

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

**Herstellung eines Reportersystems und molekulare Charakterisierung von *cagP* - einer
Komponente des *Cag*-Typ IV-Sekretionssystems des humanpathogenen Bakteriums
Helicobacter pylori.**

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

vorgelegt von
Sonja Laue

aus München
Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Wolfgang Fischer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann
Prof. Dr. Gabriele Rieder

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2024

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sonja Laue, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Herstellung eines Reportersystems und molekulare Charakterisierung von *cagP* - einer Komponente des *Cag* - Typ IV-Sekretionssystems des humanpathogenen Bakteriums *Helicobacter pylori*“

selbstständig 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Pfaffenhofen a.d. Ilm, 23.06.2024

Sonja Laue

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Abstract

Helicobacter pylori is a gastric bacterium that is pathogenic to humans. Around 50% of people worldwide are infected. The infection is associated with chronic gastritis, peptic ulcers and stomach cancer. Gastric cancer is the third most common cancer leading to death and can be attributed to *H. pylori* infection in almost all cases. In times of increasing resistance to antibiotics, the rates of treatment failures in eradication attempts rise to over 50%. The numbers vary depending on the geographic location and therapy. A precise understanding of the pathogenicity mechanism, as well as the proteins and genes involved, is essential in the search for new therapeutic approaches. The *Cag*-type-IV-secretion-system is a crucial pathogenicity factor. Recent research indicates that *cagP* has a regulatory function. It was shown that a *cagP* deletion results in a reduced CagA translocation and phosphorylation, a reduced IL8-induction and a reduced expression of *cagH*, *cagI* and *cagL*. All of these are essential components which increase the pathogenicity of the *Cag*-type-IV-secretion-system. The results found in literature regarding the expression of *cagP* are very controversial. According to some sources *cagP* could neither be detected as a full-length transcript, nor as a protein.

In the course of this dissertation the activity of the *cagP*-promoter could be confirmed and an almost complete *cagP* transcript could be inferred using RT-qPCR. This work focuses on the development of a highly sensitive NanoLuc-*cagP*-reporter-system. With the aid of a shine-dalgarno sequence inserted into the upstream region of *cagP*, the required sensitivity was achieved and the reporter system is now capable of detecting *cagP* expression using a fluorescence reader. Experiments with RT-qPCR further revealed that the transcription of *cagP* is significantly reduced when incubated with AGS cells. Additionally, the interaction of *cagP* with *cagG* was examined. While it could not be clearly clarified whether *cagG* expression is affected by a *cagP* deletion, it could be confirmed that a *cagP* deletion leads to a reduced *cagH*, *cagI* and *cagL* expression as well as to a reduced CagA translocation. In order to determine the effect of external conditions on the expression of *cagP*, first trials with the new NanoLuc reporter were started. So far, clear evidence regarding an adjustment of the *cagP* expression could not be drawn from these first trials. The newly developed reporter system shows promise for future experiments due to its heightened sensitivity in detecting *cagP* expression. The molecular mechanism and further gene expression analysis of *cagP* remain subject of further research.

Zusammenfassung

Helicobacter pylori ist ein humanpathogenes Magenbakterium. Weltweit sind etwa 50% der Menschen infiziert. Die Infektion ist mit einer chronischen Gastritis, peptischen Ulzera und Magenkrebs assoziiert. Magenkrebs ist die dritthäufigste zum Tode führende Krebserkrankung und in nahezu allen Fällen auf eine *H. pylori* Infektion zurückzuführen. In Zeiten zunehmender Antibiotikaresistenzen steigen die Raten der Therapieversager bei Eradikationsversuchen auf über 50 %. Die Zahlen variieren je nach geografischer Lage und Therapie. Ein genaues Verständnis der Pathogenitätsmechanismen sowie der beteiligten Proteine und Gene ist auf der Suche nach neuen Therapieansätzen unabdingbar. Einen wesentlichen Pathogenitätsfaktor stellt das Cag-Typ-IV-Sekretionssystem dar. Jüngste Forschungen weisen darauf hin, dass *cagP* eine regulatorische Funktion zukommt. So konnte gezeigt werden, dass eine *cagP*-Deletion in einer verminderten CagA-Translokation und -Phosphorylierung, einer verringerten IL8 Induktion sowie einer reduzierten Expression von *cagH*, *cagI* und *cagL* resultiert. Allesamt stellen essentielle pathogenitätsfördernde Mechanismen des Cag-Typ-IV-Sekretionssystems dar. Hinsichtlich der Expression von *cagP* lassen sich in der Literatur stark kontroverse Ergebnisse finden, wobei einigen Quellen zufolge *cagP* weder als vollständiges Transkript, noch als Protein detektiert werden konnte.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die Aktivität des *cagP*-Promotors bestätigt und auf ein nahezu vollständiges *cagP*-Transkript mittels RT-qPCR geschlossen werden. Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Entwicklung eines hochsensitiven NanoLuc-*cagP*-Reportersystems, mit dessen Hilfe sich die *cagP*-Expression nach Einfügen einer Shine-Dalgarno Sequenz in der Fluoreszenzmessung detektieren lässt. Mittels RT-qPCR konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Transkription von *cagP* bei einer Inkubation mit AGS Zellen signifikant reduziert wird. Es wurde außerdem eine mögliche Interaktion von *cagP* mit *cagG* überprüft. Während nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die *cagG*-Expression von einer *cagP*-Deletion beeinträchtigt wird, konnte bestätigt werden, dass eine *cagP*-Deletion zu einer verminderten Expression von *cagH*, *cagI* und *cagL* sowie zu einer reduzierten CagA Translokation führt. Um eine mögliche Induktion bzw. Reduktion durch äußere Bedingungen in der Genexpression von *cagP* feststellen zu können, wurden erste Versuche mit dem neuen NanoLuc-Reporter gestartet. Klare Hinweise über eine Anpassung der Expression konnten im Rahmen der initialen Versuche bisher noch nicht entdeckt werden. Die Nutzung des neu entwickelten Reportersystems für weitere Experimente ist jedoch vielversprechend. Der molekulare Mechanismus sowie weitere Genexpressionsanalysen von *cagP* bleiben Inhalt zukünftiger Forschung.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. <i>HELICOBACTER PYLORI</i> – ALLGEMEINES, EPIDEMIOLOGIE UND INFEKTIONSWEGE.....	1
1.2. PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON <i>H. PYLORI</i>	2
1.3. DAS CAG-TYP-IV-SEKRETIONSSYSTEM.....	5
1.4. CAGPAI (CYTOTOXIN-ASSOCIATED GENE-PATHOGENICITY ISLAND)	7
1.4.1. INTERAKTIONEN DER GENE DER CAGPAI.....	7
1.4.2. TRANSKRIPTION UND TRANSLATION VON CAGP.....	9
1.5. ZIELSETZUNG.....	10
2. MATERIAL	11
2.1. VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME.....	11
2.2. PLASMIDE	13
2.3. VERWENDETE ZELLINIE.....	14
2.4. OLIGONUKLEOTIDE	15
2.5. ANTIKÖRPER	18
2.6. ANTIBIOTIKA	19
2.7. CHEMIKALIEN UND PUFFER.....	19
2.8. AGAR PLATTEN UND NÄHRMEDIEN.....	21
2.9. KOMMERZIELLE KITS, ENZYME UND MARKER.....	22
2.10. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	23
3. METHODEN.....	25
3.1. ZELLKULTUR	25
3.2. BAKTERIENKULTIVIERUNG	25
3.3. ARBEITEN MIT RNA.....	26
3.3.1. BEREITSTELLEN VON TESTSTÄMMEN.....	26
3.3.2. VORGEHENSWEISE MIT KONTROLLPROBEN OHNE AGS ZELLKONTAKT	27
3.3.3. INFektion VON AGS ZELLEN FÜR RNA PRÄPARATION	27
3.3.4. LYSOZYM-SCHRITT.....	27
3.3.5. RNA ISOLATION	27
3.3.6. DNASE VERDAU	28
3.3.7. PRÜFUNG DER RNA INTEGRITÄT UND QUANTITÄT.....	28
3.3.8. REVERSE TRANSKRIPTION – HERSTELLUNG VON cDNA.....	29
3.3.9. qPCR.....	29
3.4. ARBEITEN MIT DNA.....	30
3.4.1. ARBEIT MIT OLIGONUKLEOTIDEN	30
3.4.2. HERSTELLUNG REKOMBINANTER DNA UND ÜBERTRAGUNG AUF <i>H. PYLORI</i>	30
3.4.3. PCR – DNA AMPLIFIKATION	32
3.4.4. RESTRIKTION VON DNA.....	32
3.4.5. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	33
3.4.6. DNA AUFREINIGUNG.....	33
3.4.7. LIGATION	34
3.4.8. TRANSFORMATION IN CHEMISCH KOMPETENTEN <i>E. COLI</i>	34
3.4.9. PLASMIDPRÄPARATION.....	35
3.4.10. TESTVERDAU.....	36

3.4.11.	TRANSFORMATION IN <i>H. PYLORI</i>	36
3.4.12.	ELEKTROPORATION.....	36
3.4.13.	SEQUENZIERUNG	37
3.4.14.	KRYOKONSERVIERUNG	37
3.5.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	37
3.5.1.	HERSTELLUNG VON LYSATEN FÜR WESTERN-BLOT	37
3.5.2.	GIEßEN DER POLYACRYLAMIDGELE FÜR WESTERN-BLOT	37
3.5.3.	SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT (AP/POX).....	38
3.5.4.	INFEKTION VON AGS ZELLEN FÜR TYROSINPHOSPHORYLIERUNGS-ASSAY	40
3.6.	FLUORESZENZMESSUNG IM CLARIOSTAR.....	40
3.6.1.	GFP STÄMME	40
3.6.2.	HIBIT PROTOKOLL.....	40
3.6.3.	VERSUCHE MIT NANOLUC HIBIT <i>CAGP</i> -REPORTER	41
3.7.	FLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	41
3.8.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	42
3.9.	TEM-CAGA TRANSLOKATIONS-ASSAY	42
3.10.	STATISTISCHE ANALYSE.....	43
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>44</u>
4.1.	INTERAKTIONEN VON <i>CAGP</i> MIT WEITEREN GENEN ODER GENPRODUKTEN DER <i>CAGPAI</i>.....	44
4.1.1.	DAS <i>CAGP</i> -GEN ALS REGULATORISCHE KOMPONENTE VON <i>CAGH</i> , <i>CAGI</i> UND <i>CAGL</i>	44
4.1.2.	HERSTELLUNG EINES <i>CAGG</i> -REPORTERS	45
4.2.	AGS ZELLKONTAKT ALS EINFLUSSGRÖßE AUF DIE TRANSKRIPTION UND NACHWEIS EINES <i>CAGP</i> TRANSKRIPTS MITTELS RT-QPCR	48
4.2.1.	QUALITÄTSKONTROLLEN DER RNA PRÄPARATION	49
4.2.2.	EINFLUSS AUF DIE TRANSKRIPTION VON GENEN DER <i>CAGPAI</i> DURCH AGS ZELLKONTAKT	50
4.2.3.	QUANTITATIVER NACHWEIS EINES <i>CAGP</i> TRANSKRIPTES MITTELS VERDÜNNUNGSREIHE	52
4.3.	ENTWICKLUNG EINES <i>CAGP</i>-REPORTERSYSTEMS FÜR GENEXPRESSIONSANALYSEN	54
4.3.1.	LUX-REPORTER	55
4.3.2.	GFP-REPORTER.....	56
4.3.3.	NANOLUC HIBIT <i>CAGP</i> -REPORTER.....	62
5.	<u>DISKUSSION</u>	<u>70</u>
5.1.	INTERAKTIONEN VON <i>CAGP</i> MIT GENEN DER <i>CAGPAI</i>	70
5.2.	REGULATION DER GENE DER <i>CAGPAI</i> DURCH ÄUßERE BEDINGUNGEN.....	71
5.3.	ENTWICKLUNG EINES <i>CAGP</i>-REPORTERS	74
5.4.	AUSBLICK.....	78
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>79</u>
7.	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>81</u>
8.	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>82</u>
9.	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>83</u>
10.	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>85</u>

11.	LITERATURVERZEICHNIS	86
12.	ANHANG	93
12.1.	WESTERN-BLOTS.....	93

1. Einleitung

1.1. *Helicobacter pylori* – Allgemeines, Epidemiologie und Infektionswege

Helicobacter pylori ist ein humanpathogenes, gramnegatives mikroaerophiles Stäbchenbakterium, das die Magenschleimhaut kolonisiert und in der Lage ist, im sauren Milieu des Magens dauerhaft zu persistieren [1, 2]. Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori* infiziert [3], wobei die Prävalenz stark von der geographischen Lage, dem Alter und dem sozioökonomischen Status abhängt. So sind beispielsweise Menschen in Entwicklungsländern weitaus häufiger betroffen [4, 5]. Vor allem Hygiene spielt bei der Infektion eine zentrale Rolle. Die Aufnahme des Bakteriums erfolgt in der Regel über den oralen Kontakt zu Erbrochenem und Fäkalien sowie über die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel und Trinkwasser [6, 7]. Meistens findet eine Infektion in der Kindheit statt, wobei die Mehrzahl der Kinder in Entwicklungsländern vor dem zehnten Lebensjahr infiziert werden [8]. Eine Infektion mit *H. pylori* ist mit diversen Erkrankungen wie chronischer Gastritis, peptischen Ulzera und Magenkrebs assoziiert [2, 9].

Die überwiegende Mehrheit der Magenkarzinome und nahezu alle duodenalen Ulzera sind auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückzuführen [10, 11]. Magenkrebs ist die dritthäufigste zum Tode führende Krebserkrankung weltweit [12]. Auch die Todeszahlen, die sich auf gastro-duodenale Ulzerationen zurückführen lassen, sind beachtlich. Jährlich sterben ca. 200.000 Menschen an den Folgen von Rupturen und Blutungen [13]. Zudem erschweren die steigenden Resistenzen gegen gängige Antibiotika die Eradikationstherapie. Es kommt häufiger zu Therapieversagen und somit können immer mehr Patienten nicht adäquat behandelt werden. Früher waren die Therapieschemata der ersten Wahl die französische Tripeltherapie (PPI, Amoxicillin, Clarithromycin) und die italienische Tripeltherapie (PPI, Metronidazol, Clarithromycin) für 7 bis 10 Tage [14]. Die Clarithromycinresistenzen nehmen jedoch zu, sodass Eradikationsversuche - je nach geografischer Lokalisation und Resistenzlage - immer weniger Erfolge verzeichnen können [15]. Einer Studie aus Syrien aus dem Jahr 2018 zufolge, war die französische Tripeltherapie mit einer Dauer von 14 Tagen in nur 35,1% der Fälle erfolgreich. Auch eine Therapie mit Levofloxacin, Amoxicillin und Protonenpumpeninhibitor erzielte in nur 29,7 % der Fälle eine Eradikation [16]. Eine um Rifaximin erweiterte

Tripeltherapie in Spanien erreichte bei lediglich 61% der Patienten eine Eradikation [17]. Ebenso nehmen Resistenzen gegen Metronidazol zu [15].

Aufgrund der zunehmenden Resistenzlage belaufen sich die neuesten Therapieempfehlungen zur Erstlinientherapie auf eine Bismut-Quadrupeltherapie für mindestens 10 Tage. Die Zweitlinientherapie soll nach Resistenztestung als Standard-Triple- oder Fluorchinolon-haltige Triple-Therapie mit einer Dauer von jeweils 14 Tagen erfolgen [18]. Die WHO stuft *H. pylori* in ihrer „Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria“ 2017, aufgrund seiner weit verbreiteten Resistenz gegen Clarithromycin, mit hoher Priorität zur Entwicklung neuer Antibiotika ein [19].

Die Erforschung des Magenbakteriums *H. pylori* ist für die Medizin von großer Bedeutung, um, basierend auf intensiver Grundlagenforschung, zukünftig alternative Therapien entwickeln zu können. Hierbei ist ein besonderes Augenmerk auf die Pathogenitätsfaktoren zu richten.

1.2. Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*

Die Pathogenitätsfaktoren des *H. pylori* sind vielfältig. Von zentraler Bedeutung für das Überleben im menschlichen Magen sowie dessen Kolonisation ist die Ureaseaktivität des *H. pylori*. Die Urease katalysiert die Spaltung von Harnstoff zu CO₂ und Ammoniak. Der durch diese Hydrolyse anfallende Ammoniak neutralisiert den sauren Magen-pH im unmittelbaren Umfeld des Bakteriums. Die Viskosität des Magenschleims nimmt hierbei ebenfalls ab, was zur verbesserten Motilität des *H. pylori* beiträgt [20].

Helicobacter-Spezies sind hoch motil. Zur Fortbewegung im Magen dienen unipolare Flagellen um zur Magenschleimhaut zu gelangen. Hierbei wird das Bakterium chemotaktisch dirigiert. So steuert es beispielsweise auf Harnstoff, Aminosäuren und Bikarbonat zu, während es sich von niedrigen pH-Werten entfernt. Die Flagellen-Aktivität ist zur Kolonisation der Magen-Mukosa unerlässlich [21]. Ist die Magenschleimhaut erreicht, kommen Adhäsine zum Einsatz. *H. pylori* verfügt über eine Vielzahl dieser wichtigen Oberflächenproteine, welche das Anheften an die Zielzellen ermöglicht. Zu ihnen zählen u.a. HopQ, BabA, SabA, OipA, AlpAB und HopZ. Erst durch sie wird eine initiale Kolonisierung und schließlich auch eine dauerhafte Besiedlung der Magenepithelzellen ermöglicht [22].

Bei der Immunreaktion spielen sowohl Oberflächenmoleküle als auch sekretierte Proteine eine wesentliche Rolle. Als Gram-negatives Bakterium produziert *H. pylori* auf der äußeren Membran Lipopolysaccharide (LPS), welche aus drei Untereinheiten bestehen. Lipid A ist der innerste Teil. Es ist mit der äußeren Membran verbunden und fungiert als Endotoxin. An das Lipid A gebunden folgt eine innere und eine äußere Kernregion, gefolgt von dem O-Polysaccharid. LPS werden als pathogen-assoziiertes molekulares Muster (PAMP) erkannt und tragen als Virulenzfaktoren wesentlich zur Schwere sowie dem chronischen Verlauf einer *H. pylori* Infektion bei. LPS binden an *toll-like*-Rezeptoren (TLR) auf Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen und aktivieren diese [23]. Zudem konnte gezeigt werden, dass ADP Heptose – ein Baustein von LPS – eine IL-8 Induktion in der Wirtszelle bewirkt [24]. Im Vergleich zu Enterobakterien fällt die endotoxische und immunologische Aktivität des Lipid A bei *H. pylori* Infektionen jedoch weitaus geringer aus [23].

VacA (vacuolisierendes Cytotoxin A) ist ein Exotoxin des *H. pylori*. Es wird über ein Typ-V-Sekretionssystem - ein Autotransporter - in den Extrazellulärraum sezerniert. Die genetische Ausprägung von *vacA* variiert unter den kursierenden Stämmen und steht je nach Ausprägung im Zusammenhang mit unterschiedlich hohen Risiken zur Entwicklung von gastroduodenalen Erkrankungen. Der Pathomechanismus von VacA bei *H. pylori* Infektionen in den Magenepithelzellen ist unter allen bekannten Bakterientoxinen einzigartig. VacA zeigt zellmodulierende Eigenschaften und induziert die Bildung von Vakuolen in den Epithelzellen des Magens. Es vermag außerdem Veränderungen an der mitochondrialen Membranpermeabilität hervorzurufen. Die Rolle von VacA ist kompliziert und wird kontrovers diskutiert. So wirkt das Toxin zum einen immunsuppressiv, indem es die Aktivität und Proliferation von T-Zellen inhibiert, zeigt zugleich aber auch proinflammatorische Eigenschaften. Es induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Mastzellen und stimuliert deren Chemotaxis. In eosinophilen Granulozyten wird die Expression von Chemokinen hochreguliert, in neutrophilen Granulozyten wird die Cyclooxygenase-II (COX2) vermehrt exprimiert. VacA trägt wesentlich zur Pathogenese der mit *H. pylori* assoziierten gastroduodenalen Erkrankungen wie Magenulzera und der Karzinogenese des Magens bei [25].

Darüber hinaus verfügt der *H. pylori* über eine außergewöhnlich hohe genetische Diversität. Unter nicht verwandten Menschen wird aufgrund mehrerer Studien angenommen, dass jedes infizierte Individuum seinen ganz persönlichen *H. pylori* Stamm oder sogar mehrere Stämme trägt. Darüber hinaus zeigte sich, dass Stämme sich während der Kolonisation verändern. Die genetische Plastizität wird zum einen durch Mutationen und zum anderen durch Rekombination mittels natürlicher Transformation, Konjugation und Phagentransfer erreicht. Genanalysen konnten zeigen, dass *H. pylori* weder über Mismatch Reparatur, noch über Basenexcisionsreparaturmechanismen verfügt. Zudem existieren 46 Gene mit homopolymerischen Sequenzen von Nukleotiden und Dinukleotiden, welche ein „*slipped-strand-mispairing*“ begünstigen. Somit besteht eine hohe Anfälligkeit für Rasterverschiebungen, welche mit der Bildung von nonsense-Produkten und somit einer Phasenvariation einher geht. Homopolymerische Sequenzen im Promotorbereich führen auf diese Weise zu Veränderungen in der Transkription des jeweiligen Gens. Studien zeigten jedoch, dass vor allem die Rekombination zwischen verschiedenen Stämmen bei gemischten Kolonisationen für die hohe Diversität von *H. pylori* verantwortlich ist [26].

Diese Arbeit befasst sich mit einem weiteren wesentlich zur Virulenz des *H. pylori* beitragenden Pathogenitätsfaktor, dem *Cag*-Typ-IV-Sekretionssystem. Dieses wird nachfolgend ausführlicher beschrieben.

1.3. Das *Cag*-Typ-IV-Sekretionssystem

Typ-IV-Sekretionssysteme (T4SS) sind sowohl unter gramnegativen als auch unter grampositiven Prokaryonten weit verbreitet. Sie dienen der Konjugation von DNA und wurden im Laufe der Evolution von einigen pathogenen Bakterien – darunter *H. pylori* – für die Translokation von Effektormolekülen und anderen Makromolekülen ins Zytosol von Eukaryonten umfunktioniert [27]. Obwohl die Typ-IV-Sekretionssysteme der verschiedenen Prokaryonten stark variieren, kann ein genereller, konservierter Aufbau in gramnegativen Bakterien mit den im Folgenden beschriebenen Untereinheiten beobachtet werden. Exemplarisch wird hierzu der Prototyp für T4SS, das T-DNA-Transfersystem von *Agrobacterium tumefaciens* herangezogen. Es werden ATPasen (VirB4, VirB11), Innere Membran-, Kanal- und Gerüst-Untereinheiten (VirB3, VirB6, VirB8) sowie Proteine, welche im Periplasma und an der äußeren Membran lokalisiert sind (VirB7, VirB9, VirB10), als auch Proteine zur Pilusformation (VirB2, VirB5) beschrieben. VirB1 löst das Peptidoglykan lokal auf und dient somit dem Einbau des Apparates in die Zellhülle. Auch das VirD4 Protein, welches eine Substraterkennung vermittelt, ist in T4SS stark konserviert [28].

H. pylori verfügt über 4 verschiedene Typ-IV-Sekretionssysteme: Das ComB, das *Cag*, das Tfs3 und das Tfs4 System. Das ComB System dient der Aufnahme von DNA und rüstet das Bakterium somit mit einer natürlichen Transformationskompetenz. Das *Cag*-Typ-IV-Sekretionssystem transloziert das CagA-Protein sowie verschiedene andere Moleküle in die Epithelzelle des Magens. Die Funktion des Tfs3 und des Tfs4 Systems ist noch unbekannt. Während alle *H. pylori* Stämme über ein ComB System verfügen, zeichnet das Vorhandensein eines *Cag*-T4SS eine Untermenge weitaus pathogenerer Stämme aus [29].

Das *Cag*-T4SS wird von der *cytotoxin-associated-gene pathogenicity Island* (*cagPAI*) codiert, einem Genabschnitt, der im Folgenden genauer erläutert wird. Obwohl das *Cag*-T4SS evolutionär mit anderen T4SS verwandt ist, sind nur wenige Proteine konserviert. Je nach Literaturquelle wird eine Sequenzähnlichkeit der *cagPAI* Sequenzen zu denen der Vir-Proteine des *Agrobacterium tumefaciens* mehr oder weniger erwogen. Offensichtliche Ähnlichkeiten zu den Vir Sequenzen liegen jedoch lediglich für CagE (VirB4), CagX (VirB9), CagY (VirB10), Cag α (VirB11) und Cag β (VirD4) vor [30]. Abbildung 1 zeigt ein Modell des *Cag*-T4SS sowie eine elektronenmikroskopische Aufnahme des *H. pylori* [31].

Das *Cag*-T4SS verfügt über Oberflächenpili, welche bei Wirtszellkontakt induziert werden und CagA ins Zytosol der Magenepithelzelle translozieren [32]. In den Epithelzellen angekommen, wird CagA an Tyrosinresten der im C-terminalen Bereich gelegenen EPIYA-Motive phosphoryliert [30]. Es konnte gezeigt werden, dass CagA als bakterielles Onkoprotein fungiert und maligne Prozesse in der Zielzelle in Gang setzt [33]. In einem Modell mit mongolischen Wüstenrennmäusen konnte ebenfalls bestätigt werden, dass CagA zu einem gesteigerten Krebsrisiko führt [34].

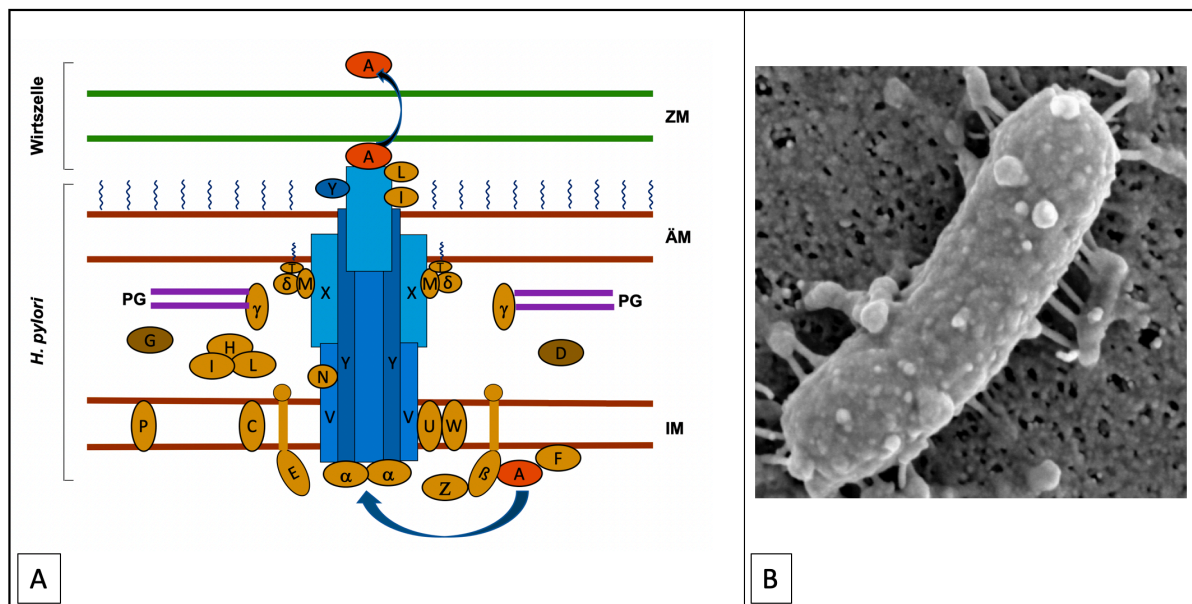


Abbildung 1: Modell des *Cag*-T4SS und elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori* bei Wirtszellkontakt

A: Die Abbildung zeigt das *Cag*-T4SS, ein Multiproteinkomplex, welcher sich über die äußere und innere Membran spannt und mit einem Pilus in den Extrazellulärraum ragt. Über den Pilus wird CagA in die Wirtszelle transloziert. ZM: Zellmembran der Wirtszelle; ÄM: Äußere Membran; PG: Peptidoglykan; IM: Innere Membran

B: Eine elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Pili, welche bei Kontakt mit der eukaryotischen Wirtszelle produziert werden und das Bakterium mit der Wirtszelle verbinden [31].

1.4. *cagPAI* (cytotoxin-associated gene-pathogenicity Island)



Abbildung 2: *cagPAI*

Die Abbildung zeigt die Genanordnung im Stamm 26695; Die vermeintlichen Homologien zu den VirB Proteinen 1-11 und VirD4 des *Agrobacterium tumefaciens* Typ-4-Sekretionssystems sind dargestellt. Die flankierenden Regionen der *cagPAI* entsprechen den Genen *hp0519*, welches Sel1 codiert, und *hp0549*, welches eine Glutamatracemase codiert. Die Abbildung wurde modifiziert nach [30], Nummerierung: [35]

Das *Cag*-Typ-IV-Sekretionssystem wird von der *cagPAI* kodiert (Abbildung 2). Diese ist ungefähr 37 kb (kilobasen) lang und umfasst ca. 30 Gene. Die *cagPAI* ist nicht in allen Stämmen gleichermaßen vorhanden. Es zeigen sich je nach geografischer Lage starke Unterschiede. So ist sie beispielsweise in allen Stämmen aus Ostasien zu finden, während sie in bestimmten afrikanischen Populationen überhaupt nicht vorkommt. *CagPAI* positive Stämme verfügen häufig über das vakuolisierende Cytotoxin des Genotyps s1m1, welches im Vergleich zum s2m2-Genotyp vermehrt exprimiert wird und stärker vakuolisiert. Stämme, die sowohl *cagPAI*, als auch s1m1 *vacA* positiv sind, werden als Typ I Stämme bezeichnet und sind hochpathogen. Typ II Stämme hingegen sind weniger virulent. Sie verfügen über m2-VacA und haben keine *cagPAI* [30]. Trotz der enorm hohen Infektionsraten mit *H. pylori*, entwickeln letzten Endes lediglich 3% der infizierten Individuen Krebs [36].

