalb sie den ICEs zugeordnet wurden (*ICEHptfs3* und *ICEHptfs4*). Auch wurde nachgewiesen, dass eine horizontale Übertragung von *ICEHptfs4* möglich ist. Die Übertragung ist dabei abhängig von der XerT-Rekombinase und der VirD2-Relaxase (Fischer *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014). Des Weiteren werden im Rezipienten das Transportprotein der inneren Membran ComEC und Proteine der homologen Rekombination, wie RecA und DprA benötigt (Weiss *et al.*, 2019).

Die Typ-IV-Sekretionssysteme Tfs3 und Tfs4 werden jedoch nicht für den konjugativen Transfer von *H. pylori*-Plasmiden benötigt (Rohrer *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2020).

Grundsätzlich findet die Konjugation von Plasmiden von Bakterien ebenso in mehreren Stufen statt. Die Relaxase bindet an das Plasmid und schneidet es innerhalb des Transferursprungs *oriT*. Ein DNA-Einzelstrang wird gelöst, linearisiert und in den Rezipienten durch Interaktion mit dem Proteinkomplex Relaxosom und dem Typ-IV-Kopplungsproteines (T4CP) transferiert (Virolle *et al.*, 2020).

50 % der *H. pylori*-Stämme tragen kryptische Plasmide unterschiedlicher Größe, die keine nachweisbaren phänotypischen Funktionen codieren (Hoeffler *et al.*, 2004). Beispiele sind hierfür pHel1 (Heuermann und Haas, 1995) oder pHel4 (Hofreuter und Haas, 2002).

Für *H. pylori* wurden insgesamt 3 Arten der Plasmidübertragung beschrieben, wobei ein genauer Ablauf der Konjugation unbekannt ist. Das Typ-IV-Sekretionssystem ComB spielt sowohl bei der natürlichen Transformation als auch bei einem konjugativen Transfer in Anwesenheit von DNase I eine große Rolle. Daneben wurde ein alternativer Weg, ebenso DNase I resistent, unabhängig von ComB mit niedrigen Frequenzen des Plasmidtransfers identifiziert (Rohrer *et al.*, 2012).

1.2.3.3 Elektroporation

Die Elektroporation ist ein technisches Verfahren, DNA in eine Zelle einzubringen. Dabei wird kurzzeitig ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Zellmembran vorübergehend permeabel wird und DNA ins Innere der Zelle gelangen kann (Miller *et al.*, 1988). Für den Erfolg sind die passende Feldstärke, Dauer und Wellenform des Impulses und die Größe, Form und Orientierung der Zelle wichtig.

Der Ablauf der Elektroporation wird in mehreren Stufen beschrieben. Während des Pulses kommt es zur Elektropermeabilisation und Migration der DNA durch Elektrophorese zur Zellmembran, wo die DNA mit der destabilisierten Membran interagiert. Nach dem Puls findet

die Translokation der DNA ins Cytosol und Migration in diesem statt. Die genauen Mechanismen der Zellmembranpermeabilitätsänderung und des Gentransfers sind unklar. Die in der Theorie beschriebene Porenbildung der Zellmembran wurde nicht beobachtet. Alternativ wird vermutet, dass die Aufnahme über gebildete Vesikel stattfindet (Escoffre *et al.*, 2009). Für *H. pylori* beschreiben Segal und Tompkins (1993) die erfolgreiche Durchführung der Elektroporation. Ando *et al.* (2000) zeigten ein ca. 5-fach, bzw. 11-fach höheres Einbringen von Plasmiden in *H. pylori* durch Elektroporation gegenüber der Transformation, unter der Voraussetzung, dass homologe Plasmid-DNA verwendet wurde.

1.2.4 Kandidatengene des DNA-Aufnahmemechanismus von *H. pylori*

Es ist bekannt, dass *H. pylori* einen anderen Mechanismus zur DNA-Aufnahme als die meisten gramnegativen Bakterien besitzt. Auch wenn inzwischen viele beteiligte Gene identifiziert worden sind, ist der genaue Ablauf unklar. Zwei Gene, zu denen die Vermutung geäußert wurde, dass sie am Transformationsmechanismus beteiligt sein könnten, werden in folgenden Abschnitten als „Kandidatengene“ näher dargestellt.

1.2.4.1 Kandidatengen *hp1473/hpp12_1451*

Über das Gen *hp1473* wurde berichtet, dass nach dessen Inaktivierung durch die Insertion eines Transposons die Durchführung eines Transformationsexperimentes in der Mutante nicht mehr erfolgreich war (Chang *et al.*, 2001).

Das Gen *hp1473* aus dem Stamm 26695 entspricht dabei *hpp12_1451* des Stammes P12. Des Weiteren besitzt *hp1473* eine gewisse Ähnlichkeit zu *cj1028c/ctsW* in *Campylobacter jejuni*. Für *ctsW* wurde ein Verlust der Transformationsfähigkeit in *C. jejuni* beschrieben, bei dem die DNA-Aufnahme jedoch noch möglich war und folglich das Gen an einem späteren Schritt der Transformation beteiligt sein muss (Wiesner *et al.*, 2003).

Ungeklärt ist dagegen die genaue Rolle des Gens *hp1473*, bzw. *hpp12_1451* im Ablauf des Transformationsmechanismus von *H. pylori*.

1.2.4.2 Kandidatengen *hp0506*

Das andere Kandidatengen, was näher beleuchtet werden soll, ist das Gen *hp0506*. Das zugehörige Protein HP0506, bzw. HdpA oder Csd3, gehört zur Familie der M23-Peptidasen und codiert ein Peptidoglycan-modifizierendes Enzym. Es besitzt sowohl eine Carboxypeptidase- als auch eine Endopeptidase-Aktivität (Bonis *et al.*, 2010; Sycuro *et al.*, 2010). Peptidoglycan ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellwand des Bakteriums. Eine Inaktivierung von *hp0506* führt zu einer gedrungenen, untersetzten und verzweigten Form von *H. pylori*. Dabei nimmt das Bakterium in seiner Länge ab und in seiner Breite zu und bekommt

weitere Zellpole. Des Weiteren wurde beim Fehlen des Gens eine leichte Verzögerung im Wachstum beobachtet, insbesondere zu Beginn der Wachstumsphase. Die Motilität des Bakteriums wird *in vitro* als unverändert beschrieben. Bei *in vivo* Experimenten mit Mäusen zeigte sich eine Abnahme der Kolonisationsfähigkeit der Mutante in Abhängigkeit der Zeit gegenüber dem Wildtyp. Bei einer Überexpression von HP0506 verändert sich die Zellform von *H. pylori* von stabförmig zu aufgegliedert kokkoid mit unregelmäßigen Bakteriengrößen, wobei die Teilungsfähigkeit erhalten bleibt. HP0506/HdpA ist durch seine enzymatischen Aktivitäten an der Zellform, der Stabilität und der Definition der Polbildung beteiligt (Bonis *et al.*, 2010). Für HP0506 wird eine Transmembrandomäne von Aminosäure 7 bis 26 vorhergesagt, dementsprechend ist C-terminal der anschließende Teil von HP0506 im Periplasma lokalisiert (An *et al.*, 2015).

1.3 Transposon-Mutagenese

Transponierbare Elemente (Transposons) sind DNA-Abschnitte, die ihre Position im Genom verändern können und als Folge Mutationen erzeugen. Katalysiert wird der Vorgang durch das Enzym Transposase. In der molekularbiologischen Forschung wird die Transposonmutagenese als Methode verwendet, bei der durch Einbringen der Transposons die DNA anderer Zellen modifiziert wird. Dabei können z.B. *random* Transposon-Insertionsmutanten erstellt werden, die zu einem „Knockout“ des jeweiligen Gens führen.

Ein genetisches Werkzeug ist das Tn5-Transpositionssystem von Goryshin und Reznikoff (1998), das auf der mutierten hyperaktiven bakteriellen Transposase Tn5 basiert und dabei höhere Transpositionsraten aufweist als der Wildtyp. Der Ablauf der Tn5-Transposition ist als *cut and paste*-Mechanismus in mehreren Schritten beschrieben: Zuerst binden die Monomere der Transposase sequenzspezifisch an die Mosaikenden (19 Bp) des Transposons. Im Anschluss werden die Enden des Transposons durch die Oligomerisation der gebundenen Transposase zusammengebracht und ein sogenannter synaptischer Komplex gebildet. Die daran angrenzende DNA wird mit *blunt ends*, von der Transposase vermittelt, abgespalten, sodass der Transpositions-komplex (Transposom) freigesetzt wird. Das Transposom bindet an die Sequenz der Ziel-DNA und es findet ein Strangtransfer, ausgehend von den 3'-Enden des Transposons, in die Zielsequenz statt. Die letzten Schritte benötigen dabei die Anwesenheit von Magnesium. Im Anschluss wird die Transposase entfernt und die Lücken in der Sequenz werden über Replikation oder Reparaturmechanismen geschlossen. Das Transposom wurde dabei über Elektroporation in das zu verändernde Bakterium eingebracht (Goryshin und Reznikoff, 1998; Goryshin *et al.*, 2000).

Für *H. pylori* wurde von Holger Kavermann über eine *in vitro*-Transposonmutagenese eine Mutantenbank mit dem EZ-Tn5-System von Epicentre erstellt (Kavermann *et al.*, 2003). *In vitro*

bedeutet dabei, dass das Transposon in einer *in vitro*-Reaktion in isolierte genomische *H. pylori*-DNA, die zuvor in Plasmide eingebracht wurde, integriert. Im Anschluss wurden dann die veränderten Plasmide in *E. coli* transformiert, vervielfältigt, isoliert und in *H. pylori* transformiert, um die Mutanten zu erhalten. Neben dem großen Aufwand, Mutanten zu generieren, können bei diesem Verfahren nicht alle *H. pylori*-Gene in der Mutantenbank abgebildet werden. DNA-Sequenzen, die für *E. coli* toxisch sind, werden nicht amplifiziert und stehen nicht für die Transformation in *H. pylori* und für weitere Versuche zur Verfügung. Im Gegensatz dazu wird bei einer *in vivo*-Mutagenese das Transposom direkt in die zu modifizierende Zelle eingebracht. Ein solches Verfahren existiert aktuell nicht für *H. pylori*.

1.4 Zielsetzung

H. pylori gehört zu den genetisch vielfältigsten Bakterien. Jeder infizierte Mensch besitzt seinen eigenen Stamm, der sich im Laufe der Zeit verändert. Die Grundlage der hohen genetischen Variation wird durch die natürliche Transformation und eine hohe Rekombinationsaktivität gebildet.

H. pylori verwendet im Gegensatz zu anderen Bakterien einen alternativen Mechanismus für die natürliche Transformation. Inzwischen wurden viele Gene und deren Proteine, die für die natürliche Kompetenz verantwortlich sind, identifiziert. Beispielsweise besitzt *H. pylori* im Gegensatz zu anderen Bakterien ein Typ-IV-Sekretionssystem ComB. Der vollständige Mechanismus der natürlichen Transformation von *H. pylori* ist jedoch noch nicht verstanden. Das Ziel dieser Arbeit war, weitere Gene und deren Proteine auf ihre Beteiligung am Transformationsmechanismus von *H. pylori* zu ermitteln.

Die beiden Kandidatengene *hp1473/hpp12_1451* und *hp0506*, deren Beteiligung bereits vermutet wurde, sollten genauer untersucht werden. Hierfür sollten Deletionsmutanten erstellt werden, um die Auswirkungen des Fehlens der Gene und ihrer Rolle am Mechanismus der natürlichen Transformation zu erfassen.

Um weitere mögliche Gene zu finden, die am Transformationsmechanismus beteiligt sind, wurde versucht, über das Tn5-Transposonmutagenesesystem eine Mutantenbank für *H. pylori* zu erstellen. In dieser Mutantenbank sollte jedes einzelne *H. pylori*-Gen mindestens einen Defekt aufweisen. Die daraus gewonnenen Mutanten sollten im Anschluss auf ihre Transformationsfähigkeit untersucht werden. Hierfür sollte ein Screeningmodell für transformationsdefiziente Mutanten von *H. pylori* entwickelt werden.

Insgesamt sollen diese Arbeiten das Verständnis für den Mechanismus der natürlichen Transformation erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

2.1.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 2.1: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Name	Charakterisierung	Referenz
DH5 α	F- Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-l gyr A96 relA1</i> (Life Technologies, Karlsruhe)	Hanahan (1983)
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacO74 recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Life Technologies, Karlsruhe)	Grant <i>et al.</i> (1990)

2.1.1.2 *Helicobacter pylori*-Stämme

Tabelle 2.2: Verwendete *Helicobacter pylori*-Stämme

Deskriptiver Name	Interner Name	Genotyp	Referenz/Quelle
<i>H. pylori</i> P12 P12 Strep	JR-H01 VK-H001	<i>H. pylori</i> P12, <i>rpsL</i> [*] , Strep ^R	AG Haas MVP
P12 Δ <i>hpp12_1451</i>	JR-H14	P12 Δ <i>hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; Strep ^R	diese Arbeit
P12 Δ <i>hp0506</i>	JR-H20	P12 Δ <i>hp0506::aphA-3</i> ; Kan ^R	Evelyn Weiss
<i>H. pylori</i> P12	JR-H31	<i>H. pylori</i> P12, Wildtyp; Klinisches Isolat (888-0) der Universität Hamburg	(Haas <i>et al.</i> , 1993)
P12 <i>recA::aphA-3</i>	JR-H32	P12 <i>recA::aphA-3</i> ; Kan ^R	diese Arbeit
P12 <i>recA::cat</i>	JR-H33	P12 <i>recA::cat</i> ; Cam ^R	diese Arbeit

Deskriptiver Name	Interner Name	Genotyp	Referenz/ Quelle
P12+hpp12_1451_moeB	JR-H34	P12 <i>moeB::aphA-3_hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pJR6); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12Δhpp12_1451+Komp_moeB	JR-H37	P12 Δ <i>hpp12_1451</i> ; <i>moeB::aphA-3_hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pJR6, pJR3); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12+myc_hpp12_1451_moeB	JR-H39	P12 <i>moeB::aphA-3_myc_hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pJR7); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12Δhpp12_1451+Komp_myc_moeB	JR-H41	P12 Δ <i>hpp12_1451</i> ; <i>moeB::aphA-3_myc_hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pJR7, pJR3); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12+hpp12_1451	JR-H42	P12 pHel3:: <i>hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pJR4); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12+myc_hpp12_1451	JR-H44	P12 pHel3:: <i>myc_hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pJR5); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12Δhpp12_1451 +Komp _{Teil}	JR-H45	P12 Δ <i>hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; pHel3:: <i>hpp12_1451</i> _{Teil} ; nur die ersten 331 Basenpaare sind komplementiert, (pJR4, pJR3); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
SR-P172	SR-P172, JR-H47	P12 pHel12:: <i>cat</i> ; Δ <i>recA::erm</i> ; Strep ^R , Cam ^R , Erm ^R	(Rohrer et al., 2012)
P12Δhpp12_1451+Komp_myc	JR-H48	P12 Δ <i>hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; pHel3:: <i>myc_hpp12_1451</i> ; (pJR5, pJR3); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12 <i>moeB::aphA-3</i>	JR-H52	P12 <i>moeB::aphA-3</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pSP76); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
P12Δhpp12_1451_moeB:: <i>aphA-3</i>	JR-H53	P12 Δ <i>hpp12_1451</i> ; <i>moeB::aphA-3</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pSP76, pJR3); Strep ^R , Kan ^R	diese Arbeit
PMSS1 Strep	JR-H61	PMSS1, <i>rpsL</i> [*] ; (pEG21); Strep ^R	diese Arbeit

Deskriptiver Name	Interner Name	Genotyp	Referenz/Quelle
PMSS1 Δ <i>hpp12_1451</i>	JR-H67	PMSS1 Δ <i>hpp12_1451</i> ; <i>rpsL</i> [*] ; (pJR3); Strep ^R	diese Arbeit
PMSS1	UB-H47	<i>H. pylori</i> PMSS1, Wildtyp; Klinisches Isolat (10700)	(Lee <i>et al.</i> , 1997)

2.1.2 Plasmide

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pBluescript II SK (+)	<i>ori</i> _{colE1} , <i>ori</i> _{f1(+)} , <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse Primerbindungsstellen; Amp ^R	Stratagene
pJR3	Plasmid zur Deletion von <i>hpp12_1451</i> , pBluescript II SK (+) mit flankierenden Bereichen von <i>hpp12_1451</i> und <i>rpsL-cat</i> -Kassette; Amp ^R , Cam ^R	diese Arbeit
pJR4	Plasmid zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> ; pHel3-Shuttle-Plasmid; pVK18 mit <i>alpA</i> -Promotor, <i>hpp12_1451</i> , <i>aphA-3</i> ; Kan ^R	diese Arbeit
pJR5	Plasmid zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> ; pHel3-Shuttle-Plasmid; pVK18 mit <i>alpA</i> -Promotor, <i>myc</i> -Tag, <i>hpp12_1451</i> , <i>aphA-3</i> ; Kan ^R	diese Arbeit
pJR6	Plasmid zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> in <i>moeB</i> ; pSP76 mit <i>aphA-3</i> , <i>alpA</i> -Promotor, <i>hpp12_1451</i> ; Kan ^R	diese Arbeit
pJR7	Plasmid zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> in <i>moeB</i> ; pSP76 mit <i>aphA-3</i> , <i>alpA</i> -Promotor, <i>myc</i> -Tag, <i>hpp12_1451</i> ; Kan ^R	diese Arbeit
pJR8	pMOD1 mit <i>aphA-3</i> für Transposon-Mutagenese; Amp ^R , Kan ^R	diese Arbeit
pVK18	Plasmid zur Komplementation von <i>hopQ</i> (J99) in pIB6; pHel3-Shuttle-Plasmid, <i>alpA</i> -Promotor, <i>aphA-3</i> ; Kan ^R	Verena Königer

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pSP76	pCDFDuet-1 mit <i>aphA-3</i> in <i>moeB</i> (flankierende Bereiche von <i>hp0755</i>); Kan ^R	Sandra Praßl
pEG21	pCR2.1 TOPO-Vektor mit <i>rpsL</i> -Gen von NCTC11637 (K43R) für das Einbringen einer Streptomycinresistenz; Amp ^R , Kan ^R	(Fischer <i>et al.</i> , 1999)
pWS48	pBluescript II KS (+) mit <i>recA</i> (partial, aus P1):: <i>cat</i> ; Amp ^R , Cam ^R	Wolfgang Fischer
pJP99	<i>recA</i> -Integrationsvektor, <i>recA</i> aus P1 mit flankierenden Bereichen, Multiple Cloning Site und <i>aphA-3</i> ; Kan ^R , Amp ^R	Jürgen Püls
pLH2	pBluscript II SK(+) mit flankierenden Bereichen aus pHel12; <i>alpA</i> -Promotor, <i>babA</i> (J99), <i>cat</i> -Kassette zwischen <i>hpp12_p11</i> und <i>mccC</i> ; Kan ^R , Cam ^R	Lea Holsten
pHK9	pMOD mit <i>cat</i> -Kassette für Transposon-Mutagenese; Cam ^R , Amp ^R	Holger Kavermann
pMOD1	<i>ori_{ColE1}</i> , 19 Bp invertierte Wiederholungssequenzen, Konstruktionsvektor für EZ::TN-Transposons; Amp ^R	Epicentre
pJP23 (pCag3)	pBA-Vektor mit <i>cag3</i> -Region, enthält <i>cagY</i> (<i>hp0527</i>); Amp ^R	Jürgen Püls (Fischer <i>et al.</i> , 2001b)

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma „biomers.net“ (Ulm) bezogen. In der nachfolgenden Tabelle sind die Oligonukleotide mit Verwendungszweck und Restriktionsenzymchnittstellen aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
JR1	GATC GGTACC ACGATTTCACTAAAACAGCGC	<i>sense</i> Oligonukleotid mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle zur Deletion von <i>hpp12_1451</i> , Fragment <i>upstream</i>

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
JR3	GATC GCGGCCG CGCTTCAAACAAGTTAA ACAACG	sense Oligonukleotid mit <i>NotI</i> -Schnittstelle zur Deletion von <i>hpp12_1451</i> , Fragment <i>downstream</i>
JR4	GATC CCGCGG GAGCTCATTGTCGCTGTG GC	<i>antisense</i> Oligonukleotid mit <i>SacII</i> -Schnittstelle zur Deletion von <i>hpp12_1451</i> , Fragment <i>downstream</i>
JR16	GATC GTCGAC GGATAAATCCATGAATAA AGTTC	<i>antisense</i> Oligonukleotid mit <i>Sall</i> -Schnittstelle zur Deletion von <i>hpp12_1451</i> , Fragment <i>upstream</i>
JR17	GATC CATATG <u>GGAACAAAACTCATCTCA</u> <u>GAAGAGGATCTG</u> CGTTGTTAACTTGTT TG	sense Oligonukleotid mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> in pHel-Shuttle-System mit <i>Myc</i> -Tag
JR18	GATC CATATG CGTTGTTAACTTGTTTG	sense Oligonukleotid mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> in pHel-Shuttle-System
JR19	GATC AGATCT TTCATTCATCCGCGCTGCA	<i>antisense</i> Oligonukleotid mit <i>BglII</i> -Schnittstelle zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> in pHel-Shuttle-System
JR20	GATC GGTACC GCCCCAAAAATTTAAGGC	sense Oligonukleotid mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> in <i>moeB</i> -Locus
JR21	GATC CTCGAG TTCATTCATCCGCGCTGC	<i>antisense</i> Oligonukleotid mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle zur Komplementation von <i>hpp12_1451</i> in <i>moeB</i> -Locus
WS67	GAAGATCTTATTCCATTTCTTCTAAAG	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Amplifikation von <i>recA</i>
WS68	CGGAATTCGCAATAGATGAAGACAAAC	sense Oligonukleotid zur Amplifikation von <i>recA</i>

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
SP116	CACTGACTTAATTA AAAATCGTTATAAAA ATCAATGCG	<i>antisense</i> Oligonukleotid für den flankierenden Bereich <i>downstream</i> des <i>moeB</i> -Locus
SP122	ACCTGACGGATCCATTTATGAAGATTCC CTAGACAGAG	<i>sense</i> Oligonukleotid für den flankierenden Bereich <i>upstream</i> des <i>moeB</i> -Locus
SR57	AGCGGCAAATTTTTCTGTCA	<i>sense</i> Oligonukleotid zum Nachweis der <i>cat_{GC}</i> -Kassette in pHel12:: <i>cat</i>
SR58	CCGACTATAGTTATTGCTAT	<i>antisense</i> Oligonukleotid zum Nachweis der <i>cat_{GC}</i> -Kassette in pHel12:: <i>cat</i>
IB34	CAGTCTAGAATCCACGTTGAAAATCTC	<i>antisense</i> Oligonukleotid an 3'-Ende der <i>cat_{GC}</i> -Kassette, Nachweis der Insertion von pLH2
IB55	GCCATTGTTATTTCCCACCGGAGTCGTT TGTTTCATGCTCGTT	<i>antisense</i> Oligonukleotid an <i>babA</i> , Nachweis der Insertion von pLH2
RH136	ATAAGAATGCGGCCGCTAAATGACTAAG GAAGCTAAAATGGAG	<i>sense</i> Oligonukleotid zur Amplifikation der <i>cat_{GC}</i> -Kassette
RH137	ATAAGAATGCGGCCGCTTACGCCCCGC CCTGCCAC	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Amplifikation der <i>cat_{GC}</i> -Kassette
pMOD FP1	ATTCAGGCTGCGCAACTGT	<i>sense</i> Oligonukleotid zur Sequenzierung des Transposons im pMOD-Vektor
pMOD RP1	GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur Sequenzierung des Transposons im pMOD-Vektor
ME Plus 9 – 3'	CTGTCTCTTATACACATCTCAACCATCA	<i>sense</i> Oligonukleotid zur direkten Tn5-Transposon-Amplifikation, 5'-Monophosphat
ME Plus 9 – 5'	CTGTCTCTTATACACATCTCAACCCTGA	<i>antisense</i> Oligonukleotid zur direkten Tn5-Transposon-Amplifikation, 5'-Monophosphat

2.1.4 Antikörper

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper mit Beschreibung und Anwendung

Antikörper	Beschreibung	Anwendung	Quelle
<i>Primäre Antikörper</i>			
α -RecA (AK263)	Polyklonales Antiserum gegen RecA-Fusionsprotein (Kaninchen)	1:1000	Fischer und Haas (2004)
α -AlpB (AK262)	Polyklonales Antiserum gegen AlpB von <i>H. pylori</i> Stamm P1 (Kaninchen)	1-2:3000	Odenbreit <i>et al.</i> (2002)
α -Myc-tag	Monoklonaler Antikörper gegen das Myc-tag (Maus)	1:1000	Cell signalling
<i>Sekundärer Antikörper</i>			
Protein A-AP	Protein A – Alkalische Phosphatase	1:2000	Sigma

2.1.5 Nährmedien für Bakterien

Tabelle 2.6: Verwendete Nährmedien für Bakterien

Nährmedium	Inhalt und Herstellung
LB (<i>Luria-Bertani</i>)-Medium	20 g/l Lennox-L-Medium (Life Technologies) in H ₂ O, autoklaviert
LB (<i>Luria-Bertani</i>)-Agar	32 g/l Lennox-L-Agar (Life Technologies) in H ₂ O, autoklaviert
Einfriermedium <i>E. coli</i>	LB-Medium mit 20 % Glycerin, sterilfiltriert
BB-Medium	28 g/l <i>Brucella Broth</i> (BD) in H ₂ O, autoklaviert
GC-Agar	36 g/l GC-Agar-basis (Oxid) in H ₂ O, autoklaviert, Zugabe von 80 ml/l Pferdeserum, 10 ml/l Vitaminmix, 1 mg/ml Nystatin und 5 mg/l Trimetoprim

Vitaminmix	100 g/l α -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoessäure, 0,25 g/l Nicotinamidadeninindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 /l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil
Einfriermedium <i>H. pylori</i>	BB-Medium mit 10 % FCS und 20 % Glycerin, sterilfiltriert

2.1.6 Hemmstoffe und Medienzusätze

Tabelle 2.7: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze

Antibiotikum oder Zusatz	Abkürzung	Konzentration <i>E. coli</i>	Konzentration <i>H. pylori</i>
Kanamycin	Kan	50 mg/l	8 mg/l
Chloramphenicol	Cam	30 mg/l	6 mg/l
Streptomycin	Strep	250 mg/l	250mg/l
Ampicillin	Amp	100 mg/l	
Trimethoprim	Tmp		5mg/l
Nystatin	Nys		1 mg/l
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid	X-Gal	40 mg/l	

2.1.7 Enzyme und Proteine

DNase I Grad II aus Rinderpankreas	Roche
EZ-Tn5 Transposase	Epicentre
Fetales Kälberserum (FCS)	FCS, Life Technologies
PANScript-Polymerase	PAN-Biotech
Pferdeserum	PAA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
Restriktionsenzyme	Roche, Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol

RNase	Roche
T4-DNA-Ligase	Roche
TaKaRa Ex Taq [®] -Polymerase	TAKARA BIO INC.

2.1.8 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck und Sigma-Aldrich bezogen. Die Ausnahmen sind in den nachfolgenden Abschnitten des Methodenteils, in welchen sie verwendet wurden, gekennzeichnet.

