

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

**Untersuchung des Proteins CagP im Hinblick auf
seine Funktion für den Cag Typ IV-Sekretionsapparat in
*Helicobacter pylori***

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



vorgelegt von
Vera Sophie Beißwenger
aus Burghausen

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Fischer

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Dr. Andreas Sing

Drittes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Dimitrios Frangoulidis

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2024

Meinem Vater Harald

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	X
II. Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis	XIV
III. Zusammenfassung	XVI
IV. Eidesstattliche Versicherung	XVII
1. Einleitung	1
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> und seine Auswirkungen	1
1.2 Diagnostik und Therapie einer <i>Helicobacter pylori</i> Infektion	4
1.3 Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	7
1.3.1 Die äußeren Membranproteine	7
1.3.2 Vakuolisierendes Zytotoxin A	8
1.3.3 Urease	9
1.4 Das Cag Typ IV-Sekretionssystem von <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.4.1 Auswirkungen des <i>cagT4SS</i> auf zellulärer Ebene	11
1.4.2 Aufbau und Komponenten des <i>cagT4SS</i>	12
1.5 Ziele dieser Arbeit	16
2. Material	17
2.1 Bakterienstämme	17
2.1.1 <i>E. coli</i> -Stämme	17
2.1.2 <i>H. pylori</i> -Stämme	17
2.2 Nährmedien für Bakterien	19
2.3 Antibiotika	19
2.4 Zelllinien	20
2.5 Zellkulturmedien und –puffer	20
2.6 Plasmide	20

2.7 Oligonukleotide	21
2.8 Proteine und Enzyme	23
2.9 Antikörper	24
2.10 Verwendete Molekulargewichtsmarker	24
2.11 Lösungen und Puffer	25
2.12 Chemikalien	27
2.13 Kommerzielle Kits	28
2.14 Verbrauchsmaterialien	28
2.15 Geräte und Apparaturen	30
3. Methoden	33
3.1 Mikrobiologische Methoden	33
3.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	33
3.1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	33
3.1.1.2 <i>Helicobacter pylori</i>	33
3.1.2 Transformation von Bakterien	33
3.1.2.1 Transformation von <i>E. coli</i>	33
3.1.2.2 Transformation von <i>H. pylori</i>	34
3.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien	34
3.1.4 Kultivierung von Zellen	35
3.1.4.1 Kultivierung von AGS-Zellen	35
3.1.4.2 Kultivierung von Kato III-Zellen	35
3.1.5 <i>In vitro</i> -Infektion von AGS- bzw. Kato III-Zellen	35
3.2 Molekularbiologische Methoden	36
3.2.1 Isolierung genomischer <i>H. pylori</i> DNA	36
3.2.2 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	37
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	37
3.2.4 Agarosegel-Elektrophorese	38

3.2.5 DNA-Fragment Aufreinigung	39
3.2.6 Restriktionsenzymverdau	39
3.2.7 Ligation	40
3.2.8 DNA-Sequenzierung	40
3.2.9 RNA Isolation	40
3.2.10 cDNA Synthese	42
3.2.11 Quantitative PCR	42
3.3 Proteinbiochemische Methoden	42
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.3.2 Western Blot und HiBiT Blot Technik	43
3.3.3 TEM-1-CagA-Translokations-Assay	45
3.3.4 HiBiT Reporter Assay	46
3.3.5 Statistische Auswertung	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Die Rolle von <i>cagP</i> für die Aktivität des Cag Typ IV-Sekretionsapparats	50
4.2 Untersuchung des <i>cagP</i> Genlocus	52
4.3 Der Einfluss von <i>cagP</i> auf CagH und CagG	56
4.4 Die Funktion von HPnc2630 und der mutmaßlichen <i>cagG</i> mRNA Bindestelle für das <i>cagT4SS</i>	59
4.5 Der Einfluss des vorhergesagten Startcodons und des 5`-Endes von <i>cagP</i> für die CagA Translokation	62
4.6 Untersuchung einer Modulation der Expression von <i>cagP</i> in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen	69
4.6.1 Untersuchung des Einflusses des Transkriptionsfaktors HP1043 auf die CagP-Produktion	69
4.6.2 Untersuchung des Einflusses von Eisen und Cyclodextrin auf die	

Produktion von CagP und CagH	70
4.6.3 Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf die Produktion von CagP und CagG	73
4.6.4 Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die Produktion von CagP, CagG und CagH	75
4.6.5 Untersuchung des Einflusses eines Wirtszellkontakts	76
4.6.5.1 Einfluss eines Wirtszellkontakts auf die Produktion von CagP, CagG und CagH	76
4.6.5.2 Untersuchung der Proteinregulation bei Wirtszellkontakt mit Hilfe von verschiedenen Deletionsmutanten	82
5. Diskussion	85
5.1 Evaluierung des HiBiT Reporter Assays im Bezug auf die Quantifizierung der <i>cagT4SS</i> Proteine	85
5.2 Die Rolle des vorhergesagten Startcodons und des 5`-Endes von <i>cagP</i>	87
5.3 Die Funktion von HPnc2630	90
5.4 Die <i>cagP</i> Expression kann durch äußere Einflüsse reguliert werden ...	92
5.5 HP1043 beeinflusst die CagP-Produktion	96
6. Fazit und Ausblick	97
7. Anhang	99
8. Literaturverzeichnis	105
9. Danksagung	119

I. Abkürzungsverzeichnis

A-up	<i>cagA upstream</i>
6-FAM Farbstoff	6-Carboxyfluorescein Farbstoff
Abb.	Abbildung
Abl-Kinase	<i>Abelson tyrosine kinase</i>
ADP-Heptose	Adenosindiphosphat- <i>glycero-β-D-manno</i> -heptose
AGS Zellen	humane Magenkarzinom-Zelllinie (Adenokarzinom)
AlpA	Adhärenz-assoziiertes Lipoprotein A
AlpB	Adhärenz-assoziiertes Lipoprotein B
ANOVA	Varianzanalyse
ATL Puffer	Puffer für Gewebe-Lyse bei Nukleinsäurepurifikation
ATP	Adensontriphosphat
AW Puffer	Puffer zur Aufreinigung chromosomaler DNA
BabA	<i>blood group antigen-binding adhesin A</i>
BB	<i>brucella broth</i>
BCIP	5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-pToluidinsalz
BHQ-1 Quencher	Black Hole Quencher®-1
<i>cag</i>	<i>cytotoxin-associated gene</i>
<i>cagPAI</i>	<i>cag</i> -Pathogenitätsinsel
<i>cagT4SS</i>	<i>cag</i> Typ IV-Sekretionsapparat
Cam	Chloramphenicol
CCF4	Farbstoff im Rahmen des TEM-1-Translokationsassays
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
Cq	Zyklusanzahl bei qPCR
Crk	Adapterprotein
Csk-Kinase	Tyrosinkinase
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Reinstwasser
DMPC-H ₂ O	Dimyristoylphosphatidylcholin-H ₂ O
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS ohne Calcium and Magnesium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>

ENA-78	<i>epithelial cell-derived neutrophil-activating protein</i>
EPIYA-Motiv	Proteinmotiv: Glutamat-Prolin-Isoleucin-Tyrosin-Alanin
Erm	Erythromycin
ExTaq Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
FCS	fetales Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
GEBS	Glycerin-EDTA-Bromphenolblau-Sarkosyl
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte colony-stimulating-factor</i>
GmRBS	vorhergesagte Stelle für Bindungen zwischen <i>cagG</i> mRNA und HPnc2630
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
Her2/Neu	<i>receptor tyrosin-protein kinase erbB-2</i>
HiBiT	<i>high affinity bioluminescence tag</i>
Hof	<i>Helicobacter</i> OMP
Hom	<i>Helicobacter</i> outer membrane
Hop	<i>H. pylori</i> OMP
Hor	<i>Hop</i> related
IL-8	Interleukin 8
Kan	Kanamycin
Kato III Zellen	humane Magenkarzinom-Zelllinie
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
LB Platten	Luria-Bertani (Agar Platten)
LgBiT	<i>large bioluminescence tag</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
mut	mutiert
<i>myc-cagP</i>	<i>cagP</i> nach <i>myc</i> -Gen exprimiert, verstärkte Expression
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-kappaB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NSAID	<i>nonsteroidal antiinflammatory drugs</i>
OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm Wellenlänge
OMPs	<i>outer membrane proteins</i>
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P-up	<i>cagP upstream</i>
PVDF Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
Ras GTPase	<i>Rat sarcoma virus</i> Guanosinriphosphatase
rev	<i>reverse</i>
RIPA Buffer	<i>radioimmunoprecipitation assay</i> Puffer
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
<i>rpsL-erm</i> Kasette	Streptomycinresistenz-Erythromycinresistenz-Genkasette
SabA	<i>sialyl-dimeric-Lewis x Glycosphingolipid</i>
SD	Shine-Dalgarno Sequenz
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Sec	Transportproteine „Sekretion“
SHP	<i>Src Homology domain-containing Phosphatase</i>
Src-Kinase	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
STET	Saline-Tris-EDTA-Triton X-100
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit <i>Tween</i>
TEM	<i>E. coli</i> β -Lactamase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamid
TE-Puffer	Tris und EDTA Puffer
Tfbl-Puffer	Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan-HCl
UreA	<i>Urease subunit alpha</i>
UreB	<i>Urease subunit beta</i>
Urel	säureaktivierter Urea Transporter
v/v	Volumen-zu-Volumen-Verhältnis
Vir	<i>virulence</i>
w/v	Gewicht-zu-Volumen-Verhältnis

WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
α	alpha entspricht „Anti-“ bei Antikörpern
Δ	delta entspricht Deletion im Genom

II. Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Der <i>cag</i> Typ IV-Sekretionsapparat	14
Abb. 1.2	Der <i>cagP</i> Genlocus	15
Abb. 3.1	HiBiT Reporter Assay	46
Abb. 4.1	Der Einfluss von <i>cagP</i> auf CagH, CagI und CagL	50
Abb. 4.2	Der Einfluss von <i>cagP</i> auf die <i>cag</i> Typ IV-Sekretionsaktivität	51
Abb. 4.3	markerfreie Fusion des HiBiT-Tags mit <i>cagP</i>	53
Abb. 4.4	Der Einfluss der SD-Sequenz und die Deletion von HPnc2630 auf die CagP-Produktion (HiBiT Reporter Assay)	54
Abb. 4.5	Der Einfluss der SD-Sequenz und die Deletion von HPnc2630 auf die CagP-Produktion (HiBiT Blot)	55
Abb. 4.6	Der Einfluss von <i>cagP</i> und HPnc2630 auf CagH.....	57
Abb. 4.7	Der Einfluss von <i>cagP</i> und HPnc2630 auf CagG	58
Abb. 4.8	Mögliche Lokalisation für Basenpaarungen zwischen HPnc2630 und der <i>cagG</i> mRNA laut Co-praRNA	59
Abb. 4.9	Der Einfluss von HPnc2630 und der mutmaßlichen <i>cagG</i> mRNA-Bindestelle auf die Aktivität des <i>cag</i> Typ IV-Sekretionsapparats	60
Abb. 4.10	Die Rolle der mutmaßlichen <i>cagG</i> mRNA Bindestelle für die CagG-, und CagH-Produktion	61
Abb. 4.11	Überexpression von <i>cagL</i> , <i>cagH</i> und <i>cagI</i> bei mutATG Stämmen	62
Abb. 4.12	Die Aktivität des <i>cag</i> Typ IV-Sekretionsapparats bei Mutation des Startcodons und Überexpression von <i>cagH</i> , <i>cagI</i> und <i>cagL</i>	63
Abb. 4.13	Darstellung des <i>cagP</i> Genlocus der verschiedenen Deletionsmutanten	65
Abb. 4.14	Der Einfluss von verschiedenen Deletionen im <i>cagP</i> Genlocus auf die Aktivität des <i>cag</i> Typ IV-Sekretionsapparats	67
Abb. 4.15	ATG Mutation	68
Abb. 4.16	CagP-Menge bei HP1043 deletierten Stämmen	69
Abb. 4.17	Einfluss verschiedener Zusätze im Inkubationsmedium für die CagP-, und CagH-Produktion	71
Abb. 4.18	Auswirkung verschiedener Medienzusätze auf <i>cagP</i> und <i>cagI</i> auf RNA Ebene	72
Abb. 4.19	Die Auswirkung verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf die Produktion von CagG, CagH und CagP	74, 75
Abb. 4.20	Die Auswirkung von saurem pH auf die Produktion von CagG, CagH und CagP	76
Abb. 4.21	Einfluss von Zellkontakt während Inkubation auf die Menge von CagP, CagH und CagG	77
Abb. 4.22	Oben: Einfluss von Zellkontakt auf die Produktion von CagG, CagH und CagP bei Infektion einer alternativen Zelllinie Unten: Einfluss von Zellkontakt auf die Produktion von CagP bei Infektion mit einem anderen <i>H. pylori</i> Stamm.....	78, 79
Abb. 4.23	Zeitabhängiger Anstieg der Proteine CagP und CagG bei Inkubation mit Wirtszellen	80
Abb. 4.24	Menge der Proteine CagG, CagH und CagP bei Inkubation mit intakten AGS Zellen und Zellysaten	81
Abb. 4.25	Die Rolle von HPnc2630 für die Erhöhung der CagP-Menge bei Inkubation mit Zellkontakt	82
Abb. 4.26	Die Rolle verschiedener Gene für <i>outer membrane proteins</i> von <i>H. pylori</i> für die Erhöhung der CagP-Menge bei Zellkontakt während Inkubation	83
Abb. 4.27	Die Rolle von <i>cagT</i> für die Erhöhung der CagP-Menge bei Inkubation mit Zellkontakt	84

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	<i>cagT4SS</i> Proteine und ihre Vir-Homologe	13
Tab. 3.1	Zusammensetzung der Western Blot Gele	43
Tab. 3.2	Zusammensetzung der TEM-1-CagA-Translokationsassay Beladelösung	45
Tab. 3.3	Zusammensetzung der HiBiT Reaktionslösung	47
Tab. 3.4	Beschreibung der verschiedenen Deletionsmutanten	66

III. Zusammenfassung

Helicobacter pylori ist ein humanpathogenes Bakterium, welches die Magenschleimhaut besiedelt, was unter anderem zu Magen-, bzw. Duodenalulcera, MALT-Lymphomen und Magenkarzinomen führen kann. Einer der wichtigsten Faktoren für die Rolle von *H. pylori* als Risikofaktor für diese Erkrankungen ist dessen sogenannte *cag* Pathogenitätsinsel, ein genomischer Bereich, den nicht alle *H. pylori* Stämme besitzen. Diese kodiert den *cag* Typ IV-Sekretionsapparat, der dafür verantwortlich ist, CagA und weitere Moleküle in Zellen des Magens zu sezernieren, welche zu verschiedenen Veränderungen der Wirtszelle führen und letztendlich Magenkarzinome auslösen können. Das Effektorprotein CagA wurde deshalb als Onkoprotein klassifiziert.

Bisherige Therapien einer *H. pylori* Infektion konzentrieren sich auf die Eradikation des Bakteriums mit Hilfe von Antibiotika. Doch steigende Resistenzraten gegen Antibiotika weltweit machen Alternativen in der Behandlung einer *H. pylori* Infektion notwendig. Um neue Therapieansätze für eine *H. pylori* Infektion zu finden und ein Verständnis für die Entstehung von Magenkrebs durch *H. pylori* zu gewinnen, sind bessere Kenntnisse über die einzelnen Bestandteile des Sekretionsapparats und deren Zusammenspiel und Funktionsweise wichtig. Der Typ IV-Sekretionsapparat besteht aus etwa 25 Proteinen, die alle auf der *cagPAI* kodiert sind. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf das Protein CagP gelegt, dessen Funktionsweise nicht geklärt ist, das aber für eine effiziente Typ IV-Sekretion benötigt wird.

Das *cagP*-Gen scheint mit den Genen *cagI*, *cagH*, *cagL* und *cagG* in einem funktionellen Zusammenhang zu stehen. So werden zumindest CagI und CagL vermindert produziert, wenn *cagP* fehlt. Zur weiteren Untersuchung wurde in dieser Arbeit der kürzlich etablierte HiBiT Reporter Assay genutzt, mit dem die CagP-, CagG- und CagH-Proteinmengen unter verschiedenen Bedingungen quantifiziert werden konnten. Es konnte via HiBiT Reporter Assay gezeigt werden, dass CagH, nicht aber CagG, vermindert produziert wird, wenn *cagP* deletiert wird.

Das Ungewöhnliche am *cagP*-Gen besteht darin, dass es zusammen mit einer kleinen, nicht-kodierenden RNA (HPnc2630) transkribiert wird. Der HiBiT Reporter Assay wurde genutzt um

den Einfluss der kleinen nicht-kodierenden RNA HPnc2630 auf die CagP-Produktion zu evaluieren. Dabei wurde festgestellt, dass die CagP-Menge bei Deletion von HPnc2630 deutlich ansteigt, was die Aktivität eines vorhergesagten Terminators an deren 3'-Ende bestätigt.

Mit Hilfe eines Reporterassays wurde festgestellt, dass die CagA-Translokation bei *cagP* Deletion deutlich zurück geht. Bei Deletion von HPnc2630 stieg diese hingegen an. Bei Mutation des Startcodons von *cagP* ging die CagA Translokation interessanterweise weniger stark zurück als bei einer *cagP* Deletion. Dafür könnten alternative Startcodons verantwortlich sein, welche zur Folge haben, dass trotz Mutation des vorhergesagten *cagP* Startcodons noch CagP produziert wird.

Die Menge von CagP, und auch CagH und CagG wurde außerdem unter verschiedenen äußeren Bedingungen untersucht, und es konnte festgestellt werden, dass die CagP-, und CagG-Menge bei Zellkontakt und bei längerer Inkubation in einer mikroaeroben Atmosphäre ansteigt. Ein saurer pH-Wert scheint die CagG-Produktion zu steigern. Der Transkriptionsfaktor HP1043, der viele Prozesse in *H. pylori* reguliert und eine Bindestelle innerhalb des *cagP* Promoters besitzt, beeinflusst die CagP-Produktion ebenfalls.

Insgesamt geben die hier erarbeiteten Ergebnisse weitere Einblicke in die komplexe Funktionsweise des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats und zeigen einen möglichen Regulationsmechanismus auf seine Bestandteile. Das Zusammenspiel der verschiedenen Sekretionsapparatkomponenten muss allerdings noch weiter untersucht werden, um ein genaues Bild der beteiligten Prozesse entwickeln zu können.

IV. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Vera Sophie Beißwenger, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung des Proteins CagP im Hinblick auf
dessen Funktion für den Cag Typ IV-Sekretionsapparat
in *Helicobacter pylori*

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

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

München, 18.07.24

Vera Beißwenger

Ort, Datum

Unterschrift

1 Einleitung

1.1 *Helicobacter pylori* und seine Auswirkungen

Helicobacter pylori ist ein spiralförmiges gramnegatives Bakterium, das erstmals 1982 von Barry Marshall und Robin Warren entdeckt und beschrieben wurde (Warren, Marshall, 1983; Marshall, Warren, 1984). Im Jahr 2005 wurden die beiden Ärzte mit dem Nobelpreis für die Entdeckung von *H. pylori* ausgezeichnet. Barry Marshall erlangte dabei besondere Berühmtheit, da er durch einen berüchtigten Selbstversuch die möglichen Folgen einer *H. pylori* Infektion zeigen konnte. Das Trinken eines Reagenzglases mit *H. pylori* Bakterien hatte eine schwere Gastritis bei Marshall zur Folge, die mit Antibiotika geheilt wurde (Marshall et al., 1985).

Die Tatsache, dass *H. pylori* im menschlichen Magen weitreichende Folgen haben kann, wurde seitdem oft bewiesen. Das Bakterium besiedelt die Mukosa des Magens und befindet sich dabei, je nach Azidität des Magens, vorrangig in den distalen Anteilen des Magens wie dem Antrum, kann aber grundsätzlich den gesamten Magen besiedeln (Suerbaum, Michetti, 2002; Kusters et al., 2006; Fox, Wang, 2007).

Dorthin gelangt es meist über den fäkal-oralen oder oral-oralen Übertragungsweg, wobei die Infektion meist schon im Kindesalter stattfindet (Brown 2000; Perry et al., 2006). Im Laufe der oft jahrzehntelangen Besiedlung mit dem Bakterium kann diese zu einer atrophischen Gastritis führen, und bei 10 – 15% der Infizierten zu peptischen Ulcera (Fox, Wang, 2007). Ein Teil der mit *H. pylori* Infizierten, nämlich 1 – 3%, entwickelt außerdem ein Adenokarzinom oder Lymphom (MALT) des Magens (Parsonnet et al., 1991; Watanabe et al., 1998; Uemura et al., 2001; Peek, Blaser, 2002; Fox, Wang, 2007). Dabei gilt eine atrophische Gastritis als Vorstufe für ein Adenokarzinom (Fox, Wang, 2007).

Magenkrebs kommt mit der zweithöchsten Mortalität im Zusammenhang mit Krebserkrankungen einer häufigen Todesursache der heutigen Zeit gleich (Plummer et al., 2015). Dabei ist eine Besiedelung mit *H. pylori* der größte Risikofaktor für Magenkarzinome. Da außerdem ca. 50% der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert sind, stellt die Behandlung des WHO Klasse I Kanzerogens einen wichtigen Ansatzpunkt in der Prävention von Magenkarzinomen dar (*Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens*, 2012; Martel et al.,

2013; Cover 2016). So wird geschätzt, dass *H. pylori* für insgesamt ca. 5,5% aller Krebserkrankungen des Menschen verantwortlich ist (Parkin 2006).

Allerdings führt eine Infektion mit *H. pylori* nicht zwangsläufig zu einer Entwicklung einer symptomatischen Gastritis oder sogar Karzinoms bzw. Lymphoms des Magens. Oft bleibt eine Infektion asymptomatisch und kann sogar gewisse Vorteile für den Wirt bergen. So sind ösophageale Erkrankungen, wie Karzinome in der Speiseröhre, oder auch in der Kindheit einsetzendes Asthma negativ mit einer *H. pylori* Infektion assoziiert (Cover, Blaser, 2009). Bestimmte Risikofaktoren und Faktoren des Wirtes spielen ebenfalls eine Rolle für die Entwicklung eines Karzinoms. So können z.B. bestimmte Interleukin-1 Polymorphismen eine gesteigerte Immunantwort und somit eine stärkere Entzündungsreaktion bedingen, welche dann wiederum zur Entwicklung eines Magenkarzinoms führen kann (El-Omar et al., 2000; Machado et al., 2001; Furuta et al., 2004). Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines Karzinoms sind Tabakkonsum, Alkoholkonsum, männliches Geschlecht sowie eine lange Dauer der *H. pylori* Besiedlung (Blaser et al., 2007; Wroblewski et al., 2010; Fang et al., 2015; Chen et al., 2016; Ordóñez-Mena et al., 2016).

Es sind jedoch nicht nur die Faktoren auf Seite des Wirtes entscheidend für den Verlauf einer *H. pylori* Infektion, sondern auch der Genotyp des Bakteriums. *H. pylori* und der Mensch teilen eine ca. 100 000 Jahre lange gemeinsame Geschichte, die ihren Ursprung in Afrika hat. Aufgrund der langen Koevolution hat sich *H. pylori* stark an seinen Wirt, den Menschen, angepasst, und es entwickelten sich über die Jahre viele verschiedene Genotypen mit verschiedenen Virulenzfaktoren. Die dabei entstandene genetische Vielfalt ist der hohen Mutations- und Rekombinationsrate von *H. pylori* zu verdanken (Suerbaum, Josenhans, 2007). Besonders interessant ist hierbei, dass man je nach *H. pylori* Stamm Rückschlüsse auf die geographische Herkunft der infizierenden *H. pylori* Population und somit auch auf die Herkunft der infizierten Person ziehen kann. Denn die Verbreitung und Differenzierung der verschiedenen *H. pylori* Stämme fand analog zur menschlichen Migration statt (Moodley et al., 2012; Maixner et al., 2016). So wird angenommen, dass *H. pylori* mit dem Menschen vor ca. 58 000 Jahren den Kontinent Afrika verließ und sich weiter über Asien und Europa ausbreitete (Falush et al., 2003; Linz et al., 2007).

Man kann die Spezies *Helicobacter pylori* in sechs verschiedene Populationen und in Subpopulationen unterteilen, die sich durch unterschiedliche genetische Ausstattung und zum Teil auch unterschiedliche Virulenzfaktoren auszeichnen. Hierbei ist der wichtigste Virulenzfaktor, der auch das Risiko, an Magenkrebs zu erkranken mitbestimmt, die *cag* Pathogenitätsinsel (*cagPAI*). Sie kodiert den *cag* Typ IV-Sekretionsapparat (*cagT4SS*), der die Humanpathogenität von *H. pylori* beeinflusst. Genetische Untersuchungen der Pathogenitätsinsel legen nahe, dass diese einmal erworben wurde und seither in den *H. pylori* Stämmen persistiert. Die der *H. pylori* Ursprungspopulation vermutlich genetisch am nächsten gelegene Population hpAfrica2 besitzt die *cagPAI* nämlich nicht, und ist somit auch mit einer niedrigeren Humanpathogenität assoziiert (Ogura et al., 2000; Olbermann et al., 2010).

1.2 Diagnostik und Therapie einer *Helicobacter pylori* Infektion

Da *H. pylori* wie schon beschrieben weitreichende Folgen für seinen Wirt, den Menschen, haben kann, ist es wichtig, eine *H. pylori* Infektion zu erkennen und gegebenenfalls zu behandeln. In diesem Kapitel soll deswegen die Diagnostik und Therapie einer *H. pylori* Infektion beschrieben werden. Es gibt zahlreiche Methoden, um eine Infektion zu diagnostizieren. Diese lassen sich in invasive und nicht-invasive Methode einteilen. Zunächst besteht die Möglichkeit eine endoskopische Untersuchung des Magens vorzunehmen. Diese Untersuchung wird meist vorgenommen, wenn schon der Verdacht auf eine von *H. pylori* ausgelöste Veränderung der Magenschleimhaut besteht. Bei Patienten mit Verdacht auf Magenadenokarzinom, MALT Lymphom oder Ulzerationen des Magens wird der Magen endoskopisch begutachtet und meist auch eine Biopsie entnommen. Diese wird bevorzugt aus der Antrum Region, aber auch dem Corpus des Magens entnommen. Zusammen mit dieser histologischen Untersuchung und dem optischen Erscheinungsbild lässt sich dann eine Diagnose stellen. Die histologische Untersuchung der Magenschleimhaut stellt immer noch den Goldstandard für die Feststellung einer *H. pylori* Infektion dar. Dennoch gibt es einige Faktoren, die zu falsch-negativen Ergebnissen bei dieser Diagnostik führen können. So können die Einnahme von Protonenpumpenhemmern, Entnahmeort und Größe der Biopsie und Färbemethoden Einfluss auf das Ergebnis des Tests haben (Malfertheiner et al., 2012; Wang et al., 2015). Eine weitere Form der invasiven Testmethoden ist der Urease-Schnelltest. Dabei wird eine zuvor entnommene Biopsie auf die Aktivität des Urease Enzyms getestet, indem Harnstoff als Substrat bereitgestellt wird, und dann eine Erhöhung des pH-Werts detektiert wird. Dabei liegt die Testdauer zwischen einer und 24 Stunden. Auch hier kann die Einnahme von verschiedenen Medikamenten zu falsch-negativen Ergebnissen führen, aber es lässt sich sagen, dass die Spezifität der Urease-Schnelltests meist über 95% und die Sensitivität meist über 85% liegt. (Siavoshi et al., 2015; Wang et al., 2015). Eine weitere Möglichkeit ist die Anzüchtung von *H. pylori* in einer Kultur nach der Biopsieentnahme, was allerdings fünf bis sieben Tage dauert und stark von Faktoren wie der Transportdauer der Biopsien und Erfahrungheit des Durchführenden des Tests abhängig ist (Ndip et al., 2003). Ein Vorteil dieser Testmethode ist allerdings, dass die entnommenen Bakterien auf Antibiotikaresistenzen getestet werden können (Malfertheiner et al., 2012). Die PCR (Polymerasekettenreaktion) ist mit einer Sensitivität

und Spezifität von über 95% eine sehr sichere diagnostische Methode einer *H. pylori* Infektion. Es können verschiedene Proben wie z.B. Stuhl-, und Speichelproben, aber auch Biopsien für eine PCR genutzt werden. Unter den Zielgenen können sich auch Antibiotika-Resistenzen verursachende Gene befinden, und somit auch diese Resistenzen gleich diagnostiziert werden (Lehours, Mégraud, 2011; Smith et al., 2014; Liu et al., 2015; Ontsira Ngoyi et al., 2015).

Der am meisten verwendete Test in der Gruppe der nicht-invasiven Testmethoden ist der Harnstoff-Atemtest. Kohlenstoffatome in Harnstoff werden isotopisch gekennzeichnet und der Harnstoff dem Patienten verabreicht. Die gekennzeichneten Kohlenstoffatome werden bei Urease Aktivität von *H. pylori* in Kohlenstoffdioxid umgewandelt, der dann in der Ausatemluft des Patienten detektiert werden kann. Die Sensitivität und Spezifität dieses Verfahrens liegt bei ca. 95% (Ferwana et al., 2015; Wang et al., 2015). Vergleichbar hohe Sensibilität und Spezifität kann der Stuhlproben Antigentest vorweisen. Bei diesem Test wird *H. pylori* mit Hilfe von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern in Stuhlproben des Patienten nachgewiesen (Gisbert et al., 2006; Wang et al., 2015). Bei dem serologischen Nachweis von *H. pylori* können Antikörper direkt im Blut des Patienten nachgewiesen werden. Hierbei werden die Antikörper gegen verschiedene Zielproteine, unter anderem CagA, VacA und UreA detektiert. Die Methode ist wenig von Störfaktoren wie Magenblutungen oder Medikamenteneinnahme beeinflusst, allerdings verbleiben Antikörper auch noch längere Zeit nach Eradikation im Blut (Malfertheiner et al., 2012; Wang et al., 2015).

Sobald *H. pylori* diagnostiziert wurde, wird eine entsprechende Therapie eingeleitet. Mittlerweile sehen die Leitlinien vor, dass *H. pylori* unabhängig von typischen Symptomen bei den Patienten eradiziert werden sollte (Malfertheiner et al., 2017). Eine absolute Indikation für die Eradikation stellt eine Symptomatik des Patienten, eine geplante Behandlung mit NSAID oder das Angehören des Patienten einer Risikogruppe für Magenkarzinome dar. Bei Patienten mit einem Alter über 50 Jahren bei Feststellung der Infektion sollte zusätzlich Diagnostik im Hinblick auf Gastritis, Magenulcera, und Magenkarzinomen erfolgen. Die Eradikation erfolgt entweder als Standard Triple Therapie mit Clarithromycin, Amoxicillin oder Metronidazol und einem Protonenpumpenhemmer oder als Quadruple Therapie, bei der zusätzlich noch Bismut zum Einsatz kommt. Die Einnahme der Antibiotika erfolgt für sieben bis 14

Tage, wobei einer längere Einnahme (10-14 Tage) anzustreben ist (*S2k-Leitlinie Helicobacter pylori und gastroduodenale Ulkuskrankheit*, 2017; Fischbach, Malfertheiner, 2018).

Problematisch bei der Antibiotika Therapie ist jedoch, dass immer häufiger Resistenzen auftreten. So liegt in Deutschland die Resistenzrate von *H. pylori* für Clarithromycin bereits bei 10,9%. Auch die Resistenzen gegen Levofloxacin und Metronidazol steigen (Selgrad et al., 2013).

Umso wichtiger ist es, die Pathogenitätsmechanismen von *H. pylori* zu verstehen, und somit alternative Ansatzpunkte für die Behandlung einer Infektion zu finden, und die möglichen weitreichenden Folgen dieser zu verhindern.

1.3 Virulenzfaktoren von *H. pylori*

1.3.1 Die äußeren Membranproteine

In diesem Kapitel sollen Faktoren besprochen werden, die im Zusammenhang mit der Bindung von *H. pylori* an die Magenepithelzellen einen wichtigen Beitrag zur Virulenz des Bakteriums leisten.

Ein wesentlicher Faktor, der zur Virulenz von *H. pylori* beiträgt, ist die Translokation des Onkoproteins CagA in die Wirtszelle (Segal et al., 1999). Dazu wird nicht nur der *cag* Typ IV-Sekretionsapparat sondern auch bestimmte Rezeptoren sowie äußere Membranproteine von *H. pylori* benötigt. (Backert et al., 2011).

Die äußeren Membranproteine (outer membrane proteins; OMPs) spielen für die Adhäsion von *H. pylori* an Wirtszellen eine entscheidende Rolle, da sie dafür sorgen, dass *H. pylori* an der Magenschleimhaut binden kann, und die Zelle so den Virulenzfaktoren von *H. pylori* ausgesetzt ist. Sie können in fünf Familien eingeteilt werden. Diese sind die Hop (*H. pylori* OMP)/Hor (*Hop related*) Familie, die Hof (*Helicobacter* OMP) Familie, die Hom (*Helicobacter outer membrane*) Familie und zwei weitere Familien, die Eisen-regulierte OMPs und Efflux Pumpen beinhalten (Backert et al., 2011; Oleastro, Ménard, 2013). Einige von ihnen wurden bereits ausgiebiger untersucht und sollen hier vorgestellt werden. Das OMP BabA (*blood group antigen-binding adhesin A*) vermittelt eine Bindung von *H. pylori* an das fucosylierte Lewis B Blutgruppen Antigen, und andere Fucose Reste auf der Oberfläche von Magenepithelzellen (Ilver et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass diese Bindung die Aktivität des *cagT4SS* steigert, und somit zur Virulenz von *H. pylori* beiträgt (Ishijima et al., 2011). SabA bindet an das namensgebende *sialyl-dimeric-Lewis x Glycosphingolipid* (Mahdavi et al., 2002). Für die OMPs AlpA und AlpB konnte bis jetzt Laminin als Bindungspartner identifiziert werden (Senkovich et al., 2011). Außerdem konnte in manchen Stämmen gezeigt werden, dass weniger Zytokine wie z.B. IL-8 in den Wirtszellen freigesetzt werden, wenn AlpA/AlpB deletiert werden (Lu et al., 2007). Ebenfalls wichtig für die Adhärenz von *H. pylori* ist OipA (*outer inflammatory protein A*), welches die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Magenkarzinomen und duodenale Ulcera erhöht (Yamaoka et al., 2006). Außerdem essentiell für die CagA Translokation und somit auch für die Virulenz von *H. pylori* ist das Protein HopQ (Belogolova et al., 2013; Busch et al., 2015; Javaheri et al., 2016; Königer et al., 2016; Bonsor

et al., 2018). Das kürzlich genauer beschriebene OMP HofF ist möglicherweise an der Adhärenz von *H. pylori* beteiligt, und *hofF* Deletionsmutanten zeigen weniger CagA Translokation und IL-8 Freisetzung aus Wirtszellen (Ji et al., 2017; Zhao et al., 2019). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass HofF neben den schon bekannteren *outer membrane proteins* ebenfalls zur Pathogenität von *H. pylori* beiträgt. *H. pylori* nutzt außerdem β_1 Integrine um an Magenepithelzellen zu binden (Kwok et al., 2007; Jiménez-Soto et al., 2009; Backert et al., 2011). Auch die humanen CEACAMs (Rezeptoren aus der Familie der *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*) werden als Bindungspartner genutzt, und zwar indem sie mit dem äußeren Membranprotein HopQ von *H. pylori* interagieren (Ordonez et al., 2007; Belogolova et al., 2013; Javaheri et al., 2016; Königer et al., 2016; Bonsor et al., 2018).

1.3.2 Vakuolisierendes Zytotoxin A

Als weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *H. pylori* soll hier das vakuolisierende Zytotoxin A (VacA) Erwähnung finden. Fast alle *H. pylori* Stämme besitzen das *vacA* Gen. VacA sorgt für die Bildung von Poren in Wirtszellen und hat außerdem noch weitere Effekte auf die Zellen, welche zu einer gesteigerten Pathogenität von *H. pylori* führen. Dabei können verschiedene Zelltypen das Ziel von VacA werden, wie z.B. Magenepithelzellen, Parietalzellen und auch Zellen des Immunsystems (Foegeding et al., 2016; Junaid et al., 2016). VacA wurde bereits kurz nach der Entdeckung von *H. pylori* als ein sich stark von anderen bereits bekannten bakteriellen Toxinen unterscheidendes Toxin beschrieben (Leunk et al., 1988; Cover, Blaser, 1992). Das Protein ist ca. 140 kDa groß, wird aber vor der Sezernierung durch *H. pylori* von einer unbekannt Protease am Carboxy-Ende und Sec-abhängig am Amino-Ende zugeschnitten. Dadurch entsteht letztendlich ein 88 kDa großes aktives Toxin, sowie ein ca. 12 kDa großes Peptid und ein ca. 33 kDa großes Protein. Nach Bindung an die Zielzelle verursacht VacA die Bildung von Poren. Diese Poren sind durchlässig für Chlorid, Bikarbonat und kleine organische Moleküle (Szabò et al., 1999; Tombola et al., 1999).

Durch die Ausbildung von Poren verliert die Membran der Zielzelle ihre Polarität und die Membranpermeabilität nimmt zu. Außerdem wird die Ausbildung von Vakuolen innerhalb der Zelle induziert (Morbiato et al., 2001; Genisset et al., 2007). Zusätzlich verursacht VacA Autophagie, eine Störung der Mitochondrien, und induziert verschiedene Signalkaskaden in Magenepithel und Immunzellen (Kimura et al., 1999; Boncristiano et al., 2003; Gebert et al., 2003; Nakayama et al., 2004; Hisatsune et al., 2007; Terebiznik et al., 2009). Wiederum

durch verschiedene Faktoren kann VacA letztendlich den Zelltod herbeiführen (Kuck et al., 2001; Cover et al., 2003; Radin et al., 2011; Foegeding et al., 2016).

1.3.3 Urease

Ein weiterer Faktor, der essentiell für das Überleben von *H. pylori* in dem sauren Magenmilieu und somit für seine Pathogenität im menschlichen Magen ist, ist das Protein Urease. Das Protein stellt einen Anteil von 10 - 15% am von *H. pylori* synthetisiertem Gesamtprotein dar (Bauerfeind et al., 1997; Scott et al., 1998) und sorgt für die Pufferung von H^+ Ionen. Wenn *H. pylori* in eine Umgebung mit einem pH-Wert niedriger als 6,5 gelangt, öffnet sich in der zytologischen Membran ein Harnstoff Transporter (Stingl, Reuse, 2005). Der nun in das Bakterium strömende Harnstoff wird von Urease in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid umgewandelt. Somit können freie H^+ im Bakterium abgepuffert werden und ein neutraler pH-Wert aufrechterhalten werden (Marshall et al., 1990; Scott et al., 2000; Weeks et al., 2000). Auch in der unmittelbaren Umgebung von *H. pylori* wird der pH-Wert angehoben, was den zähen Mukus flüssiger macht, und somit wiederum die Fortbewegung von *H. pylori* erleichtert (Celli et al., 2009). Ein ebenfalls wichtiger Faktor in diesem Mechanismus ist eine α -Carboanhydrase, die sich im Periplasma von *H. pylori* befindet und Bikarbonat und Protonen in Kohlenstoffdioxid umwandelt. So können weitere entstandene H^+ Ionen abgepuffert werden (Smith, Ferry, 2000). Die Aktivität der Urease wird unter anderem durch die Nickel und Harnstoff-Konzentrationen der Umgebung reguliert. Es handelt sich bei der Urease um ein Nickel-Metalloenzym, das aus den Untereinheiten UreA und UreB besteht. Nickel Ionen werden in das Enzym eingebaut, und haben daher einen Einfluss auf dessen Aktivität.

