

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

**Untersuchungen zur Rolle der äußeren Membranproteine
bei der Adhärenz von *Helicobacter pylori***

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

vorgelegt von
Kirstin Engel

aus
Köln

Jahr
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Stefan Odenbreit
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Enders Prof. Dr. U. Beuers
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	-
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	03.02.2006

Teile dieser Arbeit werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Engel K., Aspholm M., Walz A., Ruhl S., Faller G., Haas R., Boren T., and S. Odenbreit. Interrelations between AlpAB-, BabA- and SabA-dependent adherence activities of *Helicobacter pylori* (Manuskript in Vorbereitung)

Engel K., Haas R., and S. Odenbreit. OMP-expression profile in clinical *Helicobacter pylori* isolates

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	4
1	Entdeckung des Bakteriums <i>Helicobacter pylori</i>	4
2	Epidemiologie	5
3	Eigenschaften und Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	6
4	Immunantwort des Wirtes und Pathogenese	9
5	Diagnostik und Therapie	12
6	Bedeutung bakterieller Adhärenz in der Pathogenese.....	14
7	Adhärenz von <i>H. pylori</i> an Epithelzellen	16
8	Adaptationsmechanismen von <i>H. pylori</i> an den Wirt	18
9	Genetische Arbeiten mit <i>H. pylori</i>	19
10	Ziel der Arbeit	20
III	Material und Methoden	21
1	Material	21
1.1	Zelllinie	21
1.2	Bakterienstämme	21
1.3	Plasmide und Vektoren	22
1.4	Oligonukleotide	23
1.5	Zellkulturmedien und -puffer.....	24
1.6	Nährmedien und Puffer für Bakterien.....	24
1.7	Antibiotika und Zusätze in Selektivplatten und -medien	25
1.8	Puffer und Lösungen.....	25
1.9	Antikörper	28
1.10	Enzyme und Proteine.....	30
1.11	Molekulargewichtsmarker	30
1.12	Chemikalien	30
1.13	Hilfsmittel	31

1.14	Geräte und Apparaturen	31
2	Methoden.....	32
2.1	Arbeiten mit Zellkulturen.....	32
2.2	Arbeiten mit Bakterien.....	32
2.3	Arbeiten mit DNA	36
2.4	Arbeiten mit Proteinen.....	42
2.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	46
IV	Ergebnisse.....	47
1	Vorarbeiten	47
2	Korrelationen des OMP-Produktionsprofils klinischer <i>H. pylori</i> -Isolate und ihren adhäsiven Eigenschaften	49
2.1	Anlegen einer <i>H. pylori</i> -Stammsammlung.....	49
2.2	Analyse der Produktionsprofile mittels Immunoblot.....	50
2.3	Etablierung des Dot Blot-Arrays mit Modellstämmen	53
2.4	Bindung klinischer Isolate an definierte Antigene.....	54
2.5	Inaktive BabA-Proteine.....	56
2.6	Einfluss der <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel auf die Adhärenz	57
3	Untersuchung der <i>alpAB</i> -Abhängigkeit der SabA-vermittelten Bindung	58
3.1	Adhärenzphänotyp im Dot Blot.....	58
3.2	Präsentation von SabA auf der Oberfläche	59
3.3	Protektiver Einfluss von AlpAB auf SabA unter Trypsinbehandlung.....	60
4	Charakterisierung der BabA-Bindungsdomäne.....	61
4.1	Eingrenzung der Bindungsdomäne mit Hilfe eines <i>babA</i> -Hybridgens in <i>H. pylori</i>	61
4.2	Eingrenzung der BabA-Bindungsdomäne durch einen Autodisplay-Mechanismus in <i>Escherichia coli</i>	71
5	Untersuchungen zur Lactoferrinbindung von <i>H. pylori</i>	79
6	Einfluss des Proteins OipA auf die Induktion der IL-8-Sekretion.....	80
V	Diskussion.....	83

1	Variation der OMPs - Anpassung an den Wirt	83
2	Eingrenzung der Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins von <i>H. pylori</i>	87
3	Einfluss des <i>alpAB</i> -Genlocus auf die Adhärenz.....	89
4	Bedeutung von <i>H. pylori</i> -Adhäsinen für die Pathogenese	91
5	Rolle des äußeren Membranproteins OipA bei der Induktion von IL-8	93
6	Lactoferrinbindung durch <i>H. pylori</i>	95
VI	Anhang	98
1	Abkürzungsverzeichnis	98
2	OMP-Expressionsprofil	101
VII	Literaturverzeichnis.....	105

I Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) löst nach Infektion des Magens zunächst eine akute Gastritis aus, die innerhalb von Monaten in eine chronische Entzündung übergeht. Im Laufe der meist lebenslangen *H. pylori*-Infektion können sich daraus Folgeerkrankungen wie Ulzera, Magenkarzinome und MALT-Lymphome entwickeln. Als wichtige Voraussetzung der initialen Kolonisierung und der chronischen Persistenz des Erregers wird die Adhärenz an die Magenepithelzellen angesehen. *H. pylori* widersetzt sich dadurch unspezifischen Abwehrmechanismen des Menschen und entgeht der Gefahr, zusammen mit Mucus aus dem Magen geschwemmt zu werden. Darüber hinaus stimuliert *H. pylori* nach erfolgter Adhärenz zahlreiche Signaltransduktionswege in Epithelzellen. Dies scheint primär durch die Anwesenheit der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) bestimmt zu sein, die für einen Typ-IV-Sekretionsapparat codiert. Durch ihn wird das Effektorprotein CagA direkt in die Zielzelle transloziert und eine Sekretion des proinflammatorischen Cytokins IL-8 induziert.

Eine entscheidende Rolle im Adhärenzgeschehen scheinen die äußeren Membranproteine (OMPs) von *H. pylori* zu spielen. Mehr als 60 OMPs konnten durch Sequenzanalysen identifiziert werden. Diese Vielfalt grenzt *H. pylori* deutlich von anderen gramnegativen Bakterien ab. Für einige OMPs konnten bereits adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden. Für BabA (*blood group antigen binding adhesin A*) wurde als eukaryotischer Rezeptor das fucosylierte Blutgruppenantigen Le^b identifiziert. Das Adhäsine SabA (*sialic acid binding adhesin A*) gewinnt im Verlauf der Infektion an Bedeutung, indem es an sialylierte Blutgruppenantigene bindet, die beim Fortschreiten einer Gastritis verstärkt exprimiert werden. Die beiden homologen OMPs AlpA und AlpB (*adherence-associated lipoprotein A und B*) wurden im Zusammenhang mit Adhärenz an Biopsieschnitte und Kato-III-Zellen, einer humanen Magenkarzinomzelllinie, beschrieben. Die eukaryotischen Rezeptoren blieben bis heute unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war zum einen die nähere Charakterisierung bereits beschriebener Adhäsine und zum anderen die Identifizierung weiterer Adhärenz-assoziiierter Proteine der äußeren Membran.

Dazu wurden 200 klinische *H. pylori*-Isolate zunächst auf die Expression 8 verschiedener *omp*-Gene untersucht. Alle klinischen Isolate exprimierten die Gene *alpAB*. Etwa 60% der Stämme produzierten BabA, BabB, ein homologes Protein zu BabA, und CagA, welches aufgrund der besonderen klinischen Relevanz mit untersucht wurde. SabA und BabC, ein weitgehend uncharakterisiertes Protein, wurden von ca. 40% der Stämme produziert, Hp227 sowie das *outer inflammatory protein* (OipA) von ca. zwei Drittel der Stämme. Die Produktion des Effektorproteins CagA korrelierte mit jener von BabA und OipA. Die gleichzeitige Expression der Gene *babA* und *oipA* stellte die einzige Korrelation unter den äußeren Membranproteinen dar. Daraus lässt sich schließen, dass verschiedene *H. pylori*-Stämme sich durch ihr individuelles OMP-Schema voneinander unterscheiden.

Mit Hilfe einer neu etablierten Technik wurde anschließend das Adhärenzverhalten der Isolate an definierten Antigenen untersucht und in Korrelation zum OMP-Expressionsprofil betrachtet.

Interessanterweise zeigten 5% der *sabA*-exprimierenden Isolate keine Lamininbindung und 11% der BabA-produzierenden Stämme keine Le^b-Adhäsion. Die für die Le^b-Bindung ausschlaggebende BabA-Bindungsdomäne konnte auf einen Bereich in der N-terminalen Hälfte des Proteins eingegrenzt werden. Zuerst wurde dies durch Konstruktion eines BabA*-Fusionsproteins versucht, indem die N-terminale Hälfte eines aktiven und die C-terminale Hälfte eines inaktiven BabA-Proteins fusioniert wurde. Durch Immunfluoreszenz konnte die Lokalisation des Fusionsproteins an der Oberfläche nachgewiesen werden, es zeigte jedoch keine Bindung an Le^b. In einem zweiten Ansatz wurden verschieden lange *babA*-Fragmente mit dem *aida* (*adhesin involved in diffuse adherence*)-Gen von *E. coli* fusioniert. Diese Fusionsproteine wurden durch einen so genannten Autodisplay-Mechanismus von *E. coli* an die Oberfläche der äußeren Membran exportiert. Durch Adhärenzversuche konnte die Bindungsdomäne auf den Proteinbereich zwischen den Aminosäuren 21-362 eingegrenzt werden.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass für die Funktionalität, jedoch nicht für die Produktion, des SabA-Proteins die Anwesenheit der beiden Proteine AlpA und AlpB essentiell ist. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, nach der AlpAB als Plattform agieren und andere Adhäsine bei der Präsentation auf der Bakterienoberfläche unterstützen.

In Adhärenzversuchen wurde ferner die Bindung aller untersuchten klinischen Isolate an das Eisenspeicherprotein Lactoferrin beobachtet und daraufhin versucht einen Lactoferrin-Rezeptor von *H. pylori* zu identifizieren. Durch Crosslinking-Versuche konnte ein ca. 90 kDa großes Oberflächen-gebundenes Protein als putativer Rezeptor gezeigt werden. Aufgrund dieser Größe kommen hierfür die drei FrpB-Proteine von *H. pylori* in Frage, deren Funktion noch nicht geklärt ist.

Nachdem 2 der entsprechenden Deletionsmutanten in Adhärenzversuchen jedoch keine verminderte Lactoferrinbindung aufwiesen, konnte ein dominanter Einfluss der Gene *hp876* und *hp1512* diesbezüglich ausgeschlossen werden.

Das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin wurde von allen getesteten Isolaten gebunden und dürfte demnach auch an der Adhärenz von *H. pylori in vivo* beteiligt sein. Im Gegensatz dazu scheint Collagen IV keine Bedeutung zu haben. Nur 2% der Stämme adhärten an dieses Protein. Beide Adhärenzphänotypen ließen sich keinem *omp*-Expressionsprofil zuordnen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluss des äußeren Membranproteins OipA und des Cag-Sekretionssystems auf die Induktion der IL-8-Sekretion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *cag*-PAI einen dominanten Einfluss auf die IL-8-Sekretion ausübt. OipA hingegen führt nur in Verbindung mit einem positiven *cag*-PAI-Status zu einer weiteren IL-8-Induktion.

II Einleitung

1 Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori*

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts gab es Berichte über das Auftreten von Magengeschwüren als Ursache einer bakteriellen Infektion [26, 192]. Aufgrund mehrerer Fehlversuche das Bakterium zu isolieren, geriet die Beobachtung in Vergessenheit und es galt weiterhin die Lehrmeinung, der Magen sei ein steriles Organ. Erst Anfang der 80er Jahre wurde diese Theorie widerlegt, indem Robin Warren, Pathologe aus Perth, Australien, und sein Mitarbeiter Barry Marshall polar begeißelte, gramnegative Bakterien in Magenbiopsien von Gastritispatienten entdeckten. Aufgrund der spiraligen Form und der Tatsache, dass der Keim zunächst nur am unteren Ende des Magens, dem so genannten Pylorus, gefunden wurde, wurde das Bakterium *Campylobacter pyloridis* [142] genannt. Durch einen Selbstversuch erfüllte Marshall die Koch'schen Postulate, indem er zeigte, dass *Campylobacter pyloridis* nach der Kolonisierung der Magenschleimhaut zu einer massiven Gastritis führt [140]. Dieser Beweis revolutionierte die damalige Vorstellung, Stress und ungesunde Ernährung seien für Magenschleimhautentzündungen und Magengeschwüre verantwortlich.

Aus grammatikalischen Gründen erfolgte für kurze Zeit die Umbenennung in *Campylobacter pylori* [139]. 1989 wurde das Bakterium endgültig in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) umbenannt und aufgrund von Ultrastrukturuntersuchungen der erste Vertreter der neuen Gattung *Helicobacter* (*helico* [gr.]: spiralförmig) [75]. Diese Gattung umfasst mittlerweile mehr als 25 Spezies [212]. Warren und Marshall wurden für ihre Entdeckung im Jahre 2005 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

Der menschliche Magen kann neben *H. pylori* von einer weiteren magenspezifischen *Helicobacter* Spezies besiedelt werden. *Helicobacter heilmannii* führt nach einer Infektion zu einer mildereren Form der Gastritis [87] und wird mit der Entwicklung von MALT-Lymphomen in Verbindung gebracht [155]. Inzwischen wurden auch aus den Mägen verschiedener Tierarten *Helicobacter* Spezies isoliert, z.B. *Helicobacter felis* aus Katze und Hund [122] oder *Helicobacter mustelae* aus dem Frettchen [69]. *H. pylori* ist seinerseits auf die Besiedelung von Mensch und Primaten spezialisiert.

Enterohepatische *Helicobacter* Spezies wurden aus dem Intestinaltrakt oder der Leber verschiedener Säugetiere und Vögel isoliert. Beim Menschen werden sie in Zusammenhang mit Gastroenteritis, Hepatitis und weiteren Krankheitsbildern gebracht [212].

2 Epidemiologie

Epidemiologisch gesehen ist nach dem heutigen Stand die Kolonisierung der Magenschleimhaut durch *H. pylori* weltweit eine der häufigsten Infektionen.

Die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion variiert innerhalb der Bevölkerung nach geographischer Region, Alter und sozioökonomischem Status [134, 135]. In Entwicklungsländern sind bis zu 90% der Erwachsenen mittleren Alters infiziert, in den Industrieländern dagegen liegt die Infektionsrate bei 20 bis 50% [54] (Abb. 1). Das Hauptinfektionsalter liegt in der Kindheit und Jugend [76, 150]. Trotzdem ist die Prävalenz bei älteren Menschen deutlich höher als bei jüngeren. Dies ist auf ein so genanntes Kohortenphänomen zurückzuführen, welches eine stark rückläufige Inzidenz unter Kindern aufgrund besserer hygienischer Bedingungen in den letzten Jahrzehnten beschreibt [206, 219]. Niedriger sozioökonomischer Status führt auch heute noch zu einer höheren Prävalenz [175].

Aufgrund der Beobachtung, dass in der Regel bei nahen Angehörigen dieselben *H. pylori*-Stämme gefunden werden [14, 52, 113] und die Infektion meist schon im Kindesalter erworben wird [76, 150], wird ein oral-oraler Übertragungsweg von Mutter auf Kind diskutiert, wobei eine fäkal-orale Übertragung nicht ausgeschlossen wird [54]. Vor allem in Entwicklungsländern wird der zweiten Übertragungsrouten Bedeutung zugewiesen und fäkalkontaminiertes Wasser als potentielle Infektionsquelle gesehen [111]. Lange Zeit stellte die iatrogene Übertragung durch kontaminierte Endoskope eine unterschätzte Gefahr dar [108, 119], die jedoch durch Einhaltung der entsprechenden Hygienemaßnahmen weitgehend ausgeschlossen werden kann [185].

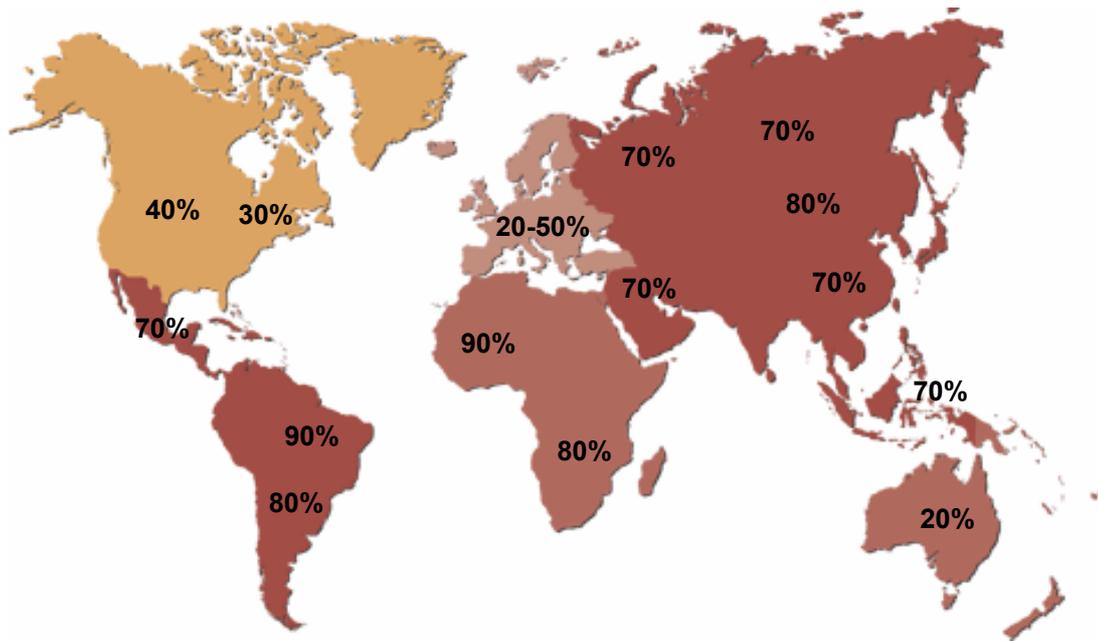


Abb. 1: Infektionsrate der Weltbevölkerung mit *H. pylori*. (nach www.helico.org)

3 Eigenschaften und Virulenzfaktoren von *H. pylori*

H. pylori ist ein gramnegatives, gebogenes bis spiralförmiges Stäbchenbakterium, welches nach der heutigen Systematik zu der ϵ -Subgruppe der Proteobakterien gezählt wird [236].

Nach Übergang in die späte stationäre Phase zeigen Kulturen einen hohen Prozentsatz an rundlichen Zellen („kokkoide Formen“), die zwar lebensfähig aber nicht mehr *in vitro* kultivierbar sind [25]. Die kokkoide Form stellt eventuell eine Art Ruhezustand dar, in dem die Bakterien mit minimalem Stoffwechsel überleben und durch ihre Persistenz eine Gefahr zur Reinfektion nach einer Antibiotikatherapie darstellen [79]. Die Rolle dieser kokkoiden Form bei der Übertragung der Infektion, der Reinfektion und bei Therapieversagern ist noch unklar [24, 204, 240].

Der Magen stellt ein durch unspezifische Abwehrmechanismen gut geschütztes Organ dar. Ein niedriger pH-Wert von ungefähr pH 1-3 sowie die Schleimhaut schützende Mucusschicht, die sich in regelmäßigen Abständen abschilfert und erneuert, kennzeichnen die für Bakterien unfreundliche Umgebung. Aus diesem Grund wurde lange ein Überleben im menschlichen Magen für unmöglich gehalten. *H. pylori* hat sich an diese ökologische Nische sehr gut adaptiert. Ein essentieller Faktor für das Überleben im sauren Lumen des Magens ist die Produktion des

Enzyms Urease [153]. Durch die Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Hydrogencarbonat wird der niedrige pH-Wert des Magens auf einen neutralen Wert im Cytoplasma des Bakteriums eingestellt [141, 216]. Die Harnstoffaufnahme wird durch einen Protonen kontrollierten Harnstoffkanal Urel reguliert, der sich bei abfallendem pH-Wert öffnet [241]. Die Urease wird ferner in Zusammenhang mit Induktion von Epithelzellschäden gebracht, da Ammoniak eine cytotoxische Substanz darstellt [146, 213, 221]. Zudem werden Apoptose-Induktion [63, 100] und Aktivierung der Neutrophilen und Monocyten durch Urease diskutiert [86]. Eine Ureasemutante konnte in den bisher untersuchten Tiermodellen seinen Wirt nicht mehr kolonisieren [55, 245].