2.1.9 Lösungen und Puffer

PBS	2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; 1,44 mM KH ₂ PO ₄ ; 12 mM Na ₂ HPO ₄
Tris-Mg-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM MgCl ₂

Puffer für Elektroporation

Elektroporationspuffer	2,43 mM K ₂ HPO ₄ ; 0,57 mM KH ₂ PO ₄ ; 272 mM Saccharose; 15 % (v/v) Glycerin
------------------------	---

Puffer für Herstellung chemisch kompetenter Zellen

TFB I Puffer	30 mM CH ₃ COOK; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl ₂ ; 50 mM MnCl ₂ ; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,2
TBF II Puffer	10 mM MOPS; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerin; pH 6,5

Puffer für alkalische Lyse

GTE-Puffer	50 mM Glucose; 25 mM Tris; 25 mM EDTA; pH 8
Lysepuffer	0,2 M NaOH; 0,1 % (w/v) SDS

Puffer für DNA-Gelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8
GEBS-Puffer	20 % (v/v) Glycerin; 50 mM EDTA; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,5 % (w/v) N-Laurylsarcosin
Ethidiumbromidbad	1 mg/l in H ₂ O

Puffer für Lysate und Zellfraktionierung

SDS-Probenpuffer (2x)	100 mM Tris-HCl; 4 % (w/v) SDS; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 20 % (v/v) Glycerin; z.T. 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Tris-HCl-Puffer	10 mM Tris-HCl pH = 8,0
Tris-HCl*	Tris-HCl mit Proteaseinhibitoren 1 mM Na-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 μ M Leupeptin und 1 μ M Pepstatin

Puffer für Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Elektrophoresepuffer	5 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM Glycin; 0,02 % (w/v) SDS
10 % kontinuierliches Gel (0,75 mm)	1,7 ml 30 % (v/v) Bisacrylamid; 2,6 ml 2 x Single-Gel-Puffer; 50 μ l Ammoniumpersulfat; 2 μ l TEMED; 0,6 ml Wasser

Puffer für Western Blot

Western-Transferpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris-HCl; 20 % Methanol; 0,1 % SDS; pH 8,3
TBS	150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5
Absättigungspuffer	TBS; 3 % BSA
TBS-T Waschpuffer	TBS; 0,075 % Tween-20
Detektionslösung	0,1 M Tris-HCl pH 9,6; 0,1 g/l NBT; 7 mM $MgCl_2$; 50 mg/l BCIP

Puffer für Transposonmutagenese

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA
-----------	------------------------------------

2.1.10 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 2.8: Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Referenz
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Cat. No. 51306)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Cat. No. 27106)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen (Cat. No. 12143)
illustra CFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
EZ-Tn5™ <KAN-2> Tnp Transposome™ Kit	Epicentre

2.1.11 Molekulargewichtsmarker

DNA-Gelelektrophorese: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific

Polyacrylamid-Gelelektrophorese: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific

2.1.12 Geräte und Apparaturen

Agarosegelkammern (Bio-Rad)

Blot-Apparatur (Biotec-Fischer)

Elektroporationsgerät MicroPulser™ (Bio-Rad)

Gefrierschrank -20 °C (Liebherr)

Gefrierschrank -70 °C (Heraeus)

Gelelektrophoresesystem Mini-Protean III™ (Bio-Rad)

Laborabzug (Waldner)

Laborbrenner (Usbeck)

Brutschränke Microinkubator MI22C (Scholzen), Inkubator (Heraeus)

Kühlschränke (Liebherr)

Magnetrührer IKA Combimag RCO (IKA)

Minizentrifuge (neoLab)

Mikrowelle (Siemens)

PCR-Thermocycler peqSTAR (VWR Peqlab)

pH-Meter (WTW)

Photometer DR 2000 (Hach)

Pipetten (Glison, Brand)

Rolltisch (Assistant)
Spannungsquellen (Bio-Rad, Amersham Pharmacia Biotech)
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
Stereomikroskop (Olympus)
Sterile Werkbank Herasafe (Thermo)
Schüttelinkubator Certomat® (Braun Biotech)
Thermomixer comfort (Eppendorf)
Ultraschallgerät Sonifier® S-250A (Branson)
Ultrazentrifuge Optima™ TL (Beckmann)
UV-Transilluminator (Bachofer)
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf)
Video-Geldokumentationssystem, Molecular Imager Gel Doc XR System mit Quantity One 4.5.0 Software (Bio-Rad)
Vortexmischer Reax top (Heidolph)
Waagen – Feinwaage, Analysewaage (Sartorius)
Wasserbad (GFL)
Zentrifuge Megafuge 3.0 (Heraeus, Thermo Scientific)
Zentrifugen 5417 R, 5415 R, 5415 D (Eppendorf)

2.1.13 Verbrauchsmittel

Elektroporationsküvetten, 2 mm (VWR Peqlab)
Eppendorfgefäße, 1,5 ml (Eppendorf)
Falcon 15-50 ml (Sarstedt)
Filterpapiere (Whatman)
Kryoröhrchen, 2 ml (Nalgene)
Nitrozellulosefilter (Merck Millipore)
PCR-Gefäße (Brand)
Petrischalen (Greiner Bio-One)
Photometerküvetten (Brand)
Pipettenspitzen, 10-1000 µl (Sarstedt)
PVDF-Membran, 0,2 µm (Bio-Rad)
Spritze 50 ml (Braun)
Sterilfilter-0,22 µm (Merck Millipore)
Stripetten, 5-20 ml (Greiner Bio-One)
Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann)
Wattestäbchen, steril (Deltalab)
Well-Platten (Costar)

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden auf LB-Platten oder in Flüssigkultur kultiviert, welche bei Bedarf mit entsprechenden Antibiotikazusätzen versehen worden waren. Das Wachstum fand bei 37 °C unter aeroben Bedingungen im Inkubator oder Schüttelinkubator bei 180 rpm statt. Zur Stammhaltung wurden die Bakterien einer halben Platte in einem Kryoröhrchen mit 1 ml *E. coli*-Einfriermedium, bestehend aus BB-Medium mit 20 % Glycerin, resuspendiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.1.2 Kultivierung und Stammhaltung von *Helicobacter pylori*

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte auf Serumplatten oder Selektivserumplatten mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen bei 37 °C im Inkubator unter mikroaerophilen Bedingungen (Atmosphäre von 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂). Zur Aufnahme in die Gefrierkultur wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte in einem Kryoröhrchen mit 1 ml *H. pylori*-Einfriermedium, bestehend aus BB-Medium mit 10 % FCS und 20 % Glycerin, resuspendiert und bei -70 °C gelagert. Nach dem Ausstreichen aus der Gefrierkultur wurden die Bakterien 3 Tage bebrütet und anschließend zweimal auf neue Serumplatten passagiert, bevor Experimente durchgeführt wurden.

2.2.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakteriensuspensionen wurde mit einem Spektralphotometer durchgeführt. Die Bakterien wurden hierfür mit einem sterilen Wattestäbchen von der Agarplatte genommen und in Medium oder Puffer resuspendiert. Die Messung erfolge in Plastikküvetten mit der Breite $d = 1$ cm in einer Verdünnung von 1/10 oder 1/100 gegen einen Blindwert unter der Wellenlänge $\lambda = 550$ nm. Eine OD von 1 entspricht ungefähr 10^8 *H. pylori*-Bakterien.

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

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte nach der Rubidium-Chlorid-Methode. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min auf Eis gekühlt und bei 2800 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 40 ml kaltem, sterilen Puffer TFB I Puffer resuspendiert

und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Bakterien in 4 ml TBF II Puffer gelöst und zu 50 µl aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.1.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (Sambrook et al., 2001)

Zur Transformation wurde zunächst ein Aliquot von 50 µl chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterienzellen auf Eis 1 h aufgetaut. Anschließend wurden 5-10 µl Ligationsansatz (2.2.2.8) hinzugefügt und die Bakterien für 10-30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec durchgeführt und der Ansatz für weitere 1-10 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien bei 37 °C und 180 rpm aerob für 1 h kultiviert. Anschließend wurde der Ansatz bei 1000 g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl des Überstandes gelöst und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Platte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.1.6 Transformation von *H. pylori*

Für die Transformation der natürlich kompetenten Bakterien wurde eine Übernachtskultur in BB-Medium mit 10 % FCS aufgenommen und eine OD₅₅₀ von 0,2 eingestellt. In eine Vertiefung einer 24-Well-Platte wurde 1 ml dieser Suspension für 1-2 h mit 10 % CO₂ bei 37°C inkubiert. Danach wurde 100 ng bis 1 µg Plasmid-DNA oder genomische DNA hinzugefügt und die Bakterien wurden für weitere 4-6 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in einem Eppendorfgefäß bei 1000 g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl BB resuspendiert und auf Selektivserumplatten ausplattiert. Die Platten wurden 4-7 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert bis Einzelkolonien weitergeführt werden konnten.

Zur Bestimmung der Transformationsfrequenz wurde zusätzlich die Lebendzellzahl in Form der koloniebildenden Einheit (CFU) bestimmt. Hierzu wurde ein Teil der Bakteriensuspension verdünnt, auf Serumplatten ausplattiert und nach 3 bis 4 Tagen ausgezählt.

2.2.1.7 Elektroporation von *H. pylori* (Segal und Tompkins, 1993)

Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch ein elektrisches Feld vorübergehend permeabel, sodass DNA eingebracht werden kann.

Zur Elektroporation von *H. pylori* wurde eine Übernachtskultur in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 1 eingestellt. Für eine Reaktion wurde 1 ml dieser Suspension verwendet, was 3×10^8 Bakterien entspricht. Nach dem Zentrifugieren bei 1700 g und 4 °C über 5 min wurde der Überstand abgenommen. In zwei Waschschrritten wurden die Bakterien in 500 µl gekühlten Elektroporationspuffer gelöst, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 55 µl Elektroporationspuffer

resuspendiert und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Dem Ansatz wurde 100-500 ng zu transformierende DNA hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 μ F in der MicroPulser™ (Bio-Rad) Apparatur. Unmittelbar danach wurde 1 ml BB mit 10 % FCS zu den Bakterien hinzugegeben, der Ansatz in eine Schale einer 24-Well-Platte überführt und für 4-6 h bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 1700 g über 5 min wurde das Bakterienpellet in 100 μ l des Überstandes gelöst und die jeweilige Selektivserumplatte ausplattiert. Die Platten wurden 3-7 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert bis Einzelkolonien weitergeführt werden konnten.

2.2.1.8 Konjugation von Plasmiden zwischen *H. pylori*-Stämmen

Die direkte Konjugation zwischen *H. pylori*-Stämmen wurde nach Rohrer *et al.* (2012) und modifiziert nach Kuipers *et al.* (1998) durchgeführt.

Um die Donor- und Rezipientenstämme unterscheiden zu können, wurde bei den Kokultivierungsexperimenten mit verschiedenen Antibiotikaresistenzen gearbeitet. Übertragen wurde hier vom Donor P12 (SR-P172) das Plasmid pHel12 mit einer *cat_{GC}*-Kassette, welche eine Chloramphenicolresistenz vermittelt. Die Rezipientenstämme beinhalten eine *aphA-3*-Kassette im *moeB*-Locus, sodass hier mithilfe von Kanamycin selektiert werden konnte. Damit der Transfer von DNA nicht beidseitig stattfindet, ist im Donorstamm das Gen *recA* deletiert, sodass dieser keine DNA aufnehmen kann.

Die Übernachtskulturen von Donor und Rezipient wurden jeweils in BB+10 % FCS resuspendiert und eine OD₅₅₀ von 2 eingestellt. Jeweils 25 μ l der Donor- und Rezipientensuspensionen wurden mit 25 μ l DNase I (100 mg/ml in Tris-Mg-Puffer) gemischt und bei 37 °C und 10 % CO₂ für 30 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1700g über 5 min wurden die Bakterienpellets mit 25 μ l DNase I resuspendiert. Die Suspensionen von Donor und Rezipient wurden anschließend gemischt, auf eine Serumplatte aufgetropft und für 16-18 h bei mikroaerophilen Bedingungen und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien von der Platte genommen und in 1 ml BB resuspendiert. Für die Bestimmung der Lebendzellzahlen der Bakterien (CFU/ml) wurden Verdünnungen von 10⁻⁵ und 10⁻⁶ auf Selektivagarplatten mit Chloramphenicol für den Donorstamm und Kanamycin für den Rezipienten ausplattiert. Zur Selektion der Transkonjuganten wurden 100 μ l und der Rest der unverdünnten Bakteriensuspension auf Doppelselektivmedium mit Chloramphenicol und Kanamycin ausplattiert und alle Platten unter mikroaerophilen Bedingungen und 37 °C für 4-7 Tage inkubiert.

2.2.2 Genetische und molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* für präparative Zwecke wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen verwendet. Die Bakterien wurden hierfür in 1 ml PBS resuspendiert, für 1 min bei 16 000 g zentrifugiert und das Zellpellet nach Herstellerangaben weiterbehandelt. Die Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des *QIAGEN Plasmid Midi Kit* nach Benutzerprotokoll.

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA alternativ durch ein Verfahren mittels alkalischer Lyse gewonnen. Dafür wurden die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert, bei 16 000 g für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris, 25 mM EDTA, pH 8) gelöst und die Bakterien wurden durch die Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH/0,1 % SDS und anschließendem Invertieren, bis der Inhalt klar wurde, lysiert. Danach wurde 0,1 µl RNase (100 mg/ml) hinzugefügt und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 150 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) zugegeben und invertiert, bis sich der Inhalt trüb verfärbte. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 16 000 g über 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Chloroform, der Ansatz wurde gevortext und bei 16 000 g für 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde daraufhin abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 350 µl Isopropanol versehen und erneut gevortext. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 16 000 g über 10 min wurde der Überstand verworfen. Im anschließenden Waschschrift wurden zum entstandenen Pellet 200 µl 70 % Ethanol hinzugefügt, bei 16 000 g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und im Anschluss in 20-100 µl H₂O_{dest} gelöst.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit dem Spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

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

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori* wurde das *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* von Promega verwendet. Die Bakterien einer Übernachtskultur wurden in 1 ml PBS resuspendiert, anschließend bei 6000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die weitere Vorgehensweise erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. pylori*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori* erfolgte mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* von Qiagen. Die Bakterien einer Übernachtskultur wurden hierfür in 1 ml PBS resuspendiert, bei 6000 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet nach Herstellerangabe weiterbehandelt.

2.2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* (Mullis *et al.*, 1986). Sie wurde in dieser Arbeit für Klonierungsarbeiten, Überprüfen von Deletionen oder Insertionen von Genen und das Erstellen der Transposon-DNA verwendet.

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.4 im Materialteil aufgeführt. Die Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotide im *Annealing*-Schritt wird über die Schmelztemperatur berechnet, welche sich aus 2 °C für jedes A/T-Paar und 4 °C für jedes G/C-Paar zusammensetzt und wurde mithilfe des Programmes DNAMAN Version 6 (Lynnon Corporation) bestimmt.

Für die PCR wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Die TaKaRa Ex Taq[®]-Polymerase (TAKARA BIO INC.) besitzt aufgrund der 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine Korrekturfunktion, sodass weniger Fehler in den neuen DNA-Fragmenten auftreten, weshalb sie sich für Klonierungen und die Erstellung von Fragmenten für Sequenzierungen eignet. Der 50 µl-Ansatz beinhaltete in H₂O 5 µl 10 x Polymerasepuffer, 5 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM), 4 µl 25 mM MgCl₂, je 2,5 µl der Oligonukleotide (10 µM), 10-100 ng Template-DNA und 0,5-1 U TaKaRa Ex Taq[®]-Polymerase.

Die PANScripT-Polymerase (PAN-Biotech) wurde für analytische Zwecke eingesetzt. Hierfür wurde ein 25 µl-Ansatz mit 2,5 µl 10 x Polymerasepuffer, 2,5 µl dNTP-Mix (je 1 mM), 1,5 µl 50 mM MgCl₂, je 1 µl der Oligonukleotide (10 µM), 10-100 ng Template-DNA und 0,5-1 U PANScripT-Polymerase verwendet.

Die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) wurde zur Erstellung der Transposon-DNA verwendet, da sie glatte Enden produziert und durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine Korrekturfunktion besitzt. Es wurde ein 50 µl-Ansatz verwendet, der 5 µl 10 x Polymerasepuffer, 5 µl dNTP-Mix (je 2 mM), 3 µl 25 mM MgCl₂, je 2,5 µl der Oligonukleotide (10 µM), 10-100 ng Template-DNA und 0,1-0,5 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase behielt.

Im Anschluss wurde die PCR-Reaktion durch die Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.6) analysiert.

Die nachfolgende Tabelle enthält die PCR-Protokolle der verschiedenen Polymerasen.

Tabelle 2.9: PCR-Protokolle der verschiedenen Polymerasen

	TaKaRa Ex Taq	PANScript	Phusion High-Fidelity
Verwendung	Klonierung, Sequenzierung	Analytische Zwecke	Erstellung des Transposons
Primäre Denaturierung	95 °C 10 min	95 °C 10 min	98 °C 30 sec
Denaturierung	95 °C 30 sec	95 °C 30 sec	98 °C 10 sec
Annealing	52 °C – 60 °C 30 sec	52 °C – 60 °C 30 sec	52 °C – 60 °C 15 sec
Elongation	68 °C 1 min/kb	72 °C 1 min/kb	72 °C 30 sec/kb
Zyklen	30 x	30 x	30 x
Finale Elongation	68 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min
Lagerung	16 °C	16 °C	4 °C

2.2.2.5 Restriktion von DNA

Die Restriktion der DNA erfolgte mit Enzymen und Puffersystemen der Firmen Roche und Fermentas und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für analytische Zwecke erfolgte die enzymatische Restriktion mit 100-300 ng Plasmid-DNA über 1 h bei 37 °C. Bei einem präparativen Ansatz wurden 700-1000 ng über einen Zeitraum von 4 h hydrolysiert. Bei der Restriktion mit Restriktionsenzymen, die aufgrund unterschiedlicher Puffer nicht gleichzeitig verwendet werden konnten, wurde der Ansatz zwischen den einzelnen Schritten mit dem *illustra CFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* oder einer Isopropanolfällung aufgereinigt (2.2.2.7).

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierfür wurden 1-2 % Agarosegele hergestellt, indem die Agarose mit TAE-Puffer aufgeköcht und in eine horizontale Agarosegelkammer gegossen wurde. Nach dem Aushärten wurde die

Kammer mit TAE-Puffer gefüllt und die DNA-Proben, die zuvor mit ca. $\frac{1}{4}$ Volumen GEBS-Puffer versetzt worden waren, in die Geltaschen aufgetragen. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde zusätzlich der Längenstandart *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* der Firma Thermo Scientific mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte unter einer Spannung von 70-120 V über 30-50 min. Im Anschluss wurde das Gel im Ethidiumbromidbad (1 mg/l) über 20 min gefärbt und die DNA-Banden mit UV-Licht (260 nm) dargestellt und dokumentiert (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad). Für präparative Zwecke wurden die gewünschten Banden mithilfe eines Skalpells unter UV-Licht ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (2.2.2.7). Alternativ konnte das Gel mit einer 0,1 % Methylenblau-Lösung angefärbt werden, wenn Ethidiumbromid vermieden werden sollte. Nach dem Entfärben des DNA-freien Gels mit Wasser konnte anschließend die gewünschte Bande ausgeschnitten werden.

2.2.2.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und enzymatischen Reaktionen erfolgte mit Hilfe des *illustra CFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von GE Healthcare nach Angabe des Herstellers.

Zur Aufreinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen wurde alternativ eine Isopropanolfällung durchgeführt, wodurch Salze und Pufferrückstände entfernt werden. Zum Restriktionsansatz wurden 0,7 Volumenanteile Isopropanol und 0,1 Volumenanteile 3 M Na-Acetat (pH 5,2) gegeben und bei -20 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 16 000 g und 4 °C für 10-15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 100 µl kalten Ethanol 70 % zum Pellet hinzugegeben, um den Isopropanol durch flüchtiges Ethanol zu ersetzen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 16 000 g bei 4 °C über 10-15 min wurde ebenso der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde daraufhin in Wasser gelöst.

2.2.2.8 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase von Roche verwendet. Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment standen dabei in einem Verhältnis von 1:5. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 10 µl und die Ligation wurde entweder für 4 h bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Für die anschließende Transformation in *E. coli* wurden 5-10 µl des Ansatzes eingesetzt (2.2.1.5).

2.2.2.9 Sequenzierung von DNA

Nach der Klonierung oder Komplementation wurde die Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkte genomischer DNA zur Überprüfung von der Firma GATC Biotech sequenziert. Dafür wurden

Standardoligonukleotide der Firma oder eigene Oligonukleotide verwendet. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden anschließend mit dem Programm CLC Workbench 6 ausgewertet.

2.2.2.10 *In silico* Klonierung

Zur Planung von Klonierungen wurden diese zuvor *in silico* mit dem Programm CLC Workbench 6, bzw. Workbench 7 durchgeführt.

2.2.2.11 EZ-Tn5-Transposonmutagenese

2.2.2.11.1 Erstellung des Transposons

Für die Transposonmutagenese wurde das EZ-Tn5-System verwendet, welches auf den Arbeiten von Goryshin und Reznikoff (1998) und Goryshin *et al.* (2000) basiert.

Das Plasmid pHK9 (Kavermann *et al.*, 2003) beinhaltet im Plasmid pMOD eine *cat*-Kassette (Chloramphenicolresistenz), die sich zwischen den jeweils 19 Basenpaar großen Mosaikenden (ME), an welche die Transposase bindet, befindet. Alternativ wurde mit einer Kanamycinresistenz gearbeitet. Hierfür wurde das Plasmid pJR8 verwendet, in welchem eine *aphA3*-Kassette im Plasmid pMOD integriert ist.

Das Transposon wurde durch das PCR-Verfahren mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2.2.2.4) vervielfältigt. Die Oligonukleotide ME Plus 9 – 3' primer und ME Plus 9 – 5' primer binden dabei an die Mosaikenden. Im Anschluss wurde die Transposon-DNA durch die Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt, wobei das Gel mit Methylblau gefärbt wurde, um den Kontakt der DNA mit Ethidiumbromid zu vermeiden.

2.2.2.11.2 *In vitro*-Transposition

Die *in vitro*-Transposition wurde nach dem Protokoll von *EZ-Tn5TM Custom Transposome Construction Kits* von Epicentre in einem 10 µl-Reaktionsansatz durchgeführt. Hierfür wurden 1 µl 10 x Reaktionspuffer, 0,2 µg Ziel-DNA und die equimolare Menge der Transposon-DNA in H₂O_{dest.} zusammengefügt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 U EZ-Tn5 Transposase (1 U/µl) und der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 2 h inkubiert. Durch das Hinzufügen von 1 µl EZ-Tn5 10 x Stopplösung und Erhitzen auf 70 °C für 10 min wurde die Reaktion beendet. Für die anschließende Transformation in die Bakterien wurde 1 µl des *in vitro*-Reaktionsansatzes verwendet und auf die Antibiotikaresistenz des Transposons selektioniert. Die Menge des *in vitro*-Reaktionsansatzes wurde angepasst, wenn im Anschluss eine geringere Anzahl an Transformationsreaktionen durchgeführt wurden.

2.2.2.11.3 *In vivo*-Transposition

Für einen 8 µl-Reaktionsansatz der *in vivo*-Transposition wurden nacheinander 2 µl Transposon-DNA (100 ng/µl), 4 U EZ-Tn5 Transposase (1 U/µl) und 2 µl Glycerin hinzugefügt und gemischt. Für kleinere Reaktionsansätze wurden die Mengen dementsprechend umgerechnet. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch sich die Transposase an die Transposon-DNA zu einem Komplex bindet. Im Anschluss erfolgte die Elektroporation von 1 µl des Reaktionsansatzes in elektrokompetente Bakterien (2.2.1.7). Um die Mutanten zu erhalten, wurden die Bakterien auf die Antibiotikaresistenz des Transposons selektioniert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Bakterienlysaten

Zur Herstellung von Bakterienlysaten von *H. pylori* wurde eine Übernachtskultur in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die OD₅₅₀ bestimmt und die Suspension bei 6000 g über 5 min zentrifugiert. Nachdem der Abnahme des Überstandes wurde das Bakterienpellet mit 10 µl 2 x SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol pro 0,1 OD₅₅₀ versetzt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 98 °C aufgeköcht und anschließend zur SDS-PAGE (2.2.3.4) verwendet oder zur Aufbewahrung eingefroren.

2.2.3.2 Zellfraktionierung von *H. pylori* durch Ultraschall und Ultrazentrifugation

Um die bestimmte Lokalisation eines Proteins zu bestimmen, wurden die Bakterien durch Ultraschall und anschließender Ultrazentrifugation in eine cytoplasmatische Fraktion und eine Membranfraktion unterteilt.

Hierfür wurden die *H. pylori*-Bakterien von 5 Platten einer Übernachtskultur in 10 ml PBS resuspendiert. Nach einem Waschschrift mit 10 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer pH = 8,0 wurde das Pellet in 2 ml Tris-HCl-Puffer mit Proteaseinhibitoren 1 mM Na-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin und 1 µM Pepstatin (Tris-HCl*) resuspendiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Ultraschall (Sonifier® S-250A von Brandson, Leistungsregelung 5, Einschaltdauer 40-50 %) über einen Zeitraum von 1 min lysiert, bis der Inhalt klar wurde, sofort auf Eis gestellt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 4000 rpm über 10 min bei 4°C setzten sich die nicht aufgebrochenen Bakterien und Zellreste ab. Der Überstand wurde anschließend in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 45 000 bzw. 100 000 rpm für 1 h bei 4°C zentrifugiert, wodurch sich die Membranfraktion von der cytosolischen Fraktion löst und sich als Pellet absetzt. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl Tris-HCl-Puffer gelöst. Für die nachfolgende Analyse am Western-Blot wurden jeweils 20 µl der Fraktionen mit 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 98 °C aufgeköcht.

2.2.3.3 Proteinfällung (Wessel und Flügge, 1984)

Zur Ausfällung der Proteine wurden 300 µl der Probe nacheinander mit 600 µl Methanol, 200 µl Chloroform und 200 µl Wasser versehen und jeweils gemischt. Durch Zentrifugation bei 15 000 rpm über 2 min wurde der Ansatz in Phasen unterteilt und im Anschluss die obere wässrige Phase verworfen. Danach wurde 1ml Methanol zur Zwischen- und unteren Phase hinzugefügt, der Ansatz gemischt und erneut bei 15 000 rpm über 5 min zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20-50 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 10-60 min gerüttelt und für 10 min bei 98 °C aufgeköcht.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese basiert auf dem Prinzip von Laemmli (1970) und wurde nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt.

Hierfür wurde ein kontinuierliches Polyacrylamid-Gel (Ahn *et al.*, 2001) mit einer Acrylamidkonzentration von 10 % gegossen und 4 µl bis 20 µl der Proteinproben, die zuvor mit 2 x SDS-Probenpuffer aufgeköcht worden waren, aufgetragen. Der Proteinmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* von Thermo Scientific wurde zur Abschätzung der molekularen Masse mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte im vertikalen Elektrophoresesystem mit SDS-Elektrophoresepuffer unter einer Spannung von 80 V über 90 bis 120 min.

2.2.3.5 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss an die SDS-PAGE durch das *semi-dry* Blotsystem (Towbin *et al.*, 1992) vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen, indem zwischen zwei Graphitplatten senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld angelegt wurde.

Hierfür wurden jeweils 2 dünne und dicke Filterpapiere in Western-Transfer-Puffer getränkt und luftblasenfrei auf die Graphitanode gestapelt. Es folgte die PVDF-Membran, welche zuvor in Methanol aktiviert und in Western-Transfer-Puffer geschwenkt worden war, das Polyacrylamidgel, 4 weitere Filterpapiere und die Graphitkathode. Der Proteintransfer wurde bei 1,25 mA/cm² über 75 min durchgeführt.

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran getrocknet, mit Methanol reaktiviert und mit 5 ml 3 % BSA in TBS über 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindungen an der Membran zu verhindern. Danach wurde der primäre Antikörper hinzugefügt und für mindestens 1 h, anhängig vom Antikörper, inkubiert. Am Anschluss erfolgten 4 Waschschriffe über jeweils

10 min mit 10 ml Waschpuffer TBS-T. Darauf wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Protein A, AP-gekoppelt) in 5 ml TBS-T versehen, für 1 h inkubiert und erneut viermal mit TBS-T gewaschen. Zur Entwicklung der AP-Konjugaten wurden 10 ml frisch angesetzte Detektionslösung hinzugefügt, unter Schwenken inkubiert, bis die Banden sichtbar wurden und zuletzt mit Wasser abgestoppt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde das Programm *GraphPad Prism 5* verwendet. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal unabhängig durchgeführt und aus den Ergebnissen der Mittelwert mit Standardabweichung errechnet.

Ergebnisse, wie Transformationsfrequenzen, Plasmidtransferraten und Raten der Elektroporation, sind in dieser Arbeit standardmäßig in den Graphen in logarithmischen Skalen der vertikalen Achse dargestellt, da diese Variablen im Vergleich mehrere Größenordnungen umfassen, beispielsweise in Hofreuter *et al.* (2001).

Die Transformationsexperimente wurden pro Ansatz mit einer Lebendzellzahl von 10^9 Bakterien durchgeführt. Für die Variablen, die keine Transformanten erzeugten, bedeutet dies, dass die Transformationsfrequenz im Schnitt nicht höher als 10^{-9} (Transformanten / (Lebendzellzahl x DNA [μg])) liegen kann. Deshalb wurden für diese Variablen zur statistischen Analyse Frequenzen von 10^{-9} angenommen. Aufgrund der logarithmischen Skala wurden zur statistischen Analyse die Frequenzen, bzw. Raten, mit dem dekadischen Logarithmus transformiert (GraphPad Software Inc., 2014). Dabei wurden die logarithmierten Werte durch die graphische Darstellung und den D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung geprüft. Unter Annahme einer Normalverteilung nach der logarithmischen Transformation wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit den parametrischen Tests T-Test und ANOVA mit Tukey post-hoc-Test erhoben. Hierbei wurde im F-Test, bzw. Bartlett-Test beachtet, dass keine signifikant unterschiedlichen Varianzen aufgezeigt werden. Die statistischen Signifikanzen wurden in *GraphPad Prism* mit * für $P \leq 0,05$, ** für $P \leq 0,01$ und *** für $P \leq 0,001$ dargestellt.

den verschiedenen *H. pylori*-Stämmen aufzeigen. Zwischen *hp1473* und *hpp12_1451* beträgt die Sequenzhomologie 94 % (s. Abbildung 3.2), zwischen den entsprechenden Proteinen 96 %. *hp1473*, bzw. *hpp12_1451* besteht aus 576 Basenpaaren. In den Programmen BLAST und CLC wird das zugehörige Protein als Amidophosphoribosyltransferase beschrieben und zur „Superfamilie ComFC“ zugehörig bezeichnet, die bei verschiedensten Bakterien eine Rolle im Transformationsmechanismus spielt.