1.4.1. Interaktionen der Gene der *cagPAI*

Das *Cag*-T4SS besteht aus einer pilzförmigen Struktur, welche sich aus einem bis an die äußere Membran heranreichenden *outer membrane core complex* (OMCC) sowie einem *inner membrane complex* (IMC) zusammensetzt und einen zentralen Kanal umgibt. Der OMCC besteht aus fünf Hauptkomponenten CagY, CagX, CagT, Cag3 und CagM, wobei CagY, CagX und CagM für den Aufbau und die Stabilität des OMCC essentiell sind [37]. Bevor CagA den Translokationskanal passieren kann, muss ein Sekretionssignal erkannt werden. Als Signalerkennungsprotein kommen CagF, CagZ und Cagβ in Frage, wobei hauptsächlich CagF

mit CagA interagiert. Es konnten jedoch auch Interaktionen zwischen Cag β und CagA sowie zwischen Cag β und CagZ nachgewiesen werden [30]. Für die Translokation von CagA in die Wirtszelle sind CagH, CagI und CagL erforderlich. Von den genannten Proteinen wird angenommen, dass es sich um Pilusproteine handelt, wobei gezeigt werden konnte, dass Stämme mit einer $\Delta cagI$ und einer $\Delta cagL$ Mutation keine Pili ausbilden. Stämme mit einer $\Delta cagH$ Mutation hingegen bildeten vermehrt verdickte und verlängerte Pili aus [32]. Vorangegangene Ergebnisse deuten darauf hin, dass *cagP* eine regulierende Funktion für verschiedene Gene der *cagPAI*, unter anderem für die Gene *cagH* und *cagI*, zukommt. Eine *cagP* Deletion resultiert in einer verminderten Tyrosinphosphorylierung von CagA in der Wirtszelle (Abbildung 3). Ebenso konnte bei einer $\Delta cagG$ Mutation eine verminderte *cagI* Expression und eine reduzierte CagA Phosphorylierung nachgewiesen werden (R. Nair, W. Fischer, unveröffentlicht).

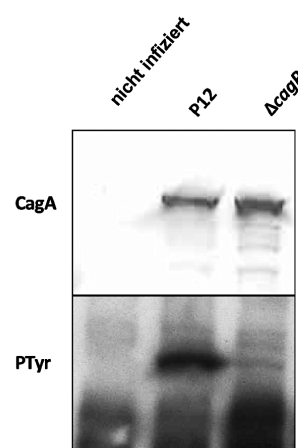


Abbildung 3: Tyrosinphosphorylierung von CagA

Die Abbildung zeigt einen Western-Blot von Ganzzelllysaten einer Infektion von AGS Zellen (humane Adenokarzinomzellen des Magens) mit dem Wildtypstamm P12 sowie einer isogenen Mutante mit einer *cagP* Deletion. Die Lysate wurden mittels SDS Gelelektrophorese und Western-Blot mit den Antikörpern α CagA (AK299) und α Kaninchen IgG-AP sowie den Antikörpern α p-Tyr (PY99) und α Maus IgG-POX auf CagA und tyrosinphosphoryliertes CagA untersucht. Als Negativkontrolle dienten AGS-Zellen ohne Infektion. Sowohl für den P12 Wildtypstamm ohne Deletion als auch für den Stamm mit der $\Delta cagP$ Mutation konnte nach Infektion eine deutliche Bande für CagA beobachtet werden. Jedoch erschien für den P12 Wildtypstamm eine eindeutig stärkere Bande für Phosphotyrosin als für die $\Delta cagP$ Mutation. Die Negativkontrolle blieb erwartungsgemäß sowohl für CagA als auch für phospho-CagA negativ. (R. Nair, W. Fischer, unveröffentlicht)

1.4.2. Transkription und Translation von *cagP*

Stromaufwärts des *cagP* Gens liegt dessen Promotor, eine kleine nicht kodierende RNA (HPnc2630) und ein mutmaßlicher Terminator (Abbildung 4) [38].

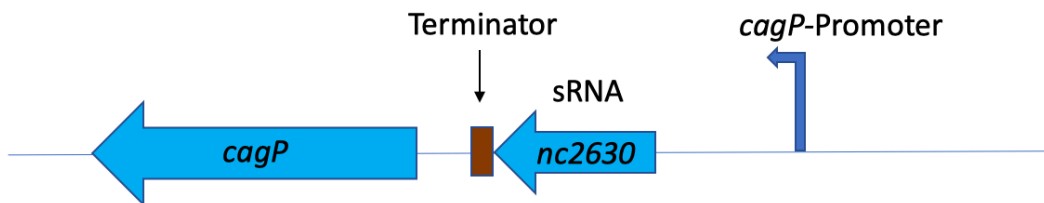


Abbildung 4: Genlocus von *cagP*

Die Abbildung stellt den Genlocus von *cagP* dar, inklusive seines stromaufwärts gelegenen Promotors, einer kleinen nicht-kodierenden RNA (HPnc2630) und eines vermuteten Terminators [38].

Der bisherigen Literatur lassen sich bezüglich der Transkription sowie der Translation von *cagP* folgende Ergebnisse entnehmen: Es konnte gezeigt werden, dass *cagP* nur in äußerst geringen Mengen exprimiert wird [39], wobei gleichsam beobachtet werden konnte, dass der *cagP* Promotor eine hohe Aktivität aufweist [38] [40]. Vannini et al. (2016) zufolge bewirkt der sich oberhalb des *cagP* befindliche mutmaßliche Transkriptions-Terminator eine Transkriptionsminderung [39].

In der Literatur können diverse Hinweise auf eine mögliche Induzierbarkeit von *cagP* gefunden werden. Epithelzellkontakt [41], Wachstumsphase [40], pH Wert [38, 40, 42] und Umweltbedingungen, wie Eisen- und Zink-Spiegel [27], scheinen sich auf die Transkriptionsraten der Gene der *cagPAI* sowie auf die Pilusbildung auszuwirken.

1.5. Zielsetzung

Eine Infektion mit dem humanpathogenen Magenbakterium *H. pylori* ist der größte bekannte Risikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms und ebenso mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von peptischen Ulzera verbunden [10, 11]. *H. pylori* Stämme, die über eine *cagPAI* verfügen, sind, im Gegensatz zu Stämmen ohne *cagPAI*, vermehrt mit Magenkarzinomen und peptischen Ulzera assoziiert [37]. Aufgrund beobachteter Interaktionen von *cagP* mit anderen Genen der *cagPAI* lässt sich folgern, dass *cagP* eine regulierende Funktion für das Cag-T4SS zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass eine *cagP*-Deletion in einer verminderten Tyrosinphosphorylierung sowie in einer verminderten *cagI* Expression resultiert (R. Nair, W. Fischer, unveröffentlicht). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass *cagP* durch äußere Bedingungen induziert wird [38, 40-42]. Hierbei ist denkbar, dass der stromaufwärts des *cagP* liegende mutmaßliche Terminator eine Rolle in der Regulation von *cagP* und somit letztlich für die Funktion des T4SS einnimmt [39]. In welcher Form *cagP* interagiert, ist noch unklar. Weder ein vollständiges Transkript noch ein Protein wurden bisher nachgewiesen [39, 43, 44]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Interaktionen von *cagP* mit Genen der *cagPAI* untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk sollte auf den Nachweis eines *cagP*-Transkriptes bzw. -Proteins sowie auf die Frage nach der Induzierbarkeit des Gens gerichtet werden. Um CagP detektieren und Genexpressionsanalysen durchführen zu können, wird ein hochsensitives Reportersystem benötigt. Dieses sollte im Rahmen dieser Arbeit vordringlich hergestellt werden. Da eine $\Delta cagG$ Mutation auch eine verminderte *cagI* Expression sowie eine reduzierte CagA Phosphorylierung aufwies (W. Fischer, unveröffentlicht) und *cagG* im selben Operon wie *cagH*, *cagI* und *cagL* liegt [43], ist es durchaus denkbar, dass *cagP* einen Einfluss auf *cagG* hat. Die Interaktion von *cagP* und *cagG* sollte untersucht werden. Da kein Antikörper gegen CagG zur Verfügung steht, sollte ein Reporter für *cagG* hergestellt werden.

2. Material

2.1. Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 1 enthält die in dieser Arbeit verwendeten *H. pylori* Stämme. In Tabelle 2 sind die hier verwendeten *Escherichia Coli* (*E. coli*) Stämme abgebildet.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *H. pylori* Stämme.

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
SL 01	P12, $\Delta cagP::Pup$ -gfp-cat	diese Arbeit
SL 02	P12, $\Delta cagP::Aup$ -gfp-cat	diese Arbeit
SL 03	P12, $\Delta cagP::Pup$ - $\Delta term$ -gfp-cat	diese Arbeit
SL 04	P12, $\Delta cagP::Aup$ - $\Delta term$ -gfp-cat (2 Klone: #1, #2)	diese Arbeit
SL 05	P12, $\Delta cagP::Pup$ - $\Delta HPNc2630$ - $\Delta term$ -gfp-cat	diese Arbeit
SL 06	P12, $\Delta cagP::Aup$ - $\Delta HPNc2630$ - $\Delta term$ -gfp-cat	diese Arbeit
SL 13	P12Str[pWS503], rpsL-erm::Pup-HiBiT- <i>cagP</i> , MF (2 Klone: #1, #2)	diese Arbeit
SL 14	P12Str[pWS503], rpsL-erm::Aup.HiBiT- <i>cagP</i> , MF (2 Klone: #1, #6)	diese Arbeit
P12	Wildtyp, Typ I Stamm	Klinisches Isolat der Univ. Hamburg [45]
P12GFP	P12, <i>GFP</i> im <i>cagA</i> Locus	W. Fischer unveröffentlicht
P12[HiBiT-CagA]	HiBiT- <i>cagA</i> , NanoLuc Positivkontrolle	Lettl et al.(2021)[46]
P12Str[pWS503]	P12, $\Delta cagP::rpsL$ -erm,	W. Fischer unveröffentlicht
RNP 3	P12, TEM-1-CagA	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht

RNP 4	RNP3, <i>ΔcagP</i>	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
RNP 5	RNP3, <i>ΔcagG::rpsL-erm</i>	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
Westen Blot und TEM Assay		
P12 Δ nc	P12 Δ HPnc2630::cat	W. Fischer unveröffentlicht
P12 Δ cagP	P12 <i>ΔcagP::cat</i>	W. Fischer unveröffentlicht
P12 Δ nc- Δ cagP	P12 Δ HPnc2630, <i>ΔcagP::cat</i>	W. Fischer unveröffentlicht
RNP3 (pRN1/433)	RNP3, myc-cagG (mf), Δ HPnc2630, <i>ΔcagP</i>	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
RNP3 (pRN1/600)	RNP3, myc-cagG (mf), Δ HPnc2630, Δ term	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
RNP5 (pRN1) \cong P12[myc-cagG], (gmyc)	P12 [TEM-1-CagA], <i>ΔcagG:: myc-cagG</i> , Streptomycin-Resistenz	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
RNP5 (pRN1/426)	RNP3, myc-cagG (mf), Δ HPnc2630	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
RNP5 (pRN1/433)	RNP3, myc-cagG (mf), Δ HPnc2630, <i>ΔcagP</i>	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
RNP5 (pRN1/600)	RNP5, myc-cagG (mf), Δ HPnc2630, Δ term	Ramya Nair & W. Fischer unveröffentlicht
pJP95	<i>ΔcagT</i> , TEM-CagA	W. Fischer unveröffentlicht

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme.

Bezeichnung	Eigenschaften/enthaltene Plasmid	Referenz
TOP 10	Chemisch kompetente <i>E. Coli</i>	Life Technologies, Karlsruhe
SLE 12	TOP 10, pSL1	diese Arbeit
SLE 13	TOP 10, pSL2	diese Arbeit
SLE 14	TOP 10, pSL3	diese Arbeit
SLE 16	TOP 10, pSL5	diese Arbeit
SLE 17	5KB05-J10, cagM	diese Arbeit
SLE 18	TOP 10, pSL7	diese Arbeit
SLE 20	TOP 10, pSL9	diese Arbeit
SLE 21	TOP 10, pSL10	diese Arbeit
SLE 22	TOP 10, pSL11	diese Arbeit
SLE 24	TOP 10, pSL13	diese Arbeit
SLE 27	TOP 10, pSL8	diese Arbeit

2.2. Plasmide

Tabelle 3 enthält diejenigen Plasmide, die für Klonierungen in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Eigenschaften	Verwendungszweck
pDH80	<i>gfp</i>	PCR Template für <i>gfp</i>
pRN1	<i>myc tag cagG</i> in pSMART-HP-2kb03-110, Kanamycin-Resistenz	<i>myc tag cagG</i> Reporter
pSL1	Pup- <i>luxCDABE</i> in pWS316, cat	Lux Reporter
pSL2	Aup- <i>luxCDABE</i> in pWS316, cat	Lux Reporter
pSL3	Pup- <i>gfp</i> in pWS316, cat	GFP Reporter
pSL5	Aup- <i>gfp</i> in pWS316, cat	GFP Reporter
pSL7	Δ term Pup- <i>gfp</i> in pWS316, cat	GFP Reporter
pSL8	Δ term Aup- <i>gfp</i> in pWS316, cat	GFP Reporter
pSL9	Δ Hpn2630 Pup- <i>gfp</i> in pWS316, cat	GFP Reporter
pSL10	Δ Hpn2630 Aup- <i>gfp</i> P in pWS316, cat	GFP Reporter

pSL11	Pup HiBit MF in 5KB05-J10, Streptomycin-Resistenz	NanoLuc Reporter
pSL13	Aup HiBit MF in 5KB05-J10, pSMART_5kb05	NanoLuc Reporter
pSMART-HP-5kb05_J10	Genbank Plasmid, <i>cagP</i> upstream um <i>cagM</i> erweitert	Klonierungen div. Reporter (MF NanoLuc Reporter - <i>cagP</i> upstream um <i>cagM</i> erweitert)
pSMART-HP-2kb03_I10	Genbank Plasmid, Kanamycin-Resistenz	Herstellung des <i>myc tag cagG</i> Reporters
pWS316	Chloramphenicol-Resistenz anstelle von <i>cagP</i>	Klonierungen für Reporter mit Chloramphenicol-Resistenz

2.3. Verwendete Zelllinie

Tabelle 4 beinhaltet die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Zelllinie.

Name	Beschreibung	Referenz
AGS	Humane Adenokarzinomzellen des Magens	ATCC CRL 1739

2.4.Oligonukleotide

Tabelle 5 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
cagAup-gfp	ACTGACTAGTTAGTAAGGAGAAAC	Primer mit <i>cagA</i>
	AATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTT C	upstream Bereich für GFP-Reporter
cagAup-lux	ACTGACTAGTTAGTAAGGAGAAAC	Primer mit <i>cagA</i>
	AATGACTAAAAAATTCATTCAT TATTAAC	upstream Bereich für Luciferase-Reporter
cagPup-gfp	ACTGACTAGTTCTTTCAAACCAA	Primer mit <i>cagP</i>
	AATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTT C	upstream Bereich für GFP-Reporter
cagPup-lux	ACTGACTAGTTCTTTCAAACCAA	Primer mit <i>cagP</i>
	AATGACTAAAAAATTCATTCAT TATTAAC	upstream Bereich für Luciferase-Reporter
cagG_fwd	AGTATGTTGGCGCATAGCCATA	5' qPCR Primer für <i>cagG</i>
cagG_rev	AGCCAAATGATGGGCGATTA	3' qPCR Primer für <i>cagG</i>
cagH_fwd	GGTTGTATTGTTGGTTAGCAGCTTT	5' qPCR Primer für <i>cagH</i>
cagH_rev	TCCGCAAATGACCGCTATC	3' qPCR Primer für <i>cagH</i>
cagI_fwd	TGACGCCAAGCAAGATGTCAATG	5' qPCR Primer für <i>cagI</i>
cagI_rev	TGGCGTTATTAATGGTGTCAATG	3' qPCR Primer für <i>cagI</i>
cagL_fwd	CATTCGCTTCAAATTTGGCTTT	5' qPCR Primer für <i>cagL</i>
cagL_rev	AAATGGGTGAAGAAGATGCTCTAA	3' qPCR Primer für <i>cagL</i>
	A	
cagP_fwd	TGCTACTCGTTTCTCTCAGCATAAT	5' qPCR Primer für <i>cagP</i>
	AA	für qPCR
cagP_rev	ACCAATTTTGCCATTGAGTCATAA	3' qPCR Primer für <i>cagP</i>
gfp-3'	ACGTGTCGACTTATTTGTATAGTTC	3' GFP Primer
	ATCCATGCCATG	
Hp537r	ACGTCTCGAG GATTTTGGCA	Sequenzierung
	AGCATCTTA	
IB 60	GACTGAAATGCCTCAAATG	Sequenzierung

Lux_kpnl_as	GATCGGTACCTTACAGCCGGATCCT CTAGAG	3' Luciferase Primer
UB-20 (fwd)	GGGTCCGCCCTACGAATTAC	5' qPCR Primer für 16S
UB-22 (rev)	GCGGGATTTGCTACCTACGA	3' qPCR Primer für 16S
WS 218	GGGGTACCTTACTCCTTTTTTCTT TCA	3' Primer für MF HiBiT- Klonierung
WS 371	CGGGTACCTCATAAGAACCAATTTT GCC	3' Primer für <i>cagP</i> Amplifikation (Berechnung der Kopienzahl)
WS 439	GCGGATCCATAGTAGGGTATTCTT TGG	5' Primer für <i>cagP</i> Amplifikation
WS 568	ACG CTA CAT ATG AAA CGA CCG ATT AGC	5' Primer für <i>cagP</i> Amplifikation (Berechnung der Kopienzahl)
WS 770	CAGTGTCGACTCATAAGAACCAAT TTTGCC	3' Primer für <i>cagP</i> Amplifikation
WS 797	GAACAAAACTCATCTCAGAAGAG GATCTGGACCAAAACACTGACATAA AAG	5' Primer mit <i>myc tag</i> <i>CagG</i>
WS 798	Phosphat-AGCGTTAAGCGGAGCGTT	3' Primer für <i>myc tag</i> <i>CagG</i>
WS 816	ACTGACTAGTAAAGGAGCAAAGG AGCATAG	Klonierung von Aup und Pup Δ term GFP Konstrukten
WS 817	GATCCTCGAGCAAGACGTTTC	Klonierung von Aup und Pup Δ term GFP und Δ term & Δ HPnc2630 GFP Konstrukten

WS 823	ACTGACTAGT <u>T</u> CTTTCAAACCAA AATGGTGTCTGGTTGGCGACTTTT CAAGAAAATTAGCCTGAAACGACC GATTAGC	5' Primer mit <i>cagP</i> upstream Bereich für HiBiT-Klonierung SpeI
WS 824	ACTGACTAGT <u>T</u> AGTAAGGAGAAAC AATGGTGTCTGGTTGGCGACTTTT CAAGAAAATTAGCCTGAAACGACC GATTAGC	5' Primer mit <i>cagA</i> upstream Bereich für HiBiT-Klonierung SpeI
WS 825	ACTGACTAGT <u>G</u> TTTCTATCCAAAA AACACAGG	Klonierung von Aup und Pup Δ term & Δ HPnc2630 GFP Konstrukten
Sonde	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
cagH_Probe	5'-6-FAM-CATGCTTACGGCTTCAGC GATGCTCT-BHQ-1-3'	<i>cagH</i> Sonde für qPCR
cagI_Probe	5'-6-FAM-AACCTGCAAAAAACCCC CCTGTCATG BHQ-1-3'	<i>cagI</i> Sonde für qPCR
cagL_Probe	5'-6-FAM-TAAATCTCCTCTCAAAGC AATGGCCGC-BHQ-1-3'	<i>cagL</i> Sonde für qPCR
cagG_P12_Probe	5'-6-FAM-ATGAAAGGATTGTTTGG ACC-BHQ-1-3'	<i>cagG</i> Sonde für qPCR
cagP_Probe	5'-6-FAM-TTTTGCGTGGCTTAAG- BHQ-1-3'	<i>cagP</i> Sonde für qPCR, bindet nahe dem 3' Ende
UB-21	TTA GCT GCA TTA CTG GAG AGA CTA AGC CC	qPCR Sonde für 16S

2.5. Antikörper

Tabellen 6 und 7 listen die in dieser Arbeit für Western-Blots verwendeten Antikörper auf.

Tabelle 6: Primäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung
α CagH	Kaninchen Antiserum gegen CagH [47]	1:3000
α CagI	Kaninchen Antiserum gegen CagI [47]	1:3000
α CagL	Kaninchen Antiserum gegen CagL [47]	1:3000
α Myc	Maus Antiserum gegen Myc-Tag (Cell Signaling)	1:1000
α GFP	Maus Antiserum gegen GFP (Clontech)	1:2500 – 1:5000
α p-Tyr (PY99)	Monoklonaler Maus IgG Antikörper gegen Phosphotyrosin (Santa Cruz Biotechnologies)	1:3000
α CagA (AK299)	Kaninchen Antiserum gegen CagA [47]	1:5000

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung
Protein A AP	Protein A (<i>Staphylococcus aureus</i>) gekoppelte AP (Sigma-Aldrich)	1:1000 (– 1:5000)
α Maus IgG-AP	AP gekoppelter Antikörper gegen Maus IgG (Kaninchen, Sigma-Aldrich)	1:1000
α Kaninchen IgG-AP	AP gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgG (Ziege, Sigma-Aldrich)	1:5000
α Maus IgG-POX	POX gekoppelter Antikörper gegen Maus IgG (Ziege, Sigma-Aldrich)	1:10000

2.6. Antibiotika

Tabelle 8 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika.

Tabelle 8: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Lösungsmittel	Konzentration in Agarplatte	
			<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	Fluka	Ethanol	6 mg/L	30mg/L
Erythromycin	AppliChem	Ethanol	10 mg/L	250 mg/L
Streptomycin	Sigma-Aldrich	Wasser	250 mg/ml	250 mg/ml

2.7. Chemikalien und Puffer

In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Puffer aufgelistet.

Tabelle 9: Chemikalien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anoden Puffer I	0,3 M Tris, pH 10,4 10 % (v/v) Methanol
Anoden Puffer II	25 mM Tris, pH 10,4 10 % (v/v) Methanol
BCIP/NBT Färbelösung (WB)	100 mM Tris/HCL, pH 9,6 7 mM MgCl ₂ 50 mg/L 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat in DMF 100 mg/L Nitroblautetrazoliumchlorid
GEBS	20 % Glycerin 50 mM EDTA 0.05 % Bromophenolblau 0.5 % N-Lauroylsarcosyl
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCL, pH 9,6 40 mM Glycine 10 % (v/v) Methanol

PBS	138 mM NaCl 2,7 mM KCL 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ HPO ₄
RIPA	50 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP-40 (v/v) (Nonidet P-40) 6 mM Na-Deoxycholsäure
SDS Laufpuffer	250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 25 mM Tris/HCL pH 8,3
STET	8 % Saccharose 5 % Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCL pH 8
TAE	40 mM Tris/HCL, pH 8 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
TBS	20 mM Tris-HCL, pH 7,5 150 mM NaCl
TE (Tris-EDTA) pH 8,0	10 mM Tris pH 8,0 Lösung 1 mM EDTA Lösung
Vitamin Mix	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-Aminobenzoensäure 0,25 g/l Nicotinamidadeninindinucleotid (NAD) 10 mg/l Vitamin B12 1 g/l L-Cystin 1 g/l Adenin

30 mg/l Guanin
 0,15 g/l L-Arginin
 0,5 g/l Uracil
 4,4 U/ml Nystatin (Sigma-Aldrich)
 5 mg/l Trimetoprim (Sigma-Aldrich)

2.8. Agar Platten und Nährmedien

Tabelle 10 umfasst die in dieser Arbeit verwendeten Agar Platten.

Tabelle 10: Agar Platten

Agar	Zusammensetzung für 500 ml Agar	Verwendungszweck
GC Agar Platten (Serum Platten)	18 g GC Agar (36g/L, Oxoid) 455 ml dH ₂ O 40 ml Pferdeserum (8 %) 5 ml Vitamin Mix (1 %)	Kultivierung von <i>H. Pylori</i>
LB Agar Platten	18 g Lennox-L agar (32g/L, Invitrogen) 500 ml dH ₂ O	Kultivierung von <i>E. Coli</i>

Je nach Bedarf wurden dem Agar Antibiotika zugesetzt (Tabelle 8).

In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien aufgelistet.

Tabelle 11: Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller
Brucella Broth (BB) Medium	Oxoid, Thermo Fischer Scientific
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies
Cholesterin (250-fach konzentriert)	Gibco, Life Technologies

Die in dieser Arbeit verwendeten Flüssigkulturmedien wurden nach Bedarf aus unterschiedlichen Zusammensetzungen der obenstehenden Nährmedien bzw. Chemikalien und Puffern zusammengestellt.

2.9. Kommerzielle Kits, Enzyme und Marker

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen *Kits*, Enzyme und Marker sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller	Verwendungszweck
<i>E. coli</i> Poly (A) Polymerase Kit	New England BioLabs	Herstellung von Poly A - RNA
ExTaq Polymerase	Takara	PCR
FastStart Essential DNA Probes Master Mix	Roche	qPCR
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore	POX Detektion WB
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare/fisher scientific	DNA Aufreinigung
Live-BLAzer-FRET B/G loading kit	Invitrogen	TEM Assay
Proteinmarker 26612 und 26616	Thermo Fisher Scientific	Proteingrößenbestimmung
QiaPrep Miniprep	Quiagen	Plasmidpräparation
QiaAMP DNA Mini Kit	Quiagen	DNA Aufreinigung
ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System	Promega	RNA Präparation
RNA Protect Bacteria Reagent	Quiagen	RNase-Inhibitor
RNaseZap	Invitrogen™	RNase-Inhibitor
StdSens Analysis Kid	Experion™	Überprüfung von RNA Integrität und Quantität
SuperScript III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen™	cDNA Synthese
T4 DNA Ligase	Roche	DNA Ligation
Turbo DNA-free-Kit	Invitrogen™	DNase-Verdau

2.10. Geräte und Verbrauchsmaterial

In Tabelle 13 sind die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Geräte und *Software*-Programme aufgeführt.

Tabelle 13: Geräte und *Software*

Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
Automated Electrophoresis System	Experion™	Überprüfung von RNA Integrität und Quantität
Blotting Kammer	Biotec-Fisher	Western-Blot
ClarioStar plate reader	BMG Labtech	Fluoreszenzmessung
CLC DNA Workbench 6	Quiagen	Primerdesign, Überprüfung von Sequenzierungen
FACSCantoll™	BD Biosciences	FACS Analyse der GFP Stämme (<i>Software</i> : FACSDiva)
Fluoreszenzmikroskop	Leica	Fluoreszenzmikroskopie der GFP Stämme
ChemiDoc Imager	Bio-Rad	Visualisieren der Gelbanden, Detektion von Chemilumineszenz (POX entwickelte WB; <i>Software</i> : Image Lab)
GraphPad Prism 5	Dotmatics	Statistische Analyse
Horizontal Elektrophoresis System	Bio-Rad	Gelelektrophorese
Inkubatoren	Scholzen, Binder	Inkubation von <i>H. pylori</i> und <i>E. coli</i>
LightCycler 96	Roche	qPCR
Mini PROTEAN Tetra Cells	Bio-Rad	SDS-PAGE Elektrophoresekammer
NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer und -Fluorometer	Thermo Scientific™	Quantifizierung von DNA und RNA
peqSTAR Thermocycler	VWR	PCR
Photometer	Hach	OD Messung
SpeedVac	Savant	Trocknen von Nucleinsäuren
Zentrifuge	Eppendorf	Zentrifugation

In Tabelle 14 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 14: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
Deckgläschen	Langenbrinck	Fluoreszenzmikroskopie
Eppendorfgefäße	Eppendorf	Reaktionen und Lagerung
Falcons	Falcon, BD	Reaktionen und Lagerung
Filterpapier	Whatman	Western-Blot (<i>Semi-dry</i>)
Kryoröhrchen	Nalgene	Stammerhaltung
Objektträger	Langenbrinck	Fluoreszenzmikroskopie
Pipettenspitzen (auch gestopft)	Sarstedt	Pipettieren
Petrischalen	Greiner	Zellkultivierung
PVDF Membran	Bio-Rad	Western-Blot
Schwarze 96 <i>Well</i> -Platten	Costar	Fluoreszenzmessung im ClarioStar
Wattestäbchen (steril)	Eurotubo	Aufnehmen von Bakterien
Weißer 96 <i>Well</i> -Platten	Roche	qPCR im LightCycler 96
<i>Well</i> -Platte (6, 26)	Corning	Infektion, Transformation
Zellkulturflaschen	Falcon, BD	Kultivierung und Infektion
Zellschaber	Corning	Abschaben von AGS Zellen

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Passagieren von AGS Zellen

Für die Infektion mit *H. pylori* wurde die humane Magenkarzinomzelllinie AGS verwendet.

Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium mit 10% FCS und 1% Glutamin bei 37 °C und 5% CO₂ in einer 75 cm² Zellkulturflasche.

Zum Passagieren (*splitten*) der AGS-Zellen wurde das Medium zunächst abgesaugt und die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen. Um die adhärennten Zellen von der Zellkulturflasche abzulösen, wurden 3 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂. Durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst. Zum Stoppen der Trypsinproteasewirkung wurde den Zellen 5 ml RPMI-Medium mit 10% FCS zugegeben. 2 ml der Zellsuspension wurden zu 12 ml RPMI-Medium in eine frische Zellkulturflasche überführt. Auf diese Weise wurden die Zellen alle 2 Tage passagiert. Je nach Bedarf konnten die Zellen auch in Zellkulturgefäße unterschiedlicher Größe *gesplittet* werden. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden für Infektions-Experimente verwendet.

3.2. Bakterienkultivierung

E. coli

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agar Platten. Zum Selektionieren der Klone wurde je nach Bedarf ein entsprechendes Antibiotikum zugegeben. Nach Beimpfung einer Platte erfolgte das Wachstum bei 37 °C über Nacht. Zur dauerhaften Stammerhaltung wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte genommen, in 1 ml BB-Medium mit 20% Cholesterin und 10% FCS suspendiert und bei -70 °C kryokonserviert. Um Bakterien aus der Kryokonservierung zu verwenden, wurden diese mit einer Impföse aus dem Kryoröhrchen entnommen, auf eine LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

H. pylori

Für die Kultivierung von *H. pylori* wurden GC-Agar Platten (Serum Platten) verwendet. Auch hier konnte je nach Bedarf ein Antibiotikum hinzugefügt werden. Die Inkubation von *H. pylori* erfolgte mikroaerophil im Inkubator bei 37 °C mit 10% CO₂, 5% O₂ und 85% N₂. Die für die Kultivierung verwendeten Flüssigmedien sind in den jeweiligen Experimenten beschrieben. Die Stammerhaltung erfolgte analog zum *E. coli*. Für die Rückgewinnung des *H. pylori* aus der Kryokonservierung wurden die Bakterien ebenfalls mit einer Impföse entnommen und auf GC-Agar Platten ausgestrichen. Die Platten wurden für 3 Nächte unter obigen Bedingungen inkubiert. Um einsatzbereite *H. pylori* Bakterienstämme zu erhalten, mussten diese noch ein weiteres Mal passagiert werden.

3.3. Arbeiten mit RNA

Während sämtlicher Arbeiten mit RNA wurde zum Schutz der RNA mit Handschuhen, einem RNase-Inhibitor (*RNaseZap* – Invitrogen), RNase freien Gefäßen und gestopften Pipetten gearbeitet.