Der zweite im Tiermodell essentielle Kolonisierungsfaktor von *H. pylori* ist die hohe Motilität, die neben der helikalen Struktur von zwei bis sieben Flagellen vermittelt wird [56]. Durch sie ist *H. pylori* in der Lage sich durch den viskosen Mucus zur Epithelschicht hin fortzubewegen. Hauptkomponente der Flagellen stellt das Flagellinprotein FlaA dar [124]. Die Untereinheit FlaB ist hauptsächlich an der Flagellenbasis lokalisiert [218]. Die Flagellen sind durch lipidhaltige Flagellenhüllen vor Depolymerisierung durch Säure geschützt [71]. Dieser Schutz vor Säure ist zeitlich begrenzt [196], so dass *H. pylori* zur Kolonisierung innerhalb weniger Minuten in den Mucus eingedrungen sein muss.

Das vakuolisierende Cytotoxin (VacA) bewirkt *in vitro* Zellschädigung, die sich morphologisch in einer Vakuolisierung des Cytoplasmas der Zellen äußert [38]. Das *vacA*-Gen codiert für ein Vorläuferprotein, welches unter Abspaltung einer Autotransporter-Domäne durch Typ-V-Sekretion in das umgebende Milieu sezerniert wird [66]. Obwohl alle bisher untersuchten *H. pylori*-Stämme ein *vacA*-Gen besitzen, zeigen nur ca. 50% eine vakuolisierende Aktivität. Genomanalysen zeigten Polymorphismen in der Signalsequenz sowie der Mittelregion des Gens, die für die unterschiedliche Cytotoxizität verantwortlich sind [9, 40]. Für VacA wurden in den letzten Jahren zahlreiche Effekte beschrieben. Im *Mongolian Gerbil*-Modell wurden durch orale Verabreichung des gereinigten Toxins Ulcera induziert [138, 169]. Desweiteren wurden Bildung anionenselektiver Poren [44, 222] sowie Apoptoseinduktion in Epithelzellen [39, 114] durch VacA beschrieben. T-Lymphocyten-Aktivierung [70] und Antigen-Präsentation durch B-Lymphocyten [154] werden durch Interferenz von VacA mit diversen Signaltransduktionswegen inhibiert.

H. pylori-Genotypen mit starker vakuolisierender Aktivität sind meist mit der Anwesenheit des *cagA*-Gens korreliert [229], welches aus diesem Grund als *cytotoxin-associated gene A* bezeichnet wurde [36]. *cagA/vacA*-positive Stämme sind mit schweren Krankheitsverläufen und dem Auftreten schwerwiegender Folgeerkrankungen wie Ulcus und Magenkarzinom assoziiert. Aufgrund dieser klinischen Relevanz werden sie als Typ-I-Stämme bezeichnet. Unter Typ-II-Stämmen versteht man doppelt negative Stämme [248].

Die Sequenzierung der chromosomalen Region um das *cagA*-Gen identifizierte eine 40kb große Genregion, die an beiden Enden von direkten 31bp-Sequenzwiederholungen flankiert wird [32]. Die Region weist die beschriebenen typischen Merkmale einer Pathogenitätsinsel auf [82] und codiert für etwa 30 Gene, darunter auch *cagA*. Aus diesem Grund wurde die Genregion als *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) bezeichnet [32].

Einige Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel zeigen signifikante Homologien zu Proteinen, die in anderen Spezies am Aufbau von Typ-IV-Sekretionssystemen beteiligt sind [31, 37]. Als Prototyp der Typ-IV-Sekretionssysteme wird das VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens* angesehen, das über einen Sekretionsapparat ein Tumor-induzierendes Plasmid (Ti-Plasmid) in die Pflanzenzelle transloziert, wo sich dieses in das Chromosom integriert und zur Ausbildung von Pflanzentumoren führt [33]. Bis heute konnten Homologien zwischen Genen der *cag*-PAI und den Genen *virB1*, *virB4*, *virB7*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* und *virD4* gezeigt werden (Abb. 2).

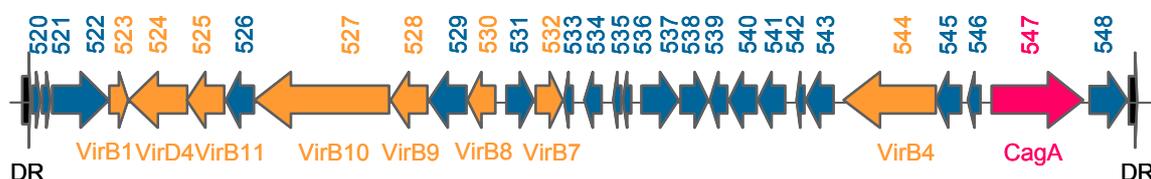


Abb. 2: Schematische Darstellung der *cag*-Pathogenitätsinsel von *H. pylori* 26695. Die offenen Leserahmen sind als Pfeile dargestellt und mit den durchlaufenden Nummern der *H. pylori*-Genomsequenz *hp520-548* bezeichnet. Die flankierenden direkten Wiederholungen (DR) sind als schwarze Pfeile, das *cagA*-Gen als rosa Pfeil dargestellt. Orangefarbene Pfeile kennzeichnen offene Leserahmen mit Homologie zu den *virB*-Genen von *A. tumefaciens*.

Die *cag*-PAI codiert für einen Typ-IV-Sekretionsapparat, mit dem CagA direkt in die Zielzelle transloziert wird [12, 165, 215]. In der Zielzelle wird es durch eine Tyrosin-Kinase der Src-Familie phosphoryliert [201] und führt dann zur Umstrukturierung des Actincytoskeletts [11, 182]. In Zellkultur-Experimenten zeigt sich das einerseits in dem so genannten *hummingbird*-Phänotyp [199], der charakteristische Zellausläufer beschreibt und zum anderen ist ein Auseinanderweichen der Zellen zu beobachten, dem so genannten *cell scattering* [34, 96]. Desweiteren induzieren *cag*-PAI-positive Stämme eine stärkere Cytokinfreisetzung, insbesondere des proinflammatorischen Cytokins IL-8. Diese Induktion ist von mehreren *cag*-PAI-Genen abhängig, jedoch unabhängig vom CagA-Protein [32, 67, 200, 203]. Der genaue Mechanismus der Induktion ist bis heute unklar. Bekannt ist bereits, dass es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B kommt, welche in einer IL-8-Induktion resultiert [202].

Als weiterer Induktor der IL-8-Sekretion wurde das OipA (*outer inflammatory protein A*)-Protein beschrieben [252].

Ein Virulenzfaktor, der maßgeblich an der Entwicklung der Gastritis beteiligt zu sein scheint, ist das Neutrophile aktivierende Protein HP-NAP. Neben Neutrophilen werden auch Monocyten durch HP-NAP in die Mucosa gelockt. Beide Zelltypen werden durch HP-NAP zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies stimuliert, welche zu einer Zunahme der Zellschädigung der Mucosa führt [61, 194].

4 Immunantwort des Wirtes und Pathogenese

Die Kolonisierung der Magenschleimhaut durch *H. pylori* löst zunächst eine akute Gastritis aus (Abb. 3), die nur bei ca. 10% der Infizierten Symptome wie Übelkeit und Erbrechen hervorruft. Anfänglich wird die akute Gastritis von einer vermehrten Säure- und Pepsinproduktion begleitet, die sich nach einigen Tagen wieder normalisiert und dann in eine temporäre Achlorhydrie übergeht [210]. Histologisch ist die akute Gastritis durch eine massive Invasion der Magenschleimhaut durch polymorphkernige Granulocyten, Lymphocyten, Plasmazellen sowie Monocyten gekennzeichnet [49, 136, 188].

Aufgrund fehlender Selbstheilung schließt sich innerhalb von Monaten diesem akuten Infektionsstadium die Entwicklung einer chronischen Typ B-Gastritis an. Als Antwort auf die *H. pylori*-Infektion sekretieren Epithelzellen der Magenschleimhaut

vermehrt proinflammatorische Cytokine wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α [42, 251]. Begleitet wird die chronische Entzündung durch das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies, die zu einer weiteren Schädigung des Epithels führen und dem Bakterium zu einer besseren Nährstoffversorgung verhelfen. Als weitere Komponente der angeborenen Immunantwort wird die Stimulation verschiedener *Toll-like* Rezeptoren (TLR2, 4 und 5) diskutiert [208, 209, 223].

Die erworbene Immunantwort äußert sich in der Bildung Antigen-spezifischer Immunglobuline der Klassen IgA und IgM [143] und einer TH₁-polarisierten T-Zell-Antwort, die durch Sekretion proinflammatorischer Cytokine wie Interferon (IFN)- γ , IL-2, und TNF- β charakterisiert ist [15, 126]. T-Zellen des TH₂-Phänotyps, die IL-4 produzieren, treten in der infizierten Mucosa kaum auf [15, 45].

Trotz der starken Immunreaktion ist der menschliche Organismus aufgrund der fehlenden TH₂-Antwort nicht in der Lage den Keim zu eliminieren [2, 191]. Lediglich in der Kindheit treten Spontanremissionen auf, die jedoch zu keiner Immunität führen [150, 184]. Da auch bei nicht *H. pylori* bedingten entzündlichen Magenerkrankungen eine stark TH₁-polarisierte Antwort vorherrscht [103, 106], bleibt zu untersuchen, ob die Polarisierung durch *H. pylori* gesteuert wird.

Der Status der Säuresekretion während der chronischen Infektion ist abhängig von der Lokalisation der Entzündung. Eine antrumbetonte Gastritis führt zu einer Zunahme der Säuresekretion mit der möglichen Folge eines *Ulcus duodeni*. Durch die verstärkte Säurebelastung des *Bulbus duodeni*, dem ersten Abschnitt des Duodenums, kommt es zu einer Zerstörung der Zellen, die im Zuge der Regeneration durch Epithelzellen des Magentyps ersetzt werden (gastrale Metaplasie) [238]. Wird dieses Gewebe von *H. pylori* besiedelt, kommt es zu einer Ausweitung der Entzündung in den Dünndarm, gefolgt von Erosionen, die als Vorstufe des *Ulcus duodeni* angesehen werden können [136].

Bei starker Entzündung der Korpus Schleimhaut kann sich die Säuresekretion reduzieren. Als mögliche Folgeerkrankungen sind hier das Magengeschwür und das Magenkarzinom zu nennen.

Die chronische atrophische Gastritis ist gekennzeichnet durch die allmähliche Rückbildung (Atrophie) der Drüsenkörper der Mucosa als Folge einer permanenten Entzündung der Magenschleimhaut. Diese führt zu einer Zerstörung der Säure

produzierenden Parietalzellen, der Pepsinogen produzierenden Hauptzellen sowie der Mucus produzierenden Nebenzellen. Das differenzierte Gewebe wird im Zuge einer Metaplasie durch intestinales Gewebe ersetzt (intestinale Metaplasie), eine Vorstufe des Adenokarzinoms [41].

Aufgrund der Tatsache, dass sich das Risiko, infolge einer *H. pylori*-Infektion an einem Magenkarzinom zu erkranken, um den Faktor sechs erhöht, erklärte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *H. pylori* im Jahre 1994 zum Klasse-I-Karzinogen [1]. Die *H. pylori*-Infektion wird nach neueren Studien sogar nahezu als Bedingung für die Entwicklung des nicht-kardialen Magenkrebses angesehen [30]. Das Magenadenokarzinom ist derzeit die zweithäufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle weltweit [35, 244].

Da die gesunde Magenmucosa durch eine dicke Mucusschicht und eine intakte Epithelzellschicht vor Antigenkontakt geschützt ist, ist sie frei von lymphatischem Gewebe. Kommt es jedoch aufgrund einer infekassozierten Epithelschädigung zur Antigenexposition der *Lamina propria*, führt dies zu einer Akquisition von gastralem lymphatischem Gewebe, welche sich in dem Auftreten von Lymphfollikeln und lymphatischen Aggregaten in der Magenmucosa äußert. Aus diesem lymphatischen Gewebe kann sich ein extranodales Marginalzonen-B-Zell-Lymphom vom MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*)-Typ (MALT-Lymphom) entwickeln [172].

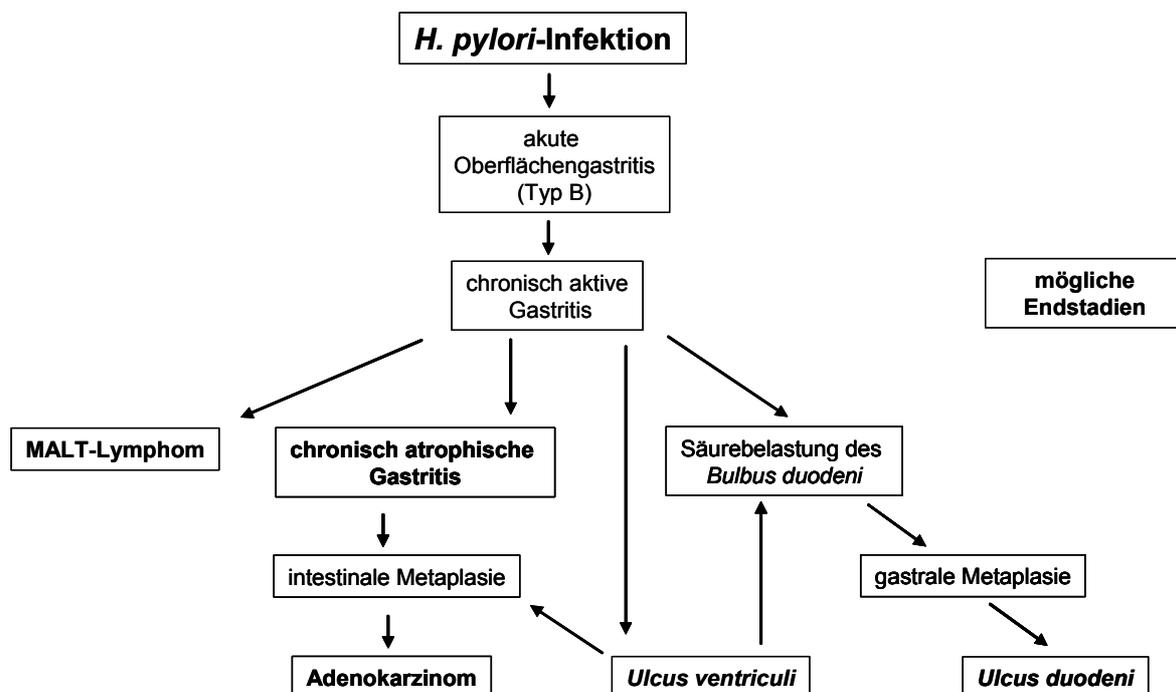


Abb. 3: Pathogenese einer *H. pylori*-Infektion. Erläuterungen s. Text.

Wotherspoon und Stolte zeigten in ihren Untersuchungen, dass mehr als 95% der untersuchten MALT-Lymphom-Patienten an einer *H. pylori*-Infektion erkrankt waren [217, 247]. Die Remission von MALT-Lymphomen durch gezielte Eradikation von *H. pylori* wurde erstmals 1995 beschrieben [16]. Seitdem stellt die antibiotische Eradikation von *H. pylori* einen kurativen Therapieansatz bei der Behandlung gastraler Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ in den Frühstadien 1a und 1b sowie primär gastraler hochmaligner Lymphome des Magens dar.

Neben den gesundheitlichen Risiken einer *H. pylori*-Infektion wurde in den letzten Jahren auch ein gewisser Schutz vor Erkrankungen durch *H. pylori* diskutiert. Verschiedene Forschungsgruppen zeigten ein vermindertes Risiko für eine gastroösophageale Refluxerkrankung [58] und dem damit assoziierten Barrett-Ösophagus sowie dem Adenokarzinom des Ösophagus [21, 254] bei *H. pylori*-Infizierten.

5 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostikmethoden lassen sich je nach Vorgehensweise in invasive und nichtinvasive Methoden unterteilen. Bei den invasiven Nachweismethoden wird während einer Magenspiegelung Biopsiematerial entnommen und anschließend untersucht. Der Nachweis kann durch Kultur, Urease-Schnelltest, histologische Färbungen oder PCR erfolgen. Bei der PCR werden charakteristische Genabschnitte aus dem Genom amplifiziert. Häufig werden hierzu Abschnitte der Gene *vacA* und *cagA* oder des Urease-Gens verwendet [136]. Die Anzucht von *H. pylori* aus Biopsiematerial gilt als Goldstandard, da nur wenige Bakterien zum Nachweis ausreichen [133].

Der nichtinvasive ^{13}C -Harnstoff-Atemtest basiert auf dem Prinzip, dass oral zugeführter ^{13}C -Harnstoff durch die Urease von *H. pylori* zu $^{13}\text{CO}_2$ und Ammoniak umgesetzt wird. Das freigesetzte $^{13}\text{CO}_2$ diffundiert durch epitheliale Blutgefäße, wird über die Lunge abgeatmet und massenspektrometrisch erfasst [173].

Durch serologische Nachweismethoden werden spezifische IgG-Antikörper gegen *H. pylori* im Blut des Patienten nachgewiesen. Diese Antikörper treten auch im Speichel und Urin auf, wobei die Konzentrationen niedriger als im Serum sind [231].

Der Stuhl-Antigen-Test beruht auf dem Nachweis spezifischer *H. pylori*-Antigene im Stuhl des Patienten mittels ELISA. Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität, die bei über 90% liegen [7], stellt er eine vergleichbare Methode zum ¹³C-Harnstoff-Atemtest dar [107, 174].

Patienten mit einer asymptomatisch verlaufenden *H. pylori*-Infektion werden in der Regel aus ökonomischen Gründen nicht therapiert. Eine symptomatische Gastritis, Ulcuserkrankung und ein frühes MALT-Lymphom gelten als klare Therapieindikationen. Auch nach Resektion eines Magenkarzinoms und bei Verwandtschaft ersten Grades zu Magenkrebspatienten ist eine *H. pylori*-Eradikation nach den Richtlinien des Maastricht Konsensus der EHSG indiziert [137]. Empfohlen wird die Therapie bei funktioneller Dyspepsie, der gastroösophagealen Refluxerkrankung und vor einer Langzeittherapie mit Nicht-Steroidalen-Antirheumatika (NSAIDs) [137].

Die erfolgreiche Therapie einer *H. pylori*-Infektion erweist sich zunehmend als schwierig. Nicht nur die schwer zugänglichen Kompartimente, in denen *H. pylori* sich aufhält, wie Speichel und Zahnplaques [151], sondern auch die zunehmende Resistenz des Bakteriums mindern den Therapieerfolg.

Die aktuelle Therapieempfehlung nach dem Maastricht Konsensus [137] sieht für die primäre Behandlung die so genannte Tripel-Therapie über 7 Tage vor, die eine Heilungsrate von ca. 90% bietet. Sie besteht aus zwei Antibiotika (Amoxicillin und Clarithromycin bzw. Metronidazol) und einem Protonenpumpeninhibitor [137]. Untersuchungen ergaben, dass ca. 2% der *H. pylori*-Stämme in Deutschland gegen Clarithromycin und ca. 26% der Stämme gegen Metronidazol resistent sind [246]. Diese Ergebnisse unterliegen jedoch starken regionalen Schwankungen. Bei der Auswahl des primären Therapieschemas sollte deshalb zur Optimierung des Therapieerfolges die jeweilige Resistenzsituation in der betreffenden Region bekannt sein. Daten hierzu liefert die seit dem Jahre 2001 laufende Studie ResiNet des Nationalen Referenzzentrums (NRF) für *H. pylori* in Freiburg.

Nach Therapieversagen empfiehlt das NRZ eine Sensibilitätsprüfung von Biopsiematerial. In über 90% der Fälle führt die Therapie mit Metronidazol, Tetracyclin, Wismutsalz und einem Protonenpumpeninhibitor zu erfolgreicher Eradikation [137]. Diese Therapie ist jedoch aufgrund erhöhten Risikos von Nebenwirkungen nur als Therapie der 2. Wahl zu betrachten.

6 Bedeutung bakterieller Adhärenz in der Pathogenese

Die Adhärenz pathogener Erreger an Wirtszellen ist oft der erste Schritt einer Infektion. Dabei binden bakterielle Faktoren, die so genannten Adhäsine, an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen. Die effektivste Strategie eine Infektion abzuwenden, ist diesen ersten Schritt zu verhindern. Zahlreiche unspezifische Abwehrmechanismen, wie z. B. Flüssigkeitsströme in Mundhöhle und Urogenitaltrakt, Peristaltik sowie die ständige Erneuerung des Epithels und des Mucus im Gastrointestinaltrakt unterstützen die Infektabwehr [62].