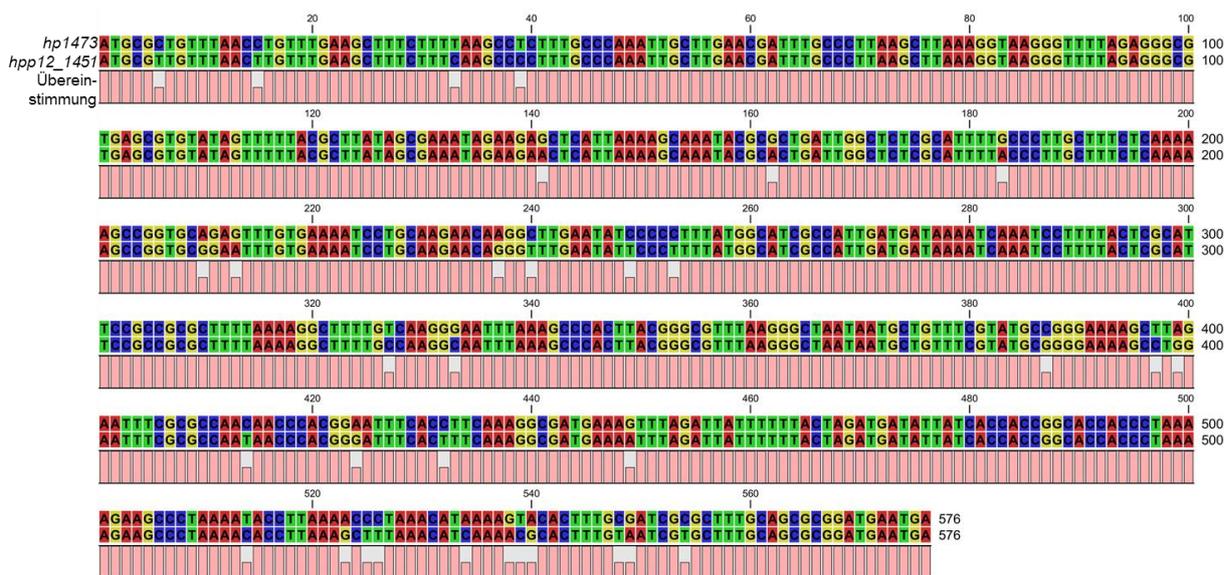


Abbildung 3.2: Vergleich des konservierten Kandidatengens in 26695 und P12

Die Gensequenzen *hp1473* (*H. pylori* Stamm 26695) und *hpp12_1451* (Stamm P12) weisen nur geringe Unterschiede (6 %) auf. Der Vergleich wurde mit *CLC DNA Workbench 6* erstellt.

Zur Untersuchung des Kandidatengens wurde der *H. pylori*-Stamm P12 verwendet, welcher sich gut für *in-vitro*-Versuche im Labor eignet. Die Abbildung 3.3 zeigt die Lage des konservierten Kandidatengens im Chromosom zwischen den benachbarten Genen, die für die geplante Deletion im Stamm P12 eine Rolle spielen, für die Stämme 26695 und P12. Beide Stämme weisen eine ähnliche Anordnung der Gene auf.

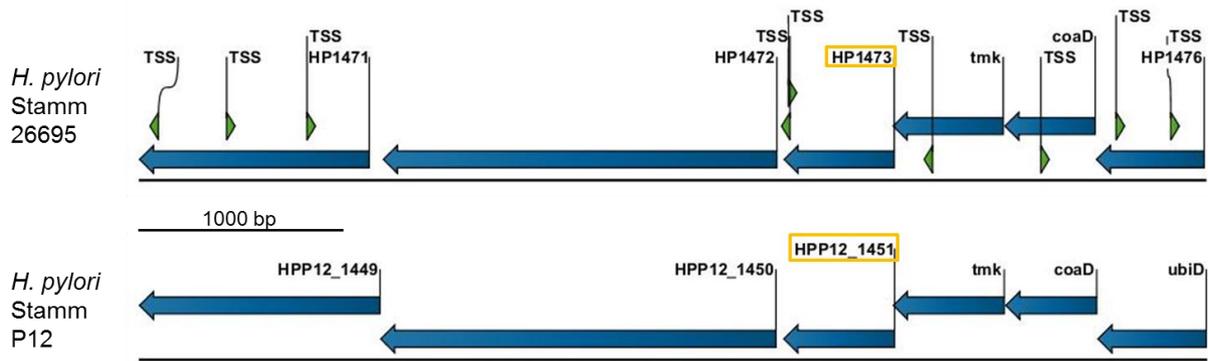


Abbildung 3.3: Kandidatengen *hp1473*, bzw. *hpp12_1451* im Chromosom

Es werden schematisch *hp1473* (Stamm 26695) und *hpp12_1451* (Stamm P12) mit den umliegenden Genen im Chromosom dargestellt. Zusätzlich sind die Transkriptionsstartpunkte (TSS) eingezeichnet.

3.1.2 Erstellung der Deletionsmutante P12Δ*hpp12_1451*

Die Deletionsmutante P12Δ*hpp12_1451* (JR-H14) wurde mit dem Kontraselektionssystem nach Debowski *et al.* (2012) hergestellt, wobei die markerfreie Deletion des Gens in nur einem Transformationsschritt durch das Xer-Rekombinase-System erreicht wird.

Es wurde hierfür das Deletionsplasmid pJR3 (s. Abbildung 3.4) angefertigt. Die flankierenden Bereiche des zu deletierenden Gens *hpp12_1451* wurden mittels PCR mit den Primern JR1 und JR16 für das vorgeschaltete Fragment und JR3 und JR4 für das nachgeschaltete Fragment vervielfältigt und aufgereinigt. Im Anschluss wurden sie über die Schnittstellen *KpnI*, *SaII* (vorgeschaltetes Fragment) und *NotI*, *SacII* (nachgeschaltetes Fragment) in das pBluescript II SK (+) eingebracht. Da sich *hpp12_1451* und das nachgeschaltete Gen *hpp12_1452*, das in CLC als *tmk* bezeichnet wird, in Bezug auf 27 Basenpaare überschneiden, konnte dieses kurze Gensegment nicht deletiert werden, um das benachbarte Gen nicht zu kürzen. Der Abschnitt codiert 9 Aminosäuren des N-terminalen Endes des Proteins HPP12_1451. Zwischen die flankierenden Bereiche wurde über die *BamHI*-Schnittstelle die *rpsL-cat*-Kontraselektionskassette, zu beiden Seiten umgeben von einer *dif*-Sequenz, kloniert. Diese Kassette vermittelt sowohl eine Chloramphenicolresistenz (Cam^R), als auch eine Streptomycinsensitivität (Strep^S). Die *dif*-Sequenzen dienen als Erkennungssequenz der Xer-Rekombinase. Zum Überprüfen der Klonierung wurde das Plasmid pJR3 sequenziert.

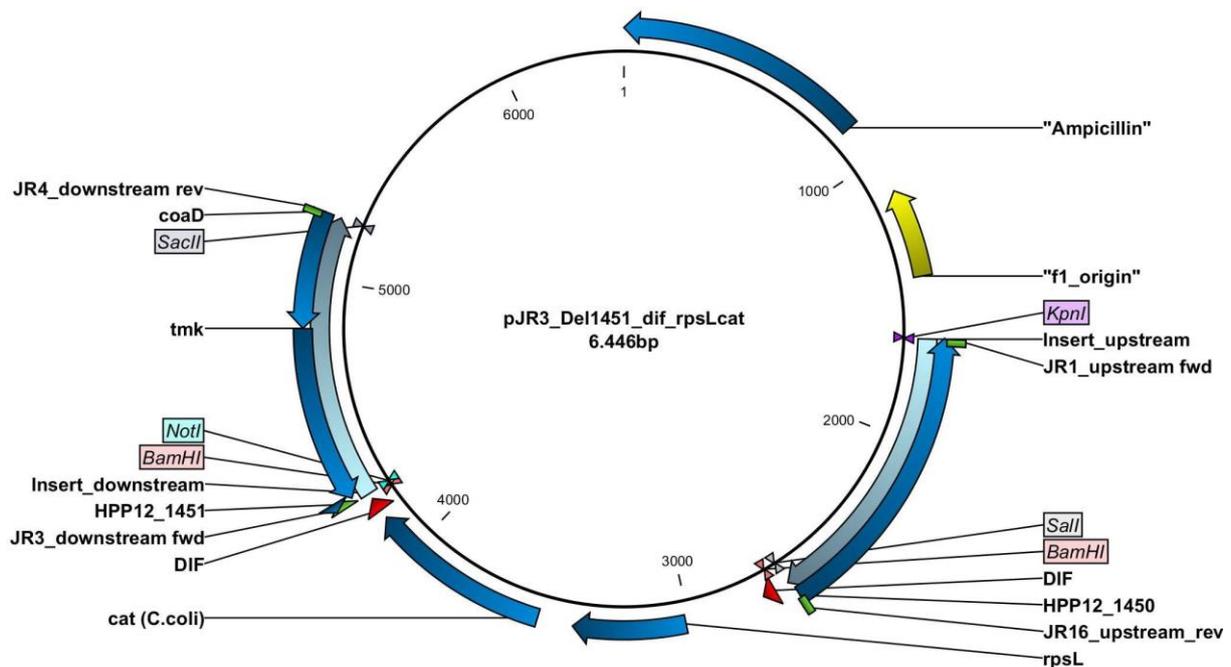


Abbildung 3.4: Deletionsplasmid pJR3

Das Deletionsplasmid pJR3 beinhaltet die flankierenden Bereiche von *hpp12_1451*. Dazwischen wurde die Kontraselektionskassette *rpsL-cat*, umgeben von den *dif*-Sequenzen als Erkennungsmerkmal für die Xer-Rekombinase, eingebracht.

Durch Transformation von pJR3 in den streptomycinresistenten *H. pylori*-Stamm P12 (P12 Strep, JR-H01) und anschließender homologer Rekombination wurde *hpp12_1451* im Chromosom durch die Kontraselektionskassette, flankiert von *dif*-Sequenzen, ersetzt. Hierdurch erhielt P12 eine Chloramphenicolresistenz (Cam^R) und gleichzeitig eine Streptomycinsensitivität (Strep^S). Das Streptomycinsensitivität-vermittelnde *rpsL*-Gen ist gegenüber der vorhandenen Resistenz dominant. Die erhaltenden Klone wurden durch Chloramphenicol selektioniert und direkt im Anschluss auf Nährplatten mit Streptomycin übertragen. Dadurch entstand ein Selektionsdruck zur Streptomycinresistenz, sodass die bakterieneigene Xer-Rekombinase an den *dif*-Sequenzen die Kontraselektionskassette mit der Streptomycinsensibilität herausschneidet. Das Bakterium besitzt nun wieder eine Streptomycinresistenz (Strep^R). Das Ergebnis ist, abgesehen von einer *dif*-Sequenz, eine markerfreie Deletion des Gens *hpp12_1451* (s. Abbildung 3.5), ausgenommen des kurzen Abschnitts, der sich mit *hpp12_1452* überschneidet. Zur Kontrolle wurde die chromosomale DNA der Mutante isoliert und die Deletion per PCR mit den Primern JR1 und JR4 bestätigt (s. Abbildung 3.6).

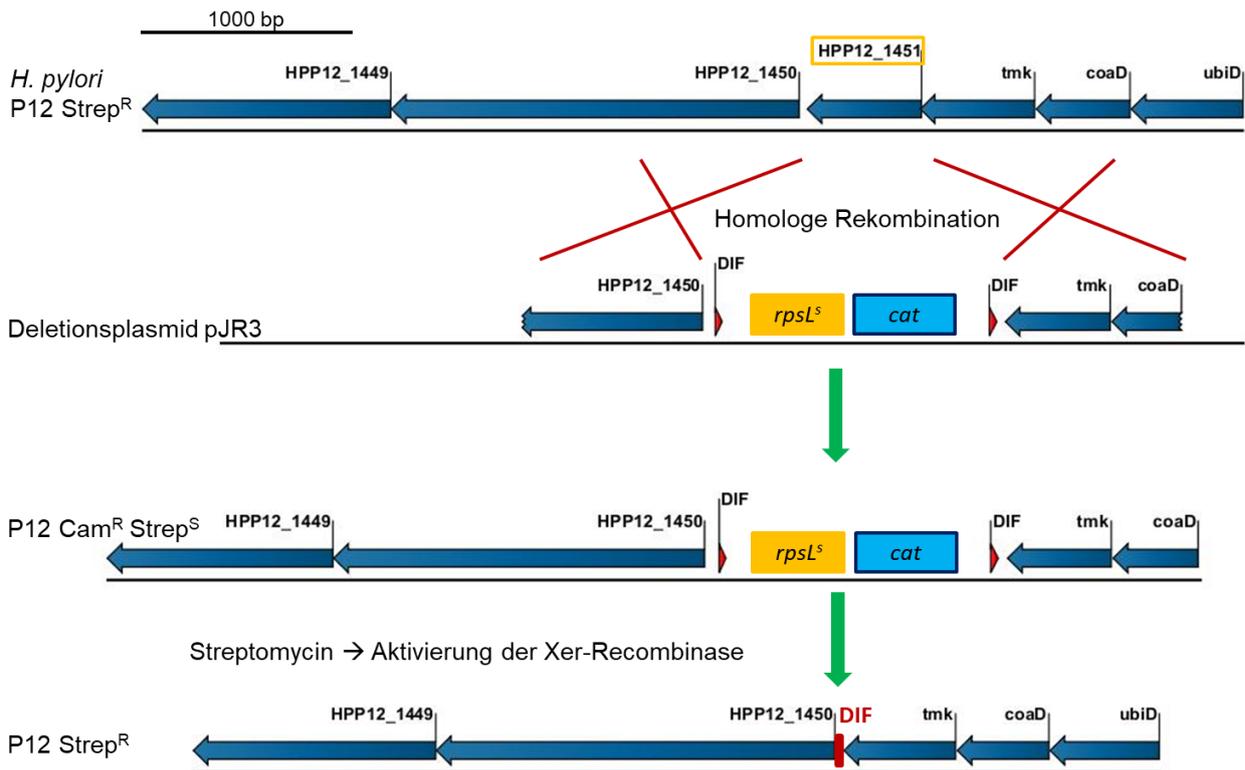


Abbildung 3.5: Deletion von *hpp12_1451*

Die Abbildung zeigt den Vorgang der Deletion von *hpp12_1451* über Kontraselektion. Nach dem Einbringen des Plasmides pJR3 durch Transformation, wird über homologe Rekombination das Gen im Chromosom durch die Kontraselektionskassette ersetzt. Durch den anschließenden Selektionsdruck von Streptomycin, wird diese über die Xer-Recombinase herausgeschnitten, sodass nur eine *dif*-Sequenz vorhanden ist.

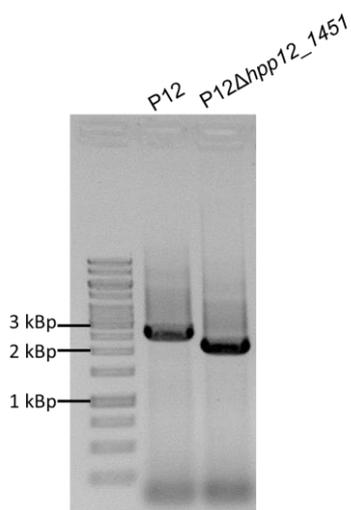


Abbildung 3.6: PCR-Nachweis der Deletion

Die Gelelektrophorese zeigt die Produkte der PCR über P12 und über die Deletionsmutante mit den Primern JR1 und JR4. Das PCR-Produkt über P12 ist mit ca. 2560 Basenpaaren größer als das von P12Δ*hpp12_1451*(JR-H14) mit ca. 2100 Basenpaaren. Die Deletion des Gens wurde somit nachgewiesen.

3.1.3 Untersuchung der Deletionsmutante auf Transformationsfähigkeit

Es wurden erste Transformationsexperimente mit verschiedenen Antibiotikaresistenzen in unterschiedliche Gen-Loci (mit pJP99, pSP76, pWS48) durchgeführt. Hierbei wurden stets der Ausgangsstamm P12 Strep und P12 Δ *hpp12_1451* (JR-H14) gleichzeitig transformiert. Die Deletionsmutante erwies sich hier als nicht transformierbar, es zeigten sich keine transformierten Klone auf den Selektionsplatten.

Die ausführlichen Experimente mit Bestimmung von Transformationsraten, inklusive der Komplementanten (s. 3.1.4) sind in Abschnitt 3.1.5 aufgeführt und grafisch dargestellt.

3.1.4 Komplementation des Gens *hpp12_1451*

Zum Nachweis, dass wirklich das deletierte Gen *hpp12_1451* bei der Transformationskompetenz eine Rolle spielt und kein anderes Gen des Chromosoms beim Erstellen der Mutante beeinträchtigt wurde, wird die Mutante komplementiert. Das zu untersuchende Gen wird in die Deletionsmutante in einen anderen Gen-Locus eingebracht, um den Phänotyp, in diesem Fall die Transformationskompetenz, wiederherzustellen.

Die Komplementation fand auf zwei unterschiedliche Arten statt. Einerseits wurde das Gen über ein pHel3-Shuttle-System eingebracht, andererseits wurde das Gen ins Chromosom inseriert.

3.1.4.1 Erstellen der Komplementationsplasmide pJR4, pJR5, pJR6 und pJR7

Zur Komplementation der *hpp12_1451*-Mutante wurde das pHel3-Shuttle-Plasmid verwendet, das sowohl in *E. coli* als auch in *H. pylori* repliziert wird (Heuermann und Haas, 1998). Die Klonierung wurde mit einem Derivat von pHel3, dem Plasmid pVK18, durchgeführt, bei welchem das betreffende Gen unter Kontrolle des *alpA*-Promotors steht. Der *alpA*-Promotor ist für die Expression von AlpA, ein Protein der äußeren Membran (Odenbreit *et al.*, 1999), verantwortlich. Der Vorteil dieses Promotors ist, dass er zwar in *H. pylori* das nachfolgende Gen exprimiert, jedoch nicht in *E. coli*. Eine toxische Wirkung durch *H. pylori*-Proteine in *E. coli*, wie dies speziell für einige *H. pylori*-Proteine der äußeren Membran bekannt ist, wird somit vermieden.

Das Plasmid pVK18 wurde mit den Enzymen *NdeI* und *BglII* geschnitten, um das Rückgrat für die Klonierung zu erhalten. Die PCR-Fragmente mit *hpp12_1451* wurden mit den Primern JR18 und JR19 bzw. JR17 und JR19 über die genomische DNA von P12 erstellt. Der Primer JR17 enthält dabei einen *myc*-Tag. Das Plasmid pJR4 (s. Abbildung 3.7) wurde durch Inserieren des geschnittenen PCR-Fragments aus der Amplifikation mit JR18 und JR19 und dem aufgeschnittenen Plasmid pVK18 angefertigt. Das Plasmid pJR5 wurde wie pJR4, jedoch mit dem PCR-Fragment durch die Primern JR17 und JR18 erstellt, wodurch das spätere

Protein HPP12_1451 n-terminal zusätzlich einen Myc-Tag erhält. Dies ermöglicht den Nachweis des Proteins durch Antikörperbindung. Zum Überprüfen der eingebrachten Fragmente wurden die Plasmide mit dem Primer JR20 sequenziert.

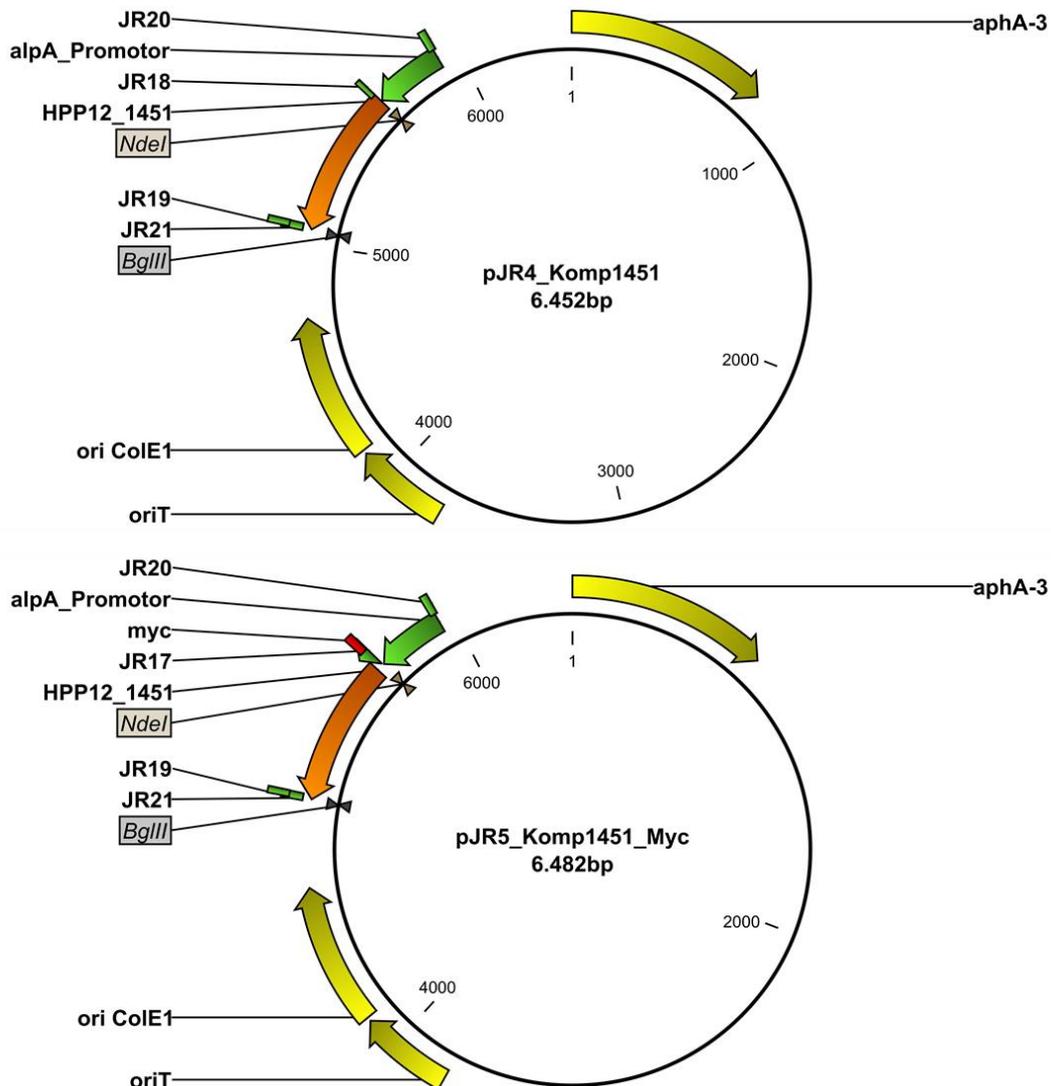


Abbildung 3.7: Komplementationsplasmide pJR4 und pJR5

Dargestellt sind die Plasmide zur Komplementation von *hpp12_1451*. *hpp12_1451* wurde über die Schnittstellen *NdeI* und *BglIII* in das pHel3-Shuttle-System eingebracht. Vorgeschaltet ist der *alpA*-Promotor. Im Plasmid pJR5 findet sich zusätzlich ein *myc*-Tag zur Darstellung der Proteinexpression.

Des Weiteren wurden Plasmide für die Komplementation im Chromosom erstellt. Hierfür eignet sich der *moeB*-Locus, welcher für die Kolonisierung im *H. pylori*-Gerbil-Tiermodell nachweislich nicht essentiell ist (Kavermann *et al.*, 2003). Das Gen *moeB* codiert für ein Protein der Molybdopterin-Biosynthese und findet sich inklusive seiner flankierenden Bereiche sowohl im *H. pylori*-Stamm 26695 (*hp0755*) als auch in P12 (*hpp12_0765*) (s. Abbildung 3.8).

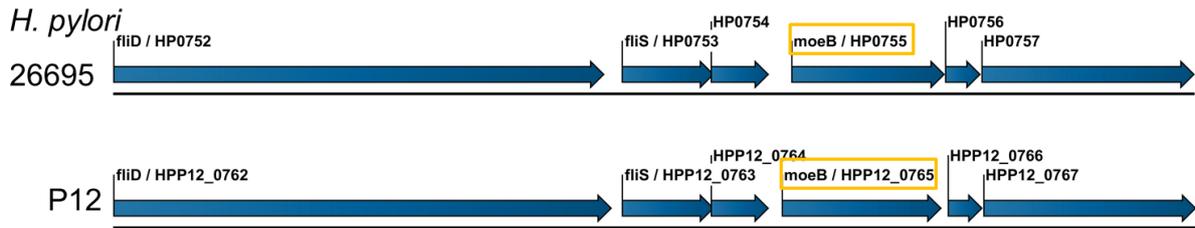


Abbildung 3.8: *moeB*-Locus in den Stämmen 26695 und P12

Die Abbildung zeigt die gleiche Anordnung der Gene um den *moeB*-Locus in den Stämmen 26695 und P12.

Für die Klonierung der Komplementationsplasmide für P12 konnte somit das Plasmid pSP76 mit der Gensequenz aus dem Stamm 26695 verwendet werden, da eine homologe Rekombination zwischen den Sequenzen aus 26695 und P12 möglich ist. Das Plasmid pSP76 enthält eine *aphA*-3-Kassette im *moeB*-Locus (*hp0755*) und dessen flankierende Bereiche von *hp0752* (teilweise) bis *hp0757*. Die PCR-Fragmente wurden mit den Primern JR20 und JR21 über die bereits vorhandenen Plasmide pJR4 und pJR5 erstellt. Hierdurch wurde *hpp12_1451* mit dem *alpA*-Promotor amplifiziert und über die Schnittstellen *KpnI* und *XhoI* in pSP76 eingebracht. Das Plasmid pJR6 entstand durch die Insertion des PCR-Fragmentes über pJR4 (*alpA*-Promotor – *hpp12_1451*), während für pJR7 das PCR-Fragment über pJR5 eingebracht wurde, weshalb hier die Reihenfolge *alpA*-Promotor – *myc*-Tag – *hpp12_1451* besteht. Die Plasmide sind in Abbildung 3.9 dargestellt und wurden auf ihre Korrektheit mit den Primern JR18 und JR21 sequenziert.

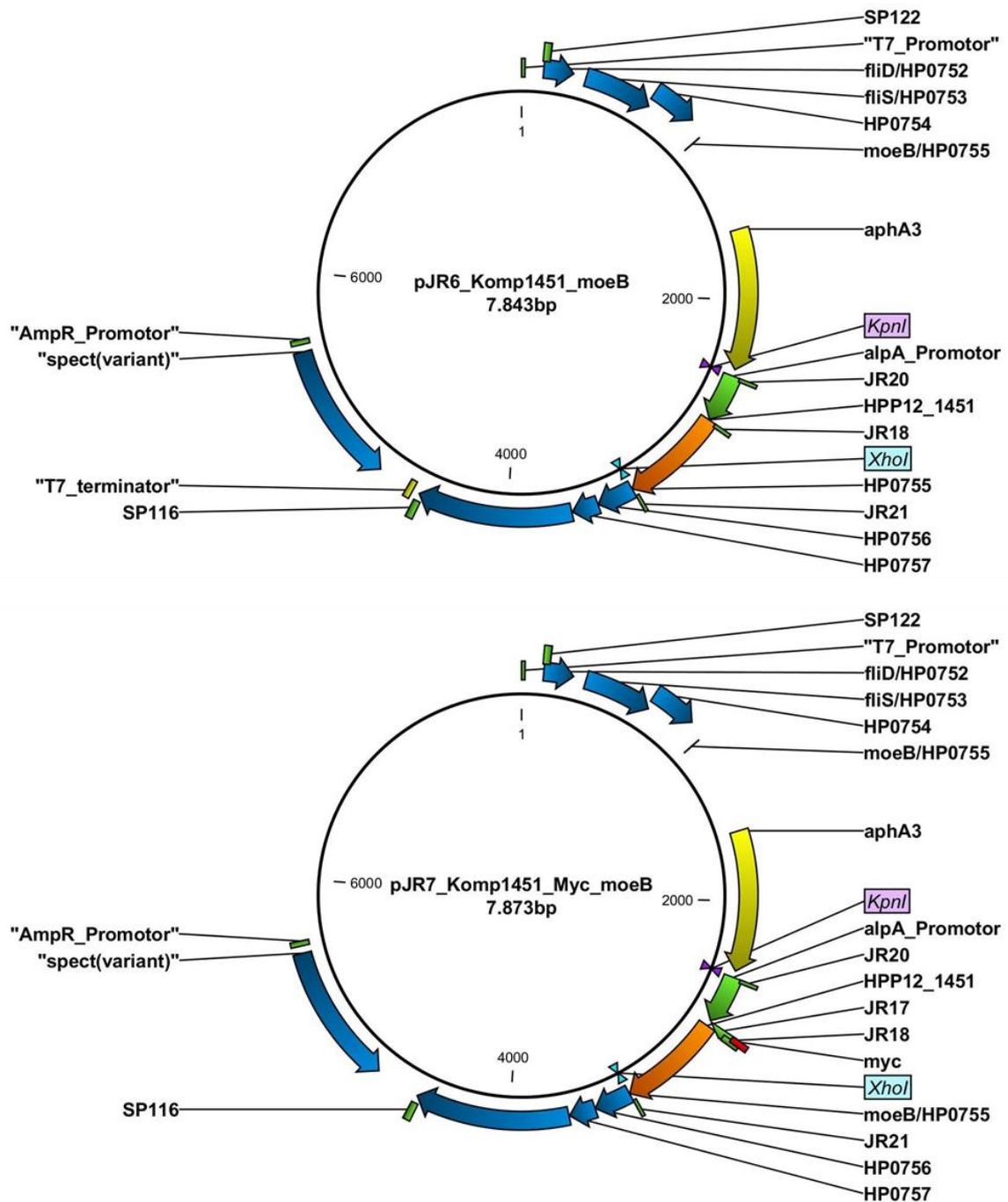


Abbildung 3.9: Komplementationsplasmide pJR6 und pJR7

Dargestellt sind die Plasmide pJR6 und pJR7 zur Komplementation von *hpp12_1451* im *moeB*-Locus. pJR7 hat zusätzlich einen *myc*-Tag vor *hpp12_1451*. In beiden Plasmiden ist der *alpA*-Promotor vor *hpp12_1451* vorgeschaltet.