Mit Hilfe der in diesem Kapitel beschriebenen Mechanismen schafft es *H. pylori* also den widrigen Umständen des sauren Magenmilieus zu trotzen. Allerdings nutzt das Bakterium den pH-Wert bzw. seinen Gradienten auch, um sich im Magen zu orientieren. Am pH-Gradienten entlang bewegt sich *H. pylori* mit seinen unipolaren Geißeln in Mukusschichten nahe den Magenepithelzellen, um dann an die Zellen der Magenschleimhaut zu binden (Schreiber et al., 2004). Würde *H. pylori* sich nicht zur Mukusschicht orientieren, in der ein pH-Wert von ca. 6 – 7 herrscht, und im Lumen mit einem pH-Wert von ca. 2 verbleiben, könnte das Bakterium nicht überleben. Die sauren pH-Werte des Magenlumens kann *H. pylori* nur kurzfristig kompensieren, danach verliert das Bakterium seine Fähigkeit zu Motilität (Suerbaum et al.,

1993; Schreiber et al., 2005). Somit ist auch die Orientierung und Fortbewegung am pH-Gradienten essentiell für eine erfolgreiche *H. pylori* Infektion.

In den folgenden Kapiteln soll die Zusammensetzung und Funktion des *cag* Typ IV Sekretionssystems erläutert werden, sowie die Auswirkungen des *cag*T4SS auf zellulärer Ebene behandelt werden.

1.4 Das *cag* Typ IV-Sekretionssystem von *Helicobacter pylori*

1.4.1 Auswirkungen des *cagT4SS* auf zellulärer Ebene

Wie schon beschrieben, ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori* die *cag* Pathogenitätsinsel, die den *cag* Typ IV Sekretionsapparat kodiert. Die *cagPAI* ist ca. 37 kb lang und beinhaltet ca. 27 Gene (Fischer et al., 2001). Je nachdem, ob ein *H. pylori* Stamm die *cagPAI* besitzt, handelt es sich um einen virulenteren, der Magengeschwüre und Magenkarzinome auslösen kann, oder einen weniger virulenten Stamm (Ogura et al., 2000). Ein Anteil von ungefähr 70% der *H. pylori*-Isolate weltweit besitzen die *cagPAI* (Olbermann et al., 2010).

Das Sekretionssystem dient dazu, das Effektorprotein CagA (*cytotoxin-associated antigen A*) in die Wirtszellen, die Magenepithelzellen, Granulozyten oder Makrophagen sein können, zu translozieren, wo CagA von Tyrosinkinasen phosphoryliert wird (Segal et al., 1999; Odenbreit et al., 2000; Stein et al., 2000). CagA ist nicht die einzige Komponente, die über den Sekretionsapparat in die Wirtszellen injiziert wird. Auch Peptidoglykan-Bausteine, DNA Fragmente und ADP-*glycero*- β -D-*manno*-heptose (ADP-Heptose) bzw. Heptose-1,7-Bisphosphat können auf diese Weise transportiert werden (Viala et al., 2004; Varga et al., 2016; Stein et al., 2017; Varga, Peek, 2017; Pfannkuch et al., 2019).

In den Magenepithelzellen wird so durch die Bindung von *H. pylori* und Translokation von Molekülen eine inflammatorische Reaktion angestoßen, die mit der Freisetzung von Zytokinen wie IL-8 einhergeht.

Auch TNF α (*tumor necrosis factor*), GM-CSF (*granulocyte-monocyte colony-stimulating-factor*), und ENA-78 (*epithelial cell-derived neutrophil-activating protein*) werden nach Kontakt der Magenepithelzellen mit *H. pylori* vermehrt sezerniert (Rieder et al., 1997; Foryst-Ludwig, Naumann, 2000; Rieder et al., 2001). Die IL-8-Produktion wird über den Transkriptionsfaktor NF-kappa β induziert, der wiederum durch ADP-Heptose aktiviert wird (Zimmermann et al., 2017; Faass et al., 2021). Bei der Aktivierung des NF- κ B Signalwegs scheint auch Peptidoglykan eine Rolle zu spielen (Viala et al., 2004). Ebenfalls unabhängig von CagA ist die Aktivierung von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR oder Her2/Neu (Keates et al., 2001; Churin et al., 2003; Tegtmeyer et al., 2010). Das sind nur einige Beispiele für die Effekte des *cagT4SS*, die nicht auf CagA zurückzuführen sind.

Allerdings hat die Injektion von CagA bekannterweise einige gravierende Veränderungen in der Wirtszelle zur Folge, so wird z.B. die Leukozytenmigration gehemmt (Busch et al., 2015). Wenn man über die Folgen von CagA in Wirtszellen spricht, ist es wichtig zu unterscheiden, ob CagA phosphoryliert oder unphosphoryliert wirkt. Wie schon erwähnt, wird das Effektorprotein nach Aufnahme in die Wirtszelle von den Tyrosinkinase Src und Abl an bestimmten Stellen, den sogenannten EPIYA-Motiven (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), phosphoryliert (Hatakeyama 2008; Wessler, Backert, 2008; Mueller et al., 2012). Das phosphorylierte CagA (CagA^{PY}) interagiert dann mit Proteinen der Signalkaskaden in eukaryotischen Zellen über deren *Src homology 2* (SH2) Domänen. Einige Beispiele als Interaktionspartner von CagA^{PY} sind die Tyrosinphosphatasen SHP1 und SHP2, die Adaptorproteine Grb2/Grb7/Crk, die Ras GTPase und die Tyrosinkinase Csk, Src und Abl (Selbach et al., 2009; Backert et al., 2010). Durch die Beeinflussung dieser Signalkaskaden verändert sich das Aktin Zytoskelett der Zellen und es entsteht der sogenannte „*hummingbird*“ Phänotyp. Dieser ist bestimmt durch die Verformung der Zellen, die eine längliche und flache Form annehmen, und sich von den anderen Zellen separieren und ausbreiten (Selbach et al., 2009; Tegtmeyer et al., 2011).

Aber auch unphosphoryliertes CagA hat Auswirkungen auf die eukaryotische Zelle. So werden die Verbindungen zwischen Zellen („*tight-junctions*“) durch das Onkoprotein aufgelöst und die Zellpolarität geht verloren (Amieva et al., 2003). Auch der NF-κB Signalweg und somit IL-8 Freisetzung kann durch unphosphoryliertes CagA aktiviert werden (Backert et al., 2010; Tegtmeyer et al., 2011).

Zusammengenommen lässt sich sagen, dass das *cagT4SS* und das Onkoprotein CagA in den Zielzellen durch verschiedenste Interaktionspartner zu einer Veränderung der Zellform, Zellpolarität und Induktion einer inflammatorischen Reaktion führen, welche wie schon erwähnt die Grundlagen für eine maligne Entartung darstellen.

1.4.2 Aufbau und Komponenten des *cagT4SS*

Obwohl es zahlreiche Hinweise zur Funktion des *cagT4SS* im Verlauf der Infektion gibt, ist diese noch nicht im Detail geklärt. Der Transport von CagA könnte zum Beispiel der Versorgung von *H. pylori* mit Eisen dienen, was bereits mehrfach untersucht wurde (Senkovich et al., 2010; Tan et al., 2011; Haley et al., 2014). Modelle für den Aufbau des Sekretionssystems beruhen auf Vorhersagen und Strukturuntersuchungen wie z.B. Kryoelektronenmikroskopie,

müssen allerdings noch abschließend evaluiert werden (Cover et al., 2020). Der Sekretionsapparat besteht aus ca. 25 Komponenten und wird zusammen mit Sekretionspili ausgebildet (Fischer 2011). Pili sind dabei T4SS-assoziierte Oberflächenstrukturen, die als haarartige Fortsätze sichtbar gemacht werden können (ibid.). Da CagA an der Spitze der Pili nachgewiesen konnte, geht man davon aus, dass die Sekretionsapparate im Zusammenhang mit den Pili ausgebildet werden (Kwok et al., 2007). Das *cagT4SS* von *H. pylori* unterscheidet sich in vielen Komponenten von den aus anderen Bakterien bekannten Typ IV-Sekretionsapparaten (Fischer et al., 2010). Es gibt allerdings einige Gene, die als Homologe zu anderen bekannten T4SS-Proteinen identifiziert wurden (siehe Tabelle 3.1). So wurden für folgende Proteine Ähnlichkeiten in Topologie und Funktion zu den Vir-Proteinen von *A. tumefaciens* vorhergesagt bzw. bestätigt (Fischer et al., 2001; Andrzejewska et al., 2006; Kutter et al., 2008).

<i>cagT4SS</i> Protein	Vir - Homolog
CagE	VirB4
CagX	VirB9
CagY	VirB10
Cag α	VirB11
Cag β	VirD4
Cag γ	VirB1
CagC	VirB2
CagL	VirB5
CagW	VirB6
CagT	VirB7
CagV	VirB8

Tabelle 1.1: *cagT4SS* Proteine und ihre Vir-Homologe

Einige Komponenten sind essentiell für die Funktion des *cagT4SS*, darunter alle bisher genannten Cag-Proteine. Wiederum andere Proteine scheinen nur für die volle Funktion des Sekretionsapparats nötig zu sein (Fischer et al., 2001; Selbach et al., 2002; Shaffer et al., 2011).

Das *cagT4SS* kann in verschiedene funktionelle Einheiten aufgeteilt werden, nämlich einen Kernkomplex der äußeren Membran, einen periplasmatischen Ringkomplex und einen Teil, der den periplasmatischen Bereich mit der inneren Membran und somit dem inneren Kernkomplex verbindet (Chung et al., 2019).

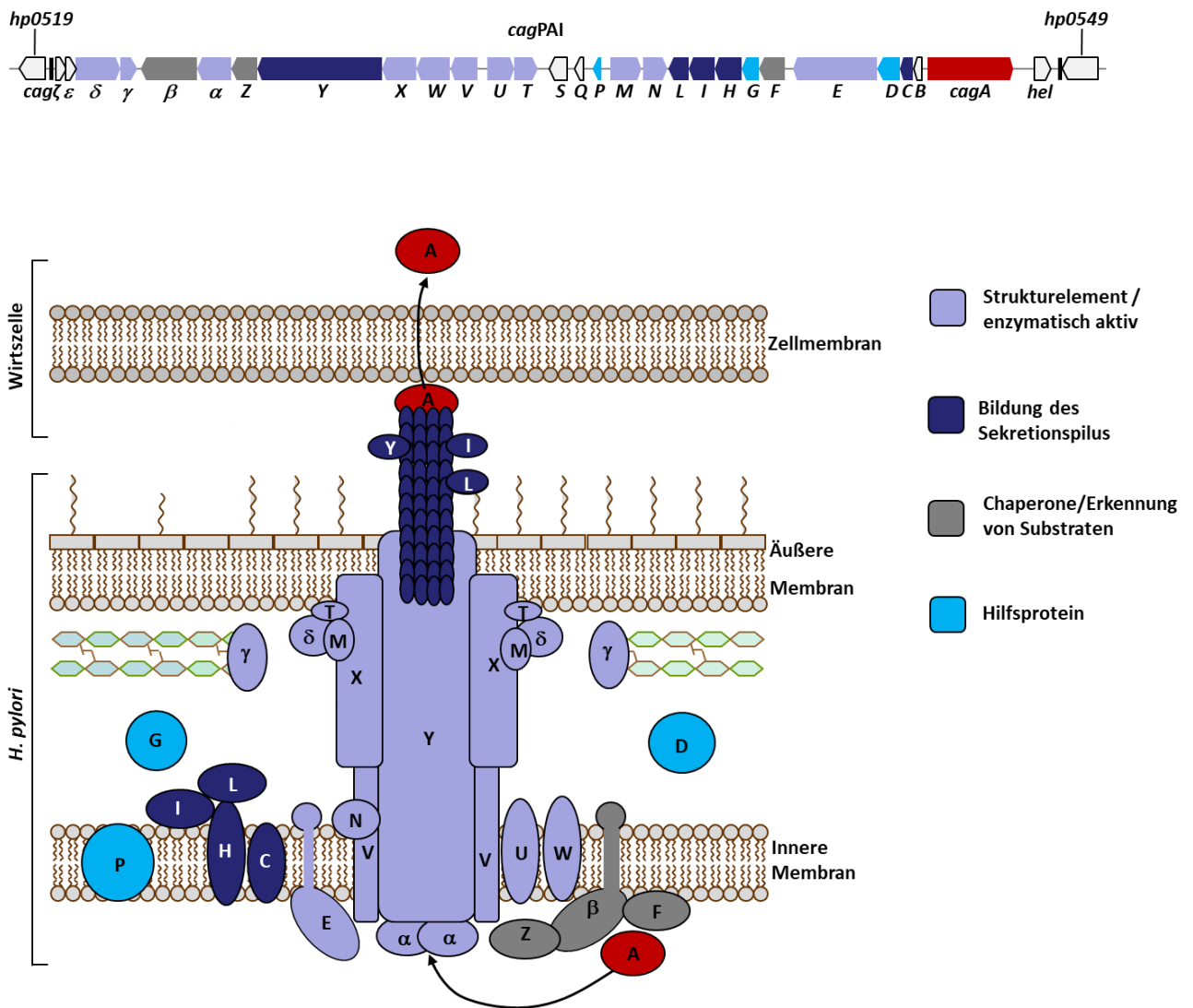


Abbildung 1.1: Der *cag* Typ IV-Sekretionsapparat

Oben: Anordnung der Gene auf der *cag* Pathogenitätsinsel.

Unten: Aufbau des *cagT4SS* laut Vorhersagen und bisherigen Daten (modifiziert nach Fischer 2011 (Fischer 2011)).

Der äußere Membrankomplex besteht aus den Komponenten CagX, CagY, CagM, CagT, and Cag3 (siehe Abb. 1.1). Die ATPasen Cag α , Cag β , and CagE tragen hingegen zur Bildung des inneren Kernkomplexes bei (Hu et al., 2019).

Außerdem gibt es eine Reihe von Proteinen, die ebenfalls am Aufbau und der Funktion des *cagT4SS* beteiligt sind, deren genaue Position im Apparat oder Funktion für die Aktivität des *cagT4SS* aber noch ungeklärt ist. Dazu gehören die sich auf der *cagPAI* befindlichen Gene

cagP, *cagG* und *cagH*. CagH scheint dabei, wie CagI und CagL, an der Ausbildung des Sekretionspilus beteiligt zu sein (Shaffer et al., 2011). Die Gene *cagH*, *cagI* und *cagL* liegen in einem Operon mit *cagG*, welches sich stromaufwärts von diesen Genen befindet. CagP wird in der inneren Membran von *H. pylori* vermutet und gehört nicht zu den essentiellen Bestandteilen des *cagT4SS* (Fischer 2011). Allerdings scheint CagP dennoch eine wichtige Rolle für die volle Funktionalität des *cagT4SS* zu spielen. So führte eine Deletion des *cagP*-Gens zu einer starken Einschränkung der Typ IV-Sekretion, und zu einer geringeren Menge an CagH, CagI, und CagL (R. Nair, S. Laue, und W. Fischer, unveröffentlichte Daten). Stromaufwärts von *cagP* befindet sich eine kleine nicht-kodierende RNA (HPnc2630 oder CncR1, siehe Abbildung 1.2). HPnc2630 wurde bereits im Hinblick auf ihre Funktion untersucht, und es wurde nachgewiesen, dass sie die Motilität und Adhäsion von *H. pylori* beeinflussen kann (Sharma et al., 2010; Vannini et al., 2016). Außerdem enthält die kleine RNA einen Terminator an ihrem 3'-Ende in Form einer *Stem-Loop* Struktur ((Sharma et al., 2010; Vannini et al., 2016).

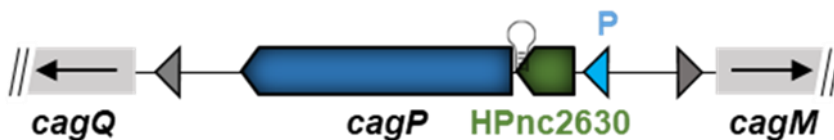


Abbildung 1.2: Der *cagP* Genlocus

Schematisch dargestellt ist der *cagP* Genlocus mit der stromaufwärts gelegenen kleinen nicht-codierenden RNA

In einer vorausgegangenen Arbeit (S. Laue & W. Fischer, unveröffentlicht) ergaben sich Hinweise darauf, dass in *H. pylori* nur sehr geringe Mengen von CagP hergestellt werden; dies konnte auf die schwache Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem *cagP*-Startcodon zurückgeführt werden.

1.5 Ziele dieser Arbeit

In den vorherigen Kapiteln wurden schon ausgiebig die Virulenzmechanismen und die daraus folgende Humanpathogenität des Bakteriums *Helicobacter pylori* besprochen. Zahlreiche Todesfälle aufgrund von Magenkarzinomen oder MALT Lymphomen sind auf *H. pylori* zurückzuführen. Die aktuelle Therapie einer *H. pylori* Infektion besteht hauptsächlich aus antibiotischer Behandlung, was aufgrund der steigenden Resistenzraten problematisch sein kann. Ein Ziel der aktuellen *H. pylori* Forschung ist es deshalb, einen Weg zu finden, die Virulenzmechanismen des Bakteriums auszuschalten, ohne die antimikrobiellen Behandlungswege ausschöpfen zu müssen. Ein für die Humanpathogenität hochrelevanter Virulenzfaktor ist das Cag Typ IV–Sekretionssystem. Der Sekretionsapparat ist durch die Translokation des Onkoproteins CagA und anderer Moleküle an der Entwicklung von Entzündungsreaktionen und im weiteren Verlauf Magenkarzinomen beteiligt. Um den Sekretionsapparat als möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Therapien nutzen zu können ist es essentiell, dessen Funktionsweise zu verstehen. Die Zusammensetzung und das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des *cagT4SS* ist noch nicht abschließend untersucht und Bestandteil der aktuellen *H. pylori* Forschung. Dabei ist funktionell wenig bekannt über die Gene *cagI*, *cagH*, und *cagG*, die sich zusammen mit *cagL* ein Operon teilen. Das *cagP*-Gen scheint hierbei mit den genannten Genen in funktionellem Zusammenhang zu stehen.

Obwohl es Hinweise dafür gibt, dass diese Gene für die volle Funktion des *cagT4SS* benötigt werden, ist nicht klar, wie diese Komponenten zusammenspielen, und inwiefern sie eine mögliche regulatorische Rolle einnehmen.

In dieser Arbeit sollte das mutmaßliche Membranprotein CagP untersucht werden. Dabei war ein Ziel der Arbeit zu evaluieren, inwiefern *cagP* und HPnc2630 die Aktivität des *cagT4SS* beeinflussen.

Des Weiteren sollte der Zusammenhang zwischen *cagP* und HPnc2630 und anderen Proteinen des *cagT4SS*, nämlich CagH und CagG, untersucht werden. Dazu sollte auf eine in der Arbeitsgruppe neu etablierte Methode (HiBiT Reporter Assay) zurückgegriffen und diese gegebenenfalls in ihrer Anwendung erweitert werden.

Außerdem sollte eine mögliche regulatorische Rolle von *cagP* durch vergleichende Messungen unter verschiedenen Umweltbedingungen untersucht werden.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

2.1.1 *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
E. coli TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMSmcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 *H. pylori*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
P12 (VB1)	Wild-Typ; Klinisches Isolat (888-0) eines Patienten der Universität Hamburg mit Ulcus duodeni im Jahr 1994	(Schmitt, Haas, 1994)
RNP3 (VB3)	P12 [TEM-CagA]	R. Nair, W. Fischer
RNP4 (VB4)	tem-cagA (RNP3); Δ cagP::rpsL-erm (pWS503)	R. Nair, W. Fischer
RNP3 Δ cagT (VB9)	P12 [TEM-CagA] Δ cagT (pJP95)	W. Fischer
pSL12 (VB48)	tem-cagA (RNP3); P-up-HiBiT-cagP mf	S. Laue, W. Fischer
pSL13 (VB5)	tem-cagA (RNP3); cagA(up)-HiBiT-cagP mf (pSL13)	S. Laue, W. Fischer
AupTerm4 (VB13)	tem-cagA (RNP4); A-up-HiBiT-cagP (pVB1)	Diese Arbeit
pVB1 (VB108)	tem-cagA (RNP4); A-up-HiBiT-cagP (pVB1)	Diese Arbeit
HiBiT-CagA (VB8)	HiBiT-cagA mf	W. Fischer
recA-HiBiT (VB65)	tem-cagA (RNP3); recA-HiBiT (pWS703)	W. Fischer
HiBiT-CagH (VB7)	tem-cagA (RNP3); HiBiT-cagH mf (pWS695)	W. Fischer
HiBiT-CagG (VB49)	tem-cagA (RNP3); HiBiT-cagG mf (pWS694)	W. Fischer
mutATG (VB15)	tem-cagA (RNP3); cagP (ATG>>TAG) mf (pWS503/pWS682)	W. Fischer
mutATG-683 (VB37)	tem-cagA (RNP3); cagP (ATG>>TAG); Palp-cagIL (pWS683)	Diese Arbeit
mutATG- 546 (VB33)	tem-cagA (RNP3); cagP (ATG>>TAG); Palp-cagHIL (pWS546)	Diese Arbeit
Δ cagP- 546	tem-cagA (RNP3); Δ cagP mf (pWS684); Palp-cagHIL (pWS546)	W. Fischer
CagG-HiBiT Δ cagP (VB51)	tem-cagA (RNP4); cagG-HiBiT Δ cagP (pWS316)	Diese Arbeit
CagG-HiBiT Δ nc2630 (VB54)	tem-cagA (RNP4); cagG-HiBiT Δ nc2630 (pWS426)	Diese Arbeit
CagH-HiBiT Δ cagP (VB27)	tem-cagA (RNP4); cagH-HiBiT Δ cagP (pWS316)	Diese Arbeit

CagH-HiBiT Δ nc2630 (VB31)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); <i>cagH</i> -HiBiT Δ nc2630 (pWS426)	Diese Arbeit
RNP4 pVB2 (VB123)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); <i>cagP</i> -HiBiT Δ nc2630 (pVB2)	Diese Arbeit (HiBiT Assays)
RNP4 pVB2 (VB124)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); <i>cagP</i> -HiBiT Δ nc2630 (pVB2)	Diese Arbeit (TEM Assays)
RNP4 pVB3 (VB139)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle (pVB3)	Diese Arbeit
CagG-HiBiT pVB3 (VB76)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); <i>cagG</i> -HiBiT Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle (pVB3)	Diese Arbeit
CagH-HiBiT pVB3 (VB83)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); <i>cagH</i> -HiBiT Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle (pVB3)	Diese Arbeit
RNP4 pVB4 (VB111)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); <i>cagP</i> -HiBiT mutHP1043 Bindestelle (pVB4)	Diese Arbeit
RNP4 pVB5 (VB77)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); Deletionen in <i>cagP</i> Starterregion: Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> (ATG>>TAG) (pVB5)	Diese Arbeit
RNP4 pVB7 (VB78)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); Deletionen in <i>cagP</i> Starterregion: Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, Δ <i>cagP</i> SD Sequenz, Δ <i>cagP</i> Startcodon (pVB7)	Diese Arbeit
RNP4 pVB8 (VB110)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); Deletionen in <i>cagP</i> Starterregion: Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, Δ <i>cagP</i> SD Sequenz, Δ <i>cagP</i> Startcodon und weitere 24 Basen stromabwärts davon (pVB8)	Diese Arbeit
RNP4 pVB9 (VB80)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); Deletionen in <i>cagP</i> Starterregion: Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, Δ <i>cagP</i> SD Sequenz, Δ <i>cagP</i> Startcodon und weitere 78 Basen stromabwärts davon (pVB9)	Diese Arbeit
RNP4 pVB10 (VB79)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); Δ <i>cagP</i> Promoter (pVB10)	Diese Arbeit
G27 pVB1 (VB147)	tem- <i>cagA</i> ; A-up-HiBiT- <i>cagP</i> (pVB1)	Diese Arbeit
AupTerm4 Δ <i>hopQ</i> (VB84)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); A-up <i>cagP</i> -HiBiT Δ <i>hopQ</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pFS10)	Diese Arbeit
G-2 Δ <i>hopQ</i> (VB88)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagG</i> -HiBiT Δ <i>hopQ</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pFS10)	Diese Arbeit
H Δ <i>hopQ</i> (VB90)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagH</i> -HiBiT Δ <i>hopQ</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pFS10)	Diese Arbeit
AupTerm4 Δ <i>hofF</i> (VB92)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); A-up <i>cagP</i> -HiBiT Δ <i>hofF</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pWS708)	Diese Arbeit
G-2 Δ <i>hofF</i> (VB96)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagG</i> -HiBiT Δ <i>hofF</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pWS708)	Diese Arbeit
H Δ <i>hofF</i> (VB98)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagH</i> -HiBiT Δ <i>hofF</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pWS708)	Diese Arbeit
AupTerm4 Δ <i>babA</i> (VB100)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); A-up <i>cagP</i> -HiBiT Δ <i>babA</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pLH3)	Diese Arbeit
G-2 Δ <i>babA</i> (VB104)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagG</i> -HiBiT Δ <i>babA</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pLH3)	Diese Arbeit
H Δ <i>babA</i> (VB106)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagH</i> -HiBiT Δ <i>babA</i> :: <i>rpsL-erm</i> (pLH3)	Diese Arbeit
AupTerm4 Δ <i>cagT</i> (VB112)	tem- <i>cagA</i> (RNP4); A-up <i>cagP</i> -HiBiT Δ <i>cagT</i> (pJP95)	Diese Arbeit

G-2 $\Delta cagT$ (VB114)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagG</i> -HiBiT $\Delta cagT$ (pJP95)	Diese Arbeit
H $\Delta cagT$ (VB116)	tem- <i>cagA</i> (RNP3); <i>cagH</i> -HiBiT $\Delta cagT$ (pJP95)	Diese Arbeit

2.2 Nährmedien für Bakterien

<i>Brucella</i> -Medium	28 g/l Brucella Broth (BD, Franklin Lakes, USA), autoklaviert
<i>E. coli</i> -Einfriermedium	80 % LB, 20 % Glycerin
<i>H. pylori</i> -Flüssigkultur	90 % BB, 10 % FCS
<i>H. pylori</i> -Einfriermedium	70 % BB, 20 % FCS, 10 % Glycerin
LB-Medium	20 g/l Lennox-L-Medium (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA), autoklaviert
LB-Platten	32 g/l Lennox-L-Agar (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA), autoklaviert
Serum-Platten	36 g/l GC-Agar-Base (Oxoid, Darmstadt, Deutschland), autoklaviert, danach Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix und 80 ml/l Pferdeserum
Ham's F12	definiertes Medium (Testerman et al., 2006)
Vitaminmix	100 g/l α -D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoessäure, 0,25 g/l Nicotinamidadeninucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l LArginin, 0,5 g/l Uracil
Pferdeserum	HyClone, Thermo Fisher (behandelt mit 56 °C, 20 min)
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (behandelt mit, 56 °C, 20 min)

2.3 Antibiotika

Hemmstoff	Lösungsmittel	Konzentration	Hersteller
Chloramphenicol (Cam)	EtOH	30 mg/l (<i>E. coli</i>) 6 mg/l (<i>H. pylori</i>)	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
Erythromycin (Erm)	EtOH	250 mg/ml (<i>E. coli</i>) 10 mg/ml (<i>H. pylori</i>)	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

Kanamycin (Kan)	ddH ₂ O	50 mg/l (<i>E. coli</i>) 8 mg/l (<i>H. pylori</i>)	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
Streptomycin (Strep)	ddH ₂ O	250 mg/ml (<i>E. coli</i>) 250 mg/ml (<i>H. pylori</i>)	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

2.4 Zelllinien

AGS	Humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739)
Kato III	Humane Magenkarzinom-Zelllinie (ATCC HTB-103)

2.5 Zellkulturmedien und -puffer

DPBS	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI Medium 1640 mit L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA

2.6 Plasmide

Name	Eigenschaften	Referenz
Hp5kb_05J10 / pSL6	Vektor: pSMART-HCKan, chromosomales Fragment <i>cagU</i> bis <i>cagM</i>	W. Fischer
pWS683	<i>pHel12::cagIL</i> -Überexpression (<i>alpA</i> Promoter)	W. Fischer
pWS546	<i>pHel12::cagHIL</i> -Überexpression (<i>alpA</i> Promoter)	W. Fischer
pWS316	Δ <i>cagP::cat</i>	W. Fischer
pWS426	Δ <i>nc2630::cat</i>	W. Fischer
pVB1	A-up <i>cagP</i> -HiBiT; Primer: VB1, VB2; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pVB2	A-up <i>cagP</i> -HiBiT Δ <i>nc2630</i> ; Primer: WS825, WS817; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pVB3	Δ <i>cagG</i> mRNA Bindestelle; Primer: WS858, WS762; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pVB4	mutHP1043 Bindestelle; Primer: WS859, WS770; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pVB5	Deletierte Regionen: <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> Startcodon mutiert zu Stoppcodon; Primer: WS858, WS763; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pVB7	Deletierte Regionen: <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> SD Sequenz, <i>cagP</i> Startcodon; Primer: WS858, PT4; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit

pVB8	Deletierte Regionen: <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> SD Sequenz, <i>cagP</i> Startcodon und weitere 24 Basen stromabwärts davon; Primer: WS858, WS783; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pVB9	Deletierte Regionen: <i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> SD Sequenz, <i>cagP</i> Startcodon und weitere 78 Basen stromabwärts davon; Primer: WS858, WS784; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pVB10	Deletierte Regionen: <i>cagP</i> Promoter; Primer: WS762, WS262; Vektor: Hp5kb_05J10	Diese Arbeit
pWS503	$\Delta cagP::rpsL-erm$	W. Fischer
pWS708	$\Delta hofF::rpsL-erm$	W. Fischer
pFS10	$\Delta hopQ::rpsL-erm$	F. Schindele
pLH3	$\Delta babA::rpsL-erm$	L. Holsten
pWS686	<i>cagP</i> Startcodon zu Stoppcodon, $\Delta nc2630$	W. Fischer
pJP95	$\Delta cagT::cat$	(Fischer et al., 2001)

2.7 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' zu 3')	Restriktionsenzym	Eigenschaften/Verwendung
VB1	GAACTAGTTCAAGGCGGTGAAC	SpeI	Herstellung Plasmid pVB1 (<i>cagA</i> SD CagP-HiBiT)
VB2	ATACTAGTTCTTTAGTAAGGAGAAACAAT-GGTGTCTGGTTGGCGACTTTTCAAGAAAAT-TAGCCTGAAACGACCGATTAGCAAATTAAG	SpeI	Herstellung Plasmid pVB1 (<i>cagA</i> SD CagP-HiBiT)
hp537r	ACGTCTCGAG GATTTTTGCA AGCATCTTA		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer
WS770	CAG TGT CGA CTC ATA AGA ACC AAT TTT GCC	NdeI/SpeI	Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer, Herstellung pVB4 (mutHP1043 Bindestelle, CagP-HiBiT)
WS780	ACTGGTCGACTTCAAAGGGATTATTCTTGGC		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer, liegt in <i>cagM</i>
WS405	ACCGGTCGAC TTTAGTAGGA AGCATTTCAC		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer, liegt in <i>cagQ</i>
UB110	AACGATGAAGCTTCTAGCTTGCTA		PCR Primer zur Überprüfung von DNase Verdau für qPCR, Zielgen ist 16S-rRNA
UB111	GTGCTTATTCSTNAGATACCGTCAT		PCR Primer zur Überprüfung von DNase Verdau für qPCR, Zielgen ist 16S-rRNA

fwd <i>cagP</i>	ACCAATTTTGCCATTGAGTCATAA		6-Fam 5' Tag, BHQ-1 3' Tag, qPCR Primer für <i>cagP</i> (Sonde: TTTT-GCGTGGCTTAAG)
rev <i>cagP</i>	TGCTACTCGTTTCTCTCAGCATAATAA		6-Fam 5' Tag, BHQ-1 3' Tag, qPCR Primer für <i>cagP</i> (Sonde: TTTT-GCGTGGCTTAAG)
fwd <i>cagl</i>	TGACGCCAAGCAAGATGTCT		6-Fam 5' Tag, BHQ-1 3' Tag, qPCR Primer für <i>cagl</i> (Sonde: AAC-CTGCAAAAACCCCCTGTCATG)
rev <i>cagl</i>	TGGCGTTATTAATGGTGTCAATG		6-Fam 5' Tag, BHQ-1 3' Tag, qPCR Primer für <i>cagl</i> (Sonde: AAC-CTGCAAAAACCCCCTGTCATG)
fwd 16s	GGGTCCGCCCTACGAATTAC		Primer für die 16S-rRNA (Kontrolle qPCR)
rev 16s	GCG GGA TTT GCT ACC TAC GA		Primer für die 16S-rRNA (Kontrolle qPCR)
WS439	GCGGATCCAT AGTAGGGTAT TCTTTGG		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer
WS858	TAGGATCCGGA GCA TAG GAA ATA ATA AGT ATT TTA C	BamHI	Herstellung Plasmid pVB3, pVB5, pVB7, pVB8, pVB9
WS762	ACGTGGATCC TGAAGTAGTT CTTTCAAAC	BamHI	Herstellung Plasmid pVB3, pVB10
WS825	ACT GAC TAG TGT TTC TAT CCA AAA AAC ACA GG	SpeI, XhoI	Herstellung Plasmid pVB2 (Δ nc2630 <i>CagP-HiBiT</i>)
WS817	GAT CCT CGA GCA AGA CGT TTC	SpeI, XhoI	Herstellung Plasmid pVB2 (Δ nc2630 <i>CagP-HiBiT</i>)
WS859	TGC TCA TAT GTA GCT TGT TGG TAT TTG AAT CTT TTA TCT TAA GGT TAT TTT TAT AC	NdeI/SpeI	Herstellung pVB4 (mutHP1043 Bindestelle, <i>CagP-HiBiT</i>)
WS763	ACGTGGATCC TGAAGTAGTT CTTTCAAAC CAAATAGAAA CGAC	BamHI	Herstellung pVB5
PT4	G ATC GGATCC AAA CGA CCG ATT AGC AAA TT	BamHI	Herstellung pVB7
WS783	GCG GAT CCA AAT TAA AAC AAA ACT TTT TAC AAT TC	BamHI	Herstellung pVB8
WS784	GCG GAT CCA AAT ACA GCC TTT ATT ATA GGC	BamHI	Herstellung pVB9
WS262	CGGGATCCAC ACTATAAGAC ATAGATTTTA C	BamHI	Herstellung pVB10
WS776	GGACTAGTTAAGGAGAAACACATATGAAACT- GAG		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer, liegt in <i>cagT</i>

WS681	TCA CAG AGC AAT GAT CTT TTA AAT		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer, liegt in <i>cagU</i>
hh64	CAG CGG ATC CAT GCT TTA TAA CTA TGG ATT		Überprüfung Existenz <i>rpsL-erm</i> Kasette
hh66	GCG GAT CCT TAC TTA TTA AAT AAT AAT TTA TAG		Überprüfung Existenz <i>rpsL-erm</i> Kasette, Sequenzierprimer <i>hoff</i> Genlocus
WS218	GGGGTACCTT AACTCCTTT TTCTTTCA		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer
WS866	CTC ACT CTC ATA GGT TCT G		Sequenzierprimer <i>hoff</i> Genlocus, PCR Primer
CE82	TGG TGA TAA AGG TCG TTA AAC CCG C		Sequenzierprimer <i>hopQ</i> Genlocus, PCR Primer
CE83	CGG CGA TGG AAC TAA ACT CTA AGG C		Sequenzierprimer <i>hopQ</i> Genlocus, PCR Primer
LH3	GAT CCT CGA GGT AGT TGG TTT AAG CGG TTG		Sequenzierprimer <i>babA</i> Genlocus, PCR Primer
LH6	GAT CGC GGC CGC ATT AGT ATT AGG GAT TTC AC		Sequenzierprimer <i>babA</i> Genlocus, PCR Primer
WS403	ACCGGTCGAC CATGTTATTA CTCATATCG		Sequenzierprimer <i>cagP</i> Genlocus, PCR Primer, liegt in <i>cagS</i>
RH136	ATAAGAATGCGGCCGCTAAATGACTAAG-GAAGCTAAAATGGAG		Sequenzierprimer <i>cagT</i> Genlocus, PCR Primer
WS260	CGGGATCCAA TTAAAAATG ATGAGTGC		Sequenzierprimer <i>cagT</i> Genlocus, PCR Primer

2.8 Proteine und Enzyme

Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Pferdeserum HyClone	GE-Healthcare (Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich)
Protein G-Agarose	Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA) Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH (Ipswich, USA)
RNase	Quiagen (Venlo, Niederlande)

Takara-Ex Taq®-Polymerase	TaKaRa Bio Inc. (Otsu, Japan)
GoScript™ Reverse Transkriptase	Promega (Fitchburg bei Madison, USA)
DNase	Promega (Fitchburg bei Madison, USA)
GoTaq® Polymerase	Promega (Fitchburg bei Madison, USA)
NanoLuc® Luziferase	Promega (Fitchburg bei Madison, USA)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

2.9 Antikörper

Zielprotein (α -)	Eigenschaften	Verdünnung	Referenz/ Hersteller
α -CagH (Anti 541)	polyklonaler Antikörper gegen CagH (Kaninchen)	1:1.000	K.T. Pham
α -CagI (Anti 540)	polyklonaler Antikörper gegen CagI (Kaninchen)	1:2.000	(Pham et al., 2012)
α -CagL (Anti 539/AK271)	polyklonaler Antikörper gegen CagL (Kaninchen)	1:1.000	(Kutter et al., 2008)
α -CagF (Anti 543/AK284)	polyklonaler Antikörper gegen CagF (Kaninchen)	1:1.000	(Pattis et al., 2007)
α -CagA (AK299)	polyklonaler Antikörper gegen CafA (Kaninchen)	1:5.000	(Schindele et al., 2016)

2.10 Verwendete Molekulargewichtsmarker

DNA-Gelelektrophorese	GeneRuler 1 kb DNA Ladder, SM0313 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
-----------------------	--

Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards #1610376 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Prestained Protein MW marker #26612 Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.11 Lösungen und Puffer

GEBS	20 % Glycerin 50 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 0,5 % Sarcosyl (N-Lauryl-Sarcosin); pH 8,0
Ligase-Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA
Milchpulver-Lösung 5 %	5 g Milchpulver, fettarm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf 100 ml TBS-Tween 0,5 % auffüllen
PBS (1x)	27 mM KCl 1,38 M NaCl 15 mM KH ₂ PO ₄ 80 mM Na ₂ HPO ₄
CutSmart® Puffer	New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA
RIPA	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) Nonidet P-40 0,25 % (v/v) Sodiumdesoxycholat
SDS Elektrophoresepuffer (5x)	25 mM Tris 250 mM Glycin auf 4,5 l Aqua dest. Auffüllen; pH 8,3 Zugabe 20 % SDS auf 5 l Aqua dest. auffüllen
SDS-Probenpuffer (2x)	100 mM Tris-HCl pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
STET	50 mM Tris-HCl; pH 8,0 50 mM EDTA 8 % (w/v) Sucrose 5 % (v/v) Triton X-100

TAE (50x)	Tris 242 g 90 % CH ₃ COOH 0,5 M EDTA; pH 8,0
TBS (10x)	150 mM NaCl 200 mM Tris-HCl; pH 7,5
TBS-Tween 0,5 %	100 ml 10x TBS 0,5 ml Tween 20 auf 1 l Aqua dest. auffüllen
Tfbl-Puffer (steril fil- triert, pH 5,8)	30 mM Kaliumacetat 100 mM Rubidiumchlorid (RbCl) 10 mM Calciumchlorid (CaCl ₂) 50 mM Manganchlorid (MnCl ₂) 15 % (v/v) Glycerol
TfblI-Puffer (steril fil- triert, pH 6,5)	10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure 10 mM Rubidiumchlorid (RbCl) 75 mM Calciumchlorid (CaCl ₂) 15 % (v/v) Glycerol
Tris-HCl pH 6,8 pH 8,8 pH 8,0 pH 9,6	1 M Tris mit 37 % Tris-HCl 1,5 M Tris mit 37 % Tris-HCl 1 M Tris mit 37 % Tris-HCl 0,1 M Tris mit 37 % Tris-HCl
Anode I-Puffer	300 mM Tris-HCl; pH 10,4 10 % Methanol
Anode II-Puffer	25 mM Tris-HCl; pH 10,4 10 % Methanol
Kathode-Puffer	25 mM Tris-HCl; pH 9,6 40 mM 6-Aminocaprinsäure 10 % Methanol
Puffer P1	50 mM Tris 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase (Roche); pH 8.0
Puffer P2	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer N3	3 M Kaliumacetat; pH 5.5
ExTaq® Puffer	TaKaRa Bio, Shiga, Japan
ATL Puffer	Quiagen, Venlo, Niederlande
AW 1 Puffer	Quiagen, Venlo, Niederlande
AW 2 Puffer	Quiagen, Venlo, Niederlande
Capture Buffer	GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
Washing Buffer	GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
RNAprotect Bacteria Reagent	Quiagen, Venlo, Niederlande