Adhäsine können nach ihrem Aufbau in Polypeptid- und Polysaccharid-Adhäsine unterschieden werden. Gramnegative Bakterien stellen den Erstkontakt zu eukaryotischen Zellen in der Regel durch filamentöse Strukturen (Fimbrien) her. Diese Polypeptid-Adhäsine, auch Pili genannt, sind unter anderem als Typ-I-Fimbrien bei Enterobakterien und als Typ-IV-Fimbrien bei verschiedenen *Neisseria* und *Pseudomonas* Spezies zu beobachten [50, 83, 147]. Uropathogene *E. coli* besiedeln Epithelzellen des Urogenitaltrakts indem sie mittels Pap-Pili (*pyelonephritis-associated pili*) an eine α -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal-Struktur in Glycolipiden binden [23].

Die zweite große Gruppe der Polypeptid-Adhäsine bilden die Nicht-Fimbrien-Adhäsine (NFA), die sowohl bei grampositiven, wie pathogenen Staphylokokken und Streptokokken, als auch bei gramnegativen Bakterien, wie pathogenen Yersinien und *H. pylori*, von Bedeutung sind. Bei gramnegativen Bakterien sind die NFA als integrale Membranproteine in der äußeren Membran verankert und werden deshalb als *outer membrane proteins* (OMPs) bezeichnet [50, 147, 159].

Aufgrund der großen Bedeutung der Adhärenz in der Pathogenese bakterieller Infektionen treten Adhäsine oft in Kombination auf. So wird der primäre Kontakt zwischen enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und Darmepithel durch Typ-IV-Pili vermittelt. Durch einen Typ-III-Sekretionsapparat translozieren EPECs das Protein Tir (*translocated intimin receptor*) in die Wirtszelle, in der es phosphoryliert und anschließend in die Plasmamembran transportiert wird. Dieses Protein verstärkt nun den Kontakt zwischen Bakterium und Wirt, da es als Rezeptor für das in der äußeren Membran der EPECs lokalisierten Adhäsin Intimin fungiert [110].

Neben der Funktion als Kolonisierungsfaktoren übernehmen gewisse Adhäsine die Beeinflussung von Signaltransduktionswegen des Wirtes. *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* binden über das Protein Invasin an β_1 -Integrine auf der apikalen Seite von M-Zellen [227] der Peyerschen Plaques, was zu einer Modulation von Signalkaskaden eukaryotischer Zellen und zu der Induktion der Aufnahme des Bakteriums führt.

Polysaccharid-Adhäsine sind Komponenten der bakteriellen Zellmembran, Zellwand oder Kapsel. Hierzu gehört das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, das neben adhäsiven Eigenschaften als Endotoxin eine entscheidende Rolle in der Pathogenese übernimmt.

Lipoteichonsäuren der Zellwand grampositiver Bakterien vermitteln Adhärenz pathogener Staphylokokken und Streptokokken [17]. Auch Polysaccharide aus der Kapsel von *Mycobacteria spp.* sind an der Adhäsion beteiligt [46].

Nach der Rezeptorstruktur unterscheidet man zwischen Kohlenhydrat-erkennenden Adhäsinen und Proteindomänen-erkennenden Adhäsinen. Proteine, die an Zuckerstrukturen auf Glycolipiden oder Glycoproteinen binden, werden Lektine genannt. Hierzu zählen die bereits erwähnten Typ-I-Pili und Pap-Pili. Kohlenhydratketten sind auch auf der Oberfläche von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) lokalisiert und spielen unter anderem bei der Adhärenz von *H. pylori* eine Rolle (s. nächstes Kapitel).

Die Bindung an Transmembranproteine wie Integrine oder Cadherine erfolgt oft über ein spezielles Tripeptid der Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Diese auch als RGD-Sequenz bezeichnete Struktur ist Bestandteil der natürlichen Liganden der Transmembranproteine und wird in Adhäsinen verschiedener Bakterien nachgeahmt, wie z. B. im bereits erwähnten Invasin verschiedener *Yersinia* Spezies [65].

Eine Interaktion mit Transmembranproteinen kann aber auch indirekt über die Bindung des Adhäsins an den natürlichen Liganden erfolgen. So binden beispielsweise pathogene Staphylokokken und Streptokokken an Fibronectin, welches über eine RGD-Sequenz an Integrine bindet und somit Signaltransduktionswege in der Zielzelle beeinflusst [198].

7 Adhärenz von *H. pylori* an Epithelzellen

Die Kolonisierung des Magenepithels wird unter anderem durch die regelmäßige Erneuerung des Epithels sowie des Mucus erschwert. Spezielle Adhäsine von *H. pylori* vermitteln Adhärenz an das Magenepithel und verhindern ein Ausschwemmen des Bakteriums aus dem Magen. Untersuchungen von Magenbiopsien *H. pylori*-Infizierter zeigten, dass die Mehrzahl der Bakterien frei im Mucus lokalisiert ist, während etwa 20% an Epithelzellen gebunden vorliegen [93, 121].

Durch Genomanalysen konnten mehr als sechzig äußere Membranproteine (OMPs) identifiziert werden [225], die sich nach ihrer Homologie phylogenetisch einteilen lassen (Abb. 4). Für einige von ihnen konnten bereits adhäsive Eigenschaften nachgewiesen werden. Aufgrund sehr ausgeprägter Sequenzhomologien über große Bereiche wurden elf *omp*-Gene zu einer Unterfamilie, der so genannten Adhäsinfamilie, zusammengefasst [3].

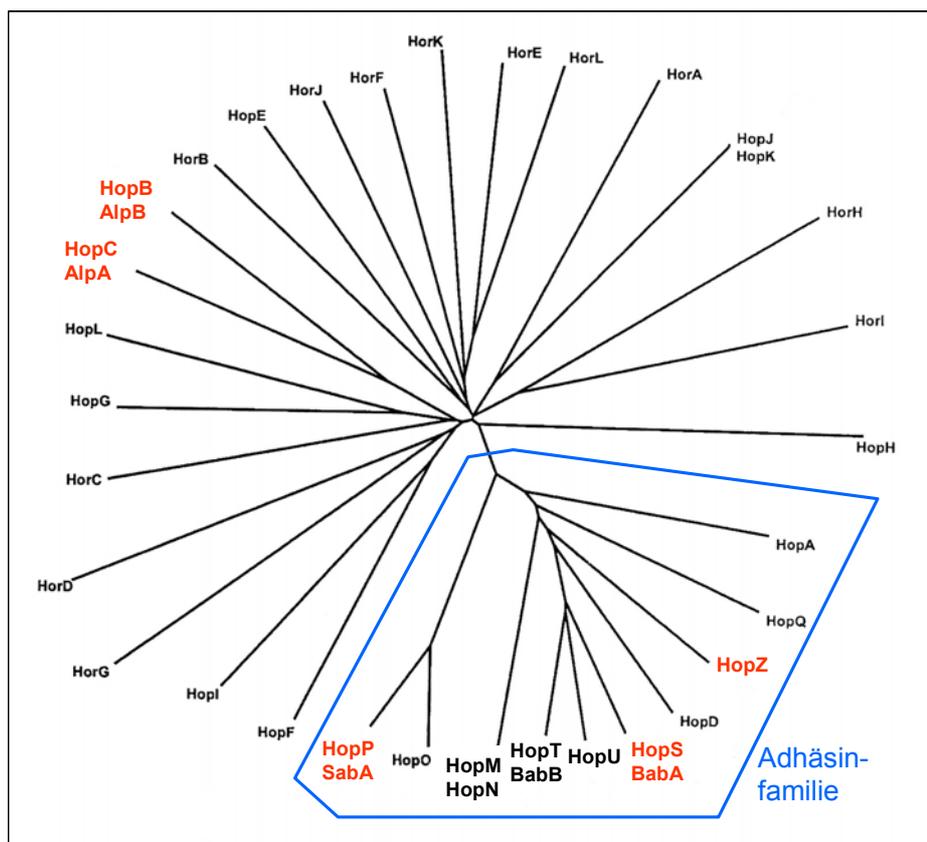


Abb. 4: Phylogenetische Einteilung äußerer Membranproteine nach Alm *et al.* [3]. Bereits in der Literatur beschriebene Adhärenz-assoziierte Proteine sind rot markiert. Die blaue Umrandung kennzeichnet die Adhäsinfamilie.

BabA (*blood group antigen binding adhesin A*) ist ein Adhäsion, welches an das Blutgruppenantigen Lewis^b (Le^b) bindet [27, 102]. Le^b wird bei Vorhandensein einer α 1,2-Fucosyltransferase (positiver Sekretor-Status) auf Magenepithelzellen als vorherrschendes Antigen exprimiert [60, 190]. Zudem ist es auf der Oberfläche von MUC5AC, einer Mucinart, zu finden und vermittelt somit die Adhäsion von *H. pylori* an den Mucus im Magen [97, 234].

Das äußere Membranprotein SabA (*sialic acid binding adhesin A*) bindet an sialylierte Strukturen, wie z. B. die sialylierten Blutgruppenantigene s-Le^x und s-Le^a [131]. Diese werden im entzündeten Magengewebe vermehrt exprimiert und verdrängen weitgehend die sonst natürlich vorkommenden Lewis-Antigene. Dieser Vorgang führt im Verlauf einer chronischen Gastritis zu einer Verstärkung der *H. pylori*-Bindung über SabA. Auch die Bindung an sialylierte Zuckerstrukturen des ECM-Proteins Laminin scheint durch SabA vermittelt zu werden [239].

Die beiden homologen Proteine AlpA und AlpB (*adherence associated lipoproteins A und B*) gehören aufgrund größerer Sequenzabweichungen der Gene nicht zu der Adhäsinfamilie. Sie wurden jedoch in Zusammenhang mit der Adhärenz an Kato-III-Zellen, eine humane Magenkarzinomzelllinie, und an Magenbiopsieschnitte beschrieben [166, 167]. Der eukaryotische Rezeptor konnte bis heute noch nicht identifiziert werden.

Als weiterer Adhärenzfaktor von *H. pylori* wurde das LPS beschrieben. So konnten Osaki *et al.* die Adhäsion an eine humane Magenkarzinomzelllinie (MKN 45) durch Antikörper gegen das LPS von *H. pylori* hemmen [171], Valkonen *et al.* beschrieben Laminin als putativen Rezeptor [232]. Es konnte gezeigt werden, dass Le^x- und Le^y-Blutgruppenantigene in der Seitenkette des LPS phasenvariabel exprimiert werden. Die Bedeutung dieser Antigene bei der Bindung wird heute noch kontrovers diskutiert [57, 130, 161].

Zahlreiche Strukturen wurden als eukaryotischen Rezeptor für *H. pylori* beschrieben, wobei in den meisten Fällen das für die Bindung verantwortliche Adhäsion noch unbekannt ist.

Neben Laminin wurden auch die extrazellulären Matrixproteine Typ-IV Collagen, Fibronectin, Laminin und Vitronectin [186, 228] als Rezeptorstrukturen beschrieben, denen vor allem eine Bedeutung zukommt, wenn diese Strukturen durch Gewebsschädigung dem Bakterium zugänglich sind.

Der Adhärenz an sialylierte und sulfatierte Strukturen in Speichelproteinen wurde in den letzten Jahren zunehmendes Interesse geschenkt, nachdem bekannt wurde, dass *H. pylori* auch in der Mundhöhle persistiert und sich dort als Gefahr der Reinfektion, aber auch als potentielle Ansteckungsquelle heraus kristallisierte [151, 179, 51].

Phosphatidylethanolamine und Gangliotetrasylceramid wurden als Lipidrezeptor in der Mucosa für *H. pylori* identifiziert [74]. Ein putatives Adhäsins, welches für diese Bindung verantwortlich sein sollte, konnte aufgereinigt werden [127, 128], stellte sich aber in weiteren Untersuchungen als Katalase heraus, die cytosolisch lokalisiert ist, was nicht für die Funktion eines Adhäsins spricht [168].

8 Adaptationsmechanismen von *H. pylori* an den Wirt

Pathogene Mikroorganismen müssen in der Lage sein, flexibel auf sich verändernde Milieubedingungen zu reagieren. Wirtsstrukturen können sich im Laufe einer Infektion z. B. durch ausgeprägte Entzündungsreaktionen verändern. Zum anderen werden Erreger nach der Transmission in ein anderes Wirtsindividuum bzw. nach Vordringen in weitere Kompartimente innerhalb eines Wirts mit neuen Oberflächenstrukturen konfrontiert. Aufgrund der in der Regel jahrzehntelangen Infektion sowie der ausgeprägten Gastritis und sich damit verändernder Magenschleimhaut ist eine Adaptation für *H. pylori* von entscheidender Bedeutung.

H. pylori zeichnet sich durch eine hohe genetische Variabilität aus [163]. Die Mikrodiversität (Unterschiede auf Genebene) wird einerseits durch freie Rekombination von DNA-Fragmenten zwischen verschiedenen *H. pylori*-Stämmen [219] und andererseits durch hohe Mutationsraten [19] verursacht. Einige der *omp*-Gene, z. B. *sabA*, *babB*, *babC* sowie die Expression des LPS unterliegen einem als Phasenvariation bezeichneten Mechanismus, der ein An- bzw. Abschalten der Gene und damit eine Adaptation an sich verändernde Oberflächenrezeptoren ermöglicht [225]. Phasenvariable Gene von *H. pylori*, die durch den so genannten *slipped-strand mispairing*-Mechanismus (SSM) reguliert werden, zeichnen sich durch homopolymere Sequenzen (z. B. 14xA) oder Dinucleotidwiederholungen (z. B. 11xCT) aus. Durch diese Wiederholungen neigt die DNA-Polymerase bei der Replikation zu einer erhöhten Fehlerrate, was sich als Deletion oder Insertion

einzelner Nucleotide äußert. Die daraus resultierende Leserasterverschiebung führt zum An- oder Abschalten der entsprechenden Gene.

Mehrere Studien belegten als weitere Ursache der genetischen Diversität eine hohe Makrodiversität (Variation der Genanordnung im Chromosom), die unter den *omp*-Genen besonders stark ausgeprägt zu sein scheint. Sequenzanalysen zeigten, dass das *omp*-Gen *hp317* (*babC*) im Genom von *H. pylori* 26695 vorhanden ist, jedoch im *H. pylori*-Stamm J99 fehlt [4, 225]. Weiter konnte gezeigt werden, dass einige *H. pylori*-Stämme, z. B. der Stamm CCUG17875, über 2 *babA*-Gene verfügen, die sich lediglich durch eine Insertion von 10bp unterscheiden [102]. Während *babA2* für BabA codiert, handelt es sich bei *babA1* um eine stille Genkopie, die als Rekombinationspotential im Genom dient [102]. Im Tiermodell konnten Genkonversionen zwischen *babA* und *babB* gezeigt werden [13, 211]. Das Gen *babB* codiert für das BabB-Protein, das große Homologien in den C- und N-terminalen Bereichen zu BabA aufweist [3, 102], jedoch keine Adhärenz an Le^b vermittelt [180]. Die stark ausgeprägte Variabilität der *omp*-Gene ermöglicht *H. pylori* sich durch Veränderungen adhäsiver Eigenschaften an Wirtsstrukturen zu adaptieren.

9 Genetische Arbeiten mit *H. pylori*

Die Möglichkeiten *H. pylori*-spezifische DNA in *E. coli* zu klonieren, erweisen sich als begrenzt, da nur wenige *E. coli*-Stämme das Modifikationsmuster *H. pylori*-spezifischer DNA akzeptieren. Die Stämme HB101, RR1 und ER1793 wurden bereits erfolgreich zur Klonierung von *H. pylori*-Genen eingesetzt [117, 124].

H. pylori weist jedoch eine natürliche Transformationskompetenz auf [158], die auch für einige andere pathogene Erreger wie *Haemophilus influenzae*, pathogene Neisserien und Streptokokken beschrieben wurde [53]. Durch diese Eigenschaft kann DNA aus dem Medium aufgenommen werden und entweder repliziert oder über homologe Rekombination in das Genom eingebaut werden. Die Fähigkeit der DNA-Aufnahme ist unter Laborbedingungen nicht bei allen *H. pylori*-Stämmen in gleichem Maße gut ausgeprägt [81], so dass sich nicht alle Stämme zur genetischen Manipulation eignen. In diesen Fällen bietet die Elektroporation eine Alternative, die jedoch häufig uneffizient ist [64].

Etwa 60% aller *H. pylori*-Stämme verfügen über kryptische Plasmide [132], deren Funktion bis heute noch unbekannt ist. Auf Basis dieser Plasmide wurde versucht *H.*

pylori-/*E. coli*-*Shuttle*-Vektoren herzustellen, die eine Klonierung von Genen in *E. coli* und nach Transfer die Expression in *H. pylori* ermöglichen. Basierend auf dem *H. pylori*-Plasmid pHel1 [94] wurden schließlich die Vektoren pHel2 und pHel3 konstruiert, die sich durch unterschiedliche Resistenzgene unterscheiden. Sie können durch Transformation wie auch Konjugation in *H. pylori* eingebracht werden [95]. Es stellte sich jedoch heraus, dass viele *H. pylori*-Gene, vor allem codierend für äußere Membranproteine, aufgrund toxischer Effekte in *E. coli* nicht klonierbar sind und daher nur bedingt über *Shuttle*-Vektoren in *H. pylori* komplementiert werden können [68].

10 Ziel der Arbeit

Die Adhärenz von *H. pylori* spielt eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung und der chronischen Persistenz des Erregers. Obwohl schon einige Adhäsine und Rezeptoren in den letzten Jahren entdeckt wurden, fehlt letztendlich noch das Gesamtverständnis für diesen sehr komplexen Vorgang.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie die bereits bekannten adhäsiven Proteine miteinander wechselwirken und ob ihre Expression untereinander korreliert. Desweiteren sollte geklärt werden, ob noch weitere Proteine der OMP-Gruppe adhäsive Eigenschaften aufweisen.

Neben der Identifizierung neuer Adhäsine sollten auch eukaryotische Strukturen in Hinsicht auf eventuelle Rezeptorfunktion analysiert werden.

Basierend auf der Untersuchung klinischer *H. pylori*-Isolate wurde zunächst ein Expressionsprofil verschiedener äußerer Membranproteine erstellt. Anschließend wurde versucht einen Zusammenhang zwischen Expressionsprofil und Adhärenzverhalten herzustellen.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins eingegrenzt werden, indem das entsprechende Gen mutagenisiert und die Mutante auf Adhärenz getestet wurde.

Weiter sollte der Einfluss des Proteins OipA auf die Induktion der IL-8-Sekretion untersucht werden, da dieser in der Literatur kontrovers diskutiert wird.