3.1.4.2 Einbringen der Komplementationsplasmide

Zuerst wurde versucht, die Komplementationsplasmide über Transformation und alternativ über Elektroporation in die Deletionsmutante P12Δ*hpp12_1451* (JR-H14) einzubringen. Dies war jedoch erfolglos, eine direkte Komplementation war weder über das Shuttle-System, noch über chromosomales Inserieren möglich.

Deshalb wurde in P12 Strep im ersten Schritt über Transformation die jeweiligen Komplementationsplasmide pJR4, pJR5, pJR6, pJR7 eingebracht, dabei entstanden folgende veränderte Stämme:

- mit pJR4 → P12+*hpp12_1451* (JR-H42)
- mit pJR5 → P12+*myc_hpp12_1451* (JR-H44)
- mit pJR6 → P12+*hpp12_1451_moeB* (JR-H34)
- mit pJR7 → P12+*myc_hpp12_1451_moeB* (JR-H39)

Im zweiten Schritt wurde das Gen *hpp12_1451* mit dem Plasmid pJR3 markerfrei über das Kontraselektionssystem deletiert.

Durch Insertion von *hpp12_1451* in den *moeB*-Locus und Deletion des Gens ergaben sich folgende Komplementaten:

- P12+*hpp12_1451_moeB* (JR-H34) und pJR3 → P12Δ*hpp12_1451*+Komp_ *moeB* (JR-H37)
- P12+*myc_hpp12_1451_moeB* (JR-H39) und pJR3 → P12Δ*hpp12_1451*+Komp_ *myc_moeB* (JR-H41)

Die Deletion wurde per PCR mit den Primern JR1 und JR4, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, überprüft. Für den Nachweis der Insertion im *moeB*-Locus wurden in der PCR die Primer SP122 und SP116 verwendet (s. Abbildung 3.11). Die Abbildung 3.10 zeigt die Komplementation im Chromosom. Um sicherzugehen, dass die eingebrachte Gensequenz von *hpp12_1451* nicht mutiert ist, wurde ein PCR-Fragment mit den Primern SP122 und JR21 erstellt und sequenziert.

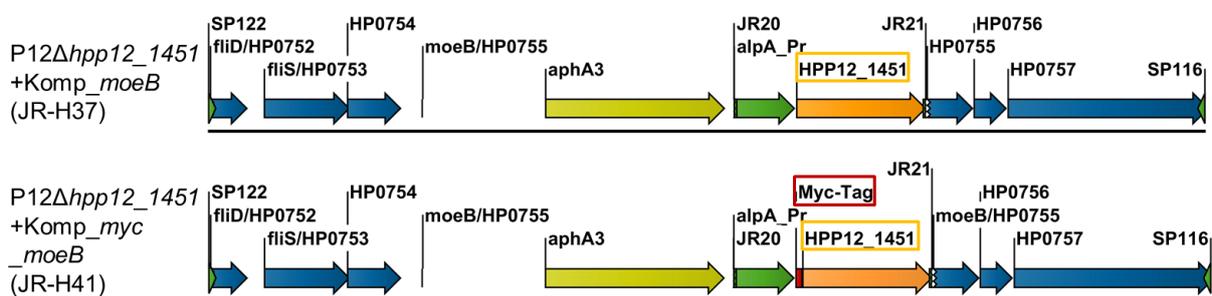


Abbildung 3.10: Komplementation im *moeB*-Locus

Die Abbildung zeigt die Komplementation von *hpp12_1451* mit einem *alpA*-Promotor im *moeB*-Locus nach Insertion durch homologe Rekombination. Es wurden zwei unterschiedliche Mutanten mit und ohne *myc*-Tag erstellt (rote Markierung). Die Primer SP122 und SP116 dienen dem PCR-Nachweis der Insertion. Mit den Primern JR20 und JR21 wurde die Komplementation sequenziert.

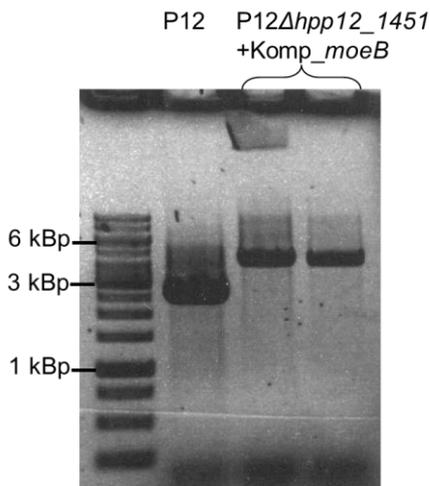


Abbildung 3.11: PCR-Nachweis der Komplementation im *moeB*-Locus

Die Gelelektrophorese zeigt die PCR-Produkte mit SP122 und SP116 über P12 (ca. 2600 Bp) und P12+*hpp12_1451_moeB* (ca. 4400 Bp). Die Insertion im *moeB*-Locus über homologe Rekombination muss folglich stattgefunden haben.

Bei der Komplementation über das pHel3-Shuttle-System wurden nach der Deletion von *hpp12_1451* folgende Komplementationsmutanten erstellt:

P12+*hpp12_1451* (JR-H42) und pJR3 → P12Δ*hpp12_1451*+Komp (JR-H45)

P12+*myc_hpp12_1451* (JR-H44) und pJR3 → P12Δ*hpp12_1451*+Komp_*myc* (JR-H48)

Wichtig war bei diesen Stämmen stets die Kultivierung auf einer Selektivserumplatte, in diesem Fall mit Kanamycin, um zu verhindern, dass die Stämme ihr pHel3-Shuttle-System, pJR4 bzw. pJR5, nicht verlieren. Die Deletion wurde per PCR überprüft. Zusätzlich wurden die *H. pylori*-Plasmide pJR4 und pJR5 aus den Komplementaten isoliert. Im PCR-Nachweis mit JR20 und JR19 über die Plasmide zeigt sich, dass die Bande über pJR4 kleiner war, als sie mit 870 Bp sein sollte (s. Abbildung 3.12). Durch die Sequenzierung wurde festgestellt, dass nur die ersten 331 Bp auf dem Komplementationsplasmid in *H. pylori* P12 enthalten sind. Die weiteren 245 Bp fehlen und wurden durch Wiederholungssequenzen des Shuttle-Plasmids ersetzt. Beim zweifachen Transformieren des Bakteriums wurde das Plasmid genetisch verändert. Diese Komplementante bietet die Möglichkeit, zu testen, wie sich ein Teilverlust des Gens auf die Transformationskompetenz auswirkt und wird im folgenden P12Δ*hpp12_1451*+Komp_{Teil} (JR-H45) genannt. Ebenso lieferte ein anderer Klon der gleichen Mutante das gleiche Ergebnis bezüglich der PCR und auch das gleiche Muster nach dem Schneiden von Restriktionsenzymen im Testverdau, sodass auch dieser Klon die Veränderung beinhaltet.

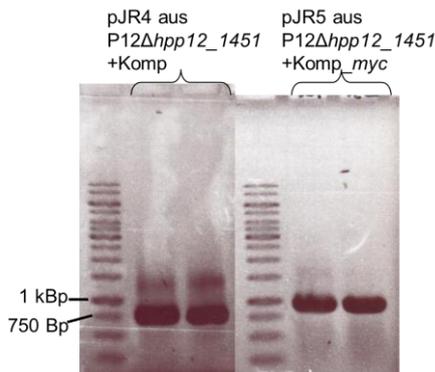


Abbildung 3.12: PCR-Nachweis der Komplementation im Shuttle-System

Die Gelelektrophoresen zeigen die PCR-Produkte mit den Primern JR 19 und JR20 über die isolierten *H. pylori*-Plasmide aus den Komplementanten P12Δ*hpp12_1451*+Komp (JR-H45) und P12Δ*hpp12_1451*+Komp_myc (JR-H48). Die Fragmente sollten ca. 870 Bp (P12Δ*hpp12_1451*+Komp) und ca. 900 Bp groß sein. Auffällig ist das deutlich kleinere Fragment von pJR4 in P12Δ*hpp12_1451*+Komp. In der darauffolgenden Sequenzierung ergab sich, dass nur 331 der 576 Bp von *hpp12_1451* vorhanden sind (genannt P12Δ*hpp12_1451*+Komp_{Teil}).

3.1.5 Untersuchung der verschiedenen Mutanten bezüglich ihrer Transformationsfähigkeit

Die ersten Testungen auf Transformation der Deletionsmutante P12Δ*hpp12_1451* im Vergleich zum Wildtyp P12 Strep wurden bereits in 3.1.3 beschrieben. Die Deletionsmutante konnte mit keinem der Plasmide pJP99, pSP76 und pWS48, die verschiedene Antibiotikaresistenzen in unterschiedlichen Gen-Loci enthalten, transformiert werden.

Des Weiteren wurde beim Erstellen der Komplementationsmutanten gezeigt, dass P12Δ*hpp12_1451* (JR-H14) nicht mit einem pHel-Shuttle-System (pJR4 und pJR5 auf Grundlage des pHel3-Shuttle), das nicht ins Chromosom inseriert, zu transformieren war.

Bei der Transformation der Komplementationsmutanten zeigten sich Kolonien auf den Selektivplatten. Zur Kontrolle, dass die Transformation erfolgreich stattgefunden hat, wurden einzelne Kolonien weitergestrichen, deren DNA isoliert und mit dieser PCR-Nachweise angefertigt, die die Insertion des zu transformierenden Genabschnittes im Genom zeigten. Beispielsweise besitzen die PCR-Produkte, erstellt mit den Primern WS67 und WS68 und der genomischen DNA der Stämme P12 Strep, P12Δ*hpp12_1451*+Komp_moeB (JR-H37) und P12Δ*hpp12_1451*+Komp_myc_moeB (JR-H41) nach Transformation mit pWS48, eine Größe von ca. 1500 Bp, gegenüber den PCR-Produkten der Ausgangsstämme von ca. 1050 Bp. Die Komplementation von *hpp12_1451*, sowohl im *moeB*-Locus, als auch über das pHel-Shuttle-System stellte die Transformationsfähigkeit von *H. pylori* wieder her.

Zur genaueren Einschätzung und Quantifizierung der natürlichen Kompetenz wurden Transformationsfrequenzen bestimmt. Diese berechnen sich aus der Anzahl der Transformanden, der eingesetzten Menge an DNA und der CFU (*colony forming unit*):

$$\frac{\text{Anzahl der Transformanden}}{\text{DNA } [\mu\text{g}] \times \text{CFU}}$$

Hierfür wurden die Transformationen mit dem Plasmid pWS48, das eine *cat*-Kassette mit flankierenden Bereichen von *recA* enthält, durchgeführt. Im Anschluss wurden die Transformanden und die Lebendzellzahl, die für die Bestimmung der CFU benötigt wird, ausgezählt und die Transformationsfrequenzen berechnet (s. Abbildung 3.13).

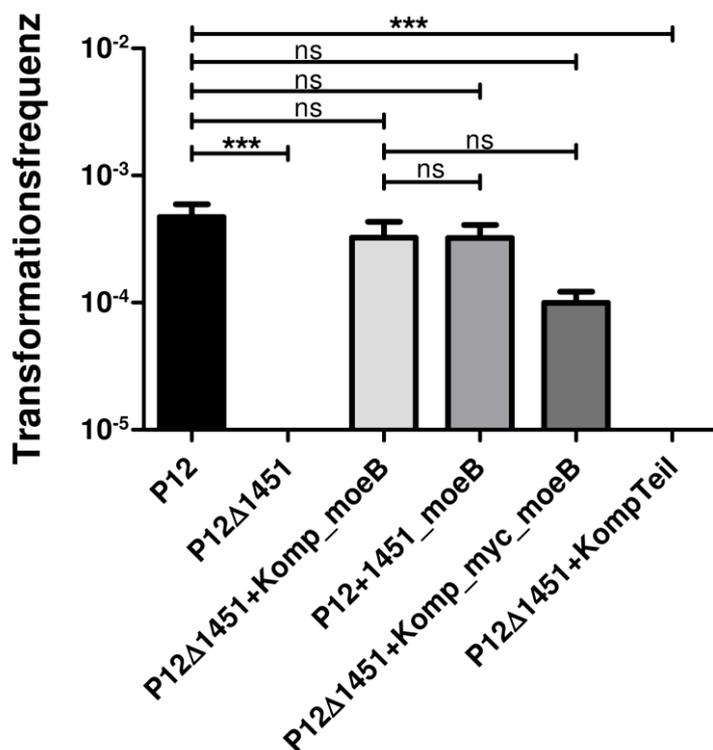


Abbildung 3.13: Transformation einer Chloramphenicolresistenz in *recA* durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung von Transformationsfrequenzen der *hpp12_1451*-Mutanten.

Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung in einer logarithmischen Skala aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Für die verschiedenen Mutanten ergaben sich folgende Transformationsfrequenzen im Mittel:

P12 Strep	4,72 x 10 ⁻⁴
Deletionsmutante P12Δ <i>hpp12_1451</i> (JR-H14)	< 10 ⁻⁹
Komplementante P12Δ <i>hpp12_1451</i> +Komp_ <i>moeB</i> (JR-H37)	3,24 x 10 ⁻⁴
P12 Strep mit zusätzlichem Gen <i>hpp12_1451</i> P12+ <i>hpp12_1451_moeB</i> (JR-H34)	3,22 x 10 ⁻⁴
Komplementante mit Myc-Tag P12Δ <i>hpp12_1451</i> +Komp_ <i>myc_moeB</i> (JR-H41)	1,00 x 10 ⁻⁴
Teilkomplementante P12Δ <i>hpp12_1451</i> +Komp _{Teil} (JR-H45)	< 10 ⁻⁹

Die statistische Auswertung erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, mit dem parametrischen Test ANOVA mit Post-Hoc-Test Tukey (***) für $P \leq 0,001$ und ns für nicht signifikant).

Die Transformation der Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* zeigte auch in diesem Experiment keine Transformanten, sodass daraus ein signifikanter Unterschied gegenüber der Transformationsfrequenz des Wildtyps P12 Strep resultiert. Durch Komplementation von *hpp12_1451* im *moeB*-Locus (P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*moeB*) wurde die Transformationsfähigkeit auch quantitativ betrachtet wiederhergestellt, die Transformationsfrequenz gegenüber P12 Strep war nicht signifikant unterschiedlich. Das zusätzliche Vorhandensein des Genes *hpp12_1451* im Wildtyp (P12+*hpp12_1451_moeB*/JR-H34) wies keine erhöhte Transformationsfähigkeit auf. Die Komplementate P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*myc_moeB* mit Myc-Tag, welche Myc-HPP12_1451 produziert, zeigte nur minimal geringere Transformationsfrequenzen im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementante ohne Tag, ohne signifikante Unterschiede.

Die Komplementante P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_{Teil} (JR-H45), in der nur die ersten 331 Bp von insgesamt 576 Bp von *hpp12_1451* vorhanden sind, war nicht zu transformieren.

3.1.6 Untersuchung der Mutanten bezüglich Elektroporation

Nachdem gezeigt wurde, dass mit dem Fehlen von *hpp12_1451* keine Transformation möglich ist, stellt sich die Frage, wie sich dies auf weitere Mechanismen der DNA-Aufnahme auswirkt. Die Elektroporation stellt hierbei ein technisches Verfahren dar, DNA in ein Bakterium einzuschleusen. Beim Erstellen der Komplementaten zeigte sich bereits, dass das Einbringen der Komplementationsplasmide, sowohl pHel-Shuttle-Plasmide, als auch Plasmide, die ins Genom integrieren, über Elektroporation in die Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* nicht möglich war (s. Abschnitt 3.1.4.2). Zur Quantifizierung wurden der Wildtyp P12 Strep, die Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* (JR-H14) und die Komplementationsmutante P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*moeB* (JR-H37) hinsichtlich der Elektroporation mit dem Plasmid pWS48 getestet (s. Abbildung 3.14). Die Elektroporationsraten wurden, entsprechend den Transformationsfrequenzen (s. Abschnitt 3.1.5), berechnet.

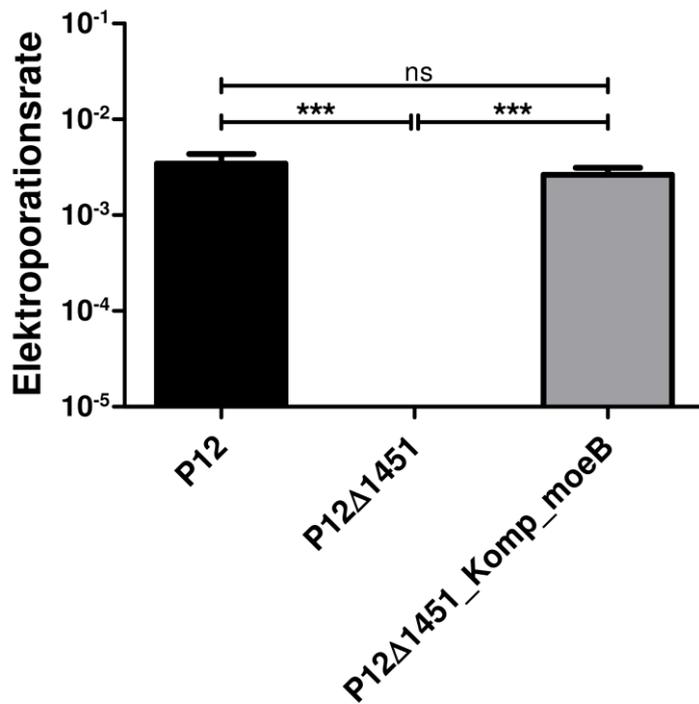


Abbildung 3.14: Elektroporation einer Chloramphenicolresistenz in *recA* durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung von Elektroporationsraten der *hpp12_1451*-Mutanten.

Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung in einer logarithmischen Skala aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Für die verschiedenen Mutanten ergaben sich folgende Elektroporationsraten im Mittel:

- P12 Strep: $3,45 \times 10^{-3}$
- Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* (JR-H14): $< 10^{-9}$
- Komplementante P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*moeB* (JR-H37): $2,65 \times 10^{-3}$

Die statistische Auswertung erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, mit dem parametrischen Test ANOVA mit Post-Hoc-Test Tukey (***) für $P \leq 0,001$ und ns für nicht signifikant).

Die Komplementation von *hpp12_1451* in der Deletionsmutante stellte auch die Fähigkeit, DNA durch Elektroporation aufzunehmen, wieder her. Die Elektroporationsrate der Komplementationsmutante P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*moeB* (JR H37) entsprach ungefähr der Rate des Wildtyps P12 Strep, der Unterschied war nicht signifikant. Dagegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied der beiden Stämme gegenüber der Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* (JR-H14).

3.1.7 Untersuchung der Mutanten bezüglich Konjugation

Ein weiterer Mechanismus der DNA-Aufnahme, dessen Abhängigkeit von *hpp12_1451* untersucht werden sollte, ist die bakterielle Konjugation. Die verschiedenen *H. pylori*-Mutanten wurden in Hinsicht auf den konjugativen Plasmidtransfer nach Rohrer *et al.* (2012) getestet. Plasmid-DNA wird vom Donor-Stamm auf den Rezipienten-Stamm übertragen, wodurch Transkonjuganten entstehen (s. Abbildung 3.15). Die Anwesenheit von DNase I soll dabei die DNA-Aufnahme über die natürliche Transformation verhindern.

Nach der Durchführung der Konjugationen zeigten sich Transkonjuganten bei den Experimenten, wo als Rezipient der Ausgangsstamm P12 *moeB::aphA-3* (JR-H52) oder die Komplementationsmutante P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*moeB* (JR-H37) verwendet worden waren. Im Gegensatz dazu war die Konjugation mit der Deletionsmutante nicht erfolgreich. Als Nachweis, dass die Rezipienten wirklich das Plasmid pHel12::*cat* über den Konjugationsmechanismus aufgenommen haben, wurde stichprobenartig aus den Transkonjuganten Plasmid-DNA isoliert und eine PCR mit den Primern SR57 und SR58 angefertigt (s. Abbildung 3.16). Die PCR-Produkte der Transkonjuganten zeigten sowohl eine kleiner Bande von ca. 430 Basenpaaren durch das Plasmid pHel12, als auch eine Bande mit ca. 1300 Bp aufgrund der Aufnahme des Plasmides pHel12::*cat* (Rohrer *et al.*, 2012). Die Transkonjuganten beinhalten somit beide Plasmide, pHel12 und pHel12::*cat*.

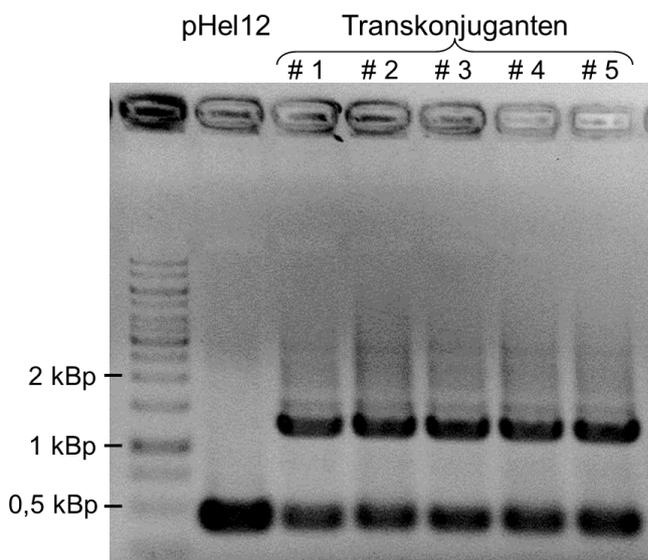


Abbildung 3.16: PCR-Produkte als Nachweis von pHel12::*cat* in den Transkonjuganten

Die Gelelektrophorese zeigt PCR-Produkte mit den Primern SR57 und SR58 über pHel12 und isolierter Plasmid-DNA aus verschiedenen Transkonjuganten mit Ausgangsstamm P12 *moeB::aphA-3* und Komplementante P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*moeB* als Rezipienten. Das PCR-Produkt über pHel12 in der ersten Spur ist ca. 430 Bp groß. Die Spuren der Plasmid-DNA der Transkonjuganten enthalten alle zusätzlich eine Bande in einer Größe von ca. 1300 Bp durch das PCR-Produkt von pHel12::*cat*.

Zur Quantifizierung des konjugativen Plamidtransfers der verschiedenen *hp12_1451*-Mutanten wurden Plasmidtransferraten bestimmt. Berechnet wurden diese mit dem Quotienten aus der Anzahl der Transkonjuganten und der Lebendzellzahl (CFU) des Rezipienten und graphisch dargestellt (s. Abbildung 3.17).

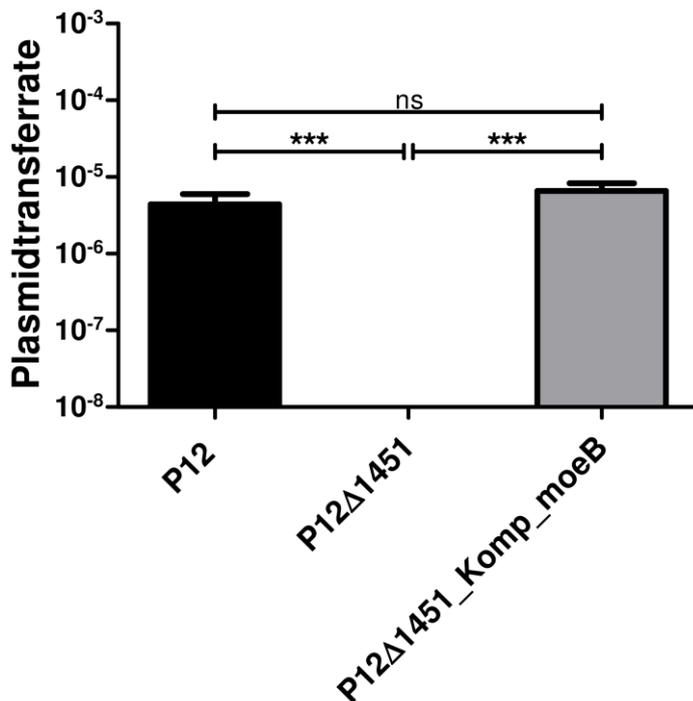


Abbildung 3.17: Plasmidtransferraten der verschiedenen *hpp12_1451*-Mutanten als Rezipienten
 Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung in einer logarithmischen Skala aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Es ergaben sich folgende Plasmidtransferraten im Mittel:

P12 <i>moeB::aphA-3</i> (JR-H52):	$4,42 \times 10^{-6}$
P12 Δ <i>hpp12_1451_moeB::aphA-3</i> (JR-H53):	$< 10^{-9}$
P12 Δ <i>hpp12_1451</i> +Komp_ <i>moeB</i> (JR-H37):	$6,56 \times 10^{-6}$

Die statistische Auswertung erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, mit dem parametrischen Test ANOVA mit Post-Hoc-Test Tukey (***) für $P \leq 0,001$ und ns für nicht signifikant).

Der konjugative Plasmidtransfer zwischen *H. pylori*-Stämmen war mit der Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451_moeB::aphA-3* (JR-H53) als Rezipient nicht möglich, es gab keine Transkonjuganten. Somit war der Unterschied der Plasmidtransferraten gegenüber dem Ausgangsstamm signifikant. Die Komplementate P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_ *moeB* (JR H37) stellte die Fähigkeit zur DNA-Aufnahme über Konjugation wieder her. Die Plasmidtransferrate der Komplementante zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Rate des Ausgangsstammes.

3.1.8 Untersuchung des Proteins HPP12_1451

Bei zwei Komplementanten wurde vor *hpp12_1451* eine *myc*-Gensequenz eingebracht. Als Folge befindet sich N-terminal an HPP12_1451 der *Myc-Tag*, wodurch das Protein per Antikörperbindung visualisiert werden kann. Dieses Prinzip wurde verwendet, um zu untersuchen, in welchem Zellkompartiment HPP12_1451 eine Rolle spielt. Gearbeitet wurde hierfür mit der Komplementante P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_ *myc_moeB* (JR-41), bei der bereits

gezeigt wurde, dass die Transformationsfrequenzen gegenüber dem Wildtyp und der Komplementante ohne *Myc-Tag* nur geringfügig niedriger sind (s. 3.1.5).

Die *H. pylori*-Bakterien von *P12Δhpp12_1451+Komp_myc_moeB* wurden durch Ultraschall und Ultrazentrifugation in eine Membranfraktion und eine lösliche cytoplasmatische und periplasmatische Fraktion aufgeteilt (s. 2.2.3.2). Aus der löslichen Fraktion wurden die Proteine ausgefällt und anschließend aus beiden Fraktionen und den Bakterienstämmen P12 Strep, *P12Δhpp12_1451* und *P12Δhpp12_1451+Komp_myc_moeB* Lysate angefertigt, die für einen Western Blot verwendet wurden (s. Abbildung 3.18). Das Protein HPP12_1451 mit *Myc-Tag* wurde durch den spezifischen Antikörper α -*Myc-tag* detektiert und war in der Komplementante und ihren beiden Phasen vorhanden. Zur Kontrolle der Reinheit der unterschiedlichen Fraktionen wurden die Antikörper gegen RecA und AlpB verwendet. AlpB ist ein Protein der äußeren Membran und war in der Fraktion des Cytoplasmas und Periplasmas nicht vorhanden, was bedeutet, dass diese Fraktion frei von Membranproteinen war. RecA, als cytoplasmatisches Protein, wurde jedoch auch in der Membranfraktion detektiert. Demnach konnte die Membranfraktion nicht komplett getrennt werden. Die *Myc*-Bande in der Fraktion des Cytoplasmas und Periplasmas spricht dafür, dass HPP12_1451 in einem dieser Kompartimente vorhanden ist. In der Membranfraktion ist die *Myc*-Bande sehr stark ausgebildet, jedoch kann aufgrund der Verunreinigung der Membranfraktion nicht sicher gesagt werden, dass HPP12_1451 auch hier eine Rolle spielt.