TE-Puffer	Tris EDTA Puffer
BL Puffer	Promega, Madison, USA
Wash Solution	Promega, Madison, USA
Column Wash Solution	Promega, Madison, USA
DNase Puffer	Promega, Madison, USA
GoScript® Enzympuffer	Promega, Madison, USA
FastStart Essential DNA Probes Master Mix	Roche, Basel, Schweiz
NanoGlo® Blotting Buffer	Promega, Madison, USA
Lösung A (CCF4)	Invitrogen, Waltham, USA
Lösung B	Invitrogen, Waltham, USA
Lösung C	Invitrogen, Waltham, USA
DMPC-H ₂ O	Thermo Fisher Scientific/J.T. Baker, Waltham, USA
Nuklease-freies Wasser	Promega, Madison, USA

2.12 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
BCIP (5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-pToluidinsalz)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bypiridin	Merck, Darmstadt, Deutschland
B-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
β-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-) Mix	TaKaRa Bio, Shiga, Japan
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ethanol reinst	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Fe-II-sulfat	Fluka / Altmann Analytik, München, Deutschland
Furimazin	Promega, Madison, USA
Glycerin	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Magnesiumchlorid MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Magnesiumchlorid MgCl ₂ (25 mM)	TaKaRa Bio, Shiga, Japan
Methanol	Thermo Fisher Scientific/J.T. Baker, Waltham, USA

Methylenblau	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA oder Merck
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Probenecid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)	Serva, Heidelberg, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamid)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Thioglycerin	Promega, Madison, USA
Tris	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

2.13 Kommerzielle Kits

Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit™	GE-Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
QIAamp DNA Mini Kit®	Quiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit	Quiagen, Venlo, Niederlande
Reliaprep™ RNA Kits	Promega, Madison, USA
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega, Madison, USA
FastStart Essential DNA Probes Master	Roche, Basel, Schweiz
Live-BLazer™-FRET B/G loading kit	Invitrogen, Waltham, USA
Nano-Glo® HiBiT lytic Detection System	Promega, Madison, USA

2.14 Verbrauchsmaterialien

12-Well Costar® Zellkulturplatten	Corning Inc., Corning NY, USA
6-Well Costar® Zellkulturplatten	Corning Inc., Corning NY, USA
96-Well Costar® Zellkulturplatten, U-Wells, durchsichtig	Corning Inc., Corning NY, USA

96-Well Costar® Zellkulturplatten, schwarz, durchsichtiger Boden	Corning Inc., Corning NY, USA
96-Well qPCR Platten, weiß	Roche, Basel, Schweiz
Einmalküvetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Einmalpipette Costar® Stripette, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Inc., Corning NY, USA
Einmalspitzen, verschiedene Größen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Einmalspritzen Omnifix® 50 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcon® Röhrchen 15 ml, 50 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Filterpapier Nitrocellulose	Millipore, Billerica, USA
Filterpapier Whatman®	Whatman, Brentford, Vereinigtes Königreich
Kryoröhrchen Nalgene™ 1,5 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitrocellulose Membran	GE-Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
Parafilm® M	Bemis Company Inc., Neenah, USA
Pasteurpipetten	Hecht-Assistent, Fritzens, Deutschland; Kimble Applications, London, Vereinigtes Königreich
PCR-Tubes	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Petrischale	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
PVDF Membran	Bio-Rad, Hercules, USA
Reaktionsgefäß; safe-lock; 1,5 ml,	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Merck Millipore, Billerica, USA
Wasser doppelt destilliert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wattestäbchen, steril	Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen Falcon® Canted Neck, 250 ml	Corning Inc., Corning NY, USA
Zellschaber steril Falcon®	Corning Inc., Corning NY, USA

2.15 Geräte und Apparaturen

Agarose-Gelkammern	BioRad, Hercules, USA
Anaerobenbrutschrank Mikroinkubator MI22C	Scholzen, Wittenbach, Schweiz
Anaerobiertopf	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Blot-Apparatur <i>semi-dry</i>	Biotech Fischer, Reiskirchen, Deutschland
Brutschrank 37 °C	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HERAcell® 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

CLARIOstar®	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Geldokumentationssystem ChemiDoc™ MP Imaging System	BioRad, Hercules, USA
Gelkammer Mini-PROTEAN 2	BioRad, Hercules, USA
LightCycler®96	Roche, Basel, Schweiz
Magnetrührer MR 3000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroliterpipette Transferpette S	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Leica DM IRB Mikroskop	Leica, Mannheim, Deutschland
pH-Meter ProfiLine pH197i	WTW, Weilheim, Deutschland
PIPETMAN® P10, P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Rollmixer SU1400	Sunlab GmbH, Aschaffenburg, Deutschland
Revco Ultima Inkubator	GS Laboratory Equipment, Asheville, USA
Schüttelinkubator Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator CERTOMAT® IS	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Spannungsquellen PowerPac 300, Power Pac Universal	BioRad, Hercules, USA
Spektrophotometer DR/2000	Hach, Bremen, Deutschland
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland

Stripettor™ Ultra. Pipet Controller	Corning Inc., Corning NY, USA
Thermocycler peqSTAR	Thermocycler peqSTAR Peqlab Ltd., Fareham, Vereinigtes Königreich
Transferpipette® -8	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Ultraschallgerät Sonifier 450	Branson Ultrasonics™, Danbury, USA
Vortex Genie 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserbad 1012	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen: Centrifuge 5424 R, Megafuge 3.0R, Vakuumzentrifuge Savant Speed Vac DNA 110, Mikro 120 Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Heraeus, Hanau, Deutschland; GMI, Ramsey, USA; Hettich, Kirchlingern, Deutschland

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

3.1.1.1 *Escherichia coli*

Für die Anzüchtung von *Escherichia coli* Bakterien wurden Luria-Bertani-(LB)-Agar Platten genutzt. Die Bakterien wurden aus Glycerinkulturen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Neue Stämme wurden in *E. coli* in 800 µl Einfriermedium resuspendiert und bei -70°C gelagert.

3.1.1.2 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori Stämme wurden aus glycerinhaltigen Kulturen auf Serumplatten ausgestrichen und bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) für ca. 60 Stunden inkubiert. Bei Verwendung für Experimente wurden die *H. pylori* Stämme zweimal passagiert, wenn nötig auf antibiotikahaltigen Serumplatten, und für jeweils 24 Stunden in einer CO₂ reichen Atmosphäre (10% CO₂) inkubiert.

Für Flüssigkulturen wurde Brucella-Medium, angereichert mit 10% FCS (BB/FCS), genutzt. Das Medium wurde mit einer OD₅₅₀ von 0,1 angeimpft und für 24 h unter mikroaeroben Bedingungen im Anaerobiertopf mit 100 rpm inkubiert.

Die Konservierung neuer Stämme erfolgte in *H. pylori* Gefriermedium, wobei das Bakterienmaterial einer halben Agarplatte in ca. 800 µl Medium suspendiert und dann bei -70°C gelagert wurde.

3.1.2 Transformation von Bakterien

3.1.2.1 Transformation von *E. coli*

Die chemisch kompetenten Rubidium-Chlorid Zellen (Hanahan 1983) wurden hergestellt, indem 200 ml LB-Medium mit 20ml einer Übernachtskultur *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,56 bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurde die Bakteriensuspension zehn Minuten zentrifugiert (3000 g, 4°C), der Überstand verworfen und 80ml gekühltes TfbI zugege-

ben. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 8 ml gekühltem TfbII suspendiert und Aliquots von je 50 µl hergestellt, die bei -70°C gelagert wurden.

Bei der Transformation wurden zunächst 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und im Anschluss 5 µl der aufzunehmenden DNA (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) zugegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 90 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und wieder 60 Sekunden auf Eis gelegt. Der Transformationsansatz wurde in 1 ml Brucella Medium suspendiert und 1 h bei 37°C und 1300 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (5 min, 2500 g) wurde der Überstand verworfen und das Zellmaterial in 200 µl Brucella Medium resuspendiert und jeweils 100 µl auf LB-Platten, angereichert mit Antibiotika zur Selektion, ausplattiert. Anschließend wurden diese für 24 h bei 37°C inkubiert.

3.1.2.2 Transformation von *H. pylori*

Da *H. pylori* natürlich kompetent ist, konnten die Zellen ohne vorherige Behandlung für die Transformation genutzt werden (Haas et al., 1993). Zunächst wurde *H. pylori* von Serumplatten entnommen und in BB/FCS suspendiert. In 12-Well Platten bei einem Volumen von 1 ml und einer OD₅₅₀ von 0,15 wurde die Bakteriensuspension 1 h (37°C, 10% CO₂, 100 rpm) inkubiert und anschließend 5 µl Plasmid-DNA pro Transformationsansatz zugegeben. Nach erneuter Inkubation unter den oben genannten Bedingungen für 4 Stunden wurden die Ansätze auf antibiotikahaltigen Serumplatten ausplattiert, und 3 bis 5 Tage unter mikroaeroben Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) inkubiert und danach einzelne Klone selektiert.

3.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien

Zunächst wurden die Bakterien von Agarplatten mit Wattestäbchen entnommen und in entsprechenden Medien resuspendiert. Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen wurde dann mit Hilfe eines Spektrophotometers durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD₅₅₀) erfasst.

3.1.4 Kultivierung von Zellen

3.1.4.1 Kultivierung von AGS-Zellen

Die Zellen der Magenepithel-Zelllinie AGS sind adhärenente Zellen und wurden mit RPMI-Medium 1640, angereichert mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ in einer 75 cm²- Kulturflasche (BD Falcon®) kultiviert. Durch regelmäßige Verdünnung wurde die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens verhindert. Vor der Verdünnung wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend ca. 5 Minuten mit einer Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C behandelt, was zu einem Ablösen der Zellen führte. Nach der Zugabe von 5 ml RPMI-Medium 1640, die zu einer Inaktivierung der Trypsin-EDTA-Lösung führte, wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 (für 2 Tage vor Versuchsdurchführung) verdünnt.

3.1.4.1 Kultivierung von Kato III-Zellen

Kato III-Zellen, Zellen einer Magenkarzinomzelllinie, wurden analog zur AGS-Zelllinie verdünnt. Da Kato Zellen aber semiadhärent sind musste vor der Ablösung der adhärenenten Zellen, die in dem Fall durch 2 mM EDTA erfolgte, der Überstand der Kulturflasche entnommen und zentrifugiert werden (5 Minuten, 1000 rpm). Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml RPMI-Medium 1640 supplementiert mit 20% FCS resuspendiert und wieder den inzwischen abgelösten Kato III-Zellen zugeführt. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:4 (für 2 Tage vor Versuchsdurchführung) verdünnt.

3.1.5 *In vitro*-Infektion von AGS-, bzw. Kato III-Zellen

Zur experimentellen Nachahmung von Infektionen der menschlichen Magenschleimhaut mit *H. pylori* wurden *In vitro*-Infektionen durchgeführt. Dazu wurden die AGS-Zellen in 96-Well Platten 2 Tage vor Durchführung des Experiments in RPMI-Medium 1640 supplementiert mit 10% FCS entsprechend verdünnt (1:4 für zwei Tage Inkubation) und bei 37°C inkubiert. Die endgültig erreichte Zellzahl betrug ca. $4,5 \times 10^4$ auf 0,5 cm². Bei Infektion mit *H. pylori* Bakterien, die zuvor je nach Versuch in Brucella Medium mit einer OD₅₅₀ von 0,075 (TEM-1-CagA-Translokationsassay) oder PBS angereichert mit 10% FCS (PBS/FCS) mit einer OD₅₅₀ von 0,5 (HiBiT Reporter Assay) suspendiert wurden, wurde das Zellmedium entfernt und 100 µl bzw. 200 µl der Bakteriensuspension zugegeben. Anschließend wurden Zellen und *H. pylori* bei

37°C und 5% CO₂ für 2,5 Stunden inkubiert und danach abhängig von der Fragestellung ein TEM1-CagA-Translokations-Assay oder HiBiT-Reporter-Assay durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.3 und 3.3.4).

Die Infektion von Kato III-Zellen erfolgte analog zu der von AGS-Zellen, allerdings wurde aufgrund der Semiadhärenz der Zelllinie in die 69-Well Platten je 50 µl unverdünnte Zellsuspension in RPMI-Medium 1640 (20% FCS) gegeben, und der Medium-Überstand vor Zugabe der Bakterien nicht entfernt. Anschließend wurden je 50 µl Bakteriensuspension mit einer OD₅₅₀ von 1 zugegeben, und somit letztendlich wieder eine OD₅₅₀ von 0,5 im Versuchsansatz mit einer vergleichbaren Zell-, und Bakteriendichte zu der AGS-Zell-Infektion erreicht.

Nach Inkubation unter oben genannten Bedingungen wurde ein HiBiT-Reporter-Assay durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung genomischer *H. pylori* DNA

Um genomische DNA aus *H. Pylori* zu isolieren, wurde das QIAamp DNA Mini Kit® (Quiagen) nach Befolgung der Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden die Bakterien mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens von Serumplatten in 500 µl PBS in Suspension gebracht, im Anschluss 5 Minuten zentrifugiert (8000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert. Das restliche Vorgehen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers des QIAamp DNA Mini Kit® (Quiagen). Es wurden 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) zur Bakteriensuspension gegeben und diese dann für ein bis drei Stunden, bis zur vollständigen Auflösung des Zellpellets, bei 56 °C und 300 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL Puffer und anschließendem Mischen wurde die Lösung für 10 Minuten bei 70 °C und 300 rpm erneut inkubiert. 200 µl Ethanol (96 - 100 %) wurden zugegeben und der Ansatz erneut gemischt. Danach wurde der Versuchsansatz unter Verwendung der Trennsäulen des Kits von Quiagen aufgereinigt. Nach Zentrifugation bei 8000 rpm für eine Minute wurde der Überstand verworfen, 500 µl AW 1 Puffer zugegeben und der Überstand nach erneuter Zentrifugation bei 8000 rpm für eine Minute wieder verworfen. Es wurden 500 µl AW 2 Puffer zugegeben und bei 14000 rpm für drei Minuten zentrifugiert, anschließend der Überstand erneut verworfen. Die Trennsäulen wurden für jeweils fünf Minuten mit zwei Mal 200

µl doppelt-destilliertem Reinstwasser (ddH₂O) inkubiert und durch jeweils anschließende Zentrifugation für eine Minute bei 8000 rpm die gelöste *H. pylori* DNA gewonnen.

3.2.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurden zunächst Bakterien mit einer abgeflamten Impföse von einer über Nacht bei 37°C inkubierten Agarplatte entnommen und in 250 µl P1 Puffer resuspendiert. 250 µl P2 Puffer wurden zugegeben und die Lyse Reaktion nach Mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes nach fünf Minuten durch Zugaben von 350 µl N3 Puffer unterbrochen. Nach erneutem Mischen durch Invertieren des Gefäßes wurde der Ansatz bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, und der Überstand in ein sauberes Gefäß überführt. Nach Zugabe von 700 µl Isopropanol und anschließendem Mischen wurde der Ansatz für 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Danach wurde wieder bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1000 µl Ethanol (70 %) gewaschen, indem es nach Zugabe des Ethanols für fünf Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Das getrocknete Pellet wurde als letzter Schritt in 100 µl ddH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Um gezielt spezifische DNA-Abschnitte zu multiplizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Die PCR wurde mit der ExTaq[®] Polymerase (TAKARA) in einem 50 µl Ansatz durchgeführt.

Für 5 Minuten bei 95°C fand die primäre Denaturierung statt, bei der die zwei Stränge der *template* DNA getrennt wurden. Im Anschluss daran folgte ein sich 30-mal wiederholender Zyklus aus 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden *Annealing*, sprich Anlagerung der Oligonukleotidprimer an das 3`- bzw. 5`-Ende der *template* DNA, bei 52°C, und schließlich je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments (1 Minute pro 1000 bp) die Elongation bei 68°C. Danach fand bei 68°C für 10 Minuten die finale Elongation statt. Während der Elongation wurde das von den Primern flankierte DNA-Fragment von der ExTaq[®]-Polymerase vervielfältigt und somit eine ausreichende Menge des gewünschten DNA-Abschnitts erzeugt.

Im Folgenden ist die Zusammensetzung des 50 µl PCR Ansatzes dargestellt:

1 µl *template*-DNA

0,5 µl 3'-Oligonucleotidprimer (10 µM)

0,5 µl 5'-Oligonucleotidprimer (10 µM)

5 µl 10x ExTaq®-Puffer

6 µl Magnesiumchlorid (MgCl₂, 25 mM)

4 µl dNTPs (2,5 mM)

32,9 µl ddH₂O

0,1 µl ExTaq®-Polymerase

3.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Um die fehlerfreie Polymerase-Kettenreaktion oder Testverdaue von Plasmiden zu überprüfen wurde eine DNA-Elektrophorese mit einem einprozentigen Agarosegel durchgeführt. Die zu überprüfenden DNA-Fragmente wurden hierbei in zuvor im Gel geformte Taschen gegeben, und durchliefen dann, aufgrund der angelegten Spannung von 70 V, ungefähr 1 Stunde das von TAE-Elektrophoresepuffer bedeckte Gel. Die DNA Proben wurden hierbei im Verhältnis 1:1 mit 2× GEBS-Puffer gemischt und es wurden jeweils 5 µl Puffer und Probe pro Tasche aufgetragen. Anschließend wurde das Gel ca. 20 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt und die Banden mit Hilfe des Geldokumentationssystem ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad) sichtbar gemacht.

Wenn die korrekte Größe von Plasmidfragmenten getestet werden sollte, die danach wiederum für die Konstruktion weiterer Plasmide verwendet wurden, wurde das Gel nach der Elektrophorese nicht in Ethidiumbromid, sondern einer wässrigen Methylenblaulösung (0,1%, w/v) für ca. 30 Minuten gefärbt. Im Anschluss wurde das Gel bis zur Sichtbarkeit der Banden mit Wasser ausgewaschen und passende Banden konnten ausgeschnitten und weiterverarbeitet werden.

3.2.5 DNA-Fragment Aufreinigung

Um die aus der oben beschriebenen Gelelektrophorese gewonnenen DNA-Ausschnitte, PCR-Produkte, oder aus Restriktionsenzymreaktionen entstandene DNA-Abschnitte weiterverarbeiten zu können, ohne mit Verunreinigungen rechnen zu müssen, wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt. Das geschah mit Hilfe des Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit™ (GE-Healthcare), welches nach dem Protokoll des Herstellers verwendet wurde. Dafür wurden 50 µl aus PCRs oder enzymatischen Reaktionen entstandene DNA Lösung zu 500 µl Aufnahmebuffer gegeben und mit diesem vermischt. Oder aber es wurde eine ausgeschnittene Bande eines Gelelektrophorese Gels bei 60 °C mit 10 µl Aufnahmebuffer pro 10 mg Agarosegel inkubiert, bis das Gel aufgelöst war. Im Anschluss an beide Schritte wurde der Aufnahmebuffer mit der gelösten DNA auf die Trennsäulen des Kits übertragen und der Ansatz für 30 Sekunden bei 16 000 g zentrifugiert, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Es wurden 500 µl Waschpuffer Typ 1 auf die Säulen gegeben und erneut für 30 Sekunden bei 16 000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Schließlich wurden 50 µl ddH₂O auf die Trennsäulen gegeben und 60 Sekunden lang inkubiert, um im Anschluss für 60 Sekunden bei 16 000 g zu zentrifugieren. Der Durchfluss des letzten Schrittes stellte die aufgereinigte DNA dar, und konnte bei -20 °C gelagert werden.

3.2.6 Restriktionsenzymverdau

Um Plasmide auf ihre Richtigkeit zu prüfen oder um Plasmide oder PCR Produkte zur Weiterverarbeitung zu spalten wurden Verdauungen mit Restriktionsendonukleasen angesetzt. Die Verdauungen erfolgten mit Restriktionsenzymen von Thermo Fisher Scientific oder New England Biolabs sowie den entsprechenden Puffersystemen.

Verdauansatz für analytische Restriktion:

1 µl 10x Puffer

4 µl ddH₂O

0,5 µl je Restriktionsendonuklease

4 µl Proben-DNA

Der Verdauansatz wurde für ca. 1 h bei 37°C inkubiert und danach mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und kontrolliert (siehe Kapitel 3.2.4).

Verdauansatz für präparative Restriktion und PCR-Produkte:

5 µl 10x Puffer

1,5 µl je Restriktionsendonuklease

45 µl Vektor-DNA/aufgereinigtes PCR-Fragment

Für präparative Verdaue wurde der Ansatz 3 Stunden bei 37°C inkubiert und die entstandenen Fragmente wiederum per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und Fragmente in der richtigen Länge aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.5) und weiterverarbeitet. Aus PCRs entstandene DNA-Abschnitte wurden vor Ansatz des Restriktionsenzymverdaus ebenfalls aufgereinigt.

3.2.7 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde ein Reaktionsansatz mit je 1 µl T4 DNA-Ligase, 10x Ligase Puffer und Vektor (*backbone*) mit 7 µl einzufügende DNA (*insert*) und somit einem Gesamtvolumen von 10 µl hergestellt und für circa 12 Stunden bei 4°C inkubiert.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Um die Sequenz bestimmter DNA-Abschnitte zu überprüfen und zu analysieren, wurden DNA-Proben (je 5 µl) mit Primer (5 pmol/ml) von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Die gewonnenen Sequenzdaten wurden anschließend mit Hilfe der ComputerSoftware CLC DNA Workbench 6 (Quiagen) analysiert und ausgewertet.

3.2.9 RNA Isolation

Um RNA aus Bakterienmaterial zu gewinnen wurde als erster Schritt das RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit (Quiagen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Im hier verwendeten Versuchsaufbau (siehe Kapitel 4.6.2) wurde *H. pylori* von der Platte entnommen und Vorkulturen mit einer OD₅₅₀ = 1 in 2 ml angesetzt. Es wurden 6-Well Platten genutzt und

die Vorkulturen 2 Stunden bei 37°C, 10% CO₂ und 90 / 100 rpm inkubiert. Danach wurde jeweils das doppelte Volumen des RNAprotect Reagenz (RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit) zugegeben. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen bei 5000 rpm für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei -25 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Mit Hilfe des Reliaprep™ RNA Kits (Promega) wurde aus dem Pellet im Anschluss die RNA isoliert. Dafür wurde auf Eis und mit RNase freien Materialien gearbeitet. Für die Lyse des Zellmaterials wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer (pH = 8, enthielt 400 µg/ml Lysozym) resuspendiert und unter regelmäßigem Mischen für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 350 µl BL Puffer (enthielt 10 µg/ml Thioglycerin und 10 µg/ml Mercaptoethanol) zur Suspension gegeben und mit dieser vermischt. Nach Zugabe von 250 µl Ethanol (96 %) wurde die Mischung in die Trennsäulen des Kits gegeben und in Schritten von je 500 µl mit 14000 g für 45 Sekunden zentrifugiert, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Im Anschluss wurden zunächst 500 µl RNA Waschlösung auf die Trennsäule gegeben, mit 14000 g für 45 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, dann 200 µl Trennsäulen-Waschlösung zugegeben, erneut mit 14000 g für 30 Sekunden zentrifugiert und wiederum der Durchfluss verworfen. Die Trennsäule wurde nochmals wie schon beschrieben mit RNA Waschlösung behandelt und schließlich die Trennsäulen ein letztes Mal mit 300 µl RNA Waschlösung durch zweiminütige Zentrifugation bei 14000 g aufgereinigt. Mit 50 µl Nuklease freiem Wasser wurden die in der Trennsäule befindlichen Nukleinsäuren gelöst und durch Zentrifugieren bei 14000 g für eine Minute in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Eis gelagert.

Als nächster Schritt wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Der zuvor gewonnene Versuchsansatz wurde mit DMPC-H₂O auf 50 µl aufgefüllt und je 5 µl DNase sowie 5 µl DNase Puffer zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C für 60 Minuten wurden 5 µl Inaktivierungspuffer pro Probe addiert. Während der anschließenden fünfminütigen Inkubation wurde regelmäßig vorsichtig gemischt. Danach wurde für zwei Minuten bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Mit Hilfe einer PCR und anschließender Gelktrophorese (siehe Kapitel 3.2.3 und 3.2.4) wurde überprüft, ob das gewonnene Material tatsächlich nur RNA enthält. Die hierfür verwendeten Primer waren UB110/111. Die RNA wurde bei -70 °C gelagert.

3.2.10 cDNA Synthese

Um cDNA aus der isolierten RNA zu gewinnen, wurde das GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) den Herstellerangaben entsprechend benutzt. Es wurden jeweils 500 ng der isolierten RNA entnommen und mit Nuklease freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Pro Probe wurden dann je 4 µl GoScript™ Enzympuffer, 4 µl Nuklease freies Wasser und 2 µl GoScript™ reverse Transkriptase addiert. Anschließend wurden die Ansätze zunächst für fünf Minuten bei 25 °C, dann für 60 Minuten bei 42 °C und schließlich für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.11 Quantitative PCR

Um die Menge der hergestellten RNA für bestimmte Proteine zu bestimmen, wurden quantitative Polymerasekettenreaktionen (qPCR) mit Hilfe des LightCycler®96 Real-Time PCR Systems (Roche) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Primer für die zu untersuchenden Gene wurden in einer Konzentration von 30 µM verwendet. Die Sonden, die jeweils am 5`-Ende mit einem 6-FAM fluoreszierendem Farbstoff und am 3`-Ende mit einem BHQ-1 Quencher markiert waren, wurden mit einer Konzentration von 25 µM eingesetzt. Pro Well der 96-Well Platte (Roche) wurde ein Volumen von 20 µl angesetzt, bestehend aus Primern und Sonden in oben genannten Konzentrationen sowie des FastStart Essential DNA Probes Master Mix (Roche) nach Herstellerprotokoll und je 2,5 µl der zuvor hergestellten cDNA (siehe Kapitel 3.2.10). Zur Kontrolle wurden ddH₂O, sowie RNA Proben und DNA Proben anderer Spezies (*Aspergillus*) verwendet. Die Menge der RNA wurde relativ quantifiziert, das heißt die Menge der Zyklen der zu untersuchenden Gene wurde ausgewertet, indem sie auf ein Referenzgen mit nicht schwankender RNA Menge (16s) bezogen wurde. Die Daten wurden mit Hilfe der LightCycler®96 Software (Roche) analysiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um das Molekulargewicht von einzelnen Proteinen bestimmen zu können, wurden Proteinlysate mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Proteinlysate wurden hergestellt, indem *H. pylori* Zellmaterial von Serumplatten

entnommen und mit einer OD₅₅₀ von 10 in PBS, 2x SDS-Probenpuffer und 5 % des Gesamtvolumens Mercaptoethanol suspendiert wurde. Danach wurde das Zelllysate bei 95°C für 10 Minuten aufgekocht und bis zur Auftragung der Proben auf Eis gelagert.

Die Gele, die bei der SDS-PAGE durchwandert werden, bestanden aus Trenn-, und Sammelgel und waren wie folgt zusammengesetzt (siehe Tabelle 3.1). Die Angaben gelten für je ein Gel mit 5 ml Trenngelvolumen und 1 ml Sammelgelvolumen.

	8%	12%	15%	
Trenngel	2,3	1,6	1,1	H₂O
	1,3	2	2,5	Acrylamid Mix (30 %)
	1,3	1,3	1,3	Tris HCl (pH 8,8 ; 1,5 M)
	0,05	0,05	0,05	SDS (10 %)
	0,05	0,05	0,05	Ammonium Persulfat (10 %)
	0,003	0,002	0,002	TEMED
Sammelgel	0,68			H₂O
	0,17			Acrylamid Mix (30 %)
	0,13			Tris HCl (pH 6,8 ; 1,0 M)
	0,01			SDS (10 %)
	0,01			Ammonium Persulfat (10 %)
	0,001			TEMED

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Western Blot Gele

Es wurden zwischen 5 und 15 µl Proteinlysate aufgetragen und eine Spannung von 120 V angelegt. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 250 mM Glycin, 0,1 % SDS, und 25 mM Tris-HCl. Nach circa 90 Minuten wurde die Gelelektrophorese gestoppt und die aufgetrennten Proteine konnten auf eine PVDF-, oder Nitrocellulose-Membran übertragen werden (siehe Kapitel 3.3.2).

3.3.2 Western Blot und HiBiT Blot Technik

Um die zuvor aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden sie entweder auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF Membran, Western Blot) oder eine Nitrocellulose Membran (HiBiT Blot Technik) übertragen. Das geschah mit Hilfe einer Semi-Dry-Blotting Kammer (Biotec-Fischer), die mit einer Stromstärke von 50 mA pro Gel in 90 Minuten Laufzeit die Proteine auf die Membran transferierte. Die Membran und das Gel wurden hierbei

zwischen zwei dicke Whatman Filterpapieren getränkt in Anode-I-Puffer, zwei dünne Whatman Filterpapieren getränkt in Anode-II-Puffer und zwei dicke und zwei dünne Whatman Filterpapieren getränkt in Kathode-Puffer gelegt. Dabei war die Membran stets auf der Seite der Anode und das Gel auf der Seite der Kathode. Während die PVDF Membran vor der oben beschriebenen Anordnung in der Blotting Kammer für 5 Sekunden in Methanol aktiviert werden musste, war das bei der Nitrocellulose Membran nicht nötig.

Um die Proteine mit Hilfe von Antikörpern im Sinne der klassischen Western Blot Technik sichtbar zu machen, wurde die PVDF Membran nach dem Transfer eine Stunde lang mit einer Blockierungslösung (TBST mit 5% Milchpulver) behandelt, damit freie Bindungsstellen auf der Membran besetzt wurden. Danach wurde der erste Antikörper je nach zu detektierendem Protein auf die Membran gegeben (Verdünnung je nach Antikörper, in 5 ml TBST mit 5% Milchpulver) und für mehrere Stunden auf dem Rollmischer inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit 1x TBST gewaschen und der zweite Antikörper (Protein A / AP) je nach zu detektierendem Protein zugegeben (1:5000, in 5 ml TBST mit 5 % Milchpulver). Nach einer Stunde Inkubation auf dem Rollmischer wurde die Membran erneut mit TBST gewaschen und danach in 10 ml Detektionslösung gefärbt. Die Reaktion wurde bei Sichtbarkeit der Banden mit Wasser gestoppt.

Wenn die Proteine mit Hilfe der HiBiT Blot Technik (siehe Kapitel 3.3.4) dargestellt werden sollten, wurde die Nitrocellulose Membran direkt nach dem Blotten für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 3 ml in der HiBiT NanoGlo® Blotting Lösung (Promega) inkubiert. Das HiBiT NanoGlo® Blotting System wurde nach Herstellerangaben verwendet und der Färbeansatz setzte sich zusammen aus 2,7 ml ddH₂O, 300 µl NanoGlo® Blotting Puffer (Promega) und 15 µl LgBit (Promega). Nach der Inkubationszeit von einer Nacht wurden 6 µl Substrat zugegeben und noch einmal für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe des ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad) detektiert und die entstandenen Bilder mit Hilfe der Image Lab Software (BioRad) ausgewertet.

3.3.3 TEM-1-CagA-Translokations-Assay

Die Virulenz von *H. pylori* zeichnet sich insbesondere durch die Injektion des Effektorproteins CagA in die Wirtszelle aus. Um diese CagA Translokation zu quantifizieren, wurde der neuartige TEM-1-CagA-Translokations-Assay verwendet. Grundlage dieses Assay ist die Fusion der β -Laktamase TEM-1 mit dem Effektorprotein CagA. Die β -Laktamase spaltet nach Erreichen des Zellinneren der Wirtszelle das Substrat CCF4-AM (Live-BLAzer™-FRET B/G loading kit, Invitrogen), das nun anstelle eines grünen ein blaues Fluoreszenzsignal aussendet. Über das Blau-Grün-Verhältnis, also dem Quotienten aus den Lichtemissions-Absolutwerten, lässt sich die Menge an transloziertem CagA berechnen. Dabei wird vor Berechnung von diesem Quotienten der Hintergrund von den Absolutwerten abgezogen, welcher sich aus Wells ohne Zellen aber mit CCF4-AM (Blanks) ergibt (Schindele et al., 2016).

Um die Infektion von *H. pylori* in den Magenepithelzellen nachzuahmen, wurden AGS-Zellen zwei Tage vor Durchführung des Assays verdünnt in einer 69-Well Platte (96-Well Costar® Zellkulturplatten, Corning Inc.) angesetzt (siehe Kapitel 3.1.5). Nach Entfernung des Zellmediums wurden 200 μ l *H. pylori* Suspension (BB/FCS) mit einer OD₅₅₀ von 0,075 pro Well zugegeben. Die Infektion fand für 2,5 Stunden statt, danach wurde die Bakteriensuspension entfernt und je 50 μ l Beladelösung pro Well eingesetzt. Die Zusammensetzung der Beladelösung lässt sich der folgenden Tabelle entnehmen (siehe Tabelle 3.2).

Anzahl Wells:	1
Well Volumen:	50 μ l
Lösung A (1 mM CCF4-AM)	0,05 μ l
Lösung B	0,5 μ l
Lösung C	7,78333 μ l
Probenecid (200 mM)	0,25 μ l
PBS für 1x Stock	41,4167 μ l

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der TEM-1-CagA-Translokationsassay Beladelösung

Die 96-Well Platte wurde nach Beladen mit CCF4-AM 2 Stunden im Dunklen inkubiert, und die Lichtemission danach bei 460 nm bzw. 530 nm und einer Anregungswellenlänge von 405 nm mit Hilfe des CLARIOstar® Plattenlesegeräts (BMG Labtech) gemessen. Die gewonnenen

Messwerte wurden ausgewertet, indem sie auf eine Positivkontrolle normiert wurden, nämlich ein Wildtyp *H. Pylori* Stamm mit TEM-CagA. Als Negativkontrolle wurde ein TEM-CagA Stamm mit *cagT*-Mutation verwendet, der nicht mehr in der Lage ist, CagA zu translozieren.

3.3.4 HiBiT Reporter Assay

Eine weitere erst kürzlich etablierte Methode um Proteinmengen in Zellen zu quantifizieren ist der sogenannte HiBiT Reporter Assay (Nano-Glo® HiBiT lytic Detection System; Promega). Dabei wird jeweils ein Protein in der Bakterienzelle N- oder C-terminal mit einem Teil des Enzyms NanoLuc-Luciferase (HiBiT, 11 Aminosäuren) fusioniert, und man kann dann eine Lumineszenz in Form von Photonen nach Zugabe des restlichen Luciferase Teils (LgBiT) und Substrat (Furimazin) detektieren. Über die Lumineszenz-Intensität lassen sich dann Rückschlüsse auf die Proteinmenge ziehen (siehe Abbildung 3.1). Die Lumineszenz in Form von emittierten Photonen wird mit Hilfe von *relative light units* (RLU) quantifiziert und in RLU angegeben (detektierte Ereignisse). Mit Hilfe von HiBiT-Fusionen ist auch eine Detektion im Western Blot möglich (siehe Kapitel 3.3.2).

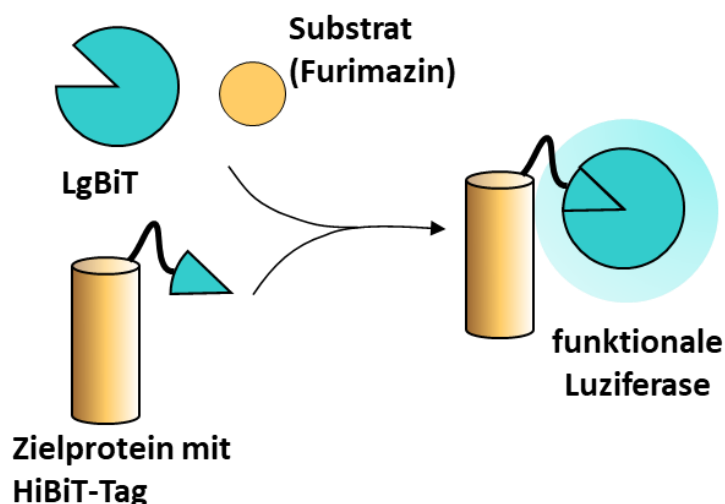


Abbildung 3.1: HiBiT Reporter Assay

Der HiBiT-Assay nutzt ein Fragment der NanoGlo® Luciferase das mit einem Zielprotein fusioniert ist. Nach Zugabe des restlichen Teils der Luciferase und des Substrats kann eine Lumineszenz detektiert werden.

Wenn die Proteinmenge eines Zielproteins eines *H. pylori* Stammes ohne bestimmte Umweltbedingungen untersucht werden sollte, dann wurde Bakterienmaterial von der Serumplatte in PBS suspendiert und eine OD₅₅₀ von 1 eingestellt. Die Suspension wurde dann zentrifugiert (5 min, 5000 rpm) und das Bakterienpellet in 100 µl PBS/FCS resuspendiert. Danach wurde im Verhältnis 1:1, also 100 µl, RIPA Puffer zugegeben, und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Um die Lumineszenz messen zu können wurden je 20 µl des Bakterienlysats und 20 µl der NanoGlo® HiBiT Reaktionslösung in eine 96-Well Platte (Costar Assay Plate, Corning) pipettiert (siehe Tabelle 3.3).

	Verhältnis zu Probenvolumen	Menge für 20 µl
Substrat (Furimazin)	1:200	0,1 µl
LgBiT (Luziferase)	1:100	0,2 µl
NanoGlo® Blotting Puffer	1:10	2 µl
ddH ₂ O	Rest	17,7 µl

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der HiBiT Reaktionslösung

Im Anschluss wurde die Lumineszenz mit Hilfe des CLARIOstar® Plattenlesegerät (BMG Labtech) für jeweils 5s im Wellenlängenbereich von 470 – 480 detektiert und die gewonnenen Werte als Absolutwerte analysiert. Die dabei entstandenen Zahlenwerte repräsentieren die im angegebenen Wellenlängenbereich emittierten Photonen und werden in „*relative light units*“ (RLU) angegeben. Als Positivkontrolle wurde ein P12 Stamm mit entweder HiBiT-RecA oder HiBiT-CagA Fusion, und als Negativkontrolle ein TEM-CagA Stamm ohne HiBiT-Protein-Fusion verwendet (RNP3). Die Lumineszenz-Werte der Negativkontrolle wurden als Hintergrund von den jeweiligen Messwerten abgezogen.

Je nach Versuchsaufbau wurden hierbei verschiedene Kulturen vor Durchführung des HiBiT Reporter Assays angesetzt und die OD angepasst. Für die Untersuchung des Einflusses von Eisen und Cyclodextrin auf die CagP-, und CagH-Menge wurden die Bakterien vor der Untersuchung via HiBiT Reporter Assay für 2,5 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ in 69-

Well Platten in den jeweils zu untersuchenden Medien inkubiert. Dabei betrug die OD₅₅₀ in den Bakterienkulturen 1.

Bei Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf die Produktion von CagP, CagH und CagG wurden die Bakterien für entweder 2, 6 oder 24 Stunden in einer 6-Well Platte mit 2 ml BB/FCS pro Well unter mikroaeroben Bedingungen (6% O₂; 10% CO₂; 37°C; 100rpm) oder der Umgebungsluft angepassten Sauerstoffbedingungen (18% O₂; 10% CO₂, 37°C; 100rpm) inkubiert. Die anfängliche OD₅₅₀ der Bakteriensuspension der Kulturen für 2 und 6 Stunden betrug 0,2; für 24 Stunden 0,075 und wurde nach der 6-stündigen und 24-stündigen Inkubationsperiode je nach Bakterienwachstum auf 1 angepasst.