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Zelllinie

AGS humane Magenkarzinomzelllinie (ATCC CRL 1739)

1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli-Stämme

DH5 α	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYAargF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Invitrogen)
TOP10	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYAargF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen)
UT5600 DE3	<i>ompT</i> ⁻ [144]
P1920	<i>E. coli</i> UT5600 DE3 transformiert mit pKE19 und pKE20
P1921	<i>E. coli</i> UT5600 DE3 transformiert mit pKE19 und pKE21
P1922	<i>E. coli</i> UT5600 DE3 transformiert mit pKE19 und pKE22
P1923	<i>E. coli</i> UT5600 DE3 transformiert mit pKE19 und pKE23
P1924	<i>E. coli</i> UT5600 DE3 transformiert mit pKE19 und pKE24

Helicobacter pylori-Stämme

P1	Klinisches Isolat 69A der Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universität Amsterdam [81]
P1(<i>babA</i>)	<i>H. pylori</i> P1 transformiert mit pDP501 [180], <i>babA::kan</i> (S. Odenbreit)
P1(<i>alpAB</i>)	<i>H. pylori</i> P1 transformiert mit pMu140a, <i>alpA::cat</i> [166]
P12	Klinisches Isolat 888-0 der Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg [195]
P12 Δ <i>cag</i> -PAI	<i>H. pylori</i> P12, Deletion der <i>cag</i> -PAI [162]

P12(<i>hp1512</i>)	<i>H. pylori</i> P12 transformiert mit pUK1512::TnMax5 (S. Odenbreit)
P12(<i>hp876</i>)	<i>H. pylori</i> P12 transformiert mit pUK876::TnMax5 (S. Odenbreit)
26695	Genom-sequenzierter Stamm [225], Bezugsquelle: American Type Culture Collection ATCC
26695(<i>alpAB</i>)	<i>H. pylori</i> 26695 transformiert mit pMu140a, <i>alpA</i> :: <i>cat</i> [164]
26695(<i>babA</i>)	<i>H. pylori</i> 26695 transformiert mit pSO197 [164]
26695(<i>babB</i>)	<i>H. pylori</i> 26695 transformiert mit pSO196 [164]
26695(<i>babC</i>)	<i>H. pylori</i> 26695 transformiert mit pSO195 [164]
26695 Δ <i>cag</i> -PAI	<i>H. pylori</i> 26695, Deletion der <i>cag</i> -PAI (S. Odenbreit)
J99	Genom-sequenzierter Stamm [4]
J99(<i>alpAB</i>)	<i>H. pylori</i> J99 transformiert mit pMu140a, <i>alpA</i> :: <i>cat</i> (S. Odenbreit)
J99(<i>babA</i>)	<i>babA</i> :: <i>cat</i> [131]
J99(<i>alpAB/babA</i>)	<i>H. pylori</i> J99 mit pMu140a und pDP501 [180] transformiert, <i>alpA</i> :: <i>cat</i> , <i>babA</i> :: <i>kan</i> (S. Odenbreit)
J99(<i>sabA</i>)	<i>sabA</i> :: <i>kan</i> [131]
J99(<i>babA/sabA</i>)	<i>babA</i> :: <i>cat</i> , <i>sabA</i> :: <i>kan</i> [131]
CCUG17874	[27]
CCUG17874 (<i>alpAB</i>)	CCUG17874 transformiert mit pMu140a, <i>alpA</i> :: <i>cat</i> (S. Odenbreit)
Hp Δ 5' <i>babA</i>	<i>H. pylori</i> 26695 transformiert mit pKE5, Δ <i>hp1243</i> , Kan ^R
Hp <i>babA</i> *	<i>H. pylori</i> Hp Δ 5' <i>babA</i> transformiert mit pKE10, Cam ^R
Stammsammlung	200 klinische, nicht näher charakterisierte <i>H. pylori</i> -Stämme, die aus menschlichem Biopsiematerial isoliert wurden

1.3 Plasmide und Vektoren

pBluescript II KS+	<i>ori</i> _{colE1} , <i>ori</i> _{f1(+)} , <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse-Primerbindungsstellen, Amp ^R (Stratagene)
pBluescript II SK+	<i>ori</i> _{colE1} , <i>ori</i> _{f1(+)} , <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse-Primerbindungsstellen, Amp ^R (Stratagene)

pCR2.1-TOPO	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/reverse- und T7-Promotor-Primerbindungsstellen, Amp ^R , Kan ^R (Invitrogen)
pMCL200	<i>ori_{P15A}</i> [156]
pET-SH3	<i>ori_{colE1}</i> [104]
pDH80	pHel2 mit <i>gfp</i> , Cam ^R [95]
pKE5	pBluescript II KS+ mit <i>babA-upstream</i> -Region (SO108/SO109) und 3' <i>hp1243</i> (SO106/SO107), Kan ^R
pKE10	pBluescript II SK+ mit 3' <i>hp1243</i> (SO106/SO123), 5' <i>jhp833</i> (SO121/SO122) und <i>hp1243-upstream</i> (SO108/SO109), Cam ^R
pKE19	<i>gfp</i> mit <i>flaA</i> -Promotor aus pDH80 (<i>EcoRI</i>) in pMCL200
pKE20	<i>babA</i> -AIDA Fusion, SO126/SO127, <i>jhp833</i> (Codon 61-423)
pKE21	<i>babA</i> -AIDA Fusion, SO126/SO128, <i>jhp833</i> (Codon 61-630)
pKE22	<i>babA</i> -AIDA Fusion, SO126/SO129, <i>jhp833</i> (Codon 61-915)
pKE23	<i>babA</i> -AIDA Fusion, SO126/SO130, <i>jhp833</i> (Codon 61-1086)
pKE24	<i>babA</i> -AIDA Fusion, SO126/SO131, <i>jhp833</i> (Codon 61-1332)

1.4 Oligonukleotide

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

Name	Sequenz (5' → 3')	Determinante
SO106	GATCATCGATGTCGACAGCTGGCACTGGTGGCAC	3' <i>babA</i> (+)
SO107	GATCGAGCTCCATGAATTTAGAGACGAG	<i>babA</i> -downstream(-)
SO108	GATCCTCGAGGTGTGCTTTATAGATGC	<i>babA</i> -upstream(+)
SO109	GATCATCGATTGGATTAAATTGGATTTAGTAT	<i>babA</i> -upstream(-)
SO117	CGGAATTCGGAAGCGAAAGTTTGAGTGGT	3' <i>babA</i> (-)
SO119	CCATCGATGTTAATCCGCCATATTGTGT	<i>cat</i> (+)
SO120	GATCCTGCAGAATTACGCCCCGCCCTGCCA	<i>cat</i> (-)
SO121	GATCCTGCAGTCCAAAAAGGAGAAAACATG	5' <i>babA</i> (+)
SO122	GATCGTCGACGGGTTGTTGCATGTGGCTAA	5' <i>babA</i> (-)

SO123	GATCGAGCTCGCTAACGCAATCCCGCCAAA	3'babA(-)
SO126	GATCTCTAGAGAAGACGACGGCTTTTACAC	3'babA(+)
SO127	GATCGGATCCGATGGTCTTTGAAGAGATGCT	3'babA(-)
SO128	CATCGGATCCTGAGCATGTGTAAGTATAGGT	3'babA(-)
SO129	GATCGGATCCACTATTACTAGCATGGAAATA	5'babA(-)
SO130	GATCGGATCCGCCATTGTTATTGCCTACCGG	5'babA(-)
SO131	GATCGGATCCGGAAGCGAAAGTTTGAGTGGT	5'babA(-)
KE1	GATCATCGATCCTTCAACAGATCCGAGATT	cat(+)
KE4	GATCGAATTCTATATCAACGGTGGTATATC	cat(-)
KE5	GATCCTCGAGTGTCGGCAGAATGCTTAATG	cat(+)

1.5 Zellkulturmedien und -puffer

PBS PBS Dulbecco's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat

RPMI RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

Alle Zellkulturlösungen und Medien wurden von Invitrogen bezogen.

1.6 Nährmedien und Puffer für Bakterien

LB-Flüssigmedium 20 g/l Lennox-L-Medium, autoklaviert

LB-Platten 32 g/l Lennox-L-Agar, autoklaviert

AIDA-Medium LB-Flüssigmedium, Ampicillin (50 µM), EDTA (10 µM), β-Mercaptoethanol (10 mM), Induktion mit 1 mM IPTG

Serumplatten 36 g/l GC-Agar-Base, autoklaviert, Zusatz von 10 ml Vitamin-Mix, 80 ml Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim, 1 mg/l Nystatin

Vitamin-Mix 100 g/l α-D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein
0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l Nicotinamidadenindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12,

	1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil
Brucella-Medium	28 g/l Brucella Broth
Einfriermedium	
für <i>H. pylori</i>	Brucella-Medium, 20% Glycerin, 10% FCS
für <i>E. coli</i>	LB-Medium, 20% Glycerin
PBS	0,2 g/l KCl, 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5

1.7 Antibiotika und Zusätze in Selektivplatten und -medien

Ampicillin (Amp)	100 mg/l
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/l (LB-Medium/-Platten) 6 mg/l (Serum-Platten)
Kanamycin (Kan)	50 mg/l (LB-Medium/-Platten) 8 mg/l (Serum-Platten)
IPTG	100 µM (LB-Platte)
X-Gal	40 mg/l (LB-Platte)

1.8 Puffer und Lösungen

1.8.1 Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

TFB I	30 mM K-Acetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 15% Glycerin, pH 5,2 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, sterilfiltriert
TFB II	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15% Glycerin, pH 6,5 mit KOH eingestellt, sterilfiltriert

1.8.2 Puffer und Lösungen für Dot Blots

TBS-DB	150 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH 7,5
PBS-DB	8,5 g/l NaCl, 0,77 g/l NaH ₂ PO ₄ , 4,84 g/l Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O
Blockingpuffer	TBS-DB, 5% BSA, 0,1% CaCl ₂ , 0,1% MgCl ₂
Waschpuffer	TBS-DB, 0,05% Tween 20, 0,1% CaCl ₂ , 0,1% MgCl ₂

1.8.3 Puffer und Lösungen für DNA-Präparationen

STET-Puffer	8% Saccharose, 5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml in STET-Puffer
TE _{100/100}	100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 100 mM EDTA
TE _{10/1}	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA,
CsCl-Lösung	1 g/ml CsCl in TE-Puffer
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA

1.8.4 Puffer für DNA-Gelelektrophorese

TAE-Puffer	4,84 g/l Tris-Base, 1,14 ml/l Eisessig, 1 mM EDTA
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser
Ethidiumbromidfärbebad	1 mg/l Ethidiumbromid in Wasser
Methylenblaulösung	1 g/l Methylenblau in Wasser
GEBS-Puffer	20% Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,5% N-Laurylsarkosin

1.8.5 Puffer für Enzymreaktionen

10x A-Puffer (Roche)	330 mM Tris-Acetat, 100 mM Magnesiumacetat, 660 mM Kaliumacetat, 0,5 mM DTT, pH 7,9
10x B-Puffer (Roche)	100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0

10x H-Puffer (Roche)	500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 10 mM DTE, pH 7,5
10x M-Puffer (Roche)	100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 500 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7,5
10x L-Puffer (Roche)	100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, pH 7,5
10x Ligase-Puffer	660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5

1.8.6 Puffer für DNA-Markierungen und DNA-DNA-Hybridisierungen

Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungspuffer	1 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,5
20x SSPE	3,6 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 20 mM EDTA, 0,21 M NaOH

ECL-Kit™ (Amersham):

Hybridisierungspuffer	Hybridisierungslösung mit 500 mM NaCl und 5% Blockierungsreagenz
Primärer Waschpuffer	0,5x SSPE, 6 M Harnstoff, 4% SDS
Sekundärer Waschpuffer	2x SSPE
Detektionslösung	Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt

Hybridisierungslösung, Blockierungsreagenz und Lösungen 1 und 2 sind im Kit enthalten.

1.8.7 Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

2x SDS-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau,
Acrylamidlösung	29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
Coomassie-Färbelösung	0,275% Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% Methanol, 10% Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	10% Methanol, 10% Ethanol, 7,5% Essigsäure
TBS	150 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7,5
TTBS	TBS, 0,5% Tween 20
Western-Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3
Detektionslösung	0,1 M Tris-HCl, 7 mM MgCl ₂ , 0,1 g/l NBT, 50 mg/l BCIP, pH 9,6
Absättigungspuffer	TBS, 3% BSA

1.8.8 Puffer und Lösungen für IL-8 ELISA

ELISA-Puffer	PBS, 0,05% Tween 20
Blockierungspuffer	PBS, 10% FCS

1.8.9 Lösung für Immunfluoreszenz-Mikroskopie

PFA-Lösung	4% PFA in PBS
Absättigungslösung	PBS, 0,2% BSA

1.9 Antikörper

1.9.1 Primäre Antikörper

α -CagA (AK257)	Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale CagA-Hälfte von Hp185-44 (Kaninchen) [165]
------------------------	---

α -AlpA (AK 214)	Polyklonales Antiserum gegen ein AlpA-Fusionsprotein (Hp912) (Kaninchen) [167]
α -AlpB (AK 262)	Polyklonales Antiserum gegen ein AlpB-Fusionsprotein (Hp913) (Kaninchen) [167]
α -BabA (AK 277)	Polyklonales Antiserum gegen ein BabA-Fusionsprotein (Hp1243) (Kaninchen) [164]
α -BabB (AK 276)	Polyklonales Antiserum ein BabB-Fusionsprotein (Hp896) (Kaninchen) [164]
α -BabC (AK 275)	Polyklonales Antiserum gegen ein BabC-Fusionsprotein (Hp317) (Kaninchen) [164]
α -SabA (AK 278)	Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale SabA-Hälfte (Hp725) (Kaninchen) (S. Odenbreit)
α -OipA (AK 282)	Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale OipA-Hälfte (Hp638) (Kaninchen) (S. Odenbreit) [115]
α -HP 227 (AK 281)	Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale Hälfte von Hp227 (Kaninchen) (S. Odenbreit)
α -Le ^x	Monoklonaler Antikörper gegen humanes CD15 Klon C3D-1 (Maus) (Dako)
α -IL-8 (G265-3)	Monoklonaler Antikörper (IgG _{2b}) gegen humanes IL-8 (Maus) (Pharmigen)

1.9.2 Sekundäre Antikörper

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

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

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

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

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

1.10 Enzyme und Proteine

AP-gekoppeltes Protein A (Sigma), Collagen IV (Sigma), Expand Taq Polymerase (Roche), Fötale Kälberserum (FCS) (PAA), Gal α 1-3GalNAc-HSA (Glycorex), humanes Fibronectin (Sigma), humanes IL-8 (Pharmingen), humanes Placentaminin (Sigma), humanes Serumalbumin (HSA) (Sigma), Lewis^B-HSA (Glycorex), Lactoferrin aus humaner Milch (Sigma), Lysozym (Roche), Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppeltes Streptavidin (Dako), Pferdeserum (Invitrogen), Proteinase K (Merck), Restriktionsenzyme (Roche), Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma), RNase (Qiagen), StreptAB-Komplex/AP (alkalische Phosphatase) (Dako), T4-DNA-Ligase (Roche), 10x Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen)

1.11 Molekulargewichtsmarker

DNA-Gelelektrophorese: Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas)

Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Prestained Low Range (Bio-Rad)
Prestained High Range (Bio-Rad)

1.12 Chemikalien

Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30%) (Roth), Agarose (Sigma), Ampicillin, 5-Brom-3-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz (BCIP) (Roth), Bromphenolblau (Serva), Brucella-Medium (Becton Dickinson), Chloramphenicol, Coomassie Brilliant Blue R 250 (Biomol), Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-)Mix (MBI Fermentas), Dithiothreitol (Pierce), EDTA, Ethidumbromid (Sigma), Entellan™ (Merck), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) (Fluka Chemie), Fluoroprep™ (BioMerieux), Formalin 37%, GC-Agar (Remel), Gentamicin, Glutaraldehyd 25%, Kanamycin, Lennox-L-LB-Agar (Invitrogen), Lennox-L-LB-Medium (Invitrogen), Leupeptin, Methyleneblau, N, N, N', N'-Tetramethyldiamid (TEMED) (Sigma),

Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT) (Roth), Nystatin, Paraformaldehyd (PFA), PBS (Dulbecco's), RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin (Invitrogen), SDS, Sephadex G-50 (Pharmacia), Sulfo-SBED (Pierce), 5-(und 6-) Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) (Invitrogen), Tetracyclin, Trimethoprim, TritonX-100, Tween 20, Vancomycin, X-Gal (Sigma)

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

1.13 Hilfsmittel

Dialyseschläuche (Medicell), Einfrierröhrchen (Nalgene), Elektroporationsküvetten (Eurogentec), ELISA Maxisorp™ Platten (Nunc), Filterpapiere (Whatman), Highbond™-Membran, Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schüll), 0,2 µm-Sterilfilter (Josef Peske GmbH), Quick-Seal™-Röhrchen (Beckmann), Röntgenfilme (Fuji), Zellkulturflaschen/-schalen (Nunc), Zellschaber (Falcon)

1.14 Geräte und Apparaturen

Agarosegelkammern (Bio-Rad), Anaerobentöpfe (Fritz Gössner GmbH), Brutschränke (Binder, Scholzen), Fluoreszenzmikroskop DM RD mit Digitalkamera (Leitz), ELISA-Reader (Tecan), Gefriertruhe (Heraeus), Gene Pulser™ (Bio-Rad), Heizblöcke (Techne), Hybridisierungsofen (Bachofer), konfokales Laserscanning-Mikroskop (Leica), Kühlschrank (Liebherr), Magnetrührer (Heidolph), Mikrowelle (AEG), Mini-Protean III™ Apparaturen für PAGE (Bio-Rad), PCR-Gerät (PerkinElmer), pH-Meter (WTW), Photometer (Hach), Rollmischer (Assistent), Expositionskassetten für Röntgenfilme (Kodak), Schüttelinkubatoren (GFL), Schüttler (Eppendorf), Spannungsquellen (Biotec Fischer, Delta Elektronika), Speed-Vac (Savant), Sterile Werkbank (BDK), Ultraschallgerät (Branson), UV-Transluminator (Kaiser), Video-Geldokumentationsanlage (Bio-Rad), Vortex (Scientific Industries), Waagen (Fischer), Wasserbäder (GFL), Western Blot-Apparatur (Biotec Fischer), Zentrifugen (Heraeus, Beckman, Sorvall), Fluoreszenzscanner FLA 3000 (Raytest)

2 Methoden

2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

2.1.1 Kultur von AGS-Zellen

AGS-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine konfluent gewachsene Kultur wurde mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt, einige Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde durch Zugabe von 2 ml RPMI-Medium die Protease inhibiert. 1 ml der Zellsuspension wurde mit 10 ml PBS in eine neue Zellkulturflasche überführt oder in geeigneter Verdünnung in Well-Schalen ausgesät.

2.1.2 Infektion von AGS-Zellen mit *Helicobacter pylori*

AGS-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 80-100% in einer 96-Well-Schale in RPMI-Medium angezüchtet. Kurz vor dem Infektionsexperiment wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die Infektion erfolgte durch Zugabe von *Helicobacter pylori*-Suspension in die einzelnen Näpfe der 96-Well-Schale zu einer End-OD von 0,1 im Well. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand nach Zentrifugation (12000 g, 5 min) abgenommen und die in den Überstand sekretierte Menge an IL-8 mittels Sandwich-ELISA bestimmt (siehe 2.4.5).

2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1 Kultivierung von *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori wurde auf Serumplatten oder antibiotikahaltigen Serumplatten unter mikroaerophilen Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) für ein bis zwei Tage im Brutschrank oder in Anaerobentöpfen bei 37°C inkubiert.

Stämme aus Gefrierkultur (-70°C) wurden nach dem Ausstreichen auf Serumplatten für drei Tage inkubiert. Nach Überimpfen auf neue Platten wurden sie nach einer weiteren Bebrütungszeit von einem Tag für Experimente eingesetzt.

Für Flüssigkulturen wurde FCS-haltiges (10%) Brucella-Medium verwendet.

2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurden Luria-Bertani-(LB)-Platten benutzt, die bei Bedarf entsprechende Antibiotika enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Bestimmung der optischen Dichte von Flüssigkulturen

Die Bakterien wurden mit einem Wattestäbchen von der Platte abgenommen und im gewünschten Medium resuspendiert. Die optische Dichte wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550\text{nm}$ (OD_{550}) gegen das unbeimpfte Medium gemessen (linearer Bereich 0,05-0,3).

2.2.4 Transformation von *E. coli*

2.2.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Wie von Hanahan [85] und Messing [148] beschrieben, wurden zur Herstellung kompetenter Zellen für die chemische Transformation 100 ml LB-Medium mit 5 ml Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD_{550} von 0,5-0,6 inkubiert. Nach einer 5 min Lagerung auf Eis wurde der Ansatz bei 2200 g und 4°C 15 min zentrifugiert, das erhaltene Pellet in 20 ml TFB I resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert, in 4 ml TFB II aufgenommen und 15 min auf Eis gekühlt. Abgefüllt in Aliquots von 50 μl wurden sie auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

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

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 2 μl Plasmid-DNA versetzt. Nach einer 30 min Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen 90 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und anschließend eine Minute auf Eis gelagert. Zu dem Transformationsansatz wurden 500 μl LB-Medium zugegeben und

die Zellen zur Ausbildung der Resistenz eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Danach wurden 50 µl des Ansatzes auf entsprechenden Selektiv-LB-Platten ausplattiert, der Rest bei 2500 g zentrifugiert, das Bakterienpellet in 50 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Liter LB-Medium wurde mit 10 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (2200 g, 15 min, 4°C), das Zellpellet in einem Liter eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert, die Zellen erneut zentrifugiert und anschließend mit 20 ml eiskalter Glycerinlösung (10%) gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien in einem Gesamtvolumen von 3-4 ml Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots zu je 40 µl auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.4.4 Elektroporation von *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 0,8-1 µl DNA gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mittels des Gene Pulser™ Geräts bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 220 Ohm durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml LB-Medium suspendiert und zur Expression der Resistenz 1 h lang bei 37°C geschüttelt, bevor Aliquots des Transformationansatzes auf LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.4.5 Transformation superkompetenter *E. coli* TOP10-Zellen

Falls eine erhöhte Transformationseffizienz erwünscht war, wurden käufliche superkompetente *E. coli* TOP10-Zellen (Invitrogen) verwendet.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec erfolgte erneute Lagerung auf Eis für 1 min. Anschließend wurde 250 µl LB-Medium zugegeben, die

Zellen 1 h bei 37°C geschüttelt und in verschiedenen Verdünnungen auf Selektivplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.5 Transformation von *H. pylori*

2.2.5.1 Transformation von *H. pylori*

Zur Transformation wurden die Bakterien in Brucella-Medium mit 10% FCS suspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 0,2 eingestellt. Jeweils 1 ml der Suspension wurde in ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einer Stunde wurden 1-3 µg DNA zugegeben, die aufgrund der natürlichen Transformationskompetenz von *H. pylori* aufgenommen wurden. Nach Inkubation weiterer 6-8 h wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltigen Serum-Selektionsplatten ausplattiert und 5 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Dot Blot-Versuch

Der Dot Blot-Versuch nach Walz [239] ermöglicht die Untersuchung verschiedener *H. pylori*-Stämme in Bezug auf ihr unterschiedliches Adhärenzverhalten an definierten Antigenen, die punktförmig auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht wurden.