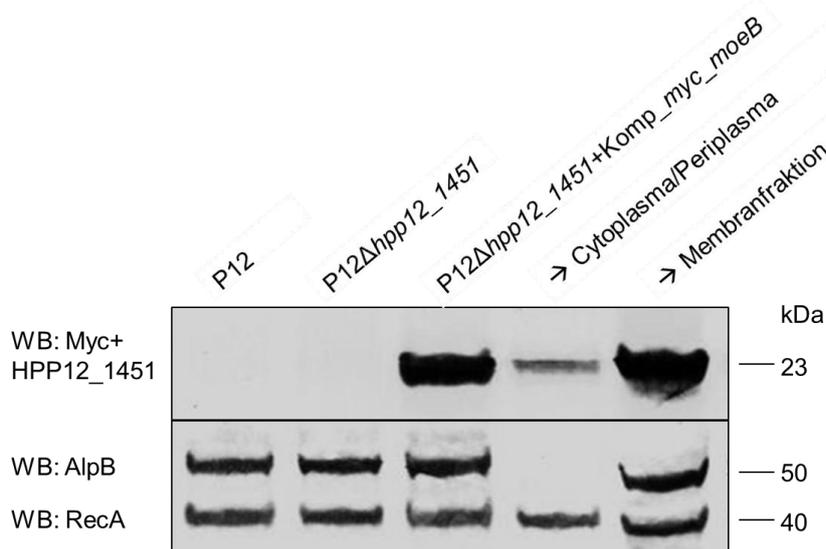


Abbildung 3.18: Western Blot der Zellfraktionen

Im Western Blot sind die verschiedenen Lysate von P12 Strep, *P12Δhpp12_1451* und *P12Δhpp12_1451+Komp_myc_moeB* mit Unterteilung in cytoplasmatische/periplasmatische Fraktion und Membranfraktion aufgetragen. HPP12_1451 und der *Myc-Tag* haben eine Gesamtgröße von 23 kDa und wurden mit dem spezifischen Antikörper α -*Myc-tag* (1:1000) detektiert. Zur Kontrolle wurden die Antikörper gegen RecA (AK263, 1:1000), ein cytoplasmatisches Protein mit einer Größe von 40 kDa, und AlpB (AK262, 1:3000), ein Protein der äußeren Membran mit einer Größe von 50 kDa, verwendet.

Um weitere Informationen hinsichtlich der Lage des Proteins HP12_1451 im Bakterium und der Proteinstruktur zu erhalten, wurden verschiedene bioinformatische Programme verwendet, die über die Aminosäuresequenz strukturelle Vermutungen berechnen. Nach den Computerprogrammen *TMpred* (Hofmann und Stoffel, 1993) und *TMHMM* (Krogh *et al.*, 2001) enthält HPP12_1451 keine Transmembrandomäne. *PSORTb* Version 3.0.2 (Yu *et al.*, 2010) bezeichnet es mit hoher Wahrscheinlichkeit als cytoplasmatisches Protein und nur mit geringer Wahrscheinlichkeit als periplasmatisches Protein. Ebenso vermutet das Programm *PredictProtein* (Yachdav *et al.*, 2014), dass HPP12_1451 keine Transmembrandomäne enthält und sich im Cytoplasma befindet. Darüber hinaus stellt es eine Katalytische- und Transferase-Aktivität fest.

3.1.9 Untersuchung des Kandidatengens im Stamm PMSS1

Nachdem festgestellt wurde, dass beim Fehlen von HPP12_1451 jegliche Art der DNA-Aufnahme nicht möglich ist, stellt sich die Frage, inwieweit dies auch die Kolonisationsfähigkeit des Bakteriums beeinträchtigt. Bei einem anderen Transformationsprotein, ComB4, ist eine Kolonisation im Tierversuch nicht möglich (Kavermann *et al.*, 2003).

In der Vorbereitung für einen Tierversuch wurde eine Deletionsmutante des *H. pylori*-Stamms PMSS1 (Lee *et al.*, 1997), welcher an die Maus adaptiert ist, erstellt.

Hpp12_1451 entspricht mit 96 % der Sequenz des Gens *PMSS1_RS07240* in der BLAST-Datenbank der *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*), jedoch war zum Zeitpunkt der Deletion die Sequenz von PMSS1 noch nicht bekannt, sodass die Deletion einfach mit dem Plasmid pJR3 erprobt wurde.

Für das Anwenden des Kontraselektionssystems mittels Xer-Rekombinase zur markerfreien Deletion des Gens, wie in 3.1.2 beschrieben, wird ein streptomycinresistenter Bakterienstamm benötigt. Deshalb wurde der Stamm PMSS1 Wildtyp (UB-H47) mit dem Plasmid pEG21 transformiert und der daraus folgende Stamm als PMSS1 Strep (JR-H61) bezeichnet. Das weitere Vorgehen entsprach dem in 3.1.2., wodurch die Deletionsmutante *PMSS1Δhpp12_1451* (JR-H67) entstand. Aus dem Nachweis der markerfreien Deletion mittels PCR mit den Primern JR1 und JR4 (siehe Absatz 3.1.2), kann gefolgert werden, dass das Einbringen der Streptomycinresistenz erfolgreich war.

Des Weiteren wurde, ebenso wie für den Laborstamm P12 (siehe Absatz 3.1.4) versucht, eine Komplementante zu erstellen. In der BLAST-Datenbank der *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) zeigt sich eine Übereinstimmung des Locus *moeB* von 98 % zwischen den Stämmen PMSS1 (*pmss1_RS03010*) und 26695 (*hp0755*), auf dessen Grundlage das Plasmid pSP76 und nachfolgend das Komplementationsplasmid pJR6 erstellt wurde. Für den Locus *moeB* inklusive der flankierenden Bereiche auf dem Komplementationsplasmid ergibt sich eine 96%ige Übereinstimmung.

Mehrfache Versuche, das Komplementationsplasmid pJR6 sowohl über natürliche Transformation, als auch über Elektroporation in den Stamm PMSS1 einzubringen, scheiterten.

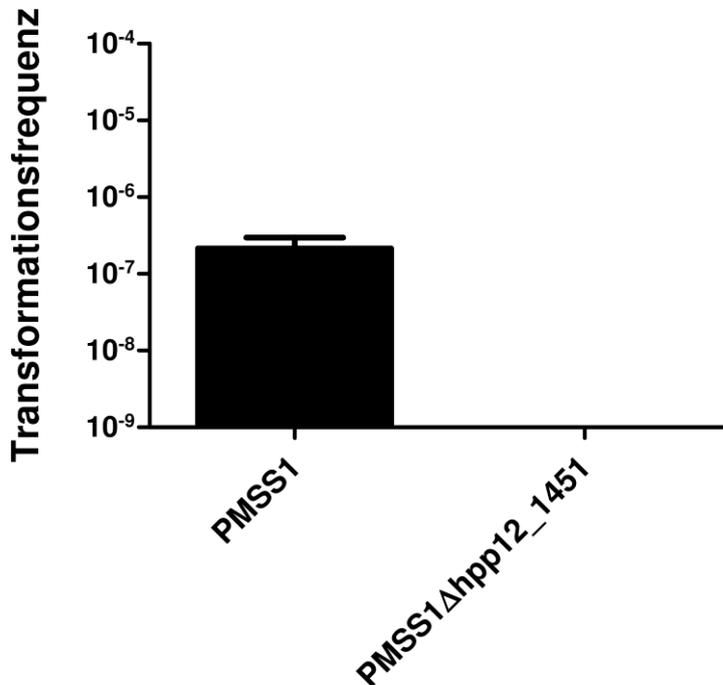


Abbildung 3.19: Transformation einer Chloramphenicolresistenz in *recA* durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung der Transformationsfrequenzen des Wildtyps und der *hpp12_1451*-Deletionsmutante im Stamm PMSS1.

Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung in einer logarithmischen Skala aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Es ergaben sich folgende Transformationsfrequenzen im Mittel:

Ausgangsstamm PMSS1 Strep (JR-H61):	$2,15 \times 10^{-7}$
Deletionsmutante PMSS1 Δ hpp12_1451 (JR-H67):	$< 10^{-9}$

Die erstellte Deletionsmutante PMSS1 Δ hpp12_1451 wurde *in vitro* mit den Plasmiden pWS48 und pJP99 auf ihre Transformationsfähigkeit geprüft und es wurden Transformationsfrequenzen, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, zur Quantifizierung im Vergleich zu PMSS1 Strep (JR-H61) bestimmt (s. Abbildung 3.19).

Auch hier zeigte sich, dass die Deletion des Genes *hpp12_1451* im Maus-adaptierten *H. pylori*-Stamm PMSS1 zum Fehlen der natürlichen Transformationskompetenz führt.

3.2 Untersuchung des Kandidatengens *hp0506*

3.2.1 Allgemeines zu *hp0506*

Ein weiteres Gen, dessen Protein an der DNA-Aufnahme beteiligt sein könnte, ist das Gen *hp0506*. Das Protein HP0506/HdpA besitzt eine Endopeptidase-Aktivität (Bonis *et al.*, 2010; Sycuro *et al.*, 2010), die zur lokalen Peptidoglykan-Hydrolyse führt und bei dem Transport von DNA-Fragmenten während des Transformationsvorganges eine Rolle spielen könnte. Das Fehlen von *hp0506* könnte sich dadurch deutlich stärker auf die Aufnahme von größeren DNA-Fragmenten auswirken, die dann schlechter bei der Transformation passieren würden. Zur Untersuchung dieser Vermutung wurde das Deletionsplasmid von Ivo G. Boneca (Bonis *et al.*, 2010) der Arbeitsgruppe von Prof. Haas zum Erstellen einer Mutante zur Verfügung gestellt.

Das Gen *hp0506* besteht aus 1212 Basenpaaren und kodiert das Protein HP0506/HdpA, bestehend aus 403 Aminosäuren. Es lässt sich in allen bekannten Sequenzen der verschiedenen *H. pylori*-Stämme in der BLAST-Datenbank mit einer Übereinstimmung von 95 – 100 % finden, sodass man von einem konservierten Gen sprechen kann.

hp0506 entspricht im *H. pylori*-Stamm P12 dem Gen *hpp12_0512* mit einer Übereinstimmung von 96 %. Die Gene *hp0506* und *hpp12_0512* weisen im Chromosom fast die gleichen flankierenden Bereiche auf (s. Abbildung 3.20).

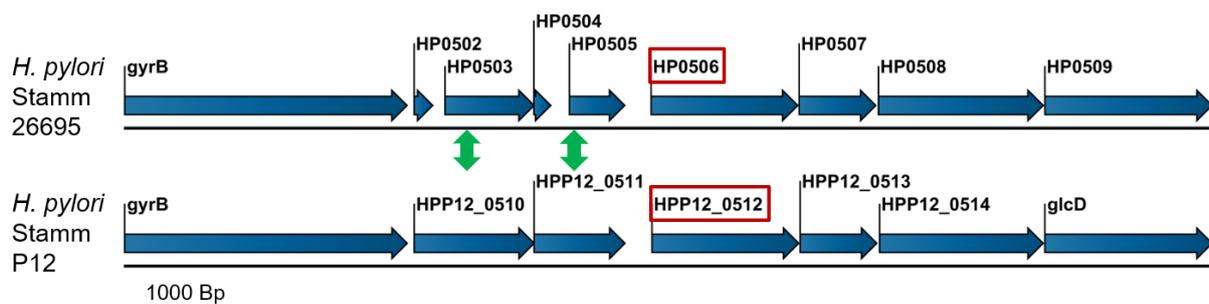


Abbildung 3.20: Kandidatengen *hp0506*, bzw. *hpp12_0512* im Chromosom

Es werden die Gene *hp0506* im Stamm 26695 und *hpp12_0512* im Stamm P12 mit ihren flankierenden Bereichen im Chromosom schematisch dargestellt. Die DNA-Sequenzen dieser Bereiche sind sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in wenigen Basen. An zwei Stellen werden im Stamm 26695 zwei Gene anstatt eines Genes bezeichnet (s. grüne Pfeilmarkierung), wobei auch hier DNA-Sequenzen nur gering voneinander abweichen.

Mit dem Plasmid von Ivo G. Boneca wurde eine Deletionsmutante durch Evelyn Weiss erstellt. Als Ausgangsstamm diente dabei der *H. pylori*-Stamm P12 Wildtyp, der sich für

in vitro-Versuche bewährt hat. Es entstand die Deletionsmutante P12 Δ hp0506 durch eine Insertion einer *aphA*-3-Kassette, welche eine Kanamycinresistenz vermittelt.

Beim Arbeiten mit dem Stamm P12 Δ hp0506 bestätigte sich das deutlich langsamere Wachstum gegenüber dem Wildtyp (Bonis *et al.*, 2010).

3.2.2 Transformationseffizienz der Deletionsmutante P12 Δ hp0506

Um zu vergleichen, ob große DNA-Fragmente schlechter aufgenommen werden können als kleinere, wurden Transformationen mit zwei unterschiedlichen Plasmiden durchgeführt. Der Unterschied der Plasmide liegt dabei in der Größe der DNA-Abschnitte, die ins Chromosom oder in *H. pylori*-Plasmide integriert werden.

Das Plasmid pWS48 wurde bereits für die Bestimmung der Transformationsfrequenzen der Mutante P12 Δ hpp12_1451 verwendet (s. Abschnitt 3.1.5). Es enthält eine *cat*-Kassette, die eine Chloramphenicolresistenz vermittelt, in der Größe von ca. 850 Bp, die von Teilabschnitten von *recA* (jeweils ca. 250 – 300 Bp) und deren angrenzenden Bereiche (1500 Bp, bzw. 800 Bp) flankiert werden. Diese flankierenden Abschnitte stehen theoretisch nach der DNA-Aufnahme durch Transformation der Rekombination ins Chromosom zur Verfügung. Unter der Annahme, dass für eine erfolgreiche Rekombination auf jeder Seite mindestens 150 Bp benötigt werden, kommt man auf ein DNA-Fragment mit einer Mindestgröße von 1150 Bp, welches durch Transformation aufgenommen werden muss.

Es wurden die Transformationen mit den Stämmen P12 Wildtyp und P12 Δ hp0506 mit pWS48 durchgeführt und daraus die Transformationsfrequenzen berechnet (s. Abbildung 3.21).

Die Transformation war in beiden Stämmen erfolgreich. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Transformationsfrequenzen der beiden Stämme P12 wt und P12 Δ hp0506 bei der Transformation mit pWS48.

Um zu kontrollieren, dass wirklich ein Teil von pWS48 ins Genom inseriert wurde, wurden stichprobenartig Transformanten kultiviert, deren genomische DNA isoliert und PCR-Fragmente mit den Primern WS67 und WS68 erstellt (s. Abschnitt 3.1.5). Dabei wurde in allen Proben die Insertion nachgewiesen.

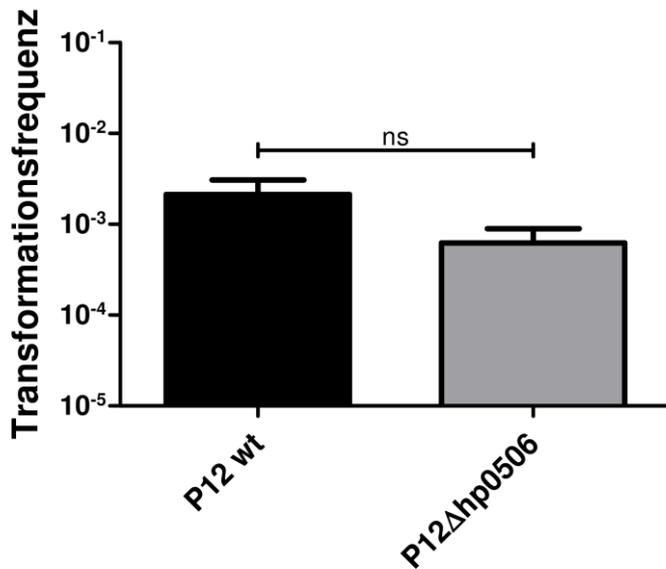


Abbildung 3.21: Transformation einer Chloramphenicolresistenz in *recA* durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung von Transformationsfrequenzen des Wildtyps und der Mutante P12 Δ hp0506.

Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung in einer logarithmischen Skala aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Es ergaben sich folgende Transformationsfrequenzen im Mittel:

Ausgangsstamm P12 wt:	$2,14 \times 10^{-3}$
Deletionsmutante P12 Δ hp0506:	$6,24 \times 10^{-4}$

Die statistische Auswertung erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, mit einem zweiseitigen T-Test (* für $P \leq 0,05$, ns für nicht signifikant).

Als zweites wurden Transformationsexperimente mit dem Plasmid pLH2 durchgeführt, um die Wirkung größerer DNA-Abschnitte auf Transformation und Rekombination zu testen. Das Plasmid pLH2 enthält eine *cat*-Kassette, einen *alpA*-Promotor und das Gen *babA* zwischen flankierenden Bereichen *hpp12_p11* und *mccC* des Shuttles pHel12, wobei das Plasmid pLH2 ursprünglich auf dem pBluescript II SK (+) basiert (s. Abbildung 3.22). Nach der Transformation in das Bakterium wird der ganze Bereich, bestehend aus *cat*-Kassette, *alpA*-Promotor und *babA* (insgesamt 3613 Bp), zwischen *hpp12_p11* und *mccC* in das *H. pylori*-eigene Plasmid pHel12 rekombiniert, sodass *H. pylori* eine Chloramphenicolresistenz (Cam^R) erhält. Die Gesamtgröße des DNA-Abschnittes, inklusive flankierender Bereiche, der für eine erfolgreiche Rekombination transformiert werden muss, beträgt demnach mindestens 3910 Bp.

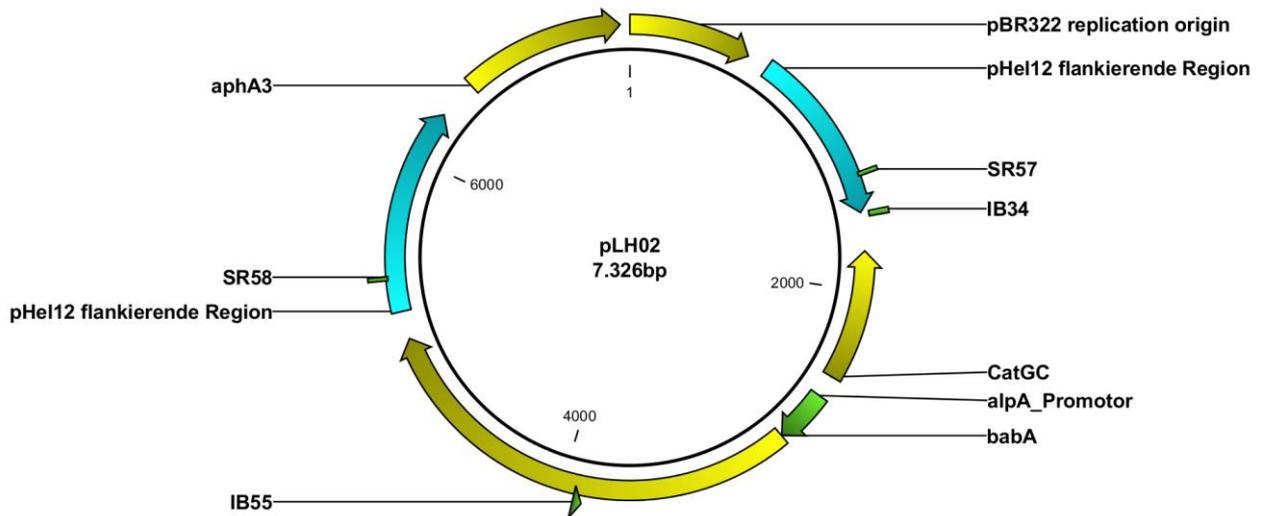


Abbildung 3.22: Plasmid pLH2

Zwischen den flankierenden Bereichen von pHel12 befindet sich eine *cat*-Kassette und *babA*, welchem der *alpA*-Promotor vorgeschaltet ist. Eingezeichnet sind auch die Bindungsstellen der Primer IB34 und IB55 für den Nachweis der erfolgreichen Transformation.

Die Transformationsexperimente wurden mit den Stämmen P12 Wildtyp und P12Δ*hp0506* mit pLH2 durchgeführt und daraus die Transformationsfrequenzen berechnet (s. Abbildung 3.23).

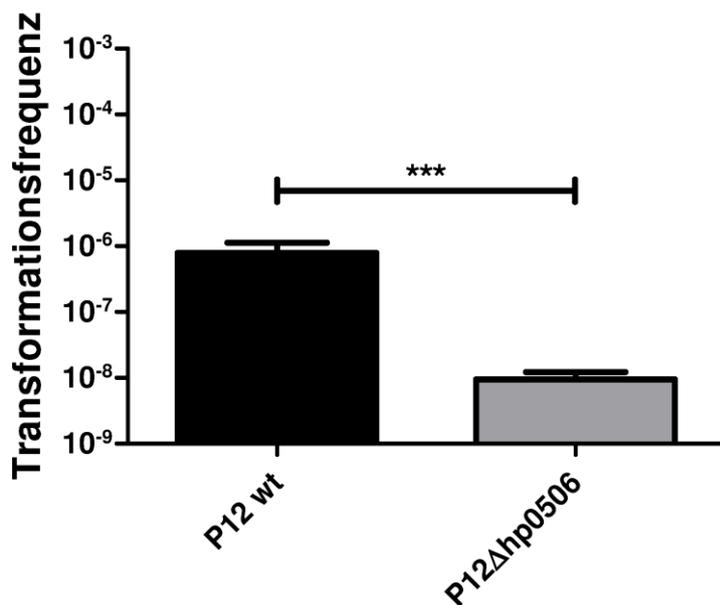


Abbildung 3.23: Transformationsfrequenzen des Wildtyps P12 und der Mutante P12Δ*hp0506* nach Transformation mit pLH2.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Es ergaben sich folgende Transformationsfrequenzen im Mittel:

Ausgangsstamm P12 wt: $7,91 \times 10^{-7}$
 Deletionsmutante P12Δ*hp0506*: $9,50 \times 10^{-9}$

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem zweiseitigen T-Test (***) für $P \leq 0,001$.

Generell war das Plasmid pHL2 gegenüber pWS48 schlechter zu transformieren, die Frequenz fiel auch für den Wildtyp P12 geringer aus.

Der Unterschied der Transformationsfrequenzen der Stämme P12 wt und P12 Δ hp0506 bei der Transformation mit pLH2 war signifikant. Das größere DNA-Fragment war schlechter in die Deletionsmutante einzubringen als in den Wildtyp.

Um sicherzugehen, dass die Transformation mit anschließender Rekombination stattgefunden hat, wurde stichprobenartig Plasmid-DNA der Transformanden isoliert. Aus diesen wurde eine PCR mit den Primern IB55 und IB34 angefertigt (s. Abbildung 3.24). Die Banden der PCR-Produkte zeigten eine erfolgreiche Aufnahme und Rekombination von pLH2 in P12 Δ hp0506.

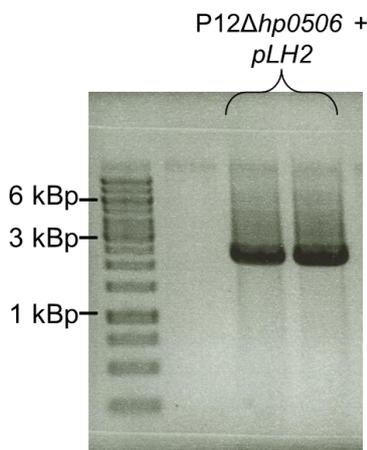


Abbildung 3.24: PCR-Nachweis der Transformation von pLH2 in P12 Δ hp0506

Die Gelelektrophorese zeigt die PCR-Produkte mit den Primern IB55 (bindet an *babA*) und IB34 (bindet an das Ende der *cat*-Kassette) als Nachweis einer erfolgreichen Transformation von pLH2 in P12 Δ hp0506. Rechnerisch besitzen die PCR-Produkte eine Größe von ca. 2330 Bp, was sich in der Gelelektrophorese bestätigt.

3.3 Versuch der Etablierung eines *in vivo*-Transposonmutagenese-Systems für *H. pylori*

3.3.1 Allgemeines zur Erstellung der *in vivo*-Transposonmutagenese-Datenbank

Als Stamm, auf dessen Grundlage die Mutanten erstellt werden sollten, wurde der Wildtypstamm P12 gewählt. Er eignet sich gut für Versuche im Labor und seine Genomsequenz ist bekannt. Des Weiteren bietet er den Vorteil, dass er keine Antibiotikaresistenzen besitzt, sodass für das spätere Testen der Transformationsfähigkeit der erstellten Mutanten eine größere Anzahl an Antibiotikaresistenzen zur Verfügung steht.

In der Arbeitsgruppe R. Haas existierte bereits das Transposonplasmid pHK9, das von Holger Kavermann konstruiert wurde (Kavermann *et al.*, 2003). Hiermit wurde auf der Grundlage des EZ-Tn5-Systems (Epicentre) bereits eine *in vitro*-Datenbank für *H. pylori* erstellt. Das Plasmid pHK9 (s. Abbildung 3.25) enthält eine *cat*-Kassette, die jeweils von 19 Bp, den sogenannten Mosaikenden (ME), flankiert ist. Die Mosaikenden dienen der Transposase als Bindungsstelle. Zusätzlich zu pHK9 wurde das Transposonplasmid pJR8 (s. Abbildung 3.25) erstellt. Das Plasmid pJR8 enthält anstatt der *cat*-Kassette eine *aphA-3*-Kassette, die eine Kanamycinresistenz vermittelt. Diese Alternative bot die Möglichkeit, bei der Etablierung eines Selektionssystems mit Transformationsschritten für die spätere Mutantenbank auch mit einer Chloramphenicolresistenz arbeiten zu können.

Beim Erstellen von pJR8 wurde die *aphA-3*-Kassette aus dem vorhandenen Plasmid pVK18 mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XbaI* ausgeschnitten und in den Konstruktionsvektor für EZ-TN-Transposons pMOD1 zwischen den ME inseriert. Zur Kontrolle der Klonierung wurde pJR8 mit den Plasmiden pMODFP1 und pMODRP1 sequenziert.

Um eine hohe Effizienz der Transpositionsreaktion zu erhalten, sollte das Transposon linearisiert und von angrenzender DNA abgespalten werden (Goryshin *et al.*, 2000). Deshalb wurden aus den Plasmiden die Transposons per PCR über die Transposonplasmide pHK9 und pJR8 und anschließender Gelelektrophorese und Gelextraktion, wie in Abschnitt 2.2.2.11.1 beschrieben, erstellt.

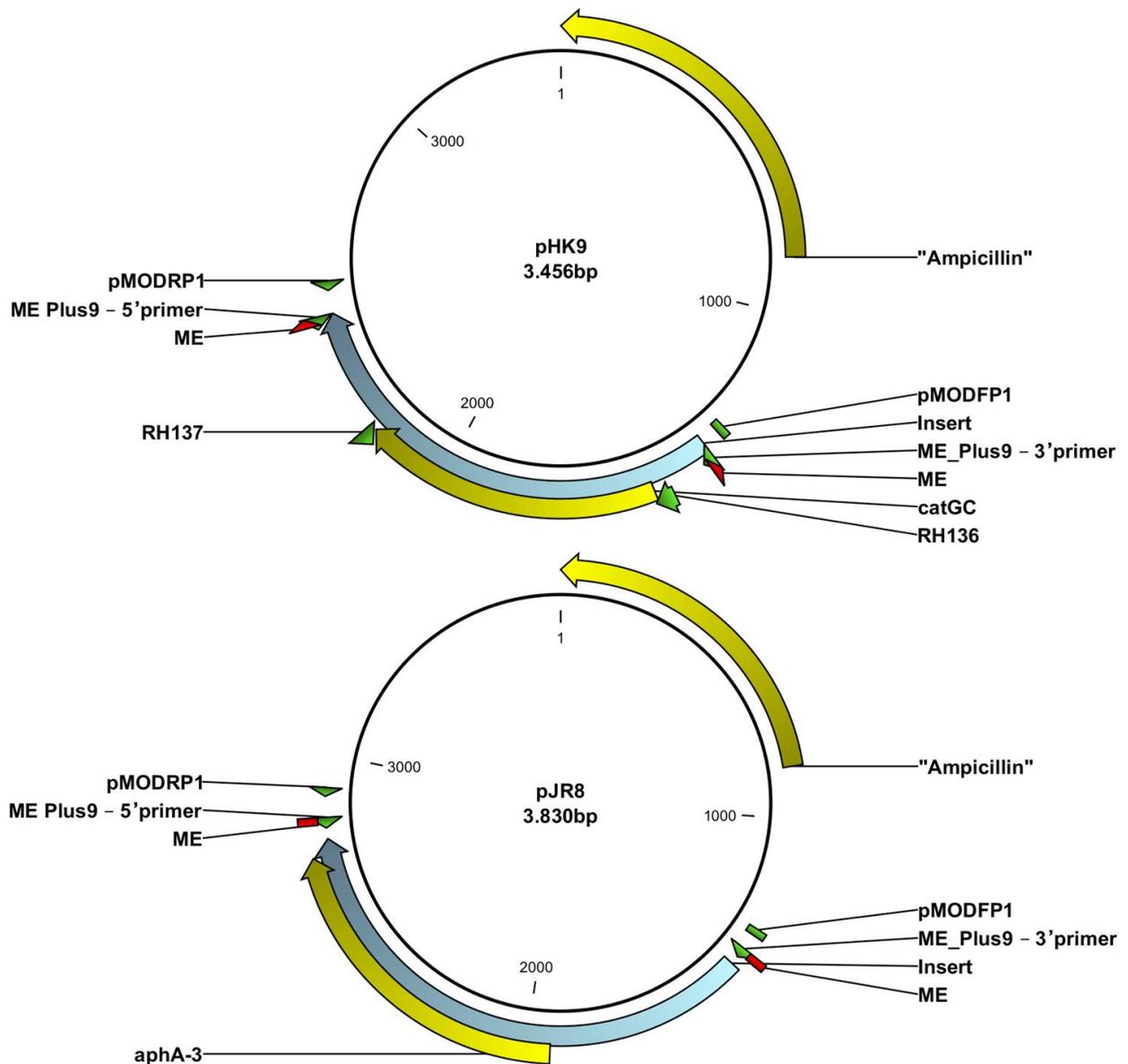


Abbildung 3.25: Transposonplasmide pHK9 und pJR8

Die Abbildung zeigt die Transposonplasmide pHK9 und pJR8. Zwischen den Mosaikenden (ME) ist eine Antibiotikaresistenzkassete, die *cat*-Kassete in pHK9 und die *aphA-3*-Kassete in pJR8, integriert. Eingezeichnet sind die Primer pMODFP1 und pMODRP1, die für die Sequenzierung verwendet wurden. Mit den Primern ME Plus 9 – 3' und ME Plus 9 – 5' wurden die Transposons durch das PCR-Verfahren erstellt.