Um den Einfluss von Wirtszellkontakt auf die Produktion von CagG, CagH und CagP zu bestimmen wurde der zu untersuchende Stamm jeweils 2,5 Stunden bzw. 1 Stunde entweder mit oder ohne Zellen inkubiert. Die Inkubation mit Wirtszellen fand bei 10% CO₂, 37°C und 100rpm in einer 69-Well Platte mit einer OD₅₅₀ von 0,5 (OD₅₅₀ von 1 bei Kato III Zellen) statt. *H. pylori* wurde auch mit Zelllysaten für 2,5 Stunden inkubiert. Für die Lysate wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche geerntet und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3 ml PBS/FCS resuspendiert. Diese Suspension wurde dann für 2 Minuten mit Impulsen einer Intensität von 60% beschallt, und erneut für 10 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Die *H. pylori* Suspension (OD₅₅₀=0,6) wurde mit jeweils 20 µl des Zelllysats in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert. So wurde am Ende wie bei den anderen Versuchsansätzen zur Untersuchung des Zellkontakts eine OD₅₅₀ von 0,5 bei einem Gesamtvolumen von 100 µl erreicht. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Versuche mit intakten AGS Zellen.

Bei Evaluierung von verschiedenen Deletionsmutanten im Hinblick auf CagH, CagP und CagG wurde *H. pylori* 2,5 h bei einer OD₅₅₀ von 0,5 mit oder ohne Infektion inkubiert. Um die Rolle des pH Wertes auf die Produktion von CagG, CagH und CagP zu beurteilen wurden die verwendeten Stämme 2,5 h in PBS/FCS bei neutralem pH (ca. 7) oder pH=5 vor Durchführung der HiBiT Reporter Assays bei 37°C und 10% CO₂ in 69-Well Platten mit einer OD₅₅₀ von 0,5 inkubiert.

3.3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung insbesondere der HiBiT Reporter Assay und TEM-1-CagA-Translokations-Assay Daten wurde GraphPad Prism 5 verwendet. Die angegebenen Mittelwerte wurden immer aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten berechnet und es wird immer der Standardfehler angegeben, der sich aus Standardabweichung (σ) dividiert durch die Wurzel der Anzahl der Durchführungen des Experiments berechnet.

$$\text{Standardfehler } (\sigma_{\bar{x}}) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Es wurde eine Normalverteilung der Daten angenommen und diese mittels One-Way-ANOVA mit anschließendem Tukey-Test oder t-Test (bei zwei Datensätzen) ausgewertet, und dabei ein Signifikanzniveau von 0,05 sowie ein Konfidenzintervall von 95% festgelegt. Wenn es darum ging, zwei oder mehr Gruppen bei normalverteilten Daten zu vergleichen, wurde ein Two-Way-ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben wurde die Signifikanz der Daten in den Abbildungen dieser Arbeit mit Sternchen nach dem folgenden Schema gekennzeichnet.

*	P < 0,05
**	P < 0,01
***	P < 0,001

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle von *cagP* für die Aktivität des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats

Frühere Versuche hatten bereits gezeigt, dass einzelne Proteine des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats im P12 Stamm vermindert produziert werden, wenn *cagP* deletiert wird (R. Nair, S. Laue, und W. Fischer, unveröffentlichte Daten). Dazu zählen CagH, CagI und CagL. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine *cagP* Deletionsmutante mit einem P12 Wildtyp Stamm im Hinblick auf die jeweiligen Proteinmengen verglichen (siehe Abbildung 4.1). Es ist zu sehen, dass die Mengen von CagI, CagL und fraglich CagH zurückgehen, wenn *cagP* deletiert wurde.

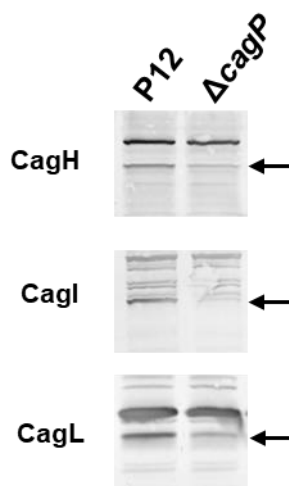


Abbildung 4.1: Der Einfluss von *cagP* auf CagH, CagI und CagL

Zu sehen ist ein Western Blot der Proteine CagH, CagI und CagL. Es wurden Lysate aus dem Stamm P12 und Lysate aus einem *cagP* deletiertem Stamm untersucht.

In weiteren vorherigen Experimenten wurde auch ein Einfluss von *cagP* auf die Aktivität des Sekretionsapparats nachgewiesen (R. Nair, S. Laue, und W. Fischer, unveröffentlichte Daten). Dieser Einfluss wurde hier zunächst mit Hilfe eines TEM-1-CagA-Translokationsassays bestätigt. Hierbei wird ein Reporterstamm verwendet, bei dem CagA mit der β -Laktamase TEM-1 fusioniert ist. Durch Spaltung von zuvor zugegebenem Substrat in der Zielzelle durch das Enzym, kann das translozierte TEM-1-CagA dann quantifiziert werden (Schindele et al., 2016). Dabei misst man die translozierte CagA Menge indirekt über das emittierte Licht des Substrats, dessen Farbe sich bei Spaltung durch die β -Laktamase TEM-1 ändert. Als Aktivität des *cagT4SS* wird die Menge an transloziertem CagA betrachtet.

Bei Beurteilung der Aktivität des Cag Typ IV-Sekretionsapparats (CagA Translokation) fällt auf, dass die Aktivität des Systems bei Fehlen von *cagP* auf ca. 10% der Ausgangsaktivität abfällt. Somit konnte bestätigt werden, dass *cagP* wichtig für eine vollständige Funktion des *cagT4SS* im *H. pylori* Stamm P12 ist (siehe Abbildung 4.2).

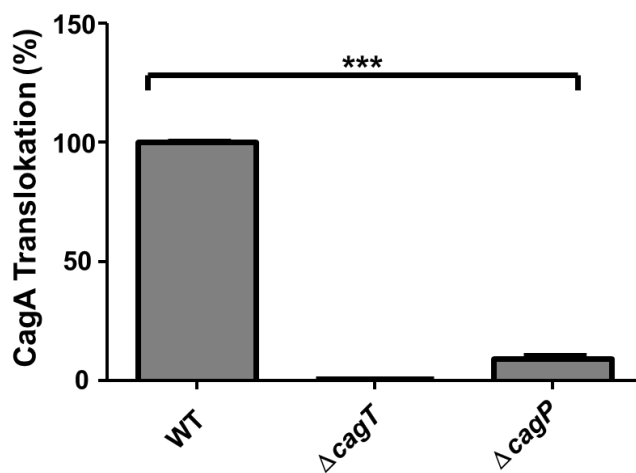


Abbildung 4.2: Der Einfluss von *cagP* auf die *cag* Typ IV-Sekretionsaktivität

AGS-Zellen wurden für 2,5 h mit *H. pylori*- Stämmen infiziert, die eine TEM-1-CagA-Fusion produzieren, und danach ein TEM-1-CagA-Translokationsassay durchgeführt. Werte wurden auf Postivkontrolle (100%) und Negativkontrolle (0%) normiert. Dabei entspricht der WT-TEM-CagA Stamm 100% CagA Translokation und die $\Delta cagT$ Mutante 0% CagA Translokation.

Die Daten sind inklusive Standardabweichung dargestellt und wurden mittels 1 way ANOVA und anschließendem Tukey's Test statistisch ausgewertet. Dabei bedeuten *** $P < 0,001$. (n=10 für WT, n=9 für $\Delta cagT$, n=10 für $\Delta cagP$).

4.2 Untersuchung des *cagP* Genlocus

Um die Rolle von *cagP* für den Cag Typ IV-Sekretionsapparat näher zu untersuchen, sollte zunächst die Menge an CagP- Protein detektiert werden. Dafür wurde ein HiBiT Reporter Assay angewandt und die Menge von CagP mit Hilfe des sogenannten HiBiT-Tags, einem Fragment der NanoLuc-Luziferase, erfasst. Der HiBiT-Tag wurde hierbei mit *cagP* an dessen 5'-Ende fusioniert. Nach Zugabe des restlichen Teils der Luziferase (LgBiT) als gereinigtes Protein sowie deren Substrat Furimazin konnte eine Lumineszenz detektiert werden. Die gemessene Lumineszenz kann dann als Maß für die Proteinmenge von CagP angenommen und somit die CagP-Menge unabhängig von Antikörpern gemessen werden.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, liegt der *cagP*-Genlocus auf der *cag*-Pathogenitätsinsel zwischen den Genloci von *cagM* und *cagQ* (Fischer 2011). Die Region stromaufwärts von *cagP* (*upstream region*) enthält das Gen für eine kleine nicht-codierende RNA (HPnc2630) mit einem vorhergesagten Transkriptionsterminator (Sharma et al., 2010; Vannini et al., 2016).

Um die Menge des von *H. pylori* produzierten CagP-Proteins zu evaluieren, wurden verschiedene HiBiT-CagP Reporterstämme hergestellt. Diese Stämme wurden durch markerfreie Integration eines HiBiT-Tags am 5' Ende von *cagP* erzeugt, sodass der Genlocus in möglichst geringem Maß verändert wird. Für die markerfreie Integration des HiBiT-CagP Konstruktes in das *H. pylori* Genom wurde zunächst eine Zwischenstufe mit einer *rpsL-erm* Genkassette hergestellt. Durch die Integration dieser Kassette wird die Streptomycin-resistente Variante des Wildtypstamms Erythromycin-resistent und verliert gleichzeitig wegen des dominanten Verhaltens des *rpsL*-Wildtyp-Gens ihre Streptomycin-Resistenz, wird also Streptomycin-sensitiv. Das *rpsL* Gen kodiert nämlich eine Bindestelle für Streptomycin, die bei dieser Variante des Wildtypstamms mutiert ist. Bei Ersetzen der Kassette durch das endgültige Konstrukt wird der *H. pylori* Stamm wiederum Streptomycin-resistent und Erythromycin-sensitiv (siehe Abbildung 4.3). Für die Rekombination in den HiBiT CagP Stämmen wurden die Plasmide pSL12, pSL13 (S. Laue & W. Fischer, unveröffentlichte Daten) und pVB1 genutzt. Es wurden im Anschluss HiBiT Reporter Assays durchgeführt.

Da sich in vorausgegangenen Untersuchungen schon gezeigt hatte, dass CagP offenbar nur in sehr geringen Mengen produziert wird (S. Laue & W. Fischer, unveröffentlichte Daten), was

durch einen Austausch der Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) verbessert werden konnte, wurden zur Verbesserung der Translation weitere Reporterstämme generiert. Diese enthalten die *cagA* Shine-Dalgarno-Sequenz anstelle der *cagP* SD-Sequenz. Nun konnte CagP in größeren Mengen in HiBiT-Assays detektiert werden (siehe Abbildung 4.4). Während das Plasmid pSL12 und, somit alle damit generierten Stämme, die *cagP* upstream (*cagP* SD-)Sequenz enthält, enthalten sowohl pSL13 und pVB1 die *cagA* upstream Sequenz. Allerdings sind im Plasmid pSL13 die letzten vier Basen des mutmaßlichen Terminators in HPnc2630 deletiert, während diese im pVB1 Plasmid unverändert sind.

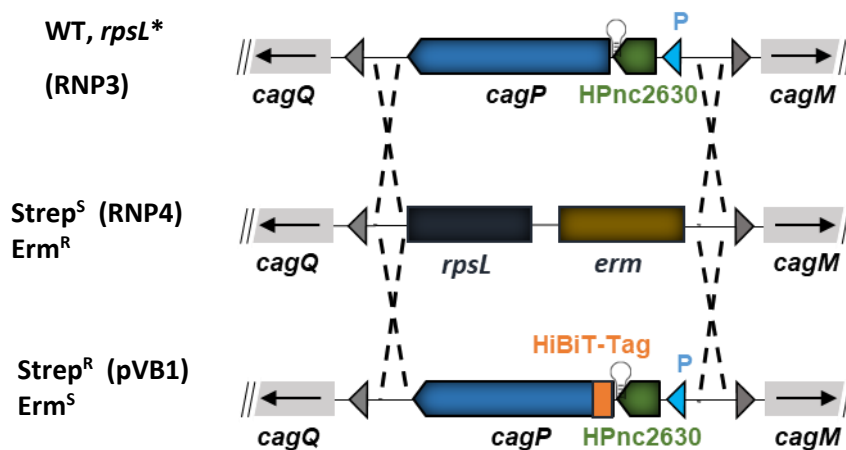


Abbildung 4.3: markerfreie Fusion des HiBiT-Tags mit *cagP*

Dargestellt ist der *cagP* Genlocus mit *cagP* upstream region (*cagP* Promoter (P), kleine nicht-kodierende RNA HPnc2630 mit mutmaßlichem Terminator). Zunächst wird für die markerfreie Integration des HiBiT-Tags eine *rpsL-erm* Resistenzkassette anstelle von *cagP* in den Wildtypstamm eingebracht. Dieser ist aufgrund eines mutierten *rpsL** Gens Streptomycin-resistent. Der Wildtypstamm verliert dadurch seine Resistenz aufgrund der Dominanz des *rpsL*-Wildtyp-Gens und wird Streptomycin-sensitiv und Erythromycin-resistent. Danach erfolgt die Rekombination der jeweiligen HiBiT-CagP-Fusion über das Plasmid pVB1/pSL13/pSL12. Dabei wird der Stamm Streptomycin-resistent und Erythromycin-sensitiv.

Auch einzelne Komponenten des *cagP* Genlocus wurden mit Hilfe des HiBiT Reporter Assays näher untersucht.

Wie schon erwähnt könnte die kleine nicht-kodierende RNA HPnc2630 durch Verringerung der CagP-Menge eine Rolle für die Funktion des Cag Typ IV-Sekretionsapparats spielen. Um zu untersuchen, ob HPnc2630 bzw. der Terminator einen Einfluss auf die CagP-Produktion haben, wurde ein weiterer HiBiT-CagP Reporterstamm generiert, dem HPnc2630 sowie der mutmaßliche Terminator fehlt. Zur besseren Translation wurde ebenfalls die *cagA upstream* Sequenz anstelle der *cagP upstream* Sequenz beibehalten.

Dafür wurde das Plasmid pVB2 durch eine inverse PCR unter Verwendung der Primer WS825 und WS817 und HP-5kb-05_J10 als *template* erzeugt (siehe Kapitel 3.2. und 3.1.2.1) und der *H. pylori* Stamm RNP4 damit transformiert. Tatsächlich zeigen die HiBiT-Reporter-Assay Daten eine deutliche Zunahme der CagP-Menge bei Deletion von HPnc2630 (siehe Abbildung 4.4). Offenbar bildet der entsprechende Bereich also tatsächlich eine die Transkription terminierende Sekundärstruktur aus, wobei die Transkriptionstermination nicht vollständig ist.

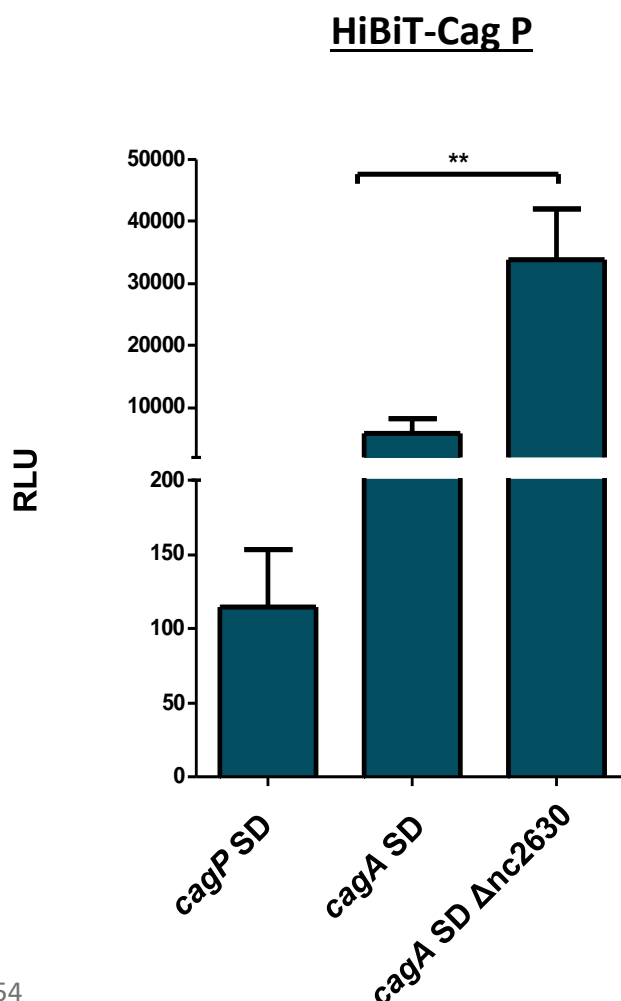


Abbildung 4.4: Der Einfluss der SD-Sequenz und die Deletion von HPnc2630 auf die CagP-Produktion (HiBiT Reporter Assay)

Bakterienmaterial wurde von Serumplatten entnommen und ein HiBiT Reporter Assay durchgeführt. Gemessen wurden CagP-HiBiT Reporterstämme (pSL12, pVB1, pVB2) im Vergleich. (n=4 für *cagP* SD, n=5 für *cagA* SD und n=5 für *cagA* SD Δnc2630). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt und wurden statistisch mittels 1 way ANOVA und anschließendem Tukey's Test ausgewertet. Dabei bedeutet ** P < 0,01.

Die mit dem HiBiT-Tag fusionierten Proteine können, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, nicht nur mit Hilfe des HiBiT Reporter Assays sichtbar gemacht werden, sondern auch durch die Nutzung der HiBiT Blot Technik. In Abbildung 4.5 sieht man sowohl einen HiBiT-CagP Reporterstamm (pVB1) als auch einen Δ nc2630 HiBiT-CagP Reporterstamm (pVB2) im Vergleich.

Man kann in Abbildung 4.5 sehen, dass die Proteinmenge von CagP höher ausfällt, wenn HPnc2630 deletiert wurde. Damit konnten die im HiBiT Reporter Assay gemessenen Werte bestätigt werden. Allerdings ist die Sensitivität des HiBiT Reporter Assay deutlich höher als die des HiBiT Blots. Der HiBiT Blot gibt jedoch Aufschluss über die Größe von CagP, die den Vorhersagen entsprechend bei etwa 18kDa liegt.

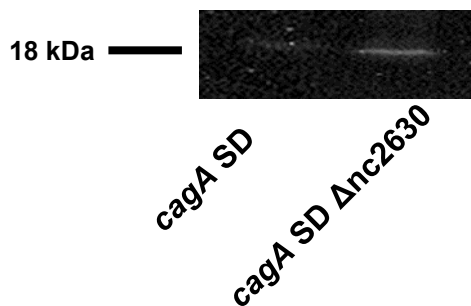


Abbildung 4.5: Der Einfluss der SD-Sequenz und die Deletion von HPnc2630 auf die CagP-Produktion (HiBiT Blot)

Die oben verwendeten HiBiT-CagP Reporterstämmen wurden auch mittels HiBiT-Blot Technik evaluiert. Der vollständige HiBiT-Blot der hier gezeigten Ausschnitte ist im Anhang zu finden (Anhang A).

Man kann also sagen, dass die Wildtyp SD-Sequenz von *cagP* offenbar nur eine geringe Translation von *cagP* erlaubt. Außerdem steigt die CagP Menge bei Deletion von HPnc2630 deutlich an.

4.3 Der Einfluss von *cagP* auf CagH und CagG

Die Methode des HiBiT Reporter Assays ist also geeignet um das CagP-Protein nachzuweisen, zumal für dieses Protein kein Antikörper verfügbar ist, und somit immunologische Methoden für die Untersuchung des Proteins nicht zur Verfügung stehen. Auch die Proteine CagG und CagH wurden mit Hilfe des HiBiT Reporter Assays untersucht. Die Menge dieser Proteine im Zusammenhang mit *cagP* ist von Interesse, da bei *cagP* Deletion CagI und CagL, sowie möglicherweise CagH vermindert produziert werden (siehe Abb. 4.1). Die Gene dieser Proteine sind im gleichen Operon enthalten wie *cagG* und somit ist auch ein Einfluss einer *cagP* Deletion auf die CagG -Menge zu erwarten. CagH lässt sich außerdem ebenfalls nur schwer mit Hilfe von Western Blots darstellen, da das CagH-Antiserum nicht nur spezifisch CagH bindet, sondern auch andere Proteine (siehe Abbildung 4.1). Für CagG ist genau wie für CagP kein Antikörper verfügbar. Aus diesen Gründen wurden sowohl HiBiT-CagH-, und auch HiBiT-CagG-Reporterstämme hergestellt und untersucht.

Dabei wurden *cagG* und *cagH* analog zu CagP mit dem HiBiT-Tag versehen, und dann Lumineszenz detektiert (siehe Abbildung 4.6 und 4.7). Der HiBiT-Tag befindet sich jeweils am N-Terminus von CagH und CagG, wobei sich der HiBiT-Tag im CagG-Protein am N-Terminus des reifen Proteins befindet, dh. nach der abzuspaltenden Signalsequenz. Alle HiBiT Reporterstämme wurden durch markerfreie Austausche im Chromosom erzeugt, das heißt die chromosomale Umgebung der jeweiligen Gene veränderte sich abgesehen von der Sequenz für den HiBiT-Tag nicht. Die detektierte Lumineszenz entsprach bei HiBiT-CagG Reporterstämmen ungefähr der von *cagA* SD HiBiT-CagP Reporterstämmen, und war im Fall der HiBiT-CagH Reporterstämmen niedriger.

Zur Untersuchung eines Einflusses von *cagP* oder HPnc2630 auf die CagH und CagG Produktion wurden bei den genannten HiBiT Reporterstämmen außerdem *cagP* oder HPnc2630 deletiert und diese Stämme danach mittels HiBiT Reporter Assay und HiBiT Blot untersucht.

Im HiBiT Reporter Assay ließ sich signifikant weniger CagH detektieren, wenn *cagP* deletiert war, allerdings nicht in Δ nc2630 Mutanten (siehe Abbildung 4.6). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den HiBiT-Blots wider. Die CagH-Bande bei *cagP* Deletion ist weniger stark ausgeprägt als beim Wildtyp. Anders ist das bei CagG, die CagG-Banden imponieren alle gleich

stark. Auch der HiBiT-Assay zeigt, dass CagG nicht weniger produziert wird, wenn *cagP* oder HPnc2630 fehlen (siehe Abbildung 4.7)

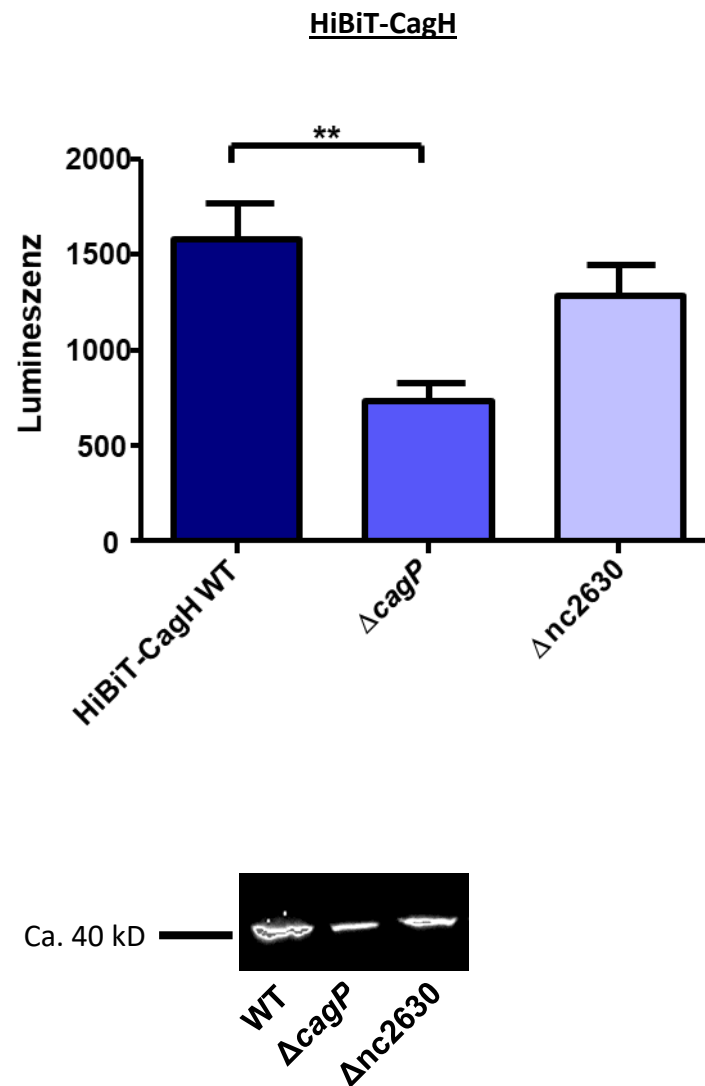


Abbildung 4.6: Der Einfluss von *cagP* und HPnc2630 auf CagH

Oben: Bakterienmaterial von HiBiT-CagH Reporterstämmen wurde von Serumplatten entnommen und ein HiBiT Reporter Assay durchgeführt (n=10 für WT, *cagP* und $\Delta nc2630$). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt und wurden mittels 1 way ANOVA und anschließendem Tukey's Test statistisch ausgewertet. **entspricht $P < 0,01$.

Unten: Bei denselben HiBiT-CagH Reporterstämmen wurde die HiBiT-Blot Technik angewandt. Der vollständige HiBiT-Blot zu den hier gezeigten Ausschnitten ist im Anhang zu finden (Anhang B).

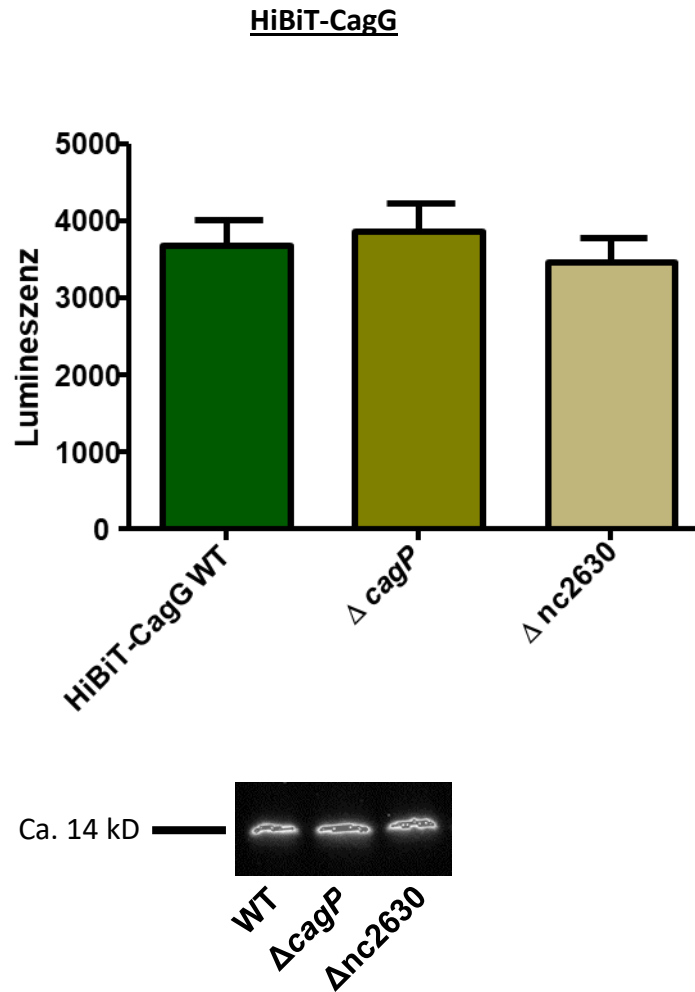


Abbildung 4.7: Der Einfluss von *cagP* und HPnc2630 auf CagG

Oben: Bakterienmaterial von HiBiT-CagG Reporterstämmen wurde von Serumplatten entnommen und ein HiBiT Reporter Assay durchgeführt (n=10 für WT, *cagP* und $\Delta nc2630$). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt und wurden mittels 1 way ANOVA und anschließendem Tukey's Test statistisch ausgewertet.

Unten: Bei denselben HiBiT-CagG Reporterstämmen wurde die HiBiT-Blot Technik angewandt. Der vollständige HiBiT-Blot zu den hier gezeigten Ausschnitten ist im Anhang zu finden (Anhang C).

Es scheint also, als hätte *cagP* zwar einen Einfluss auf die Produktion von CagH, nicht aber von CagG. HPnc2630 scheint für die produzierte Menge beider Proteine keine Rolle zu spielen.

4.4 Die Funktion von HPnc2630 und der mutmaßlichen *cagG* mRNA Bindestelle für das *cagT4SS*

Obwohl die CagG-Menge nicht durch die Deletion von *cagP* oder HPnc2630 beeinflusst zu werden scheint, wurde die kleine nicht-kodierende RNA HPnc2630 und ihre mögliche Rolle als Bindepartner bzw. Gegenstrang-RNA für die *cagG* mRNA näher untersucht. Basis für diese Untersuchungen ist eine mögliche Interaktion im Sinne einer Basenpaarung von HPnc2630 mit der *messenger* RNA von *cagG*. Laut einer bioinformatischen Vorhersage (CoprRNA) könnte die *cagG* mRNA an HPnc2630 binden (siehe Abbildung 4.8).

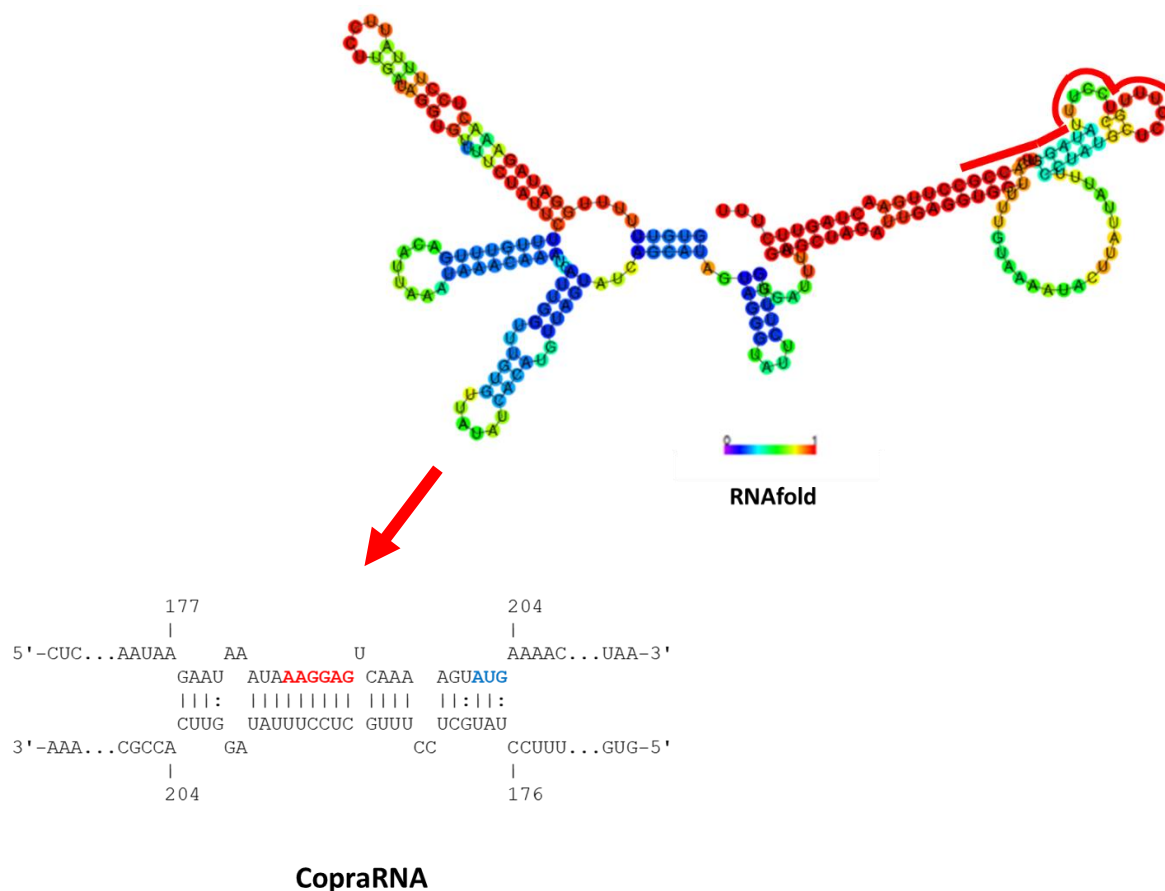


Abbildung 4.8: Mögliche Lokalisation für Basenpaarungen zwischen HPnc2630 und der *cagG* mRNA laut CopraRNA

Oben ist die vorhergesagte Sekundärstruktur der kleinen nicht-kodierenden RNA HPnc2630 zu sehen. Der rot markierte Bereich stellt die mögliche Bindestelle für die *cagG* mRNA nach Vorhersage mit CopraRNA dar (deletiert bei Δ GmRBS Stämmen). Unten sind die beiden RNA Sequenzen und ihre mögliche vorhergesagte Basenpaarung im Bereich der SD-Sequenz (rot) bzw. des Startcodons (blau) zu sehen.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurde ein Stamm generiert, dem der entsprechende Bereich in HPnc2630 (Basen 185 bis 210) fehlt (pVB3), und dieser Stamm mit einer Deletion der *cagG*-mRNA-Bindestelle (Δ GmRBS) via TEM-1-CagA-Translokationsassay gemessen (siehe Abbildung 4.9). Bei der Δ GmRBS Mutante zeigte sich interessanterweise eine deutlich erhöhte CagA-Translokation.

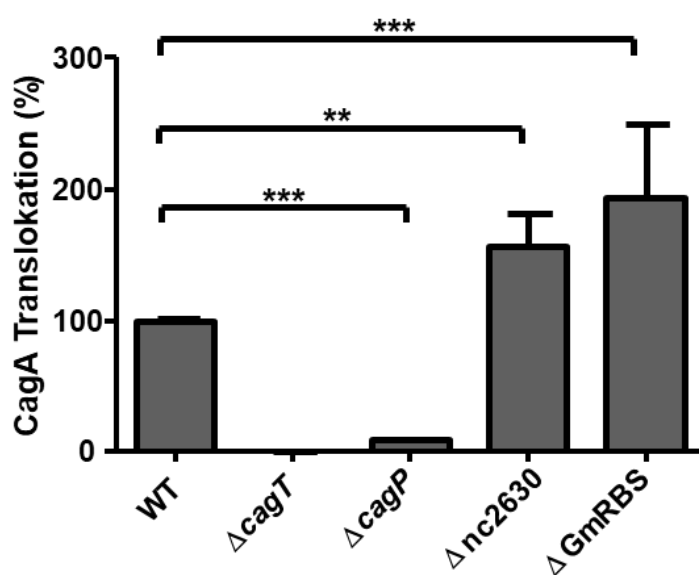


Abbildung 4.9: Der Einfluss von HPnc2630 und der mutmaßlichen *cagG* mRNA-Bindestelle auf die Aktivität des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats

AGS-Zellen wurden 2,5 h mit *H. pylori* infiziert und danach ein TEM-1-CagA-Translokationsassay durchgeführt (n=10 für WT und Δ cagP, n=9 für Δ cagT, n=5 für Δ nc2630, n=2 für Δ GmRBS). Der WT-TEM-CagA Stamm dient als Referenz und entspricht 100% CagA Translokation während die Δ cagT Mutante 0% CagA Translokation entspricht. Die Werte wurden auf die Positiv-, und Negativkontrolle normiert und sind mit Standardabweichung dargestellt. Die Daten wurden mittels 1 way ANOVA anschließendem Tukey's Test ausgewertet und es gilt ** P < 0,01, und *** P < 0,001.

Um der Frage nachzugehen ob und wie sich die gesamte Deletion der kleinen nicht-kodierenden RNA HPnc2630 auf die Aktivität des *cagT*4SS auswirkt, wurden außerdem Δ nc2630 TEM-CagA Stämme generiert und untersucht. Es konnte schon gezeigt werden, dass die Deletion von HPnc2630 eine Steigerung der CagP-Produktion zur Folge hat (siehe Abbildung 4.4) und somit eine terminierende Funktion von HPnc2630 für *cagP* nahe liegt. Bei den durchgeführten TEM-1-CagA-Translokationsassays fiel weiterhin auf, dass die CagA-Translokation im Vergleich zum Wildtyp ansteigt, wenn HPnc2630 deletiert wird (Δ nc2630 Stamm (pVB2) siehe Abbildung 4.9).

Da eine Deletion der mutmaßlichen *cagG*-mRNA-Bindestelle (GmBRS) ebenfalls zu einer deutlichen Steigerung der CagA-Translokation führte, wurde der Einfluss von GmBRS auch im Hinblick auf die CagG-, und CagH-Produktion überprüft. Hier wurde mit Hilfe des HiBiT Reporter Assays überprüft, ob GmRBS die Menge von CagH oder CagG durch die Bindung von HPnc2630 an die *cagG* mRNA vermindert. Dazu wurden ein Δ GmRBS HiBiT-CagG und Δ GmRBS HiBiT-CagH Reporterstamm generiert.

Eine Messung der Lumineszenz nach Lyse dieser Stämme und Zugabe von LgBiT (Abb. 4.10) ergab jedoch keinen Unterschied zu HiBiT-CagG WT Reporterstämmen. Somit scheint die mögliche Stelle für Basenpaarungen von HPnc2630 mit der *cagG* mRNA unter den hier verwendeten Bedingungen keinen Einfluss auf die CagG-Produktion zu haben. Dasselbe gilt für die Menge von CagH (siehe Abbildung 4.10).

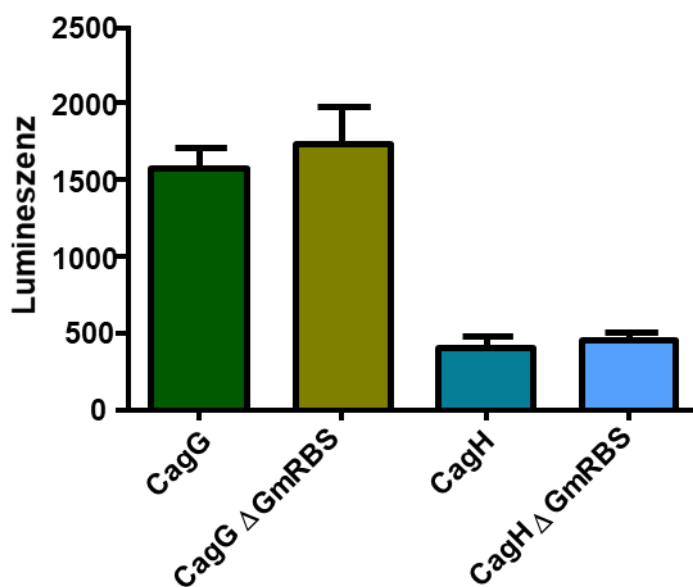


Abbildung 4.10: Die Rolle der mutmaßlichen *cagG* mRNA Bindestelle für die CagG-, und CagH-Produktion

Bakterien wurden 2.5 h inkubiert ($OD_{550} = 0,5$) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt. Es gilt $n=3$ für alle dargestellten Stämme. Die Daten sind mit Standardabweichungen dargestellt und wurden mittels 1 way ANOVA und anschließendem Tukey's Test statistisch ausgewertet.