Hierzu wurden Fibronectin, Lactoferrin, HSA, Collagen IV, Lewis^b-HSA und Gal α 1-3 GalNAc α -HSA in einer Konzentration von 1 µg/µl auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht. Die Membran (2,5 x 2,5 cm²) wurde kurz in TBS-DB geschwenkt und anschließend 1,5 h bei 4°C in 2,5 ml Blockingpuffer gelagert.

1 ml einer Bakteriensuspension mit der OD von 6 wurde mit 10 µl einer 1% FITC-DMSO-Lösung 30 min inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Bakterien (2500 g, 4 min) erfolgten drei Waschschrte mit PBS-DB. Die Bakterien wurden in 0,5 ml Blockingpuffer suspendiert und zu der vorbehandelten Membran gegeben. Nach 1 h Inkubation folgten drei Waschschrte mit je 7 ml Waschpuffer.

Die Membran wurde getrocknet und das Bindungsmuster der FITC-markierten, adhärennten Bakterien mit dem Fluoreszenzscanner FLA 3000 dokumentiert.

2.2.7 Induktion *aida*-exprimierender *E. coli*

20 ml AIDA-Medium wurde mit einer Kolonie Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. 40 ml AIDA-Medium wurde mit 750 µl der Übernachtskultur versetzt und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6 inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 40 µl 1 M IPTG. Nach Inkubation von 1 h wurden die Bakterien zentrifugiert (2200 g, 10 min), geerntet und in PBS suspendiert.

2.3 Arbeiten mit DNA

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der Koch-Methode [98]

Nach Suspension von Zellmaterial einer Impföse in 300 µl STET-Puffer erfolgte Zugabe von 15 µl Lysozymlösung und eine 5 minütige Inkubation auf Eis. Durch einminütiges Kochen bei 100°C wurden die Zellen lysiert und anschließend bei 12000 g 10 min zentrifugiert um chromosomale DNA abzutrennen. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der wässrige Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde mit 200 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde 10 min bei 12000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen. Die ausgefällte DNA wurde lyophilisiert und in 50 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.3.1.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit™

Die Reinigung und Anreicherung von Plasmid-DNA, z.B. für Sequenzierungen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit™ von Qiagen nach beiliegender Gebrauchsanleitung.

2.3.2 Präparation chromosomaler DNA aus *H. pylori*

2.3.2.1 Isolierung chromosomaler DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit™

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori* erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit™ von Qiagen.

Das Zellmaterial einer Impföse wurde in 180 µl Puffer ATL suspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K-Lösung erfolgte die Inkubation der Zellen bei 56°C bis zur vollständigen Lyse. Danach wurde der Ansatz mit 200 µl Puffer AL versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl absolutem Ethanol wurde die Probe in eine Qiagen-Säule gefüllt und 1 min bei 6000 g zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säule mit jeweils 500 µl AW1 und AW2 Puffer gewaschen. Nach Zugabe 150 µl sterilem Wasser erfolgte Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur, die Säule wurde bei 6000 g 1 min zentrifugiert und die DNA in einem sterilen Eppendorfgefäß aufgefangen.

2.3.2.2 Isolierung chromosomaler DNA mittels Ethidiumbromid-Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation [124]

Die EtBr-CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ist eine effiziente Methode zur Gewinnung sehr reiner chromosomaler DNA in größerem Maßstab und ist deshalb für die Gewinnung von DNA für Southern-Blots geeignet.

Bakterien von zwei Serumplatten wurden mit einem sterilen Wattestäbchen in 1 ml TE_{100/100}-Puffer suspendiert. Durch Zugabe von 50 µl Lysozymlösung, Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur und Zugabe von 100 µl einer 10% N-Laurylsarkosinlösung erfolgte Zellyse. Der aufgeklärten Lösung wurden 1,5 ml TE_{100/100}-Puffer und eine Spatelspitze Proteinase K zugefügt. Nach Inkubation für 2 h bei 60°C wurde der Ansatz mit 2,6 g CsCl versetzt und bei 60°C inkubiert, um eine vollständige Lösung des Cäsiumchlorids zu erhalten. Die Lösung wurde mit 40 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und in ein Beckmann Quick-Seal™-Röhrchen gefüllt. Nach Verschweißen des Röhrchens wurde über Nacht bei 100000 g zentrifugiert. Die unter UV-Licht (260 nm) sichtbare chromosomale DNA wurde mit Hilfe einer Kanüle durch das Röhrchen abgezogen. Die Extraktion des Ethidiumbromids erfolgte durch mehrmaliges Ausschütteln mit Isobutanol. Die farblose Lösung wurde zur Entfernung des Cäsiumchlorids gegen TE_{10/1}-Puffer dialysiert.

2.3.3 DNA-Gelelektrophorese [193]

Für die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agaroseflachbettgele (11,5 x 15 cm²) mit einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 1,5% je nach gewünschtem Auftrennungsbereich eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit ¼ Volumen GEBS-Puffer versetzt. Als Gel- und Laufpuffer diente TAE-Puffer. Nach der Auftrennung bei 65 V wurden die DNA-Banden in einem Ethidiumbromidfärbebad angefärbt und waren anschließend unter UV-Licht (260 nm) sichtbar. Die Dokumentation erfolgte mittels eines Video-Systems der Firma Bio-Rad. Für präparative Zwecke war die Auftrennung analog, gegebenenfalls wurde für eine bessere Auftrennung die Dauer verlängert. Das Gel wurde mit einer 0,1% igen Methylenblaulösung angefärbt. Ein anschließendes Wasserbad entfärbte die Agarose weitgehend, die DNA-Banden blieben als blaue Banden sichtbar und konnten aus dem Gel ausgeschnitten werden.

Die Isolierung der DNA aus der Agarose wurde mittels des Ultra Clean™ 15 Kit von Mo Bio Laboratories durchgeführt (siehe II 2.3.4).

2.3.4 DNA-Fragmentisolierung

Um DNA-Fragmente nach einer präparativen Gelelektrophorese aus dem Agarosegel herauszulösen, wurde das Ultra Clean™ 15 Kit von Mo Bio Laboratories herangezogen.

Das Agarosestück mit der zu isolierenden DNA wurde in 600 µl NaI-Lösung (6 M) bei 60°C aufgelöst und anschließend mit 7 µl Ultra Bind versetzt. Die Bindung der DNA an die Silica-Matrix erforderte 15 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Glasmilch wurde durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert und mehrmals mit Ultra Wash gewaschen. Die DNA wurde von der Matrix durch Versetzen des Ansatzes mit 50 µl bidestilliertem Wasser gelöst und nach Zentrifugation als Überstand erhalten.

2.3.5 Restriktionsverdau

Analytische DNA-Restriktionsverdauungen wurden in einem Ansatz von 15 µl mit Restriktionsenzymen und dem dazu passenden Puffer von Roche durchgeführt. DNA

wurde in einer Menge von 0,1-1 µg mit einer Enzymmenge von etwa 1-2 U/µg DNA versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Präparative Restriktionsverdauere erfolgten in einem Volumen von 50 µl bei einer DNA-Menge von 3-5 µg DNA 3 h lang.

Durch Zugabe von ¼ Volumen GEBS-Puffer wurde der Verdau durch Inaktivierung der Enzyme gestoppt.

Um bei einer Ligation eingesetzt werden zu können, wurden die Fragmente einer Reinigung über ein präparatives Agarosegel (siehe II 2.3.3) oder einer Zentrifugationsentsalzung (siehe II 2.3.6) unterzogen.

2.3.6 Zentrifugationsentsalzung

Die Zentrifugationsentsalzung wurde als ausschlusschromatographisches Verfahren zur schnellen Abtrennung von Salzen, Nukleotiden, denaturierten Proteinen und kleinen DNA-Fragmenten eingesetzt.

Als Säule dienten 1,5 ml Eppendorfggefäße, deren Boden mit einer Kanüle perforiert und anschließend mit 20 µl silikonisierten Glasperlen und 1,5 ml Sephadex G-50 (in wässriger Lösung) gefüllt worden waren.

Zur Äquilibrierung wurde die Säule zentrifugiert (1300 g, 2 min) und mit 100 µl destilliertem Wasser gewaschen. Die zu entsalzende Probe wurde auf die Säule aufgetragen und nach erneuter Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen in ein frisches Eppendorfggefäß eluiert.

2.3.7 Ligation

Die geschnittene Vektor-DNA wurde mit einem 4-fachen Überschuss an Insert-DNA, 1,2 µl 10x Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase versetzt.

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 12 µl bei einer Temperatur von 4°C über Nacht.

2.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [189]

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur effizienten Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte eingesetzt, die zur Klonierung oder zur Sequenzierung benötigt wurden.

Oligonucleotide, die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, dienen als Primer für die hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase).

Als Matrize wurde chromosomale DNA (1:25 verdünnt) oder Plasmid-DNA (1:100 verdünnt) eingesetzt. Puffer, DNA-Polymerase, dNTPs wurden aus dem Expand High Fidelity Systems von Roche verwendet.

Pro 100 µl Ansatz wurden 2 µl verdünnte DNA, je 100 pmol Oligonucleotide, je 20 nmol der vier Desoxynucleosid-Triphosphate und 2 U Taq-Polymerase verwendet.

Für die Amplifizierung wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

Die DNA-Doppelhelix wurde im ersten Schritt durch Erhitzen auf 94°C für 1 min in Einzelstränge zerlegt, an diese die Primer bei einer Absenkung der Temperatur auf 48-52°C (variiert je nach Primer) für 2 min hybridisierten. Die Polymerisation wurde bei 72°C durchgeführt, wobei die Länge dieses Schrittes von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes abhing.

Die Reaktion wurde nach 30 Zyklen abgebrochen. Die entstandenen PCR-Fragmente wurden nach Zugabe ¼ Volumens GEBS-Puffer mittels Agarosegel und Ultra Clean™ aufgereinigt.

2.3.9 Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning™

Der Vorteil der Ligation von PCR-Produkten mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor mittels des TOPO-TA-Cloning™-Kits (Invitrogen) liegt in der hohen Effizienz dieser Ligation auch bei sehr langen PCR-Produkten. Grund dafür ist die Sequenz-unspezifische terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase, welche bei jeder Kettenverlängerung Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt. Der linearisierte pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt einen überhängenden 3'-Desoxythymidin-Rest (T) und eine kovalent gebundene Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus, wodurch die effektive Ligation vermittelt wird.

Nach der Ligation erfolgte die Transformation in TOP10-Zellen. Unterschiedliche Aliquots wurden auf X-Gal-LB-Platten ausplattiert. Die erfolgreich transformierten Klone wurden nach der sogenannten Blau-Weiss-Selektion ermittelt, bei der jene Klone weiss erscheinen, deren *lacZ'*-Gen durch Insertion zerstört wurde. Dies verhindert die Bildung des Enzyms β -Galactosidase, das X-Gal in einen blauen Farbstoff umzuwandeln vermag.

2.3.10 DNA-Fällung mit Ethanol

Die Ethanolfällung wurde zur Aufkonzentrierung und Entsalzung DNA-haltiger Lösungen verwendet.

Die DNA-Lösung wurde mit einem Zehntel ihres Volumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung, dem 2,5 fachen Volumen Ethanol versetzt und anschließend 30 min bei -70°C inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 10 min) und einem Waschschrift mit Ethanol (70%) erfolgte die Lyophilisierung der DNA in einer Vakuumzentrifuge.

2.3.11 DNA-Sequenzierung

PCR-Produkte, deren Sequenz ermittelt werden sollte, wurden mittels TOPO-TA-Cloning™ in den TOPO-Vektor kloniert, transformiert und anschließend wurde das Plasmid mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit™ isoliert. Die mit Ethanol gefällte DNA wurde zu der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) geschickt.

2.3.12 DNA-DNA-Hybridisierungen [214]

Chromosomale DNA, die nach der EtBr-CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurde, wurde nach dem Restriktionsverdau auf einem TAE-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Gel wurde nach der fotografischen Dokumentation in 0,25 M HCl 15 min geschüttelt, was zu der Depurinierung der DNA führt. Es folgte Denaturierung der Doppelstrang-DNA durch je 2x 25 min Schütteln in Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer. Die DNA wurde mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Apparatur auf eine Highbond™-Membran transferiert (50 mbar, 1 h) und anschließend mit einem UV-Crosslinker mit 125 kJ/cm² kovalent an die Membran gebunden. Das Gel wurde während des

Blotvorgangs ständig mit 20x SSPE überschichtet. Die Membran wurde 1 h mit Hybridisierungspuffer bei 42°C abgesättigt.

Die Markierung der Sonden erfolgte nach der ECL-Methode von Amersham. Das DNA-Fragment, das im Southern Blot als Sonde dienen sollte, wurde über ein TAE-Gel gereinigt und aus der Agarose mittels Ultra Clean™ isoliert. 100 ng der DNA wurden im Wasserbad bei 100°C 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die kovalente Bindung der einzelsträngigen DNA mit Peroxidase erfolgte durch Zugabe von 10 µl Markierungsreagenz (im ECL-Kit™ enthalten), 10 µl Glutaraldehyd und Inkubation für 10 min bei 37°C.

Die abgesättigte Membran wurde über Nacht mit der markierten Sonde hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 20 min mit primärem Waschpuffer bei 42°C und zweimal 5 min mit sekundärem Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Membran wurde 1 min in der Detektionslösung (im ECL-Kit™ enthalten) geschwenkt, bevor sie in einer Filmkassette gegen einen Röntgenfilm exponiert wurde. Nach 2 bis 20 min, abhängig von der Stärke der Signale, wurde der Film entwickelt.

2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durch das Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt und nachfolgend färberisch oder mit Hilfe von spezifischen Antikörpern dargestellt werden [118].

Damit die Auftrennung ausschließlich nach der Größe erfolgt, werden die Proteine mit SDS, einem stark amphiphatischen Detergenz vorbehandelt, das die Proteine denaturiert und ihnen eine negative Ladung verleiht.

2.4.1.1 Probenvorbereitung

Um Bakterienlysate herzustellen, wurde Zellmaterial einer halben Serumplatte in 300 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min auf 95°C erhitzt. Die Lysate wurden bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.4.1.2 Durchführung der Gelelektrophorese

SDS-Gelelektrophoresen wurden mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-Protean III™ von Bio-Rad durchgeführt. Aus einer 30% Acrylamidlösung wurden standardmäßig 8-10% Trenngele und 5% Sammelgele nach Sambrook gegossen [193].

5 µl der mit SDS-Probenpuffer versetzten Bakterienlysate wurden auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 130 V circa 90 min. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend entweder nach dem Semi-dry Verfahren auf eine Membran übertragen (siehe 2.4.2.1) oder die Proteine wurden direkt im Gel mit Coomassie für 15 min angefärbt und fixiert. Entfärben des Gels erfolgte mit Coomassie-Entfärber, wodurch die Proteinbanden sichtbar wurden.

2.4.2 Western Blot

2.4.2.1 Semi-dry-Blot nach Towbin [226]

Nach Towbin *et al.* erfolgt der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran nach einem Semi-dry-Verfahren unter Verwendung zweier Graphitelektroden.

Dazu wurden auf die Graphitanode vier in Western-Transferpuffer getränkte Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran gelegt. Das SDS-Gel wurde nach Abtrennung des Sammelgels auf die Nitrocellulosemembran gebettet. Um einen ungehinderten Stromfluß zu gewährleisten wurden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt. Den Kontakt zwischen Gel und Graphitkathode stellten vier in Western-Transferpuffer getränkte Filterpapiere her. Der Proteintransfer erfolgte bei 1 mA/cm² für eine Stunde.

Nach einer dreißigminütigen Absättigungsphase der Membran mit 5 ml TBS/3%BSA, erfolgte Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht, indem das jeweilige Antiserum je nach Titer in einer Verdünnung von 1:3000 bis 1:5000 zugegeben wurde.

Dreifaches Waschen der Membran mit TTBS für je 5 min entfernte nicht gebundenes Antiserum. Die Membran wurde eine Stunde mit einem Konjugat aus Protein A und alkalischer Phosphatase oder einem Peroxidase-gekoppeltem sekundären Antikörper in TTBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS erfolgte Detektion der Proteine.

Wurde als sekundärer Antikörper das Protein A-Konjugat gewählt, erfolgte die Detektion der Proteine mit Hilfe der unter II 1.8.7 beschriebenen Detektionslösung.

Schwach produzierte Proteine wurden mit POX-gekoppelten Antikörpern und dem Western Lightning™-Detektionsreagenz für Western Blot von Perkin Elmer Life Sciences über Chemilumineszenz detektiert.

Die Chemilumineszenz der Proteinbanden führt zu einer Belichtung der entsprechenden Bereiche eines aufgelegten Röntgenfilms in einer lichtundurchlässigen Expositions-kammer. Diese belichteten Bereiche wurden durch anschließende Entwicklung des Films als schwarze Banden sichtbar. Je nach Stärke der Chemilumineszenz beträgt die Belichtungszeit zwischen 30 und 60 sec.

2.4.3 Verdau von Oberflächenproteinen mit Trypsin

Die Bakterien wurden von einer Platte abgenommen und in PBS suspendiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, versetzt mit 0,05% Tween 20, wurde die OD₆₀₀ auf 0,5 in PBS eingestellt. 200 µl Bakteriensuspension wurde mit 50 µg /ml Trypsinlösung in PBS versetzt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Um den Verdau zu stoppen erfolgte Zugabe von 22 µl FCS. Die Suspension wurde 5 min zentrifugiert bei 5000 g und in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.4.4 Quervernetzung von Lactoferrin mit Sulfo-SBED

Zur Quervernetzung von Lactoferrin mit dem Lactoferrin-Rezeptor auf der bakteriellen Oberfläche wurde das Pro Found Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Kit™ der Firma Pierce verwendet.

500 µl Fibronectinlösung (1 µg/µl Fibronectin in Wasser) wurden mit 1 µl (äquimolare Menge) bzw. 5 µl (5 fache molarer Überschuss) Sulfo-SBED-Lösung (1 µg/µl DMSO) versetzt und 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgte Dialyse über Nacht gegen 4 l PBS und anschließend für 3 h gegen 300 ml Label Transfer Puffer™ (Pierce). 100 µl der quervernetzten Fibronectinlösungen wurden zu 1 ml Bakteriensuspension (*H. pylori* 26695, OD₅₅₀ 0,5) gegeben und im Dunkeln 60 min bei RT inkubiert. Das SBED-Konjugat wurde 15 min durch UV_{370nm} photoaktiviert. Um Hitzeentwicklung zu vermeiden, wurden die Ansätze auf Eis gekühlt. Nach

Zentrifugation (5 min, 3000 g) wurde das Pellet mit 20 µl PBS, 4 µl DTT und 24 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach 5 min Erwärmung auf 70°C wurden die Ansätze auf ein Gradientengel (4-20% Tris-HCl, Bio-Rad) aufgetragen. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Mit einem Streptavidin-POX-Konjugat und dem Western LightningTM-Detektionsreagenz für Western Blot von Perkin Elmer Life Sciences wurde der Biotin markierte Lactoferrin-Rezeptor über Chemilumineszenz detektiert (siehe II 2.4.2.1).

2.4.5 Sandwich-ELISA zur Quantifizierung von IL-8

Durch ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) können geringe Mengen an Proteinen mittels spezifischer Antikörper bestimmt werden [59]. Im Sandwich-ELISA [255] wird ein sogenannter Fangantikörper in den Polystyrolnäpfen einer Mikrotiterplatte immobilisiert, der das entsprechende Antigen, in diesem Fall IL-8, selektiv in einer komplexen Proteinlösung binden kann. Die Detektion erfolgt über einen direkt oder indirekt markierten Sekundärantikörper, der gegen ein anderes Antigenepitop als der Fangantikörper gerichtet ist.