Die Funktionsfähigkeit der EZ-Tn5-Transposase (Epicentre) wurde überprüft, indem eine *in vitro*-Transpositionsreaktion mit der DNA des EZ-Tn5 <KAN-2> Tnp Transposome™ Kit und anschließender Transformation in *E. coli* durchgeführt wurde.

3.3.2 Suche nach einem Screeningverfahren von transformationsdefizienten Mutanten

Zur Detektion der transformationsdefizienten Mutanten sollte ein Screeningverfahren für *H. pylori* etabliert werden. Hierfür wurde versucht, das beschriebene Verfahren für *Campylobacter jejuni* nach Wiesner *et al.* (2003) anzupassen. Im Verfahren für *C. jejuni* wurden jeweils 2,5 µg chromosomale DNA von Mutanten mit einer Chloramphenicolresistenz auf Serumplatten verteilt und getrocknet. Im Anschluss wurde der Transformationsansatz verdünnt und jeweils ca. 100 Bakterien ausplattiert. Nach der Kultivierung einzelner transformierter Mutanten wurden einzelne Kolonien sowohl auf Serumselektivplatten mit Chloramphenicol als auch auf Serumplatten ohne zusätzliche Antibiotika übertragen. In einer Bakterienkolonie, in der die Bakterien weiterhin die natürliche Transformationskompetenz besaßen, wurde mindestens einmal während der Kultivierung auf der DNA-Platte die Chloramphenicolresistenzkassette aufgenommen, sodass die Bakterien der Kolonie nun auf beiden Nährböden wuchsen. Es wurde dabei von einer 100-prozentigen Effizienz der Transformation von chromosomaler DNA bei den transformationsfähigen Mutanten ausgegangen. Transformationsdefiziente Mutanten wuchsen dagegen nur auf der Serumplatte ohne Chloramphenicol.

Dieses Verfahren sollte nun auf *H. pylori* angepasst werden. Hierfür wurden erste Versuche mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen und unterschiedlichen Mengen von chromosomaler DNA, die auf den Serumplatten verteilt wurden, getestet. Untersucht wurde des Weiteren die nötige Dauer der Kultivierung von *H. pylori* auf den DNA-Platten. Der Ablauf der Testversuche ist in der Abbildung 3.26 dargestellt.

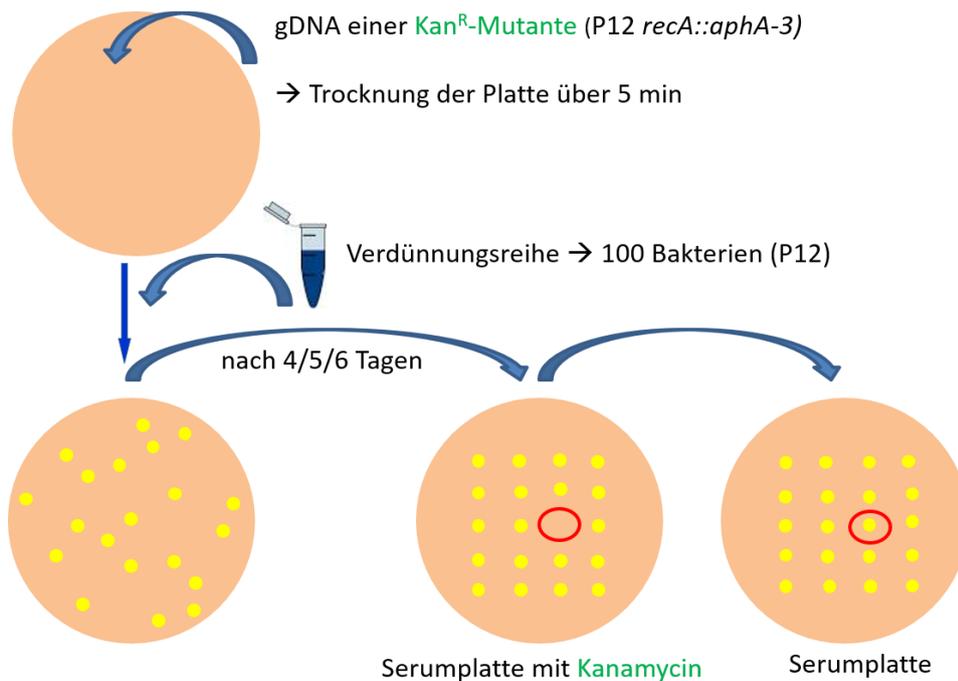


Abbildung 3.26: Aufnahmefähigkeit einer Antibiotikaresistenzkassette als Screeningverfahren für *H. pylori*.

Die chromosomale DNA (gDNA) von P12 mit einer Kanamycinresistenzkassette (*aphA-3*) wurde auf einer Serumplatte verteilt und die Platte über 5 min getrocknet. Im Anschluss wurden Verdünnungsreihen mit dem Wildtyp *H. pylori*-Stamm P12 angefertigt, sodass ca. 100 Bakterien auf einer DNA-Platte wachsen sollten. Die einzelnen Bakterienkolonien wurden wegen des langsamen Wachstums von *H. pylori* nach 4, bzw. 5 oder 6 Tagen mit Pipettenspitzen auf die Serumselektivplatten, hier mit Kanamycin, alternativ mit Chloramphenicol oder Streptomycin, und zusätzlich auf eine Serumplatte ohne Antibiotikum übertragen. Nach der weiteren Kultivierung von 2 bis 3 Tagen wurde die beiden Platten miteinander verglichen. Bei transformationsfähigen Bakterien sollten die Kolonien nun auf beiden Serumplatten vorhanden sein, während das Wachstum von transformationsdefiziten Bakterien auf der Antibiotikaplatte ausfiel. In der Darstellung zeigt sich eine Mutante als transformationsdefizient, während alle anderen transformationskompetenten Mutanten die Antibiotikaresistenzkassette aufgenommen haben.

Für die Beschichtung der Platten mit DNA wurde, ebenso wie beim Screeningverfahren für *C. jejuni*, chromosomale DNA (gDNA) verwendet, da die Transformation von Plasmid-DNA, insbesondere von heterologen Stämmen, durch Restriktions-Modifikationssysteme stärker eingeschränkt wird, während homologe chromosomale DNA gut transformiert wird ((Ando *et al.*, 2000; Hofreuter *et al.*, 2001).

Für die Erstellung der chromosomalen DNA mit einer Antibiotikaresistenzkassette wurde der Stamm P12 mit dem Plasmid pJP99 (enthält *aphA-3* in *recA*), bzw. pWS48 (enthält *cat* in *recA*) transformiert und die daraus entstandenen Mutanten in die Stammhaltung aufgenommen. Der Stamm P12 Strep mit einer Streptomycinresistenz war bereits im Labor vorhanden. Aus den aufgeführten Stämmen wurde die gDNA isoliert:

P12 *recA::aphA-3* (JR-H32) → Kanamycinresistenz

P12 *recA::cat* (JR-H33)

→ Chloramphenicolresistenz

P12 Strep, *rpsL**

→ Streptomycinresistenz

In den Testversuchen wurde nur der transformationskompetente Stamm P12 verwendet, sodass man ein Wachstum auf beiden Serumplatten, mit und ohne Antibiotikum, aufgrund der Aufnahme der Antibiotikaresistenzkassette erwartet hätte. Das Anwachsen auf beiden Platten wurde miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Testversuche sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Transformationen von genomischer DNA durch Aufnahme von Serumplatten waren in den Testreihen weit von der geforderten 100-prozentigen Effizienz entfernt, sodass nach ersten Testversuchen abgebrochen wurde.

Tabelle 3.1: Testversuche des Screeningverfahrens

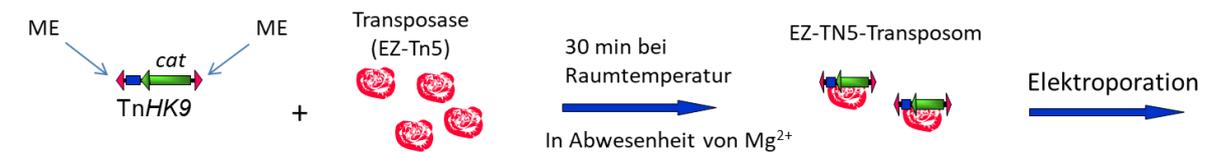
Dauer der Kultivierung auf den DNA-Platten	DNA-Menge	Ergebnis des Anwachsens, Anzahl (Antibiotikumplatte/Serumplatte)	
Kanamycinresistenz (<i>aphA-3</i> in <i>recA</i>)			
4 Tage	2 µg	1/15	6,7 %
4 Tage	5 µg	5/15	33,3 %
5 Tage	2 µg	3/15	20 %
5 Tage	5 µg	1/10	10 %
6 Tage	5 µg	5/15	33,3 %
Chloramphenicolresistenz (<i>cat</i> in <i>recA</i>)			
4 Tage	2 µg	5/15	33,3 %
4 Tage	5 µg	4/15	26,7 %
5 Tage	2 µg	14/15	93,3 %
5 Tage	2 µg	58/74	78,4 %
5 Tage	3 µg	94/116	81,0 %
5 Tage	5 µg	7/15	46,7 %
6 Tage	2 µg	29/67	43,3 %
6 Tage	3 µg	25/80	31,3 %
Streptomycinresistenz (<i>rpsL</i>*)			
4 Tage	2 µg	4/18	22,2 %
4 Tage	3 µg	4/18	22,2 %
4 Tage	5 µg	3/4	75 %
5 Tage	2 µg	5/38	13,2 %
5 Tage	3 µg	10/38	26,3 %
5 Tage	5 µg	4/16	25 %

Das Screeningverfahren für transformationsdefiziente Mutanten von *C. jejuni* konnte nicht ausreichend für *H. pylori* angepasst werden. Keine der Antibiotikaresistenzkassetten für die Chloramphenicol-, Kanamycin- als auch Streptomycinresistenz eignete sich zur Aufnahme über DNA-Platten. Das beste Ergebnis wurde beim Verwenden von 2 µg gDNA mit einer Chloramphenicolresistenzkassette und einer Kultivierung von 5 Tagen auf der DNA-Platte bis zum Übertragen auf die Serumplatten erzielt. Die Testversuche wiesen insgesamt eine sehr große Streuung auf. Auffällig waren die schlechten Transformationsraten der Streptomycinresistenz.

3.3.3 Versuch der Etablierung einer *in vivo*-Transposonmutagenese-Datenbank

Das Verfahren der *in vivo*-Tn5-Mutagenese sollte nun auf *H. pylori* angepasst werden, mit dem Ziel, Insertionsmutanten zu erstellen. Der Vorteil der *in vivo*-Mutagenese ist, dass das Transposom direkt in das zu modifizierende Bakterium eingebracht wird und in die genomische DNA inseriert. Im Gegensatz zur *in vitro*-Mutagenese von *H. pylori* nach Kavermann *et al.* (2003) sollten die aufwendigen Schritte, wie das Modifizieren von Plasmiden und das Einbringen und Vervielfältigen in *E. coli.*, umgangen werden. Dargestellt ist der Ablauf der *in vivo*-Transposonmutagenese in Abbildung 3.27.

Die Transposons TnHK9 und TnJR8 wurden wie zuvor beschrieben (s. Abschnitt 3.3.1) aus den Plasmiden pHK9 und pJR8 mittels PCR erstellt und von zusätzlicher DNA getrennt, wie vom Hersteller (Epicentre) des EZ-Tn5-Systems empfohlen (Goryshin und Reznikoff, 1998; Goryshin *et al.*, 2000). Die *in vivo*-Transpositionsreaktion wurde, wie in Abschnitt 2.2.2.11.3 beschrieben, mehrmals durchgeführt.



ME: Mosaikenden 19 Bp

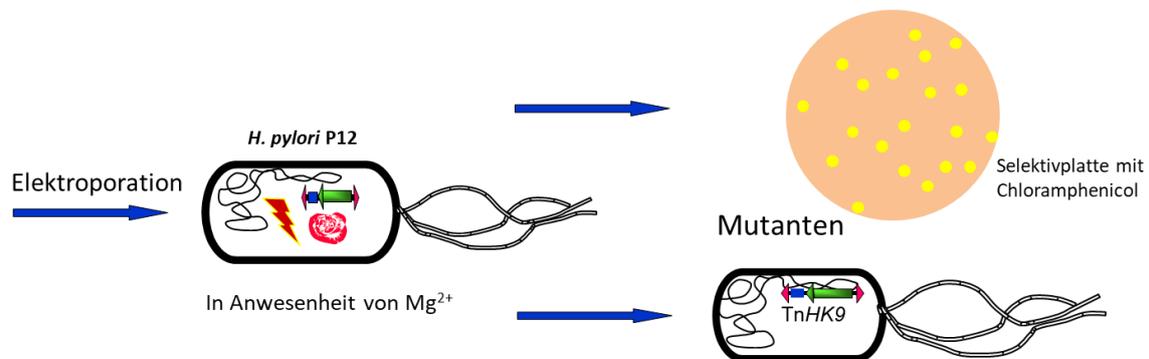


Abbildung 3.27 Modell der *in vivo*-Transpositionsreaktion von *H. pylori* am Beispiel TnHK9

Das Transposon TnHK9 enthält eine *cat*-Kassette und wird von den Mosaikenden flankiert. Durch Inkubation des Transposons mit der Transposase EZ-Tn5 bildete sich ein Transpositions-komplex, das sogenannte Transposom. Im Anschluss wurde das Transposom durch Elektroporation in das Bakterium *H. pylori* eingebracht. Durch die Transpositionsreaktion sollte das Transposon unter Anwesenheit von Magnesium in das Genom integriert werden. Die Bakterien wurden nach Elektroporation auf eine Serumselektivplatte, hier mit Chloramphenicol, ausplattiert und für bis zu 9 Tage inkubiert. Das Wachstum von Bakterienkolonien, die durch die Transpositionsreaktion eine Chloramphenicolresistenz erworben hatten, wurde nach 4 Tagen täglich kontrolliert.

Leider brachte keine der mehrfach durchgeführten Transpositionsreaktionen mit TnHK9, bzw. TnJR8 den Erfolg, Mutanten zu generieren. Keine Bakterienkolonie war auf den Selektivplatten sichtbar.

Zusätzlich wurden die Versuche auch mit den vollständigen Plasmiden pHK9, bzw. pJR8, anstatt der einzelnen mittels PCR erstellten Transposons, durchgeführt. Die Transposonplasmide pHK9 und pJR8 wurden mit der Transposase inkubiert und im Anschluss in *H. pylori* elektroporiert. Angenommen wurde dabei, dass das Transposon bei der Bildung des Transpositions-komplexes von der angrenzenden DNA abgespalten werden kann (Goryshin und Reznikoff, 1998). Leider brachte auch diese Variation keinen Erfolg, es konnten keine Mutanten erstellt werden.

Alternativ wurde versucht, über eine *in vitro*-Methode (s. Abschnitt 2.2.2.11.2) das Transposon TnHK9, bzw. TnJR8 in isolierte genomische DNA von *H. pylori* „springen zu lassen“ und im Anschluss auf den direkten Weg die modifizierte gDNA über Elektroporation oder Transformation in *H. pylori* einzubringen. Auch über diesen Weg ließen sich keine Mutanten generieren.

4 Diskussion

Das Bakterium *H. pylori* besitzt eine hohe genetische Vielfalt. Ursächlich für die hohe genetische Variation sind die natürliche Transformation, eine hohe Rekombinationsrate und eine hohe Mutationsrate. In Folge verändert sich das Genom des Bakteriums im Laufe einer Infektion und passt sich seinem Wirt an (Suerbaum und Josenhans, 2007). Dies geschieht z.B. durch Veränderungen der Oberflächenproteine oder durch die Aufnahme und Verbreitung von Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzen (Dorer *et al.*, 2009).

Das Bakterium *H. pylori* besitzt eine Vielzahl von Genen, die Proteine des Transformationsmechanismus kodieren, der genaue Mechanismus ist jedoch nicht vollständig verstanden. Der Mechanismus der natürlichen Transformation unterscheidet sich in *H. pylori* gegenüber anderen Bakterien. Anstatt sogenannter Typ-IV-Pili verwendet *H. pylori* das Typ-IV-Sekretionssystem ComB (Hofreuter *et al.*, 2001). Die natürliche Transformation erfolgt dabei in einem 2-Stufen-Mechanismus. Die Doppelstrang-DNA wird über das ComB-System über die äußere Membran ins Periplasma aufgenommen. Im zweiten Schritt gelangt die DNA in einem Einzelstrang durch ComEC, ein Kanalprotein der inneren Membran, ins Cytoplasma. Im Anschluss wird die aufgenommene DNA durch die homologe Rekombination ins Chromosom integriert und vervielfältigt. Selbstreplizierende Plasmide dagegen werden nicht ins Chromosom integriert (Stingl *et al.*, 2010).

Eine Alternative des horizontalen Gentransfers ist die Konjugation. Für *H. pylori* wurden mehrere Wege in Anwesenheit von DNase I, die den Weg der natürlichen Transformation verhindert, beschrieben (Kuipers *et al.*, 1998; Rohrer *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurden zwei Gene und die davon gebildeten Proteine, deren Beteiligung am Mechanismus der natürlichen Transformation bereits vermutet wurde, näher untersucht. Durch die Experimente und Ergebnisse sollte den Proteinen HPP12_1451 und HP0506 eine Rolle am Transformationsmechanismus zugeordnet werden. Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit war die Etablierung eines Tn5-Transposonmutagenesesystems für *H. pylori* mit dem Ziel, eine *in vivo*-Mutantenbank zu erstellen. Die Mutanten sollten auf einen Defekt der natürlichen Kompetenz gescreent werden und somit neue unbekannte Gene des Transformationsmechanismus identifiziert werden.

4.1 Beteiligung von *hpp12_1451* an der natürlichen Transformation

In der Vergangenheit wurde berichtet, dass nach Insertion eines Transposons in das Gen *hp1473* Transformationsversuche nicht erfolgreich waren (Chang *et al.*, 2001). Das Gen

hp1473 entspricht *hpp12_1451* und ist als konserviertes Gen in allen *H. pylori*-Stämmen mit nur sehr geringen Sequenzunterschieden vorhanden (s. Abschnitt 3.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion und Rolle von *hpp12_1451* am Transformationsmechanismus genauer untersucht.

Zu Beginn wurde eine Deletionsmutante des *H. pylori*-Stammes P12 erstellt (P12 Δ *hpp12_1451*). Das Gen *hpp12_1451* wurde dabei markerfrei über ein Kontraselektionssystem nach Debowski *et al.* (2012) deletiert (s. Abschnitt 3.1.2). In ersten Transformationsexperimenten erwies sich die Mutante als transformationsdefizient (s. Abschnitt 3.1.3), was mit dem Ergebnis von Chang *et al.* (2001) übereinstimmt. Um zu beweisen, dass der Defekt der Transformationskompetenz der Mutante auf das Fehlen von HPP12_1451 zurückzuführen war, wurde der Gendefekt komplementiert, indem das Gen an einem anderen Locus im Genom eingebaut wurde (s. Abschnitt 3.1.4). Einerseits wurde das Gen *hpp12_1451* in dem *moeB*-Locus im Genom inseriert (P12+*hpp12_1451_moeB*/JR-H34), andererseits wurde es über ein pHel3-Shuttle-System ins Bakterium eingebracht (P12+*hpp12_1451*/JR-H42).

Zur Quantifizierung der Transformationskompetenz der Deletionsmutante und der Komplementationsmutanten wurden in Experimenten die Transformationsfrequenzen bestimmt (s. Abschnitt 3.1.5). Die Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* erwies sich weiterhin als transformationsdefizient. Durch Komplementation wurde die Transformationskompetenz wiederhergestellt, der Unterschied zwischen Komplementate P12+*hpp12_1451_moeB* und Wildtyp war nicht signifikant. Eine Steigerung der Transformationsfähigkeit durch Überexpression durch das zusätzliche Vorhandensein des Genes *hpp12_1451* im *moeB*-Locus im Wildtyp war nicht nachweisbar. Eine Teilkomplementante, in welcher nur die ersten 331 Basenpaare von insgesamt 576 Basenpaaren von *hpp12_1451* vorhanden waren, zeigte sich ebenso als transformationsdefizient. Der erste Teil des Genes ist somit für die Transformationskompetenz nicht ausreichend.

Beim Erstellen der Komplementationsmutanten zeigte sich, dass die Transformation in die Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* weder mit Shuttle-Plasmiden, die sich selbst replizieren, noch mit Plasmiden, die ins Chromosom über homologe Rekombination integrieren, möglich war.

Die fehlende Transformationskompetenz für Shuttle-Plasmide spricht dafür, dass HPP12_1451 nicht an der homologen Rekombination, sondern zuvor am Transformationsmechanismus beteiligt ist.

Zusätzlich wurde die Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* auf weitere DNA-Aufnahmemechanismen getestet. Die Deletionsmutante P12 Δ *hpp12_1451* konnte durch Elektroporation nicht genetisch verändert werden (s. Abschnitt 3.1.6). Elektroporationen waren

mit der Komplementationsmutante wieder möglich. Auch Shuttle-Plasmide konnten in die Deletionsmutante nicht elektroporiert werden.

Die Elektroporationen mit dem Wildtyp P12 mit pWS48 waren in dieser Arbeit ca. 10 x erfolgreicher im Vergleich zu den Transformationen derselben. Grundsätzlich ist bekannt, dass Elektroporationen effizienter als natürliche Transformationen sind, wobei auch hier die Barrieren der verschiedenen Stämme in Form von Restriktions-Modifikations-Systemen beobachtet wurden (Ando *et al.*, 2000).

In der Vergangenheit wurde für verschiedene andere Deletionsmutanten des Transformationsmechanismus gezeigt, dass nur einige davon auch im Ablauf der Elektroporation beeinträchtigt waren.

Die Elektroporationen in Deletionsmutanten $\Delta comB2$ und $\Delta comH$, die sich transformationsdefizient zeigten, waren weiterhin möglich. ComB2 als Teil des ComB-Systems und ComH als periplasmatischer Rezeptor sind an der Aufnahme der DNA in den periplasmatischen Raum beteiligt (Karnholz *et al.*, 2006; Damke *et al.*, 2019). Daraus kann angenommen werden, dass Transformationsproteine, die für die primäre Aufnahme der DNA notwendig sind, im Rahmen der Membranpermeabilitätsänderung der Elektroporation umgangen werden. Für die Deletionsmutante $\Delta comEC$ wurden unterschiedliche Ergebnisse berichtet, einerseits waren Elektroporationen nicht möglich, andererseits erfolgreich (Yeh *et al.*, 2003; Damke *et al.*, 2019).

In die Deletionsmutante $\Delta recA$ waren Elektroporationen, wie bei der Deletionsmutante P12 $\Delta hpp12_1451$, nicht möglich. In $\Delta dprA$ war dies nur in einem sehr geringen Ausmaß möglich (Damke *et al.*, 2019). Im Unterschied zu P12 $\Delta hpp12_1451$ ist bei $\Delta recA$ die Transformation von Shuttle-Plasmiden, die nicht auf die homologe Rekombination angewiesen sind, jedoch weiterhin möglich (Schmitt *et al.*, 1995).

In Konjugationsexperimenten dieser Arbeit war die Deletionsmutante P12 $\Delta hpp12_1451$ als Rezipient nicht in der Lage, DNA über Konjugation aufzunehmen (s. Abschnitt 3.1.7). In der Komplementationsmutante war die Fähigkeit wiederhergestellt, hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber dem Wildtyp. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht getestet, wie sich die Deletionsmutante als Donor verhält.

Mehrere Proteine spielen sowohl bei der Transformation, als auch bei der Konjugation eine Rolle. Es wurde für *H. pylori* verschiedene Wege des konjugativen Transfers von Plasmiden beschrieben. Dabei ist einerseits das Typ-IV-Sekretionssystem ComB beteiligt, andererseits gibt es einen ComB-unabhängigen Weg mit niedrigeren Frequenzen des Plasmidtransfers (Rohrer *et al.*, 2012). Des Weiteren sind das Kanalprotein der inneren Membran ComEC und die Proteine der homologen Rekombination RecA und DprA im Rezipienten auch für die Konjugation der chromosomalen mobilen genetischen Elementen wie ICEH $pfts4$ notwendig

(Weiss *et al.*, 2019). Dies lässt annehmen, dass die Mechanismen der natürlichen Transformation und der Konjugation zumindest zu gewissen Anteilen miteinander verknüpft sind, vermutlich im späteren Teil der DNA-Aufnahme ins Cytoplasma oder dem Transport der DNA zur homologen Rekombination. Dies kann auch die Notwendigkeit von HPP12_1451 für die verschiedenen Transfermechanismen wie natürliche Transformation, Elektroporation und Konjugation erklären.

Um zu untersuchen, in welchem Zellkompartiment HPP12_1451 nun eine Rolle spielt, wurde eine Komplementationsmutante mit Myc-Tag (P12 Δ *hpp12_1451*+Komp_*myc_moeB*) in die Membranfraktion und in die lösliche Fraktion, bestehend aus Cytoplasma und Periplasma, aufgeteilt (s. Abschnitt 3.1.8). HPP12_1451 war in beiden Fraktionen nachweisbar, wobei nur die lösliche Phase im Western Blot als gut abgetrennt zu betrachten war. Dies wurde als Nachweis von HPP12_1451 im Cytoplasma oder Periplasma gesehen. Die Bande von HPP12_1451 in der Membranfraktion war sehr stark ausgeprägt und kann einerseits eine Verunreinigung sein, alternativ aber auf das Vorhandensein von HPP12_1451 in der Zellmembran hindeuten. Die Analyse verschiedener bioinformatischer Programme ergab, dass sich HPP12_1451 wahrscheinlich im Cytoplasma befindet und keine Transmembrandomäne enthält. Zusätzlich wurde eine Katalytische- und Transferase-Aktivität vermutet (s. Abschnitt 3.1.8).

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass das Protein ComB4, welches für die Transformationskompetenz essentiell ist, auch im Tiermodell für die Kolonisierung essentiell war. Die Proteine ComB8-10 waren hingegen im Tiermodell nicht essentiell (Kavermann *et al.*, 2003). Nun stellt sich die Frage, inwieweit HPP12_1451 auch an der Kolonisierung beteiligt ist. In Vorbereitung für einen Tierversuch wurde das Gen *hpp12_1451* im Stamm PMSS1, der sich für das Mausmodell eignet, deletiert (s. Abschnitt 3.1.9). Die Komplementation des Genes war leider nicht erfolgreich. Der fehlende Erfolg bei den Komplementationsversuchen kann an der insgesamt geringeren Transformationsfähigkeit des Stammes PMSS1 gegenüber P12 liegen. In den Experimenten dieser Arbeit unterschieden sich die Transformationsfrequenzen von PMSS1 gegenüber P12 um ca. 10^{-3} .

Während der Niederschrift dieser Arbeit publizierten Damke *et al.* (2022) ihre Ergebnisse über die Beteiligung von *hp1473*, von ihnen *comFC* genannt, an der natürlichen Transformation von *H. pylori*.

Ihre Deletionsmutante Δ *comFC* zeigte eine Abnahme der Transformationseffizienz von ca. 4-Log-Stufen im Gegensatz zum Wildtyp. Die natürliche Kompetenz war jedoch, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in einem sehr geringen Ausmaß erhalten. Mögliche Gründe

für unterschiedliche Transformationsfrequenzen können die verschiedenen *H. pylori*-Stämme oder die getesteten Antibiotikaresistenzkassetten sein (Fischer *et al.*, 2001a). Trotzdem wirft dieses Ergebnis weitere Fragen auf, da bei den vielen Transformationsversuchen in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen und DNA-Arten nie eine Mutante erzeugt wurde.

Zusätzlich beobachteten Damke *et al.* (2022) fluoreszenzmarkierte DNA, die in der Mutante $\Delta comFC$, ähnlich wie in der Mutante $\Delta comEC$, nicht im Cytoplasma nachweisbar war. Daraus wurde gefolgert, dass ComFC am Transport der DNA durch die innere Membran beteiligt ist. In weiteren Experimenten zeigten sie, dass ComFC auch an nachfolgenden Schritten der Transformation eine Rolle spielen muss. Einzelstrang-DNA, die zuvor durch Elektroporation in das Cytoplasma in die Mutante $\Delta comFC$ eingebracht wurde, erzielte nur sehr geringe Transformationsereignisse, ähnlich wie bei der Mutante $\Delta dprA$.