3.3.1. Bereitstellen von Teststämmen

Von den *H. pylori* Stämmen RNP3 und RNP4 wurden über Nacht Flüssigkulturen angelegt. Hierzu wurden die entsprechenden Stämme mit Hilfe eines Wattestäbchens von den Serum-Platten abgenommen und in sterilem PBS gelöst. Zur Ermittlung der Bakterienzahl erfolgte eine optische Dichte Messung (OD-Messung) bei einer Wellenlänge von 550 nm. Anschließend wurden 20 ml Flüssigmedium, bestehend aus *Brucella Broth* und Cholesterin, in je einen 100 ml Glaskolben gegeben und mit einer OD von 0,05 beimpft. Die Kultivierung der Flüssigkulturen erfolgte über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 10% CO₂ mit 120 rpm. Am nächsten Tag wurde die OD gemessen und aus beiden Flüssigkulturen je zweimal dieselbe Bakterienmenge - entsprechend 1,3 ml OD1 - in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 5 min mit 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen.

3.3.2. Vorgehensweise mit Kontrollproben ohne AGS Zellkontakt

Die Pellets der Vergleichsproben, also je einmal RNP3 und einmal RNP4, wurden in je 500 μ L PBS gelöst. Daraufhin wurde den Proben je 1 ml „*RNA Protect Bacteria Reagent*“ (Quiagen) hinzugegeben. Die Eppendorf-Gefäße wurden erneut für 5 min mit 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für die Dauer der parallellaufenden Infektion der AGS Zellen bei -70 °C gelagert.

3.3.3. Infektion von AGS Zellen für RNA Präparation

Die Pellets der Stämme, welche zur Infektion von AGS Zellen genutzt werden sollten, also je einmal RNP3 und einmal RNP4, wurden in 3 ml PBS mit 10% FCS gelöst. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen zur Infektion in eine 6 *Well*-Zellkulturplatte mit konfluent gewachsenen AGS Zellen hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2,5 Stunden im Infektionsschrank bei 37 °C mit 5% CO_2 . Nach der Infektion wurde die 6 *Well*-Platte auf Eis gestellt. Den Proben wurden je 6 ml „*RNA Protect Bacteria Reagent*“ (Quiagen) hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und mit einer sterilen Pipette in ein 10 ml Falcon überführt, um anschließend für 5 min bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet auf Trockeneis schockgefroren.

3.3.4. Lysozym-Schritt

Die Eppendorf-Gefäße wurden auf Eis gestellt und die Pellets in 100 μ L TE mit 400 μ g/ μ L Lysozym, pH 8, suspendiert. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dabei alle 2 min auf dem Tischrüttler gerüttelt und anschließend für 45 s mit 14000 rpm zentrifugiert.

3.3.5. RNA Isolation

Die RNA Isolation erfolgte mit dem *ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System* und einem Protokoll von Promega. Vor Beginn wurden 10 μ L TG auf 1 ml LBA Puffer zugegeben. Anschließend wurden 10 μ L BME pro 1 μ L LBA-TG Puffer zugefügt. Die Pellets wurden in 350 μ L LBA-TG Puffer gelöst. Es wurden 250 μ L Ethanol hinzugegeben. Nun wurden die Säulchen und Sammelröhrchen des Kits zusammengesteckt. Die Säulchen wurden in

500 μL -Schritten beladen und mit 14000 g für 45 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurde den Säulchen 200 μL Säulchen-Waschlösung hinzugefügt und es wurde mit 14000 g für 30 s zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 500 μL RNA Waschlösung und eine Zentrifugation mit 14000 g für 45 s. Die Sammelröhrchen wurden nun entsorgt und die Säulchen auf frische Sammelröhrchen gesteckt. Es wurden erneut 300 μL RNA Waschlösung hinzugegeben und mit 14000 g für 2 min zentrifugiert. Nun wurden die Säulchen auf frische 1,5 ml RNase-freie Eppendorf-Gefäße gesteckt und mit 50 μL nukleasefreiem Wasser eluiert.

3.3.6. DNase Verdau

Für den DNase Verdau wurden 30 μL RNA entnommen und 3 μL des 10-fach konzentrierten Turbo DNase Puffers (Invitrogen) sowie 1,5 μL Turbo DNase (Invitrogen) hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 1,5 μL Turbo DNase sowie eine erneute Inkubation für 30 min bei 37 °C. Nachfolgend wurden 3 μL DNase Inaktivierungs-Puffer hinzugegeben und die Proben für 5 min bei Raumtemperatur unter wiederholtem „Ansnipsen“ inkubiert. Danach wurde mit 10000 g für 1,5 min zentrifugiert und die RNA, welche sich nun im Überstand befand, in ein neues Eppendorf Gefäß überführt.

3.3.7. Prüfung der RNA Integrität und Quantität

Die Verifizierung der RNA Integrität und die Bestimmung der RNA Quantität erfolgte mit Hilfe des Experion automatisierten Elektrophorese-Systems unter Verwendung des *StdSens Analysis Kid* (BioRad). Hierbei wurden hinsichtlich des RNA Qualitäts-Index (RQI) Werte zwischen 7 und 10 als qualitativ einwandfrei betrachtet. Das System liefert Werte zur Größe der RNA Fragmente in den Proben und lässt somit auf den Abbaugrad der RNA schließen. Anhand der Elektrophorese-Werte wird der Quotient aus 16S und 23S RNA zueinander ermittelt, welcher ebenfalls Rückschlüsse auf die RNA Qualität erlaubt.

3.3.8. Reverse Transkription – Herstellung von cDNA

Der isolierten RNA wurde zunächst unter Verwendung des *E. coli Poly A Polymerase Kit* (New England BioLabs) ein Poly A Schwanz angehängt. Hierzu wurden der RNA 2,5 µL zehnfach konzentrierter Puffer, 2,5 µL ATP und 1,25 µL Poly A Polymerase zugesetzt. Schließlich wurde der Reaktionsansatz mit DEPC Wasser (Ambion – Thermo Fisher) auf 25 µL aufgefüllt. Im folgenden Schritt wurde dann je 1 µL Oligo (dT) Primer (Invitrogen™) sowie 4 µL dNTP's (Thermo Fisher) hinzugegeben und mit DEPC Wasser auf 13 µL aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 65 °C inkubiert und dann für 1 min auf Eis gestellt. Die cDNA Synthese erfolgte mit Hilfe des SuperScript III Reverse Transkriptase Kits von Invitrogen™. Den Proben wurden nun 4 µL 5-fach konzentrierter FS-Puffer sowie 2 µL DTT zugesetzt. Daraufhin wurden die Proben für 2 min bei 42 °C inkubiert. Nun wurde 1 µL von der SuperScript III Reverse Transkriptase (RT) zugegeben. Anschließend folgte eine 50-minütige Inkubation bei einer geeigneten Arbeitstemperatur der Reversen Transkriptase zur cDNA Synthese von 50 °C. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurden die Proben anschließend für 15 min auf 70 °C erwärmt. Die fertige cDNA wurde auf Eis gestellt und bis zur qPCR bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.9. qPCR

Die qPCR erfolgte im LightCycler 96 von Roche. Mithilfe entsprechender Primer und Sonden (siehe Tabelle 5) wurden die C_q -Werte der Transkripte von *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagG* und *cagP* sowie von der 16S RNA (interne Kontrolle) bestimmt. Alle Sonden verfügen am 5' Ende über einen 6-FAM Fluorophor und sind am 3' Ende mit einem BHQ-1 *Quencher* versehen. Um eine Aussage über die Anzahl der Gen-Kopien treffen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe von *cagP* angelegt. Hierzu wurde *cagP* aus dem Plasmid pSMART-HP-5kb05_J10 mit den Primern WS568 und WS371 mittels PCR amplifiziert. Dem 3' Primer hängen hierbei noch 8 weitere Nukleotide über das 3' Ende und dem 5' Primer noch 9 weitere Basen über das 5' Ende von *cagP* hinaus an. Somit beträgt die Länge des hier gewonnenen Amplicons 371 bp. Die Gesamtlänge von *cagP* beträgt 354 bp. Anschließend wurde für die RT-qPCR in 10er-Schritten verdünnt. Die Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer und -Fluorometer (Thermo Scientific™) aus 5 Messungen ermittelt. Zudem wurde eine DNA Kontamination anhand von nicht revers-transkribierten Kontrollen ausgeschlossen. Für die qPCR lagen die Primer in einer finalen Konzentration von 30 µM und

die Sonden in einer Konzentration von 25 μM vor. Für die Reaktion wurde der *FastStart Essential DNA Probes Master Mix* (Roche) verwendet. Nach der Zugabe der DNA-Vorlage betrug das finale Reaktionsvolumen in den *Wells* der weißen 96-Wellplatte (Roche) 20 μL . Der LightCycler wurde auf 45 Zyklen eingestellt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe der LightCycler 96 Software. Schlussendlich erfolgten auf diese Weise, ab Bereitstellung der kryokonservierten Teststämme RNP3 und RNP4, drei Durchführungen, wobei die Proben stets über ihren cDNA Gehalt auf die Transkriptmenge der getesteten Gene geprüft wurden. Die Stämme RNP3 und RNP4 wurden hierzu einmal mit und einmal ohne AGS Zellen behandelt. Während der Inkubation mit AGS Zellen wurden die Kontrollproben ohne AGS-Zellkontakt bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend wurde mit allen Proben parallel weitergearbeitet. Als Positivkontrolle diente die DNA des Wildtyp-Stammes P12. Für die Negativkontrolle wurde *Aspergillus* DNA verwendet.

3.4. Arbeiten mit DNA

3.4.1. Arbeit mit Oligonukleotiden

Zum *Primerdesign* wurde die Software *CLC DNA workbench 6* verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion erworben. Nach Erhalt wurden die Oligonukleotide in ddH₂O gelöst mit einer Konzentration von 100 pmol/ μL . Zum weiteren Arbeiten mit den Oligonukleotiden wurde eine Konzentration von 10 pmol/ μL eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 3.4.1 zu entnehmen.

3.4.2. Herstellung rekombinanter DNA und Übertragung auf *H. pylori*

Zum Zwecke einer späteren Genexpressionsanalyse wurden verschiedene rekombinante *H. pylori* Stämme hergestellt. Die Klonierungen der verwendeten Stämme liefen methodisch identisch ab, weshalb nur Klonierungsschema des Stammes SL01 dargestellt wird (Abbildung 17). Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurden per Sequenzierung überprüft. Die neu klonierten Stämme enthielten entweder den original belassenen *cagP-upstream* Bereich (Pup) oder wurden mit dem *cagA-upstream* Bereich (Aup), welcher eine *Shine-Dalgarno* (SD) Sequenz enthält (ACTAAGGAGAAAC), versehen.

Die verwendeten Amplikons, Restriktionsstellen, Plasmidvektoren und Zielstämme können Tabelle 15 entnommen werden.

Tabelle 15: Amplikons, Restriktionsstellen, Plasmidvektor und Zielstamm für Klonierungen

Stamm	PCR (Amplikon)	Restriktionsstellen	Plasmidvektor	Zielstamm
SL01	Matrize: pDH80 Primer: cagPup-gfp, gfp-3'	<i>speI, salI</i>	pWS316 (cat)	P12
SL02	Matrize: pDH80 Primer: cagAup-gfp, gfp-3'	<i>speI, salI</i>	pWS316 (cat)	P12
SL03	Matrize: pSMART-HP-5kb05_J10 Primer: WS 816, WS 817	<i>speI, xhoI</i>	pSL3	P12
SL04	Matrize: pSMART-HP-5kb05_J10 Primer: WS 816, WS 817	<i>speI, xhoI</i>	pSL5	P12
SL05	Matrize: pSMART-HP-5kb05_J10 Primer: WS 825, WS 817	<i>speI, xhoI</i>	pSL3	P12
SL06	Matrize: pSMART-HP-5kb05_J10 Primer: WS 825, WS 817	<i>speI, xhoI</i>	pSL5	P12
SL13	Matrize: pSMART-HP-5kb05_J10 Primer: WS 823, WS 218	<i>speI, sphI</i>	pSMART-HP-5kb05_J10	P12Str[pWS503]
SL14	Matrize: pSMART-HP-5kb05_J10 Primer: WS 824, WS 218	<i>speI, sphI</i>	pSMART-HP-5kb05_J10	P12Str[pWS503]

3.4.3. PCR – DNA Amplifikation

Die PCR (Polymerase Kettenreaktion) ist ein Verfahren zur Genamplifikation. In dieser Arbeit wurde die PCR zum Einfügen gewünschter Schnittstellen für Klonierungen und für anschließende Sequenzierungen genutzt. Verwendet wurde hierfür die ExTaq Polymerase mit Korrekturlesefunktion. Der Ablauf der PCR beginnt mit einer initialen Denaturierung der DNA bei 95 °C für 5 min. Anschließend folgen 30 Zyklen, beginnend mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von der Anlagerung der Primer bei 52 °C für 30 s. Anschließend erfolgt die Elongation bei 68 °C für 1 min pro Kilo Basenpaare. Nach Beendigung von 30 Zyklen findet eine finale Elongation für 10 min bei 68 °C statt. Anschließend erfolgt eine Kühlung auf 10 °C zur Lagerung der PCR Produkte bis zur Entnahme. Die Zusammensetzung von 50 µl Reaktionsansatz ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: PCR Reaktionsansatz für 50 µl

Komponente	Volumen in µl
10 x ExTaq Puffer	5
dNTP	4
MgCl ₂	6
Je Primer (1:10 Verdünnung)	0,5
DNA Vorlage	0,5
ExTaq Polymerase	0,1
ddH ₂ O	Auf 50 auffüllen

3.4.4. Restriktion von DNA

Der präparative Restriktionsverdau dient der Spaltung der DNA an einer gezielten Position. Auf diese Weise können Fragmente gewonnen und mit einem anderen DNA-Abschnitt rekombinant ligiert werden. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C für 3 Stunden. Es wurde stets ein Reaktionsansatz von 50 µl angesetzt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Präparativer Restriktionsverdau, Zusammensetzung von 50 µl Reaktionsansatz

Komponente	Volumen in µl
Plasmid	20
10x Puffer	5
Je Restriktionsenzym	1
ddH ₂ O	24

3.4.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Separierung von DNA Fragmenten entlang ihrer Größe. Das Beladen der Agarosegele erfolgte mit in GEPS aufgenommenen PCR Produkten. Hierzu wurden 5 µl PCR Produkt mit je ca. 1 µl GEBS vermischt. Je nach Fragmentlänge wurde ein 1% oder 2% Agarosegel verwendet, welches, ebenfalls der Größe des jeweilig gesuchten DNA Fragmentes bzw. der Prozentigkeit des Gels angepasst, entweder bei 70 V für 50 min oder bei 100 V für 35 min lief. Anschließend wurde das Gel ausgeschnitten und für 20 min in ein Ethidiumbromidbad gelegt. Mittels UV Exposition wurden die Banden im GelDoc sichtbar gemacht.

Für das Gießen der Agarosegele wurde 1 g bzw. 2 g Agarosepulver in 100 ml TAE gegeben, in der Mikrowelle erwärmt und handwarm in die Gelelektrophoreseeinrichtung gegossen.

3.4.6. DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) und *QiaAMP DNA Mini Kit* (Quiagen) entsprechend den Herstellerangaben. Für die Aufreinigung von Gelbanden wurden die Agarosegele zunächst für 10 min in einem 0,1% Bromthymolbad gefärbt und die Banden anschließend ausgeschnitten.

3.4.7. Ligation

Die Ligation von Vektor und *insert* erfolgte bei 4 ° Celsius über Nacht mit der T4 Ligase von Roche. Die Zusammensetzung eines 10 µl Reaktionsansatzes kann der untenstehenden Tabelle 18 entnommen werden.

Tabelle 18: Zusammensetzung für 10 µl Ligationsansatz

Komponente	Volumen
Vektor	2 µl
PCR <i>Insert</i>	6 µl
10 x Ligase-Puffer	1 µl
T4-Ligase	1 µl

3.4.8. Transformation in chemisch kompetenten *E. coli*

Für die Transformation wurden Rubidium-Chlorid kompetente *E. coli* Zellen verwendet (TOP 10). In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 5 µl der aus der Ligation neu gewonnenen rekombinanten Plasmid-DNA zu 50 µl *E. coli* TOP 10 Zellen hinzugegeben und anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42° C in einem Wasserbad. Der Transformationsansatz wurde mit LB Medium auf 1 ml aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37 °C im Rüttler mit 180 rpm inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl Transformationsansatz auf Selektivplatten ausplattiert. Auch die restlichen Zellen wurden ausplattiert. Hierzu wurde zunächst bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. Die pelletierten Bakterien wurden in den verbliebenen 100 µl aufgenommen, ebenfalls auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die neu entstandenen Klone gepickt und für eine anschließende Plasmidpräparation auf Selektivmedium weitergestrichen.

3.4.9. Plasmidpräparation

QiaPrep Miniprep Kit (Qiagen)

Die Plasmidpräparation erfolgte unter anderem mit dem QiaPrep Miniprep Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben. In einem Eppendorf Reaktionsgefäß wurde eine Impföse Bakterien in 250 µl P1 Pufferlösung suspendiert. Anschließend wurden 250 µl P2 Pufferlösung hinzugegeben und das Gefäß 4-6 mal invertiert. Als die Lösung klar wurde (nach maximal 5 min), wurden weitere 350 µl N3 Pufferlösung hinzugefügt und sofort 4-6 mal invertiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und es wurden 700 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach gründlichem Invertieren wurde die Probe für 10 min bei -20 °C inkubiert, um anschließend erneut für 10 min mit 13000 rpm zentrifugiert zu werden. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 1000 µl 70% Ethanol gewaschen und für weitere 5 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das im Gefäß verbliebene Pellet für 20-30 min im *SpeedVac* getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl Reinstwasser gelöst.

Koch-Methode nach Holmes & Quigley

Die Plasmidpräparation wurde auch mittels Koch-Methode [48] durchgeführt. Hierzu wurden eine Impföse Bakterien in 300 µl STET Puffer in einem Eppendorf Gefäß suspendiert und 15 µl Lysozymlösung (10 mg/ml Lysozym in STET) hinzugegeben. Der Präparationsansatz wurde für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Eppendorf Gefäße für 60 s bei 100 °C im Wasserbad gekocht und danach für 15-20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entnommen und verworfen. Es wurden 200 µl Isopropanol hinzugegeben und 10 min bei -20 °C inkubiert. Die Eppendorf Gefäße wurden daraufhin erneut bei Maximalgeschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 500 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut für 5 min mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für 10 min im *SpeedVac* getrocknet und in 50 µl Reinstwasser gelöst.

3.4.10. Testverdau

Zur Überprüfung der rekombinant hergestellten Plasmide wurde ein Testverdau durchgeführt. Hierzu wurde ein 10 µl Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zusammensetzung ist der untenstehenden Tabelle 19 zu entnehmen. Anschließend wurden die Proben in GEPS aufgenommen und auf ein Elektrophoresegel aufgetragen.

Tabelle 19: Testverdau, Zusammensetzung von 10 µl Reaktionsansatz

Komponente	Volumen
Plasmid	5 µl
10x Puffer	1 µl
Je Restriktionsenzym	0,2 µl
H ₂ O _{dest}	4 µl

3.4.11. Transformation in *H. pylori*

Für die Transformation in das Bakterium *H. pylori* wurde 1 ml BB mit 10% FCS in einer 24-Well-Platte mit einer OD von 0,2 beimpft und für 1-2 Stunden bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Plasmid zu den Bakterien hinzugegeben und für weitere 4 Stunden bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert. Die Bakterien wurden bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. Die pelletierten Bakterien wurden in den verbliebenen 100 µl aufgenommen, auf Selektivmedium ausplattiert und über 3 Nächte bei 37 °C, 10% CO₂, 85% N₂ und 5% O₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die neuen Klone gepickt und auf Selektivmedium weitergestrichen.

3.4.12. Elektroporation

Die Elektroporation für die gescheiterte Transformation eines LUX Plasmids in *H. pylori* wurde nach dem Protokoll von Segel und Tompkins vorgenommen [49].

3.4.13. Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC Biotech vorgenommen. Hierzu wurde die zu sequenzierende DNA zusammen mit einem Primer entsprechend den Angaben von GATC eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Zielsequenzen im Programm *CLC Workbench 7* abgeglichen.

3.4.14. Kryokonservierung

Um sowohl die neu hergestellten *E. coli*, als auch die neuen *H. pylori* Klone dauerhaft zu konservieren, wurden diese bei -70 °C in BB-Medium mit 20% Cholesterin und 10% FCS kryokonserviert.

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. Herstellung von Lysaten für Westen-Blot

Für die Herstellung von Bakterienlysaten wurde die OD_{500} einer Bakteriensuspension ermittelt, die gewünschte Menge entnommen und mit 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 μl SDS Puffer mit 5% Mercaptoethanol aufgenommen. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95 °C gekocht und für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die zu testenden Proteine verblieben im Überstand. Die Lysate wurden für die Gelelektrophorese verwendet und der Rest bei -20 °C aufbewahrt.

3.5.2. Gießen der Polyacrylamidgele für Western-Blot

Für die SDS-PAGE wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit Trenn- und Sammelgel mit 0,75 mm Durchmesser gegossen. Die Konzentration der Gele richtete sich nach der molekularen Masse des gesuchten Proteins. So wurde beispielsweise für das ca. 14 kDa große, mit einem *Myc-Tag* versehene, CagG ein 15% Gel gewählt, während für CagI mit ca. 39 kDa ein 12% Gel verwendet wurde. Die Zusammensetzung der Gele ist den untenstehenden Tabellen (Tabelle 20, Tabelle 21) zu entnehmen.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Polyacrylamidtrenngele

Zusammensetzung	12% Trenngel (5 ml)	15% Trenngel (5 ml)
H ₂ O _{dest}	1,6 ml	1,1 ml
30 % Acrylamid-mix	2,0 ml	2,5 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl
10 % Ammoniumperoxidsulfat	50 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Tabelle 21: Zusammensetzung der 5% Polyacrylamidsammelgele

Zusammensetzung	5% Sammelgel (2 ml)
H ₂ O _{dest}	1,4 ml
30 % Acrylamid-mix	0,33 ml
1,0 M Tris, pH 6,8	0,25 ml
10 % SDS	20 µl
10 % Ammoniumperoxidsulfat	20 µl
TEMED	2 µl

3.5.3. SDS-PAGE und Western-Blot (AP/POX)

Die SDS-PAGE und der Western-Blot dienen dem immunologischen Nachweis von Proteinen.

SDS-PAGE

In der Elektrophorese werden Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und durch einen Antikörper nachgewiesen. Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Lysate in die Taschen des Polyacrylamid-Gels geladen. Als Marker wurde der Prestained Proteinmarker 26612 und 26616 von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Elektrophoresekammer wurde mit SDS Laufpuffer aufgefüllt. Die SDS-PAGE wurde für ca. 90 min bei einer Spannung von 100 bis 140 V durchgeführt.

Western-Blot

Anschließend wurde das Gel entnommen und die Proteine auf eine PVDF Membran nach dem *semi-dry* Verfahren in einem elektrischen Feld zwischen zwei Graphitplatten übertragen. Für das sogenannte „*blotting*“ wurde die Membran zunächst in Methanol und anschließend in Anode II Puffer getränkt. In der *Blotting* Kammer kamen von unten nach oben zu liegen: Zwei Blätter dickes und zwei Blätter dünnes Filterpapier (Whatman), welche jeweils zunächst in Anode I Puffer und anschließend in Anode II Puffer getränkt wurden. Darüber wurde die PVDF Membran und das Gel gelegt, woraufhin zwei weitere dünne und zwei dicke Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer I, darüber platziert wurden. Anschließend wurde die Kammer geschlossen und es wurde mit 50 mA pro Gel für 90 min *geblottet*.

Inkubation mit Antikörpern und Detektion des gesuchten Proteins

Nach dem Übertragen der Proteine auf die PVDF Membran wurde diese entnommen und in 5 ml einer 5% Milchpulversuspension in einem Falcon für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht abgesättigt. Nun wurde der erste Antikörper in 5 ml Lösung mit 1% Milchpulver und 0,1% TBST zur Membran gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x für je 5 min mit TBST gewaschen, der zweite Antikörper wieder in 1% Milchpulver und 0,1% TBST hinzugegeben und erneut 3-mal für je 5 min in TBST gewaschen. Zum detektieren fanden zwei verschiedene Verfahren Anwendung. Für alkalische Phosphatase (AP) gebundene Antikörper wurde eine BCIP/NBT Färbelösung eingesetzt. Die Membran wurde in der Färbelösung belassen, bis deutliche Banden zu sehen waren. Anschließend wurde die Reaktion mit Wasser abgestoppt. Für die Verwendung von POX gekoppelten Antikörpern wurde die Membran mit *Immobilon Western HRP Substrat* (Millipore) entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Die Chemilumineszenz wurde im GelDoc detektiert und mit Hilfe der *ChemiDoc Software* ausgelesen.

Detektion des gesuchten mit einem HiBiT-Tag versehenen Proteins

Nach dem Übertragen der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese in ein Falcon gegeben und gemäß der Herstellerangaben mit 2 ml IgBiT/Puffer + 4 µl Substrat (Verhältnis 1:500 Substrat:IgBiT) versetzt. Die Inkubation erfolgte auf einer Rolle für 5 Minuten bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4°C über Nacht. Die Chemilumineszenz wurde im GelDoc detektiert und mithilfe der *ChemiDoc-Software* ausgewertet.

3.5.4. Infektion von AGS Zellen für Tyrosinphosphorylierungs-Assay

In einer 6-Well-Platte konfluent gewachsene AGS Zellen wurden mit *H. pylori* einer OD₅₀₀ von 0,1 infiziert und für 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit 2 ml PBS gewaschen, mit einem Zellschaber auf Eis abgelöst und in 1 ml PBS (1 mM Natriumvandat, 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 5 min mit 2300 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 µl PBS gelöst. Es wurden 25 µl von 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer hinzugegeben und für 10 min bei 95 °C im Heizblock gekocht. Die Proben konnten nun für die SDS-PAGE verwendet werden.

3.6. Fluoreszenzmessung im ClarioStar

3.6.1. GFP Stämme

Von den *H. pylori* Stämmen SL 01, SL 02, SL 03, SL 04, SL 05, SL 06 sowie P12GFP als Positivkontrolle und P12 als Negativkontrolle wurden je 1 ml OD 1 mit 4000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in je 500 µl PBS mit 10% FCS aufgenommen und zusammen mit 500 µl Brucella Broth mit 10% FCS in einer 24-Well-Platte für 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die *H. pylori* Suspensionen mit 4000 rpm für 5 min abzentrifugiert und die Pellets in 1 ml PBS aufgenommen. Es wurden jeweils 100 µl der Suspensionen in eine 96-Well-Platte überführt. Von jeder Probe sowie der Positiv- und Negativkontrolle wurden zwei Duplikate angefertigt. Die Messung im ClarioStar erfolgte bei 488 nm.

3.6.2. HiBiT Protokoll

Die Bakterien wurden in PBS aufgenommen und auf eine OD₅₅₀ von 1 in entweder 200 µl oder in 500 µl eingestellt. Es erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation mit 5000 rpm. Das resultierende Pellet wurde in 200 µl oder 500 µl Ripa gelöst, entsprechend einer OD₅₅₀ von 1. Bis alle zu messenden Proben vorbereitet waren, wurden die Proben auf Eis gestellt. Das Reagenz wurde mit einer Substratverdünnung von 1:200, einer IgBit-Verdünnung von 1:100 und einem 10x Puffer in Reinstwasser zubereitet. Pro Reaktion wurden 25 µl Bakterien-Ripa Lysat und 25 µl Reagenz in einer schwarzen 96-Well-Platte (Costar) zusammengefügt. Hierzu

wurden die Bakterien zunächst vorpipettiert. Anschließend wurde das Reagenz hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Alufolie bedeckt und für 3 min mit 500 rpm auf einem Tischrüttler gerüttelt. Daraufhin wurde die Platte für 10 min stehen gelassen und eventuell entstandene Luftblasen mit einer sterilen Kanüle zerstochen. Anschließend wurde eine Fluoreszenzmessung im ClarioStar durchgeführt, wobei bei 460 nm mit einer *top-optic* von oben ohne Deckel gemessen wurde. Die *focal hight/gain* wurde nach der Positivkontrolle eingestellt. Als *Blank*-Messwert diente ein *Well* mit RIPA und Reagenz.

3.6.3. Versuche mit NanoLuc HiBiT *cagP*-Reporter

Die ersten Genexpressionsanalysen von *cagP* bei unterschiedlichen externen Bedingungen mit dem NanoLuc HiBiT System sind im Folgenden in ihrer Durchführung beschrieben. Als *cagP*-Reporter-Teststämme kamen zwei Klone des SL14 Stammes zum Einsatz. Ein HiBiTCagA Stamm diente als Positivkontrolle, der P12 Wildtyp Stamm diente als Negativkontrolle.

Zum Ermitteln des Expressionsverhaltens von *cagP* in verschiedenen (Wachstums-) Medien wurden 200 µl *H. pylori* Suspension der Teststämme mit einer OD₅₅₀ von 1 für 5 min mit 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl des jeweiligen Test-Mediums (BB, PBS, PBS mit 10% FCS, PBS mit 2 µl Cholesterin) aufgenommen und in einer 24-*Well*-Platte für 1 Stunde bei 37 °C mit 10% CO₂ auf dem Rüttler mit 120 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Eppendorfgefäße umpipettiert und erneut mit 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl RIPA aufgenommen und auf Eis gestellt. Der Versuch wurde gemäß des oben beschriebenen „HiBiT Protokolls“ durchgeführt.

3.7. Fluoreszenzmikroskopie

Um bei den GFP-Reporterstämmen eine grüne Fluoreszenz zu beobachten, wurden diese unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica) inspiziert. Hierzu wurden Bakterien von Platte in PBS aufgenommen. Von diesen Bakteriensuspensionen wurden 20 µl auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen versehen. Die Bakterien wurden mit UV-Strahlung angeregt und mikroskopiert. Mit der „*Leica Application Suite (LAS) X*“ Software wurden Bilddateien aufgenommen.

3.8. Durchflusszytometrie (FACS)

Für die FACS-Analyse wurden die Bakterien der GFP-Teststämme mit einer OD_{550} 0,2 in 200 μ l DPBS suspendiert. Die Proben wurden im FACSCantoII™ (BD Biosciences) getestet und mit der Software FACSDiva ausgewertet.