50 µl des α -IL-8-Antikörpers G265-3 (3 mg/ml in 100 mM Na₂HPO₄, pH 9,0) wurden in die Näpfe einer 96-Napf-ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert. Über Nacht erfolgte die Bindung der Antikörper an die Unterlage der Platte bei 4°C. Die Platte wurde viermal mit ELISA-Puffer gewaschen und anschließend die freien Bindungsstellen mit 200 µl Blockierungspuffer 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl Zellüberstand in die Näpfe gegeben und über Nacht inkubiert. Als Standard diente rekombinantes humanes IL-8 in den Konzentrationen von 12,5 bis 800 pg/ml. Nach vierfachem Waschen wurden je 100 µl des Biotin-gekoppelten α -IL-8 Sekundärantikörper G265-8 (0,5 µg/ml in Blockierungspuffer) in die Näpfe gegeben und bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Das Streptavidin-Biotin-POX-Konjugat wurde mit 2 µl Lösung A, 2 µl Lösung B und 200 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) hergestellt und 30 min inkubiert. Die Platte wurde viermal gewaschen und jeder Napf mit 100 µl Konjugat versetzt und eine Stunde bei 37°C gelagert. Es folgte ein sechsfacher Waschschrift und die Zugabe von 50 µl Substrat zu jedem Napf. Nach einer exakten Reaktionszeit von 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 490 nm mit dem ELISA-Messgerät bestimmt.

2.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Ein Milliliter einer Bakteriensuspension in PBS (OD_{550} von 0,01) wurden in einen Napf einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben, auf dessen Boden ein Deckglas gelegt worden war. Anschließend wurden die Bakterien auf das Deckglas zentrifugiert (3000 g, 5 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit einer 4% PFA-Lösung auf dem Deckglas fixiert. Nach zweifachem Waschen mit je 1 ml PBS erfolgte Zugabe von 1 ml Absättigungslösung für 15 min. Auf Parafilm wurde der erste Antikörper in PBS suspendiert vorgelegt und das Deckglas mit der Bakterienseite nach unten auf den Antikörper gelegt. Nach einer Stunde Inkubation erfolgte dreimaliges Waschen in je 200 μ l PBS für je 5 min. Das Deckglas wurde auf einen 40 μ l Tropfen PBS gelegt, der den sekundären Antikörper, einen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper, enthielt. Nach einstündiger Inkubation wurde erneut mit PBS gewaschen. Das Deckglas wurde auf einem mit Fluoprep™ versehenen Objektträger fixiert. Die Fluoreszenz wurde nach Aushärten des Fluoprep™ unter dem Mikroskop betrachtet.

IV Ergebnisse

1 Vorarbeiten

Einige Adhäsine von *H. pylori* sind bereits näher charakterisiert worden. Für das Adhäsin BabA wurde das Blutgruppenantigen Lewis^b (Le^b) als Rezeptor identifiziert [102]. *H. pylori* CCUG17875 zeigte jedoch auch nach Mutagenese des *babA*-Gens Adhärenz an Magenbiopsiematerial von Patienten mit einer signifikanten Gastritis. Diese Tatsache ließ auf mindestens ein weiteres beteiligtes Adhäsins schließen. Als verantwortliches Protein konnte SabA identifiziert werden, welches sialylierte Lewis-Antigene auf der Epithelzelloberfläche erkennt [131]. Für die beiden Adhäsine AlpA und AlpB, die Adhärenz an eine humane Magenkarzinomzelllinie und Biopsieschnitte vermitteln [167], konnte bis heute noch kein Rezeptor identifiziert werden.

Um Interaktionen und funktionelle Zusammenhänge zwischen AlpAB, BabA und SabA näher zu untersuchen, wurde das Adhärenzverhalten des Modellstammes *H. pylori* J99 und einiger isogener Mutanten an Magenbiopsieschnitten von Dr. Stefan Odenbreit untersucht. *H. pylori* J99 zeichnet sich durch die Produktion eines aktiven BabA- und SabA-Adhäsins sowie der AlpAB-Proteine aus. Dazu wurden Fluoreszenzfarbstoff (TAMRA)-markierte Bakterien mit auf Objektträger aufgebrachtem Biopsiematerial inkubiert.

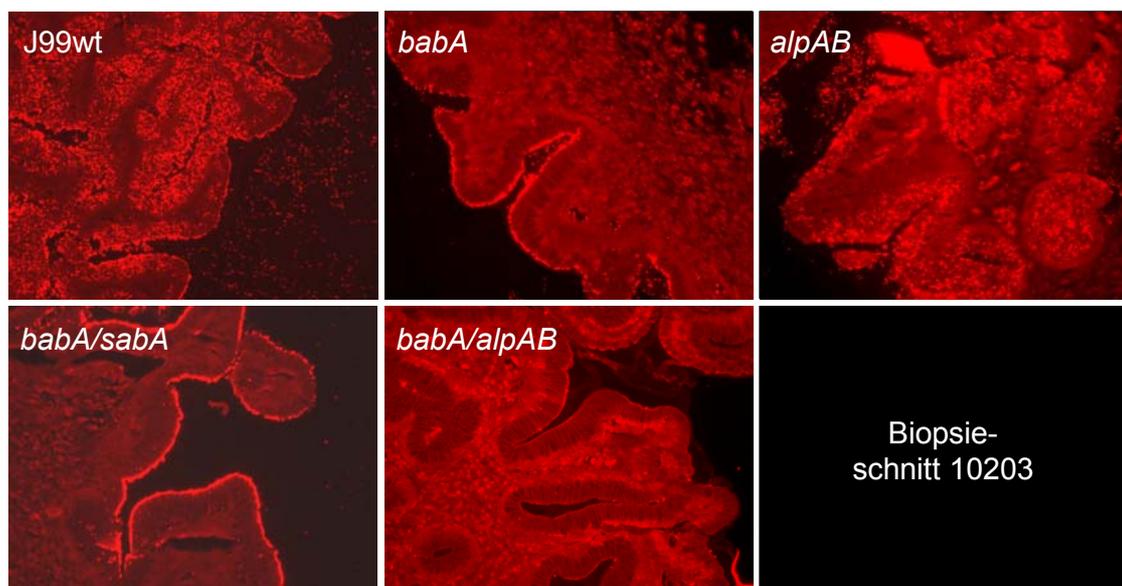


Abb. 5: Einfluss von BabA, SabA und AlpAB auf die Bindung von *H. pylori* J99 an Magenbiopsieschnitt 10203. Bindung von TAMRA-markierten Bakterien (J99wt, J99(*babA*), J99(*alpAB*), J99(*babA/sabA*), J99(*babA/alpAB*)) an Magengewebe eines Gastritispatienten nach Inkubation für eine Stunde.

Der Wildtypstamm zeigte ein Adhärenzverhalten, bei dem die Bakterien sowohl an der Epithelzelloberfläche, als auch über den gesamten Gewebeschnitt adhärten (J99wt) (Abb. 5). Nach Einführung einer *babA*-Mutation ging die über den Gewebeschnitt verteilte Bindung verloren, die Adhäsion an der Epithelzelloberfläche verstärkte sich (*babA*). Dieser Bindungsphänotyp wurde durch eine zusätzliche Mutagenese des *sabA*-Gens nicht verändert (*babA/sabA*). Wurden die beiden Gene *alpA* und *alpB* mutagenisiert, resultierte daraus ein Verlust der epithelialen Oberflächenbindung, die Adhärenz über die Schnittfläche blieb erhalten (*alpAB*). Eine zusätzliche *babA*-Mutation führte zum kompletten Adhäsionsverlust (*babA/alpAB*). Diese Ergebnisse ließen auf zwei unabhängig voneinander exprimierte Adhärenzphänotypen schließen, den BabA- und den AlpAB-spezifischen Bindungstyp. Obwohl es sich bei den Schnitten um Material aus Patienten mit Gastritis handelte, konnten keine SabA-abhängigen Bindungseigenschaften beobachtet werden. Aus diesem Grund erscheint die Aktivität mindestens eines weiteren Adhäsins plausibel, welches einen AlpAB-abhängigen Phänotyp aufweist.

Die beobachteten Bindungsphänotypen konnten unter Verwendung von Biopsiematerial weiterer Patienten mit unterschiedlicher Gastritisausprägung bestätigt werden (Tab. 1).

Tab. 1: Einfluss verschiedener Mutationen von *H. pylori* J99 auf die Adhärenz an Magenbiopsieschnitte verschiedener Spender

Biopsie-nummer	J99wt	(<i>babA</i>)	(<i>alpAB</i>)	(<i>babA/sabA</i>)	(<i>babA/alpAB</i>)
10203	+++	++	++/+++	++	-
10205	+++	++	++	++	-
10043	+++	+ / ++	+ / ++	++	-
11135	+++	- / +	+ / ++	+	-
11182	+++	++	n. b.	+	-
10142	++	-	+	- / +	-
3422	++	- / +	n. b.	- / +	-

Schnitte 10203 und 10205 stammen von Patienten mit einer signifikanten Gastritis; die anderen Biopsieproben aus Patienten ohne Gastritis. + bis +++: zunehmende Bindungsstärke; - / +: sehr schwache Bindung; -: adhärenzdefekt; n. b.: nicht bestimmt

2 Korrelationen des OMP-Produktionsprofils klinischer *H. pylori*-Isolate und ihren adhäsiven Eigenschaften

2.1 Anlegen einer *H. pylori*-Stammsammlung

In vorausgegangenen Arbeiten wurden überwiegend passagierte Laborstämme, wie z. B. *H. pylori* J99 und CCUG17875, auf Adhärenz untersucht. Die Expression der einzelnen Adhäsine in frischen klinischen Isolaten blieb jedoch unklar. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Produktion oben bereits beschriebener Adhärenz-assoziiierter Proteine von 200 klinischen *H. pylori*-Stämmen untersucht, die im Zuge einer Biopsie Patienten entnommen worden waren. Zusätzlich wurde die Produktion zweier Proteine, Hp227 und BabC, geprüft, die aufgrund von Sequenzhomologien zur Gruppe der Adhäsinfamilie gehören und damit in Zusammenhang mit Adhärenz interessant erschienen (vgl. Abb. 4).

Ziel dieser Arbeit war es, Adhärenzeigenschaften voneinander abzugrenzen, ihre Abhängigkeit voneinander zu definieren und eventuell neue Adhäsinkandidaten zu identifizieren.

In Vorarbeiten waren bereits *H. pylori*-Stämme aus Biopsiematerial von Patienten isoliert worden und standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. *H. pylori*-Isolate von 195 Patienten konnten unter Laborbedingungen rekultiviert werden (vgl. Tab. A1, VII 2). Da eine Mischinfektion einzelner Patienten mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen nicht auszuschließen war, wurden Einzelkolonien der entsprechenden Isolate weiterkultiviert und bei -70°C gelagert. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass für die anschließenden Experimente Reinkulturen zur Verfügung standen. Von 5 der 195 Patienten wurden je 2 Stämme kultiviert, so dass 200 klinische Isolate in späteren Experimenten untersucht wurden. Um statistische Aussagen treffen zu können, wurden die Patienten, aus denen die *H. pylori*-Stämme isoliert worden waren, nach Alter, Geschlecht und Biopsieindikation eingeteilt (Tab. 2).

Tab. 2: Einteilung der 195 Patienten nach Alter und Geschlecht sowie Biopsieindikation

Angaben zum Geschlecht	<10 Jahre	11-20 Jahre	21-50 Jahre	>50 Jahre	k. A.
insgesamt	25%	27%	11%	9%	28%
weiblich	53%	59%	62%	26%	
männlich	41%	26%	33%	68%	
k. A.	6%	15%	5%	6%	

Biopsieindikation bzw. Diagnose	<10 Jahre	11-20 Jahre	21-50 Jahre	>50 Jahre	k. A.
Gastritis	78%	79%	28%	41%	
bereits diagnostizierte <i>H. pylori</i> -Infektion	4%	6%	4%	-	
<i>Ulcus duodeni</i>	2%	-	10%	-	
<i>Ulcus ventriculi</i>	-	-	4%	-	
Magenkarzinom	-	-	14%	35%	
andere Gründe	8%	4%	11%	-	
k. A.	8%	11%	29%	24%	

k. A.: keine Angabe

Im Altersbereich 0-20 Jahre wurde die Biopsie in überwiegender Anzahl der Fälle aufgrund einer bereits diagnostizierten Gastritis durchgeführt. Mit zunehmendem Alter traten vermehrt Folgeerkrankungen wie Ulcus oder Magenkarzinom auf. Bis zu dem Alter von 50 Jahren überwog deutlich der Anteil weiblicher Patienten. Laut Literatur gibt es jedoch keinen Hinweis auf eine geschlechtsspezifische *H. pylori*-Infektion.

2.2 Analyse der Produktionsprofile mittels Immunoblot

Von den 200 klinischen Isolaten wurden Zelllysate angefertigt und anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Immunoblot wurde die Produktion von 8 äußeren Membranproteinen (OMPs) untersucht. Zusätzlich wurde CagA in diese Untersuchung aufgrund der besonderen klinischen Relevanz aufgenommen [22, 251].

In Abb. 6 sind auszugsweise Immunoblot-Ergebnisse der 9 untersuchten Proteine dargestellt.

Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich zeigen, dass sowohl das Produktionsprofil der einzelnen Proteine unter verschiedenen *H. pylori*-Stämmen, als auch Menge und Größe eines Proteins variieren können.

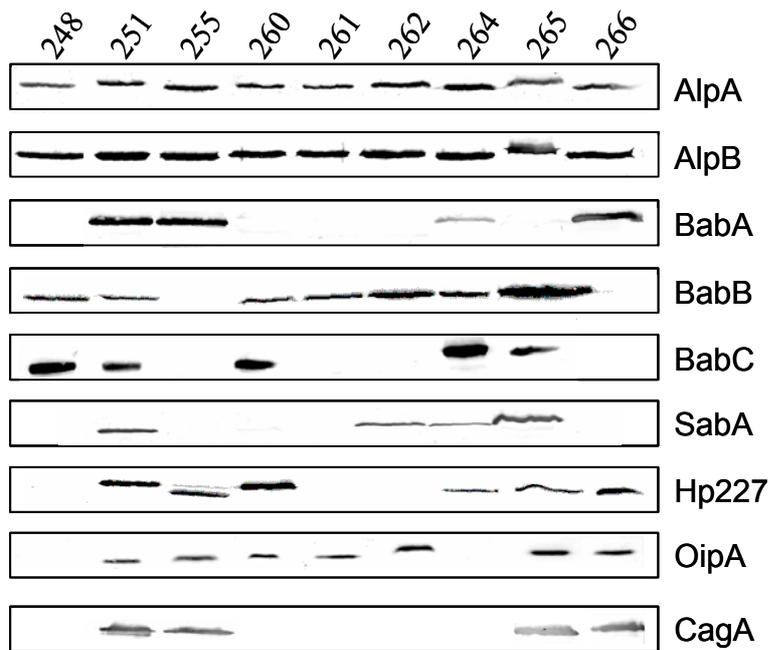


Abb. 6: Produktion von OMPs und CagA in 9 repräsentativ ausgewählten klinischen Isolaten. Nach Auftrennung der Zelllysate mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper detektiert.

In Tab. 3 ist die Produktion der einzelnen OMPs prozentual zusammengefasst. Von den 200 untersuchten *H. pylori*-Stämmen exprimierten alle die Gene *alpA* und *alpB*. Die Proteine BabA und BabB wurden von ca. 60% der Stämme produziert, BabC (35%) und das sialylbindende Adhäsins SabA (38%) von deutlich weniger Stämmen. Hp227, ebenfalls ein Mitglied der Adhäsinfamilie, wurde von 73% und CagA von 62% der untersuchten *H. pylori*-Stämme produziert.

Tab. 3: Prozentuale Produktion verschiedener äußerer Membranproteine und CagA von 200 klinischen *H. pylori*-Isolaten

Hp-Nummer ¹	Jhp-Nummer ¹	HOP ²	Proteinname	Häufigkeit
912	848	C	AlpA	100%
913	849	B	AlpB	100%
1243	833	S	BabA	58%
896	1164	T	BabB	59%
317	-	U	BabC	35%
725	662	P	SabA	38%
227	212	M/N	-	73%
638	581	H	OipA	68%
547	495	-	CagA	62%

¹ Nomenklatur nach Tomb *et al.* [225]; bezogen auf den Leserahmen von *H. pylori* 26695 (Hp) bzw. J99 (Jhp)

² HOP=*helicobacter outer membrane protein*; Nomenklatur nach Alm *et al.* [3], bezogen auf den Leserahmen von *H. pylori* J99

Um mögliche funktionelle Zusammenhänge zwischen verschiedenen OMPs bzw. CagA zu erkennen, wurde mit Hilfe des Programms Epi Statcalc Version 6 die Korrelation der Produktion der Proteine mittels Chi-Quadrat-Test untersucht. Drei Korrelationen erwiesen sich als hoch signifikant (Tab. 4). Die gleichzeitige Expression der Gene *babA* und *oipA* stellte dabei die einzige Korrelation unter den untersuchten äußeren Membranproteinen dar. Die fehlende Korrelation zwischen BabA, BabB und BabC trotz homologer Bereiche der N-Termini bestätigte die hohe Spezifität der Antikörper. Die Produktion des Effektorproteins CagA korrelierte mit den beiden äußeren Membranproteinen BabA und insbesondere OipA.

Tab. 4: Korrelation der Coexpression von *H. pylori*-Proteinen

	P-Wert	Odds ratio
BabA / OipA	$<10^{-7}$	6,41
OipA / CagA	$<10^{-7}$	68,25
BabA / CagA	$<10^{-7}$	6,85

Zur Beurteilung der Signifikanz wurde der P-Wert errechnet. P-Werte $p < 0,01$ wurden als statistisch signifikant erachtet, P-Werte $p < 0,005$ als hoch signifikant. Ein Odds ratio-Wert > 1 beschreibt das „Risiko“ einer Korrelation.

Bestimmte Proteine, wie z. B. CagA und BabA gelten als Risikofaktor für das Auftreten von Folgeerkrankungen einer *H. pylori*-Infektion. In dieser Untersuchung produzierten alle *H. pylori*-Stämme, die aus Patienten mit Magenkarzinom isoliert worden waren, BabA (n=9) (Tab. 5). Die isolierten Stämme produzierten zu je 78% SabA und OipA und zu 67% CagA. Nur 44% der Isolate exprimierten *babC*. Die aus Ulcus-Patienten isolierten Stämme, produzierten alle BabB (n=4). BabA, OipA und CagA wurden von je 50% produziert. Ein Viertel dieser Stämme exprimierten *sabA* und *babC*. Etwa die Hälfte der mit Gastritis assoziierten Stämme produzierten BabA, BabB, Hp227, OipA und CagA. Etwa ein Drittel produzierte die Proteine SabA und BabC.

Tab. 5: Korrelation der OMP-Produktion mit den Krankheitsbildern Magenkarzinom, Ulcuserkrankungen und Gastritis

	AlpA	AlpB	BabA	SabA	BabB	Hp 317	Hp 227	OipA	CagA
Magen-CA (n=9)	100%	100%	100%	78%	67%	44%	56%	78%	67%
Ulcuserkrankungen (n=4)	100%	100%	50%	25%	100%	25%	0%	50%	50%
Gastritis (n=26)	100%	100%	50%	31%	58%	35%	50%	54%	42%

Aufgrund der kleinen Anzahl an *H. pylori*-Stämmen, die mit Ulcuserkrankungen assoziiert waren, wurden *Ulcus duodeni* und *Ulcus ventriculi* zusammengefasst.

Da der überwiegende Teil der Stammsammlung aus jüngeren Patienten isoliert worden war, war die Anzahl der mit Folgeerkrankungen assoziierten Stämme sehr klein und eine statistische Absicherung dieser Ergebnisse nicht sinnvoll.

2.3 Etablierung des Dot Blot-Arrays mit Modellstämmen

Im Folgenden sollten Bindungseigenschaften unter Verwendung der so genannten Dot Blot-Technik [239] untersucht werden. Diese Technik wurde in Kooperation mit Prof. Ruhl, Regensburg, für *H. pylori* optimiert. Dabei werden definierte Antigene auf einer Nitrocellulosemembran fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Bakterien inkubiert. Zunächst sollte diese Methode in unserem Labor unter Verwendung einiger Modellstämmen und isogener Mutanten etabliert und bekannte Bindungsphänotypen überprüft werden (Abb. 7).