Außerdem belegten sie, dass ComFC nur an ssDNA und nicht an dsDNA bindet. Zusätzlich schützte ComFC die ssDNA vor dem Abbau durch eine nicht-spezifische Nuklease in einem Testversuch. Bei der Fraktionierung der Bakterien ließ sich in ihren Experimenten ComFC in der inneren Membran und in der löslichen Phase nachweisen, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Damke *et al.* (2022) sahen die ComFC-Bande der löslichen Phase jedoch als Überexpression und folgerten, dass ComFC mit der inneren Membran assoziiert ist, entweder durch eine direkte Verbindung oder vermittelt durch ein anderes Protein. Ihre Strukturanalysen und Analysen mit bioinformatischen Programmen ergaben, dass ComFC C-terminal eine Phosphoribosyltransferase- und N-terminal eine Zinkfingerdomäne enthält.

Aus ihren Experimenten zogen Damke *et al.* (2022) den Schluss, dass ComFC an der inneren Membran lokalisiert ist. ComFC ist einerseits am Transport von ssDNA durch die innere Membran ins Cytoplasma und andererseits am Verbindungsschritt der DNA zwischen Cytoplasma-Aufnahme und Rekombination ins Chromosom beteiligt. Zusätzlich spekulierten sie, dass ComFC zusammen mit DprA und RecA die aufgenommene DNA vor dem Abbau schützen könnte.

Viele Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich mit den Ergebnissen von Damke *et al.* (2022) zusammenführen, um ein besseres Bild von der Rolle von HPP12_1451/ComFC am Transformationsmechanismus zu bekommen.

HPP12_1451/ComFC ist sowohl für die natürliche Transformationskompetenz als auch für die Konjugation, ein weiterer Weg des horizontalen Gentransfers, und die Elektroporation von DNA essentiell.

Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass die verschiedenen DNA-Aufnahmemechanismen natürliche Transformation, Konjugation und Elektroporation in ihren

Wegen miteinander verknüpft sind, vermutlich im späteren Teil der DNA-Aufnahme ins Cytoplasma.

Laut Damke *et al.* (2022) ist HPP12_1451/ComFC am Transport von ssDNA durch die innere Membran ins Cytoplasma und an der Verbindung zwischen Aufnahme der ssDNA ins Cytoplasma und Rekombination beteiligt.

Gegen eine ausschließliche Beteiligung von HPP12_1451/ComFC an der homologen Rekombination spricht, dass in dieser Arbeit auch die Transformation und Elektroporation von Shuttle-Plasmiden, die sich selbst replizieren und nicht ins Chromosom integrieren, in die Deletionsmutante nicht möglich war. HPP12_1451/ComFC muss somit an Schritten der natürlichen Transformation vor der Rekombination beteiligt sein.

Daraus und aufgrund des Mitwirkens von HPP12_1451/ComFC an den verschiedenen DNA-Aufnahmemechanismen kann die Vermutung aufgestellt werden, dass HPP12_1451/ComFC die aufgenommene DNA vor dem Abbau durch Restriktionsenzyme schützt. Diese Schutzfunktion wird durch die Ergebnisse von Damke *et al.* (2022) unterstützt, in welchen gezeigt wurde, dass HPP12_1451/ComFC ssDNA bindet und ssDNA vor dem Abbau durch eine unspezifische Nuklease schützt.

Die Ergebnisse beider Arbeiten zusammengefasst sprechen für das Vorhandensein von HPP12_1451/ComFC im Cytoplasma und einer Assoziation mit der inneren Membran.

Weitere Versuche mit HPP12_1451/ComFC sind notwendig, um den genauen Wirkort des Proteins zu bestätigen und ggf. Bindungsproteine an die innere Membran zu identifizieren.

Die hier gewonnenen Ergebnisse ließen sich durch einen Tierversuch ergänzen, in dem das Fehlen von HPP12_1451/ComFC hinsichtlich seiner Auswirkung auf die Kolonisierung von *H. pylori* im Mausmodell getestet wird.

4.2 Beteiligung von *hp0506* an der natürlichen Transformation

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Kandidatengen *hp0506* und sein Protein HP0506 auf seine Beteiligung am Mechanismus der natürlichen Transformation untersucht. Das Gen *hp0506* gehört zu den konservierten Genen von *H. pylori* (s. Abschnitt 3.2.1).

Das Protein HP0506, auch HdpA oder Csd3 genannt, besitzt eine Carboxypeptidase- und eine Endopeptidase-Aktivität und ist aufgrund seiner Peptidoglykan-modifizierenden Eigenschaft an der Zellform, der Stabilität und der Polbildung beteiligt (Bonis *et al.*, 2010; Sycuro *et al.*, 2010). Die Endopeptidase-Aktivität führt zu einer lokalen Peptidoglykan-Hydrolyse. Die Frage, inwieweit HP0506/HdpA eine Rolle beim Transportvorgang von DNA-Fragmenten während

der Transformation spielt, wurde in dieser Arbeit untersucht. Dabei wurde auch auf die Größe der zu transformierenden DNA-Fragmente eingegangen, da vermutet wurde, dass das Fehlen von HP0506 sich aufgrund seiner Endopeptidase-Aktivität stärker auf die Aufnahme von größeren Fragmenten auswirken könnte.

In den Transformationsexperimenten zeigte sich HP0506 als nicht essentiell für die natürliche Transformation (s. Abschnitt 3.2.2), Transformationen von DNA in die Deletionsmutante waren weiterhin möglich. Bei der Transformation von einer Chloramphenicolresistenzkassette in *recA* (pWS48), mit einer Größe von ca. 850 Bp plus flankierende Bereiche, war die Transformationsfrequenz der Deletionsmutante P12 Δ *hp0506* etwas geringer als die Transformationsfrequenz des Wildtyp-Stammes P12. Der Unterschied beider Stämme war jedoch nicht signifikant.

Beim Verwenden eines größeren DNA-Fragmentes aus pLH2, bestehend aus *cat*-Kassette, *alpA*-Promotor und *babA*, insgesamt 3613 Bp plus flankierende Bereiche, zur Transformation zeigte sich mit fast 2 Log-Stufen ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und der Deletionsmutante P12 Δ *hp0506* (s. Abschnitt 3.2.2).

Dieses Ergebnis kann als Hinweis gesehen werden, dass HP0506 an der Transformation größerer DNA-Fragmente beteiligt ist. Hierfür müssen jedoch weitere Faktoren, die die Transformationseffizienz der Mutante beeinflussen können, ausgeschlossen werden.

Auffällig ist, dass das große Fragment von pLH2 insgesamt deutlich schlechter zu transformieren war. Auch die Transformationsfrequenz des Wildtyps mit pLH2 war mit über 3 Log-Stufen deutlich geringer als mit pWS48. Zusätzlich zur insgesamt schlechteren Transformationsfähigkeit von pLH2 besteht ein deutlich langsames Wachstum der Deletionsmutante P12 Δ *hp0506*. Bonis *et al.* (2010) zeigten mit der Bestimmung von Wachstumsraten eine leichte Wachstumsverzögerung der Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp, insbesondere zu Beginn der Wachstumsphase. Über die Transformationskompetenz ist bekannt, dass diese vor Beginn der exponentiellen Wachstumsphase am größten ist (Israel *et al.*, 2000). In Folge kann angenommen werden, dass durch langsames Wachstum auch die Transformationsfrequenzen reduziert werden.

Bei schlechter zu transformierenden DNA-Abschnitten, wie dem Fragment aus pLH2, könnte dieser Effekt stärker sichtbar werden. Dadurch könnte es sein, dass die niedrigeren Transformationsfrequenzen von P12 Δ *hp0506* gegenüber dem Wildtyp auf ein insgesamt langsames Wachstum zurückzuführen sind.

Zusätzlich stellt sich die Frage, wie das Fehlen von HP0506 den Transformationsmechanismus beeinflussen kann. Es wurde beschrieben, dass HP0506 an der Bildung der Zellform und Polbildung beteiligt ist. Die Inaktivierung des Gens führte zu einer unteretzten und verzweigten Form des Bakteriums und Bildung zusätzlicher Zellpole (Bonis *et al.*, 2010). Über die natürliche Kompetenz von *H. pylori* ist bekannt, dass die DNA-Aufnahme

im Wesentlichen an den Zellpolen und den nachfolgenden Septen stattfindet (Stingl *et al.*, 2010). Demnach ist es vorstellbar, dass eine veränderte Zellform und mehrere Zellpole durch das Fehlen von HP0506 auch zu einer veränderten DNA-Aufnahme führen kann.

Des Weiteren ist es möglich, dass HP0506 aufgrund seiner Endopeptidase-Aktivität direkt am Transport von DNA-Fragmenten während des Transformationsvorgangs beteiligt ist. HP0506 besitzt eine Transmembrandomäne und ist C-terminal im Periplasma lokalisiert (An *et al.*, 2015).

Über den Transformationsmechanismus ist bekannt, dass die DNA, die als Doppelstrang über die äußere Membran aufgenommen wurde, durch das Periplasma zu ComEC, dem Kanalprotein der inneren Membran, transportiert wird (Stingl *et al.*, 2010). Der periplasmatische DNA-Rezeptor ComH besitzt eine starke Affinität für die dsDNA und ist am Import der DNA ins Periplasma und am weiteren Transport zu ComEC beteiligt (Damke *et al.*, 2019). Des Weiteren befindet sich im Periplasma die Endonuklease NucT, die vorzugsweise Einzelstrang-DNA spaltet. Es wird angenommen, dass NucT am Abbau des Einzelstranges, der nicht ins Cytoplasma übertritt, beteiligt ist (O'Rourke *et al.*, 2004; Celma *et al.*, 2017).

Die Beteiligung von HP0506 am Transformationsmechanismus ist durch die lokale Hydrolyse der Peptidoglykane an 2 verschiedenen Stellen der Transformation vorstellbar. Zum einen könnte HP0506 die Weitergabe der dsDNA durch ComH zum Kanalprotein ComEC unterstützen, zum anderen könnte HP0506 am Abtransport von DNA-Fragmenten von NucT eine Rolle spielen. Bei beiden Abläufen ist es denkbar, dass das Fehlen von HP0506 den Transport größere Fragmente stärker beeinflusst und somit die Transformationseffizienz reduziert wird.

Die Experimente dieser Arbeit sind für den Nachweis der Beteiligung von HP0506 am Transformationsmechanismus nicht ausreichend. So wurden die Transformationsexperimente in dieser Arbeit nur mit Plasmid-DNA durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Methylierungsmuster und Restriktions-Modifikations-Systeme in *H. pylori* sollten die Experimente zusätzlich mit genomischer DNA von *H. pylori* und auch mit Shuttle-Plasmiden durchgeführt werden, um eine bessere Aussagekraft über den Einfluss der Art und Größe der zu transformierenden DNA-Fragmente zu erhalten. Auch könnte die Wirkung des fehlenden HP0506 auf weitere DNA-Aufnahmemechanismen, wie die Konjugation oder Elektroporation, in Experimenten getestet werden, um die Rolle von HP0506 und den Wirkungsort im Transformationsmechanismus besser differenzieren zu können. Zusätzlich könnte mit fluoreszenzmarkierter DNA der Transformationsvorgang der Deletionsmutante mikroskopisch beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigt das Ergebnis dieser Arbeit, dass die Transformation eines größeren DNA-Fragmentes durch das Fehlen von HP0506 stärker reduziert wurde, als bei der Transformation eines kleineren Fragmentes. Dies kann als Hinweis auf eine Beteiligung von

HP0506 am Transformationsmechanismus gesehen werden, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieser Effekt durch die Wachstumsverzögerung oder die Formveränderung der Deletionsmutante zustande kommt.

4.3 Etablierungsversuch einer *in vivo*-Mutantenbank von *H. pylori*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Mutantenbank von *H. pylori* erstellt werden, in der jedes einzelne Gen dem jeweiligen Defekt abgebildet werden sollte. Hierfür sollte ein *in vivo*-Mutagenesesystem auf der Basis des EZ-Tn5-Systems für *H. pylori* etabliert werden. Zusätzlich sollte ein effizientes Screeningverfahren von *C. jejuni* (Wiesner *et al.*, 2003) an *H. pylori* angepasst werden, um transformationsdefiziente Mutanten zu detektieren.

4.3.1 Etablierungsversuch eines Screeningverfahrens transformationsdefizienter Mutanten von *H. pylori*

In einem Teilprojekt sollte das Screeningverfahren nach Wiesner *et al.* (2003) für *C. jejuni*-Mutanten, die die natürliche Transformationsfähigkeit verloren hatten, für *H. pylori* angepasst werden. Dieses Verfahren bot die Möglichkeit, einzelne Bakterien ohne großen Aufwand hinsichtlich ihrer DNA-Aufnahmefähigkeit zu überprüfen. Beim Fehlen der Kompetenz identifizierte man am Ende eine Bakterienkolonie, genetisch unverändert, mit der weitergearbeitet werden konnte. Voraussetzung für die Selektion war, dass innerhalb der jeweiligen Kolonie aller transformationsfähigen Mutanten auf den DNA-Platten mindestens einmal über natürliche Transformation die Antibiotikaresistenzkassette aufgenommen wurde. Dabei wurde von einer 100-prozentigen Effizienz gesprochen.

Für *H. pylori* wurden zunächst die Menge genomischer DNA für die Serumplattenbeschichtung, die Kultivierungsdauer der einzelnen Mutanten auf den DNA-beschichteten Platten und die Art der Antibiotikaresistenzkassette der genomischen DNA näher untersucht.

Die meisten Transformationsereignisse wurden in den ersten Testversuchen beim Verwenden von 2 µg gDNA mit einer Chloramphenicolresistenzkassette und einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen erreicht.

Auffällig war, dass beim Verwenden von größeren Mengen (5 µg) von gDNA mit einer Chloramphenicolresistenz für die Beschichtung der Platten weniger Transformationsereignisse erzielt wurden als mit 2 µg gDNA. Des Weiteren führten sowohl kürzere, als auch längere Kultivierungszeiten auf den DNA-Platten zu schlechteren Ergebnissen. Überraschenderweise eigneten sich die Antibiotikaresistenzen Kanamycin und

Streptomycin weniger als die Chloramphenicolresistenz für die Beschichtung der DNA-Platten. Die Streptomycinresistenz (*rpsL*) wird durch eine Punktmutation vermittelt, sodass man annehmen könnte, dass diese leichter zu transformieren sei. Dies war jedoch nicht der Fall. Letztendlich wurde keine 100-prozentige Effizienz erzielt, sodass das Verfahren nicht ausreichend an *H. pylori* angepasst werden konnte und nach den Versuchsreihen abgebrochen wurde.

Unter der Annahme, dass eine Bakterienkolonie ungefähr 10^8 bis 10^9 Bakterien enthält, sollte beim Hochwachsen einer Mutante bei Transformationsraten von 10^{-3} bis 10^{-6} mindestens ein Transformationsereignis mit der gDNA stattgefunden und sich dieses Bakterium vervielfältigt haben. Nun stellt sich die Frage, warum diese Effizienz in den Testversuchen mit *H. pylori*, im Gegensatz zu *C. jejuni* bei Wiesner *et al.* (2003), nicht erreicht wurde.

Leider wurde beim *C. jejuni*-Verfahren nicht beschrieben, wie lange die Mutanten auf den DNA-Platten inkubiert wurden, bis sie auf die Serumplatten mit und ohne Antibiotikum weitergestrichen wurden. Aufgrund des schnelleren Wachstums von *C. jejuni* gegenüber *H. pylori* kann vermutet werden, dass kürzere Zeiträume bei *C. jejuni* ausreichen. Die Verdopplungszeiten betragen bei *H. pylori* 4-6 h am ersten Tag (Tan *et al.*, 2009) und bei *C. jejuni* 1,2 h unter optimalen Laborbedingungen (Golz und Stingl, 2021), bzw. 2 h (Battersby *et al.*, 2016), wobei die Verdopplungszeiten von den Wachstumsbedingungen, wie Medium und Temperatur abhängen. Die größte Transformationskompetenz ist bei *H. pylori* vor Beginn der exponentiellen Wachstumsphase vorhanden (Israel *et al.*, 2000).

Durch die relativ lange Inkubationszeit von *H. pylori* auf den Serumplatten, die jedoch für das Hochwachsen einer Kolonie nötig ist, kann vermutet werden, dass aufgrund des Mangels an frischem Medium die natürliche Kompetenz abnimmt oder auch ein Teil der Bakterien zu Grunde geht. Bestärkt wird diese Vermutung auch durch die Beobachtung, dass nach einer längeren Inkubationszeit die Effizienz der Transformation durch Aufnahme der DNA von der Platte wieder abnahm.

Außerdem ist die Frage ungeklärt, inwieweit die ausplattierte gDNA über mehrere Tage im Inkubator stabil ist. Bei Beeinträchtigungen wäre auch hier das schnellere Wachstum von *C. jejuni* von Vorteil.

Eine technische Fehlerquelle kann eine ungleichmäßige Beschichtung der Serumplatten mit gDNA sein. Beim Ausplattieren wurde die gesamte Platte mit der DNA-Lösung befeuchtet, eine unregelmäßige Verteilung wurde jedoch nicht ausgeschlossen.

Um die Wahrscheinlichkeit der ungenügenden DNA-Beschichtung an einzelnen Stellen der Platten zu reduzieren, wäre die einfachste Folgerung, größere Mengen an DNA zu verwenden. Dagegen spricht jedoch, dass bei größerem Einsatz von gDNA, die Effizienz nicht gesteigert

werden konnte. Israel *et al.* (2000) beschrieben einen Sättigungseintritt der Transformationsfrequenzen beim Verwenden einer gewissen Menge von homologer DNA.

Eine weitere mögliche Erklärung, warum das Screeningmodell für *H. pylori* eine geringere Effizienz aufweist, sind die unterschiedlichen Transformationsfrequenzen von *C. jejuni* und *H. pylori*. Ein direkter Vergleich der beiden Bakterienarten hinsichtlich ihrer Transformationsfrequenzen konnte nicht gefunden werden.

In unabhängigen Veröffentlichungen wurde die Frequenz für *H. pylori* bei der Transformation mit gDNA mit einer Metronidazolresistenz mit 3×10^{-5} , mit homologer Plasmid-DNA mit einer Chloramphenicolresistenz mit 10^{-4} , mit Plasmid-DNA (Chloramphenicolresistenz) aus einem anderen Stamm mit $< 10^{-7}$ (Wang *et al.*, 1993) und mit homologer und heterologer gDNA mit einer Streptomycinresistenz zwischen 10^{-3} und 10^{-5} (Israel *et al.*, 2000) beschrieben.

Für *C. jejuni* sind beispielweise Transformationsfrequenzen von 10^{-4} für homologe gDNA mit einer Streptomycinresistenz oder Nalidixinsäureresistenz (Wang und Taylor, 1990) und 10^{-3} bis 10^{-4} für gDNA mit einer Streptomycin- oder Kanamycinresistenz (Wiesner *et al.*, 2003) bekannt. Aufgrund dieser Beispiele könnte man folgern, dass *C. jejuni* eine geringfügig stärker ausgeprägte Transformationskompetenz als *H. pylori* besitzt.

Grundsätzlich muss auch bedacht werden, dass die Transformationsfrequenzen, abhängig von den transformierenden Resistenzmarkern, der Bakterienstämme und der Wachstumsbedingungen, wie Atmosphäre, Temperatur und pH-Wert, variieren (Fischer *et al.*, 2001a; Krueger *et al.*, 2016; Corbinais *et al.*, 2017).

Als wahrscheinlichste Ursache, warum das Screeningverfahren von *C. jejuni* nicht für *H. pylori* anwendbar war, scheint die Kombination der verschiedenen Faktoren zu sein.

Auch in der Literaturrecherche konnte kein Selektionsverfahren für transformationsdefiziente *H. pylori*-Mutanten, mit dem eine große Anzahl an Mutanten schnell untersucht werden kann, gefunden werden. In anderen Arbeitsgruppen, in denen Mutantenbanken auf die Transformationskompetenz untersucht wurden, wurde für jede Mutante ein Transformationsversuch durchgeführt. Für die Transformationen verwendeten Smeets *et al.* (2000) beispielsweise genomische DNA mit einer Clarithromycinresistenz und Chang *et al.* (2001) Plasmid- und genomische DNA mit einer Chloramphenicolresistenz. Einzelne Transformationen für jede Mutante sind personell und zeitlich sehr aufwendig.

Die Kombination der beiden Systeme kann das Screening für transformationsdefiziente *H. pylori*-Mutanten verbessern. Das an *H. pylori* partiell angepasste Verfahren von Wiesner *et al.* (2003) kann zur Vorselektion von möglicherweise transformationsdefizienten Mutanten

verwendet werden, wobei alle Mutanten, die nicht auf der Serumplatte mit Antibiotikum wachsen, in einem zweiten Schritt durch einzelne Transformationsexperimente jeweils genauer untersucht werden müssen. Somit konnte kein in sich geschlossenes Screeningverfahren für *H. pylori* entwickelt werden. Die aktuelle Situation wurde aber verbessert, indem ein Teil der einzelnen Transformationen beim Screening eingespart werden kann.

4.3.2 Etablierungsversuch der *in vivo*-Mutagenese in *H. pylori*

Die *in vivo*-Mutagenese für *H. pylori* sollte mit dem EZ-Tn5-System etabliert werden. In der Arbeitsgruppe wurde bereits in der Vergangenheit ein *in vitro*-Mutagenesesystem erstellt (Kavermann *et al.*, 2003) und Mutanten generiert, wobei sich die verschiedenen Klonierungs- und Transformationsschritte als sehr aufwendig gestalteten. Des Weiteren konnten nicht alle Gene von *H. pylori* in der Mutantenbank abgebildet werden, da die Gene, die für *E. coli* toxisch sind, nicht in *E. coli* vervielfältigt wurden. Diese aufgeführten Punkte sollten mit einem *in vivo*-Mutagenesesystem umgangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transposons TnHK9 und TnJR8 verwendet, die sich in ihren Antibiotikaresistenzkassetten unterscheiden. Die *cat*-Kassette in TnHK9 und die *aphA-3*-Kassette in TnJR8 werden von den Mosaikenden (ME) flankiert.

Die *in vivo*-Transpositionsreaktionen wurden mit den Transposons TnHK9 und TnJR8, die, wie vom Hersteller Epicentre empfohlen, aus den Plasmiden pHK9 und pJR8 mittels PCR erstellt wurden, durchgeführt. Alternativ wurden die vollständigen Plasmiden pHK9 und pJR8 als Transposons verwendet. Des Weiteren wurden mit den Transposons TnHK9 und TnJR8 *in vitro*-Transpositionsreaktionen mit gDNA von *H. pylori* P12 durchgeführt, bei denen die Transposons in die gDNA integrieren und im zweiten Schritt über Transformation in die *H. pylori*-Bakterien eingebracht werden sollten. Alle drei Varianten der Transpositionsreaktionen mit den jeweils unterschiedlichen Antibiotikaresistenzkassetten im Transposon erzeugten im *H. pylori*-Stamm P12 leider keine Mutanten.

Auf mögliche Erklärungen, warum die Etablierung der *in vivo*-Mutagenese für *H. pylori* nicht funktionierte, und Verbesserungsvorschläge soll in diesem Abschnitt näher eingegangen werden.

Ein Erklärungsansatz hierfür sind die unterschiedlichen Restriktions-Modifikations-Systeme (R-M-Systeme) der verschiedenen Bakterienstämme.

R-M-Systeme limitieren grundsätzlich, heterologe DNA im Rahmen der Transformation ins Genom zu integrieren, während homologe DNA, unabhängig ihrer Methylierung, nicht beeinflusst wird. Begründet wird dies damit, dass nach Aufnahme des Einzelstranges der heterologen DNA ein Komplementärstrang gebildet werden muss, wobei der entstehende

Doppelstrang nicht methyliert ist und somit durch die Restriktionsendonukleasen abgebaut werden kann. Der Einzelstrang der homologen DNA dagegen bildet sofort einen Komplex mit der chromosomalen DNA, sodass dieser hemi-methyliert nicht abgebaut werden kann (Bubendorfer *et al.*, 2016).

Unabhängig von der Integration ins Chromosom muss der Methylierungsstatus jedoch auch bei der Transformation selbst eine Rolle spielen, da z.B. das Shuttle-Plasmid pHel2 100-fach effizienter transformiert wurde, wenn es zuvor aus dem *H. pylori*-Stamm P1 anstelle des *E. coli*-Stammes DH5 α isoliert wurde (Heuermann und Haas, 1998).

Im Rahmen der Transpositionsreaktion wird das Transposon als Doppelstrang geschnitten und in die Ziel-DNA integriert (Goryshin und Reznikoff, 1998).

Transposons, die durch das PCR-Verfahren erstellt wurden, haben keine Methylierungen, während Transposons, die aus *E. coli* isoliert wurden, nur das *E. coli*-Methylierungsmuster aufweisen. Dies könnte zur Folge haben, dass die Transposon-DNA bei der DNA-Aufnahme durch die Restriktions-Modifikations-Systeme als fremd erkannt und gespalten wird.

Um die unterschiedlichen Methylierungsmuster zu umgehen, kann darüber nachgedacht werden, das Transposon in *H. pylori* einzubringen und zu vervielfältigen. Hierfür würde sich ein pHel-Shuttlesystem, z.B. pHel3 anbieten, in welches das Transposon kloniert wird. Nach Transformation und der Vervielfältigung in *H. pylori* könnte das Plasmid isoliert, durch Restriktionsenzyme geschnitten und das Transposon durch Elektrophorese und anschließender Aufreinigung gewonnen werden. Das Transposon würde dann mit einem *H. pylori*-Methylierungsmuster für *in vivo*-Transpositionsreaktionen zur Verfügung stehen.

Eine erfolgreiche Durchführung der EZ-Tn5-Mutagenese *in vivo* wurde für *C. jejuni* beschrieben (Teh *et al.*, 2017). Als Transposon wurde dabei ebenso eine Chloramphenicolkassette zwischen den ME verwendet und durch das PCR-Verfahren amplifiziert. Die Durchführung der Transpositionsreaktion erfolgte, auch wie in dieser Arbeit, wie vom Hersteller angegeben. Teh *et al.* (2017) erhielten für den *C. jejuni* Stamm 2868 insgesamt 37 Mutanten. Interessanterweise wurden die Versuche auch mit 7 anderen *C. jejuni*-Stämmen durchgeführt, ohne Mutanten zu erhalten, weshalb die These aufgestellt wurde, dass die Transposonmutagenese stammabhängig sei. Als Ursache wurden dabei ebenso die verschiedenen Restriktions-Modifikationssysteme vermutet.

Aus dem Beispiel lässt sich schließen, dass die *in vivo*-Mutagenese mit dem EZ-Tn5-System auch mit weiteren *H. pylori*-Stämmen versucht werden sollte.

Für das Bakterium *Deinococcus radiodurans* wurde eine andere Methode der *in vivo* EZ-Tn5-Mutagenese etabliert. Hierfür wurde ein Shuttlevektor, welcher sowohl das Transposon als auch das Transposase-codierende Gen mit passendem Promotor enthält, kloniert. Nach

der Transformation des Vektors ins Bakterium wurde das Transposon in die DNA integriert. Der verwendete Vektor war des Weiteren temperatursensitiv, sodass durch spätere Temperaturerhöhung der Vektor zerstört wurde. Es wurde dabei eine Frequenz der Transpositionereignisse von 10^{-2} erfasst (Dulermo *et al.*, 2015).

Ein möglicher Vorteil des Verfahrens ist, dass das Enzym Transposase nicht von außen in das Bakterium eingebracht werden muss, sondern erst im Bakterium synthetisiert wird. Falls das Problem der fehlenden *H. pylori*-Mutanten bei der *in vivo*-Mutagenese mit dem EZ-Tn5-System daran liegt, dass der Transpositions-komplex beim Einbringen in das Bakterium zu instabil ist, könnte dieses Verfahren für *H. pylori* übernommen und angepasst werden. Es müsste jedoch eine andere Methode zur Selektion auf *H. pylori* als die Temperatursensitivität des Vektors für *D. radiodurans* gefunden werden.

Eine weitere Überlegung für die fehlenden *H. pylori*-Mutanten ist, dass die Transposase EZ-Tn5 in *H. pylori* nicht funktioniert. Jedoch liefert dieser Ansatz keine Erklärung dafür, dass auch die Integration des Transposons *in vitro* in genomische DNA von *H. pylori* nicht funktionierte. Trotzdem kann überlegt werden, ein anderes Transposase-System für die *in vivo*-Versuche zu erproben, falls dies besser in *H. pylori* arbeitet als das EZ-Tn5-System.

Für *H. pylori* findet sich in der Literatur ein Tn7-basiertes *in vitro*-Mutagenesesystem, mit welchem eine Datenbank von ca. 10 000 Mutanten erstellt wurde. Zuerst wurde das Transposon über die Transpositionsreaktion in chromosomale DNA integriert und anschließend über die natürliche Transformation in *H. pylori* eingebracht (Salama *et al.*, 2004). Für die Transpositionsreaktion wurde dabei der gesamte Vektor verwendet, der das Transposon beinhaltet.

Im Gegensatz zum Tn7-Mutagenesesystem *in vitro*, welches eine beachtliche Anzahl an Mutanten lieferte, war das EZ-Tn5-Mutagenesesystem dieser Arbeit mit der Integration des Transposons in genomische DNA nicht erfolgreich.