3.9. TEM-CagA Translokations-Assay

Der TEM-CagA Translokations-Assay dient der Quantifizierung des translozierten CagA in die Wirtszelle. Hierzu werden Stämme getestet, deren CagA mit TEM-1, einer β -Lactamase, fusioniert wurde. TEM-1 ist in der Lage β -Lactamringe zu spalten und bewirkt somit für seinen Träger eine Penicillin-Resistenz. Der TEM-Assay macht sich diese Enzymaktivität als Reporter zunutze. Es kommt ein zellmembranpermeables FRET Fluoreszenzsubstrat (CCF4) zum Einsatz, welches ein 7-Hydroxycoumarin, ein Fluorescein sowie einen zentral gelegenen β -Lactamring in einem Molekül vereint. Außerhalb der Zelle liegt CCF4 verestert vor. Gelangt es ins Zellinnere, werden die Estergruppen abgespalten und das Substrat beginnt mit 520 nm grün zu fluoreszieren. Wird nun der β -Lactamring gespalten, kommt es zu einer strukturellen Distanzierung der beiden Fluorophore mit einer Unterbrechung des FRET, woraufhin nunmehr 7-Hydroxycoumarin blau fluoresziert. In der Fluoreszenzmessung kann ein „Blau zu Grün Ratio“ ermittelt werden, welches Rückschlüsse über die quantitative CagA Translokation erlaubt. Die zu testenden Stämme wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte gewonnen und in DPBS mit 10% FCS suspendiert. Von jeder Probe wurden 500 μ l einer OD_{550} von 0,075 in einer 24-Well-Platte für 1 Stunde bei 37 °C mit 10% CO_2 inkubiert. Anschließend folgte eine 2,5-stündige Infektion von AGS Zellen in einer 24-Well-Platte mit je 200 μ l Bakteriensuspension bei 37 °C mit 5% CO_2 . Nach der Infektion wurde das Fluoreszenzsubstrat CCF4 hinzugegeben und die Proben für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Substratzusammensetzung ist untenstehender Tabelle 22 zu entnehmen. Es folgte eine Fluoreszenzmessung im ClarioStar.

Tabelle 22: CCF4 Zusammensetzung für 1ml Substrat

Zusammensetzung	Volumen
PBS	828,4 μ l
Lösung A	1 μ l
Lösung B	10 μ l
Lösung C	155,6 μ l
Probenicid (Sigma Aldrich) (1mM)	5 μ l

3.10. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit der *Software GraphPad Prism 5* durchgeführt. Die experimentellen Datensätze ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen einschließlich der Standardabweichung des Mittelwertes. Die Signifikanz wurde anhand des *student's t-test* ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Interaktionen von *cagP* mit weiteren Genen oder Genprodukten der *cagPAI*

Vorangegangene Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine *cagP*-Deletion zu einer verminderten CagH-, CagI- und CagL-Produktion sowie zu einer stark verminderten Aktivität des Cag-Typ-IV-Sekretionssystems führt (R. Nair & W. Fischer, unveröffentlicht). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die verminderte CagH-, CagI- und CagL-Produktion bei Vorliegen einer *cagP*-Deletion bestätigt werden. Da *cagG* zusammen mit *cagH*-, *cagI*- und *cagL* in einem Operon organisiert ist, sollte außerdem der Einfluss von CagP auf CagG untersucht werden [43].

4.1.1. Das *cagP*-Gen als regulatorische Komponente von CagH, CagI und CagL

Um den Einfluss von *cagP* auf CagH, CagI und CagL zu untersuchen, wurden Western-Blots von Stämmen mit und ohne *cagP* Deletion durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein Stamm mit einer kombinierten Deletion von *cagP* und der kleinen nicht kodierenden RNA *HPnc2630* sowie ein Stamm mit alleiniger Deletion der kleinen RNA *HPnc2630* untersucht (Abbildung 4, Abbildung 5).

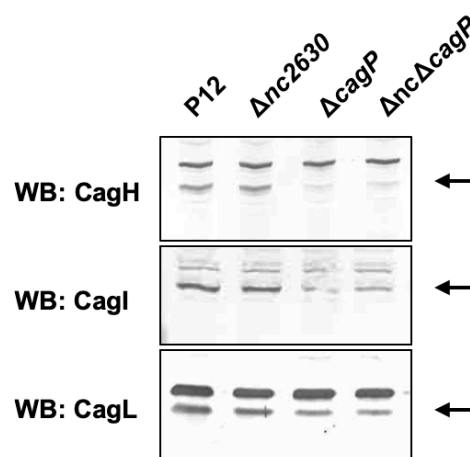


Abbildung 5: Einfluss von *cagP* auf CagH, CagI und CagL

Die Abbildung zeigt Western-Blots von *H. pylori* P12 Stämmen, bei denen sowohl die RNA *HPnc2630* als auch *cagP* separat und in Kombination deletiert wurden. Es wurden Ganzzelllysate der entsprechenden Stämme hergestellt. Die Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Westen-Blot mit den Antikörpern α CagH, α CagI und α CagL auf die entsprechenden Genprodukte untersucht. Die Pfeile deuten auf die den jeweiligen Proteinen entsprechende Bande. Eine *cagP* Deletion führt zu einer verminderten CagH-, CagI- und CagL-Produktion, wobei die Deletion der RNA *HPnc2630* keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene zu haben scheint.

Im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass eine *cagP*-Deletion zu einer verminderten CagH-, CagI- und CagL- Produktion führt. Hierzu wurden die Antikörper α CagH, α CagI und α CagL verwendet. Eine alleinige Deletion der kleinen, nicht kodierenden RNA (HPnc2630) hat hierbei keinen Einfluss auf die Expression der drei Proteine. Dementsprechend fand sich auch kein Unterschied hinsichtlich der Bandenstärke für CagH, CagI und CagL zwischen den Stämmen mit alleiniger *cagP* Deletion und einer kombinierten Deletion von *cagP* mitsamt der kleinen RNA HPnc2630 (Abbildung 5).

4.1.2. Herstellung eines *cagG*-Reporters

Da bisher kein Antikörper gegen CagG zur Verfügung steht, wurde zur Detektion von CagG ein mit einem *Myc-Tag* versehener CagG Reporter erstellt. Für die Herstellung des entsprechenden Stammes wurde *cagG* zunächst in dem *H. pylori* Stamm RNP3 (Str^R) durch eine *rpsL-erm* Genkassette ersetzt. Es erfolgte eine Selektion auf Erythromycin-Resistenz, wobei die Transformanten aufgrund der Dominanz des (Wildtyp-) *rpsL*-Gens gleichzeitig Streptomycin-sensitiv werden. Im zweiten Schritt wurde *cagG* - versehen mit einem *myc-Tag* hinter seinem N-terminalen Sekretionssignal - wieder eingefügt, wodurch der neu hergestellte Stamm RNP5 (pRN1) (Str^R) erneut eine Streptomycin-Resistenz aufwies und über diese auf den Verlust der *rpsL-erm*-Kassette selektioniert wurde (Abbildung 6).

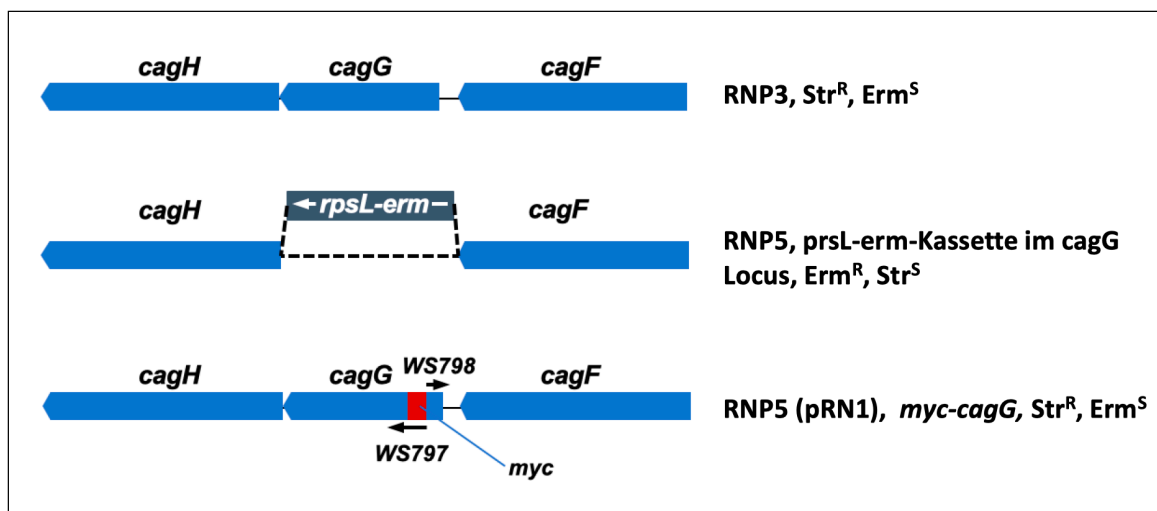


Abbildung 6: Herstellung des *Myc-cagG* Stammes RNP5 (pRN1)

Abbildung 6 präsentiert den *cagG* Locus (1. Zeile). Der *H. pylori* Stamm RNP3 verfügt über eine Streptomycin Resistenz. Eine schematische Darstellung beschreibt den Prozess zur Erstellung des *Myc-cagG* Stammes RNP5 (pRN1). Schritt 1-2 zeigen den Austausch von *cagG* durch eine *rpsL-erm* Kassette. Die erfolgreich klonierten Stämme wurden auf Erythromycin selektioniert. Aufgrund der Dominanz des *rpsL*-Gens wurden die Transformanten (Zeile 2) *Streptomycin-sensitiv*. Schritt 2-3 verdeutlichen den Austausch der *rpsL-erm* Kassette durch homologe Rekombination gegen ein mit einem *myc-Tag* versehenes *cagG*. Der neu erstellte CagG Reporter ist Streptomycin resistent und wurde auf Streptomycin-Platten selektioniert. Der neu entwickelte Stamm RNP5 (pRN1) entspricht einem mit einem *myc-tag* versehenen CagG Reporter im *H. pylori* Stamm RNP3. Verwendetes Plasmid ohne *myc-cagG*: pSMART-HP-2kb03_i10; Verwendetes Plasmid mit *myc-cagG*: pRN1, Str: Streptomycin, Erm: Erythromycin, (R)Resistenz (S)Sensitiv.

Der Stamm RNP5 (pRN1) wird in den Abbildungen 7 und 8 mit „Gmyc“ bezeichnet. Mittels Western-Blot konnte das CagG Protein mit Myc-Tag mit einer Größe von ca. 14 kDa im Stamm RNP5 (pRN1) nachgewiesen werden (Abbildung 7). Um den Einfluss des *cagP*-Gens bzw. der kleinen nicht-kodierenden RNA *HPnc2630* auf die CagG-Expression zu untersuchen, wurden in dem Stamm RNP5 (pRN1) zusätzlich *cagP*, die RNA *HPnc2630*, oder beide zusammen deletiert. Bakterienlysate von jeweils zwei unabhängigen Transformanten der entsprechenden Stämme wurden in Western-Blots mit einem Myc-Antikörper entwickelt. Es zeigten sich jedoch nur jeweils sehr schwache Banden. Aufgrund der scheinbar geringen CagG Proteinmenge konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Expression von *cagG* von einer *cagP* Deletion, von einer Deletion der kleinen RNA *HPnc2630*, oder von einer Deletion beider Genabschnitte zusammen beeinträchtigt wird (Abbildung 7).

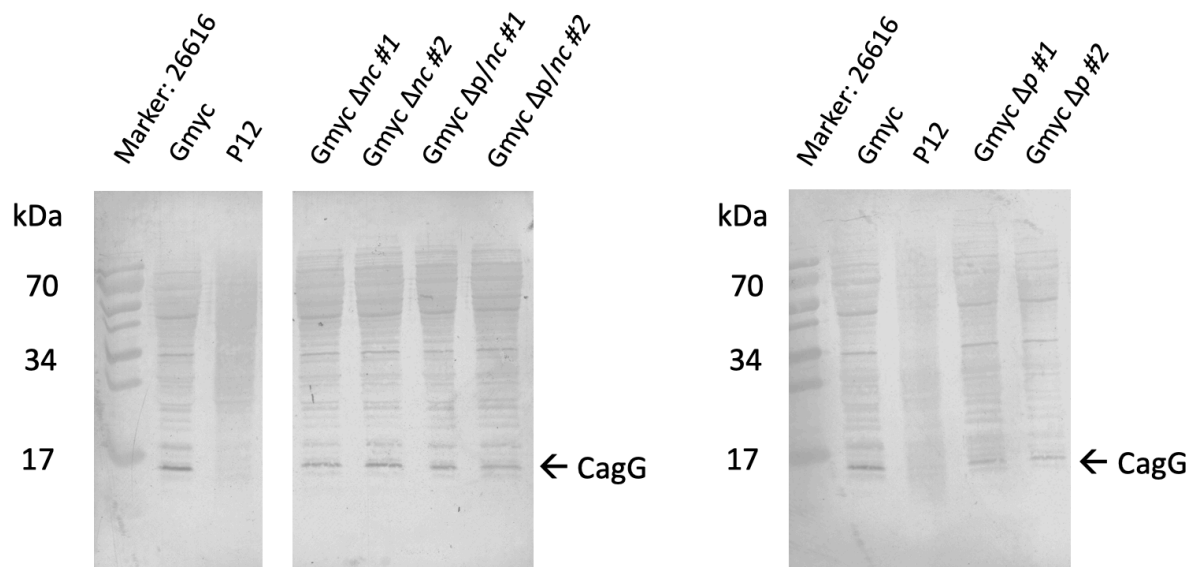


Abbildung 7: Einfluss von *cagP* auf *cagG*

Die Abbildung zeigt Western-Blots von Mutanten des Stammes RNP3 (pRN1) (=Gmyc), wobei entweder *cagP*, *HPnc2630* oder alle beide deletiert wurden. Die Inkubation erfolgte mit dem α Myc Antikörper. Als zweiter Antikörper wurde α Maus IgG-AP verwendet. Für CagG zeigten sich nur sehr schwache Banden, weshalb nicht eindeutig ersichtlich ist, ob die Expression von *cagG* einem Einfluss von *cagP* bzw. von *HPnc2630* oder beiden zusammen unterliegt. Positivkontrolle: Gmyc: RNP5 (pRN1); Negativkontrolle: P12 (Wildtyp), Gmyc Δ nc = RNP5 (pRN1/426), Gmyc Δ p/ Δ nc = RNP5 (pRN1/433), Marker: 26616 PageRuler, (ThermoFisher); Δ nc: Deletion der kleinen RNA *HPnc2630*; Δ p: Deletion von *cagP*; Δ p/nc: Deletion sowohl von *cagP* als auch von *HPnc2630*. Gesamter WB (links) im Anhang.

Die bisherigen Beobachtungen der Arbeitsgruppe, dass eine *cagP*-Deletion zu einer verminderten CagA-Translokation führt, konnten mittels TEM Assay bestätigt werden. RNP3 entspricht einem P12 Wildtyp mit einer TEM-1-CagA-Fusion und dient somit als Positivkontrolle. Da *cagT* für den Sekretionsapparat essentiell ist, wurde ein Teststamm mit einer *cagT* Deletion als Negativkontrolle gewählt (Abbildung 8).

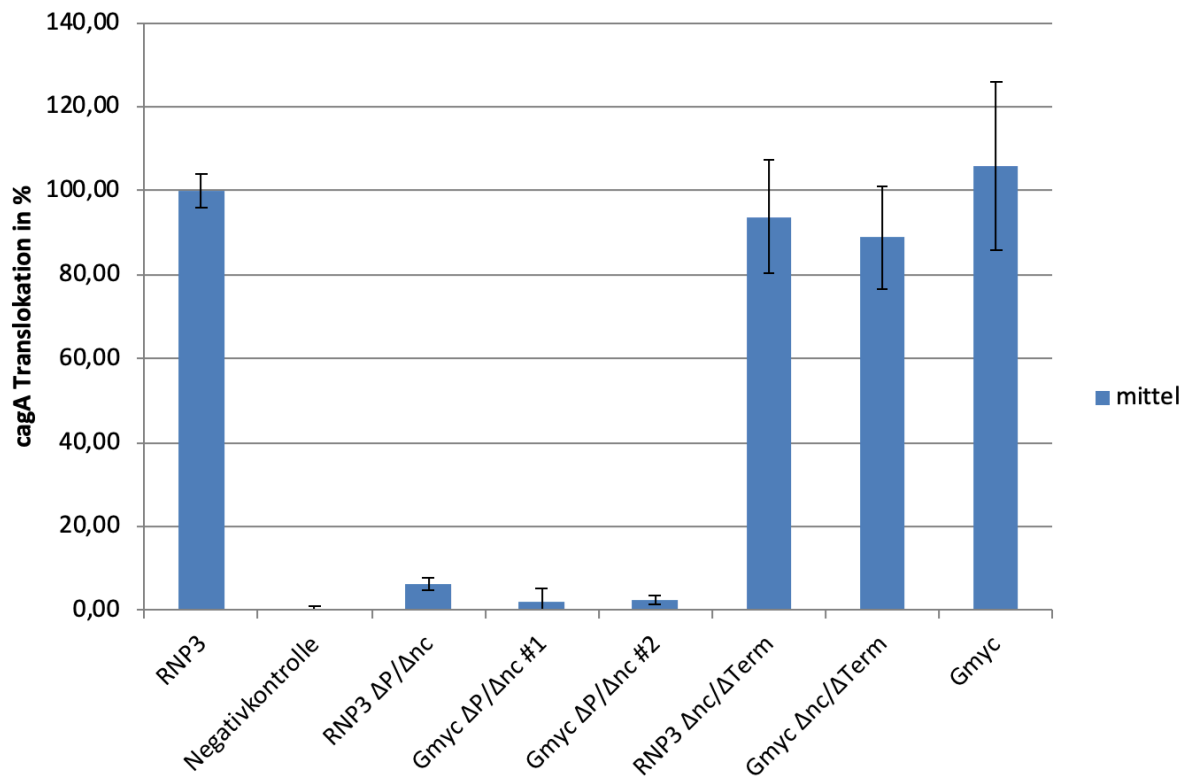


Abbildung 8: Einfluss von *cagP* auf die CagA Translokation.

Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm, das die Ergebnisse eines TEM-Assays zur Überprüfung der Abhängigkeit der CagA-Translokation von *cagP*, *HPnc2630* und von dem mutmaßlichen Terminator von *cagP* darstellt. Hierzu wurden Stämme getestet, die entweder eine kombinierte Deletion von *cagP* und *HPnc2630* oder eine kombinierte Deletion von *HPnc2630* und dem Terminator aufweisen. Als Positivkontrolle diente RNP3 (P12, (TEM-1-CagA)), während der Stamm pJP95 mit einer *cagT* Deletion als Negativkontrolle fungierte, wobei *cagT* für das Cag-Typ-IV-Sekretionssystem essentiell ist. Der Stamm RNP5 (pRN1) (= Gmyc) wurde ebenfalls getestet. Bei Vorliegen einer Deletion von *cagP* und *HPnc2630* konnte eine deutlich reduzierte CagA Translokation (im Mittel ca. 4%) im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Stämme mit einer Δnc - und einer $\Delta Term$ -Mutation zeigten eine CagA Translokation, die mit der des Wildtyps vergleichbar war. Dies traf erwartungsgemäß auch für den Stamm RNP5 (pRN1) zu. Die Messwerte stammen aus vier Durchführungen mit jeweils zwei Duplikaten. Die Daten wurden gemittelt und mit Standardabweichung angegeben. Δp : Deletion von *cagP*; Δnc : Deletion der kleinen RNA *HPnc2630*, $\Delta Term$: Deletion des Terminators; #1: Klon 1; #2: Klon 2. RNP3 $\Delta p/\Delta nc$ = RNP3 (pRN1/433), Gmyc $\Delta p/\Delta nc$ = RNP5 (pRN1/433), RNP3 $\Delta nc/\Delta Term$ = RNP3 (pRN1/600), Gmyc $\Delta nc/\Delta Term$ = RNP5 (pRN1/600), Gmyc = RNP5 (pRN1)

Stämme mit einer $\Delta cagP$ und $\Delta HPnc2630$ Mutation wiesen, verglichen mit dem Wildtyp, im Mittel lediglich ca. 4% von dessen CagA Translokation auf. Dem gegenüber stehen Stämme mit einer Deletion der kleinen RNA *HPnc2630* mitsamt dem mutmaßlichen Terminator (Abbildung 4), welche eine nahezu gleich hohe CagA Translokation aufweisen, wie der als Wildtyp fungierende Stamm RNP3. Der Stamm RNP5 (pRN1) erreicht eine ähnlich hohe CagA Translokation wie der Stamm der Positivkontrolle (RNP3).

4.2. AGS Zellkontakt als Einflussgröße auf die Transkription und Nachweis eines *cagP* Transkripts mittels RT-qPCR

Es wurde bereits beschrieben, dass der *cagP*-Promotor bei Epithelzellkontakt aktiviert und die *cagP* Transkription somit induziert werden kann [41]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dies anhand des Stammes RNP3 (P12 [TEM-1-CagA]) mit AGS-Zellkontakt überprüft werden. Dieser Stamm weicht gegenüber dem Wildtyp-Stamm P12 lediglich hinsichtlich einer eingefügten Fusion von CagA mit einer β -Lactamase ab. Es sollte untersucht werden, ob die Transkription von *cagP* sowie von *cagG*, *cagH*, *cagI* und *cagL* durch AGS Zellkontakt induziert oder reduziert wird. Ergebnisse früherer Arbeiten lassen darauf schließen, dass *cagP* nur in geringen Mengen und nicht vollständig bis zum 3' Ende transkribiert wird. So konnte anhand einer qPCR-Analyse zweier Wildtypstämme (G27 und 26695) mit drei verschiedenen Sondenbindungsstellen gezeigt werden, dass die Transkription von *cagP* durch den Terminator sehr stark vermindert und nur noch ein kurzes Stück über diesen hinaus fortgesetzt wird [39]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch für den Stamm RNP3 durch eine qPCR auf ein fast vollständiges Transkript mit einer Länge von mindestens 346 Basen geschlossen werden. Hierzu wurden die Primer *cagP_fwd* und *cagP_rev* verwendet, wobei die entsprechende Template cDNA vom Startcodon bis zum 3' Primer für *cagP* (*cagP_rev*) eine Länge von 346 bp umfasst. Im Vergleich hierzu wurden bisher lediglich qPCR Produkte von *cagP* mit einer Länge von 257 bp [44] und 267 bp [43] nachgewiesen. Die Bindungsstellen der Primer für *cagP* können Abbildung 9 entnommen werden.

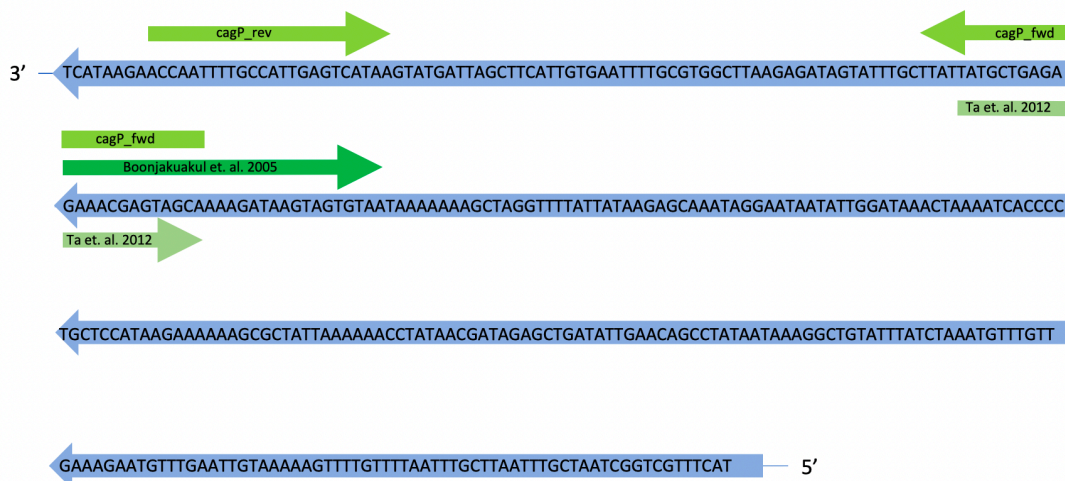


Abbildung 9: qPCR von *cagP* mit Bindungsstellen

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der *cagP*-Primer-Bindungsstellen, die im Rahmen dieser Arbeit für die qPCR verwendet wurden. Außerdem sind die 3' Primer für die *cagP* qPCR von Boonjakuakul et al. (2005) und Ta e. al. (2012) eingezeichnet. Boonjakuakul et al. (2005) konnten auf ein Transkript mit einer Länge von 257 Basen und Ta et al. (2012) auf ein Transkript mit einer Länge von 267 Basen schließen. In dieser Arbeit konnte indirekt auf ein *cagP* Transkript mit einer Länge von 346 Basen geschlossen werden. (Vollständige Länge von *cagP* (354 bp). *CagP* qPCR 3'Primer: *cagP_rev*; *CagP* qPCR 5'Primer: *CagP_fwd*).

4.2.1. Qualitätskontrollen der RNA Präparation

Um die Zuverlässigkeit der qPCR-Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die nachfolgend aufgeführten Qualitätskontrollen und internen Kontrollen durchgeführt.

Die RNA Qualität wurde mit Hilfe des automatisierten Elektrophorese Systems Experion (BioRad) evaluiert (siehe Methoden). Die unten aufgeführten Ergebnisse entstammen drei unabhängigen Durchführungen mit je vier Proben, deren Integrität jeweils bestätigt wurde. Folglich repräsentieren die untenstehenden Abbildungen insgesamt 12 Proben mit RNA von guter Qualität (Abbildung 10).

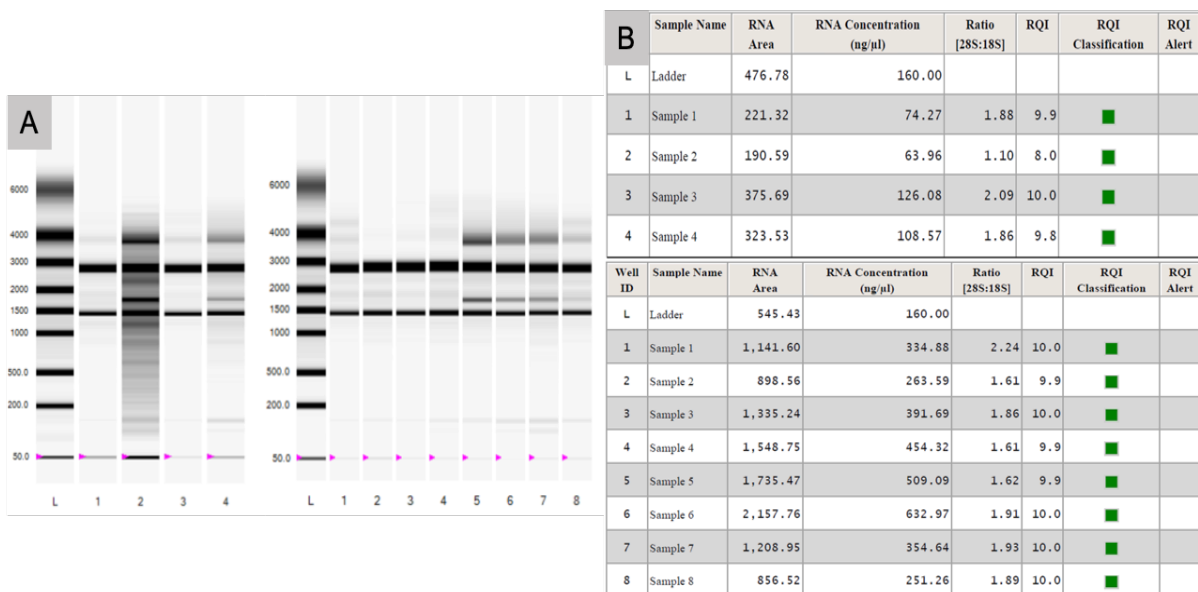


Abbildung 10: RNA Quantitätskontrolle

Die Abbildung stellt die Verifizierung der RNA Qualität mit Hilfe des automatisierten Elektrophorese-Systems von Experion (BioRad) dar. Es wurden je vier Proben aus drei unabhängigen RNA Präparationen, also insgesamt 12 Proben, untersucht.

A: Abbildung A stellt die erhaltene RNA als virtuelle Gelbanden dar und dient somit der Evaluierung des Abbaugrades der RNA. Große Fragmente entsprechen hierbei einem geringen Abbaugrad.

B: Die Tabelle gibt die RNA-Konzentration der Proben sowie den RNA Qualität-Index (RQI) an, wobei bei einem RQI von 7 bis 10 von einer intakten RNA ausgegangen wird.

Um den vollständigen DNase-Verdau zu bestätigen, wurden der qPCR nicht-revers-transkribierte Proben hinzugefügt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen RT-qPCR-Datensätzen. In Abbildung 11 sind die gemittelten C_q -Werte mit Standardabweichung dargestellt, wobei der Wildtyp P12 als Positivkontrolle für vorhandene DNA dient. Als Negativkontrolle wurde Aspergillus-DNA verwendet. Getestet wurde mit einer *cagP*-Sonde, beziehungsweise mit Sonden der entsprechend getesteten Gene.

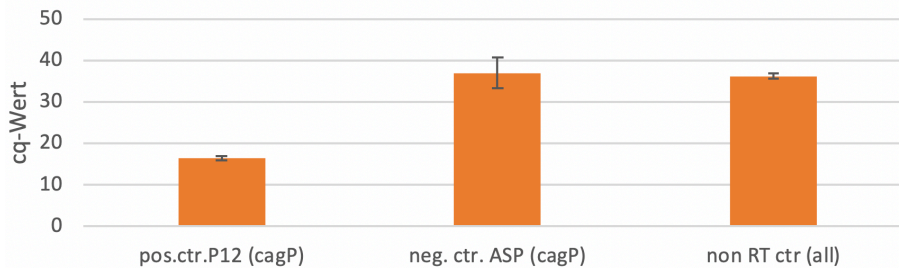


Abbildung 11: Bestätigung der Vollständigkeit des DNase-Verdaus

Um die Qualität des DNase-Verdaus beurteilen zu können, wurden die qPCR-Reaktionen auch mit nicht revers-transkribierten Proben durchgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse für die *cagP*-qPCR. Als Positivkontrolle wurde P12 DNA (pos.ctr.P12 (cagP)) verwendet, als Negativkontrolle diente Aspergillus DNA (neg.ctr.ASP(cagP)). Die nicht revers-transkribierten Proben stammen aus drei unabhängigen RT-qPCR-Durchführungen. Ihr C_q -Wert ist als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die C_q -Werte der getesteten nicht-revers-transkribierten Proben (*non RT ctr*) entsprechen denen der Negativkontrolle und sind somit frei von DNA.

4.2.2. Einfluss auf die Transkription von Genen der *cagPAI* durch AGS Zellkontakt

Um den Einfluss des AGS-Zellkontaktes auf die Transkription der Gene *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagG* und *cagP* zu ermitteln, wurde der Stamm (RNP3) getestet. Hierzu wurden von jedem Stamm sowohl eine Probe ohne AGS Zellkontakt als auch eine nach Inkubation mit AGS Zellen gewonnen. Die RNA wurde isoliert und revers transkribiert. Anschließend wurde eine RT-qPCR mit Primern bzw. Sonden für die oben angegebenen Gene und für die 16S-rRNA als Kontrolle durchgeführt. Die resultierenden Datensätze liefern C_q -Werte, welche der Anzahl der durchlaufenen Zyklen der qPCR bis zum Nachweis des gesuchten Gens entsprechen. Ein qPCR Zyklus (ΔC_q -Wert von 1) entspricht theoretisch einer Verdopplung der Menge des amplifizierten Fragments. Die in Abbildung 12 dargestellten Daten entstammen 3 voneinander unabhängig durchgeführten qPCRs. Die Kopienzahlen wurde entsprechend der Formel $x = 2^{-C_q}$ ermittelt und auf die Mittelwerte der Proben ohne AGS-Zellkontakt normiert. Die y-Skala gibt die relative Kopienzahl in % der Positivkontrolle (RNP3 ohne AGS Zellkontakt) an.