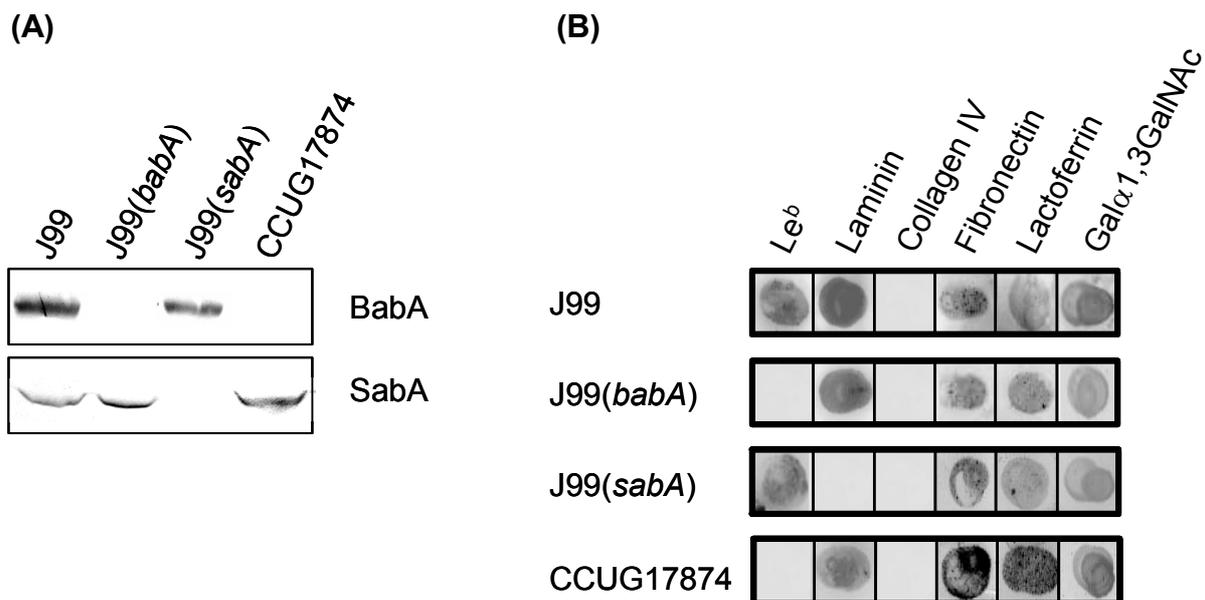


Abb. 7: Etablierung des Dot Blot-Arrays mit *H. pylori*-Modellstämmen.

(A) BabA- und SabA-Produktion von *H. pylori* J99 und CCUG17874 sowie isogener Mutanten im Immunoblot. Nach Auftrennung der Zelllysate durch SDS-PAGE erfolgte Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran und Detektion mit AK277 (α -BabA) bzw. AK278 (α -SabA).

(B) Adhärenz verschiedener *H. pylori*-Modellstämmen an definierte Antigene. Bindung FITC-markierter Bakterien an verschiedene Antigene, die auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen worden waren. Die Inkubation erfolgte für 1h.

Das Blutgruppenantigen Le^b wurde als Testsubstanz für die BabA-vermittelte Bindung gewählt. Laminin wird als sialyliertes Matrixprotein von SabA erkannt und wurde aus diesem Grund als Antigen verwendet. Die in der Literatur bereits beschriebene Bindung von *H. pylori* an Collagen IV [228] sollte überprüft werden. Fibronectin und Lactoferrin stellen putative Rezeptorkandidaten für *H. pylori* dar, da sie in der Pathogenese anderer humanpathogener Bakterien eine wichtige Rolle spielen. Als Negativkontrolle wurde humanes Serumalbumin (HSA) und das nicht humane Disaccharid Gal α 1-3GalNAc gewählt.

H. pylori J99 und die *sabA*-Mutante J99(*sabA*) adhärten aufgrund der BabA-Produktion an das fucosylierte Blutgruppenantigen. Diese Bindung ging durch Mutagenese des *babA*-Gens verloren (J99(*babA*)). *H. pylori* CCUG17874 weist kein *babA*-Gen im Genom auf und adhärte demnach nicht an Le^b. Die bereits von Ilver *et al.* beschriebene BabA-abhängige Bindung an Le^b konnte folglich bestätigt werden [102]. SabA-produzierende Stämme wie J99, J99(*babA*) und CCUG17874 zeigten Adhäsion an Laminin, die nach Mutagenese des *sabA*-Gens verloren ging (J99(*sabA*)). An Collagen IV adhärte keiner der Stämme. Alle untersuchten Stämme zeigten Bindung an Fibronectin und Lactoferrin. Interessanterweise waren alle untersuchten Stämme in der Lage Gal α 1-3GalNAc zu binden, welches ursprünglich als Negativkontrolle aufgrund seines nicht humanen Charakters verwendet werden sollte. HSA bewährte sich als Negativkontrolle.

2.4 Bindung klinischer Isolate an definierte Antigene

Nach Etablierung des Systems sollte mit Hilfe der Dot Blot-Technik eine Korrelation zwischen OMP-Produktionsprofil und Adhärenzverhalten untersucht werden. Aus den Adhärenzversuchen der Vorarbeiten war bereits bekannt, dass BabA einen dominanten Adhärenzphänotypen vermittelt (Abb. 5). Um mögliche Überlagerungen einzelner Adhäsine aufdecken zu können, wurden die klinischen Isolate nach BabA- und SabA-Produktion in 4 Gruppen eingeteilt. Da keine Korrelation zwischen der BabA- und SabA-Produktion vorlag (Tab. 4), fiel die Verteilung der einzelnen Gruppen weitgehend homogen aus (Tab. 6).

Tab. 6: Einteilung der 200 klinischen Isolate nach BabA- und SabA-Produktion

	BabA+	BabA-
SabA+	55	22
SabA-	63	60

Repräsentative Vertreter dieser Gruppen wurden anschließend auf ihr Adhärenzverhalten mittels Dot Blot-Arrays untersucht.

Tab. 7: Adhärenz klinischer Isolate an definierte Antigene in Dot Blot-Arrays

	Le ^b	Laminin	Collagen IV	Fibronectin	Lactoferrin	Gal α 1-3GalNAc
BabA+ SabA+ (n=25)	88%	92%	0%	100%	100%	100%
BabA- SabA- (n=40)	0%	0%	5%	100%	100%	100%
BabA+ SabA- (n=13)	92%	0%	0%	100%	100%	100%
BabA- SabA+ (n=14)	0%	93%	0%	100%	100%	100%

200 klinische *H. pylori*-Isolate wurden nach BabA- und SabA-Produktion in 4 Gruppen unterteilt. 92 repräsentative Vertreter (Anzahl (n) in Klammern angegeben) wurden anschließend auf ihre Adhärenzeigenschaften in Dot Blot-Arrays untersucht.

Tab. 7 zeigt, dass nur 88% (BabA+/SabA+) bzw. 92% (BabA+/SabA-) der BabA-produzierenden Stämmen in der Lage waren, Le^b zu binden. Laminin wurde nur von 92% (BabA+/SabA+) bzw. 93% (BabA-/SabA+) der *sabA*-exprimierenden Stämme gebunden. Demnach scheinen BabA und SabA in einer inaktiver Form vorkommen zu können, die keine Adhäsion an Le^b bzw. sialylierte Strukturen vermittelt. Auf dieses Bindungsverhalten wird im nächsten Kapitel detailliert eingegangen.

Bindung an Collagen IV wurde bei 5% der untersuchten Stämme, welche weder BabA noch SabA produzierten, beobachtet. Auffallend war, dass alle untersuchten Stämme unabhängig von der Expression der untersuchten Adhäsine an Fibronectin, Lactoferrin und Gal α 1-3GalNAc adhärten.

2.5 Inaktive BabA-Proteine

Das Ausbleiben der Le^b-Bindung trotz BabA-Produktion, trat nicht nur bei klinischen Isolaten auf, sondern konnte auch in Dot Blot-Arrays mit *H. pylori* 26695 und P1 beobachtet werden. Um die Aussage der inaktiven BabA und SabA-Adhäsine zu verifizieren, wurde die Adhäsionproduktion und das Adhärenzverhalten der entsprechenden *H. pylori*-Stämme überprüft (Abb. 8). Die Proteinproduktion konnte mittels Immunoblot bestätigt werden (Abb. 8A und C). Es erfolgte jedoch keine Bindung an Le^b bzw. Laminin (Abb. 8B und D).

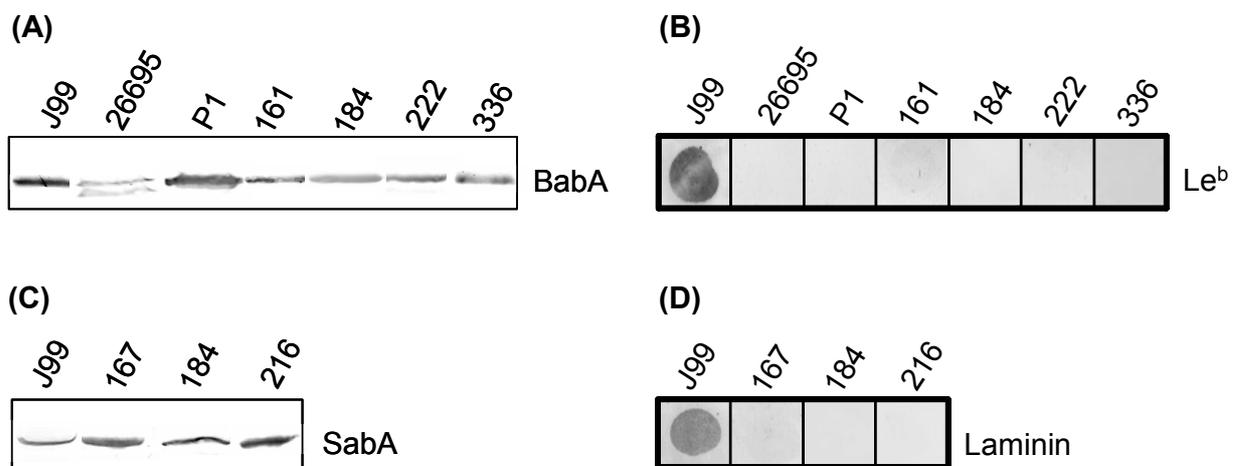


Abb. 8: Nachweis inaktiver BabA- und SabA-Proteine.

(A) BabA-Produktion von *H. pylori* J99, 26695, P1 und der klinischen Isolate 161, 184, 222 und 336 im Immunoblot. Lysate der *H. pylori*-Stämme wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend BabA mit einem spezifischen Antikörper (AK277) detektiert.

(B) Bindung an Le^b in Dot Blot-Arrays. Bakterien von *H. pylori* J99, 26695, P1 und der klinischen Isolate 161, 184, 222 und 336 wurden mit FITC markiert und im Dot Blot-Array auf Bindung an Le^b getestet.

(C) SabA-Produktion des Stamms J99 und der klinischen Isolate 167, 184 und 216 im Immunoblot. Lysate der *H. pylori*-Stämme wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend SabA mit einem spezifischen Antikörper (AK278) detektiert.

(D) Bindung an Laminin in Dot Blot-Arrays. Bakterien von *H. pylori* J99 sowie der klinischen Isolate 167, 184 und 216 wurden mit FITC markiert und im Dot Blot-Array auf Bindung an Laminin getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene BabA- und SabA-Proteine unter *H. pylori*-Stämmen auftreten, die sich nicht im Immunoblot durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern, jedoch hinsichtlich ihres Adhärenzverhaltens unterscheiden. In einem späteren Kapitel wird die Bindungsdomäne, die für die Adhärenz von BabA an Le^b verantwortlich ist, eingegrenzt.

2.6 Einfluss der *cag*-Pathogenitätsinsel auf die Adhärenz

Im Folgenden sollte näher untersucht werden, ob CagA oder andere Komponenten des Typ-IV-Sekretionsapparates die Adhärenz beeinflussen.

Mit den Modellstämmen *H. pylori* 26695, P12 und isogenen Mutanten wurde das Adhärenzverhalten mit Hilfe der Dot-Blot-Technik untersucht (Abb. 9).

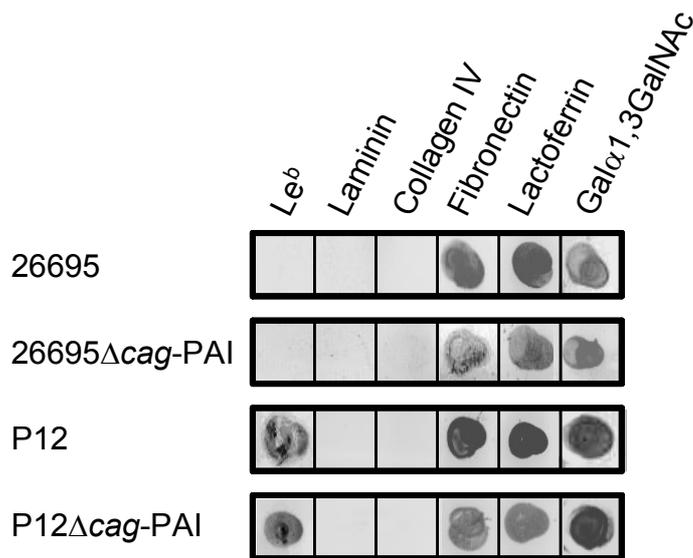


Abb. 9: Adhärenz von *H. pylori* 26695, 26695Δ*cag*-PAI, P12 und P12Δ*cag*-PAI an definierte Antigene. Bakterien der Stämme *H. pylori* 26695, P12 und der isogenen Δ*cag*-PAI-Mutanten wurden mit FITC markiert und eine Stunde mit definierten Antigenen inkubiert. Diese waren auf einer Nitrocellulosemembran fixiert.

Die Bindung an Fibronectin und Lactoferrin war bei allen untersuchten Stämmen in gleichem Maße ausgeprägt. Aufgrund des Fehlens des *sabA*-Gens in P12 und 26695 war keine Bindung an Laminin erkennbar. P12 und die Mutante P12Δ*cag*-PAI verfügen über ein aktives BabA-Adhäsion und adhären an Le^b. Diese Bindungseigenschaft war aufgrund der inaktiven BabA-Form von *H. pylori* 26695 weder beim Wildtyp-Stamm noch bei der Mutante 26695Δ*cag*-PAI zu beobachten.

Es konnte kein Einfluss der *cag*-PAI auf das Adhärenzverhalten an die ausgewählten Antigene gezeigt werden.

3 Untersuchung der *alpAB*-Abhängigkeit der SabA-vermittelten Bindung

3.1 Adhärenzphänotyp im Dot Blot

Die Mutagenese der *alpAB*-Gene hatte in früheren Versuchen zu einem Adhärenzdefekt an Kato-III-Zellen und fixiertem Magengewebe geführt [161, 167]. Im Folgenden sollte eine mögliche Interaktion zwischen AlpAB-Proteinen und der SabA- bzw. BabA-vermittelten Bindung untersucht werden. In Dot Blot-Arrays wurde der Adhärenzphänotyp von *H. pylori* J99, CCUG17874 sowie der isogenen *alpAB*-Mutanten untersucht (Abb. 10).

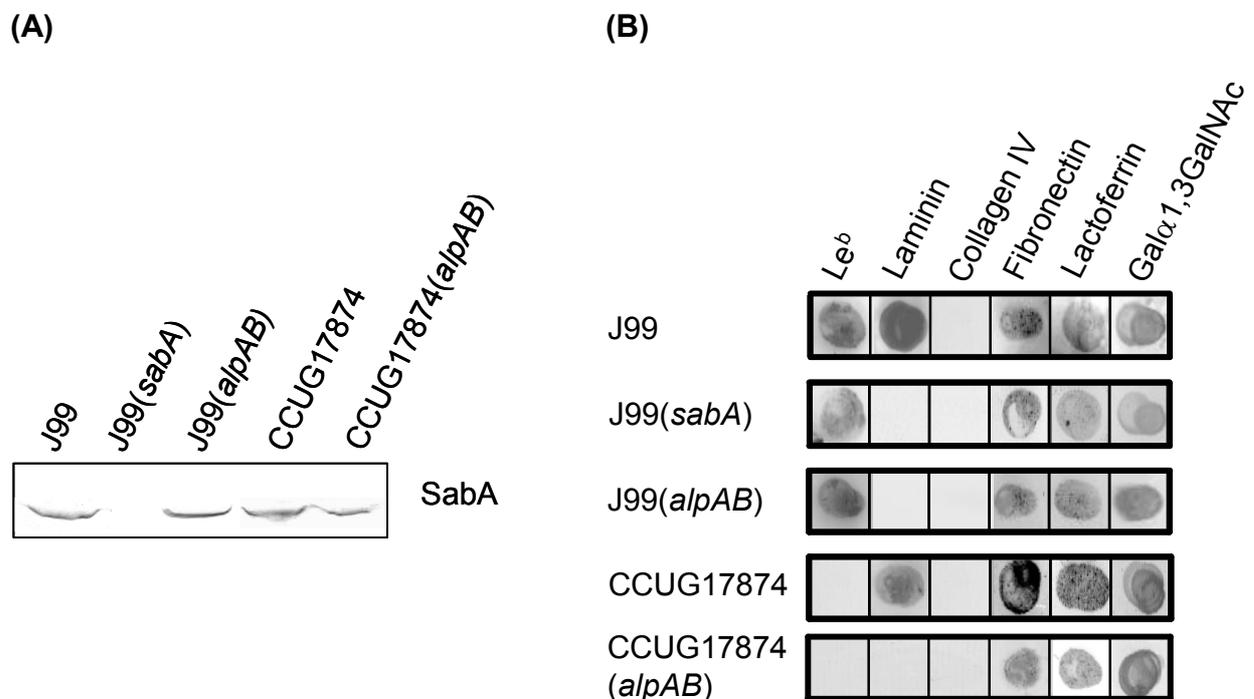


Abb. 10: Bindung an definierte Antigene in Abhängigkeit von der AlpAB-Produktion.

(A) Nachweis der SabA-Produktion im Immunoblot. Zelllysate von *H. pylori* J99, J99(*sabA*), J99(*alpAB*), CCUG17874 und CCUG17874(*alpAB*) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend SabA mittels eines spezifischen Antikörpers (AK278) detektiert.

(B) Bindung an definierte Antigene im Dot Blot-Array. FITC-markierte Bakterien von *H. pylori* J99, J99(*sabA*), J99(*alpAB*), CCUG17874 und CCUG17874(*alpAB*) wurden 1h mit definierten Antigenen inkubiert, die auf Nitrocellulosemembranen aufgetragen worden waren.

Die SabA-Produktion der Wildtypstämme J99 und CCUG17874 sowie der isogenen *alpAB*-Mutanten konnte im Immunoblot gezeigt werden. SabA wurde nicht von der *sabA*-Mutante (J99(*sabA*)) produziert (Abb. 10A). Demnach interferiert die AlpAB-

Produktion nicht mit der SabA-Produktion. Interessanterweise führte die Mutagenese der *alpAB*-Gene sowohl bei *H. pylori* J99 als auch bei *H. pylori* CCUG17874 zu einem Verlust der Bindung an Laminin (Abb. 10B), obwohl das hierfür verantwortliche Adhäsin SabA weiterhin produziert wurde. Nach Mutagenese des *sabA*-Gens (J99(*sabA*)) ging die Adhärenz an Laminin gleichermaßen verloren. Demnach interagiert die Funktionalität von SabA, nicht jedoch die Produktion von SabA mit der Expression der Gene *alpAB*. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss der *alpAB*-Expression auf die Adhäsion an Le^b, Collagen IV, Fibronectin, Lactoferrin und Gal α 1-3GalNAc beobachtet werden.

3.2 Präsentation von SabA auf der Oberfläche

Die Beobachtung, dass nach Mutagenese der *alpAB*-Gene das SabA-Adhäsin inaktiv wird, führte zur Hypothese, dass die Proteine AlpA und AlpB mit dem Transport von SabA auf die Bakterienoberfläche interagieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht, ob SabA nach *alpAB*-Mutation weiterhin an der Oberfläche der äußeren Membran exponiert wird (Abb. 11).