4.5 Der Einfluss des vorhergesagten Startcodons und des 5`-Endes von *cagP* für die CagA Translokation

Da das CagP-Protein im Wildtypstamm offenbar nur in sehr geringen Mengen produziert wird, stellte sich die Frage, ob diese geringe CagP-Menge für die Funktion des *cagT4SS* zuständig ist, oder ob das *cagP*-Transkript für diese bereits ausreichend ist.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden TEM-1-CagA Mutanten hergestellt, deren mutmaßliches *cagP* Startcodon zu einem Stoppcodon mutiert ist (*mutATG*). Hierbei sind keine anderen Bereiche aus dem *cagP* Genlocus deletiert und die Stämme sollten nun kein CagP mehr produzieren können, das *cagP* Transkript sollte aber fast unverändert bleiben. Diese Stämme wurden zunächst mittels Western Blot auf die Produktion von CagH, CagI und CagL untersucht (siehe Abbildung 4.11). Überraschenderweise scheinen diese Proteine zwar in geringerer Menge als im Wildtyp produziert zu werden, aber stärker als in der *cagP*-Mutante (vgl. Abb. 4.1).

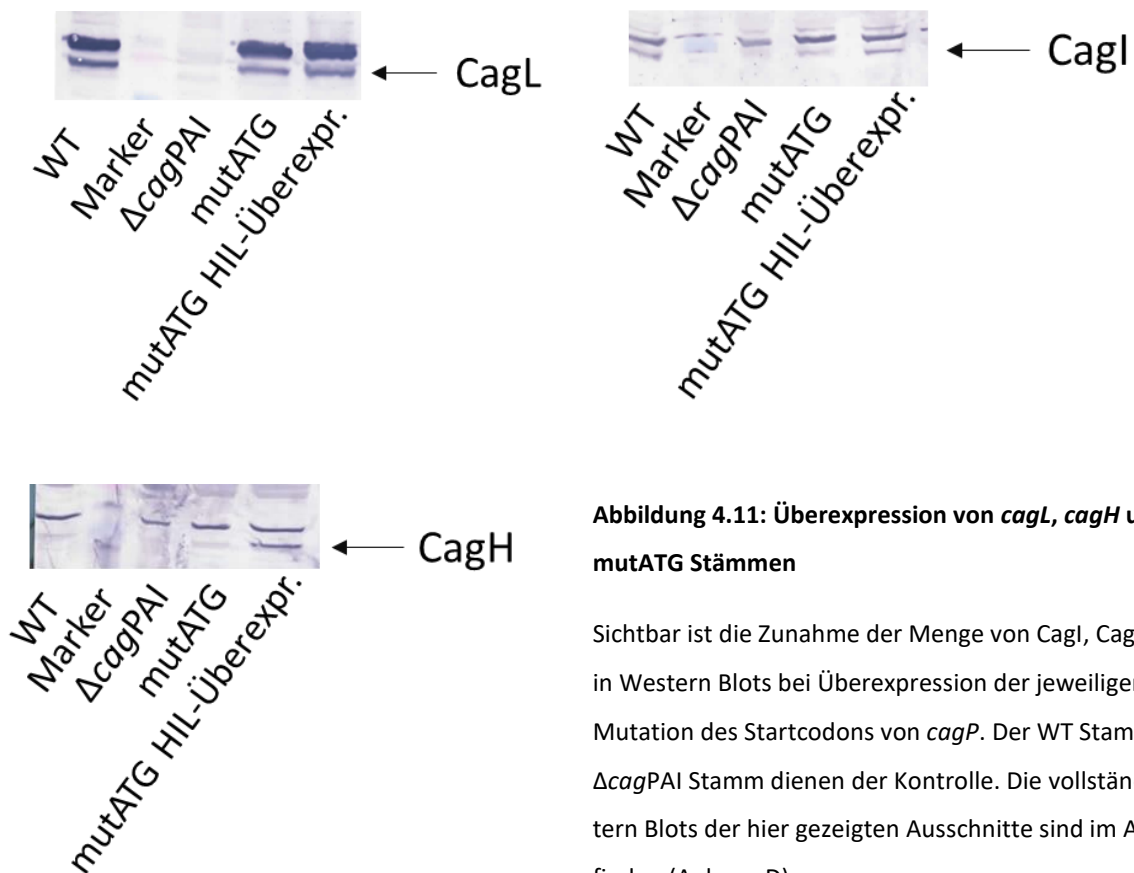


Abbildung 4.11: Überexpression von *cagL*, *cagH* und *cagI* bei *mutATG* Stämmen

Sichtbar ist die Zunahme der Menge von CagI, CagL und CagH in Western Blots bei Überexpression der jeweiligen Gene und Mutation des Startcodons von *cagP*. Der WT Stamm und der *ΔcagPAI* Stamm dienen der Kontrolle. Die vollständigen Western Blots der hier gezeigten Ausschnitte sind im Anhang zu finden (Anhang D).

Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurden auch mutATG TEM-1-CagA und $\Delta cagP$ TEM-1-CagA Stämme generiert, die eine Überproduktion der Proteine CagH, CagI und CagL aufweisen. Dafür wurden die drei Gene unter der Kontrolle des alpA-Promoters exprimiert und die vermehrte Produktion von CagH, CagI und CagL via Western Blots überprüft (siehe Abbildung 4.11).

Im Anschluss wurden mit diesen Stämmen TEM-1-CagA-Translokationsassays durchgeführt. Es ist zu sehen, dass eine alleinige Mutation des Startcodons von *cagP* eine Reduktion der Aktivität des Sekretionsapparats auf ca. 50% nach sich zieht, im Vergleich zu einer deutlich stärkeren Reduktion der CagA-Translokation bei *cagP* Deletion (auf ca. 10%). Somit sind auch Mutanten, bei denen das Startcodon zum Stoppcodon mutiert ist, immer noch zur CagA Translokation imstande. Außerdem kann eine Überproduktion der Proteine CagH, CagI und CagL zwar die Funktion des Sekretionsapparats bei $\Delta cagP$ Stämmen wieder auf bis zu 50% regenerieren, bei mutATG Mutanten hat die Überexpression der genannten Proteine allerdings keine weitere Steigerung der CagA-Translokation zur Folge (siehe Abbildung 4.12).

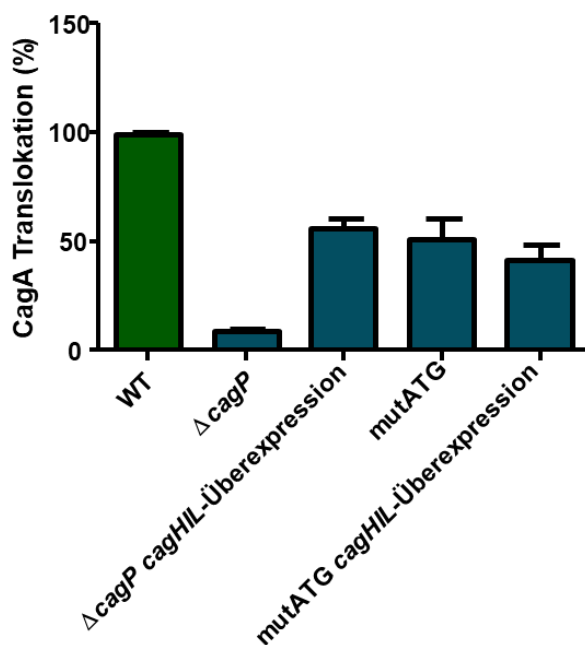


Abbildung 4.12: Die Aktivität des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats bei Mutation des Startcodons und Überexpression von *cagH*, *cagI* und *cagL*

AGS-Zellen wurden 2,5 h mit *H. pylori* infiziert und dann ein TEM-1-CagA-Translokationsassay durchgeführt. Die Daten sind mit Standardabweichungen dargestellt (n= 8 für WT, n=10 für $\Delta cagP$, n=6 für $\Delta cagP$ cagHIL-Überexpression, n=7 für mutATG, n=4 für mutATG cagHIL Überexpression). Daten sind normiert auf 100% (WT) und 0% ($\Delta cagT$). Daten wurden statistisch mittels 1 way ANOVA und anschließendem Tukey`s Test ausgewertet.

Da Mutanten, bei denen das Startcodon zum Stoppcodon mutiert ist, immer noch deutlich besser zur CagA Translokation imstande sind als die *cagP*-Mutante, stellt sich weiterhin die Frage, ob es einer Translation des *cagP*-Gens überhaupt bedarf. Dass *cagP* eine wichtige Rolle für die vollständige Funktion des Cag Typ IV-Sekretionsapparats spielt, wurde bereits dargelegt. Unklar ist jedoch, ob dieser Effekt auf der Funktion von CagP als Protein, oder nur der Funktion des Transkripts von *cagP* beruht, zumal das CagP-Protein im HiBiT-CagP WT Reporterstamm in nur sehr geringen Mengen detektiert werden kann (siehe Abbildung 4.4).

Um die Rolle des mutmaßlichen CagP-Proteins besser zu verstehen, wurden verschiedene weitere markerfreie Deletionsmutanten generiert, denen unterschiedlich große Teile am 5'-Ende von *cagP* und von HPnc2630 fehlen. Diese wurden via TEM-1-CagA-Translokationsassay untersucht. Bei mehreren Mutanten wurde das vorhergesagte Startcodon von *cagP* deletiert oder zu einem Stoppcodon mutiert, sodass kein CagP-Protein mehr gebildet werden sollte. Die Stämme sind in der folgenden Tabelle und Abbildung zusammengefasst (siehe Abbildung 4.13 und Tabelle 3.4).

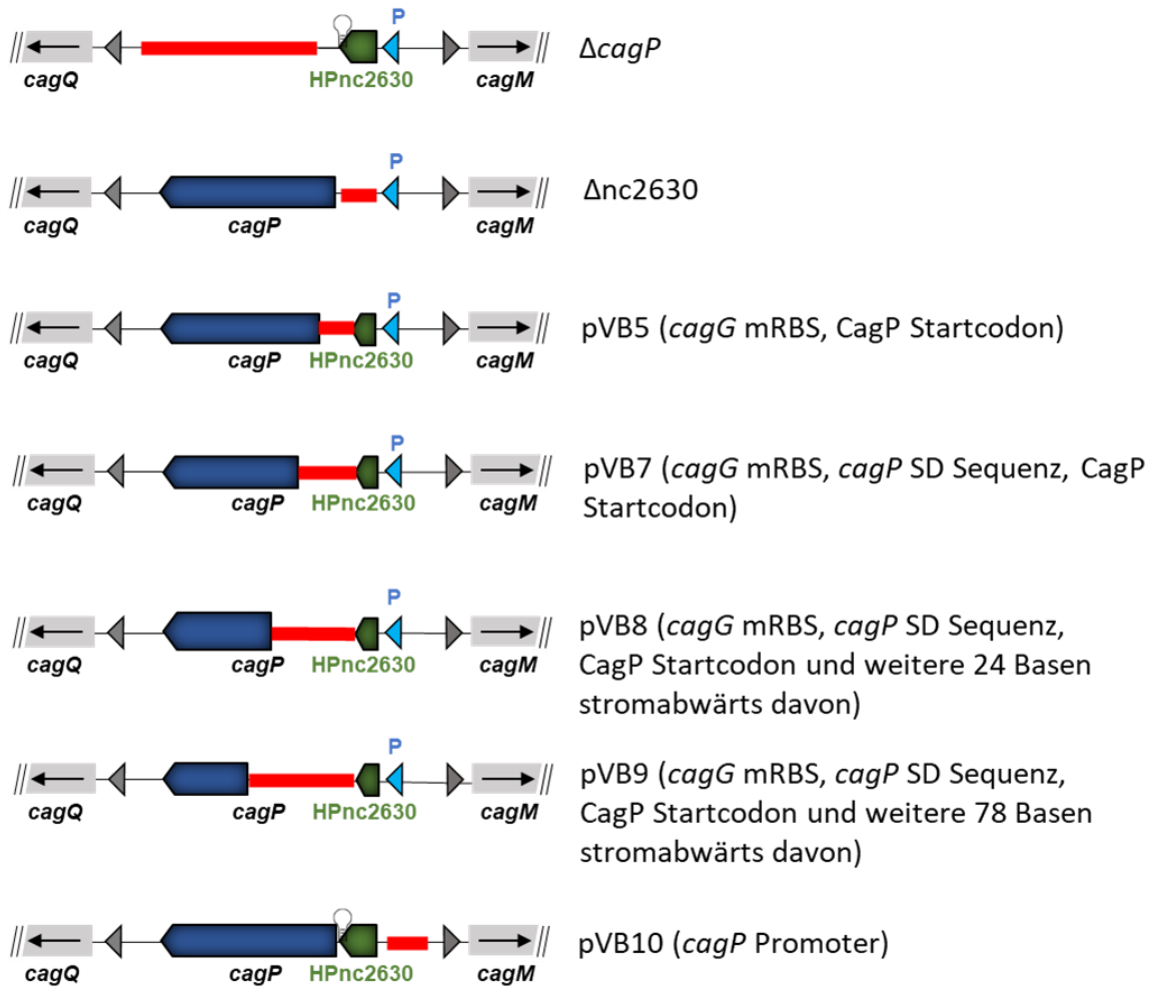


Abbildung 4.13: Darstellung des *cagP* Genlocus der verschiedenen Deletionsmutanten

Zu sehen ist die schematische Darstellung des *cagP* Genlocus und der jeweiligen deletierten bzw. mutierten Regionen. Dabei stellen die roten Bereiche und der Text in Klammern die deletierten bzw. mutierten Regionen dar.

Stamm	Plasmid	Primer und Vektor zur Plasmidherstellung	Schnittstelle zur Plasmidherstellung	Deletierte/mutierte Regionen
VB77	pVB5	WS858/WS763, HP-5kb-05_J10	BamHI, Religation	<i>cagG</i> mRNA Bindestelle (Basen 185 bis 210), <i>cagP</i> Startcodon mutiert zu Stoppcodon
VB78	pVB7	WS858/PT4, HP-5kb-05_J10	BamHI, Religation	<i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> SD Sequenz, <i>cagP</i> Startcodon
VB110	pVB8	WS858/WS783, HP-5kb-05_J10	BamHI, Religation	<i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> SD Sequenz, <i>cagP</i> Startcodon und weitere 24 Basen stromabwärts davon
VB80	pVB9	WS858/WS784, HP-5kb-05_J10	BamHI, Religation	<i>cagG</i> mRNA Bindestelle, <i>cagP</i> SD Sequenz, <i>cagP</i> Startcodon und weitere 78 Basen stromabwärts davon
VB79	pVB10	WS762/WS262, HP-5kb-05_J10	BamHI, Religation	<i>cagP</i> Promoter

Tabelle 3.4: Beschreibung der verschiedenen Deletionsmutanten

Bei Betrachten der verschiedenen Mutanten im Hinblick auf die CagA Translokation sieht man, dass bei Stamm VB77 (pVB5) die Aktivität überraschenderweise nicht eingeschränkt ist. Bei den anderen Deletionsmutanten ist das der Fall. Der mit pVB7 transformierte Stamm zeigt niedrige *cagT4SS* Aktivität, welche aber noch über der von Δ *cagP* Deletionsmutanten zu liegen scheint. Die Stämme VB110 (pVB8) und VB80 (pVB9), bei denen zusätzlich noch der Genanfang von *cagP* deletiert wurde, zeigen *cagT4SS* Aktivität im Bereich von Δ *cagP* Deletionsmutanten. Wenn der *cagP*-Promoter (VB79, pVB10) deletiert wurde, geht die Aktivität des Sekretionsapparats ebenfalls stark zurück. Es ist eine Aktivität im Bereich der *cagP*-Mutanten nachzuweisen. (siehe Abbildung 4.14).

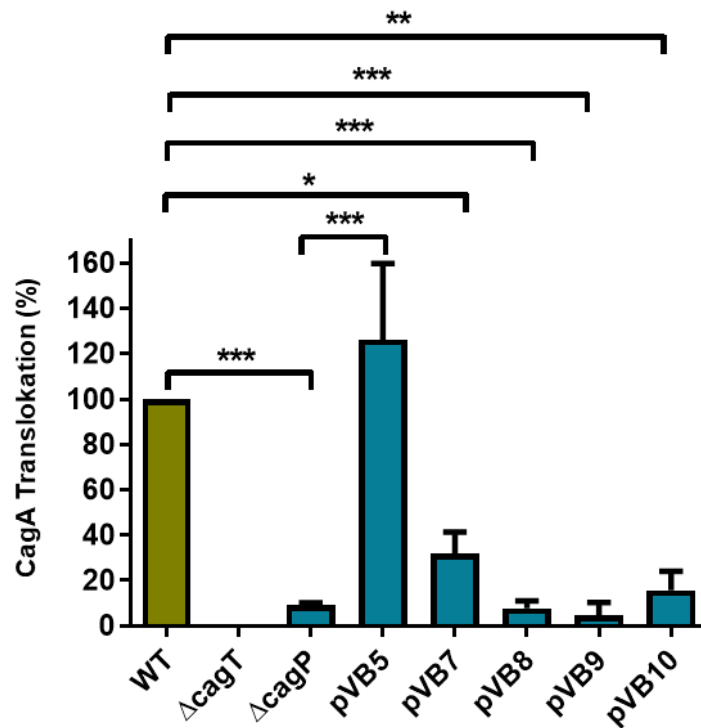


Abbildung 4.14: Der Einfluss von verschiedenen Deletionen im *cagP* Genlocus auf die Aktivität des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats

AGS-Zellen wurden 2,5 h mit *H. pylori* infiziert und im Anschluss ein TEM-1-CagA-Translokationsassay durchgeführt. Daten sind normiert auf 100% (WT) und 0% ($\Delta cagT$) und mit Standardabweichungen dargestellt (n=4 für pVB5, pVB7, pVB8 und pVB10, n=5 für pVB9, n=10 für $\Delta cagP$ und n=3 für WT und $\Delta cagT$). Statistisch ausgewertet wurden die Daten mittels 1 way ANOVA Test und nachfolgendem Tukey-Test. Es gilt * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; und *** $P < 0,001$.

Auffällig ist, dass sich der mutATG Stamm und pVB5 unterschiedlich im TEM-1-CagA-Translokationsassay verhalten. Bei beiden Stämmen ist das *cagP* Startcodon zum Stoppcodon mutiert. Allerdings ist bei dem mutATG Stamm nur das Startcodon verändert während bei pVB5 auch die mutmaßliche Stelle für die Bindung der *cagG* mRNA in HPnc2630 deletiert wurde, und somit auch ein wesentlicher Teil des vorhergesagten Terminators von HPnc2630 (siehe Abbildung 4.15). Das passt einerseits zu den vorherigen Ergebnissen, da auch die $\Delta GmRBS$ Mutante und die $\Delta nc2630$ Mutante eine deutliche Steigerung der CagA-Translokation zeigen

(siehe Abbildung 4.9), andererseits scheint somit eine zusätzliche Mutation des mutmaßlichen Startcodons von *cagP* keinen Einfluss auf die CagA Translokation zu haben.

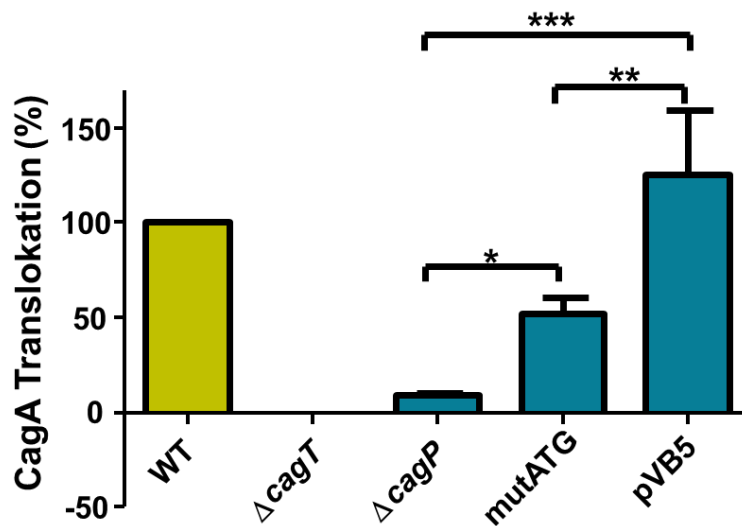


Abbildung 4.15: ATG Mutation

AGS-Zellen wurden 2,5 h mit *H. pylori* infiziert und im Anschluss ein TEM-1-CagA-Translokationsassay durchgeführt. Daten sind normiert auf 100% (WT) und 0% ($\Delta cagT$) und mit Standardabweichungen dargestellt (n=4 für pVB5, n=7 für mutATG und n=10 für $\Delta cagP$, n=3 für WT und $\Delta cagT$). Statistisch ausgewertet wurden die Daten mittels 1 way ANOVA Test und nachfolgendem Tukey-Test. Es gilt * P < 0,05; ** P < 0,01; und *** P < 0,001.

Es lässt sich also insgesamt sagen, dass die Aktivität des Sekretionsapparats bei Mutation des Startcodons von *cagP* zwar zurückgeht, aber nicht verschwindet. Die CagA Translokation geht dagegen wesentlich deutlicher zurück, wenn der mutmaßliche N-Terminus des Proteins entfernt wird. Eine Ausnahme bildet der Stamm VB77 (pVB5), der eine dem Wildtyp ähnliche *cagT4SS* Aktivität zeigt, obwohl auch hier das *cagP* Startcodon mutiert wurde.

Eine Mutation des Startcodons zum Stoppcodon scheint also eine weniger starke Reduktion der CagA Translokation nach sich zu ziehen als die vollständige oder teilweise Deletion von *cagP*. Daraus könnte man schlussfolgern, dass entweder die *cagP* mRNA eine Rolle für die Aktivität des *cagT4SS* spielt, oder aber weitere Startcodons von *cagP* existieren, welche die CagP Produktion trotz Deletion des mutmaßlichen Startcodons ermöglichen.

4.6 Untersuchung einer Modulation der Expression von *cagP* in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen

4.6.1 Untersuchung des Einflusses des Transkriptionsfaktors HP1043 auf die CagP-Produktion

Der Transkriptionsfaktor HP1043 oder HsrA reguliert bekanntermaßen einige physiologische Prozesse in *H. pylori* (Pellicciari et al. 2017; Olekhnovich et al. 2014). Eine Bindestelle für HP1043 befindet sich auch innerhalb des *cagP* Promoters (Sharma et al., 2010) und deswegen wurde hier die Vermutung aufgestellt, HP1043 könnte äußere Einflussfaktoren auf die *cagP* Expression vermitteln. HiBiT-CagP Stämme, bei denen besagte HP1043 Bindesequenz im Promoter verändert wurde, wurden generiert und via HiBiT Reporter Assay untersucht. Es wurde bei Fehlen der Bindestelle erwartungsgemäß viel weniger CagP produziert, was die Annahme unterstützt, dass HsrA als Transkriptionsfaktor für *cagP* dient (siehe Abbildung 4.16).

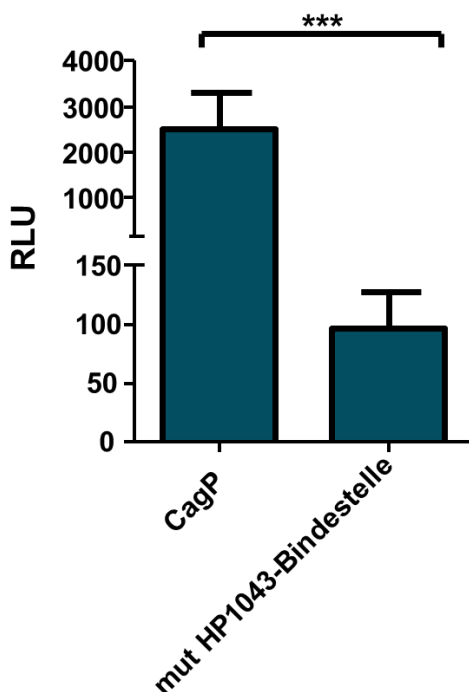


Abbildung 4.16: CagP-Menge bei HP1043 deletierten Stämmen

Stämme wurden 2.5 h inkubiert ($OD_{550}=0,5$; 10% CO₂; 37°C) und dann ein HiBiT Reporter Assay durchgeführt (n=5). Es handelt sich um CagP *cagA* SD HiBiT Reporterstämmen. Die Daten wurden statistisch mittels t-Test ausgewertet, wobei *** P < 0,0001 bedeutet.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass HP1043 tatsächlich einen Einfluss auf die CagP-Produktion hat. Unklar ist aber, ob die verbleibende Produktion von CagP bei Deletion der HP1043-Bindestelle auf eine Restbindung von HP1043 zustande kommt, oder ob eine kleine Menge CagP auch ohne den Transkriptionsfaktor produziert werden kann. Deshalb konnte im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob HP1043 eine Rolle für die unten beschriebenen Änderungen der CagP-Produktion (bei Zellkontakt) spielt.

4.6.2 Untersuchung des Einflusses von Eisen und Cyclodextrin auf die Produktion von CagP und CagH

Eine weitere Fragestellung war, ob sich die produzierte Menge von CagP unter bestimmten Umweltbedingungen ändert. Je nachdem welche Faktoren dafür sorgen, dass mehr oder weniger CagP produziert wird, könnten so ggf. Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins gezogen werden. So könnte es sein, dass eine Funktion des *cag* Typ IV Sekretionssystems die Beschaffung von bestimmten Nährstoffen, wie z.B. Eisen, ist. Es wurde nämlich beschrieben, dass CagA einen Mechanismus auslöst, der die Übertragung von Eisen aus Zellen der Magenschleimhaut an die apikale Seite der Zellen nahe den Bakterien bewirkt (Tan et al., 2011).

Andere schon veröffentlichte Ergebnisse legen nahe, dass Eisen den *cag* Typ IV-Sekretionsapparat von *H. pylori* und dessen Proteine beeinflussen kann (Testerman et al., 2006; Senkovich et al., 2010; Tan et al., 2011; Haley et al., 2014; de la Cruz et al., 2017). *H. pylori* bildet z.B. in Kultur mit Wirtszellen mehr Sekretionspili aus, wenn Eisenmangel besteht (Haley et al., 2014).

Da CagP als möglicher Bestandteil des Sekretionsapparats auch für diese Funktionen wichtig sein könnte wäre es möglich, dass auch das *cagP*-Gen in Nährstoffmangelsituationen hochreguliert werden könnte.

Dafür wurde in dieser Arbeit mittels HiBiT Reporter Assay der Frage nachgegangen, ob verschiedene Zusammensetzungen von Medien einen Einfluss auf die Menge an produziertem CagP haben. Um den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die CagP-Produktion zu testen, wurden wegen der deutlicheren Sichtbarkeit von möglichen Effekten *cagA* SD Stämme (pVB1) benutzt. Für die jeweils 2,5-stündige Vorkultur (siehe Kapitel 3.3.4) wurden die folgenden Medien benutzt.

Ham's F-12

F-12 + Cyclodextrin + FeCl₂

F-12 + Cyclodextrin (200 µg/ml)

F-12 + FeCl₂ (50 µM)

F-12 + Cyclodextrin + FeCl₂ + FCS

F-12 + FCS (10%)

PBS + FCS (10%)

PBS

Es wurden die Zusätze Eisen und Cyclodextrin gewählt, weil diese in der Literatur schon als mögliche Faktoren für eine Regulation des Cag Typ IV-Sekretionsapparats beschrieben wurden (Senkovich et al., 2010; Tan et al., 2011; Jiménez-Soto et al., 2012; Haley et al., 2014). Das Medium Ham's F-12 (siehe Kapitel 2.2) wurde als Grundlage gewählt, da sämtliche Bestandteile des Mediums bekannt sind, und es als Minimalmedium nur die notwendigsten Nährstoffe für *H. pylori* enthält (Testerman et al., 2001; Testerman et al., 2006), anders als bei den für gewöhnlich mit FCS versetzten und bei den meisten Versuchen genutzten Medien. Die in HiBiT Reporter Assays getesteten Stämme sind ein HiBiT-CagP Reporterstamm (pSL13) und ein HiBiT-CagH Reporterstamm zum Vergleich.

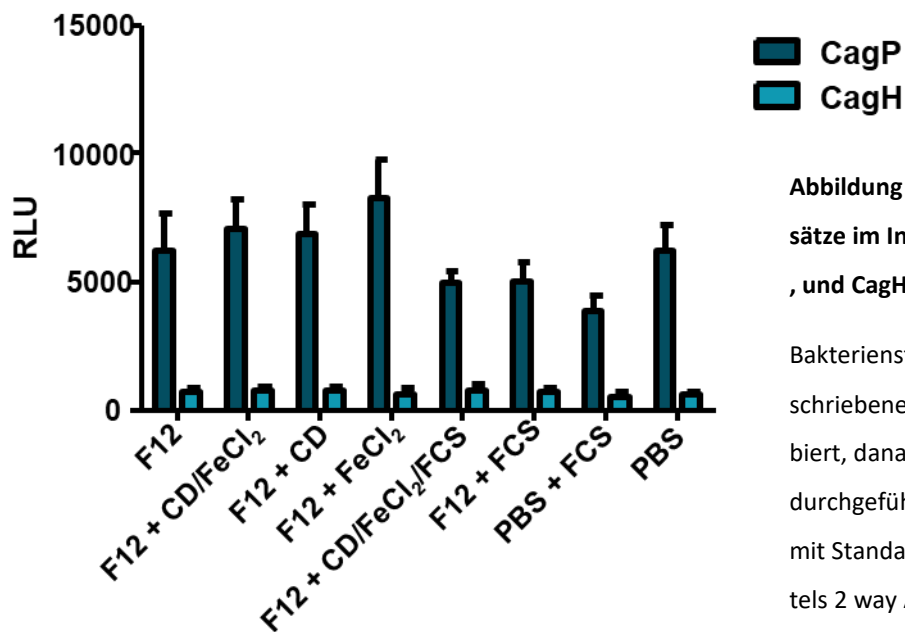


Abbildung 4.17: Einfluss verschiedener Zusätze im Inkubationsmedium für die CagP-, und CagH-Produktion

Bakterienstämme wurden 2,5 h in beschriebenen Medien (10% CO₂, 37°C) inkubiert, danach wurden HiBiT Reporter Assay durchgeführt (n=6). Daten sind dargestellt mit Standardabweichung und wurden mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test statistisch ausgewertet.

Es ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge zwischen den verschiedenen Medienzusammensetzungen ausmachen, weder für CagH noch für CagP (siehe Abbildung 4.17).

Auch auf RNA-Ebene wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Medienbedingungen in der Kultur und der Menge von *cagP* herzustellen. Dafür wurde eine qPCR (siehe Kapitel 3.2.11) durchgeführt. Hierfür wurde ein P12 WT Stamm genutzt und zum Vergleich auch die Menge des Transkripts von *cagI* gemessen. Es ließen sich allerdings keine Unterschiede im Bezug auf verschiedene Medien und RNA-Menge erkennen. Aus den Daten lässt sich lediglich schließen, dass unter allen hier getesteten Bedingungen weniger *cagP* RNA als *cagI* RNA produziert wurde (siehe Abbildung 4.18).

Um die RNA-Menge bewerten zu können, wurde als Referenz die 16S-rRNA genutzt, da dieses Gen wenig regulatorischen Schwankungen unterliegt.

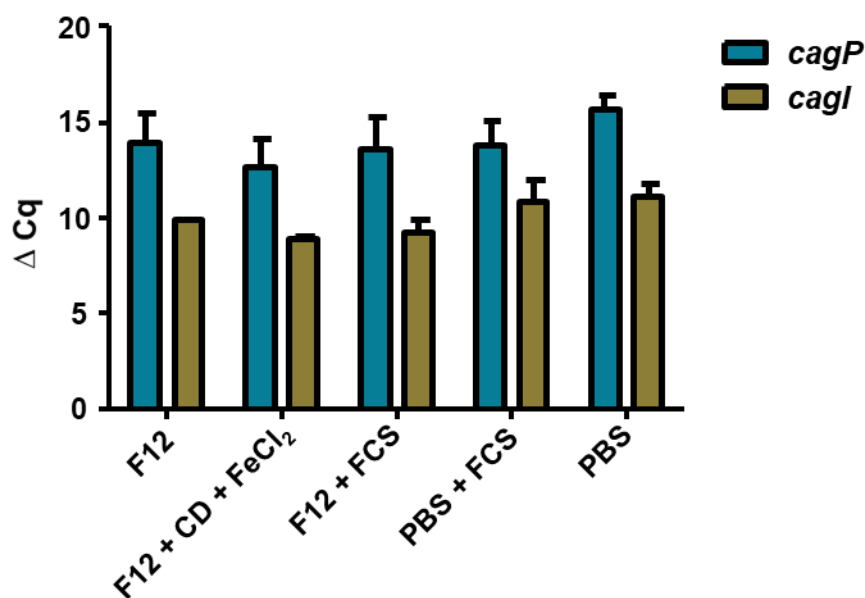


Abbildung 4.18: Auswirkung verschiedener Medienzusätze auf *cagP* und *cagI* auf RNA Ebene

Bakterienstämme wurden 2 h im jeweiligen Medium inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach eine qPCR durchgeführt (n=3 für *cagP* und n=2 für *cagI*). Die y-Achse zeigt die jeweilige Differenz der Zyklusanzahl Cq zur Zyklusanzahl des Referenzgens 16S. Die Daten wurden statistisch ausgewertet mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test und sind inklusive Standardabweichung dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich unter den hier verwendeten Bedingungen, nämlich unter Eisenüberschuss-, bzw. Eisenmangelsituationen und Cyclodextrinzusatz, die Produktion von CagP nicht signifikant verändert.

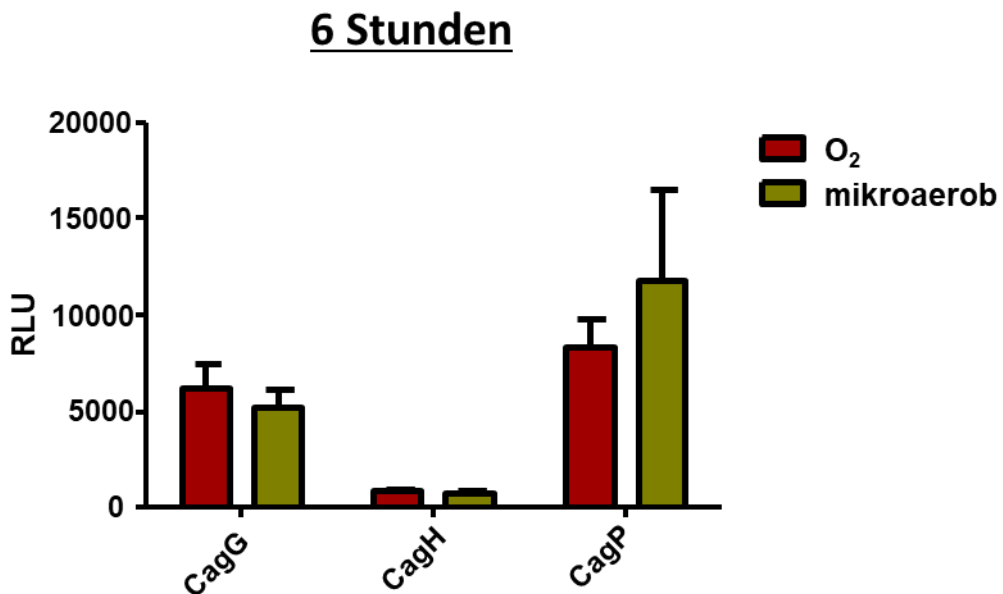
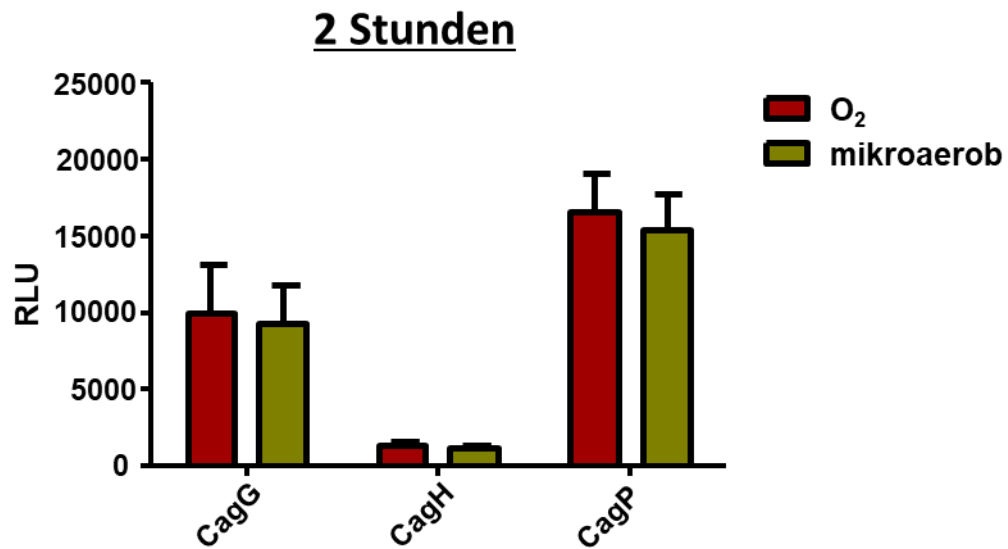
4.6.3 Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf die Produktion von CagP, CagG und CagH

Als weiterer möglicher Einflussfaktor für die Produktion von CagP wurde die Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre der Bakterienkultur getestet. Grundlage dafür ist die Überlegung, dass *H. pylori* im Magen zwar normalerweise nur sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt ist, aber die Ausbildung der *cag*Typ IV-Sekretionsapparate auch durch hohe Sauerstoffkonzentrationen induziert werden könnte, da einige Gene des Bakteriums auch als Reaktion auf erhöhte Sauerstoffkonzentrationen exprimiert werden (Park, Lee, 2013; Olekhovich et al., 2014). Diesen könnte *H. pylori* z.B. bei der Übertragung oder während der Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei einer Entzündungsreaktion ausgesetzt sein.

Um die Auswirkung von Sauerstoffkonzentrationen auf die CagP- bzw. CagG-Menge zu analysieren wurden die Bakterien für entweder 2, 6 oder 24 Stunden in einer 6-Well Platte mit 2 ml BB/FCS pro Well unter mikroaeroben Bedingungen (6% O₂; 10% CO₂; 37°C; 100rpm) oder der Umgebungsluft angepassten Sauerstoffbedingen (18% O₂; 10% CO₂, 37°C; 100rpm) inkubiert. Danach wurde ein HiBiT Assay nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.4). Die verwendeten Stämme waren ein HiBiT-CagP (pVB1) ein HiBiT-CagG und HiBiT-CagH Reporterstamm.

Nach zwei und sechs Stunden Kultur vor der Messung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Bedingung „mikroaerob“ (6% O₂) und „Sauerstoff“ (18% O₂) in der Proteinmenge von CagG, CagH oder CagP ausgemacht werden. Nach einer 24-stündigen Kultur unter den oben genannten Bedingungen konnte jedoch ein deutlicher Anstieg von CagP unter mikroaeroben Bedingungen im Vergleich zur sauerstoffreicheren Umgebung festgestellt werden (siehe Abbildung 4.19). Dabei ist davon auszugehen, dass sich *H. pylori* nach diesem Zeitraum in der stationären Phase des Wachstums befindet. Die OD bei 550 nm liegt nämlich nach 24 h unter mikroaeroben Bedingungen meist bei 1,5 bis 2, während sie bei höherem Sauerstoffgehalt bei ca. 0,5 bis 1,5 liegt, ist also je nach Versuch fast doppelt so hoch. Nach 6

h ergibt sich unter mikroaerober Atmosphäre eine ebenfalls leicht erhöhte OD₅₅₀ im Vergleich zu Inkubation bei höherem Sauerstoffgehalt. Nach 2 h liegt die OD₅₅₀ bei ca. 0,2 in beiden Versuchsansätzen und entspricht somit der OD bei Ansatz des Kultur vor der Inkubationszeit. Das Wachstum von *H. pylori* unterscheidet sich also je nach Versuchsbedingungen, vor Messungen wurden die optischen Dichten jedoch angeglichen.