Ein Nachteil der *in vitro*-Mutagenese ist, dass DNA-Abschnitte der genomischen DNA, die grundsätzlich schlecht zu transformieren sind, auch in den Mutanten nicht verändert werden. Des Weiteren kann durch die Transformationen von genomischer DNA, auch ohne Transposon, das *H. pylori*-Genom des Wildtyps weiter verändert werden.

Nach dem Erfolg von Salama *et al.* (2004) mit der *in vitro*-Mutagenese Tn7 in genomische DNA von *H. pylori* lässt sich dieses Verfahren vielleicht auch *in vivo* etablieren, was Gegenstand in künftigen Experimenten sein kann.

Bis zu diesem Zeitpunkt existierte weiterhin keine *in vivo*-Mutantenbank für *H. pylori*, in der alle Gene von *H. pylori* abgebildet werden. Eine eindeutige Ursache, warum eine *in vivo*-Transposonmutagenese mit dem EZ-Tn5-System in *H. pylori* nicht funktionierte, konnte nicht

gefunden werden. Die verschiedenen aufgeführten Überlegungen lassen vermuten, dass die unterschiedlichen Restriktions-Modifikations-Systeme von *H. pylori* das Transposonsystem beeinflussen.

Für die erfolgreiche Etablierung einer *in vivo*-Transposonmutagenese für *H. pylori* sind weitere Versuche notwendig. Denkbare Möglichkeiten sind, z.B. andere *H. pylori*-Stämme zu verwenden oder das Transposon über die Vervielfältigung in *H. pylori* mit dem eigenen Methylierungsmuster zu versehen. Auch die Testung einer anderen Transposase, z.B. die TransposaseTn7, ist zu überlegen.

Literaturverzeichnis

- Ahn, T., Yim, S. K., Choi, H. I. und Yun, C. H. (2001). Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes. *Anal Biochem* 291(2): 300-303.
- Ailloud, F., Estibariz, I., Pfaffinger, G. und Suerbaum, S. (2022). The *Helicobacter pylori* UvrC Nuclease Is Essential for Chromosomal Microimports after Natural Transformation. *mBio* 13(4): e0181122.
- 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. und Trust, T. J. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397(6715): 176-180.
- An, D. R., Kim, H. S., Kim, J., Im, H. N., Yoon, H. J., Yoon, J. Y., Jang, J. Y., Hesek, D., Lee, M., Mobashery, S., Kim, S. J., Lee, B. I. und Suh, S. W. (2015). Structure of Csd3 from *Helicobacter pylori*, a cell shape-determining metallopeptidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71(Pt 3): 675-686.
- Ando, T., Israel, D. A., Kusugami, K. und Blaser, M. J. (1999). HP0333, a member of the *dprA* family, is involved in natural transformation in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 181(18): 5572-5580.
- Ando, T., Xu, Q., Torres, M., Kusugami, K., Israel, D. A. und Blaser, M. J. (2000). Restriction-modification system differences in *Helicobacter pylori* are a barrier to interstrain plasmid transfer. *Mol Microbiol* 37(5): 1052-1065.
- Atherton, J. C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 1: 63-96.
- Backert, S. und Blaser, M. J. (2016). The Role of CagA in the Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 76(14): 4028-4031.
- Battersby, T., Walsh, D., Whyte, P. und Bolton, D. J. (2016). *Campylobacter* growth rates in four different matrices: broiler caecal material, live birds, Bolton broth, and brain heart infusion broth. *Infect Ecol Epidemiol* 6: 31217.
- Bonis, M., Ecobichon, C., Guadagnini, S., Prevost, M. C. und Boneca, I. G. (2010). A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence. *Mol Microbiol* 78(4): 809-819.
- Bubendorfer, S., Krebs, J., Yang, I., Hage, E., Schulz, T. F., Bahlawane, C., Didelot, X. und Suerbaum, S. (2016). Genome-wide analysis of chromosomal import patterns after natural transformation of *Helicobacter pylori*. *Nat Commun* 7: 11995.
- Celma, L., Corbinais, C., Vercruyssen, J., Veaute, X., de la Sierra-Gallay, I. L., Guerois, R., Busso, D., Mathieu, A., Marsin, S., Quevillon-Cheruel, S. und Radicella, J. P. (2017). Structural basis for the substrate selectivity of *Helicobacter pylori* NucT nuclease activity. *PLoS One* 12(12): e0189049.
- Chang, K. C., Yeh, Y. C., Lin, T. L. und Wang, J. T. (2001). Identification of genes associated with natural competence in *Helicobacter pylori* by transposon shuttle random mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 288(4): 961-968.

- Corbinais, C., Mathieu, A., Damke, P. P., Kortulewski, T., Busso, D., Prado-Acosta, M., Radicella, J. P. und Marsin, S. (2017). ComB proteins expression levels determine *Helicobacter pylori* competence capacity. *Sci Rep* 7: 41495.
- Covacci, A., Falkow, S., Berg, D. E. und Rappuoli, R. (1997). Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol* 5(5): 205-208.
- Cover, T. L. und Blanke, S. R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 3(4): 320-332.
- Cover, T. L., Dooley, C. P. und Blaser, M. J. (1990). Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 58(3): 603-610.
- Damke, P. P., Celma, L., Kondekar, S. M., Di Guilmi, A. M., Marsin, S., Dépagne, J., Veaute, X., Legrand, P., Walbott, H., Vercruyssen, J., Guérois, R., Quevillon-Cheruel, S. und Radicella, J. P. (2022). ComFC mediates transport and handling of single-stranded DNA during natural transformation. *Nat Commun* 13(1): 1961.
- Damke, P. P., Di Guilmi, A. M., Varela, P. F., Velours, C., Marsin, S., Veaute, X., Machouri, M., Gunjal, G. V., Rao, D. N., Charbonnier, J. B. und Radicella, J. P. (2019). Identification of the periplasmic DNA receptor for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *Nat Commun* 10(1): 5357.
- Debowski, A. W., Gauntlett, J. C., Li, H., Liao, T., Sehna, M., Nilsson, H. O., Marshall, B. J. und Benghezal, M. (2012). Xer-cise in *Helicobacter pylori*: one-step transformation for the construction of markerless gene deletions. *Helicobacter* 17(6): 435-443.
- Dorer, M. S., Fero, J. und Salama, N. R. (2010). DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 6(7): e1001026.
- Dorer, M. S., Sessler, T. H. und Salama, N. R. (2011). Recombination and DNA repair in *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol* 65: 329-348.
- Dorer, M. S., Talarico, S. und Salama, N. R. (2009). *Helicobacter pylori*'s unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog* 5(10): e1000544.
- Dulermo, R., Onodera, T., Coste, G., Passot, F., Dutertre, M., Porteron, M., Confalonieri, F., Sommer, S. und Pasternak, C. (2015). Identification of new genes contributing to the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* using a Tn5-based transposon mutant library. *PLoS One* 10(4): e0124358.
- Dunn, B. E. und Phadnis, S. H. (1998). Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. *Yale J Biol Med* 71(2): 63-73.
- Dwivedi, G. R., Sharma, E. und Rao, D. N. (2013). *Helicobacter pylori* DprA alleviates restriction barrier for incoming DNA. *Nucleic Acids Res* 41(5): 3274-3288.
- Eaton, K. A., 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(7): 2470-2475.

- Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C. und Krakowka, S. (1996). Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 64(7): 2445-2448.
- Eidt, S., Stolte, M. und Fischer, R. (1994). *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 47(5): 436-439.
- Escoffre, J. M., Portet, T., Wasungu, L., Teissie, J., Dean, D. und Rols, M. P. (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol Biotechnol* 41(3): 286-295.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M. J., Graham, D. Y., Vacher, S., Perez-Perez, G. I., Yamaoka, Y., Megraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M. und Suerbaum, S. (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299(5612): 1582-1585.
- Feldman, R. A., Eccersley, A. J. und Hardie, J. M. (1998). Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. *Br Med Bull* 54(1): 39-53.
- Fernandez-Gonzalez, E. und Backert, S. (2014). DNA transfer in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 49(4): 594-604.
- Fischbach, W., Bornschein, J., Hoffmann, J. C., Koletzko, S., Link, A., Macke, L., Malfertheiner, P., Schütte, K., Selgrad, D. M., Suerbaum, S. und Schulz, C. (2022). Aktualisierte S2k-Leitlinie *Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2022 – AWMF-Registernummer: 021 – 001.
- Fischbach, W. und Malfertheiner, P. (2018). *Helicobacter Pylori* Infection. *Dtsch Arztebl Int* 115(25): 429-436.
- Fischbach, W., Malfertheiner, P., Lynen Jansen, P., Bolten, W., Bornschein, J., Buderus, S., Glocker, E., Hoffmann, C. J., Koletzko, S., Labenz, J., Mayerle, J., Miehke, S., Mossner, J., Peitz, U., Prinz, C., Selgrad, M., Suerbaum, S., Venerito, M. und Vieth, M. (2017). S2k-Guideline *Helicobacter pylori* and gastroduodenal ulcer disease. *Z Gastroenterol* 55(2): 167-206.
- Fischer, W. (2011). Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *Febs j* 278(8): 1203-1212.
- Fischer, W., Breithaupt, U., Kern, B., Smith, S. I., Spicher, C. und Haas, R. (2014). A comprehensive analysis of *Helicobacter pylori* plasticity zones reveals that they are integrating conjugative elements with intermediate integration specificity. *BMC Genomics* 15: 310.
- Fischer, W. und Haas, R. (2004). The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranslational modification for full activity. *J Bacteriol* 186(3): 777-784.
- Fischer, W., Hofreuter, D. und Haas, R. (2001a). Natural Transformation, Recombination, and Repair. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. H. L. T. Mobley, G. L. Mendz and S. L. Hazell. Washington (DC), ASM Press
ASM Press.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. und Haas, R. (2001b). Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 42(5): 1337-1348.

- Fischer, W., Schwan, D., Gerland, E., Erlenfeld, G. E., Odenbreit, S. und 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(3): 501-507.
- Fischer, W., Tegtmeyer, N., Stingl, K. und Backert, S. (2020). Four Chromosomal Type IV Secretion Systems in *Helicobacter pylori*: Composition, Structure and Function. *Front Microbiol* 11: 1592.
- Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R., Zimmer, R. und Haas, R. (2010). Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res* 38(18): 6089-6101.
- Golz, J. C. und Stingl, K. (2021). "Take It or Leave It"-Factors Regulating Competence Development and DNA Uptake in *Campylobacter jejuni*. *Int J Mol Sci* 22(18).
- Goodwin, C. S. und Armstrong, J. A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9(1): 1-13.
- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., McConnell, W. und 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39(4): 397-405.
- Goryshin, I. Y., Jendrisak, J., Hoffman, L. M., Meis, R. und Reznikoff, W. S. (2000). Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat Biotechnol* 18(1): 97-100.
- Goryshin, I. Y. und Reznikoff, W. S. (1998). Tn5 *in Vitro* Transposition. *Journal of Biological Chemistry* 273(13): 7367-7374.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12): 4645-4649.
- GraphPad Software Inc. (2014). "GraphPad Statistics Guide." Abgerufen am 13.11.2019, unter <http://cdn.graphpad.com/docs/prism/6/Prism-6-Statistics-Guide.pdf>.
- Haas, R., Meyer, T. F. und van Putten, J. P. (1993). Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol* 8(4): 753-760.
- Han, S. R., Zschausch, H. C., Meyer, H. G., Schneider, T., Loos, M., Bhakdi, S. und Maeurer, M. J. (2000). *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol* 38(10): 3646-3651.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hatakeyama, M. (2014). *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* 15(3): 306-316.
- Heuermann, D. und Haas, R. (1995). Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene* 165(1): 17-24.

- Heuermann, D. und Haas, R. (1998). A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol Gen Genet* 257(5): 519-528.
- Hoefler, C., Fischer, W., Hofreuter, D. und Haas, R. (2004). Cryptic plasmids in *Helicobacter pylori*: putative functions in conjugative transfer and microcin production. *Int J Med Microbiol* 294(2-3): 141-148.
- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374(166).
- Hofreuter, D. und Haas, R. (2002). Characterization of two cryptic *Helicobacter pylori* plasmids: a putative source for horizontal gene transfer and gene shuffling. *J Bacteriol* 184(10): 2755-2766.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S. und Haas, R. (2001). Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* 41(2): 379-391.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Henke, G. und Haas, R. (1998). Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol Microbiol* 28(5): 1027-1038.
- Israel, D. A., Lou, A. S. und Blaser, M. J. (2000). Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol Lett* 186(2): 275-280.
- Israel, D. A., Salama, N., Krishna, U., Rieger, U. M., Atherton, J. C., Falkow, S. und Peek, R. M., Jr. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14625-14630.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K. und Taylor, D. E. (1996). Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol* 20(4): 833-842.
- Karnholz, A., Hoefler, C., Odenbreit, S., Fischer, W., Hofreuter, D. und Haas, R. (2006). Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 188(3): 882-893.
- Kavermann, H., Burns, B. P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K. und Haas, R. (2003). Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* 197(7): 813-822.
- Kim, S. Y., Choi, D. J. und Chung, J. W. (2015). Antibiotic treatment for *Helicobacter pylori*: Is the end coming? *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 6(4): 183-198.
- Kong, H., Lin, L. F., Porter, N., Stickel, S., Byrd, D., Posfai, J. und Roberts, R. J. (2000). Functional analysis of putative restriction-modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Res* 28(17): 3216-3223.
- Kraft, C. und Suerbaum, S. (2005). Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: mechanisms and role in generating strain diversity. *Int J Med Microbiol* 295(5): 299-305.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3): 567-580.

- Krueger, N. J., Knuver, M. T., Zawilak-Pawlik, A., Appel, B. und Stingl, K. (2016). Genetic Diversity as Consequence of a Microaerobic and Neutrophilic Lifestyle. *PLoS Pathog* 12(5): e1005626.
- Kuipers, E. J., Israel, D. A., Kusters, J. G. und Blaser, M. J. (1998). Evidence for a conjugation-like mechanism of DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 180(11): 2901-2905.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. und Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19(3): 449-490.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M. C., Robertson, B., Daskalopoulos, G. und Dixon, M. F. (1997). A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112(4): 1386-1397.
- Lin, E. A., Zhang, X. S., Levine, S. M., Gill, S. R., Falush, D. und Blaser, M. J. (2009). Natural transformation of *helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragments interrupted by gaps of variable size. *PLoS Pathog* 5(3): e1000337.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S. W., Yamaoka, Y., Graham, D. Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S. und Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445(7130): 915-918.
- Londono-Vallejo, J. A. und Dubnau, D. (1993). *comF*, a *Bacillus subtilis* late competence locus, encodes a protein similar to ATP-dependent RNA/DNA helicases. *Mol Microbiol* 9(1): 119-131.
- Maixner, F., Krause-Kyora, B., Turaev, D., Herbig, A., Hoopmann, M. R., Hallows, J. L., Kusebauch, U., Vigl, E. E., Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Sullivan, N., Cipollini, G., Coia, V., Samadelli, M., Engstrand, L., Linz, B., Moritz, R. L., Grimm, R., Krause, J., Nebel, A., Moodley, Y., Rattei, T. und Zink, A. (2016). The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman. *Science* 351(6269): 162-165.
- Malaty, H. M. und Graham, D. Y. (1994). Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35(6): 742-745.
- Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. B. und Glancy, R. J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 142(8): 436-439.
- Marshall, B. J. und Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1(8390): 1311-1315.
- Miller, J. F., Dower, W. J. und Tompkins, L. S. (1988). High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(3): 856-860.
- Moodley, Y., Linz, B., Bond, R. P., Nieuwoudt, M., Soodyall, H., Schlebusch, C. M., Bernhoff, S., Hale, J., Suerbaum, S., Mugisha, L., van der Merwe, S. W. und Achtman, M. (2012). Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog* 8(5): e1002693.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.

- Nedenskov-Sorensen, P., Bukholm, G. und Bovre, K. (1990). Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis* 161(2): 365-366.
- NIH (1994). *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *NIH Consens Statement* 12(1): 1-23.
- O'Rourke, E. J., Pinto, A. V., Petroni, E. A., Tolmasky, M. E. und Ielpi, L. (2004). Evidence for the Active Role of a Novel Nuclease from *Helicobacter pylori* in the Horizontal Transfer of Genetic Information. *Journal of Bacteriology* 186(9): 2586-2593.
- Odenbreit, S., Faller, G. und Haas, R. (2002). Role of the AlpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int J Med Microbiol* 292(3-4): 247-256.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. und Haas, R. (2000). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287(5457): 1497-1500.
- Odenbreit, S., Swoboda, K., Barwig, I., Ruhl, S., Boren, T., Koletzko, S. und Haas, R. (2009). Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect Immun* 77(9): 3782-3790.
- Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G. und 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(5): 1537-1548.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., Whitehead, S. und Barrell, B. G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403(6770): 665-668.
- Parsonnet, J., Shmueli, H. und Haggerty, T. (1999). Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *Jama* 282(23): 2240-2245.
- Peleteiro, B., Bastos, A., Ferro, A. und Lunet, N. (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci* 59(8): 1698-1709.
- Quaglia, N. C. und Dambrosio, A. (2018). *Helicobacter pylori*: A foodborne pathogen? *World J Gastroenterol* 24(31): 3472-3487.
- Regnath, T., Raecke, O., Enninger, A. und Ignatius, R. (2017). Increasing metronidazole and rifampicin resistance of *Helicobacter pylori* isolates obtained from children and adolescents between 2002 and 2015 in southwest Germany. *Helicobacter* 22(1).
- Rohrer, S., Holsten, L., Weiss, E., Benghezal, M., Fischer, W. und Haas, R. (2012). Multiple pathways of plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 7(9): e45623.
- Salama, N. R., Shepherd, B. und Falkow, S. (2004). Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 186(23): 7926-7935.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Savoldi, A., Carrara, E., Graham Prof, D. Y., Conti, M. und Tacconelli, E. (2018). Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. *Gastroenterology*.
- Schmitt, W., Odenbreit, S., Heuermann, D. und Haas, R. (1995). Cloning of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and functional characterization of its product. *Mol Gen Genet* 248(5): 563-572.
- Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., Josenhans, C. und Suerbaum, S. (2004). The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 5024-5029.
- Schwarz, S., Morelli, G., Kusecek, B., Manica, A., Balloux, F., Owen, R. J., Graham, D. Y., van der Merwe, S., Achtman, M. und Suerbaum, S. (2008). Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 4(10): e1000180.
- Segal, E. D. und Tompkins, L. S. (1993). Transformation of *Helicobacter pylori* by electroporation. *Biotechniques* 14(2): 225-226.
- Smeets, L. C., Bijlsma, J. J., Boomkens, S. Y., Vandenbroucke-Grauls, C. M. und Kusters, J. G. (2000). *comH*, a novel gene essential for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 182(14): 3948-3954.
- Smeets, L. C., Bijlsma, J. J., Kuipers, E. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. und Kusters, J. G. (2000). The *dprA* gene is required for natural transformation of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27(2): 99-102.
- Stingl, K., Muller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M. und Maier, B. (2010). Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(3): 1184-1189.
- Suerbaum, S. und Josenhans, C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 5(6): 441-452.
- Suerbaum, S. und Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347(15): 1175-1186.
- Suerbaum, S., Smith, J. M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N. H., Kunstmann, E., Dyrek, I. und Achtman, M. (1998). Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12619-12624.
- Suzuki, H. und Mori, H. (2016). Different Pathophysiology of Gastritis between East and West? An Asian Perspective. *Inflamm Intest Dis* 1(3): 123-128.
- Sycuro, L. K., Pincus, Z., Gutierrez, K. D., Biboy, J., Stern, C. A., Vollmer, W. und Salama, N. R. (2010). Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. *Cell* 141(5): 822-833.
- Tan, S., Tompkins, L. S. und Amieva, M. R. (2009). *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog* 5(5): e1000407.
- Taylor, L. A. und Rose, R. E. (1988). A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res* 16(1): 358.

Teh, A. H. T., Lee, S. M. und Dykes, G. A. (2017). Identification of potential *Campylobacter jejuni* genes involved in biofilm formation by EZ-Tn5 Transposome mutagenesis. *BMC Res Notes* 10(1): 182.

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., Fitzegerald, 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. und Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388(6642): 539-547.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-149.

Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S. und Lesterlin, C. (2020). Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes (Basel)* 11(11).

Wang, Y., Roos, K. P. und Taylor, D. E. (1993). Transformation of *Helicobacter pylori* by chromosomal metronidazole resistance and by a plasmid with a selectable chloramphenicol resistance marker. *J Gen Microbiol* 139(10): 2485-2493.

Wang, Y. und Taylor, D. E. (1990). Natural transformation in *Campylobacter* species. *J Bacteriol* 172(2): 949-955.

Weiss, E., Spicher, C., Haas, R. und Fischer, W. (2019). Excision and transfer of an integrating and conjugative element in a bacterial species with high recombination efficiency. *Sci Rep* 9(1): 8915.

Wessel, D. und 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(1): 141-143.

Weyermann, M., Rothenbacher, D. und Brenner, H. (2009). Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in early childhood: independent contributions of infected mothers, fathers, and siblings. *Am J Gastroenterol* 104(1): 182-189.

Wiesner, R. S., Hendrixson, D. R. und DiRita, V. J. (2003). Natural transformation of *Campylobacter jejuni* requires components of a type II secretion system. *J Bacteriol* 185(18): 5408-5418.

Wozniak, R. A. und Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 8(8): 552-563.

Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., Hecht, M., Goldberg, T., Hamp, T., Honigschmid, P., Schafferhans, A., Roos, M., Bernhofer, M., Richter, L., Ashkenazy, H., Punta, M., Schlessinger, A., Bromberg, Y., Schneider, R., Vriend, G., Sander, C., Ben-Tal, N. und Rost, B. (2014). PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue): W337-343.

Yeh, Y. C., Lin, T. L., Chang, K. C. und Wang, J. T. (2003). Characterization of a ComE3 Homologue Essential for DNA Transformation in *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 71(9): 5427-5431.

Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S. C., Ester, M., Foster, L. J. und Brinkman, F. S. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26(13): 1608-1615.

Zhang, X. S. und Blaser, M. J. (2012). DprB facilitates inter- and intragenomic recombination in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 194(15): 3891-3903.

Zhao, H., Xu, L., Rong, Q., Xu, Z., Ding, Y., Zhang, Y., Wu, Y., Li, B. und Ji, X. (2018). Application of methylation in improving plasmid transformation into *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Methods* 150: 18-23.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AP	alkalische Phosphatase
<i>aphA-3</i>	<i>aphA-3</i> -Kassette; Gen für die Kanamycinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CagA	Cytotoxin-assoziierte Gen A
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
<i>cat</i>	<i>cat</i> -Kassette; Gen für das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase
CFU	engl.: <i>colony-forming unit</i> ; Koloniebildende Einheit
C-Terminus	carboxyterminaler Bereich
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
Erm ^R	Erythromycinresistenz
<i>et al.</i>	lat.: <i>et alii</i> ; und andere
FCS	fetales Kälberserum
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>hp</i> , HP	Gen, Protein des <i>H. pylori</i> -Stammes 26695
<i>hpp12</i> , HPP12	Gen, Protein des <i>H. pylori</i> -Stammes P12

ICEs	engl.: <i>integrating and conjugative elements</i>
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kBp	kilo Basenpaare
ME	Mosaikenden
N-Terminus	aminoterminaler Bereich
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>pmss1</i> , PMSS1	Gen, Protein des <i>H. pylori</i> -Stammes PMSS1
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R-M-Systeme	Restriktions-Modifikations-Systeme
RNase	Robonuklease
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
<i>rpsL</i> *	Gen für die Streptomycinresistenz
s.	siehe
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Strep ^R	Streptomycinresistenz
Strep ^S	Streptomycinsensitivität
T	Thymin
T4SS	Typ-IV-Sekretionssystem
TBS	engl.: <i>Tris-buffered saline</i>
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VacA	Vakuolisierendes Cytotoxin A
WB	Western-Blot
Wt	Wildtyp
α	anti
Δ	Deletion

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Entwicklung von <i>H. pylori</i> -assoziiertes Krankheitsverläufe.....	10
Abbildung 1.2: Modell der Transformation von <i>H. pylori</i> , modifiziert nach Stingl <i>et al.</i> (2010)	17
Abbildung 3.1: Vergleich der Proteinsequenzen HP1473 und CtsW	47
Abbildung 3.2: Vergleich des konservierten Kandidatengens in 26695 und P12.....	48
Abbildung 3.3: Kandidatengen <i>hp1473</i> , bzw. <i>hpp12_1451</i> im Chromosom	49
Abbildung 3.4: Deletionsplasmid pJR3	50
Abbildung 3.5: Deletion von <i>hpp12_1451</i>	51
Abbildung 3.6: PCR-Nachweis der Deletion	51
Abbildung 3.7: Komplementationsplasmide pJR4 und pJR5.....	53
Abbildung 3.8: <i>moeB</i> -Locus in den Stämmen 26695 und P12	54
Abbildung 3.9: Komplementationsplasmide pJR6 und pJR7.....	55
Abbildung 3.10: Komplementation im <i>moeB</i> -Locus	56
Abbildung 3.11: PCR-Nachweis der Komplementation im <i>moeB</i> -Locus	57
Abbildung 3.12: PCR-Nachweis der Komplementation im Shuttle-System	58
Abbildung 3.13: Transformation einer Chloramphenicolresistenz in <i>recA</i> durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung von Transformationsfrequenzen der <i>hpp12_1451</i> -Mutanten.	59
Abbildung 3.14: Elektroporation einer Chloramphenicolresistenz in <i>recA</i> durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung von Elektroporationsraten der <i>hpp12_1451</i> -Mutanten.....	61
Abbildung 3.15: Konjugativer Plasmidtransfer von pHel12:: <i>cat</i>	62
Abbildung 3.16: PCR-Produkte als Nachweis von pHel12:: <i>cat</i> in den Transkonjuganten.....	63
Abbildung 3.17: Plasmidtransferraten der verschiedenen <i>hpp12_1451</i> -Mutanten als Rezipienten	64
Abbildung 3.18: Western Blot der Zellfraktionen	65
Abbildung 3.19: Transformation einer Chloramphenicolresistenz in <i>recA</i> durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung der Transformationsfrequenzen des Wildtyps und der <i>hpp12_1451</i> - Deletionsmutante im Stamm PMSS1.....	67
Abbildung 3.20: Kandidatengen <i>hp0506</i> , bzw. <i>hpp12_0512</i> im Chromosom	68
Abbildung 3.21: Transformation einer Chloramphenicolresistenz in <i>recA</i> durch das Plasmid pWS48 zur Ermittlung von Transformationsfrequenzen des Wildtyps und der Mutante P12 Δ <i>hp0506</i>	70
Abbildung 3.22: Plasmid pLH2	71
Abbildung 3.23: Transformationsfrequenzen des Wildtyps P12 und der Mutante P12 Δ <i>hp0506</i> nach Transformation mit pLH2.	71
Abbildung 3.24: PCR-Nachweis der Transformation von pLH2 in P12 Δ <i>hp0506</i>	72

Abbildung 3.25: Transposonplasmide pHK9 und pJR8.....	74
Abbildung 3.26: Aufnahmefähigkeit einer Antibiotikaresistenzkassette als Screeningverfahren für <i>H. pylori</i>	76
Abbildung 3.27 Modell der <i>in vivo</i> -Transpositionsreaktion von <i>H. pylori</i> am Beispiel TnHK979	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	24
Tabelle 2.2: Verwendete <i>Helicobacter pylori</i> -Stämme	24
Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide	26
Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide	27
Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper mit Beschreibung und Anwendung.....	30
Tabelle 2.6: Verwendete Nährmedien für Bakterien	30
Tabelle 2.7: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze.....	31
Tabelle 2.8: Kommerziell erhältliche Kits	34
Tabelle 2.9: PCR-Protokolle der verschiedenen Polymerasen.....	41
Tabelle 3.1: Testversuche des Screeningverfahrens	77

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Rainer Haas dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gab, mich mit einem spannenden bakteriologischen Thema auseinanderzusetzen und Techniken des molekularbiologischen Arbeitens zu erlernen. Des Weiteren danke ich ihm für die Förderung, Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an PD Dr. Wolfgang Fischer für die Mitbetreuung der Arbeit. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine theoretischen und praktischen Fragen. Sein breites Wissen und seine Bereitschaft für Diskussionen waren mir eine große Hilfe.

Verena Königer danke ich für die Einarbeitung in die Methoden und für die Einführung in die Welt von *Helicobacter pylori*.

Des Weiteren unterstützte mich Evelyn Weiss beim Erlernen von molekularbiologischen Methoden und gab mir viele hilfreichen Tipps, großen Dank dafür.

Anna Zeitler möchte ich für ihre Motivation, die gemeinsame Zeit als Schreibtischnachbarn und die dadurch entstandene Freundschaft danken.

Allen weiteren „Haasen“ danke ich für das gute Miteinander und Klima in der Arbeitsgruppe, die vielen aufbauenden und unterhaltsamen Gespräche und das häufige Kuchen essen.

Johannes möchte ich für seine Geduld und Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Mein letzter Dank geht an meine Eltern Michael und Sigrid, die mir das Studium ermöglichten, mir den dabei nötigen Rückhalt gaben und mich bei dieser Arbeit stets ermutigten und unterstützten.