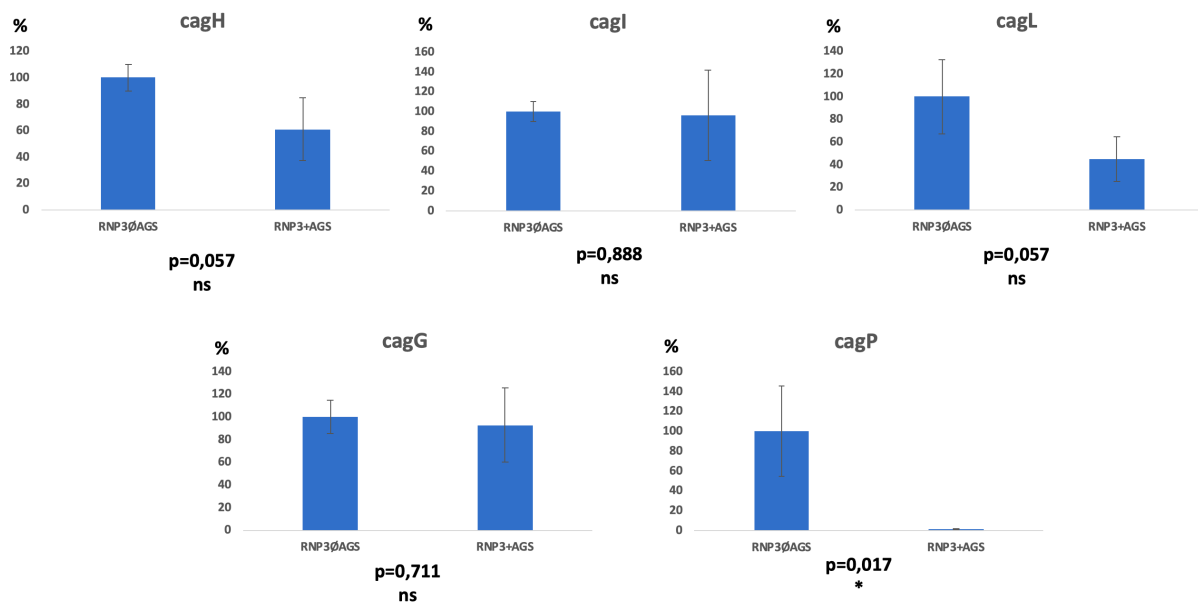


Abbildung 12: Einfluss auf die Transkription von *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagG* und *cagP* bei Kontakt mit AGS Zellen

Die Balkendiagramme in der Abbildung repräsentieren die Ergebnisse von drei unabhängigen qPCRs als Mittelwerte mit Standardabweichung. Zur Untersuchung des Einflusses des AGS-Zellkontakts auf die Transkription der Gene *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagG* und *cagP* wurden Flüssigkulturen des Stammes RNP3 sowohl mit als auch ohne AGS-Zellkontakt inkubiert. Nach einer Zentrifugation erfolgte die RNA-Präparation mithilfe des *ReliaPrep RNA Tissue Miniprep Systems* von Promega. Die gewonnene RNA wurde revers transkribiert. Anschließend wurde eine qPCR unter Verwendung von Primern und Sonden (Tabelle 5) für die gesuchten Gene durchgeführt. Die mit Hilfe der Formel $x = 2^{-C_q}$ ermittelte Kopienzahlen wurden auf die Mittelwerte des RNP3-Stammes ohne AGS-Zellkontakt (ØAGS) normiert. Es zeigte sich eine signifikant geringere Transkription von *cagP* bei AGS-Zellkontakt ($p < 0,05$). Die statistische Analyse wurde mittels eines ungepaarten *student-t-test* durchgeführt ($p < 0,05$). ns = nicht signifikant, * = signifikant ($p < 0,05$)

Die Ergebnisse zu den Genen *cagH*, *cagI*, *cagL* und *cagG* weisen erhebliche Standardabweichungen auf, weshalb sich für diese Gene keine definitive Aussage bezüglich des Einflusses auf die Transkription durch AGS-Zellkontakt treffen lässt.

Ein signifikanter Einfluss auf die Transkription durch AGS-Zellkontakt wurde jedoch bei dem Gen *cagP* beobachtet ($P=0,017$). Im Mittel ging die Transkription von *cagP* bei AGS Zellkontakt auf etwa 1,5% zurück. Hierbei könnten die relativ hohen Fehlerbalken für *cagP* auf die geringe Menge an Transkript zurückzuführen sein.

4.2.3. Quantitativer Nachweis eines *cagP* Transkriptes mittels Verdünnungsreihe

Zur quantitativen Abschätzung der tatsächlichen *cagP*-Transkriptmenge (Kopienzahl) wurde eine Verdünnungsreihe eines PCR-amplifizierten *cagP*-Genfragments angelegt. Um die entsprechenden C_q -Werte der Proben der Verdünnungsreihe zu ermitteln, durchliefen diese zusammen mit den getesteten cDNA-Proben eine RT-qPCR. Beginnend mit einer Konzentration von 17,34 ng/ μ L wurde das aus der PCR gewonnene *cagP*-Produkt in Schritten von 1:10 verdünnt (Kurven von links nach rechts) (Abbildung 13).

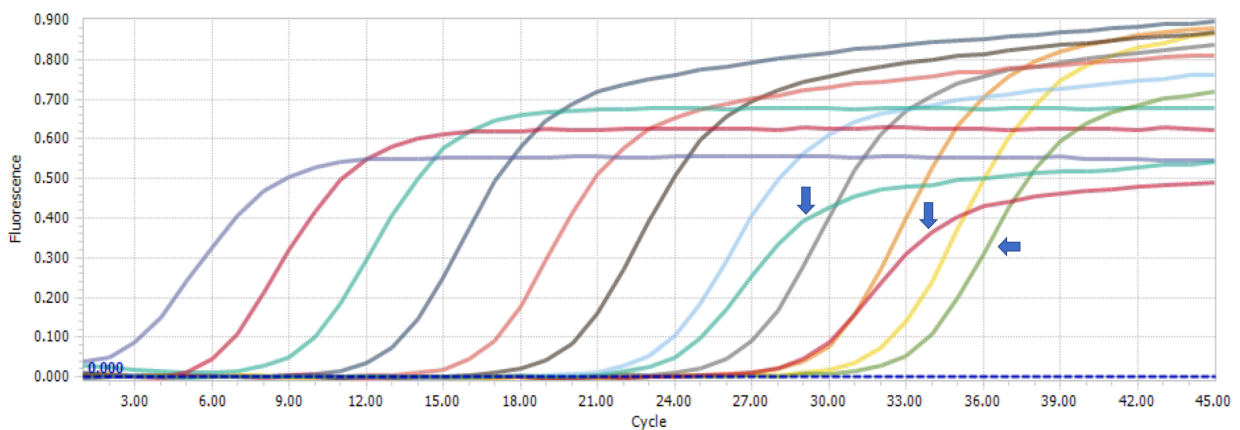


Abbildung 13: Verdünnungsreihe von *cagP*

Die Abbildung zeigt die C_q -Werte einer Verdünnungsreihe von *cagP* gemessen im *LightCycler 96* (Roche). Von links nach rechts erfolgte je Kurve eine Verdünnung eines PCR-amplifizierten *cagP*-Genfragments im Verhältnis von 1:10. Die unverdünnte Probe (ganz links) wies eine Konzentration von 17,34 ng/ μ L auf. Die türkisfarbene, rote und grüne Kurve, jeweils mit einem Pfeil markiert, repräsentieren die *cagP*-Transkription des RNP3-Stamms ohne AGS-Zellkontakt (türkise Kurve: C_q -Wert: 24,03), des RNP3-Stamms nach AGS-Zellkontakt (rote Kurve: C_q -Wert: 29,14) und eines *Aspergillus*-Stamms als Negativkontrolle (grüne Kurve: C_q -Wert: 32,83). Die dargestellten Daten stammen exemplarisch aus dem ersten von drei Datensätzen und sind repräsentativ für die zwei weiteren Durchführungen.

Die Anzahl der Transkript-Kopien der einzelnen Verdünnungen wurde mit folgender Formel berechnet und dem jeweiligen C_q -Wert zugeordnet (Abbildung 14):

$$N_{\text{Kopien}} = \frac{(DNA_{(ng)}) \times (6,022 \times 10^{23})}{\text{Genlänge}_{(bp)} \times \text{Molekulargewicht 1 Mol bp}_{(ng/bp)}}$$

Von der unverdünnten Probe mit einer Konzentration von 17,34 ng/μl wurden 2,8 μl eingesetzt, was einer DNA-Masse von 48,552 ng entspricht. Die Genlänge des amplifizierten *cagP*-Fragments beträgt 371 bp. Für 1 Mol bp wurde ein Gewicht von 650 g angenommen.

$$N_{\text{Kopien}1:0} = \frac{(48,552 \text{ ng}) \times (6,022 \times 10^{23})}{371 \text{ bp} \times 1 \times 10^9 \times 650 \text{ ng/bp}} = 1,21 \times 10^{11}$$

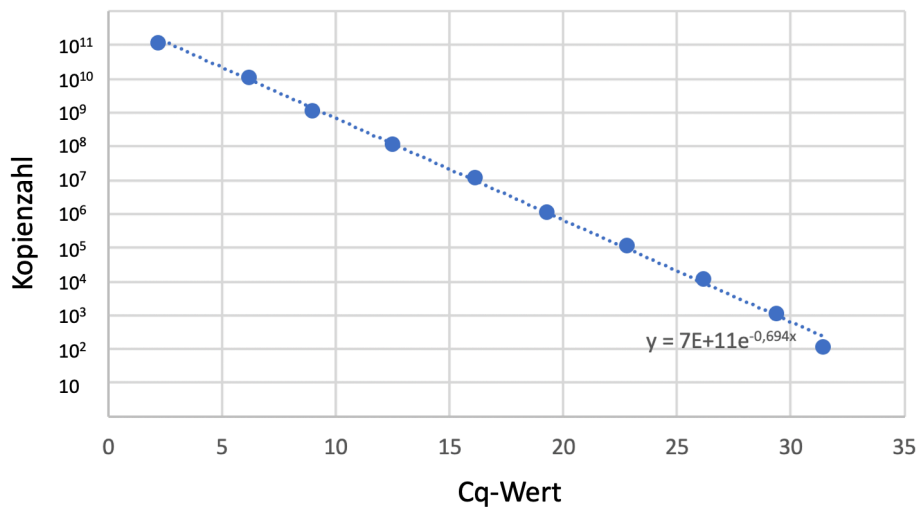


Abbildung 14: Zuordnung von C_q -Wert und Kopienzahl der Verdünnungsreihe von *cagP*

Die Abbildung zeigt ein Punktdiagramm mit Regressionsgrade, welches die C_q -Werte der Verdünnungsreihe eines PCR-amplifizierten *cagP*-Genfragments auf der X-Achse und die entsprechende Kopienzahl auf der Y-Achse darstellt. Die Kopienzahl der unverdünnten Probe wurde anhand der obenstehenden Formel errechnet. Zur Berechnung der *cagP*-Transkript-Kopienzahl wurde die gezeigte Regressionsgeradengleichung verwendet.

Bei der eingesetzten Menge von ca. 50 ng und entsprechender Umrechnung gemäß oben genannter Formel ergeben sich für RNP3 ohne AGS Zellkontakt (türkisfarbene Kurve mit einem C_q -Wert von 24,03 in Abbildung 13) nur ca. 40000 Transkriptkopien für *cagP*. Der C_q -Wert für die Probe mit AGS Zellkontakt (rote Kurve in Abbildung 13 mit $C_q = 29,14$) entspricht nur ca. 1000 *cagP* Transkriptkopien.

Derart geringe Transkriptionsmengen machen die Entwicklung alternativer Reportersysteme erforderlich, um aussagekräftige Genexpressionsanalysen durchzuführen zu können.

4.3. Entwicklung eines *cagP*-Reportersystems für Genexpressionsanalysen

Um den Einfluss verschiedener Versuchsbedingungen auf die Expression von *cagP* zu erforschen, wird ein adäquates *cagP*-Reportersystems benötigt.

Die bisherige Literatur zu *cagP* sowie die oben aufgeführten Ergebnisse legen nahe, dass *cagP*, wenn überhaupt, nur in äußerst geringen Mengen exprimiert wird. Im natürlichen Genlocus von *cagP* kommt keine Konsensus-*Shine-Dalgarno*(SD)-Sequenz vor. Eine Konsensus-SD-Sequenz, wie sie beispielsweise im *upstream*-Bereich von *cagA* vorzufinden ist, ermöglicht eine effektive ribosomale Bindung und somit eine Translation der mRNA. Die im Folgenden besprochenen Reporterstämme wurden deshalb stets in zwei Varianten entwickelt. Für die erste Variante wurde der originale *cagP-upstream* Bereich (mit einer schwachen *cagP*-SD-Sequenz) belassen. Um eine stärkere Produktion des Reporters zu ermöglichen, wurde alternativ eine Version mit dem *upstream*-Bereich von *cagA* hergestellt. In dieser zweiten Variante wurde der *cagP-upstream* Bereich gegen 13 bp des *cagA-upstream* Bereichs ausgetauscht und somit künstlich mit einer starken SD-Sequenz versehen. Als *cagP*-Reporter wurden zunächst Konstrukte mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und auch mit einer autonom biolumineszierenden Luciferase (LuxCDABE) entworfen.

4.3.1. LUX-Reporter

Es wurde zunächst versucht, einen *cagP*-Reporter mittels Klonierung des *luxCDABE* Operons - eines autonom biolumineszierenden Luciferasesystems des Bakteriums *Photobacterium luminescens* - herzustellen. Das *lux*-Operon besteht aus fünf Genen, welche alle für die Lichtproduktion nötigen Proteine kodieren (Abbildung 15). Die Gesamtlänge des *lux*-Operons beträgt 5800 bp.

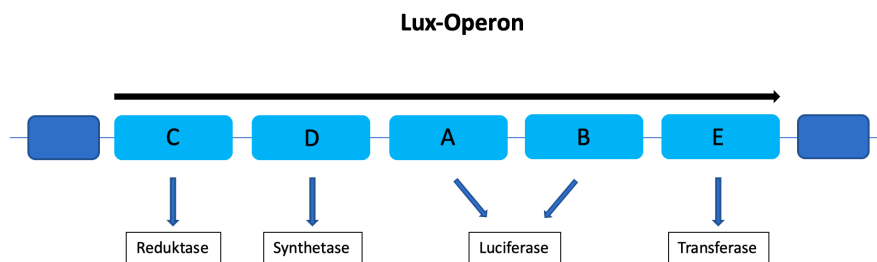


Abbildung 15: Aufbau des *LuxCDABE*-Operons

Das in dieser Arbeit verwendete *Lux*-Operon des Bakteriums *Photobacterium luminescens* ist 5800bp lang und umfasst die 5 Gene CDABE, welche die Proteine für die Biolumineszenz kodieren.

Biolumineszierende Bakterien nutzen FMNH_2 als Luciferin (reduziertes Flavinmononukleotid), welches während der Reaktion ein Photon aussendet. Im selben Zug wird ein Aldehyd zu Säure oxidiert. Die Untereinheiten *luxA* und *luxB* codieren die Luciferase, während die anderen Untereinheiten *luxCDE* Proteine für die Rückreduktion der Carbonsäuren codieren [50, 51]. Das *luxCDABE* Operon wurde zusammen mit einer Chloramphenicol-Resistenzkassette zwischen die das *cagP*-Gen flankierenden Gene *cagQ* und *cagM* kloniert (Abbildung 16).

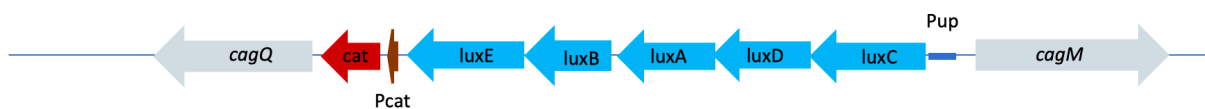


Abbildung 16: pSL1 mit *luxCDABE* Operon

Die Abbildung zeigt das *LuxCDABE* Operon, zusammen mit einer Chloramphenicol-Resistenzkassette, eingebettet zwischen den flankierenden Regionen *cagM* und *cagQ* im Plasmid pSL1 mit einem *cagP*-upstream-Bereich mit einer schwachen SD Sequenz (Pup). Eine zweite Variante wurde mit einem *cagA*-upstream-Bereich mit einer starken SD Sequenz vor dem *lux*-Operon kloniert (pSL2).

Trotz mehrerer Versuche, unter anderem mittels Elektroporation und dem Einsatz größerer Plasmidmengen, ließen sich jedoch weder pSL1 (*cagP*-upstream Bereich mit schwacher SD Sequenz) noch pSL2 (*cagA*-upstream Bereich mit starker SD Sequenz) in das Bakterium *H. pylori* transformieren. Ursächlich hierfür könnte unter anderem die Plasmidgröße sein, die bedingt, dass das Plasmid nicht effizient von *H. pylori* aufgenommen oder ins Genom eingebaut werden kann.

4.3.2. GFP-Reporter

Nachdem der LUX-Reporter fehlgeschlagen war, wurde ein GFP-Reporter hergestellt. Hierbei wurde *cagP* durch *gfp*, gefolgt von einer *cat*-Kassette, ersetzt. Abbildung 17 stellt die Klonierung für den Stamm SL 01 dar.

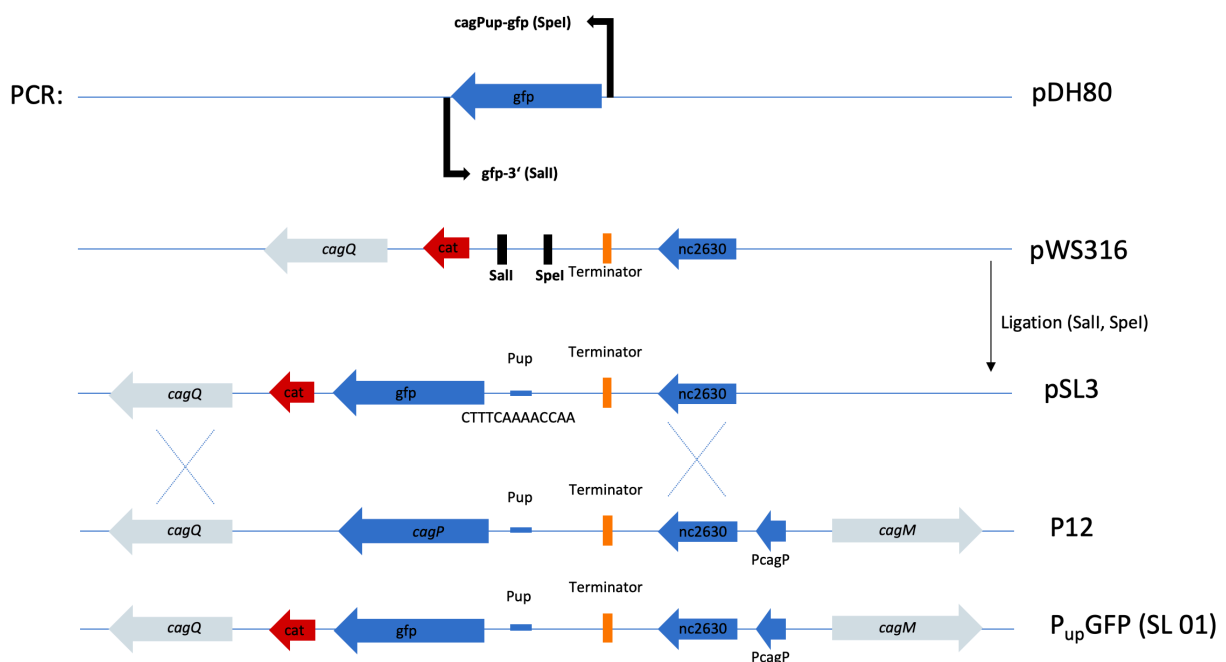


Abbildung 17: Klonierungsschema für SL 01 (PupGFP)

Die Abbildung zeigt das Klonierungsschema für den Stamm SL 01 (PupGFP). Die Amplifikation des *gfp*-Gen erfolgte aus dem Plasmid pDH80 mit den Primern *cagPup-gfp* und *gfp-3'*. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Sall* und *SpeI* in das Plasmid pWS316 eingebaut. Über eine Transformation in den chemisch kompetenten *E. coli* Stamm TOP 10 wurde das neue Plasmid pSL3 gewonnen. Dieses wurde in den Wildtypstamm P12 transformiert und das Konstrukt über homologe Rekombination in das Genom des *H. pylori* aufgenommen. Die Klonierung von SL 02 erfolgte analog und unterscheidet sich lediglich im 5' Primer für die Amplifikation des *gfp*-Gens (Primer für SL 02: *cagAup-gfp (speI)*).

Das *gfp*-Gen wurde aus dem Plasmid pDH80 mit den Primern *cagPup-gfp* (SL 01) bzw. *cagAup-gfp* (SL 02) und *gfp-3'* amplifiziert. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Sall* und *SpeI* in das Plasmid pWS316 in den Genlocus von *cagP* ligiert. Es entstanden die Plasmide

pSL3 (Pup-gfp) und pSL5 (Aup-gfp). Mittels homologer Rekombination wurden die neuen Konstrukte in das Genom des Wildtypstammes P12 aufgenommen. Hieraus entstanden die Stämme SL 01 mit einem *cagP-upstream*-Bereich mit einer schwachen SD Sequenz und der Stamm SL 02 mit einem *cagA-upstream*-Bereich mit einer starken SD Sequenz vor dem *gfp* Gen, um ein möglichst sensitives *cagP*-Reportersystem zu erhalten (Abbildung 18).

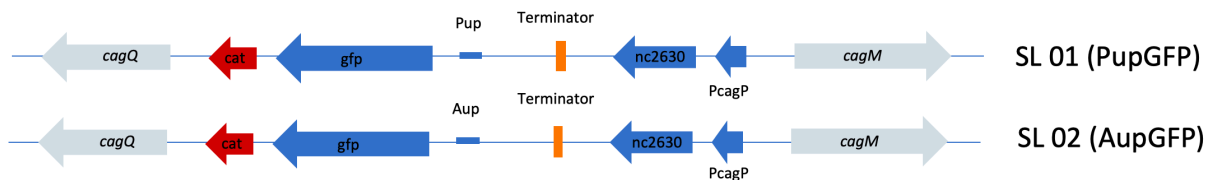


Abbildung 18: Genlocus des *gfp* Gens in den Stämmen SL 01 und SL 02

Die Plasmide pSL3 (Pupgfp) und pSL5 (Aupgfp) wurden in den Wildtypstamm P12 transformiert. Die Abbildung zeigt den Genlocus des *cagP*-Gens in den Stämmen SL 01 (PupGFP) und SL 02 (AupGFP).

Zur Untersuchung der GFP-Produktion wurden Bakterienlysate der Stämme SL 01 und SL 02 hergestellt und mittels Western-Blots analysiert. Bei der Auswertung der Western-Blots wurde für den Stamm SL 01 eine Bande mit einer Größe von ca. 27 kDa nachgewiesen, was der erwarteten Größe des GFP entspricht und mit der Bande der Positivkontrolle (P12 GFP) übereinstimmt. Im Gegensatz dazu wurde für den Stamm SL 02 keine entsprechende Bande detektiert. Als Negativkontrolle diente der Wildtypstamm P12 (Abbildung 19).

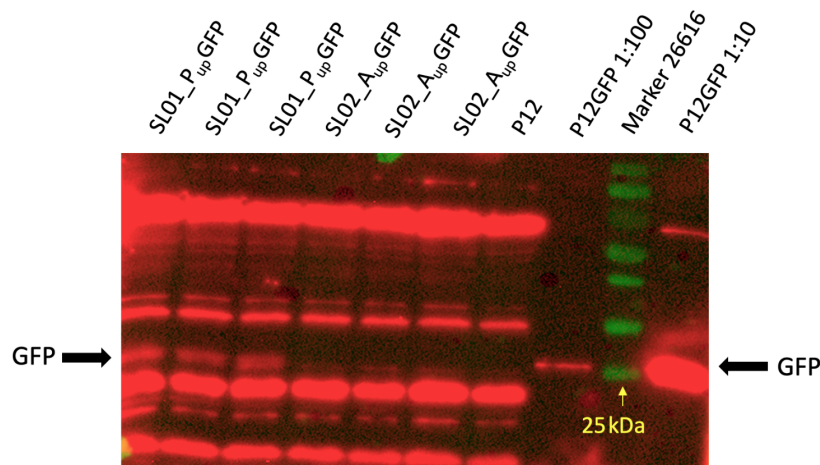


Abbildung 19: GFP Expressionsanalyse der Stämme SL 01 und SL 02

Um die Produktion von GFP in den Stämmen SL 01 und SL 02 zu untersuchen, wurden Bakterienlysate der genannten Stämme erstellt. Diese wurden mittels SDS Gelelektrophorese und Western-Blot auf GFP untersucht. 1.AK: α GFP; 2.AK: α -Maus IgG-POX (Peroxidase Antikörper). Als Negativkontrolle diente der Wildtypstamm P12, als Positivkontrolle diente der Stamm P12GFP (GFP im *cagA* Locus). SL 01 zeigt eine 27 kDa-Bande, die der erwarteten GFP-Größe entspricht und auf Höhe der Positivkontrolle liegt. Für SL 02 wurde keine entsprechende Bande detektiert. Marker: *Prestained Proteinmarker 26616 Thermo Fisher Scientific*

Mit dem Ziel eine höhere Sensitivität für den *cagP* Reporter zu erreichen, wurden weitere Klonierungen vorgenommen, bei denen zum einen der mutmaßliche Terminator und zum anderen die kleine RNA *HPnc2630* mitsamt dem Terminator entfernt wurden (Abbildung 20).

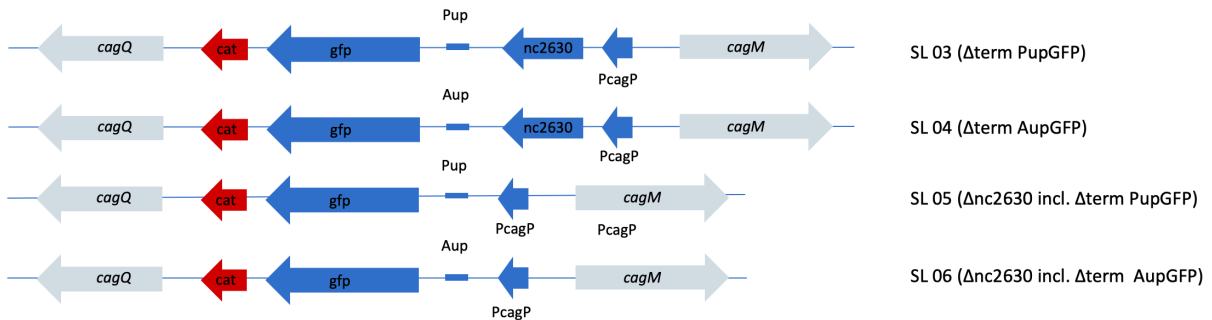


Abbildung 20: Genlocus des *cagP*-Gens in den Stämmen SL 03, SL 04, SL 05 und SL 06

Zur Herstellung von GFP-Reporter-Konstrukten (mit *cagP*- und *cagA*-upstream-Bereich) ohne Terminator wurde das Plasmid pSMART-HP-5kb05_J10 als Vorlage für eine PCR mit den Primern WS816 und WS817 verwendet. Nach Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte ein Verdau mit den Restriktionsenzymen SpeI und XhoI. Die Plasmide pSL3 (Pup-gfp) und pSL5 (Aup-gfp) wurden ebenfalls mit SpeI und XhoI verdaut und anschließend mit dem zuvor gewonnenen PCR Produkt ligiert, was zu den Plasmiden pSL7 und pSL8 führte. Zur Herstellung der Stämme SL 05 und SL 06 wurde anstelle des Primers WS816 der Primer WS825 verwendet, wodurch die Plasmide pSL9 und pSL10 entstanden. Die Plasmide pSL7, pSL8, pSL9 und pSL10 wurden zunächst in den *E. coli* Stamm TOP 10 transformiert und anschließend selektiert und präpariert. Daraufhin erfolgte die Transformation in den *H. pylori* Wildtypstamm P12. Es entstanden die Stämme SL 03, SL 04, SL 05 und SL 06.

Zur Untersuchung der GFP-Produktion der Stämme SL 03, SL 04, SL 05 und SL 06 wurden Ganzzelllysate erstellt und mittels SDS-Gelelektrophorese sowie Western-Blots unter Verwendung der Antikörper α GFP und α -Maus IgG-POX analysiert. Der Nachweis einer GFP Bande konnte nur für die Stämme SL 03 (Δ term, Pup-GFP) und SL 06 (Δ nc2630, Aup-GFP) erbracht werden. Bei den Stämmen SL 04 (Δ term, Aup-GFP) und SL 05 (Δ nc2630, Pup-GFP) konnte im Western-Blot kein GFP nachgewiesen werden (Abbildung 21).

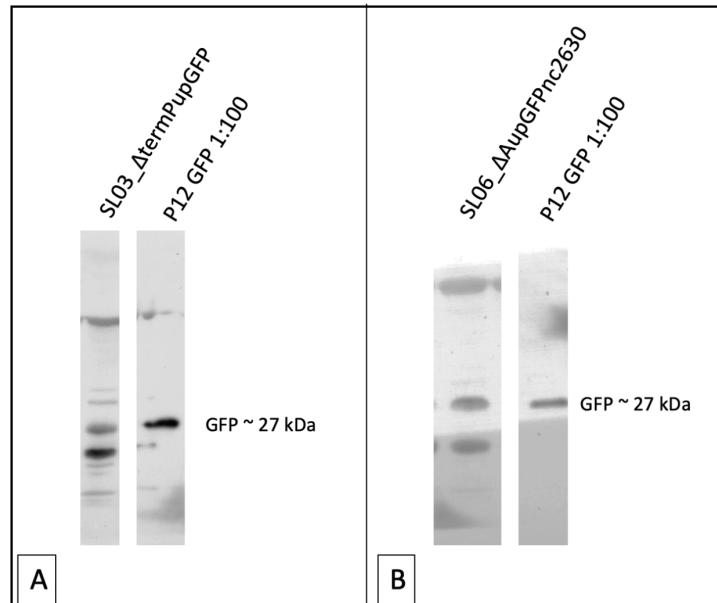


Abbildung 21: GFP-Detektion in den Stämmen SL 03 und SL 06

Um die GFP-Produktion in den Stämmen SL 03, SL 04, SL 05 und SL 06 zu untersuchen, wurden Ganzzelllysate erstellt. Es erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese und Western-Blots unter Verwendung der Antikörper α GFP und α -Maus IgG-POX. Die Entwicklung erfolgte auf einem Röntgenfilm mit einer Dauer von 8 Minuten. GFP-Banden konnten ausschließlich in den Stämmen SL 03 ($\Delta term$, Pup-GFP) und SL 06 ($\Delta nc2630$, Aup-GFP) nachgewiesen werden. In den Stämmen SL 04 ($\Delta term$, Aup-GFP) und SL 05 ($\Delta nc2630$, Pup-GFP) konnte im Western-Blot keine GFP-Bande festgestellt werden. Der vollständige Western-Blot ist im Anhang verfügbar.