24 Stunden

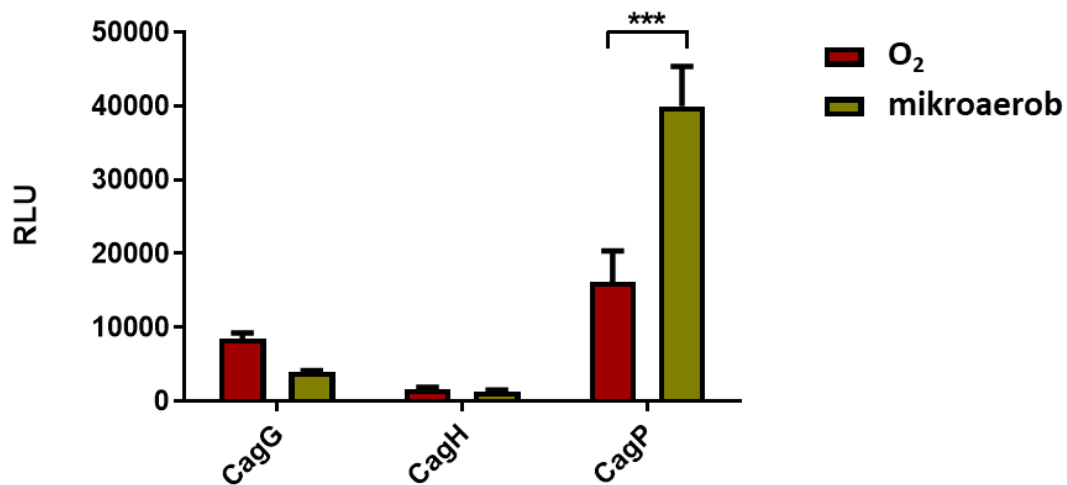


Abbildung 4.19: Die Auswirkung verschiedener Sauerstoffkonzentrationen auf die Produktion von CagG, CagH und CagP

HiBiT-Reporterstämme wurden je 2 h, 6 h oder 24 h in mikroaerober oder sauerstoffreicherer (ca. 18%) Umgebung inkubiert und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt (n=3). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test ausgewertet. *** bedeutet P < 0,001.

Im Vergleich ist also die CagP-Menge bei *H. pylori* in der stationären Phase nach längerer Inkubationszeit in mikroaerober Atmosphäre deutlich höher als bei erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzten Kulturen.

4.6.4 Untersuchung des Einflusses des pH-Werts auf die Produktion von CagP, CagG und CagH

Im menschlichen Magen herrscht ein saures Milieu, nämlich ein pH-Wert von ca. 3 im Lumen unter normalen Bedingungen, und von ca. 6 in der Schicht direkt überhalb der Mukosa (Talley et al., 1992; Schreiber et al., 2004). Dabei spielt der pH Wert auch eine Rolle für die Orientierung und Funktionsweise von *H. pylori* im Magen (Worku et al., 1999; Schreiber et

al., 2004), und auch einige Proteine des Bakteriums werden von saurem pH beeinflusst (de la Cruz et al., 2017). Es lag also nahe, auch diese Bedingung in Hinblick auf die Produktion von CagP zu untersuchen.

Es wurden HiBiT Reporter Assays mit einem CagP-HiBiT (pVB1), CagG-HiBiT sowie CagH-HiBiT Reporterstamm durchgeführt. Dabei wurden die Bedingungen pH=5 und pH=neutral (≈ 7) während der 2,5-stündigen Kultur vor Messung verglichen (siehe Kapitel 3.3.4).

Es fiel auf, dass weder die Menge von CagP noch CagH von einem sauren pH beeinflusst wurde, CagG bei saurem pH-Wert allerdings deutlich vermehrt produziert wurde (siehe Abbildung 4.20).

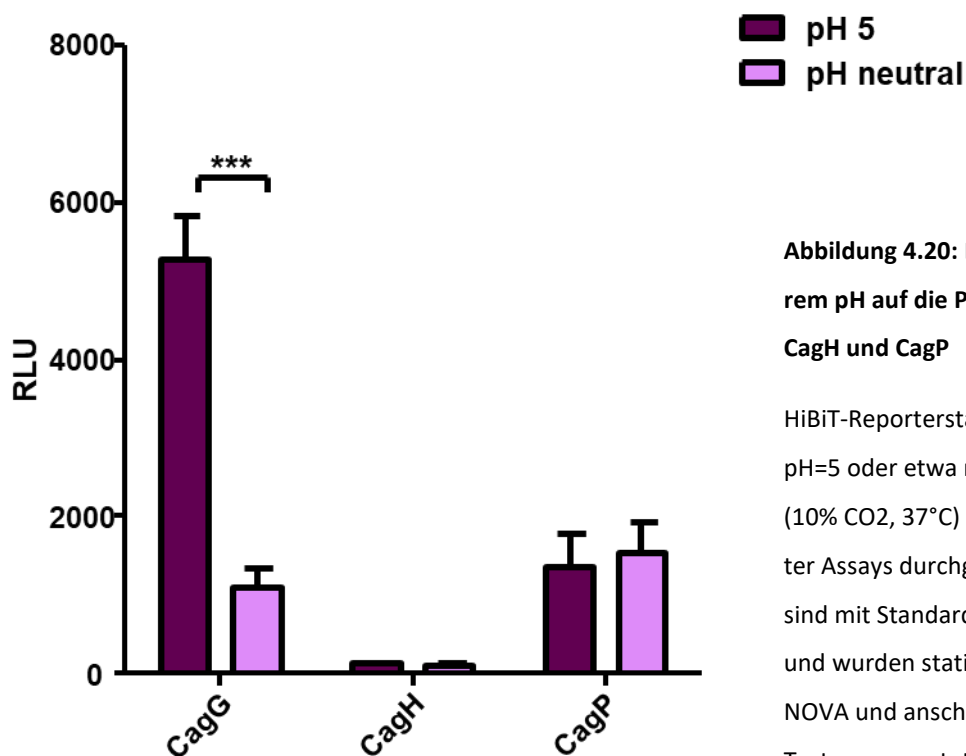


Abbildung 4.20: Die Auswirkung von saurem pH auf die Produktion von CagG, CagH und CagP

HiBiT-Reporterstämme wurden 2,5 h bei pH=5 oder etwa neutralem pH inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt (n=4). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließend Bonferroni Test ausgewertet. Dabei bedeutet *** P < 0,001.

4.6.5 Untersuchung des Einflusses eines Wirtszellkontakts

4.6.5.1 Einfluss eines Wirtszellkontakts auf die Produktion von CagP, CagG und CagH

Bei der Frage welche Faktoren die Expression von Genen der *cag* Pathogenitätsinsel bedingen oder beeinflussen könnten, ist der Wirtszellkontakt von *H. pylori* zu nennen. *H. pylori* hat

in seinem Lebensraum, dem menschlichen Magen, Kontakt zu Magenepithelzellen und dieser könnte auch die Ausbildung der *cag*Typ IV-Sekretionsapparate auslösen. Außerdem wurde der Einfluss von Zellkontakt auf die Expression einiger Gene bereits belegt (Cárdenas-Mondragón et al., 2016; de la Cruz et al., 2017). Somit wurde der Faktor Wirtszellkontakt hier für die Proteine CagP, CagG und CagH getestet. Es wurden dafür ein HiBiT-CagP Reporterstamm (pVB1), ein HiBiT-CagG und HiBiT-CagH Reporterstamm verwendet, die jeweils 2,5 Stunden entweder mit oder ohne Zellen inkubiert wurden (siehe Kapitel 3.1.5 und 3.3.4).

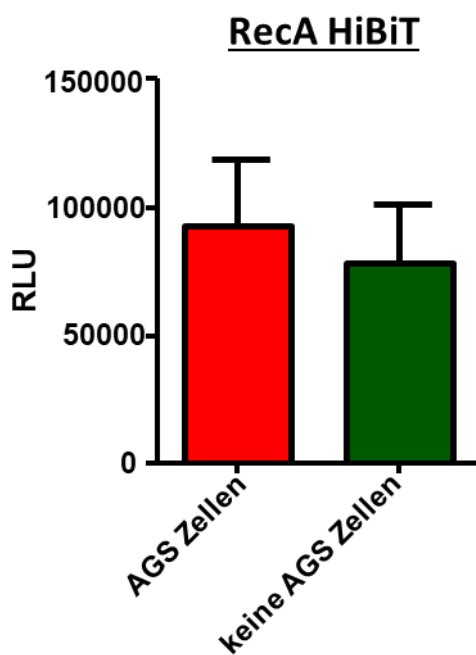
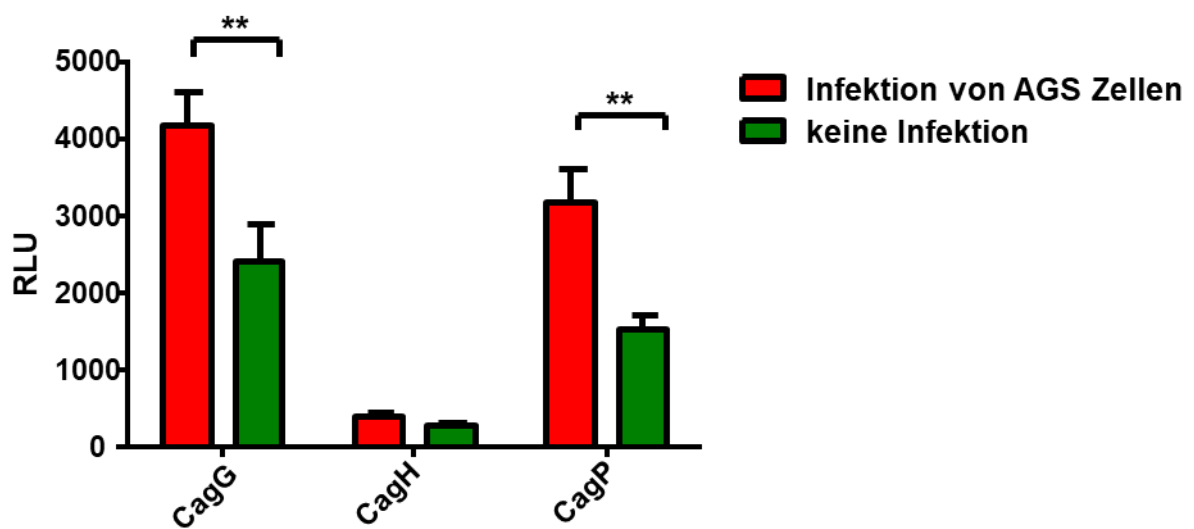


Abbildung 4.21: Einfluss von Zellkontakt während Inkubation auf die Menge von CagP, CagH und CagG

HiBiT-Reporterstämme wurden 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (AGS Zelllinie) inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt (n=6). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test ausgewertet. ** bedeutet P < 0,01. Der HiBiT-*recA* Reporterstamm dient als Kontrolle. Die Daten hierzu wurden mittels t-Test ausgewertet.

Es fällt auf, dass sowohl CagG, als auch CagP in signifikant höheren Mengen produziert werden, wenn während der Inkubationsperiode ein Kontakt zu AGS Zellen stattfand (siehe Abbildung 4.21). Als Negativkontrollen wurden jeweils Zellen ohne Bakterien und ein *recA*-HiBiT Stamm verwendet. Bei den Zellen ohne Bakterien wurde keine Lumineszenz erhöht gegenüber dem Hintergrund gemessen und der *recA*-HiBiT Stamm zeigte keine Erhöhung des Proteins RecA bei Zellkontakt (siehe Abbildung 4.21).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden sie noch einmal mit einer anderen Zelllinie (Kato III Zellen) durchgeführt, und auch in diesen Experimenten ließ sich eine erhöhte Lumineszenz bei den Proteinen CagG und CagP feststellen (siehe Abbildung 4.22 oben). Auch bei Durchführung des Versuchs mit einem anderen *H. pylori* Stamm (G27) und AGS Zellen zeigte sich dieser Effekt (siehe Abbildung 4.22 unten).

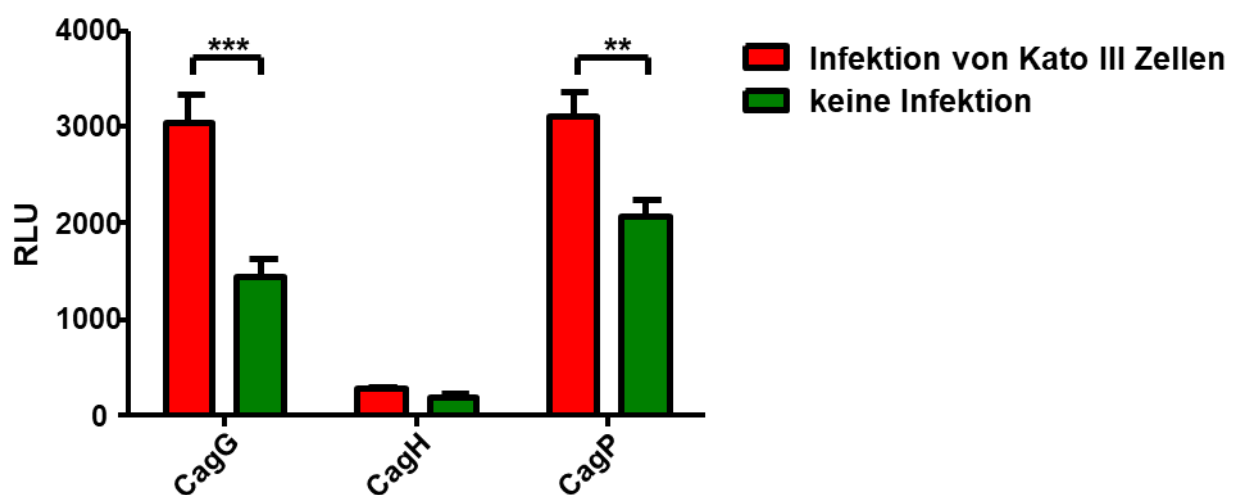


Abbildung 4.22: Oben: Einfluss von Zellkontakt auf die Produktion von CagG, CagH und CagP bei Infektion einer alternativen Zelllinie

HiBiT-Reporterstämme wurden 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (Kato III Zelllinie) inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt (n=6 für CagG und CagH und n=5 für CagP). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test ausgewertet. ** bedeutet P < 0,01, *** bedeutet P < 0,001.

HiBiT-CagP

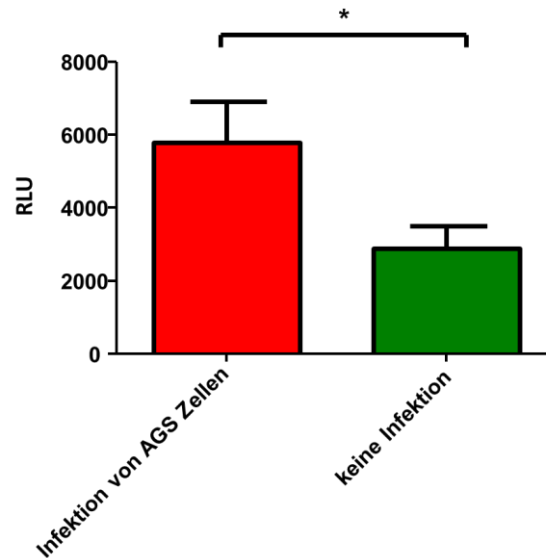


Abbildung 4.22:

Unten: Einfluss von Zellkontakt auf die Produktion von CagP bei Infektion mit einem anderen *H. pylori* Stamm

HiBiT-Reporterstamm (G27 pVB1) wurden 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (AGS Zelllinie) inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt (n=9). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels t-Test ausgewertet. * bedeutet P < 0,05

Als nächster Schritt wurde der Frage nachgegangen, ab wann genau die Mengen von CagG und CagP bei Zellkontakt im Vergleich zu Inkubation ohne Infektion erhöht sind. Es wurden die oben genannten Stämme erneut untersucht, und die Inkubation mit AGS Zellen unter den bekannten Bedingungen für eine Stunde und 2,5 Stunden angesetzt.

Dabei fiel auf, dass die gemessene Lumineszenz emittiert von HiBiT-CagP nach ca. 2,5 Stunden erhöht war. Bei CagG war das bereits nach einer Stunde der Fall, zu diesem Zeitpunkt aber sehr deutlich. Das Protein CagH war zu keinem der Zeitpunkte signifikant erhöht bei Wirtszellkontakt (siehe Abbildung 4.23).

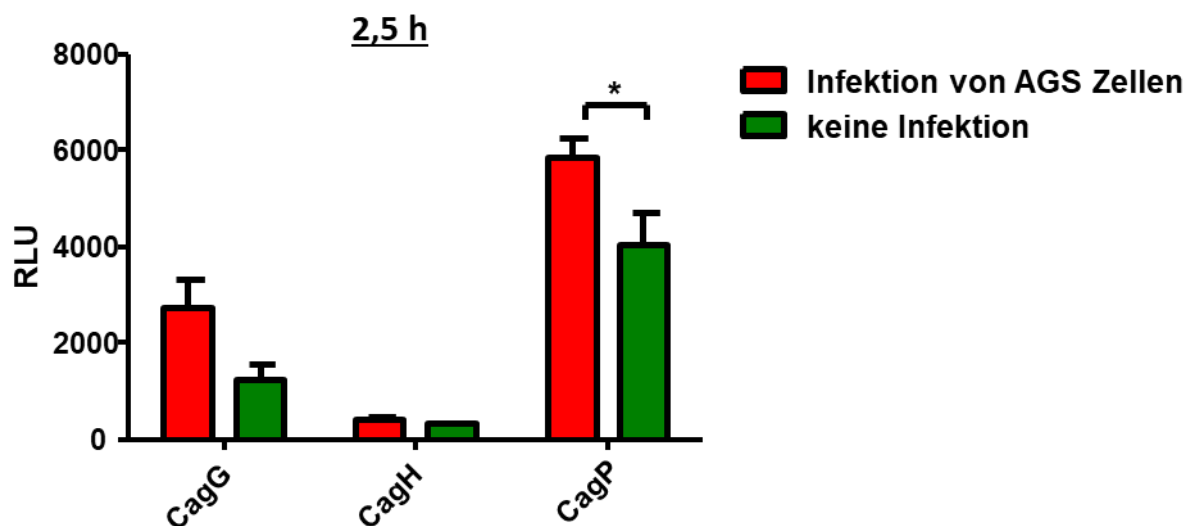
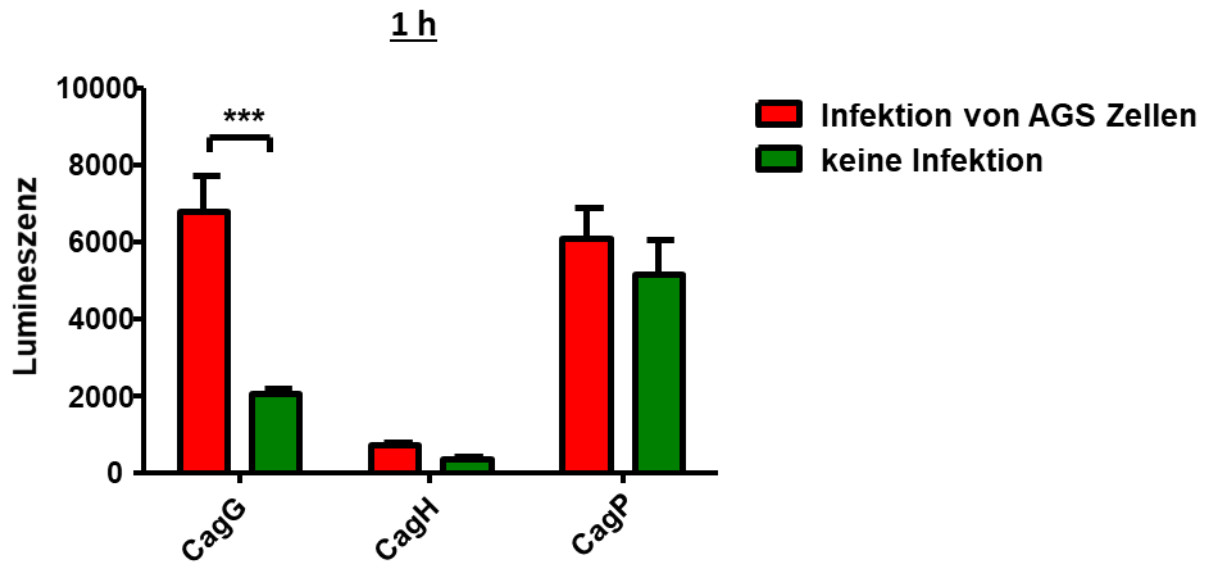


Abbildung 4.23: Zeitabhängiger Anstieg der Proteine CagP und CagG bei Inkubation mit Wirtszellen

HiBiT-Reporterstämme wurden 1 bzw. 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (AGS Zelllinie) inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt (n=4). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test ausgewertet. Dabei bedeutet * P < 0,05; ** P < 0,01 und *** P < 0,001.

Um der Regulation der *cag*-Genexpression weiter näher zu kommen, wurde der Frage nachgegangen, ob intakte Zellen für die Erhöhung der Proteinmenge nötig sind, oder schon Zelllysate ausreichen, um eine Vermehrung von CagG und CagP zu bewirken. Die Lysate wurden mittels Ultraschall hergestellt und *H. pylori* unter den bekannten Bedingungen für 2,5 Stunden inkubiert.

Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass wie bereits mehrfach gezeigt, die Proteine CagG und CagP nach 2,5-stündiger Kultur bei Zellkontakt im Vergleich zu fehlender Infektion erhöht sind. Doch auch bei Inkubation mit Zelllysaten waren die jeweiligen Proteinmengen erhöht, wenn auch nicht so deutlich wie bei den Infektionsansätzen (siehe Abbildung 4.24).

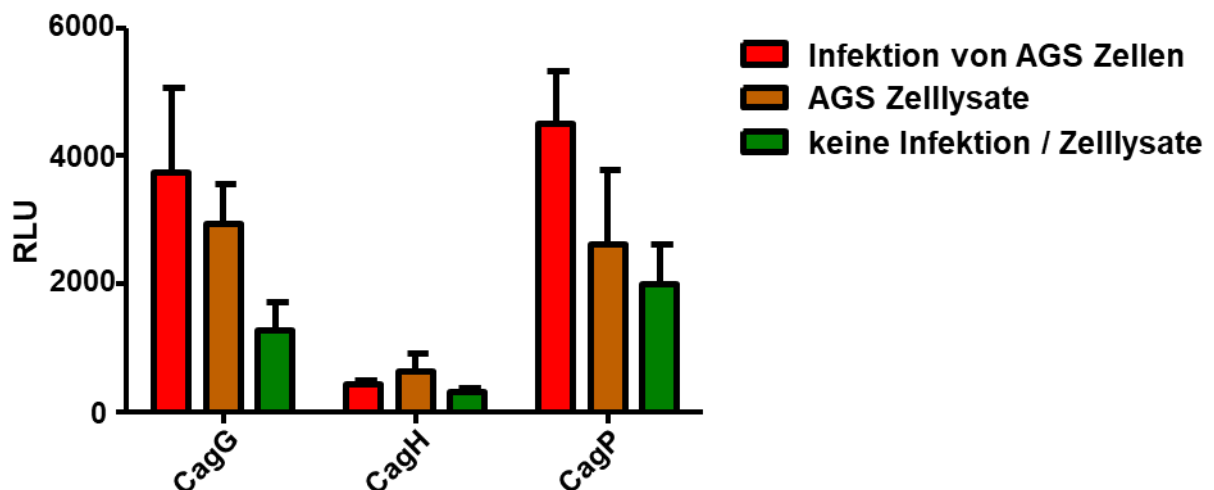


Abbildung 4.24: Menge der Proteine CagG, CagH und CagP bei Inkubation mit intakten AGS Zellen und Zelllysaten

HiBiT-Reporterstämme wurden 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (AGS Zelllinie) oder mit AGS Zelllysaten inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt (n=3). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test ausgewertet.

Man kann also sagen, dass Wirtszellkontakt sowohl eine erhöhte Produktion von CagG als auch CagP bewirkt. Möglicherweise erzeugt der Kontakt mit zellulären Molekülen diesen Effekt zu einem gewissen Grad, aber intakte Zellen scheinen effektiver zu sein.

4.6.5.2 Untersuchung der Proteinregulation bei Wirtszellkontakt mit Hilfe von verschiedenen Deletionsmutanten

Als nächstes wurde untersucht wie die Hochregulation von *cagP* und *cagG* vermittelt werden könnte. Um zu untersuchen, ob die Induktion der CagP-Produktion nach Zellkontakt über die kleine nicht-kodierende RNA HPnc2630 vermittelt wird, wurden entsprechende Deletionsmutanten untersucht. Hierfür wurde der Stamm Δ nc2630 HiBiT-CagP im Hinblick auf die Veränderung der CagP-Menge bei AGS Zellkontakt via HiBiT Reporter Assay evaluiert.

Es konnte allerdings kein Unterschied zwischen den gewöhnlichen CagP-HiBiT Reporterstämmen und der Δ nc2630 Mutante festgestellt werden, da auch in diesem Stamm die CagP-Menge bei vorheriger Inkubation mit Zellkontakt anzusteigen scheint. Der Anstieg erreichte allerdings keine statistische Signifikanz (siehe Abb. 4.25).

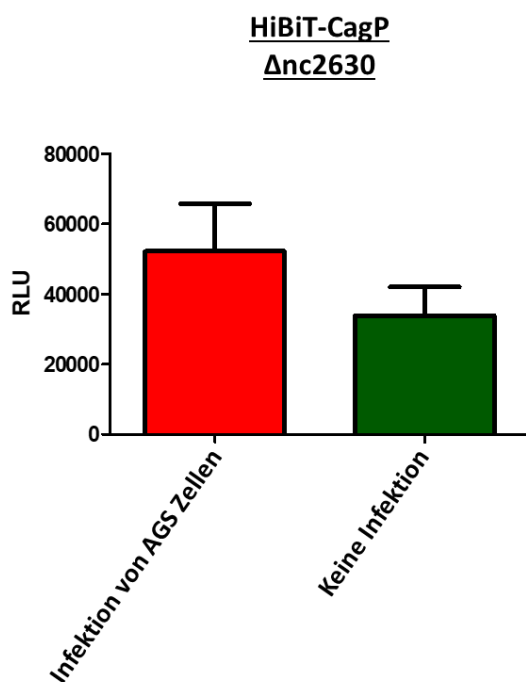


Abbildung 4.25: Die Rolle von HPnc2630 für die Erhöhung der CagP-Menge bei Inkubation mit Zellkontakt

HiBiT-Reporterstämme bei denen HPnc2630 deletiert wurde, wurden 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (AGS Zelllinie) inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt. Es wurden CagP Reporterstämme untersucht (n=5). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels t-Test ausgewertet.

Ein möglicher Bestandteil des Regulationsprozesses könnten außerdem äußere Membranproteine (OMPs) sein, die den Kontakt mit der Wirtszelle herstellen. In dieser Arbeit wurden diesbezüglich die OMPs BabA, HopQ, und HofF untersucht. Von BabA und HopQ ist schon bekannt, dass sie an der Bindung von *H. pylori* an Wirtszellen beteiligt, und auch wichtig für die vollständige Funktion des Cag Typ IV-Sekretionsapparats sind (Ishijima et al., 2011;

Belogolova et al., 2013; Busch et al., 2015; Javaheri et al., 2016; Königer et al., 2016). Die Funktion von HofF ist zwar noch nicht abschließend geklärt, aber als OMP spielt HofF auch eine Rolle bei der Adhäsion und könnte somit an Signalkaskaden wie der Vermittlung von Zellkontakt in *H. pylori* beteiligt sein (Zhao et al., 2019).

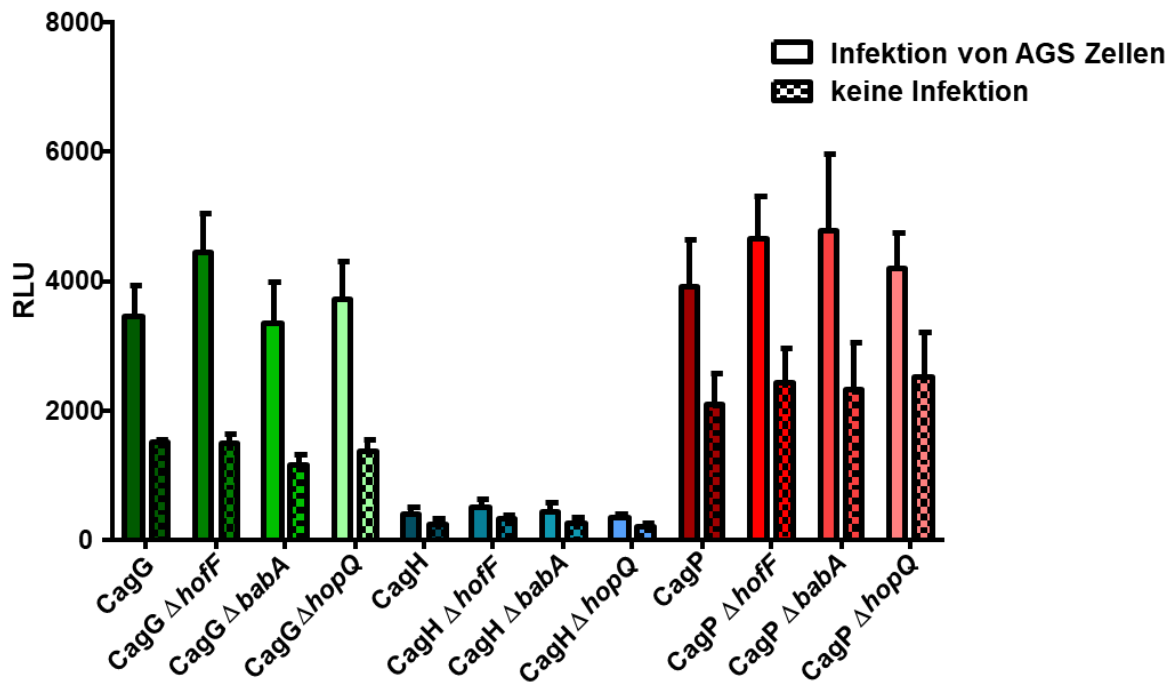


Abbildung 4.26: Die Rolle verschiedener Gene für *outer membrane proteins* von *H. pylori* für die Erhöhung der CagP-Menge bei Zellkontakt während Inkubation

HiBiT-Reporterstämme bei denen entweder *hofF*, *babA* oder *hopQ* deletiert wurde, wurden 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (AGS Zelllinie) inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt. Es wurden CagG, CagH und CagP Reporterstämme untersucht (n=4). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test ausgewertet.

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden Deletionsmutanten in den CagG-HiBiT, CagH-HiBiT und CagP-HiBiT (pVB1) Reporterstämmen hergestellt, bei denen die jeweiligen OMP Gene (Δ *hofF*, Δ *babA*, Δ *hopQ*) deletiert waren. Bei einer Vermittlung der Steigerung der CagP-, oder CagG-Produktion durch eines der genannten Membranproteine, dürfte ein Zell-

kontakt in der jeweiligen Deletionsmutante die Proteinmengen von CagP und CagG nicht beeinflussen. Allerdings war dies bei keiner der Mutanten der Fall und die gemessene Lumineszenz der Proteine CagG und CagP war bei allen getesteten Stämmen höher wenn eine Infektion während der 2,5-stündigen Kultur stattfand (siehe Abbildung 4.26), sodass eine Signalübertragung durch diese Proteine unwahrscheinlich ist.

Um der Hypothese nachzugehen, dass womöglich der Sekretionsapparat selbst für die Erkennung des Zellkontakts verantwortlich ist, wurden *cagT* Deletionsmutanten generiert, die keine Sekretionsapparate ausbilden und nicht mehr zur CagA Translokation in der Lage sind (Schindele et al., 2016). Es entstanden CagG-HiBiT, CagH-HiBiT und CagP-HiBiT (pVB1) Reporterstämme mit Deletion von *cagT*, welche im HiBiT Reporter Assay getestet wurden.

Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den CagG-, bzw. CagP-HiBiT Reporterstämmen und den $\Delta cagT$ CagG-, bzw. CagP-HiBiT Reporterstämmen ausgemacht werden, was die Hochregulation der Sekretionsapparatproteine angeht (siehe Abbildung 4.27).

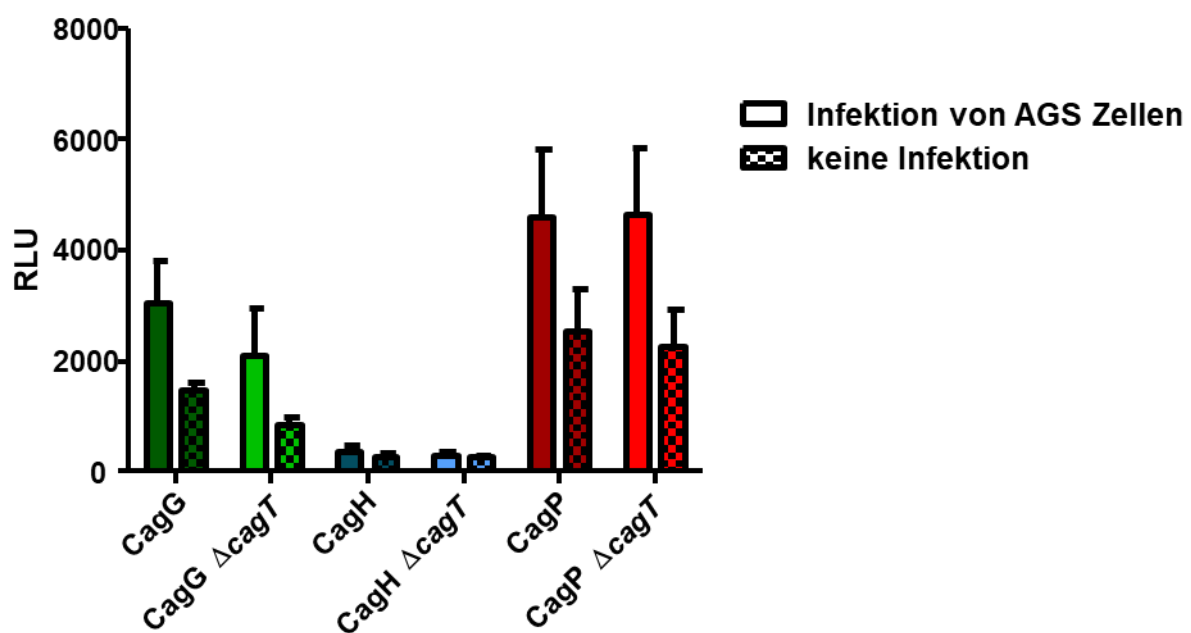


Abbildung 4.27: Die Rolle von *cagT* für die Erhöhung der CagP-Menge bei Inkubation mit Zellkontakt

HiBiT-Reporterstämme bei denen *cagT* deletiert wurde, wurden 2,5 h mit oder ohne Wirtszellen (AGS Zelllinie) inkubiert (10% CO₂, 37°C) und danach HiBiT Reporter Assays durchgeführt. Es wurden CagG, CagH und CagP Reporterstämme untersucht (n=5). Die Daten sind mit Standardabweichungen gezeigt und wurden statistisch mittels 2 way ANOVA und anschließendem Bonferroni Test ausgewertet.

5 Diskussion

5.1 Evaluierung des HiBiT Reporter Assays im Bezug auf die Quantifizierung der *cagT4SS* Proteine

Um die Funktion des *cag* Typ IV Sekretionsapparats weiter aufzuklären, und dessen Rolle bei der Humanpathogenität von *H. pylori* genauer zu verstehen, wurde in dieser Arbeit der Rolle des *cagP*-Gens bzw. des CagP-Proteins nachgegangen. Über CagP ist bis jetzt noch nicht viel bekannt, es wird allerdings auf der *cag* Pathogenitätsinsel zusammen mit den anderen *cagT4SS* Proteinen kodiert und ist vermutlich in der inneren Membran von *H. pylori* lokalisiert (Fischer 2011).

Der Einfluss einer Deletion von *cagP* sowohl auf die Aktivität des *cagT4SS* als auch auf die produzierte Menge von *cagT4SS* Proteinen wurde mit Hilfe verschiedener Methoden in dieser Arbeit nachgewiesen. Zur Quantifizierung der Proteine wurden zum einen Western Blots und zum anderen der HiBiT Reporter Assay genutzt. Es wurde festgestellt, dass die Proteine CagH, CagI und CagL, nicht aber CagG, vermindert produziert werden, wenn *cagP* deletiert wird. Der HiBiT Reporter Assay war dabei eine zentrale sowie neue Methode bei der Evaluierung der jeweiligen *cagT4SS* Proteine. Diese Methode war besonders nützlich bei den Proteinen CagG und CagP, da für diese keine Antikörper vorliegen. Aber auch CagH ließ sich durch diese Vorgehensweise besser darstellen als durch die Western Blot Technik, da nach Anwendung der Western Blot Technik für dieses Protein oft nur schwache und uneindeutige Banden zu erkennen sind.

Der HiBiT Reporter Assay beruht auf der Fusion eines Zielproteins mit einem Fragment der NanoGlo® Luziferase (HiBiT). Nach Lyse der Bakterien und Zugabe des ergänzenden Teils der Luziferase (LgBiT) sowie deren Substrat Furimazin kommt es zu einer Lumineszenz, die quantitativ gemessen werden kann. Wegen der Zugabe von LgBiT und Furimazin im Überschuss, können je nach Lumineszenz-Intensität Rückschlüsse auf die Proteinmenge gezogen werden. Das Prinzip des HiBiT Assay wurde auch im Zusammenhang mit der Western Blot Technik genutzt. Dabei wurden die Proteine wie bei einem Western Blot aufgetrennt und auf eine Membran transferiert, danach jedoch anstelle von Antikörpern mit dem LgBiT Teil der Luziferase inkubiert. So wurden die Zielproteine, die mit dem HiBiT Fragment der Luziferase fusioniert waren, nach Zugabe von Substrat als Lumineszenz emittierende Banden sichtbar.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass der HiBiT Assay eine geeignete Methode ist, um Proteine des Sekretionsapparats zu quantifizieren. Die Methode ist relativ einfach und schnell durchzuführen, und der HiBiT-Tag beeinflusst mit seinen 11 Aminosäuren die Eigenschaften der jeweiligen Proteine in vergleichsweise geringem Maß. Es muss allerdings für jedes Zielprotein ein eigener rekombinanter Stamm hergestellt werden, der den HiBiT-Tag an einer Stelle, die die Funktion des Proteins möglichst nicht beeinträchtigt, enthält. Somit können keine Messungen in Wildtyp-Stämmen durchgeführt werden.

Ein weiteres Problem bei der Quantifizierung von Proteinen mithilfe des HiBiT Assays sind fehlende interne Kontrollen, denn Positivkontrollen, die als Referenz dienen können (z.B. RecA-HiBiT Stämme), sind nur als unabhängiger Stamm vorhanden, und verhalten sich unter den jeweils untersuchten Bedingungen womöglich anders als der zu untersuchende Stamm. Es müssen also immer geeignete Kontrollen verwendet werden, z.B. sogenannte *housekeeping*-Gene. Dabei muss auch darauf geachtet werden, dass stets gleiche Mengen verschiedener Stämme miteinander verglichen werden (bzw. gleiche Gesamtprotein-Mengen). Man könnte auch womöglich eine alternative Luziferase als Kontrolle einsetzen, die in den Stämmen produziert wird und ein anderes Substrat nutzt.

Mit Hilfe des HiBiT Reporter Assays und der HiBiT Blot Technik konnte die zuvor im Western Blot abgeschätzte Reduktion von CagH bei *cagP* Deletion bestätigt werden. Die Proteine CagG und CagH lassen sich auch ohne Probleme via HiBiT Blot Technik darstellen.

Allerdings kann man zur HiBiT Blot Technik im Bezug auf CagP als Protein sagen, dass sich CagP damit nicht so gut darstellen lässt wie man das bei dessen Signalstärke im HiBiT Reporter Assay erwarten würde. Diesen Schluss kann man daraus ziehen, dass die Proteine CagG und CagP zwar im HiBiT Reporter Assay Lumineszenz in der gleichen Größenordnung ausstrahlen, die Banden von CagG nach Auftrennung und Blotten mit Hilfe der HiBiT Blot Technik aber deutlich stärker sichtbar sind als die von CagP.