Die GFP-Reporterstämme wurden zudem im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es konnte jedoch keine eindeutige grüne Fluoreszenz beobachtet werden. Der einzige Stamm, bei dem eine leichte Fluoreszenz zu sehen war, war der Stamm SL 03 ($\Delta term$, Pup-GFP) (Abbildung 22).

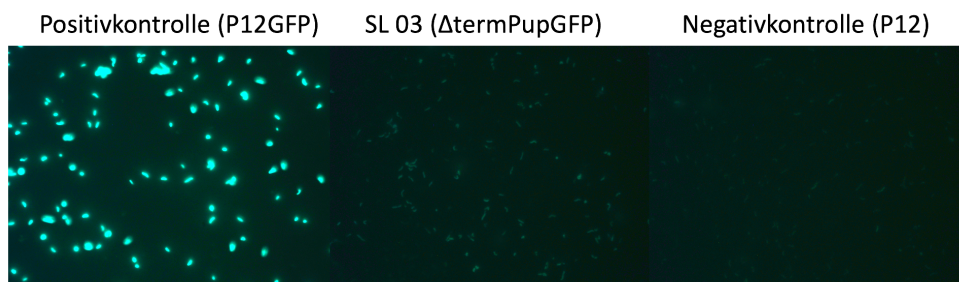


Abbildung 22: Fluoreszenz von SL03

Um GFP nachzuweisen, wurden die Reporterstämme im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierzu wurden die Bakterien von LB-Agar-Platten mit einem Wattestäbchen in PBS aufgenommen und auf einen Objektträger gegeben. Die Proben wurden mit UV-Strahlung angeregt und im Fluoreszenzmikroskop (Leica) inspiziert. Es wurde jedoch lediglich bei dem Stamm SL 03 eine schwache grüne Fluoreszenz festgestellt (Bildmitte). Positivkontrolle: P12GFP (links), Negativkontrolle: P12 (rechts).

Um die Fluoreszenz der rekombinant hergestellten GFP-Reporterstämme weiter zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse (FACS) verwendet. Als Positivkontrolle diente der P12 GFP-Stamm, als Negativkontrolle diente der P12 WT. Die Anregung erfolgte mithilfe eines 488 nm Lasers und die Messung fand im grünen Spektrum statt, wobei die Einstellung für das grüne Fluorophor "Fluoresceinisothiocyanat" (FITC) mit einem Emissionsmaximum bei 525 nm gewählt wurde. Für jede Probe wurden 10.000 Zellen erfasst. Jedoch konnte in keiner der Proben GFP detektiert werden, einschließlich der Probe des Stammes SL 03 (Δ term, Pup-GFP), der hier exemplarisch und stellvertretend für die anderen rekombinant hergestellten GFP-Reporter dargestellt ist (Abbildung 23).

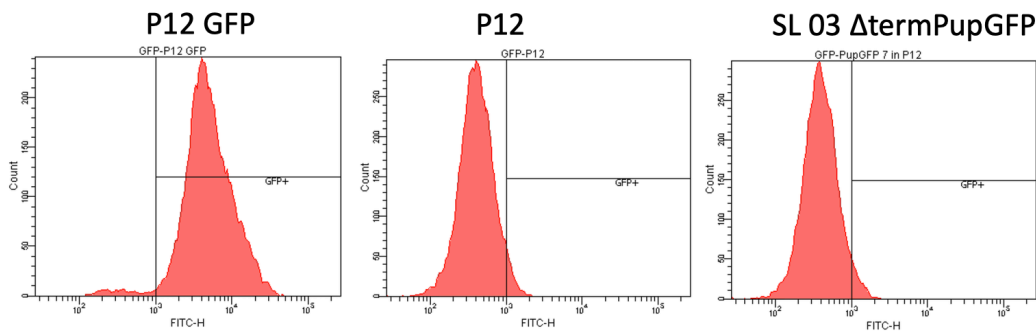


Abbildung 23: Fluoreszenzmessung der GFP Stämme in der Durchflusszytometrie

Um die GFP-Reporterstämme weiter auf Fluoreszenz zu überprüfen, wurden die Bakterien der GFP-Teststämme mit einer OD₅₅₀ 0,2 in 200 μ l DPBS suspendiert, zur Analyse im FACSCantoII™ (BD Biosciences) getestet und mit der Software FACSDiva ausgewertet. Die Anregung erfolgte bei 488 nm mit einem Emissionsmaximum bei 525 nm. Von jeder Probe wurden 10.000 Zellen getestet. Jedoch konnte in keiner der Proben GFP nachgewiesen werden. Die Abbildung zeigt die Auswertung des Teststammes SL 03, wobei die restlichen Teststämme identische Ergebnisse liefern. Positivkontrolle: P12 GFP; Negativkontrolle: P12 WT.

Um die GFP-Reporterstämme fluoreszenzphotometrisch zu untersuchen, wurden diese in PBS suspendiert und im Fluoreszenzphotometer bei 488 nm gemessen. Keiner der sechs GFP-Reporter-Varianten wies hierbei eine eindeutige, gut messbare Fluoreszenz auf (Abbildung 24).

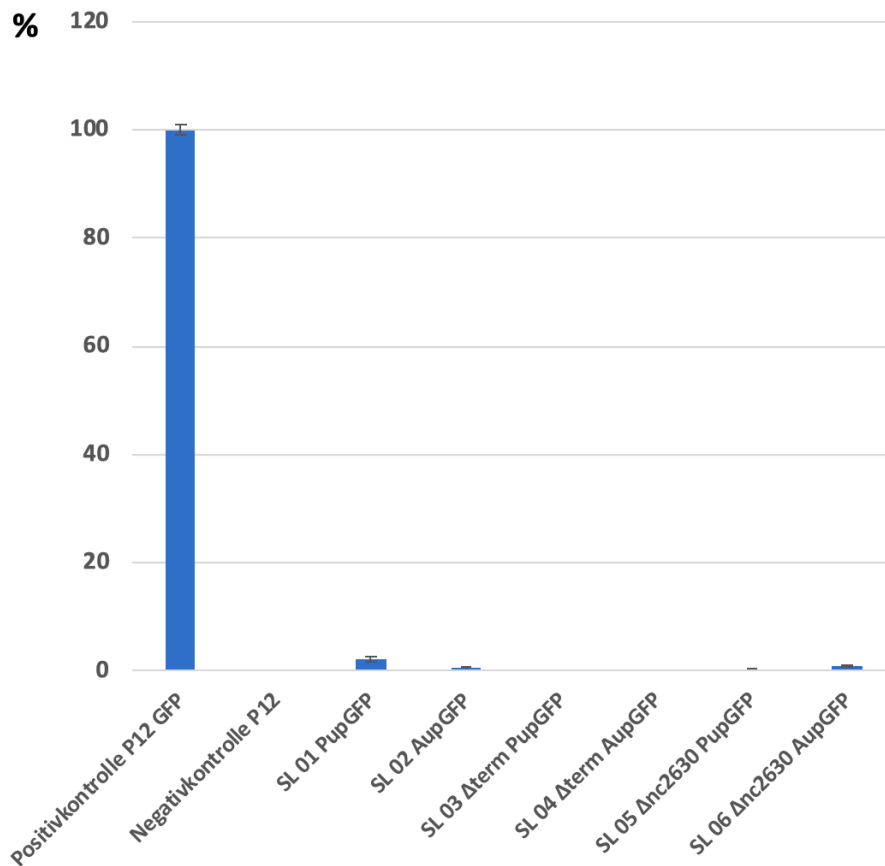


Abbildung 24: Fluoreszenzmessung der GFP Stämme mittels Fluoreszenzphotometer

Die Abbildung 24 zeigt ein Balkendiagramm, das die Ergebnisse einer Fluoreszenzmessung der GFP-Teststämme in % der Positivkontrolle (P12GFP) angibt, wobei die Positivkontrolle auf 100% gesetzt wurde. Als Negativkontrolle diente der P12 WT Stamm. Dieser wurde auf 0% festgelegt. Zur fluoreszenzphotometrischen Untersuchung der GFP-Reporterstämme wurden die entsprechenden Stämme in PBS suspendiert. Im Fluoreszenzphotometer (*ClarioStar*) wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm gemessen. Bei keiner der sechs GFP-Reporter-Varianten konnte eine eindeutige Fluoreszenz festgestellt werden.

Die uneinheitlichen Nachweise von GFP im WB zusammen mit den Ergebnissen aus der Fluoreszenzmikroskopie und aus der FACS-Analyse legen insgesamt nahe, dass der GFP Reporter eine zu geringe Sensitivität aufweist. Folglich kann geschlossen werden, dass der GFP-Reporter für *cagP*-Expressionsanalysen nicht geeignet ist. Das im Western-Blot detektierte GFP bestätigt jedoch grundsätzlich die Aktivität des *cagP* Promotors.

Aufgrund dieser Ergebnisse schien es zum Erreichen des Ziels dieser Arbeit vielversprechender, ein alternatives Reportersystem zu entwickeln, welches für *cagP* Gen-Expressionsanalysen in einem Photometer sensitiv genug ist.

4.3.3. NanoLuc HiBiT *cagP*-Reporter

Nachdem weder der LUX- noch der GFP-Reporter zielführend waren, wurde ein NanoLuc-Reportersystem etabliert. Die NanoLuc-Luciferase erwies sich im Vergleich zu verschiedenen Luciferasen als am stabilsten und mit ihrer besonders hohen Signal-Intensität mit Abstand als am sensibelsten [52].

Das *Nano-Glo HiBiT Blotting System* von Promega besteht aus zwei NanoLuc-Fragmenten, dem HiBiT-Fragment, einem 11-Aminosäuren langen Peptid, welches einem Zielprotein an beliebiger Stelle als *Tag* angehängt werden kann, und dem LgBiT Protein, welches an das HiBiT-Fragment bindet. Gemeinsam bilden das HiBiT und das LgBiT einen (NanoLuc-)Luciferase-Komplex. Dieser setzt Furimazin in Furimamid um. Während dieses Prozesses wird Licht emittiert. Die Lumineszenz wird bei 460 nm gemessen (Abbildung 25).

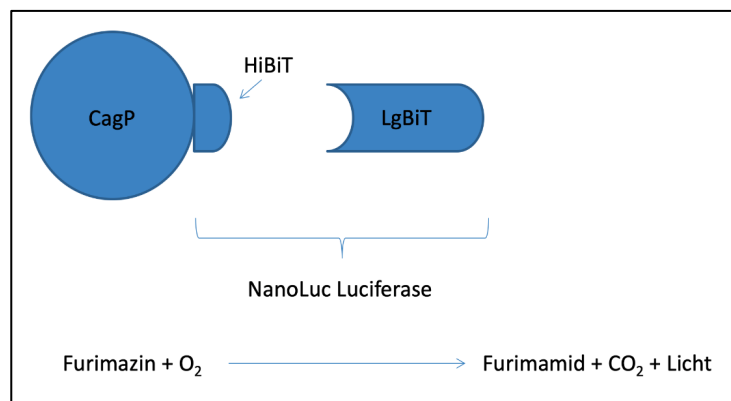


Abbildung 25: NanoLuc Luciferase

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus des NanoLuc HiBiT *cagP*-Reporters. Das HiBiT-Fragment besteht aus 11 Aminosäuren und ist dem CagP-Protein als *Tag* angehängt. Dieses bildet zusammen mit dem LgBiT einen NanoLuc-Luciferase-Komplex, der Furimazin zu Furimamid umsetzt und dabei Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm emittiert.

Zur Detektion des CagP-Proteins wurde dieses mit einem HiBiT-*Tag* fusioniert. Die kodierende Sequenz findet sich hierbei am 5'-Ende des *cagP*-Gens. Die Herstellung des Stammes SL 13 (PupHiBit MF) erfolgte entsprechend dem Klonierungsschema in Abbildung 26. Die PCR erfolgte mit den Primern WS 218 und WS 823. Als PCR Template diente das Genbankplasmid pSMART-HP-5kb05_J10. Die Ligation erfolgte über die Restriktionsstellen *SphI* und *SpeI* ebenfalls mit dem Plasmid pSMART-HP-5kb05_J10. Das daraus resultierende Plasmid pSL11 wurde in den *H. pylori* Stamm P12Str(pWS503) transformiert. Im Rahmen dieser

Transformation wurde somit eine *rpsL-erm* Kassette durch *cagP* mitsamt *HiBiT-Tag* ohne Einbau eines weiteren Resistenzgens (MF: markerfreier Austausch) ersetzt (Abbildung 26).

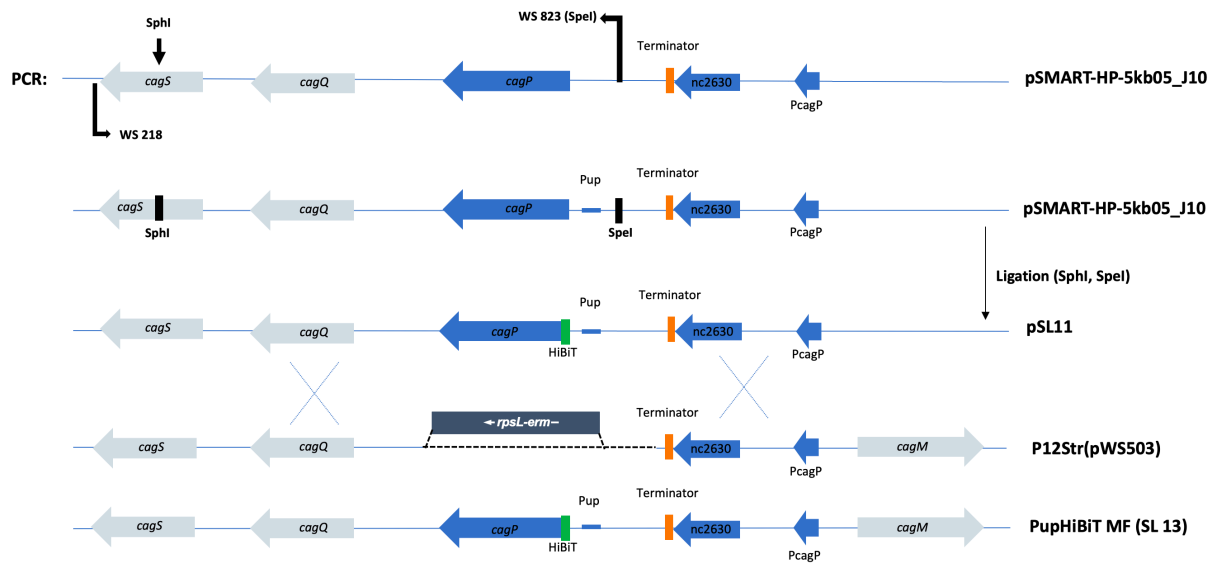


Abbildung 26: Klonierungsschema SL 13

Die Abbildung zeigt das Klonierungsschema für den Stamm SL 13 (PupHiBiT MF). Um den entsprechenden PupHiBiT-Tag zu erhalten, wurde der Primer WS 823 hergestellt. Die Amplifikation erfolgte mit den Primern WS 823 und WS 218, wobei das Plasmid pSMART-HP-5kb05_J10 als PCR-Template diente. Das resultierende Amplicon wurde über die Restriktionsschnittstellen SpeI und SphI in das Plasmid pSMART-HP-5kb05_J10 ligiert. Anschließend erfolgte eine Transformation in den chemisch kompetenten E. coli Stamm TOP 10. Das neu hergestellte Plasmid pSL11 wurde in den Stamm P12Str(pWS503) transformiert und das neue Genkonstrukt wurde über homologe Rekombination in das Genom des *H. pylori* aufgenommen. MF: Markerfrei

Die Klonierung von SL 14 (AupHiBiT MF) erfolgte analog zur Klonierung von SL 13 (Abbildung 26). Jedoch wurde anstelle des Primers WS 823 der Primer WS 824 verwendet und das Plasmid pSL13 gewonnen. PSL13 wurde wiederum in den Stamm P12Str(pWS503) transformiert um den Stamm SL 14 herzustellen. Die Stämme wurden per Sequenzierung überprüft. Der Genlocus des *HiBiT-cagP* ist in Abbildung 27 dargestellt.

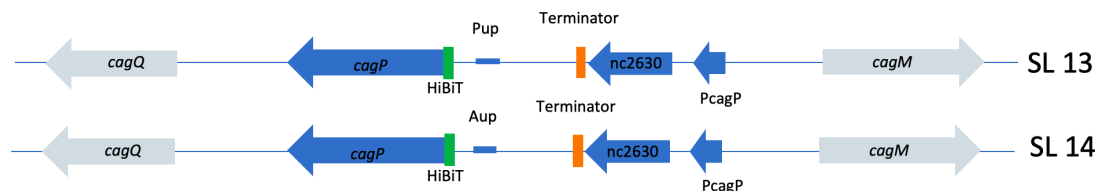


Abbildung 27 Genlocus des *HiBiT-cagP* in den Stämmen SL13 und SL14

Die Plasmide pSL11 (PupHiBiTcagP) und pSL13 (AupHiBiTcagP) wurden in den Stamm P12Str(pWS503) transformiert. Die Abbildung zeigt den Genlocus des *cagP*-Gens in den Stämmen SL13 (PupHiBiTcagP) und SL14 (AupHiBiTcagP).

Zur Überprüfung der Funktionalität der neu entwickelten Reporterstämme wurde gemäß der Herstellerangaben ein Western-Blot unter Verwendung des *Nano-Glo HiBiT Blotting System* (Promega) angefertigt. Als Positivkontrolle diente der *cagA* HiBiT Stamm in einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung. Die Größe des HiBiT getaggtten CagA beträgt 135 kDa. Der P12 WT Stamm diente als Negativkontrolle. Bei beiden Klonen des Stammes SL14 (Aup HiBiT *cagP*) erschien eine 15 kDa Bande, entsprechend der vollen vorhergesagten Länge des CagP Proteins. Der Stamm SL13 wies, möglicherweise aufgrund einer zu geringen Sensitivität, keine entsprechende Bande im Western-Blot auf (Abbildung 28). Zusätzlich waren bei den SL14-Klonen noch Signale bei höherem Molekulargewicht zu sehen, welche möglicherweise Multimere des CagP-Proteins darstellen könnten.

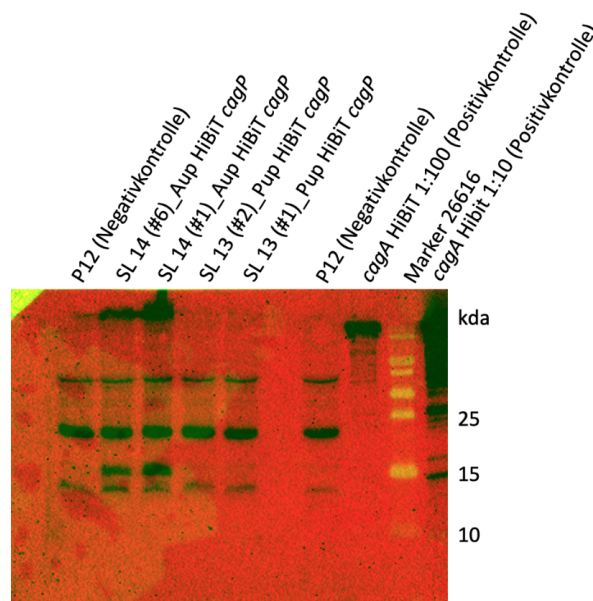


Abbildung 28: HiBiTCagP im Western-Blot

Zur Überprüfung der Funktionalität der neuen Reporterstämme wurde ein Western-Blot unter Verwendung des Nano-Glo HiBiT Blotting Systems gemäß den Herstellerangaben (3.5.3) durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde im ChemiDoc Imager erfasst und mithilfe der ChemiDoc-Software ausgewertet. Bakterienlysate von jeweils zwei Klonen der Stämme SL 13 und SL 14 wurden auf ein HiBiT CagP-Signal untersucht. Als Positivkontrolle diente der Stamm P12(HiBiT-Cag-A) in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 (Größe des CagA-HiBiT: 135 kDa). Der P12 WT Stamm fungierte als Negativkontrolle. Bei beiden Klonen des Stammes SL 14 (Aup HiBiT *cagP*) zeigte sich eine 15 kDa Bande, entsprechend der vollen Länge des CagP Proteins, während der Stamm SL 13 (Pup HiBiT *cagP*) keine entsprechende Bande aufwies. Zur Größenkontrolle wurde der Proteinmarker 26616 von ThermoFisher verwendet.

Um die Funktionalität der Klone SL 13 und SL 14 zu untersuchen, wurde eine Infektion von AGS-Zellen und ein anschließender Tyrosinphosphorylierungs-Assay durchgeführt (Abbildung 29).

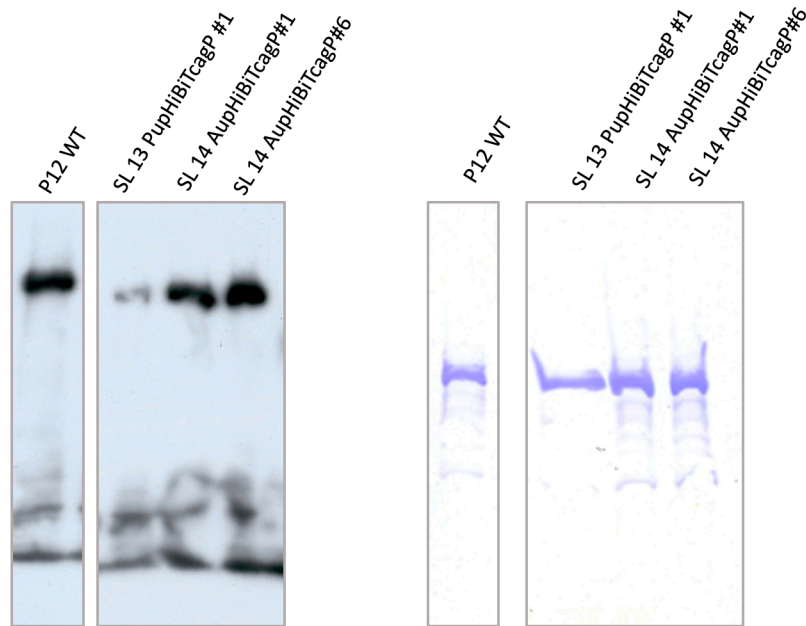


Abbildung 29: Tyrosinphosphorylierung von CagA (li.) und CagA Expression (re.) der Stämme SL13 und SL14

Abbildung 29 zeigt Western-Blots, welche zur Überprüfung der Funktionalität der Klone SL 13 und SL 14 durchgeführt wurden. Die genannten Stämme wurden in Flüssigmedium mit *Brucella Broth* und Cholesterin kultiviert. Es erfolgte eine Infektion mit AGS Zellen. Anschließend wurden Ganzzelllysate hergestellt und mittels SDS Gelelektrophorese und Western-Blot zum einen hinsichtlich der Tyrosinphosphorylierung (AK1: α -p-Tyr (PY99); Ak2: α -Maus IgG-AP) und zum anderen auf die CagA Expression (AK1: α -CagA (AK299); AK2: α -Kaninchen IgG-AP) überprüft. Die HiBiT-Stamminfektion bestätigt die Funktionalität der AupHiBiTcagP-Stamm-Klone in Bezug auf CagA-Expression und -Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu zeigt der getestete PupHiBiTcagP-Stamm SL13 eine verminderte CagA-Phosphorylierung. Gesamter WB im Anhang.

Während eine Infektion mit den HiBiT Stämmen die Funktionalität der Klone des AupHiBiTcagP Stammes SL 14 sowohl hinsichtlich der CagA Expression als auch der CagA Phosphorylierung bestätigt, liegt bei dem getesteten PupHiBiTcagP Stamm SL 13 eine verminderte CagA Phosphorylierung vor, sodass angenommen werden muss, dass dieser Stamm nicht voll funktional und somit nicht repräsentativ verwendbar ist (Abbildung 29).

Da die Klone des AupHiBiTcagP Stammes SL 14 durch die eingefügte SD Sequenz das sonst sehr gering produzierte *cagP* verstärkt exprimieren, wurde dieser Stamm für die folgenden Versuche genutzt, um das Expressionsverhalten von *cagP* unter verschiedenen Testbedingungen zu beobachten.

Während der Western-Blot entsprechend dem Protokoll der Herstellerangaben durchgeführt wurde, wurde das Blotting Kit für Messungen im Fluoreszenzphotometer durch verschiedene Vorversuche für diese Nutzung optimiert (3.6.2). So zeigte sich, dass eine Substratverdünnung von 1:200 gute Ergebnisse liefert. Für die Ansatzmenge stellte sich ein Totalvolumen von 50 μ L pro *Well*, zusammengesetzt aus 25 μ L Bakterien-RIPA Lysat und 25 μ L Reagenz, als funktional und praktikabel heraus. Bezüglich der Aufbewahrung von Proben wurde festgestellt,

dass eine Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ die Messergebnisse stark verfälscht. Als interner Leerwert diente ein *Well* mit RIPA + Reagenz. Außerdem zeigte sich, dass eine 10-minütige Inkubation, entsprechend den Herstellerangaben des *Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System*, bereits deutliche Messwerte liefert. Es wurden vergleichende Messungen nach 90-minütiger Inkubation erhoben (Abbildung 30).

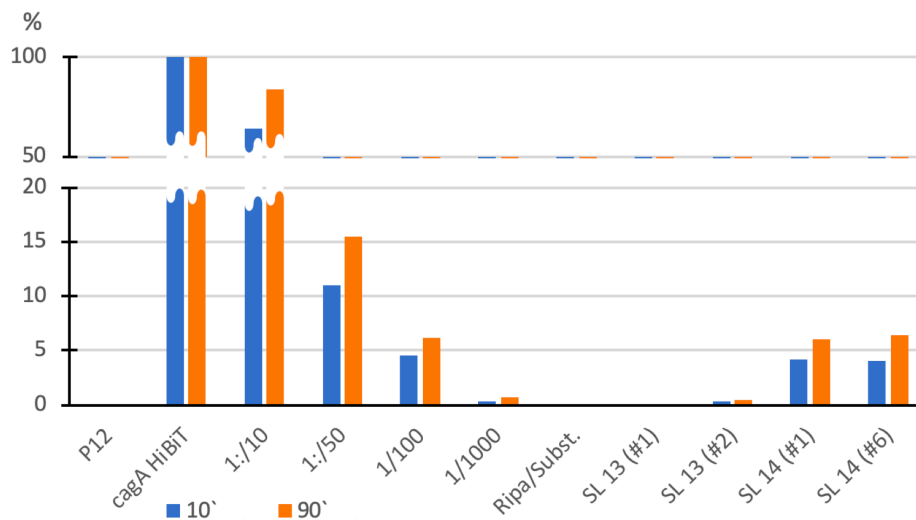


Abbildung 30: HiBiT Reporter: Vergleich verschiedener Inkubationszeiten

Zur Entwicklung eines geeigneten Messprotokolls für Genexpressionsanalysen von *cagP* unter Verwendung des HiBiT Reporters wurden verschiedene Inkubationszeiten verglichen. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm, das die Fluoreszenz im Fluoreszenzphotometer nach einer 10-minütigen Inkubation mit der Fluoreszenz nach einer 90-minütigen Inkubation vergleicht. Dabei wurden $25\text{ }\mu\text{L}$ Bakterien-RIPA-Lysat und $25\text{ }\mu\text{L}$ Reagenz pro Well pipettiert. Als Positivkontrolle diente der *cagA* HiBiT Stamm P12(HiBiT-CagA) in den Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:1000. Zwei Klone der Teststämme SL 13 und SL 14 wurden jeweils aufgetragen sowie ein Well mit RIPA und Substrat ohne Bakterien zur Ermittlung des Leerwerts. Die Messung erfolgte im Fluoreszenzphotometer bei 460 nm . Die Ergebnisse sind in Prozent der unverdünnten Positivkontrolle angegeben und stammen aus einer Versuchsdurchführung. Die Lumineszenz von SL 14 (*AupHiBiTcagP*) entspricht ungefähr der 1:100-Verdünnung der Positivkontrolle. Eine 10-minütige Inkubation liefert bereits deutliche Ergebnisse, wobei die Signalstärke nur minimal hinter einer 90-minütigen Inkubation zurückbleibt.

Die Herstellerangaben des *Nano-Glo HiBiT Blotting System* sehen eine 60-minütige Inkubation vor. Eine längere Inkubationszeit erlaubt zwar eine weitere Signalverstärkung, diese ist jedoch für die in dieser Arbeit beschriebene Versuchskonstellation nicht erforderlich.

Sowohl eine Ultraschallbehandlung als auch die Anwendung von RIPA kamen für die Zellyse in Betracht. Im Vergleich zeigten sich für die Lyse mit RIPA höhere Lumineszenzwerte als bei einer Zellyse mittels Ultraschallbehandlung (Abbildung 31).

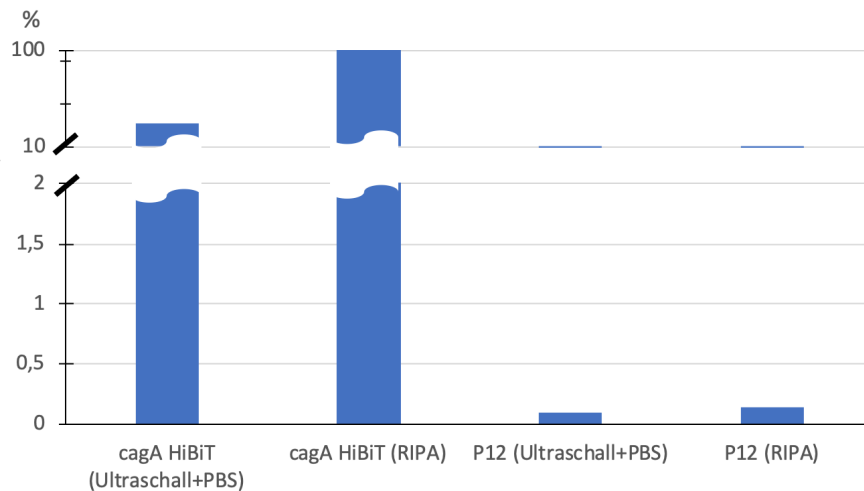


Abbildung 31: HiBiT Reporter: Vergleich verschiedener Lyse-Verfahren

Die Grafik zeigt ein Balkendiagramm mit den Ergebnissen einer Fluoreszenzmessung im Fluoreszenzphotometer (*Clario Star Plate Reader*), das die Signalstärke der getesteten Stämme unter Anwendung verschiedener Lyseverfahren vergleicht. Es erfolgte ein Probeansatz mit einer Zellyse mittels RIPA, wobei für jede Reaktion 25 μ l Bakterien-RIPA-Lysat und 25 μ l Reagenz in einer schwarzen 96-Well-Platte (Costar) kombiniert wurden. Im Vergleich dazu erfolgte ein weiterer Probeansatz mit Zellyse mittels Ultraschallbehandlung. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 460 nm. Die RIPA-Lyse erwies sich als effektiver im Vergleich zur Ultraschall-Lyse. Der P12 Wildtyp-Stamm diente als Negativkontrolle, während der cagA HiBiT-Stamm als Positivkontrolle fungierte und auf 100 % festgelegt wurde. Die Ergebnisse sind in Prozent der Positivkontrolle angegeben und stammen aus einer Versuchsdurchführung.

Um die Sensitivität der neu erstellten HiBiT *cagP*-Reporter genauer zu untersuchen, wurden die Teststämme SL 13 und SL 14 mit je zwei Klonen unter der neu erprobten, optimierten Nutzung des NanoLuc Blotting Kit für Messungen im Fluoreszenzphotometer analysiert. Es wurden 25 μ L Bakterien-RIPA-Lysat und 25 μ L Reagenz pro Well pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten und die Zellyse erfolgte mit RIPA. Die beiden SL 14-Klone zeichneten sich erneut als die signalstärksten HiBiT *cagP*-Reporter aus. Im Gegensatz zum Stamm SL 13 verfügt SL 14 über eine künstlich eingefügte SD-Sequenz. Die gemessene Lumineszenz liegt auch hier im Schnitt leicht unterhalb der 1:100-Verdünnung der HiBiT-*cagA*-Positivkontrolle. Die SL 13-Klone lieferten erneut keine verwertbaren Messungen und verhielten sich wie die P12-Negativkontrolle (Abbildung 32). Als Leerwert diente RIPA mit Substrat ohne Bakterien.

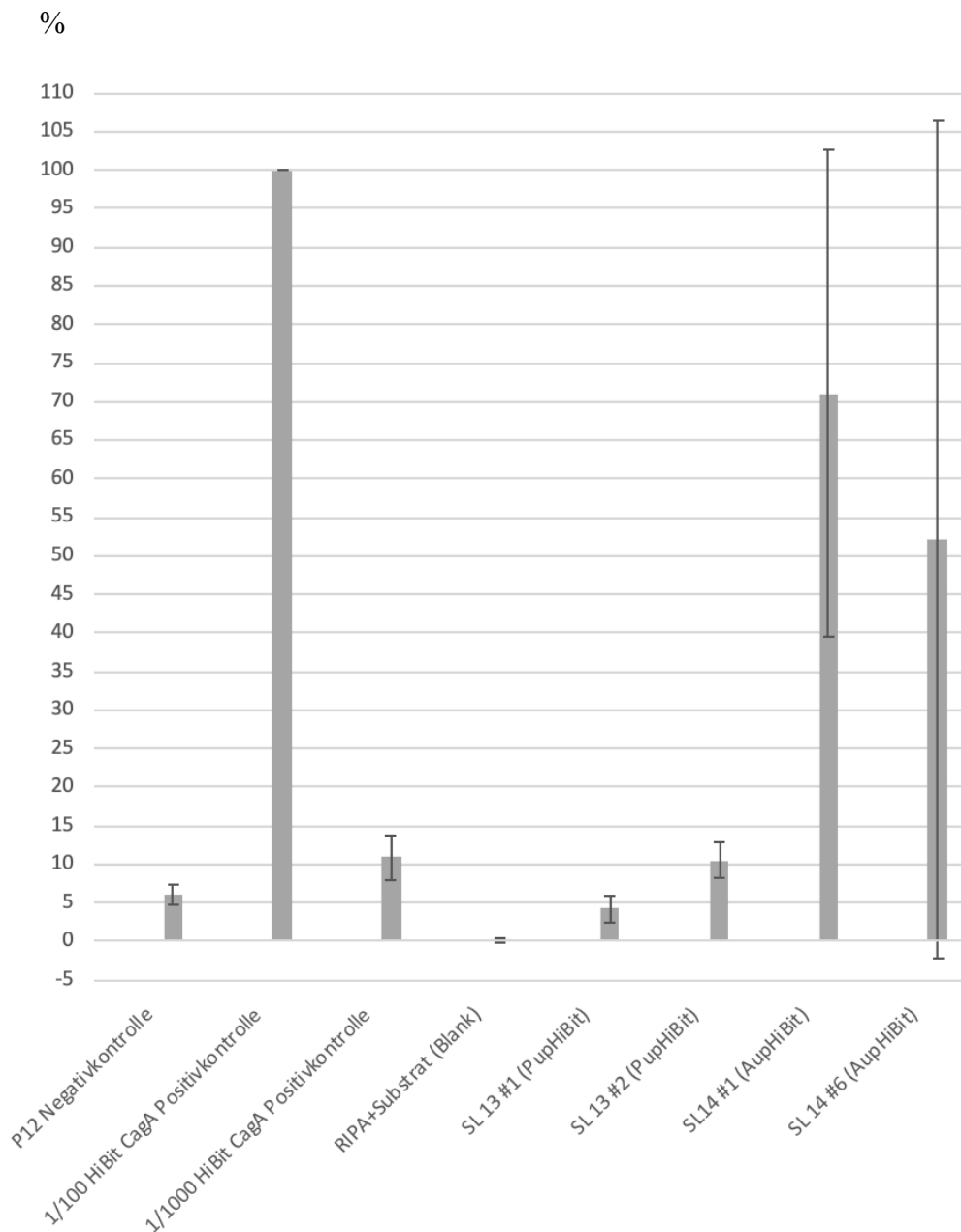


Abbildung 32 Sensitivität des NanoLuc *cagP*-Reporters

Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm, das die Lumineszenz der NanoLuc HiBiT *cagP*-Reporter als Prozentsatz der Positivkontrolle P12(HiBiT-CagA) (=HiBiTCagA 1:100 Verdünnung) darstellt. Je zwei Klone der Teststämme SL 13 und SL 14 wurden untersucht. In die *Wells* wurde Bakterien-RIPA-Lysat mit Substrat pipettiert und es wurde im Fluoreszenzphotometer bei 460 nm gemessen. Der Stamm SL 14 zeigt eine Lumineszenz, die nahezu der 1:100 Verdünnung der Positivkontrolle entspricht. Im Gegensatz dazu verhält sich der Stamm SL 13 ähnlich der Negativkontrolle P12. Als Leerwert (*Blank*) diente ein *Well* mit RIPA und Substrat ohne Bakterien. Die Werte stammen aus zwei Versuchsdurchführungen und sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Naheliegender ist an dieser Stelle, dass auch hier eine *cagP*-Expression des Stammes SL 13, wenn überhaupt, nur in einem so geringen Maße stattfindet, dass auch dieser Reporter ohne verbesserte SD Sequenz unterhalb der Nachweisgrenze für *cagP* liegt. Der Hypothese folgend, dass *cagP* in sehr geringen Mengen exprimiert wird, kann der Stamm SL 14 als repräsentativer

Reporter für die Expression von *cagP* verwendet werden. Zwar kann dieser Reporter nicht zur Ermittlung natürlicher Mengen von CagP dienen, jedoch können Hinweise auf eine eventuell durch externe Bedingungen gesteigerte oder verminderte Transkription und Translation von *cagP* gewonnen werden. Zur Evaluierung des Reportersystems wurden die im Folgenden vorläufigen Experimente zur Genexpression in unterschiedlichen Medien durchgeführt.

Um eine mögliche Induktion oder Reduktion der *cagP*-Expression zu untersuchen, wurden die beiden Klone des Stammes SL 14 gemäß des im Rahmen dieser Arbeit modifizierten HiBiT-Protokolls (3.6.2) zusammen mit verschiedenen Medien getestet. Ansätze erfolgten mit *Brucella Broth* (BB), phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), PBS mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und PBS mit Cholesterin. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Inkubator bei 37°C. Die Experimente lieferten zwar gute und weitgehend reproduzierbare Messwerte, zeigten jedoch keine erkennbare Tendenz einer Induktion oder Reduktion der *cagP*-Expression durch die getesteten Medien (Abbildung 33).

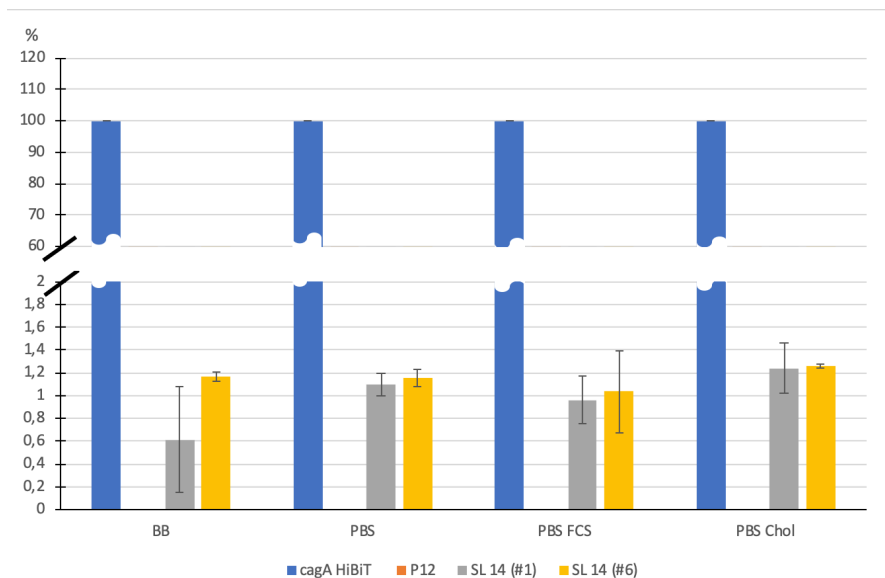


Abbildung 33: Expression von *cagP* in unterschiedlichen Medien

Um das Expressionsverhalten von *cagP* in verschiedenen Wachstumsmedien zu bestimmen, wurden 200 μ l *H. pylori*-Suspension der beiden Klone des Teststammes SL 14 mit einer OD_{550} von 1 zentrifugiert und in 500 μ l des Testmediums (BB, PBS, PBS mit 10% FCS, PBS mit 2 μ l Cholesterin) aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C mit 10% CO₂ auf dem Rüttler mit 120 rpm. Nach einer Zentrifugation wurden die Bakterienpellets in 200 μ l RIPA aufgenommen und gemäß dem HiBiT-Protokoll (3.6.2) im Fluoreszenzphotometer untersucht. Die Werte stammen aus zwei Versuchsdurchführungen und sind als Mittelwert mit Standardabweichung in % der Positivkontrolle angegeben. Als Positivkontrolle diente der Stamm P12(HiBiT-CagA). Als Negativkontrolle diente der P12 Wildtyp-Stamm. Es konnte keine eindeutige Tendenz einer Induktion oder Reduktion der *cagP*-Expression durch die verwendeten Medien gezeigt werden.

5. Diskussion

5.1. Interaktionen von *cagP* mit Genen der *cagPAI*

Vorangegangene unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die Produktion von CagH und CagI bei einer $\Delta cagP$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert ist. Aus der Literatur geht außerdem hervor, dass die Ausbildung der Pili des *Cag*-T4SS durch Wirtszellkontakt induziert wird. Pili konnten fast nur auf adhärenen Bakterien, nicht jedoch auf nicht-adhärenen Bakterien nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sowohl *cagI* als auch *cagL* für die Pilusformation notwendig sind [32].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Western-Blot bestätigt werden, dass eine *cagP*-Deletion in einer deutlich verminderten Expression von *cagH*, *cagI* und *cagL* resultiert. Eine Deletion lediglich der kleinen, nicht kodierenden RNA (*HPnc2630*) hat hierbei keinen Einfluss auf die Expression der drei Gene (Abbildung 5). Es wird angenommen, dass *cagH*, *cagI* und *cagL* an der Pilusbildung beteiligt sind [32]. Führt man die obenstehenden Ergebnisse zusammen, so kann daraus geschlossen werden, dass *cagP* eine regulierende Funktion für *cagH*, *cagI* und *cagL* zukommt. Die genannten Gene sind für die Funktionalität des *Cag*-T4SS essentiell.

Weitere Experimente der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass eine *cagP* Deletion in einer verminderten CagA Translokation resultiert. Dies konnte mittels TEM-Assay bestätigt werden (Abbildung 8) und folglich die Vermutung stützen, dass die Ausbildung der Pili für die Translokation von CagA erforderlich ist. Eine verminderte Expression von *cagH*, *cagI* und *cagL* könnte folglich in einer reduzierten Pilusbildung und somit in einer verringerten CagA Translokation resultieren. Zudem konnte durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine *cagP*-Deletion eine verminderte Tyrosinphosphorylierung des CagA-Proteins (Abbildung 3) sowie eine verringerte IL-8 Induktion in der Wirtszelle zufolge hat. Bei einer $\Delta cagG$ Mutation zeigte sich ebenfalls eine reduzierte *cagI* Expression und eine reduzierte CagA Phosphorylierung (W. Fischer, unveröffentlicht). Entgegen der ursprünglichen Hypothese zeigt sich jedoch kein klarer Einfluss von *cagP* auf die *cagG*-Expression (Abbildung 7).

5.2. Regulation der Gene der CagPAI durch äußere Bedingungen

Die Regulation der Gene der *cagPAI* scheint einem komplexen Zusammenspiel von Genen und äußeren Faktoren zu unterliegen. Joyce et al. (2001) berichten über eine Induktion des *cagP* Promotors durch Epithelzellkontakt. Vannini et al. (2014) konnten eine solche Induktion durch Zellkontakt jedoch nicht bestätigen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivität des *cagP* Promotors mit der aktuellen Wachstumsphase der Bakterienkultur zusammen zu hängen scheint. So wurde beobachtet, dass der *cagP* Promotor in exponentieller Wachstumsphase einer der aktivsten Promotoren der *cagPAI* ist, während seine Aktivität in stationärer Wachstumsphase um nahezu das 8-fache abnimmt [40]. 2018 präsentierten Markus et al. Ergebnisse zur Säureregulierbarkeit einiger *H. pylori* Gene. Es konnten unter anderem auch einige Gene der *cagPAI* durch verminderte pH-Werte induziert werden, wenn auch *cagP* nicht mitgetestet wurde [42]. Auch Sharma et al. (2010) und Vannini et al. (2014) konnten erhöhte Transkriptionsraten einiger *cagPAI* Gene durch Säureinkubation beobachten. Jedoch zeigte die *cagP* Transkriptionsrate keine signifikante Veränderung bei Säurekontakt [38] [40]. Auch die Ausbildung der Pili scheint von Umweltfaktoren beeinflusst zu werden. So begünstigt ein niedriger Eisenspiegel die Pilusbildung, während niedrige Zinkspiegel die Pilusbildung reduzieren [27].

Eine mögliche Erklärung für die Induzierbarkeit des *cagP* Promotors stellt der *Riboswitch* dar. Hierbei handelt es sich um einen molekularen Mechanismus, bei dem Metabolite an untranslatierte Bereiche der mRNA binden und so, ohne dass ein weiteres Protein erforderlich wäre, die Transkription und auch die Translation regulieren können [53]. Es wäre also denkbar, dass der Terminator mit bestimmten Metaboliten interagiert und somit außer Kraft gesetzt wird. Dies würde wiederum bedeuten, dass sich die Expression von *cagP* durch bestimmte Umweltfaktoren, wie sich auch aus oben aufgeführten Ergebnissen vorangegangener Forschungen abzeichnet, induzieren lässt und eine regulatorische Funktion im Cag-Typ-IV-Sekretionssystem einnimmt. Hierbei lässt sich explizit eine Induzierbarkeit sowohl bei Epithelzellkontakt als auch in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase [39] vermuten.

Eine Strukturvorhersage der kleinen, nicht-kodierenden RNA mitsamt dem mutmaßlichen Terminator weist eine stark ausgebildete Stemloop-Struktur auf, von der anzunehmen ist, dass diese als Transkriptionsterminator wirkt. Dies bestärkt die Hypothese, dass eine Transkription von *cagP* vermutlich nur stattfinden kann, wenn der Stemloop aufgelöst und somit eine verlängerte Transkription ermöglicht wird. (Abbildung 34).

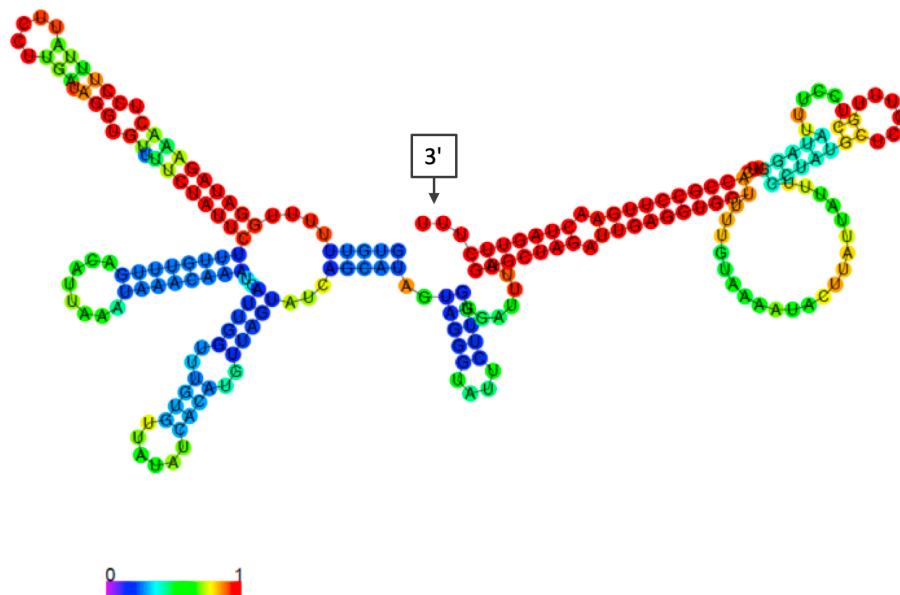


Abbildung 34: Strukturvorhersage der kleinen nicht-kodierenden RNA HPnc2630

Um die RNA-Struktur der kleinen nicht-kodierenden RNA HPnc2630 einschließlich des mutmaßlichen Terminators vorherzusagen, wurde mithilfe des RNAFold WebServers der Universität Wien eine Strukturvorhersage durchgeführt. Es zeigt sich eine stark ausgebildete Stemloop-Struktur (roter Bereich, Mitte bis rechte Bildseite, hohe Vorhersagekraft). Das *cagP*-Transkript beginnt nur wenige Basen stromabwärts des gekennzeichneten 3'-Ende. Es ist anzunehmen, dass die gezeigte Stemloop-Struktur als Transkriptionsterminator wirkt.

Aus den RT-qPCR Ergebnissen der AGS-Zellkontakt-Versuche geht hervor, dass die Transkription von *cagP* bei AGS-Zellkontakt auf ungefähr 1,5% reduziert wird. Es fällt außerdem auf, dass *cagP* auch ohne AGS-Zellkontakt nur in äußerst geringen Mengen transkribiert wird. Entgegen der Ursprungshypothese konnte gezeigt werden, dass Epithelzellkontakt die Transkriptmenge von *cagP* signifikant reduziert ($p < 0,05$). Die Werte von *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL* und *cagG* weisen zu starke Standardabweichungen auf, um sicher beurteilt werden zu können. Sie scheinen in ihrer Transkription jedoch kaum durch den AGS-Zellkontakt beeinflusst zu werden (Abbildung 12).

Die Bindestellen der qPCR Primer für das *cagP*-Gen liegen nahe des 3' Endes (Abbildung 9). Dies lässt darauf schließen, dass eine Transkription des *cagP* Gens vom Startcodon aus

mindestens bis zum 3'-Primer (*cagP_rev*) stattfindet. Die entsprechende Transkriptlänge umfasst 346 Basen. Die Gesamtlänge des *cagP*-Gens beträgt 354 Basen. Es lässt sich daher folgern, dass der Terminator (Abbildung 34) eine Transkription nicht vollständig unterbindet. Es ist möglich, dass die Ergebnisse in Abschnitt 4.2 lediglich einen Bruchteil der Menge an *cagP*-Transkripten widerspiegeln, da kürzere Transkripte nicht erfasst wurden. Vorstellbar wäre, dass bei Kontakt mit AGS-Zellen eine deutlich höhere Transkription von *cagP*, insbesondere des *cagP*-5'-Bereichs, stattfindet. Es ist denkbar, dass ein verstärkter Abbau der *cagP*-mRNA oder ein vorzeitiger Transkriptionsabbruch von *cagP* stattfindet. Die hohen Fehlerbalken in Abbildung 12, insbesondere für *cagP*, könnten auf die geringe Menge an erfasstem Transkript zurückzuführen sein.

Da *cagP* für die vollständige Expression von *cagI*, *cagH* und *cagL* erforderlich ist, diese Gene wiederum essentiell für die Pilusbildung sind und *H. pylori* erst bei Zellkontakt Pili ausbildet [32], liegt die Vermutung auf der Hand, dass der Mechanismus der Typ IV-Sekretion unter anderem auch von *cagP* abhängig ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass *cagP* für das Cag-T4SS eine regulatorische Funktion einnimmt und zur Pathogenität des *H. pylori* beiträgt.

Aus der Literatur geht hervor, dass die Expression von *cagP* äußerst gering ausfällt. Frühere Arbeiten befassen sich in diesem Zusammenhang bereits mit der Rolle des Transkriptionsterminators. Mittels Northern Blot konnte gezeigt werden, dass die Transkription hinter dem mutmaßlichen Terminator wesentlich geringer ausfällt als vor dem Terminator. Ein *cagP* Transkript am 3' Ende konnte kaum noch nachgewiesen werden. Es wurde geschlussfolgert, dass ein CagP Protein in voller Länge – wenn überhaupt – nur in sehr geringen Mengen produziert wird (Vannini et al., 2016). Weiteren Quellen ist zu entnehmen, dass *cagP* im Vergleich zu den anderen Genen der *cagPAI* am wenigsten transkribiert wird [43, 44].

Dass der *cagP* Promotor dennoch sehr aktiv ist, konnte durch eine sehr hohe Transkription der kleinen nicht kodierenden RNA *HPnc2630* nachgewiesen werden. Diese ist allerdings stromaufwärts des Terminators lokalisiert [38]. Auch eine andere Arbeit konnte zeigen, dass der *cagP* Promotor einer der aktivsten der *cagPAI* ist [40].

Im Rahmen der hier durchgeführten RT-qPCR konnte ein indirekter Nachweis für ein nahezu vollständiges *cagP* Transkript erbracht werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Transkription bis zum *cagP*-Stopcodon fortgesetzt wird. Dies wurde jedoch, bedingt durch die im Rahmen dieser qPCR genutzten Primer, nicht gezeigt. In der bisherigen Literatur wurde bisher stets auf kürzere Transkripte geschlossen und eine vollständige Transkription des Gens

in Frage gestellt (4.2). Außerdem konnte das CagP-Protein mit der vorhergesagten Größe in einem HiBiT-Blot identifiziert werden. Dies gelang allerdings nur in den Proben des Stammes SL 14, welcher über die SD-Sequenz des *cagA*-Gens verfügt (Abbildung 28). In seinem natürlichen Genlocus verfügt das *cagP*-Gen nur über eine schwache SD-Sequenz, die vermutlich nur ineffizient zur ribosomalen Bindung der mRNA beiträgt. In einem vorherigen Experiment konnte im Western-Blot ebenfalls ein mit einem *Myc-Tag* versehenes CagP-Protein nachgewiesen werden, wenn das Gen stromabwärts des *cagA* Promotors mit dessen SD-Sequenz kloniert wurde. Dieser Nachweis konnte jedoch ausschließlich für Stämme mit *myc-Tag* am 5'Ende des *cagP* erbracht werden. Stämme mit einem *myc-Tag* am 3'Ende lieferten keine Bande im Western-Blot (E. Weiss und W. Fischer, unveröffentlicht). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die Expression von *cagP* gegebenenfalls vorher abbricht. Es lässt sich folgern, dass eine Produktion des CagP-Proteins aus seinem natürlichen Genlocus, trotz hoch aktivem Promotor, stark eingeschränkt ist. Als Ursache hierfür kommen der Terminator sowie die schwache SD-Sequenz in Frage. Die stark eingeschränkte Expression des *cagP*-Gens machte die Entwicklung eines hoch sensitiven Reportersystems erforderlich.

5.3. Entwicklung eines CagP-Reporters

Im Rahmen der Entwicklung eines *cagP*-Reporters wurden verschiedene Reportersysteme erprobt. Es sollten zunächst zwei LUX Reporter erstellt werden. Hierzu sollte zum einen das Plasmid pSL1 (Abbildung 16) mit der original belassenen *cagP-upstream* Region und zum anderen das Plasmid pSL2 mit einer der *cagA-upstream* Region entsprechenden SD-Sequenz in den *H. pylori* Stamm P12 transformiert werden. Obwohl eine Vielzahl von Transformations-Versuchen erfolgte – unter anderem mittels Elektroporation sowie verschiedener Mengen eingesetzten Plasmids – verlief keine Transformation erfolgreich. Es konnten keine Klone gewonnen werden. Grund hierfür ist am wahrscheinlichsten die enorme Plasmidgröße mit ca. 10400 bp nach Einfügen des *lux-CDABE*-Operons (ca. 5800 bp). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Effizienz von Transformation und Rekombination mit zunehmender Länge der einzufügenden nicht homologen DNA Fragmente exponentiell zurück geht. Auch die Länge der flankierenden Regionen erwies sich als maßgebender Faktor für eine erfolgreiche Rekombination [54]. Die flankierenden Regionen wurden vor allem für die *cagP*- und *cagA-upstream* Bereiche möglicherweise zu kurz gewählt. Ebenfalls ist bekannt, dass LUX Gene eine gewisse Toxizität aufweisen können [55]. Es ist somit denkbar, dass dies zur missglückten Transformation beigetragen hat.

Nachdem der Versuch eines LUX Reporters für CagP gescheitert war, sollte ein GFP Reporter erstellt werden. Auch hierbei wurden zunächst zwei Varianten, eine mit einem *cagP-upstream* Bereich (SL 01) und eine mit einem *cagA-upstream* Bereich (SL 02), hergestellt (Abbildung 17, Abbildung 18). Darüber hinaus wurden weitere Klonierungen mit einer Deletion des Terminators sowie mit einer kombinierten Deletion des Terminators und der RNA *HPnc2630* durchgeführt. Diese erfolgten ebenfalls jeweils sowohl für eine *cagP-upstream* sowie auch für eine *cagA-upstream* Variante (Abbildung 20). Die Detektion von GFP im Western Blot des Stammes SL 01 (Pup-GFP) bestätigt die Aktivität des original belassenen *cagP*-Promotors. Die weiteren Western-Blot-Ergebnisse gestalteten sich allerdings uneinheitlich. Bei den Stämmen SL 03 sowie im Stamm SL 06 konnte ebenfalls eine eindeutige GFP-Bande im Western-Blot nachgewiesen werden (Abbildung 21). Die Fluoreszenzmikroskopie lieferte jedoch keine überzeugenden Ergebnisse. Nur der Stamm SL 03 schien leicht zu fluoreszieren (Abbildung 22). In der FACS-Analyse konnte jedoch bei keinem der rekombinant hergestellten GFP-Reporterstämme ein GFP detektiert werden (Abbildung 23). Zudem konnten auch in einer fluoreszenzphotometrischen Messung keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Keiner der Stämme zeichnete sich eindeutig von der Negativkontrolle ab (Abbildung 24). Zusammenfassend ließen sich die oben beschriebenen Ergebnisse nicht einheitlich erklären, weshalb naheliegend ist, dass Messungen mit dem GFP Reporter unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Im Rahmen dieser Arbeit schien es daher zielführend, ein neues, sensitiveres Reportersystem zur Detektion von CagP zu entwickeln.

Mit dem NanoLuc System von Promega war es möglich, einen hochsensitiven Reporter herzustellen und somit das mit einem HiBiT-Tag versehene CagP zu detektieren (Abbildung 28). Die NanoLuc Luciferase zeichnet sich, verglichen mit bisher genutzten Luciferasen, durch ihre besondere Sensitivität und verbesserte Stabilität bei gleichzeitig geringer Größe aus [56]. Es wurden jedoch auch hier nicht für alle Stämme eindeutig positive Messwerte erzielt, sondern lediglich für die beiden Klone des Stammes SL 14, welcher mit einer künstlich eingefügten SD Sequenz versehen ist. In der Annahme, dass CagP ohne SD-Sequenz dennoch synthetisiert wird und lediglich auf Grund der äußerst geringen Expression vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze liegt, wurde der Reporterstamm mit eingefügter SD Sequenz stellvertretend für andere *H. pylori* Stämme für das Expressionsverhalten von *cagP* unter verschiedenen externen Bedingungen verwendet. Zwar kann dieser Reporter nicht zur Ermittlung natürlicher Mengen dienen, jedoch können Hinweise

auf eine durch externe Bedingungen mögliche gesteigerte oder verminderte Expression von *cagP* gewonnen werden. Die bisherigen Ergebnisse der getesteten Umweltfaktoren bezüglich der *cagP*-Expression mittels NanoLuc umfassen lediglich eine Testung zur Inkubation in unterschiedlichen Medien (BB, PBS, PBS mit 10% FCS, PBS mit Cholesterin). Es konnte kein messbarer Unterschied der *cagP* Expression im Hinblick auf externe Einflüsse durch die getesteten Medien beobachtet werden.

Um weitere Informationen zur *cagP*-Expression auf RNA Ebene zu erlangen, bietet die RT-qPCR über die Transkriptionsmenge des jeweilig getesteten Gens gute Möglichkeiten. Vor allem im Falle einer Runterregulierung der Transkription – wie es hier bei *cagP* mit AGS-Zellkontakt der Fall zu sein scheint – ist es möglich, eben diese reduzierte Transkriptmenge darzustellen. Ein qPCR Verfahren (Messsystem auf Transkriptionsebene) ist sensitiver für einen Transkriptionsrückgang, als eine Messung der Proteinmenge nach Translation. Es ist anzunehmen, dass Proteine, die vor der Veränderung der zu testenden Umwelteinflüsse bereits synthetisiert wurden, im Falle eines Rückgangs der Expression nicht schnell genug abgebaut werden können. Dadurch würden sie fälschlicherweise in die Messung einbezogen. Hier erweist sich daher die RT-qPCR als zielführender, da eine mRNA einem wesentlich schnelleren Zerfall unterliegt als ein Protein.

In dieser Arbeit wurde *cagP* mittels RT-qPCR lediglich im 3' Bereich, entsprechend der verwendeten Primer, amplifiziert. Somit konnten nur *cagP*- Transkripte mit einer Länge von mindesten 346 Basen, jedoch keine kürzeren Fragmente, erfasst werden. Um auch mögliche kürzere *cagP*-Transkripte zuverlässig erfassen zu können, wäre es notwendig, qPCR-Primer zu entwickeln, die näher am 5'-Ende binden. Bei einer derart niedrigen Transkriptionsrate und den deutlichen Schwankungen in den Ergebnissen können keine quantitativ verlässlichen Aussagen zum Expressionsverhalten der getesteten Gene getroffen werden. Daher stellen hoch sensitive Reportersysteme eine vielversprechende Alternative dar.