Obwohl dieses Phänomen nicht abschließend aufgeklärt werden konnte, und man so die Quantität von CagP im Vergleich mit anderen Proteinen in der Darstellung mit Hilfe von HiBiT Blots nicht abschätzen kann, wurde die Methode doch genutzt um verschiedene HiBiT-CagP Reporterstämme untereinander zu vergleichen. So konnte die Steigerung der

CagP-Menge bei Deletion von HPnc2630 auch mittels HiBiT Blot Technik visualisiert werden (siehe Abbildung 4.4; 4.5). Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen könnte die bereits beschriebene nicht vollständige Transkription des *cagP* Genlocus sein (Sharma et al., 2010). Womöglich entstehen dadurch Teile von CagP, die zwar einen HiBiT Tag besitzen, aber nicht die Größe des vollständigen CagP-Proteins erreichen, und deshalb nicht in der CagP Bande des HiBiT Blots zu sehen sind, oder aber CagP wird teilweise abgebaut, wobei der HiBiT-Tag erhalten bleibt. Auch die hohe Hydrophobizität von CagP könnte ein Problem darstellen.

Abschließend lässt sich sagen, dass mit Hilfe des HiBiT Reporter Assays in dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Proteinmengen der *cagT4SS* Proteine gewonnen wurden. Der Einfluss von *cagP* auf CagH und CagG, sowie der Einfluss verschiedener Veränderungen des *cagP* Genlocus auf CagP wurden hier ermittelt und beschrieben. Trotz einiger Unklarheiten in Bezug auf die Darstellung von CagP mittels HiBiT Blot Technik ist diese aufgrund von fehlenden CagP Antikörpern eine nützliche Ergänzung zur CagP Detektion.

5.2 Die Rolle des vorhergesagten Startcodons und des 5`-Endes von *cagP*

In dieser Arbeit wurde in Bestätigung vorangegangener Experimente gezeigt, dass *cagP* essentiell für die volle Funktionalität des Sekretionsapparats ist. Dafür wurden *cagP* Deletionsmutanten mittels TEM-1-CagA-Translokationsassay untersucht. Die CagA Translokation stellt hierbei das Äquivalent für die *cagT4SS* Aktivität dar. Die Daten zeigen, dass die CagA Translokation bei Deletion von *cagP* von 100% auf ca. 10% zurückgeht. Das heißt, dass die CagA Translokation zwar bei Fehlen von *cagP* möglich, aber deutlich eingeschränkt ist. Interessant ist hierbei noch, dass die Überexpression der Gene *cagH*, *cagI* und *cagL* den Funktionsverlust durch *cagP* Deletion teilweise kompensieren kann, sodass bei einer solchen Überexpression die CagA Translokation wieder auf ca. 50% ansteigt. Die Proteine CagH, CagI und CagL werden auch vermindert produziert, wenn *cagP* deletiert ist, was zur Vermutung führt, dass ein Zusammenspiel dieser Proteine mit CagP besteht. Eine volle Kompensation des Funktionsverlusts des Sekretionsapparats durch die *cagP* Deletion kann aber nicht durch vermehrte Produktion dieser Proteine erreicht werden. Das macht eine Funktion von *cagP* als einfacher Regulator für die CagH-, CagI-, und CagL-Produktion unwahrscheinlich.

Der Frage ob das CagP-Protein für die volle Funktion des *cagT4SS* verantwortlich ist, oder bereits das *cagP* Transkript dafür ausreichend ist, wurde ebenfalls nachgegangen. Der Grund dafür war, dass CagP als Protein physiologisch in nur sehr geringen Mengen von *H. pylori* produziert wird. Das legen HiBiT Assay Daten nahe, die mit HiBiT-CagP WT Stämmen gewonnen wurden (siehe Abbildung 4.4). Die Lumineszenzwerte in P12 Stämmen mit der natürlicherweise vorkommenden *cagP* Shine-Dalgarno-Sequenz lagen nur wenig, aber eindeutig, über den gemessenen Hintergrundwerten. Deshalb wurde der Fragestellung nachgegangen welchen Einfluss CagP als Protein auf die CagA Translokation hat, und *H. pylori* Stämme mit TEM-1-CagA und mutiertem *cagP* Startcodon (mutATG) in TEM-1-CagA Translokationsassays getestet (Abb. 4.12). Bei dieser Mutation geht die CagA Translokation nicht wie bei einer vollständigen *cagP* Deletion auf 10%, sondern nur auf ca. 50% zurück.

Daraus könnte man schließen, dass CagP nicht nur als Protein eine Funktion für das *cagT4SS* erfüllt, sondern auch das *cagP* Transkript selbst, das möglicherweise eine modulierende Funktion einnehmen könnte. Das würde den Effekt einer *cagP* Deletion auf die CagA Translokation, bei einer gleichzeitig geringen Produktion von CagP in WT Stämmen erklären. Eine andere Erklärung für die beobachtete verminderte CagA Translokation ist das Vorhandensein von alternativen Startcodons, die dafür sorgen, dass trotz Deletion bzw. Mutation des vorhergesagten Startcodons noch *cagP* produziert werden kann. Das hätte möglicherweise zur Folge, dass weniger Protein vorhanden ist, und die Aktivität des *cagT4SS* deshalb zurückgeht. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde versucht bei den mutATG Stämmen die verminderte CagA Translokation durch eine Überexpression von *cagH*, *cagI* und *cagL* zu kompensieren. Hier blieb die CagA Translokation aber bei ca. 50%, entsprechend den mutATG Stämmen. Bei einer Steigerung der CagA Translokation hätte man davon ausgehen können, dass die Reduktion der CagA Translokation um 50% durch die fehlende regulatorische Funktion von *cagP* auf *cagH*, *cagI* und *cagL* entsteht, die in diesem Fall vom Startcodon abhinge. Ob es alternative Startcodons gibt, kann man aus diesen Ergebnissen jedoch nicht schließen.

Es ist also noch nicht vollständig klar, inwiefern CagH, CagI und CagL die Funktion von *cagP* kompensieren können. Zumindest auf den Teil der Funktion, die *cagP* auch ohne Startcodon

bzw. mit mutiertem vorhergesagtem Startcodon erfüllen kann, scheinen diese Proteine keinen Einfluss zu haben. Das Startcodon scheint, wenn auch in geringerem Maße als *cagP*, wichtig für die volle Funktion des *cagT4SS* zu sein.

Es wurden weitere genetische Elemente im Bereich des Translationsstarts des *cagP* Genlocus untersucht um festzustellen, welche Rolle diese für die Aktivität des *cagT4SS* haben.

Deshalb wurden verschiedene TEM-1-CagA Stämme untersucht, bei denen verschiedene Bereiche des *cagP* Genlocus in der Nähe des Translationsstarts von *cagP* und auch im *cagP* Gen deletiert wurden.

Es konnte festgestellt werden, dass verschiedene Deletionen in der Translationsinitiationsregion unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität des *cagT4SS* haben. So führt z.B eine Deletion der mutmaßlichen *cagG* mRNA Bindestelle in HPnc2630 in Kombination mit einem mutierten *cagP* Startcodon nicht zu einer Reduzierung der CagA Translokation. Bei Deletion der mutmaßlichen Interaktionsstelle von *cagG* mRNA und HPnc2630 wird allerdings auch der größte Teil des mutmaßlichen Terminators in HPnc2630 deletiert. Das könnte wiederum zu einer Steigerung der CagP-Produktion und damit auch der CagA Translokation führen. Die alleinige Mutation des *cagP* Startcodons führt, wie schon erwähnt, zu einer Verminderung der CagA Translokation auf ca. 50%, wohingegen eine alleinige Deletion der mutmaßlichen *cagG* mRNA Bindestelle zu einer Steigerung der CagA Translokation führt. Vermutlich kompensieren sich diese beiden Einflüsse gegenseitig und das ist der Grund dafür, dass die *cagT4SS* Aktivität in diesen Stämmen nicht reduziert ist.

Bei einer Deletion der mutmaßlichen *cagG* mRNA Bindestelle, zusätzlicher Deletion des *cagP* SD Bereichs sowie Mutation des Startcodons ist die CagA Translokation stark vermindert, aber deutlich vorhanden (ca. 30-40%). Allerdings hat eine zusätzliche Deletion von weiteren 24 Basen stromabwärts des Startcodons einen nochmals größeren Effekt, und die CagA Translokation geht auf ca. 5-10% zurück, was in etwa dem Niveau von $\Delta cagP$ Mutanten entspricht. Ein weiterer Defekt in Form einer zusätzlichen Deletion von nochmals 78 Basen stromabwärts des Startcodons scheint die CagA Translokation ebenfalls auf dieses Niveau zu senken.

Dass das Transkript neben dem CagP-Protein eine Funktion für das *cagT4SS* übernehmen könnte, konnte schon durch Evaluierung von *cagP* Startcodon Mutanten gezeigt werden. Da die Größe des deletierten Bereichs im *cagP* Genlocus mit der Einschränkung der CagA

Translokation zu korrelieren scheint, könnte das auch für das Vorhandensein alternativer Startcodons sprechen. So könnte durch Deletion der ersten 9 vorhergesagten Codons von *cagP* auch ein alternatives Startcodon verloren gehen, wodurch dann kein CagP mehr produziert würde. Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, könnte man in zukünftigen Experimenten z.B. ein weiteres Stoppcodon an dieser Stelle in das *cagP*-Gen einbauen, und dann die CagA-Translokation evaluieren.

Außerdem soll noch erwähnt werden, dass eine Deletion des mutmaßlichen *cagP*-Promoters ebenfalls eine Verminderung der CagA Translokation zur Folge hat, nämlich auf ca. 15%, und dabei wiederum in etwa auf dem Niveau einer *cagP* Deletionsmutante liegt. Das spricht für die Funktion dieses Bereichs als *cagP*-Promoter.

Was sich also sagen lässt ist, dass CagP vermutlich trotz seiner geringen Produktion als Protein essentiell für die effiziente CagA Translokation ist. Eine direkte Rolle des *cagP*-Transkripts lässt sich mit den hier gewonnenen Ergebnissen nicht ausschließen, vermutlich spielt aber das CagP-Protein die entscheidende Rolle.

5.3 Die Funktion von HPnc2630

Ein bemerkenswertes Element des *cagP* Genlocus ist die kleine nicht-kodierende RNA HPnc2630. HPnc2630 wurde schon als Modulator von Motilität und Adhäsion von *H. pylori* identifiziert. Außerdem wird vermutet, dass die RNA einen Terminator in einer stem-loop Form an ihrem 3'-Ende enthält (Sharma et al., 2010; Vannini et al., 2016). Es liegt also nahe, dass dieser Terminator einen Einfluss auf die Transkription von *cagP* hat.

Das wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Δ nc2630 HiBiT-CagP Reporterstämmen näher untersucht. Wie in Abbildung 4.4 gezeigt wurde, steigt die CagP-Produktion drastisch an, wenn HPnc2630 inklusive Terminator deletiert wurde. Das spricht dafür, dass HPnc2630 tatsächlich einen Terminator enthält, durch dessen Effekt CagP vermindert produziert wird. Dabei ist die Transkriptionstermination nicht vollständig, denn auch mit Terminator wird noch CagP produziert.

Allerdings handelt es sich bei den hier untersuchten Stämmen um Reporterstämmen, bei denen die *cagP* Shine-Dalgarno-Sequenz (WT) mit der von *cagA* ersetzt wurde (HiBiT-CagP *cagA* SD). Somit wird in diesen Reporterstämmen unabhängig von HPnc2630 vermehrt CagP produziert. Es wäre aber zu erwarten, dass auch in *cagP* SD HiBiT Reporterstämmen eine

vermehrte Produktion von CagP bei Deletion von HPnc2630 eintritt, da der Effekt eindeutig und konstant in allen *cagA* SD Stämmen auftritt.

Dadurch, dass HPnc2630 einen Terminator enthält und somit weniger CagP produziert wird, könnte auch die erhöhte CagA Translokation in Δ nc2630 TEM-1-CagA Stämmen erklärt werden. In Abbildung 4.9 wurde gezeigt, dass die CagA Translokation ansteigt, wenn HPnc2630 deletiert wurde. Dabei stieg die Aktivität des *cagT4SS* auf ca. 150% in Δ nc2630 TEM-1-CagA Stämmen im Vergleich zum Wildtyp an. Die kleine nicht-kodierende RNA scheint also nicht nur die CagP-Produktion, sondern darüber auch die CagA-Translokation zu vermindern.

Gegen diese Erklärung spricht allerdings, dass sowohl bei *cagP* SD als auch *cagA* SD TEM-1-CagA Stämmen eine CagA Translokation von ca. 100% gemessen wurde, obwohl, wie schon erwähnt, die CagP-Produktion in *cagA* SD Stämmen ebenfalls deutlich erhöht im Vergleich zu *cagP* SD Stämmen ist.

Um die Funktion von HPnc2630 aufzuklären wurde auch der Hypothese nachgegangen, ein Teil der kleinen nicht-kodierenden RNA könnte an die *cagG* mRNA binden, und somit die Produktion von CagG beeinflussen. Diese Hypothese entstand auf der Grundlage einer bioinformatischen Vorhersage und wurde hier versucht zu überprüfen. Dafür wurden Stämme generiert, denen die vorhergesagte Region für Bindungen mit der *cagG* mRNA in HPnc2630 fehlt. Diese Stämme wurden sowohl mittels TEM-1-CagA-Translokationsassay im Hinblick auf ihre CagA Translokation als auch mittels HiBiT Reporter Assay im Hinblick auf ihre CagG-, und CagH-Produktion untersucht. Eine veränderte Produktion von CagH bzw. CagG bei Δ GmRBS Mutanten konnte unter den hier getesteten Bedingungen allerdings nicht festgestellt werden. Die Hypothese konnte also nicht bestätigt werden, da eine erhöhte CagG-Produktion bei Deletion der vorhergesagten Bindestelle zu erwarten gewesen wäre.

Jedoch scheint die Deletion der mutmaßlichen Bindestelle einen Effekt auf die CagA Translokation zu haben. Diese ist nämlich deutlich gesteigert, von 100% in WT TEM-1-CagA Stämmen auf fast 200% in Δ GmRBS TEM-1-CagA Stämmen. Das könnte daran liegen, dass wie bei den Δ nc2630 Stämmen hier auch der mutmaßliche Terminator, oder zumindest der größte Teil davon, deletiert ist. Auf den Einfluss von CagH und CagG lässt sich die gesteigerte *cagT4SS* Aktivität wohl nicht zurückführen, da die Mengen der beiden Proteine bei Deletion der vorhergesagten Bindestelle, wie oben schon erwähnt, nicht verändert sind.

Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass sowohl eine vollständige Deletion von HPnc2630, als auch eine Deletion des mutmaßlichen *cagG* mRNA Bindestellen-Teils eine Steigerung der CagA Translokation zur Folge haben, und HPnc2630 somit einen reduzierenden Effekt auf die Aktivität des *cagT4SS* zu haben scheint. Das liegt vermutlich an dem Terminator, der sich als Stemloop-Sequenz am 3'-Ende von HPnc2630 befindet, und eine verminderte CagP-Produktion zur Folge hat. Auf jeden Fall wird bei Fehlen von HPnc2630 deutlich mehr CagP produziert, als das bei WT Stämmen der Fall ist, was eine Wirkung des Terminators am Ende von HPnc2630 bestätigt.

5.4 Die *cagP* Expression kann durch äußere Einflüsse reguliert werden

Da die Sekretionspili von *H. pylori* erst auf bestimmte Reize hin ausgebildet werden (Rohde et al., 2003; Haley et al., 2014) liegt es nahe, dass auch die Expression der Gene für den *cag* Typ IV-Sekretionsapparat durch äußere Faktoren reguliert wird.

Verschiedene Faktoren könnten im Zusammenhang mit dem natürlichen Habitat von *H. pylori* eine Rolle für das *cag* Typ IV-Sekretionssystem spielen. Der Einfluss von hohen Sauerstoffkonzentrationen, Eisenmangel, niedrigem pH-Wert sowie Wirtszellkontakt wurden in dieser Arbeit als Bedingungen untersucht.

Wachstum in einer mikroaeroben Atmosphäre (ca. 6% O₂) hatte im Vergleich zu erhöhten Sauerstoffkonzentrationen, nämlich 18% O₂, erst nach längerer Inkubationszeit, nämlich 24 Stunden, einen Einfluss auf die CagP-Menge. Dabei war die CagP-Produktion deutlich höher, wenn *H. pylori* unter mikroaeroben Bedingungen, also mit niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen inkubiert wurde. Eine Hochregulation von *cagP* unter mikroaeroben Bedingungen geschieht erst nach einer derart langen Inkubationszeit, wobei sich *H. pylori* dann in einer stationären Wachstumsphase befindet.

Da *H. pylori* unter mikroaeroben Bedingungen deutlich stärkeres Wachstum zeigt, und niedrigere Sauerstoffkonzentrationen auch eher den Bedingungen im menschlichen Magen ähneln (Friedman et al., 2018; Di et al., 2020), könnte eine Hochregulation von *cagP* Ausdruck einer besseren Anpassung von *H. pylori* an diese Bedingungen sein. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass *H. pylori* auch unter höheren Sauerstoffkonzentrationen, unter der Bereitstellung von ausreichend CO₂ Wachstum zeigt (Bury-Moné et al., 2006; Park, Lee, 2013). CagG

und CagH scheinen auch nach 24 h nicht von einer erhöhten Sauerstoffkonzentration beeinflusst zu sein.

Da *H. pylori* bei der Mensch zu Mensch Übertragung oder bei Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Immunzellen zumindest kurzfristig Kontakt mit erhöhten Sauerstoffkonzentrationen haben könnte (Butcher et al., 2017), wurden diese als Auslöser für *cagT4SS* Aktivitätssteigerung diskutiert. Aber zumindest für die drei hier untersuchten Proteine scheint der Kontakt zu erhöhten Sauerstoffkonzentrationen nicht zu einer vermehrten Produktion, und somit einer möglichen *cagT4SS* Aktivitätssteigerung, zu führen.

H. pylori ist im menschlichen Magen zumindest kurzfristig niedrigen pH-Werten ausgesetzt, denn im Lumen des Magens beträgt der pH-Wert ca. 2. *H. pylori* bewegt sich allerdings schnell zur Mukosa, wo der pH-Wert bei ca. 6 liegt (Schreiber et al., 2004). Ein saurer pH-Wert ist bekannterweise auch für die Regulation von verschiedenen Genen in *H. pylori* verantwortlich (Pflock et al., 2006; Marcus et al., 2018).

Um den Einfluss eines sauren pH-Wertes auf bestimmte *cagT4SS* Proteine zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit CagP-, CagH-, und CagG-HiBiT Reporterstämme bei einem pH-Wert von 5 inkubiert und danach die jeweiligen Proteinmengen ermittelt. Dabei fiel auf, dass lediglich die Expression von *cagG* in einer sauren Umgebung hochreguliert wird. Womöglich spielt CagG also eine Rolle bei der Initiierung der *cag* Typ IV-Sekretionsapparate, welche bei saurem pH aktiviert werden könnten. Bekannt ist jedenfalls, dass *H. pylori* den pH-Wert Gradienten nutzt, um sich im menschlichen Magen zu orientieren, und seinen Weg zur Mukosa und den Magenepithelzellen zu finden (Schreiber et al., 2004). Außerdem scheint ein saurer pH-Wert bei *H. pylori* Infektion zu vermehrter IL-8 Freisetzung in den Magenepithelzellen zu führen (Choi et al., 2007).

Die Untersuchung von verschiedenen Eisenkonzentrationen in den Medien der *H. pylori* Kultur führte im Rahmen dieser Arbeit nicht zu Veränderungen der Menge der untersuchten *cagT4SS* Proteine. Weder Eisenüberschuss, noch eine Eisenmangelsituation führten zu einer signifikanten Veränderung der *cagP* Expression. Der Eisengehalt in der Umgebung scheint allerdings einen Einfluss auf *H. pylori* zu haben. So könnte Eisenmangel ein Auslöser für die Ausbildung der Sekretionspili und *cagT4SS* sein, und dieser Mechanismus somit auch die Funktion der Eisenbeschaffung aus Wirtszellen haben. (Tan et al., 2011; Harris et al., 2013; Haley et al., 2014). Unter diesen Gesichtspunkten liegt die Vermutung nahe, dass auch

cagT4SS Proteine wie CagH, CagG, oder CagP auf veränderte Eisenkonzentrationen hin vermehrt oder vermindert gebildet werden. Dies konnte allerdings, wie schon erwähnt, unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen nicht bestätigt werden.

Jedoch wurde die *cagP* und auch die *cagG* Expression durch den Kontakt mit Wirtszellen nachgewiesenermaßen moduliert. Da *H. pylori* über den *cag*Typ IV-Sekretionsapparat CagA in die Magenepithelzellen transloziert, ist eine Aktivierung des *cagT4SS* bei Kontakt mit Wirtszellen, und somit auch eine Hochregulierung von *cagT4SS* Genen, plausibel. Eine Steigerung der Expression z.B. von Typ II Toxin-Antitoxin Genen bei Wirtszellkontakt wurde bereits nachgewiesen (Cárdenas-Mondragón et al., 2016). Auch diverse Transkriptionsfaktoren werden bei Wirtszellkontakt bekannterweise hochreguliert (de la Cruz et al., 2017).

In dieser Arbeit wurden die Proteinmengen von CagG, CagH und CagP nach Inkubation mit AGS-Zellen und Kato III-Zellen via HiBiT Reporter Assay untersucht. Dabei waren sowohl die Mengen von CagP als auch von CagG nach einer Infektion erhöht. Dieser Effekt konnte im P12 und im G27 Stamm nachgewiesen werden.

Es wurde außerdem versucht nachzuverfolgen, wie genau die Hochregulation von *cagG* und *cagP* vermittelt wird. Dabei spielten verschiedene Überlegungen eine Rolle. Zum einen könnte die Bindung von *H. pylori* an die Wirtszellen, in diesem Fall Magenepithelzellen, eine Signalkaskade auslösen, die die vermehrte Produktion von CagG und CagH zur Folge hat. Für die Bindung von *H. pylori* an Wirtszellen sind, wie in der Einleitung beschrieben, die OMPs essentiell. Es gibt diverse OMPs, die in fünf Familien eingeteilt werden (Backert et al., 2011; Oleastro, Ménard, 2013), in dieser Arbeit wurden drei davon im Hinblick auf ihre Funktion bei Wirtszellkontakt untersucht. Es handelt sich um HopQ, HofF und BabA. Die Gene dieser Proteine wurden in den jeweiligen HiBiT Reporterstämmen deletiert, und dann in HiBiT Reporter Assays mit vorhergegangener Infektion die Proteinmengen bestimmt. Die schon beschriebenen erhöhten Proteinmengen von CagG und CagP konnten auch hier bei allen Stämmen festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die drei untersuchten OMPs nicht am Prozess der Hochregulierung der *cagT4SS* Gene beteiligt sind. Allerdings wurde hier jeweils nur ein Gen deletiert. Es kann also daraus nur geschlossen werden, dass ein Knockout eines der drei OMPs keinen Einfluss auf den Effekt von AGS Zellkontakt hat. Womöglich kann *H. pylori* einfach auf die jeweils andern OMPs ausweichen, oder hier nicht untersuchte Adhä-

sionsproteine spielen eine Rolle. Es ist also nicht auszuschließen, dass der beobachtete Effekt durch andere oder sogar die hier untersuchten OMPs im Zusammenspiel zustande kommt.

Die Translokation von CagA in Wirtszellen stellt einen zentralen Aspekt der *H. pylori* Infektion dar. Die Ausbildung der Sekretionsapparate könnte deshalb auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des Zellkontakts spielen und zur Regulation von *cagT4SS* Genen beitragen. Dieser Überlegung wurde hier mit Hilfe von *cagT* Deletionsmutanten und HiBiT Reporter Assays mit vorheriger Infektion von AGS Zellen nachgegangen. Auch hier waren als Effekt des Wirtszellkontakts erhöhte Proteinmengen von CagG und CagP zu sehen. Da aber $\Delta cagT$ Stämme nicht mehr zu CagA Translokation und Ausbildung von funktionsfähigen *cagT4SS* in der Lage sind, lässt sich aus den dennoch erhöhten Proteinmengen von CagP und CagG schließen, dass die Apparate wohl ebenfalls nicht wichtig für eine mögliche Signaltransduktion sind.

Interessanterweise stiegen die Proteinmengen von CagG und CagP auch bei einer Inkubation mit AGS-Zelllysate an, allerdings nicht so stark wie bei Inkubation mit intakten Zellen. Es ist davon auszugehen, dass durch die Zerstörung der Zellstruktur mittels Ultraschall nur noch Membranvesikel, Zellorganellen sowie zytosolische Faktoren intakt sind. Membranvesikel mit Oberflächenmolekülen könnten die teilweise Hochregulation der Genexpression von *cagP* und *cagG* erklären.

Für die maximale beobachtete Steigerung der CagG-, und CagP-Produktion sind aber intakte AGS Zellen nötig, und man kann vermuten, dass ein Bestandteil in deren Zellmembran eine Signaltransduktion zur Folge hat.

Weiterhin wurde versucht den zeitlichen Verlauf der *cagG* bzw. *cagP* Hochregulation aufzuklären. Dabei fiel auf, dass die CagG-Menge nach einer Stunde deutlich erhöht war. Bei CagP konnte dieser Effekt ebenfalls gemessen werden, jedoch erst nach 2,5 h Inkubationszeit. Somit scheint die vermehrte CagP-Produktion aufgrund des Zellkontakts später einzusetzen, als die Steigerung der CagG-Produktion.

5.5 HP1043 beeinflusst die CagP-Produktion

HP1043 scheint als Transkriptionsfaktor für *H. pylori* eine wichtige Rolle zu spielen. Bei einer Deletion des *hp1043*-Gens oder einer veränderten Proteinmenge von HP1043 ist *H. pylori* nicht mehr überlebensfähig (Schär et al., 2005; Pellicciari et al., 2017). Unter den identifizierten HP1043 Bindestellen befindet sich auch eine in der *cagP* Promoter Region. Diese Bindestelle wurde im Rahmen dieser Arbeit mutiert und die Mutanten in TEM-1-CagA-Translokationsassays und HiBiT Reporter Assays analysiert. Interessant war hierbei, dass die CagP-Produktion bei Mutation der HP1043 Bindestelle stark abnahm, und die im HiBiT Reporter Assay gemessene Lumineszenz kaum über dem Hintergrund lag. Dabei waren mutHP1043 Bindestelle Stämme noch in der Lage, CagA zu translozieren, wie vorläufige Ergebnisse nahelegen (Daten nicht gezeigt). Über die Rolle des Transkriptionsfaktors kann aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse nur spekuliert werden. Da HP1043 essentiell für die Lebensfähigkeit von *H. pylori* ist, liegt es nahe, dass der Transkriptionsfaktor auch wichtige Prozesse bei der Infektion, wie z.B. die *cag* Typ IV Sekretionsapparate reguliert. Für die maximale Expression bei *cagA* SD-Sequenz Stämmen von *cagP* ist offenbar eine Bindung von HP1043 an den *cagP* Promoter nötig.

Weil immer noch eine kleine Menge CagP produziert wird, wenn die HP1043 Bindestelle mutiert ist, kann aber mit den vorliegenden Ergebnissen keine eindeutige Aussage zu einer möglichen Rolle von HP1043 bei der Regulation des Sekretionssystems getroffen werden. So könnte trotz der verminderten CagP-Menge noch eine Aktivität bestehen bleiben. Dennoch ist der starke Einbruch der CagP-Produktion bei Mutation der HP1043 Bindestelle von Interesse und sollte in zukünftigen Arbeiten weiter geklärt werden.

6 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Rolle von CagP für den *cag* Typ IV-Sekretionsapparat untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass *cagP* wichtig ist für die volle Funktion des Sekretionsapparats. Auch das vorhergesagte Startcodon von *cagP* ist relevant für dessen volle Funktion, allerdings geht die CagA Sekretion bei Mutation des vorhergesagten Startcodons von *cagP* weniger stark zurück als bei kompletter *cagP* Deletion. Die Rolle des vorhergesagten und möglicher alternativer Startcodons sollte in Zukunft noch weiter untersucht werden.

Der hier genutzte HiBiT Reporter Assay war sehr hilfreich um CagP, CagH und CagG zu quantifizieren. Diese kürzlich etablierte Methode stellt eine gute Alternative zu herkömmlichen Quantifikationsmethoden wie z.B. Western Blots dar, im Speziellen für die hier untersuchten Proteine. Allerdings sollte die Methode in Zukunft noch weiter optimiert werden, und z.B. an der Entwicklung von internen Kontrollen gearbeitet werden. Die mit Hilfe dieses Assays hier entstandenen Daten konnten zeigen, dass bei *cagP* Deletion weniger CagH, nicht aber weniger CagG produziert wird. Dieser Versuchsaufbau kann in zukünftigen Experimenten mit weiteren Proteinen des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats wiederholt werden, um den Einfluss von *cagP* auf weitere Proteine des Sekretionsapparats zu ergründen.

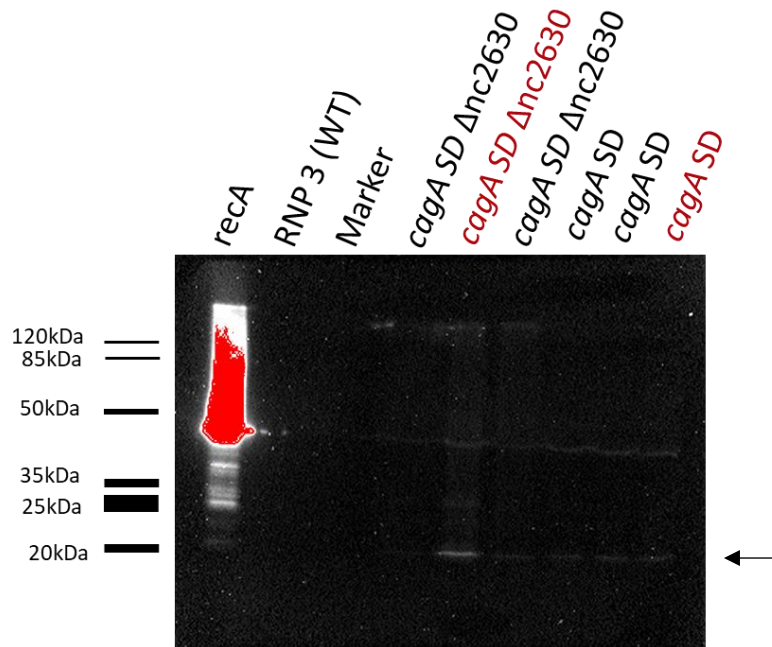
Der Nachweis des funktionellen Terminators am 3'-Ende der kleinen nicht-kodierenden RNA HPnc2630 erfolgte ebenfalls mit Hilfe des HiBiT Reporter Assays. Zur genaueren Charakterisierung dieser beiden Elemente sind jedoch umfassendere RNA-Arbeiten notwendig. Ebenfalls genutzt wurde der HiBiT Reporter Assay um die CagP-, CagH-, und CagG-Produktion unter verschiedenen Umweltbedingungen zu evaluieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die CagP-, sowie CagG-Menge bei Zellkontakt ansteigt. Auch scheint eine mikroaerobe Atmosphäre im Vergleich zu einer sauerstoffreicheren Atmosphäre nach langer Inkubationszeit einen steigernden Einfluss auf die CagP-Produktion zu haben. Ein saurer pH-Wert scheint die CagG-Menge zu erhöhen. Der genaue Mechanismus hinter der Steigerung der CagP-Produktion bei Zellkontakt konnte hier nicht aufgeklärt werden. Dafür sollten in Zukunft noch weitere Versuche stattfinden, in denen z.B. weitere OMPs und deren mögliche Funktion als Übermittler des Zellkontaktes untersucht werden.

Obwohl noch weitere Versuche notwendig sind, um das Zusammenspiel einzelner *cag* Typ IV-Sekretionsapparat Komponenten und die Rolle von CagP und dessen Regulierung zu evaluieren, konnten die hier präsentierten Daten einen wichtigen Einblick in die Funktionsweise

des Sekretionsapparats geben. In Zukunft können diese Daten hoffentlich genutzt werden, um durch ein besseres Verständnis des *cag* Typ IV-Sekretionsapparats den Pathomechanismus einer *H. pylori* Infektion zu verstehen, und womöglich auch um gezieltere Wirkstoffe zur Behandlung zu entwickeln.

7 Anhang

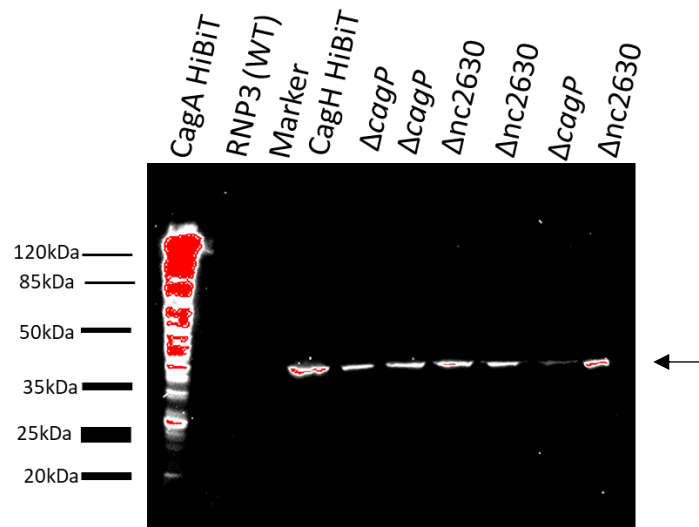
A



Anhang A:

Im Ergebnisteil abgebildete Stämme sind rot markiert, RecA (HiBiT RecA, housekeeping gene in *H. pylori* und somit sicher exprimiert, Positivkontrolle) und RNP3 (kein HiBiT-Tag, somit keine Lumineszenz, Negativkontrolle) dienen der Kontrolle. Weitere hier abgebildete Stämme wurden untersucht aber in der Arbeit nicht erwähnt. (Siehe Abb. 4.5)

B

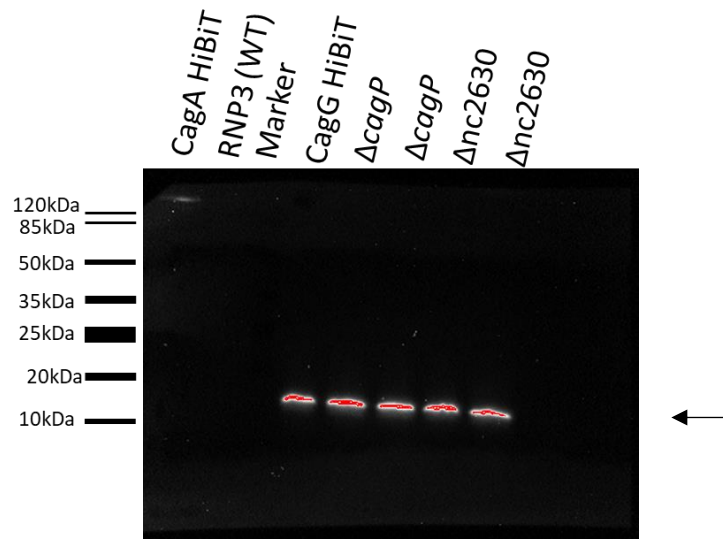


Anhang B:

Gezeigt sind CagH-HiBiT Sämme, CagA (HiBiT-CagA, Positivkontrolle) und RNP3 (kein HiBiT-Tag, somit keine Lumineszenz, Negativkontrolle) dienen der Kontrolle.

(Siehe Abb. 4.6)

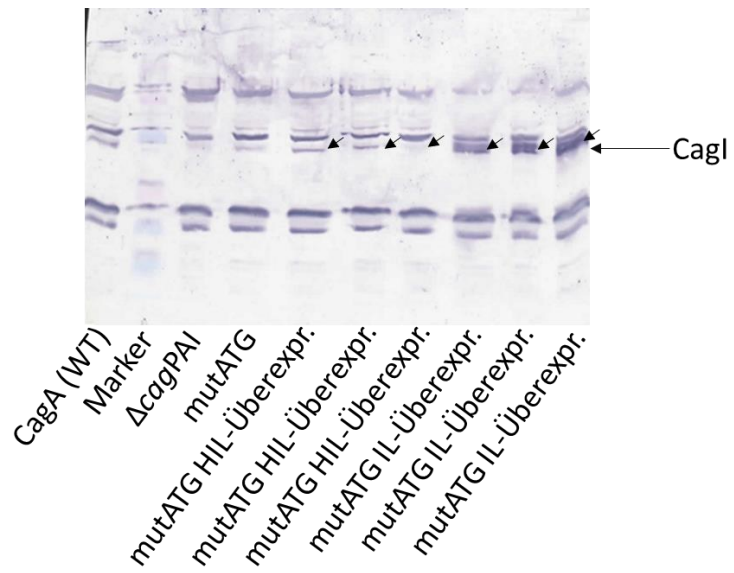
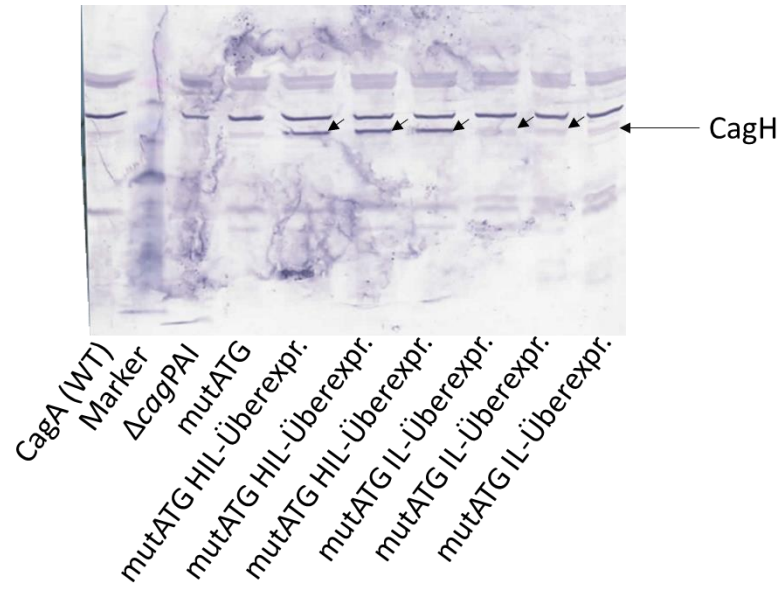
C

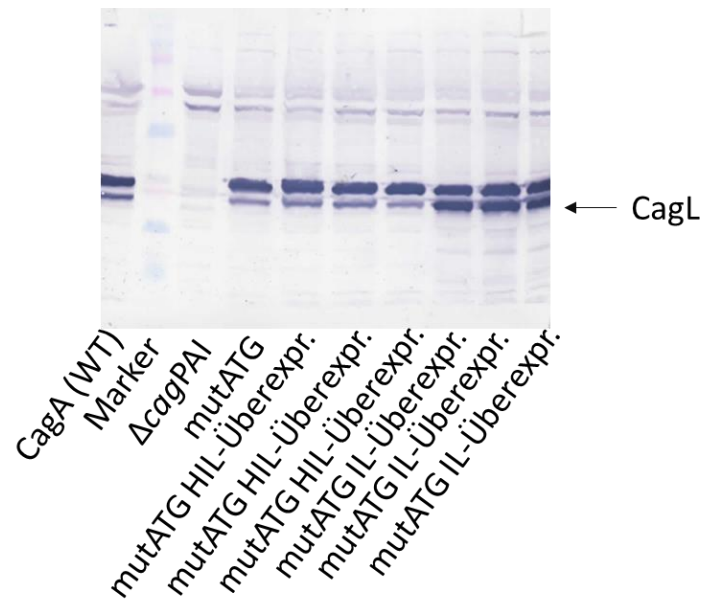


Anhang C:

Gezeigt sind CagG-HiBiT Sämme, CagA (HiBiT-CagA, Positivkontrolle) und RNP3 (kein HiBiT-Tag, Negativkontrolle) dienen der Kontrolle. (Siehe Abbildung 4.7)

D





Anhang D:

CagI, CagL und CagH Western Blot. CagA (WT, wie im WT zu erwartende Expression von *cagH*, *cagl* und *cagL*) und $\Delta cagPAI$ (besitzt keine Pathogenitätsinsel, Negativkontrolle) dienen der Kontrolle. Rote Linie markiert den Verlauf der Zielbanden. (Siehe Abbildung 4.11)

8 Literaturverzeichnis

- Amieva M. R., Vogelmann R., Covacci A., Tompkins L. S., Nelson W. J., Falkow S., 2003: *Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA*. "Science", 300, 5624, 1430–1434.
- Andrzejewska J., Lee S. K., Olbermann P., Lotzing N., Katzowitsch E., Linz B., Achtman M., Kado C. I., Suerbaum S., Josenhans C., 2006: *Characterization of the pilin ortholog of the Helicobacter pylori type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection*. "Journal of Bacteriology", 188, 16, 5865–5877.
- Backert S., Clyne M., Tegtmeyer N., 2011: *Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by Helicobacter pylori*. "Cell Communication and Signaling", 9, 28.
- Backert S., Tegtmeyer N., Selbach M., 2010: *The versatility of Helicobacter pylori CagA effector protein functions: The master key hypothesis*. "Helicobacter", 15, 3, 163–176.
- Bauerfeind P., Garner R., Dunn B. E., Mobley H. L., 1997: *Synthesis and activity of Helicobacter pylori urease and catalase at low pH*. "Gut", 40, 1, 25–30.
- Belogolova E., Bauer B., Pompaiah M., Asakura H., Brinkman V., Ertl C., Bartfeld S., Nechitaylo T. Y., Haas R., Machuy N., Salama N., Churin Y., Meyer T. F., 2013: *Helicobacter pylori outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor*. "Cellular Microbiology", 15, 11, 1896–1912.
- Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens*, 2012. "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans", 100, Pt B, 1–441.
- Blaser M. J., Nomura A., Lee J., Stemmerman G. N., Perez-Perez G. I., 2007: *Early-life family structure and microbially induced cancer risk*. "PLoS Medicine", 4, 1, e7.
- Boncristiano M., Paccani S. R., Barone S., Ulivieri C., Patrussi L., Ilver D., Amedei A., D'Elios M. M., Telford J. L., Baldari C. T., 2003: *The Helicobacter pylori vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms*. "The Journal of Experimental Medicine", 198, 12, 1887–1897.
- Bonsor D. A., Zhao Q., Schmidinger B., Weiss E., Wang J., Deredge D., Beadenkopf R., Dow B., Fischer W., Beckett D., Wintrobe P. L., Haas R., Sundberg E. J., 2018: *The Helicobacter pylori adhesin protein HopQ exploits the dimer interface of human CEACAMs to facilitate translocation of the oncoprotein CagA*. "The EMBO Journal", 37, 13.
- Brown L. M., 2000: *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission*. "Epidemiologic Reviews", 22, 2, 283–297.
- Bury-Moné S., Kaakoush N. O., Asencio C., Mégraud F., Thibonnier M., Reuse H. de, Mendz G. L., 2006: *Is Helicobacter pylori a true microaerophile?* "Helicobacter", 11, 4, 296–303.