In künftigen Experimenten könnte es von Interesse sein, einen Vergleich zwischen Transkripten und Proteinen anzustellen. Dies könnte durch die Durchführung von Experimenten unter gleichen Umweltbedingungen erfolgen, wobei sowohl die RT-qPCR als auch der NanoLuc Reporter zum Einsatz kommen. Hierbei sollte bedacht werden, dass eine verringerte Expression möglicherweise lediglich mittels RT-qPCR festzustellen ist. Es ist durchaus denkbar, dass die Expression von *cagP* in bestimmten Wachstumsphasen induziert wird. Veränderungen der Expressionsraten in unterschiedlichen Wachstumsphasen sind in der Literatur bereits beschrieben. Vannini et al 2016 konnten zeigen, dass die Promotoraktivität des *cagP*-Promotors zur spät-logarithmischen Wachstumsphase abnimmt. Es gibt allerdings auch Beispiele unter anderen Organismen, bei denen die Expression bestimmter Gene in späten Wachstumsphasen zunimmt. So wurde beschrieben, dass die Expression einiger Virulenzfaktoren bei Legionellen nur in post-exponentieller Wachstumsphase stark induziert wird [57]. Aus der Literatur geht mehrfach hervor, dass einige Gene der *cagPAI* in sauren pH-Werten induziert werden [38, 40, 42]. Genexpressionsanalysen von *cagP* und *cagA* bei unterschiedlichen pH-Werten könnten daher aufschlussreiche Ergebnisse liefern. Zur Bestätigung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur *cagP*-Expression bei AGS Zellkontakt (4.2) sollten weitere Versuche mit der NanoLuc-Luciferase durchgeführt werden. Es wäre für zukünftige Versuche sicherlich interessant, unterschiedlich lange Inkubationszeiten zu wählen, so dass Veränderungen der Proteinmenge gegebenenfalls besser erfasst werden können. Um die Expression von *cagP* weiter zu untersuchen, könnte die Inkubation in zusätzlichen Medien neue Ergebnisse liefern. Bisher erfolgte eine Inkubation lediglich in den Medien BB, PBS, PBS mit 10% FCS und PBS mit Cholesterin. Aus der Literatur geht hervor, dass ein geringer Eisenspiegel die Pilusbildung des *H. pylori* induziert, während ein niedriger Zinkspiegel die Pilusbildung reduziert [27]. Denkbar wären also Versuche mit Chelatbildnern, um die Eisenkonzentration zu reduzieren und zu überprüfen, ob dies eine *cagP*-Induktion bewirkt. Ebenso bleibt zu überprüfen, wie sich die *cagP*-Expression bei unterschiedlichen Zinkspiegeln verhält.

Aufgrund der zu geringen Empfindlichkeit des mit einem Myc-Tag versehenen CagG Reporters (Abbildung 7) könnte es weiterhin zielführend sein, ein alternatives *cagG* Messsystem herzustellen, um die Interaktionen von *cagG* mit den Genen der *cagPAI* zu überprüfen. Auch hierbei könnte ein HiBiT-*cagG* Reportersystem in Betracht gezogen werden.

5.4. Ausblick

Sowohl vorangegangene Ergebnisse der Arbeitsgruppe als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass *cagP* eine tragende regulatorische Funktion im *Cag*-T4SS zukommt. Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung eines sensitiven Reporters zur Bestimmung von CagP. Das Bestreben, einen *cagP*-Reporter auf Proteinebene zu entwickeln, beruht auf der Annahme, dass das *cagP*-Gen auch ohne künstlich eingefügte SD-Sequenz in ein Protein transkribiert und translatiert wird, was durch die hohe Konservierung seines offenen Leserahmens in verschiedenen Stämmen nahegelegt wird. Mithilfe des NanoLuc HiBiT *cagP*-Reporters können Genexpressionsanalysen für *cagP* auf Proteinebene durchgeführt werden. Hierbei erscheint die Untersuchung der Genexpression in verschiedenen Wachstumsphasen, bei unterschiedlichem pH-Wert, in verschiedenen Medien sowie bei niedrigem Eisen- und variierenden Zinkspiegeln vielversprechend. Der Mechanismus der Regulation der Genexpression von *cagP* bleibt weiterhin ungeklärt. Ein *Riboswitch* konnte bisher nicht bestätigt werden. Als nächster Schritt wäre auch die Bestimmung oder Vorhersage der Proteinstruktur von CagP sinnvoll, um daraus möglicherweise Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen zu können.

6. Zusammenfassung

Helicobacter pylori ist ein humanpathogenes Magenbakterium mit weltweit enormer Verbreitung. 50% der Weltbevölkerung ist durch das Bakterium besiedelt. Während es in 100% der Fälle zu einer Gastritis kommt, sind auch die meisten Magenkarzinome auf eine *H. pylori* Infektion zurückzuführen. Die medizinische Relevanz dieses Organismus steht damit außer Frage. In den letzten Jahren kam es bei Eradikationsversuchen vermehrt zum Therapieversagen. Im Zeitalter der zunehmenden Antibiotikaresistenzen ist die Suche nach alternativen Interventionsmaßnahmen unabdingbar. Ein bestmögliches Verständnis des pathogenen Organismus, welches aufbauend auf Grundlagenforschung Schritt für Schritt erreicht werden kann, ist somit von fundamentaler Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde die *cagPAI*, ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor des *H. pylori*, mit besonderem Augenmerk auf das Gen *cagP*, untersucht, welches eine bisher wenig erforschte, aber relevante regulatorische Funktion einzunehmen scheint. Die *upstream* Region von *cagP* umfasst eine kleine, nicht-kodierende RNA sowie einen mutmaßlichen Transkriptionsterminator. Die Ursprungshypothese dieser Arbeit war, dass *cagP* durch bestimmte Umweltfaktoren induziert werden kann. Als möglicher Mechanismus könnte etwa ein *Riboswitch* dazu dienen, den Terminator außer Kraft zu setzen. Während die bisherigen Ergebnisse aus der Literatur zur Transkription von *cagP* sehr heterogen ausfielen und einigen Quellen zufolge *cagP* kaum bis gar nicht transkribiert würde, konnte in dieser Arbeit – wenn auch in geringen Mengen – ein nahezu vollständiges Transkript von *cagP* nachgewiesen werden.

Es wurde ein sensitives NanoLuc-Reportersystem zur Messung der *cagP*-Genexpression entwickelt und optimiert, das in einem Plattenlesegerät verwendet werden kann und so eine Bestimmung der *cagP*-Expression im 96 well-Format erlaubt. Während mittels RT-qPCR eine Modulation der Transkription von *cagP* bei AGS-Zellkontakt gezeigt werden konnte, konnten im Rahmen dieser Arbeit noch keine endgültigen Erkenntnisse über Veränderungen der CagP-Proteinmenge unter diesen Bedingungen erzielt werden. Zweifelsfrei konnte die Interaktion von *cagP* mit *cagH*, *cagI* und *cagL* sowie dessen Einfluss auf die CagA Translokation belegt werden. Eine *cagP*-Deletion resultiert schlussendlich in einer verminderten CagA-Translokation und mindert somit vermutlich die Virulenz des *H. pylori*. Die Ursprungshypothese, dass *cagP* durch Epithelzellkontakt induziert wird, konnte nicht bestätigt werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass die *cagP*-Transkription durch AGS-Zellkontakt vermindert wird.

Auch wenn der molekulare Mechanismus der *cagP*-Genregulation noch nicht geklärt werden konnte, ist die Nutzung des neuen NanoLuc *cagP*-Reportersystems für weitere Experimente sehr vielversprechend. Auch weitere Expressionsanalysen anderer Gene könnten zukünftig mit ähnlichen Reporterkonstrukten durchgeführt werden.

7. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MODELL DES CAG-T4SS UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON H. PYLORI BEI WIRTSZELLKONTAKT ..	6
ABBILDUNG 2: CAGPAI	7
ABBILDUNG 3: TYROSINPHOSPHORYLIERUNG VON CAGA	8
ABBILDUNG 4: GENLOCUS VON CAGP	9
ABBILDUNG 5: EINFLUSS VON CAGP AUF CAGH, CAGI UND CAGL	44
ABBILDUNG 6: HERSTELLUNG DES MYC-CAGG STAMMES RNP5 (PRN1)	45
ABBILDUNG 7: EINFLUSS VON CAGP AUF CAGG	46
ABBILDUNG 8: EINFLUSS VON CAGP AUF DIE CAGA TRANSLOKATION.	47
ABBILDUNG 9: qPCR VON CAGP MIT BINDUNGSSTELLEN	48
ABBILDUNG 10: RNA QUANTITÄTSKONTROLLE	49
ABBILDUNG 11: BESTÄTIGUNG DER VOLLSTÄNDIGKEIT DES DNASE-VERDAUS	50
ABBILDUNG 12: EINFLUSS AUF DIE TRANSKRIPTION VON CAGH, CAGI, CAGL, CAGG UND CAGP BEI KONTAKT MIT AGS ZELLEN	51
ABBILDUNG 13: VERDÜNNUNGSREIHE VON CAGP	52
ABBILDUNG 14: ZUORDNUNG VON C_q-WERT UND KOPIENZAHLE DER VERDÜNNUNGSREIHE VON CAGP	53
ABBILDUNG 15: AUFBAU DES LUXCDABE-OPERONS.....	55
ABBILDUNG 16: pSL1 MIT LUXCDABE OPERON.....	55
ABBILDUNG 17: KLONIERUNGSSCHEMA FÜR SL 01 (PUPGFP)	56
ABBILDUNG 18: GENLOCUS DES GFP GENS IN DEN STÄMMEN SL 01 UND SL 02.....	57
ABBILDUNG 19: GFP EXPRESSIONSANALYSE DER STÄMME SL 01 UND SL 02	57
ABBILDUNG 20: GENLOCUS DES CAGP-GENS IN DEN STÄMMEN SL 03, SL 04, SL 05 UND SL 06.....	58
ABBILDUNG 21: GFP-DETEKTION IN DEN STÄMMEN SL 03 UND SL 06	59
ABBILDUNG 22: FLUORESCENZ VON SL03	59
ABBILDUNG 23: FLUORESCENZMESSUNG DER GFP STÄMME IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	60
ABBILDUNG 24: FLUORESCENZMESSUNG DER GFP STÄMME MITTELS FLUORESCENZPHOTOMETER.....	61
ABBILDUNG 25: NANOLUC LUCIFERASE	62
ABBILDUNG 26: KLONIERUNGSSCHEMA SL 13.....	63
ABBILDUNG 27 GENLOCUS DES HiBiT-CAGP IN DEN STÄMMEN SL13 UND SL14	63
ABBILDUNG 28: HiBiT-CAGP IM WESTERN-BLOT	64
ABBILDUNG 29: TYROSINPHOSPHORYLIERUNG VON CAGA (Li.) UND CAGA EXPRESSION (RE.) DER STÄMME SL13 UND SL14	65
ABBILDUNG 30: HiBiT REPORTER: VERGLEICH VERSCHIEDENER INKUBATIONSZEITEN.....	66
ABBILDUNG 31: HiBiT REPORTER: VERGLEICH VERSCHIEDENER LYSE-VERFAHREN	67
ABBILDUNG 32 SENSITIVITÄT DES NANOLUC CAGP-REPORTERS.....	68
ABBILDUNG 33: EXPRESSION VON CAGP IN UNTERSCHIEDLICHEN MEDIEN.....	69
ABBILDUNG 34: STRUKTURVORHERSAGE DER KLEINEN NICHT-KODIERENDEN RNA HPnc2630	72
ABBILDUNG 35: WESTERN-BLOT ZU ABBILDUNG 7.....	93
ABBILDUNG 36: WESTERN-BLOTS ZU ABBILDUNG 21	93
ABBILDUNG 37: WESTERN-BLOT ZU ABBILDUNG 29.....	94

8. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE H. PYLORI STÄMME.	11
TABELLE 2: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE E. COLI STÄMME.	13
TABELLE 3: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE PLASMIDE.	13
TABELLE 4: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE ZELLINIE.	14
TABELLE 5: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.	15
TABELLE 6: PRIMÄRE ANTIKÖRPER	18
TABELLE 7: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	18
TABELLE 8: ANTIBIOTIKA	19
TABELLE 9: CHEMIKALIEN UND PUFFER	19
TABELLE 10: AGAR PLATTEN	21
TABELLE 11: NÄHRMEDIEN	21
TABELLE 12: KOMMERZIELLE KITS	22
TABELLE 13: GERÄTE UND SOFTWARE	23
TABELLE 14: VERBRAUCHSMATERIAL	24
TABELLE 15: AMPLIKONS, RESTRIKTIONSSTELLEN, PLASMIDVEKTOR UND ZIELSTAMM FÜR KLONIERUNGEN	31
TABELLE 16: PCR REAKTIONSANSATZ FÜR 50 ML	32
TABELLE 17: PRÄPARATIVER RESTRIKTIONSVERDAU, ZUSAMMENSETZUNG VON 50 ML REAKTIONSANSATZ	33
TABELLE 18: ZUSAMMENSETZUNG FÜR 10 ML LIGATIONSANSATZ	34
TABELLE 19: TESTVERDAU, ZUSAMMENSETZUNG VON 10 ML REAKTIONSANSATZ	36
TABELLE 20: ZUSAMMENSETZUNG DER POLYACRYLAMIDTRENNGELE	38
TABELLE 21: ZUSAMMENSETZUNG DER 5% POLYACRYLAMIDSAMMELGELE	38
TABELLE 22: CCF4 ZUSAMMENSETZUNG FÜR 1ML SUBSTRAT	43

9. Abkürzungsverzeichnis

Aup	<i>Upstream</i> -Bereich des <i>cagA</i> -Gens mit <i>Shine-Dalgarno</i> Sequenz
α	Anti
Bp	Basenpaar
AP	Alkalische Phosphatase
BB	Brucella Broth
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BME	β -Merkaptoethanol
<i>cagPAI</i>	<i>Cytotoxin-associated gene-pathogenicity</i> Island
cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Δ	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTPS	Desoxyribonukleinsäuren
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia Coli
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FS	First Strand
GEBS	Glycerin-EDTA-Bromphenolblau-Sarcosyl Puffer
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
<i>H. pylory</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ₂ O _{dest}	Destilliertes Wasser
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
IL-8	Interleukin-8
IMC	inner membrane complex
kb	kilobasen
LB	Luria-Bertani (Agar)
LPS	Lipopolysaccharide
luxCDABE	Autonom biolumineszierende Luciferase
MF	Markerfrei

min	Minuten
MOI	Multiplizität der Infektion
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm Wellenlänge
OMCC	<i>Outer membrane core complex</i>
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pup	Original belassener <i>upstream</i> Bereich des <i>cagP</i> -Gens mit Promotor, Δ HPnc2630 und Terminator
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
POX	Peroxidase
rpm	Runden pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RQI	RNA Qualitäts-Index
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
SD	Shine-Dalgarno (Sequenz)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM/TEM-1	<i>E. coli</i> β -Lactamase
TEM-CagA	TEM-1 mit CagA fusioniert
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptoren
TG	Thioglycerol
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
VacA	Vacuolisierendes Cytotoxin A
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

10 . D a n k s a g u n g

Mit Freude und Dankbarkeit möchte ich meine Wertschätzung zum Ausdruck bringen, an all die wunderbaren Menschen, die mich mit Ihrer Geduld und Unterstützung auf dem Weg zum Dokortitel begleitet haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Wolfgang Fischer. Du hast mich mit Deiner enormen fachlichen Kompetenz stets hervorragend angeleitet und mit Geduld, Freundlichkeit und unermüdlicher Bereitschaft unterstützt, diese Arbeit - auch nach einer etwas längeren Zeit – fertigzustellen.

Ebenso möchte ich mich von Herzen bei Evelyn Weiß bedanken. Nicht nur durch Deine hervorragende Kompetenz, sondern auch mit Deiner warmherzigen Art hast Du mich und meine Arbeit unterstützt – in ganz besonderem Maße während meiner Schwangerschaft.

Ich kann Euch gar nicht genug danken.

An meine liebe Familie, insbesondere meine Eltern, möchte ich meinen Dank richten. Ihr habt mich stets ermutigt und mir Kraft gegeben, meine Ziele zu verfolgen und wart an meiner Seite, in guten wie in schweren Zeiten.

Meinem Ehemann möchte ich ganz besonders danken. Deine Liebe, Unterstützung und Verständnis waren uferlos. Du hast Opfer gebracht und mich immer wieder bestärkt, meinen Weg zu gehen. Ich danke Dir von Herzen.

Ich danke auch meinen Kindern. Ich weiß, dass auch Ihr Opfer gebracht habt und mich mehr an Eurer Seite gebraucht hättet. Ich liebe Euch über alles. Ihr seid mein Leben, meine Liebe und meine Kraft, zu der ich nach jedem anstrengenden Tag nach Hause kommen darf.

All den Menschen, die mich auf meinem Weg begleitet haben, sei es durch fachlichen Rat, aufmunternde Worte oder einfach durch Ihre Anwesenheit, danke ich herzlich.

Ohne Euch hätte ich es nicht geschafft.

Von Herzen, Danke!

11. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Salama NR, Hartung ML, Muller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(6):385-99.
2. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1(8390):1311-5.
3. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1863-73.
4. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. 2000;22(2):283-97.
5. Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1994;35(6):742-5.
6. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Gastrointestinal Physiology Working Group*. *Lancet*. 1991;337(8756):1503-6.
7. Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Sotomayor V, Russell RG, Wasserman SS, Morris JG, Jr. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J Infect Dis*. 1993;168(1):222-6.
8. Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, Yamaoka Y, Berenson GS. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*. 2002;359(9310):931-5.
9. D. Forman PW, D. Newell, M. Coleman, D. Palli, H. Moller, K., Hengels JE, G. De Backer. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. *Lancet*. 1993;341(8857):1359-62.

10. Smith VC, Genta RM. Role of *Helicobacter pylori* gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia, and gastric neoplasia. *Microsc Res Tech.* 2000;48(6):313-20.
11. Moller H, Heseltine E, Vainio H. Working group report on schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer.* 1995;60(5):587-9.
12. WHO. Cancer Fact Sheets 2019 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>].
13. Parsonnet J. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut.* 1998;43 Suppl 1:S6-9.
14. Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, Jones NL, Render C, Leontiadis GI, Moayyedi P, Marshall JK. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology.* 2016;151(1):51-69.e14.
15. O'Morain NR, Dore MP, O'Connor AJP, Gisbert JP, O'Morain CA. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in 2018. *Helicobacter.* 2018;23 Suppl 1:e12519.
16. Cheha KM, Dib SOA, Alhalabi MM. Pilot study: Comparing efficacy of 14-day triple therapy Clarithromycin versus levofloxacin on eradication of *Helicobacter pylori* infection in Syrian population single-center experience. *Avicenna J Med.* 2018;8(1):14-7.
17. Ramas M, Donday MG, McNicholl AG, Gisbert JP. Efficacy and safety of rifaximin associated with standard triple therapy (omeprazole, clarithromycin and amoxicillin) for *H. pylori* eradication: A phase IV pilot clinical trial. *Gastroenterol Hepatol.* 2017;40(10):658-62.
18. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie V-uSeVD. Aktualisierte S2k-Leitlinie *Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) - Version 4.2: AWMF; 2022 [Available from: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/021-001>].

19. WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. WHO; 2017. p. 7.
20. Yamaoka Y. *Helicobacter Pylori: Molecular Genetics and Cellular Biology*: Caister Academic; 2008.
21. Rust M, Schweinitzer T, Josenhans C. *Helicobacter Flagella, Motility and Chemotaxis*. In: Yamaoka Y, editor. *Helicobacter Pylori: Molecular Genetics and Cellular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. p. 61-85.
22. Yamaoka Y, Alm RA. *Helicobacter pylori Outer Membrane Proteins*. In: Yamaoka Y, editor. *Helicobacter pylori: Molecular Genetics and Cellular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. p. 37-60.
23. Moran AP, Trent MS. *Helicobacter pylori Lipopolysaccharides and Lewis Antigens*. In: Yamaoka Y, editor. *Helicobacter pylori: Molecular Genetics and Cellular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. p. 7-36.
24. Pfannkuch L, Hurwitz R, Trauisen J, Sigulla J, Poeschke M, Matzner L, Kosma P, Schmid M, Meyer TF. ADP heptose, a novel pathogen-associated molecular pattern identified in *Helicobacter pylori*. *The FASEB Journal*. 2019;33(8):9087-99.
25. Blanke SR, Cover TL. *Helicobacter pylori Vacuolating Toxin*. In: Yamaoka Y, editor. *Helicobacter pylori: Molecular Genetics and Cellular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. p. 87-114.
26. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host*. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):441-52.
27. Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W. *Composition, structure and function of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island encoded type IV secretion system*. *Future Microbiol*. 2015;10(6):955-65.

28. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(4):775-808.
29. Fischer W, Karnholz A, Jimenez-Soto LF, Haas R. Type IV Secretions Systems in *Helicobacter pylori*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. p. 115-36.
30. Fischer W. Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *Febs j.* 2011;278(8):1203-12.
31. Lettl C, Fischer W. Export von Gefahrgut: *Helicobacter pylori* und sein CagA-Protein. *BIOspektrum.* 2020;26(6):597-9.
32. Shaffer CL, Gaddy JA, Loh JT, Johnson EM, Hill S, Hennig EE, McClain MS, McDonald WH, Cover TL. *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002237.
33. Hatakeyama M. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(1):30-7.
34. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 2008;134(1):306-23.
35. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1997;388(6642):539-47.

36. Figura N. Helicobacter pylori exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 1996;10 Suppl 1:79-96.
37. Cover TL, Lacy DB, Ohi MD. The Helicobacter pylori Cag Type IV Secretion System. *Trends Microbiol.* 2020;28(8):682-95.
38. Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiss S, Sittka A, Chabas S, Reiche K, Hackermuller J, Reinhardt R, Stadler PF, Vogel J. The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori. *Nature.* 2010;464(7286):250-5.
39. Vannini A, Roncarati D, Danielli A. The cag-pathogenicity island encoded CncR1 sRNA oppositely modulates Helicobacter pylori motility and adhesion to host cells. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(16):3151-68.
40. Vannini A, Roncarati D, Spinsanti M, Scarlato V, Danielli A. In depth analysis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island transcriptional responses. *PLoS One.* 2014;9(6):e98416.
41. Joyce EA, Gilbert JV, Eaton KA, Plaut A, Wright A. Differential gene expression from two transcriptional units in the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori. *Infect Immun.* 2001;69(7):4202-9.
42. Marcus EA, Sachs G, Scott DR. Acid-regulated gene expression of Helicobacter pylori: Insight into acid protection and gastric colonization. *Helicobacter.* 2018;23(3):e12490.
43. Ta LH, Hansen LM, Sause WE, Shiva O, Millstein A, Ottemann KM, Castillo AR, Solnick JV. Conserved transcriptional unit organization of the cag pathogenicity island among Helicobacter pylori strains. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:46.
44. Boonjakuakul JK, Canfield DR, Solnick JV. Comparison of Helicobacter pylori virulence gene expression in vitro and in the Rhesus macaque. *Infect Immun.* 2005;73(8):4895-904.

45. Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol.* 1994;12(2):307-19.
46. Lettl C, Haas R, Fischer W. Kinetics of CagA type IV secretion by *Helicobacter pylori* and the requirement for substrate unfolding. *Mol Microbiol.* 2021;116(3):794-807.
47. Pham KT, Weiss E, Jimenez Soto LF, Breithaupt U, Haas R, Fischer W. CagI is an essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system and forms a complex with CagL. *PLoS One.* 2012;7(4):e35341.
48. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 1981;114(1):193-7.
49. Segal ED, Tompkins LS. Transformation of *Helicobacter pylori* by electroporation. *Biotechniques.* 1993;14(2):225-6.
50. Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene.* 1996;173(1 Spec No):5-11.
51. Hastings JW, Nealson KH. Bacterial Bioluminescence Light Emission in the Mixed Function Oxidation of Reduced Flavin and Fatty Aldehyde. *CRC Crit Rev Biochem.* 1978;5(2):163-84.
52. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, Otto P, Zimmerman K, Vidugiris G, Machleidt T, Robers MB, Benink HA, Eggers CT, Slater MR, Meisenheimer PL, Klaubert DH, Fan F, Encell LP, Wood KV. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol.* 2012;7(11):1848-57.
53. Sashital DG, Butcher SE. Flipping off the riboswitch: RNA structures that control gene expression. *ACS Chem Biol.* 2006;1(6):341-5.

54. Kung SH, Retchless AC, Kwan JY, Almeida RP. Effects of DNA size on transformation and recombination efficiencies in *Xylella fastidiosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(5):1712-7.
55. Hollis RP, Lagido C, Pettitt J, Porter AJ, Killham K, Paton GI, Glover LA. Toxicity of the bacterial luciferase substrate, n-decyl aldehyde, to *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 2001;506(2):140-2.
56. England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem.* 2016;27(5):1175-87.
57. Byrne B, Swanson MS. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun.* 1998;66(7):3029-34.

12. Anhang

12.1. Western-Blots

Im Folgenden sind die vollständigen Western-Blots zu den Abbildungen 7, 21 und 29 dargestellt.

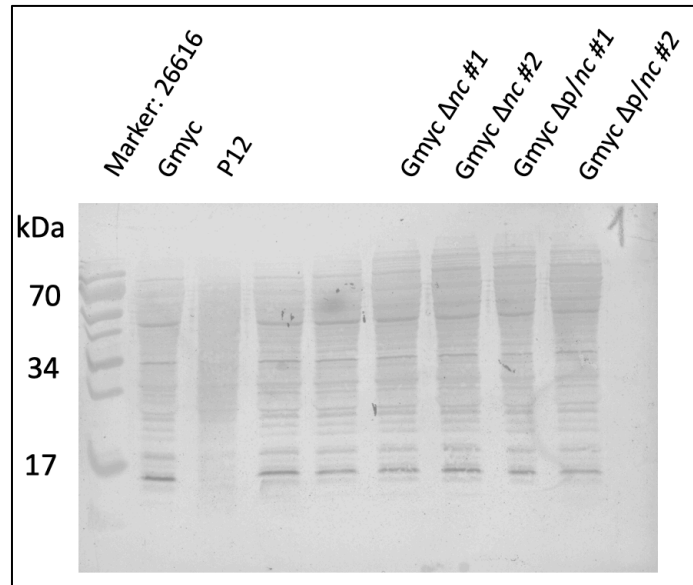


Abbildung 35: Western-Blot zu Abbildung 7

Den nicht beschrifteten Banden kommt im Rahmen dieser Arbeit keine Bedeutung zu.

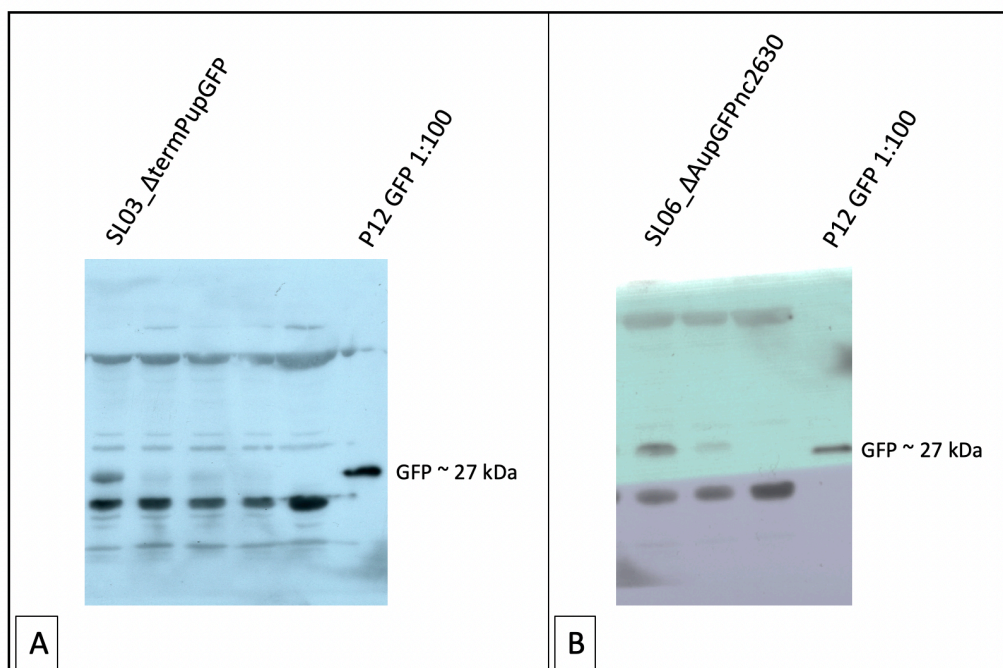


Abbildung 36: Western-Blots zu Abbildung 21

Nicht beschriftete Banden entsprechen verworfenen Klonen

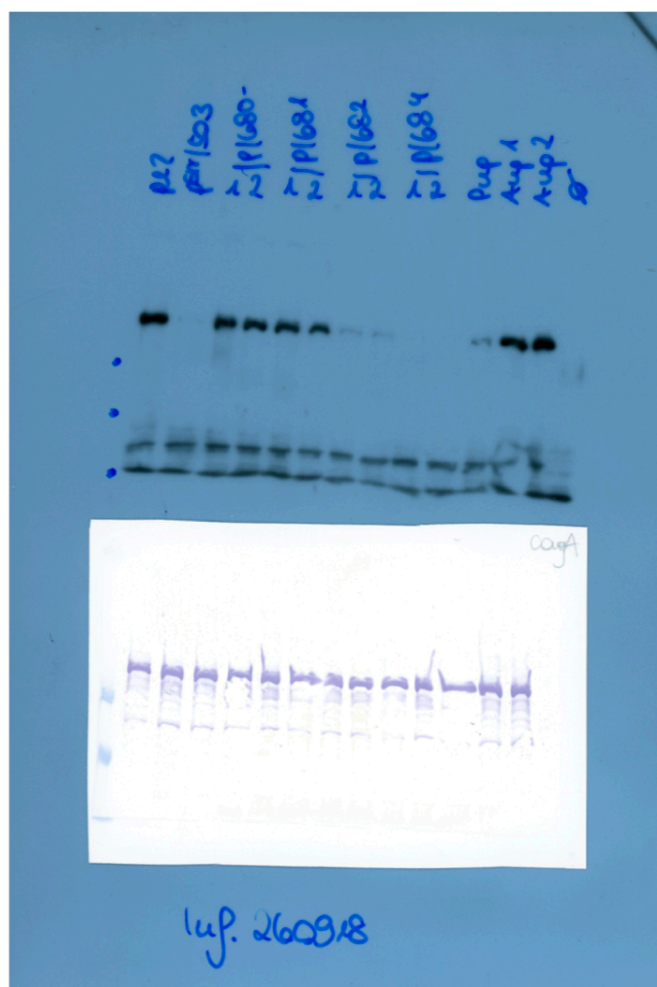


Abbildung 37: Western-Blot zu Abbildung 29

AGS-Zell-Infektion mit den Stämmen SL 13 und SL 14