- Busch B., Weimer R., Woischke C., Fischer W., Haas R., 2015: *Helicobacter pylori* interferes with leukocyte migration via the outer membrane protein HopQ and via CagA translocation. "International Journal of Medical Microbiology", 305, 3, 355–364.
- Butcher L. D., den Hartog G., Ernst P. B., Crowe S. E., 2017: *Oxidative Stress Resulting From Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. "Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology", 3, 3, 316–322.
- Cárdenas-Mondragón M. G., Ares M. A., Panunzi L. G., Pacheco S., Camorlinga-Ponce M., Girón J. A., Torres J., de la Cruz M. A. de, 2016: *Transcriptional Profiling of Type II Toxin-Antitoxin Genes of Helicobacter pylori* under Different Environmental Conditions: Identification of HP0967-HP0968 System. "Frontiers in Microbiology", 7, 1872.
- Celli J. P., Turner B. S., Afdhal N. H., Keates S., Ghiran I., Kelly C. P., Ewoldt R. H., McKinley G. H., So P., Erramilli S., Bansil R., 2009: *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 106, 34, 14321–14326.
- Chen J., Gong T.-T., Wu Q.-J., 2016: *Parity and gastric cancer risk: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies*. "Scientific Reports", 6, 18766.
- Choi I. J., Fujimoto S., Yamauchi K., Graham D. Y., Yamaoka Y., 2007: *Helicobacter pylori* environmental interactions: effect of acidic conditions on *H. pylori*-induced gastric mucosal interleukin-8 production. "Cellular Microbiology", 9, 10, 2457–2469.
- Chung J. M., Sheedlo M. J., Campbell A. M., Sawhney N., Frick-Cheng A. E., Lacy D. B., Cover T. L., Ohi M. D., 2019: *Structure of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system*. "eLife", 8.
- Churin Y., Al-Ghoul L., Kepp O., Meyer T. F., Birchmeier W., Naumann M., 2003: *Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response*. "The Journal of Cell Biology", 161, 2, 249–255.
- Cover T. L., 2016: *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. "mBio", 7, 1, e01869-15.
- Cover T. L., Blaser M. J., 1992: *Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori*. "The Journal of Biological Chemistry", 267, 15, 10570–10575.
- Cover T. L., Blaser M. J., 2009: *Helicobacter pylori* in Health and Disease. "Gastroenterology", 136, 6, 1863–1873.
- Cover T. L., Krishna U. S., Israel D. A., Peek R. M., 2003: *Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin*. "Cancer Research", 63, 5, 951–957.
- Cover T. L., Lacy D. B., Ohi M. D., 2020: *The Helicobacter pylori Cag Type IV Secretion System*. "Trends in Microbiology", 28, 8, published online 26 March 2020, 682–695.

- Di J., Zhang J., Cao L., Huang T.-T., Zhang J.-X., Mi Y.-N., Xiao X., Yan P.-P., Wu M.-L., Yao T., Liu D.-Z., Liu J., Cao Y.-X., 2020: *Hydrogen Peroxide-Mediated Oxygen Enrichment Eradicates Helicobacter pylori In Vitro and In Vivo*. "Antimicrobial Agents and Chemotherapy", 64, 5.
- El-Omar E. M., Carrington M., Chow W. H., McColl K. E., Bream J. H., Young H. A., Herrera J., Lissowska J., Yuan C. C., Rothman N., Lanyon G., Martin M., Fraumeni J. F., Rabkin C. S., 2000: *Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer*. "Nature", 404, 6776, 398–402.
- Faass L., Stein S. C., Hauke M., Gapp M., Albanese M., Josenhans C., 2021: *Contribution of Heptose Metabolites and the cag Pathogenicity Island to the Activation of Monocytes/Macrophages by Helicobacter pylori*. "Frontiers in Immunology", 12, published online 19 May 2021, 632154.
- Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard J. K., Stephens M., Kidd M., Blaser M. J., Graham D. Y., Vacher S., Perez-Perez G. I., Yamaoka Y., Mégraud F., Otto K., Reichard U., Katzowitsch E., Wang X., Achtman M., Suerbaum S., 2003: *Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations*. "Science", 299, 5612, 1582–1585.
- Fang X., Wei J., He X., An P., Wang H., Jiang L., Shao D., Liang H., Li Y., Wang F., Min J., 2015: *Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies*. "European Journal of Cancer", 51, 18, 2820–2832.
- Ferwana M., Abdulmajeed I., Alhajiahmed A., Madani W., Firwana B., Hasan R., Altayar O., Limburg P. J., Murad M. H., Knawy B., 2015: *Accuracy of urea breath test in Helicobacter pylori infection: meta-analysis*. "World Journal of Gastroenterology", 21, 4, 1305–1314.
- Fischbach W., Malfertheiner P., 2018: *Helicobacter Pylori Infection*. "Deutsches Arzteblatt international", 115, 25, 429–436.
- Fischer W., 2011: *Assembly and molecular mode of action of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion apparatus*. "The FEBS Journal", 278, 8, 1203–1212.
- Fischer W., Püls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., Haas R., 2001: *Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8*. "Molecular Microbiology", 42, 5, 1337–1348.
- Fischer W., Windhager L., Rohrer S., Zeiller M., Karnholz A., Hoffmann R., Zimmer R., Haas R., 2010: *Strain-specific genes of Helicobacter pylori: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer*. "Nucleic Acids Research", 38, 18, 6089–6101.
- Foegeding N. J., Caston R. R., McClain M. S., Ohi M. D., Cover T. L., 2016: *An Overview of Helicobacter pylori VacA Toxin Biology*. "Toxins", 8, 6.

- Foryst-Ludwig A., Naumann M., 2000: *p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and proinflammatory cytokines in Helicobacter pylori infection*. "The Journal of Biological Chemistry", 275, 50, 39779–39785.
- Fox J. G., Wang T. C., 2007: *Inflammation, atrophy, and gastric cancer*. "The Journal of Clinical Investigation", 117, 1, 60–69.
- Friedman E. S., Bittinger K., Esipova T. V., Hou L., Chau L., Jiang J., Mesaros C., Lund P. J., Liang X., Fitzgerald G. A., Goulian M., Lee D., Garcia B. A., Blair I. A., Vinogradov S. A., Wu G. D., 2018: *Microbes vs. chemistry in the origin of the anaerobic gut lumen*. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 115, 16, 4170–4175.
- Furuta T., Shirai N., Sugimoto M., 2004: *Controversy in polymorphisms of interleukin-1beta in gastric cancer risks*. "Journal of Gastroenterology", 39, 5, 501–503.
- Gebert B., Fischer W., Weiss E., Hoffmann R., Haas R., 2003: *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation*. "Science", 301, 5636, 1099–1102.
- Genisset C., Puhar A., Calore F., Bernard M. de, Dell'Antone P., Montecucco C., 2007: *The concerted action of the Helicobacter pylori cytotoxin VacA and of the v-ATPase proton pump induces swelling of isolated endosomes*. "Cellular Microbiology", 9, 6, 1481–1490.
- Gisbert J. P., La Morena F. de, Abaira V., 2006: *Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of H. pylori infection: a systematic review and meta-analysis*. "The American Journal of Gastroenterology", 101, 8, 1921–1930.
- Haas R., Meyer T. F., van Putten J. P., 1993: *Aflagellated mutants of Helicobacter pylori generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis*. "Molecular Microbiology", 8, 4, 753–760.
- Haley K. P., Blanz E. J., Gaddy J. A., 2014: *High resolution electron microscopy of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system pili produced in varying conditions of iron availability*. "Journal of Visualized Experiments", 93, e52122.
- Hanahan D., 1983: *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. "Journal of Molecular Biology", 166, 4, 557–580.
- Harris P. R., Serrano C. A., Villagrán A., Walker M. M., Thomson M., Duarte I., Windle H. J., Crabtree J. E., 2013: *Helicobacter pylori-associated hypochlorhydria in children, and development of iron deficiency*. "Journal of Clinical Pathology", 66, 4, 343–347.
- Hatakeyama M., 2008: *SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis*. "Current Opinion in Microbiology", 11, 1, 30–37.

- Hisatsune J., Yamasaki E., Nakayama M., Shirasaka D., Kurazono H., Katagata Y., Inoue H., Han J., Sap J., Yahiro K., Moss J., Hirayama T., 2007: *Helicobacter pylori* VacA enhances prostaglandin E2 production through induction of cyclooxygenase 2 expression via a p38 mitogen-activated protein kinase/activating transcription factor 2 cascade in AZ-521 cells. "Infection and Immunity", 75, 9, 4472–4481.
- Hu B., Khara P., Song L., Lin A. S., Frick-Cheng A. E., Harvey M. L., Cover T. L., Christie P. J., 2019: *In Situ Molecular Architecture of the Helicobacter pylori Cag Type IV Secretion System*. "mBio", 10, 3.
- Ilver D., Arnqvist A., Ogren J., Frick I. M., Kersulyte D., Incecik E. T., Berg D. E., Covacci A., Engstrand L., Borén T., 1998: *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. "Science", 279, 5349, 373–377.
- Ishijima N., Suzuki M., Ashida H., Ichikawa Y., Kanegae Y., Saito I., Borén T., Haas R., Sasakawa C., Mimuro H., 2011: *BabA-mediated adherence is a potentiator of the Helicobacter pylori type IV secretion system activity*. "The Journal of Biological Chemistry", 286, 28, 25256–25264.
- Javaheri A., Kruse T., Moonens K., Mejías-Luque R., Debraekeleer A., Asche C. I., Tegtmeyer N., Kalali B., Bach N. C., Sieber S. A., Hill D. J., Königer V., Hauck C. R., Moskalenko R., Haas R., Busch D. H., Klaile E., Slevogt H., Schmidt A., Backert S., Remaut H., Singer B. B., Gerhard M., 2016: *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. "Nature Microbiology", 2, 16189.
- Ji X., Wang Y., Li J., Rong Q., Chen X., Zhang Y., Liu X., Li B., Zhao H., 2017: *Application of FLP-FRT System to Construct Unmarked Deletion in Helicobacter pylori and Functional Study of Gene hp0788 in Pathogenesis*. "Frontiers in Microbiology", 8, 2357.
- Jiménez-Soto L. F., Kutter S., Sewald X., Ertl C., Weiss E., Kapp U., Rohde M., Pirch T., Jung K., Retta S. F., Terradot L., Fischer W., Haas R., 2009: *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. "PLoS Pathogens", 5, 12, e1000684.
- Jiménez-Soto L. F., Rohrer S., Jain U., Ertl C., Sewald X., Haas R., 2012: *Effects of cholesterol on Helicobacter pylori growth and virulence properties in vitro*. "Helicobacter", 17, 2, 133–139.
- Junaid M., Linn A. K., Javadi M. B., Al-Gubare S., Ali N., Katzenmeier G., 2016: *Vacuolating cytotoxin A (VacA) - A multi-talented pore-forming toxin from Helicobacter pylori*. "Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology", 118, 27–35.
- Keates S., Sougioultzis S., Keates A. C., Zhao D., Peek R. M., Shaw L. M., Kelly C. P., 2001: *cag+ Helicobacter pylori* induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. "The Journal of Biological Chemistry", 276, 51, 48127–48134.

- Kimura M., Goto S., Wada A., Yahiro K., Niidome T., Hatakeyama T., Aoyagi H., Hirayama T., Kondo T., 1999: *Vacuolating cytotoxin purified from Helicobacter pylori causes mitochondrial damage in human gastric cells*. "Microbial Pathogenesis", 26, 1, 45–52.
- Königer V., Holsten L., Harrison U., Busch B., Loell E., Zhao Q., Bonsor D. A., Roth A., Kengmo-Tchoupa A., Smith S. I., Mueller S., Sundberg E. J., Zimmermann W., Fischer W., Hauck C. R., Haas R., 2016: *Helicobacter pylori exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA*. "Nature Microbiology", 2, 16188.
- Kuck D., Kolmerer B., Iking-Konert C., Krammer P. H., Stremmel W., Rudi J., 2001: *Vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS*. "Infection and Immunity", 69, 8, 5080–5087.
- Kusters J. G., van Vliet A. H. M., Kuipers E. J., 2006: *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. "Clinical Microbiology Reviews", 19, 3, 449–490.
- Kutter S., Buhrdorf R., Haas J., Schneider-Brachert W., Haas R., Fischer W., 2008: *Protein subassemblies of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies*. "Journal of Bacteriology", 190, 6, 2161–2171.
- Kwok T., Zabler D., Urman S., Rohde M., Hartig R., Wessler S., Misselwitz R., Berger J., Sewald N., König W., Backert S., 2007: *Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation*. "Nature", 449, 7164, 862–866.
- de la Cruz M. A. de, Ares M. A., Barga K. von, Panunzi L. G., Martínez-Cruz J., Valdez-Salazar H. A., Jiménez-Galicia C., Torres J., 2017: *Gene Expression Profiling of Transcription Factors of Helicobacter pylori under Different Environmental Conditions*. "Frontiers in Microbiology", 8, 615.
- Lehours P., Mégraud F., 2011: *Helicobacter pylori molecular diagnosis*. "Expert Review of Molecular Diagnostics", 11, 4, 351–355.
- Leunk R. D., Johnson P. T., David B. C., Kraft W. G., Morgan D. R., 1988: *Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori*. "Journal of Medical Microbiology", 26, 2, 93–99.
- Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe S. W., Yamaoka Y., Graham D. Y., Perez-Trallero E., Wadstrom T., Suerbaum S., Achtman M., 2007: *An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori*. "Nature", 445, 7130, 915–918.
- Liu Q., Qi D., Kang J., Jin Y., Liu W., Gao W., Hou P., Lu J., 2015: *Efficacy of real-time PCR-based detection of Helicobacter pylori infection and genotypic resistance-guided quadruple therapy as the first-line treatment for functional dyspepsia with Helicobacter pylori infection*. "European Journal of Gastroenterology & Hepatology", 27, 3, 221–225.

- Lu H., Wu J. Y., Beswick E. J., Ohno T., Odenbreit S., Haas R., Reyes V. E., Kita M., Graham D. Y., Yamamoto Y., 2007: *Functional and intracellular signaling differences associated with the Helicobacter pylori AlpAB adhesin from Western and East Asian strains*. "The Journal of Biological Chemistry", 282, 9, 6242–6254.
- Machado J. C., Pharoah P., Sousa S., Carvalho R., Oliveira C., Figueiredo C., Amorim A., Seruca R., Caldas C., Carneiro F., Sobrinho-Simões M., 2001: *Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma*. "Gastroenterology", 121, 4, 823–829.
- Mahdavi J., Sondén B., Hurtig M., Olfat F. O., Forsberg L., Roche N., Angstrom J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson K.-A., Altraja S., Wadström T., Kersulyte D., Berg D. E., Dubois A., Petersson C., Magnusson K.-E., Norberg T., Lindh F., Lundskog B. B., Arnqvist A., Hammarström L., Borén T., 2002: *Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation*. "Science", 297, 5581, 573–578.
- Maixner F., Krause-Kyora B., Turaev D., Herbig A., Hoopmann M. R., Hallows J. L., Kusebauch U., Vigil E. E., Malfertheiner P., Megraud F., O'Sullivan N., Cipollini G., Coia V., Samadelli M., Engstrand L., Linz B., Moritz R. L., Grimm R., Krause J., Nebel A., Moodley Y., Rattei T., Zink A., 2016: *The 5300-year-old Helicobacter pylori genome of the Iceman*. "Science", 351, 6269, 162–165.
- Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. A., Atherton J., Axon A. T. R., Bazzoli F., Gensini G. F., Gisbert J. P., Graham D. Y., Rokkas T., El-Omar E. M., Kuipers E. J., 2012: *Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report*. "Gut", 61, 5, 646–664.
- Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. A., Gisbert J. P., Kuipers E. J., Axon A. T., Bazzoli F., Gasbarini A., Atherton J., Graham D. Y., Hunt R., Moayyedi P., Rokkas T., Rugge M., Selgrad M., Suerbaum S., Sugano K., El-Omar E. M., 2017: *Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report*. "Gut", 66, 1, 6–30.
- Marcus E. A., Sachs G., Scott D. R., 2018: *Acid-regulated gene expression of Helicobacter pylori: Insight into acid protection and gastric colonization*. "Helicobacter", 23, 3, published online 25 April 2018, e12490.
- Marshall B. J., Armstrong J. A., McGeachie D. B., Glancy R. J., 1985: *Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter*. "The Medical Journal of Australia", 142, 8, 436–439.
- Marshall B. J., Barrett L. J., Prakash C., McCallum R. W., Guerrant R. L., 1990: *Urea protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of acid*. "Gastroenterology", 99, 3, 697–702.
- Marshall B. J., Warren J. R., 1984: *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. "Lancet", 1, 8390, 1311–1315.

- Martel C. de, Forman D., Plummer M., 2013: *Gastric cancer: epidemiology and risk factors*. "Gastroenterology Clinics of North America", 42, 2, 219–240.
- Moodley Y., Linz B., Bond R. P., Nieuwoudt M., Soodyall H., Schlebusch C. M., Bernhöft S., Hale J., Suerbaum S., Mugisha L., van der Merwe S. W., Achtman M., 2012: *Age of the association between Helicobacter pylori and man*. "PLoS Pathogens", 8, 5, e1002693.
- Morbiato L., Tombola F., Campello S., Del Giudice G., Rappuoli R., Zoratti M., Papini E., 2001: *Vacuolation induced by VacA toxin of Helicobacter pylori requires the intracellular accumulation of membrane permeant bases, Cl(-) and water*. "FEBS Letters", 508, 3, 479–483.
- Mueller D., Tegtmeyer N., Brandt S., Yamaoka Y., Poire E. de, Sgouras D., Wessler S., Torres J., Smolka A., Backert S., 2012: *c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian Helicobacter pylori strains*. "The Journal of Clinical Investigation", 122, 4, 1553–1566.
- Nakayama M., Kimura M., Wada A., Yahiro K., Ogushi K., Niidome T., Fujikawa A., Shirasaka D., Aoyama N., Kurazono H., Noda M., Moss J., Hirayama T., 2004: *Helicobacter pylori VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells*. "The Journal of Biological Chemistry", 279, 8, 7024–7028.
- Ndip R. N., MacKay W. G., Farthing M. J. G., Weaver L. T., 2003: *Culturing Helicobacter pylori from clinical specimens: review of microbiologic methods*. "Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition", 36, 5, 616–622.
- Odenbreit S., Püls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W., Haas R., 2000: *Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion*. "Science", 287, 5457, 1497–1500.
- Ogura K., Maeda S., Nakao M., Watanabe T., Tada M., Kyutoku T., Yoshida H., Shiratori Y., Omata M., 2000: *Virulence factors of Helicobacter pylori responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil*. "The Journal of Experimental Medicine", 192, 11, 1601–1610.
- Olbermann P., Josenhans C., Moodley Y., Uhr M., Stamer C., Vauterin M., Suerbaum S., Achtman M., Linz B., 2010: *A global overview of the genetic and functional diversity in the Helicobacter pylori cag pathogenicity island*. "PLoS Genetics", 6, 8, e1001069.
- Oleastro M., Ménard A., 2013: *The Role of Helicobacter pylori Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis*. "Biology", 2, 3, 1110–1134.
- Olekhnovich I. N., Vitko S., Valliere M., Hoffman P. S., 2014: *Response to metronidazole and oxidative stress is mediated through homeostatic regulator HsrA (HP1043) in Helicobacter pylori*. "Journal of Bacteriology", 196, 4, 729–739.

- Ontsira Ngoyi E. N., Atipo Ibara B. I., Moyen R., Ahoui Apendi P. C., Ibara J. R., Obengui O., Ossibi Ibara R. B., Nguimbi E., Niama R. F., Ouamba J. M., Yala F., Abena A. A., Vadivelu J., Goh K. L., Menard A., Benejat L., Sifre E., Lehours P., Megraud F., 2015: *Molecular Detection of Helicobacter pylori and its Antimicrobial Resistance in Brazzaville, Congo*. "Helicobacter", 20, 4, 316–320.
- Ordonez C., Zhai A. B., Camacho-Leal P., Demarte L., Fan M. M. Y., Stanners C. P., 2007: *GPI-anchored CEA family glycoproteins CEA and CEACAM6 mediate their biological effects through enhanced integrin alpha5beta1-fibronectin interaction*. "Journal of Cellular Physiology", 210, 3, 757–765.
- Ordóñez-Mena J. M., Schöttker B., Mons U., Jenab M., Freisling H., Bueno-de-Mesquita B., O'Doherty M. G., Scott A., Kee F., Stricker B. H., Hofman A., Keyser C. E. de, Ruiter R., Söderberg S., Jousilahti P., Kuulasmaa K., Freedman N. D., Wilsgaard T., Groot L. C. de, Kampman E., Håkansson N., Orsini N., Wolk A., Nilsson L. M., Tjønneland A., Pająk A., Malyutina S., Kubínová R., Tamosiunas A., Bobak M., Katsoulis M., Orfanos P., Boffetta P., Trichopoulou A., Brenner H., 2016: *Quantification of the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium*. "BMC Medicine", 14, 62.
- Park S. A., Lee N. G., 2013: *Global regulation of gene expression in the human gastric pathogen Helicobacter pylori in response to aerobic oxygen tension under a high carbon dioxide level*. "Journal of Microbiology and Biotechnology", 23, 4, 451–458.
- Parkin D. M., 2006: *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. "International Journal of Cancer", 118, 12, 3030–3044.
- Parsonnet J., Friedman G. D., Vandersteen D. P., Chang Y., Vogelman J. H., Orentreich N., Sibley R. K., 1991: *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma*. "The New England Journal of Medicine", 325, 16, 1127–1131.
- Pattis I., Weiss E., Laugks R., Haas R., Fischer W., 2007: *The Helicobacter pylori CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein*. "Microbiology", 153, Pt 9, 2896–2909.
- Peek R. M., Blaser M. J., 2002: *Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas*. "Nature Reviews Cancer", 2, 1, 28–37.
- Pellicciari S., Pinatel E., Vannini A., Peano C., Puccio S., Bellis G. de, Danielli A., Scarlato V., Roncarati D., 2017: *Insight into the essential role of the Helicobacter pylori HP1043 orphan response regulator: genome-wide identification and characterization of the DNA-binding sites*. "Scientific Reports", 7, 41063.
- Perry S., La Luz Sanchez M. de, Yang S., Haggerty T. D., Hurst P., Perez-Perez G., Parsonnet J., 2006: *Gastroenteritis and transmission of Helicobacter pylori infection in households*. "Emerging Infectious Diseases", 12, 11, 1701–1708.

- Pfannkuch L., Hurwitz R., Traulsen J., Sigulla J., Poeschke M., Matzner L., Kosma P., Schmid M., Meyer T. F., 2019: *ADP heptose, a novel pathogen-associated molecular pattern identified in Helicobacter pylori*. "FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology", 33, 8, published online 21 June 2019, 9087–9099.
- Pflock M., Kennard S., Finsterer N., Beier D., 2006: *Acid-responsive gene regulation in the human pathogen Helicobacter pylori*. "Journal of Biotechnology", 126, 1, published online 19 May 2006, 52–60.
- Pham K. T., Weiss E., Jiménez Soto L. F., Breithaupt U., Haas R., Fischer W., 2012: *CagI is an essential component of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system and forms a complex with CagL*. "PloS one", 7, 4, e35341.
- Plummer M., Franceschi S., Vignat J., Forman D., Martel C. de, 2015: *Global burden of gastric cancer attributable to Helicobacter pylori*. "International Journal of Cancer", 136, 2, 487–490.
- Radin J. N., González-Rivera C., Ivie S. E., McClain M. S., Cover T. L., 2011: *Helicobacter pylori VacA induces programmed necrosis in gastric epithelial cells*. "Infection and Immunity", 79, 7, 2535–2543.
- Rieder G., Einsiedl W., Hatz R. A., Stolte M., Enders G. A., Walz A., 2001: *Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in Helicobacter pylori-associated gastritis*. "Infection and Immunity", 69, 1, 81–88.
- Rieder G., Hatz R. A., Moran A. P., Walz A., Stolte M., Enders G., 1997: *Role of adherence in interleukin-8 induction in Helicobacter pylori-associated gastritis*. "Infection and Immunity", 65, 9, 3622–3630.
- Rohde M., Püls J., Buhrdorf R., Fischer W., Haas R., 2003: *A novel sheathed surface organelle of the Helicobacter pylori cag type IV secretion system*. "Molecular Microbiology", 49, 1, 219–234.
- S2k-Leitlinie Helicobacter pylori und gastroduodenale Ulkuskrankheit (S2k-Guideline Helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease)*, 2017. "Zeitschrift für Gastroenterologie", 55, 2, 167–206.
- Schär J., Sickmann A., Beier D., 2005: *Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of Helicobacter pylori*. "Journal of Bacteriology", 187, 9, 3100–3109.
- Schindele F., Weiss E., Haas R., Fischer W., 2016: *Quantitative analysis of CagA type IV secretion by Helicobacter pylori reveals substrate recognition and translocation requirements*. "Molecular Microbiology", 100, 1, 188–203.
- Schmitt W., Haas R., 1994: *Genetic analysis of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein*. "Molecular Microbiology", 12, 2, 307–319.

- Schreiber S., Bücker R., Groll C., Azevedo-Vethacke M., Garten D., Scheid P., Friedrich S., Gatermann S., Josenhans C., Suerbaum S., 2005: *Rapid loss of motility of Helicobacter pylori in the gastric lumen in vivo*. "Infection and Immunity", 73, 3, 1584–1589.
- Schreiber S., Konradt M., Groll C., Scheid P., Hanauer G., Werling H.-O., Josenhans C., Suerbaum S., 2004: *The spatial orientation of Helicobacter pylori in the gastric mucus*. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 101, 14, 5024–5029.
- Scott D. R., Marcus E. A., Weeks D. L., Lee A., Melchers K., Sachs G., 2000: *Expression of the Helicobacter pylori ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease*. "Infection and Immunity", 68, 2, 470–477.
- Scott D. R., Weeks D., Hong C., Postius S., Melchers K., Sachs G., 1998: *The role of internal urease in acid resistance of Helicobacter pylori*. "Gastroenterology", 114, 1, 58–70.
- Segal E. D., Cha J., Lo J., Falkow S., Tompkins L. S., 1999: *Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by Helicobacter pylori*. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 96, 25, 14559–14564.
- Selbach M., Moese S., Meyer T. F., Backert S., 2002: *Functional analysis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms*. "Infection and Immunity", 70, 2, 665–671.
- Selbach M., Paul F. E., Brandt S., Guye P., Daumke O., Backert S., Dehio C., Mann M., 2009: *Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins*. "Cell Host & Microbe", 5, 4, 397–403.
- Selgrad M., Meissle J., Bornschein J., Kandulski A., Langner C., Varbanova M., Wex T., Tammer I., Schlüter D., Malfertheiner P., 2013: *Antibiotic susceptibility of Helicobacter pylori in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies*. "European Journal of Gastroenterology & Hepatology", 25, 11, 1257–1260.
- Senkovich O., Ceaser S., McGee D. J., Testerman T. L., 2010: *Unique host iron utilization mechanisms of Helicobacter pylori revealed with iron-deficient chemically defined media*. "Infection and Immunity", 78, 5, 1841–1849.
- Senkovich O. A., Yin J., Ekshyyan V., Conant C., Traylor J., Adegboyega P., McGee D. J., Rhoads R. E., Slepnev S., Testerman T. L., 2011: *Helicobacter pylori AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils*. "Infection and Immunity", 79, 8, 3106–3116.
- Shaffer C. L., Gaddy J. A., Loh J. T., Johnson E. M., Hill S., Hennig E. E., McClain M. S., McDonald W. H., Cover T. L., 2011: *Helicobacter pylori exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface*. "PLoS Pathogens", 7, 9, e1002237.

- Sharma C. M., Hoffmann S., Darfeuille F., Reignier J., Findeiss S., Sittka A., Chabas S., Reiche K., Hackermüller J., Reinhardt R., Stadler P. F., Vogel J., 2010: *The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori*. "Nature", 464, 7286, 250–255.
- Siavoshi F., Saniee P., Khalili-Samani S., Hosseini F., Malakutikhah F., Mamivand M., Shahreza S., Sharifi A. H., 2015: *Evaluation of methods for H. pylori detection in PPI consumption using culture, rapid urease test and smear examination*. "Annals of Translational Medicine", 3, 1, 11.
- Smith K. S., Ferry J. G., 2000: *Prokaryotic carbonic anhydrases*. "FEMS Microbiology Reviews", 24, 4, 335–366.
- Smith S. M., O'Morain C., McNamara D., 2014: *Antimicrobial susceptibility testing for Helicobacter pylori in times of increasing antibiotic resistance*. "World Journal of Gastroenterology", 20, 29, 9912–9921.
- Stein M., Rappuoli R., Covacci A., 2000: *Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation*. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 97, 3, 1263–1268.
- Stein S. C., Faber E., Bats S. H., Murillo T., Speidel Y., Coombs N., Josenhans C., 2017: *Helicobacter pylori modulates host cell responses by CagT4SS-dependent translocation of an intermediate metabolite of LPS inner core heptose biosynthesis*. "PLoS Pathogens", 13, 7, e1006514.
- Stingl K., Reuse H. de, 2005: *Staying alive overdosed: how does Helicobacter pylori control urease activity?* "International Journal of Medical Microbiology", 295, 5, 307–315.
- Suerbaum S., Josenhans C., 2007: *Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host*. "Nature Reviews Microbiology", 5, 6, 441–452.
- Suerbaum S., Josenhans C., Labigne A., 1993: *Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange*. "Journal of Bacteriology", 175, 11, 3278–3288.
- Suerbaum S., Michetti P., 2002: *Helicobacter pylori infection*. "The New England Journal of Medicine", 347, 15, 1175–1186.
- Szabò I., Brutsche S., Tombola F., Moschioni M., Satin B., Telford J. L., Rappuoli R., Montecucco C., Papini E., Zoratti M., 1999: *Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of Helicobacter pylori is required for its biological activity*. "The EMBO Journal", 18, 20, 5517–5527.
- Talley N. J., Ormand J. E., Frie C. A., Zinsmeister A. R., 1992: *Stability of pH gradients in vivo across the stomach in Helicobacter pylori gastritis, dyspepsia, and health*. "The American Journal of Gastroenterology", 87, 5, 590–594.

- Tan S., Noto J. M., Romero-Gallo J., Peek R. M., Amieva M. R., 2011: *Helicobacter pylori* perturbs iron trafficking in the epithelium to grow on the cell surface. "PLoS Pathogens", 7, 5, e1002050.
- Tegtmeyer N., Hartig R., Delahay R. M., Rohde M., Brandt S., Conradi J., Takahashi S., Smolka A. J., Sewald N., Backert S., 2010: A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation. "The Journal of Biological Chemistry", 285, 30, 23515–23526.
- Tegtmeyer N., Wessler S., Backert S., 2011: Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. "The FEBS Journal", 278, 8, 1190–1202.
- Terebiznik M. R., Raju D., Vázquez C. L., Torbricki K., Kulkarni R., Blanke S. R., Yoshimori T., Colombo M. I., Jones N. L., 2009: Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. "Autophagy", 5, 3, 370–379.
- Testerman T. L., Conn P. B., Mobley H. L. T., McGee D. J., 2006: Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. "Journal of Clinical Microbiology", 44, 5, 1650–1658.
- Testerman T. L., McGee D. J., Mobley H. L., 2001: *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. "Journal of Clinical Microbiology", 39, 11, 3842–3850.
- Tombola F., Carlesso C., Szabò I., Bernard M. de, Reytrat J. M., Telford J. L., Rappuoli R., Montecucco C., Papini E., Zoratti M., 1999: *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. "Biophysical Journal", 76, 3, 1401–1409.
- Uemura N., Okamoto S., Yamamoto S., Matsumura N., Yamaguchi S., Yamakido M., Taniyama K., Sasaki N., Schlemper R. J., 2001: *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. "The New England Journal of Medicine", 345, 11, 784–789.
- Vannini A., Roncarati D., Danielli A., 2016: The *cag*-pathogenicity island encoded *CncR1* sRNA oppositely modulates *Helicobacter pylori* motility and adhesion to host cells. "Cellular and Molecular Life Sciences", 73, 16, 3151–3168.
- Varga M. G., Peek R. M., 2017: DNA Transfer and Toll-like Receptor Modulation by *Helicobacter pylori*. "Current Topics in Microbiology and Immunology", 400, 169–193.
- Varga M. G., Shaffer C. L., Sierra J. C., Suarez G., Piazuolo M. B., Whitaker M. E., Romero-Gallo J., Krishna U. S., Delgado A., Gomez M. A., Good J. A. D., Almqvist F., Skaar E. P., Correa P., Wilson K. T., Hadjifrangiskou M., Peek R. M., 2016: Pathogenic *Helicobacter pylori* strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated *cag* type IV secretion system. "Oncogene", 35, 48, published online 9 May 2016, 6262–6269.

- Viala J., Chaput C., Boneca I. G., Cardona A., Girardin S. E., Moran A. P., Athman R., Mémet S., Huerre M. R., Coyle A. J., DiStefano P. S., Sansonetti P. J., Labigne A., Bertin J., Philpott D. J., Ferrero R. L., 2004: *Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island*. "Nature Immunology", 5, 11, 1166–1174.
- Wang Y.-K., Kuo F.-C., Liu C.-J., Wu M.-C., Shih H.-Y., Wang S. S. W., Wu J.-Y., Kuo C.-H., Huang Y.-K., Wu D.-C., 2015: *Diagnosis of Helicobacter pylori infection: Current options and developments*. "World Journal of Gastroenterology", 21, 40, 11221–11235.
- Warren J. R., Marshall B., 1983: *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*. "Lancet", 1, 8336, 1273–1275.
- Watanabe T., Tada M., Nagai H., Sasaki S., Nakao M., 1998: *Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils*. "Gastroenterology", 115, 3, 642–648.
- Weeks D. L., Eskandari S., Scott D. R., Sachs G., 2000: *A H⁺-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization*. "Science", 287, 5452, 482–485.
- Wessler S., Backert S., 2008: *Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by Helicobacter pylori*. "Trends in Microbiology", 16, 8, 397–405.
- Worku M. L., Sidebotham R. L., Walker M. M., Keshavarz T., Karim Q. N., 1999: *The relationship between Helicobacter pylori motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology*. "Microbiology", 145, 10, 2803–2811.
- Wroblewski L. E., Peek R. M., Wilson K. T., 2010: *Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk*. "Clinical Microbiology Reviews", 23, 4, 713–739.
- Yamaoka Y., Ojo O., Fujimoto S., Odenbreit S., Haas R., Gutierrez O., El-Zimaity H. M. T., Reddy R., Arnqvist A., Graham D. Y., 2006: *Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease*. "Gut", 55, 6, 775–781.
- Zhao H., Xu L., Xu Z., Ding Y., Yu H., Zhang Y., Wu Y., Li B., Ji X., 2019: *Investigation on the role of gene hp0788 in Helicobacter pylori in infecting gastric epithelial cells*. "Microbial Pathogenesis", 137, 103739.
- Zimmermann S., Pfannkuch L., Al-Zeer M. A., Bartfeld S., Koch M., Liu J., Rechner C., Soerensen M., Sokolova O., Zamyatina A., Kosma P., Mäurer A. P., Glowinski F., Pleissner K.-P., Schmid M., Brinkmann V., Karlas A., Naumann M., Rother M., Machuy N., Meyer T. F., 2017: *ALPK1- and TIFA-Dependent Innate Immune Response Triggered by the Helicobacter pylori Type IV Secretion System*. "Cell Reports", 20, 10, 2384–2395.

9 Danksagung

Ich möchte mich gerne bei meinem Doktorvater PD Dr. Wolfgang Fischer herzlich für die Bereitstellung der Arbeit und die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Seine Tür stand immer offen und er war stets bereit als Ansprechpartner für Fragen, mit Ratschlägen oder als Diskussionspartner zur Seite zu stehen. Außerdem verdanke ich PD Dr. Fischer und Prof. Dr. Rainer Haas die Möglichkeit, meine Daten auf der Konferenz der DGHM in Leipzig vorzustellen.

Auch bei Evelyn Weiss möchte ich mich bedanken, ohne deren Hilfe und Expertise die Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie war eine große Stütze bei der Einarbeitung in die Laborarbeit und hat mir mit Geduld viel methodisches Wissen beigebracht.

Außerdem gilt mein Dank der ganzen Arbeitsgruppe des Labors, insbesondere Clara, Barbara und Ina, die mir immer im Labor zur Seite standen und stets alle Fragen beantworteten. Sie und das ganze Team des Max-von-Pettenkofer Instituts haben mich sehr freundlich aufgenommen und für eine angenehme und familiäre Arbeitsatmosphäre gesorgt.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere Selma. Danke für das Probelesen meiner Arbeit und sämtliche Unterstützung in jeder Phase des Projektes.