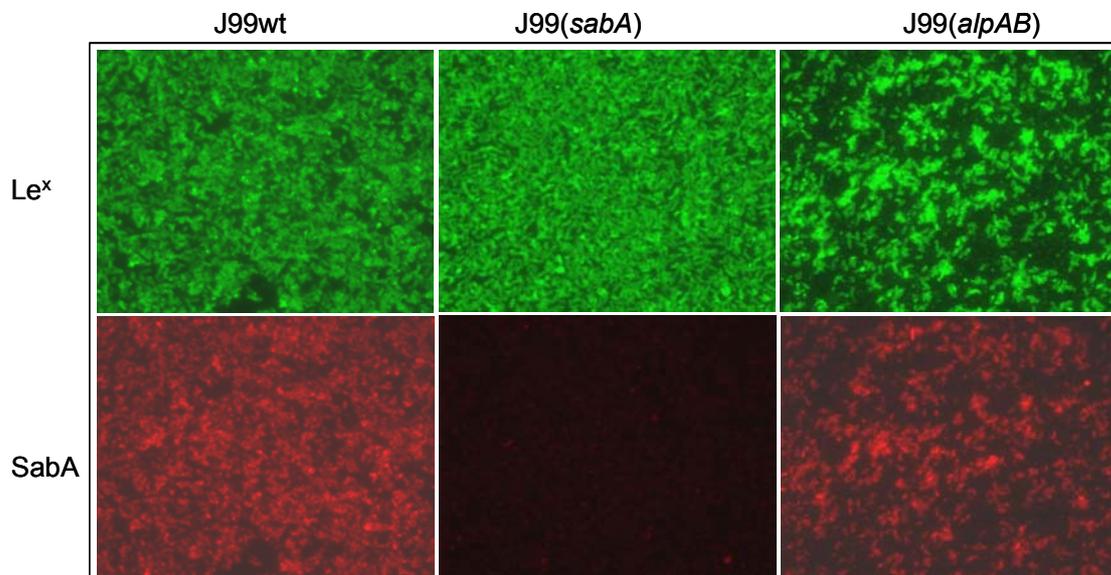


Abb. 11: Exposition von SabA auf der Bakterienoberfläche. Über Immunfluoreszenz wurden *H. pylori* J99wt sowie die isogene *sabA*- und *alpAB*-Mutante mit einem Le^x-spezifischen Antikörper/TRITC (Le^x) und dem SabA-spezifischen Antikörper AK278/FITC (SabA) doppelt gefärbt. Le^x-Antigene sind Bestandteil des LPS von *H. pylori*. Diese Färbung dient der Detektion aller auf dem Objektträger fixierten *H. pylori*.

Es konnte gezeigt werden, dass SabA auch nach Mutagenese der *alpAB*-Gene an der Oberfläche präsentiert wird. Die beiden Proteine AlpA und AlpB sind demnach nicht für den Export von SabA an die Bakterienoberfläche essentiell.

3.3 Protektiver Einfluss von AlpAB auf SabA unter Trypsinbehandlung

Nachdem die Hypothese, AlpAB seien am SabA-Transport an die Bakterienoberfläche beteiligt, nicht bestätigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob AlpAB bei der korrekten Faltung und/oder der stabilen Präsentation von SabA mitwirken. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde der proteolytische Abbau von SabA durch Trypsin untersucht. Bereiche von Proteinen, die an der Oberfläche exponiert sind, sind für den Angriff einer Proteinase zugänglich. Ganze Zellen von *H. pylori* CCUG17874 wurden von außen mit unterschiedlichen Trypsinmengen behandelt und entstandene Abbauprodukte im Immunoblot detektiert.

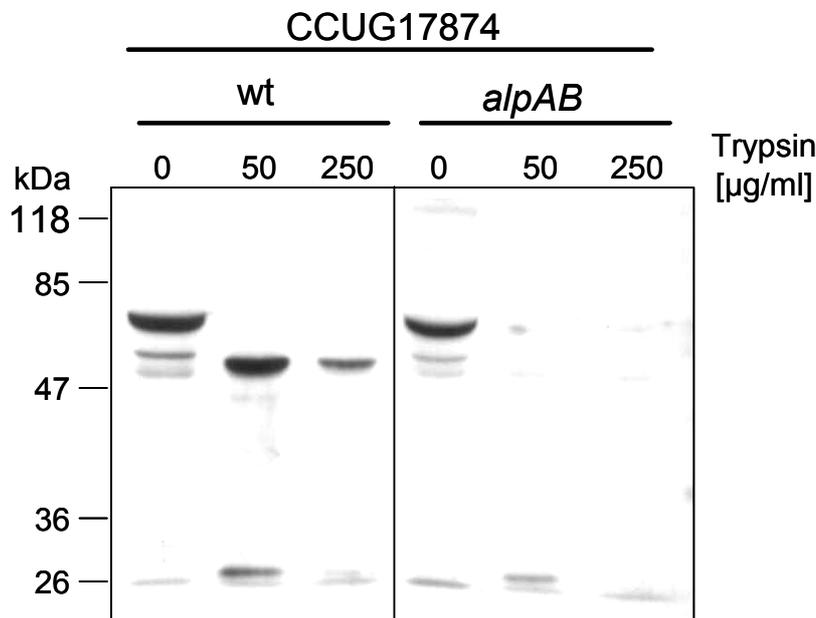


Abb. 12: Einfluss von AlpAB auf den proteolytischen Abbau von SabA. *H. pylori* CCUG17874 und die isogene *alpAB*-Mutante wurden mit unterschiedlichen Trypsinmengen (50 und 250 µg/ml) behandelt. Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. SabA wurde mit einem α -SabA-Antikörper (AK278) detektiert.

Im Lysat der unbehandelten Zellen wurde das SabA-Protein in der ursprünglichen Größe von 70 kDa detektiert (Abb. 12). Die Zugabe von 50 µg/ml Trypsin zu *H. pylori* CCUG17874 degradierte SabA zu einem Protein der Größe von ca. 50 kDa. Zusätzlich wurde das Signal bei ca. 26 kDa verstärkt. Da dies auch bei der Kontrolle unbehandelter Bakterien auftrat, kann es sich hierbei um ein kreuzreagierendes Protein oder um ein stabiles SabA-Abbauprodukt handeln. Bei höherer Trypsinkonzentration wurde die Menge des metastabilen Abbauprodukts (ca. 50 kDa) vermindert.

Nach Mutagenese der *alpAB*-Gene wurde SabA durch beide Trypsinmengen komplett degradiert und war im Immunoblot nicht mehr detektierbar. Das Signal im Bereich von ca. 26 kDa trat unverändert auf.

AlpA und AlpB können demnach SabA vor proteolytischem Verdau schützen. Werden die beiden Proteine nach Mutagenese nicht mehr produziert, geht dieser Effekt verloren und SabA wird durch Trypsin proteolytisch abgebaut.

4 Charakterisierung der BabA-Bindungsdomäne

4.1 Eingrenzung der Bindungsdomäne mit Hilfe eines *babA*-Hybridgens in *H. pylori*

4.1.1 Konstruktion eines *babA*-Hybridgens

Das äußere Membranprotein BabA vermittelt die Adhärenz von *H. pylori* an Le^b-Blutgruppenantigene [102]. Im Modellstamm 26695 und in klinischen Isolaten wurden inaktive BabA-Proteine nachgewiesen, die keine Adhärenz an Le^b vermitteln (Abb. 8). Sequenzanalysen der *babA*-Gene von *H. pylori* CCUG17875, 26695 und J99 zeigten große Homologie untereinander, die in der C-terminalen Hälfte der Gene sehr stark ausgeprägt war (Abb. 13A). Abweichungen traten vornehmlich in einem daraufhin als variable Mittelregion bezeichneten Bereich auf, der sich an den weitgehend konservierten N-Terminus anschließt (Abb. 13B).

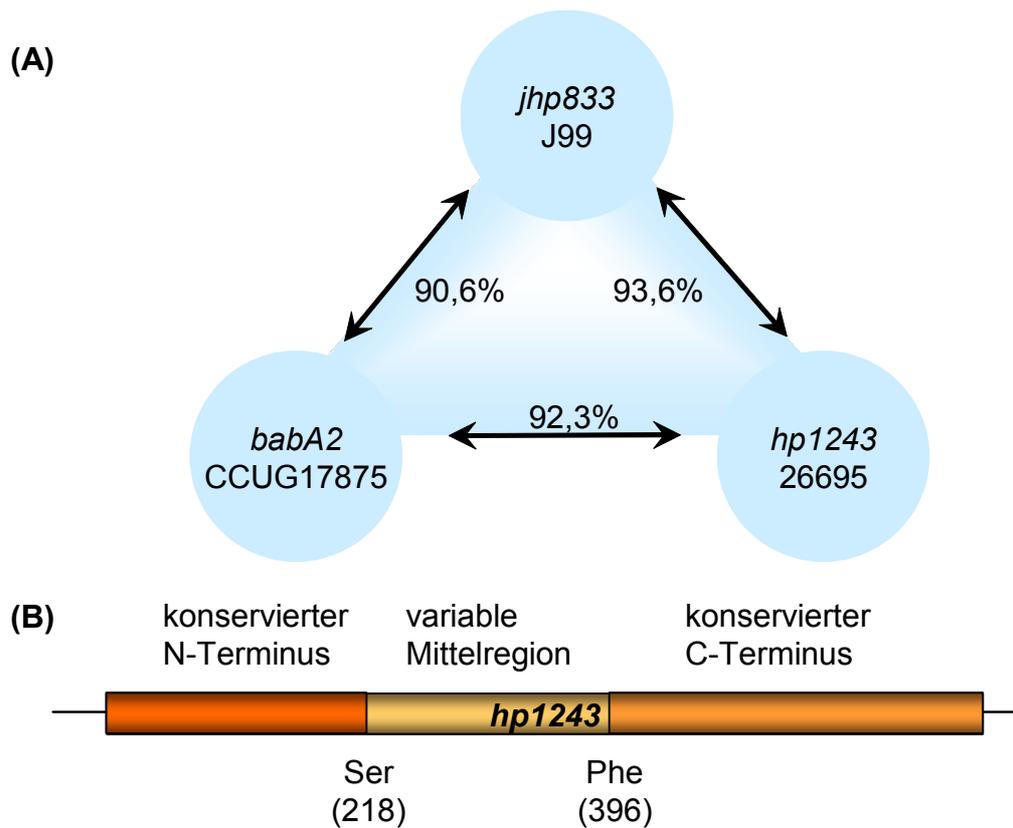


Abb. 13: Homologien der *babA*-Gene von *H. pylori* CCUG17875, 26695 und J99.

(A) Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der *babA*-Gene.

(B) Variable Mittelregion und konservierter N- und C-Terminus von *hp1243*.

Die Sequenzabweichungen lassen auf eine Lokalisation der Le^b-Bindungsdomäne in der variablen Mittelregion bzw. in der N-terminalen Hälfte des BabA-Adhäsins schließen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine Mutante hergestellt, die ein BabA-Hybridprotein aus einem N-Terminus eines aktiven BabA-Proteins und dem C-Terminus eines inaktiven BabA-Proteins produziert (Abb. 14).

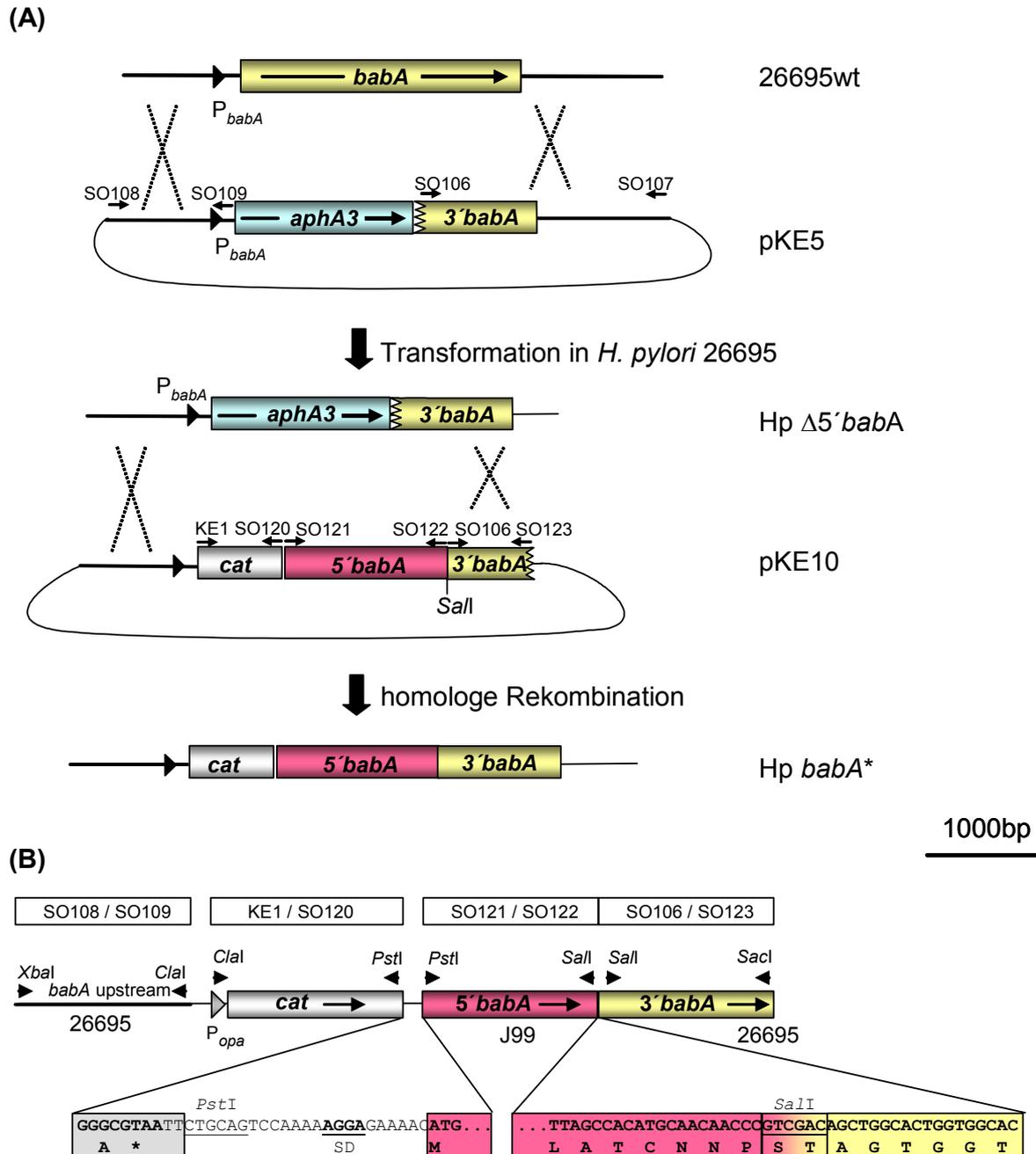


Abb. 14: Konstruktion eines *babA*-Hybridgens.

(A) Das Plasmid pKE5 wurde aus einer Kanamycinresistenzkassette (*aphA3*), der *upstream*-Region des *babA*-Gens von *H. pylori* 26695 (SO108/SO109) und dessen C-terminalem Teil (SO106/SO107) zusammengesetzt. Das Plasmid pKE5 wurde in den Stamm *H. pylori* 26695 transformiert. Homologe Rekombination führte zur Integration der entsprechenden Bereiche in das Genom (Hp $\Delta 5'$ *babA*). Parallel dazu wurde ein Plasmid konstruiert (pKE10), das modular aus der *upstream*-Region des *babA*-Gens (SO108/SO109), einer Chloramphenicolresistenzkassette (*cat*) (KE1/SO120), dem N-Terminus des *babA*-Gens (SO121/SO122) des Stammes J99 und einem Teil des C-terminalen Bereiches des *babA*-Gens (SO106/SO123) von *H. pylori* 26695 zusammengesetzt wurde. Transformation von pKE10 in die Deletionsmutante Hp $\Delta 5'$ *babA* führte zu der Komplementanten Hp *babA**.

(B) Detaillierte Darstellung der Operonfusion zwischen *cat*-Resistenzgen und *5'babA* von *H. pylori* J99 sowie der Genfusion zwischen *babA*-Bereichen von *H. pylori* J99 und 26695 in Plasmid pKE10. Die Fusionen erfolgten über die mit Pfeilen gekennzeichneten Schnittstellen. SD: Shine-Dalgarno-Sequenz

Nach Amplifizierung des inaktiven *babA*-Gens von *H. pylori* 26695 wurde der N-terminale Bereich durch eine Kanamycinresistenzkassette ersetzt. Dieses Plasmid (pKE5) wurde in *H. pylori* 26695 transformiert und führte zu der Deletionsmutante Hp $\Delta 5'babA$. Parallel dazu wurde Plasmid pKE10 konstruiert (Abb. 14 B), welches über einen N-terminalen Bereich eines aktiven (*H. pylori* J99) und den C-terminalen Bereich eines inaktiven (*H. pylori* 26695) *babA*-Gens verfügte. Nach Transformation von pKE10 in die Deletionsmutante Hp $\Delta 5'babA$ führte homologe Rekombination zu der Komplementanten Hp *babA**. Diese Mutante enthielt nach erfolgreicher Rekombination ein Hybridgen, das für den N-Terminus des aktiven BabA-Proteins von *H. pylori* J99 und für den C-Terminus des inaktiven BabA-Proteins des Stammes 26695 codierte. Der für die Expression notwendige *babA*-Promotor befindet sich in der *upstream*-Region. Bei der Konstruktion des Plasmids pKE10 wurde zunächst ein *cat*-Resistenzgen inklusive *cat*-Promotor (SO119/SO120) verwendet, was womöglich zu einer Expression des *cat*-Gens sowie des nachfolgenden *babA*-Gens in *E. coli* führte. Expression artfremder Gene können z. B. aufgrund fremder sekretorischer Signalsequenzen für den Organismus toxisch sein. Um dieses Problem zu reduzieren, wurde anschließend ein *cat*-Resistenzgen ohne Promotor verwendet (KE1/SO120) (Abb. 14A). Auf den *babA*-Promotor, der in der *upstream*-Region lokalisiert ist, konnte aus Gründen der homologen Rekombination nicht verzichtet werden.

Die BabA-Produktion der Deletionsmutanten wurde im Immunoblot überprüft (Abb. 15). 6 von 7 Transformanden zeigten keine BabA-Produktion, wodurch auf eine erfolgreiche homologe Rekombination geschlossen werden konnte. Die untere Bande im Immunoblot, die bei allen Proben gleich stark auftrat, kennzeichnet eine kreuzreagierende Bande und war für die Beurteilung der BabA-Produktion bedeutungslos.

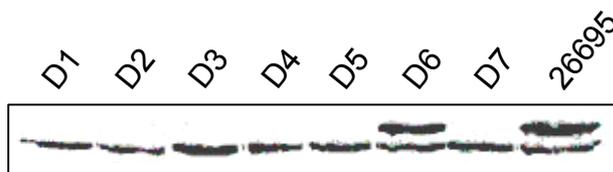


Abb. 15: BabA-Produktion der Deletionsmutanten Hp $\Delta 5'babA$. Zellysate der Deletionsmutanten D1-7 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion von BabA mit AK277 im Immunoblot. Als Positivkontrolle diente das BabA-Protein des Stammes *H. pylori* 26695.

Die Mutante D3 wurde für die anschließende Komplementation mit pKE10 verwendet. Die BabA*-Produktion der erhaltenen Transformanten wurde mittels Immunoblot untersucht (Abb. 16).

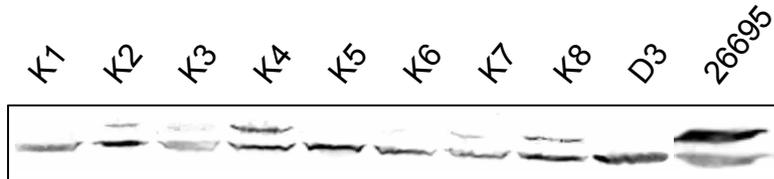


Abb. 16: BabA*-Produktion von Hp *babA.** Zellysate der Komplementanten K1-8 und der Deletionsmutante Hp $\Delta 5'babA$ D3 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulose erfolgte die Detektion von BabA mit AK277 im Immunoblot. Als Positivkontrolle diente das BabA-Protein des Stammes *H. pylori* 26695.

Die obere Bande im Immunoblot signalisiert die Produktion des Hybridproteins BabA* der Klone K1-8. Das BabA*-Protein wurde von den Mutanten K2, K3, K4, K7 und K8 produziert, wobei die Expression in allen Fällen sehr schwach ausfiel.

4.1.2 Überprüfung des Hybridgens *babA** mittels Southern Blot

Da die Komplementanten nur eine sehr geringe BabA*-Produktion zeigten, sollte im Folgenden die korrekte Anordnung der einzelnen Genfragmente in den Deletionsmutanten sowie den Komplementanten überprüft werden. Dies erfolgte mittels Southern Blot. Die chromosomale DNA der entsprechenden Mutanten wurde mittels CsCl-Methode isoliert. Nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* erfolgte Hybridisierung mit einem Fragment komplementär zu der *upstream*-Region (Sonde 1). In einem weiteren Ansatz wurde die DNA mit *EcoRI* und *BglII* verdaut und mit Sonde 2 hybridisiert, die komplementär zu einem Teil des 5'*babA*-Bereiches war (Abb. 17A).

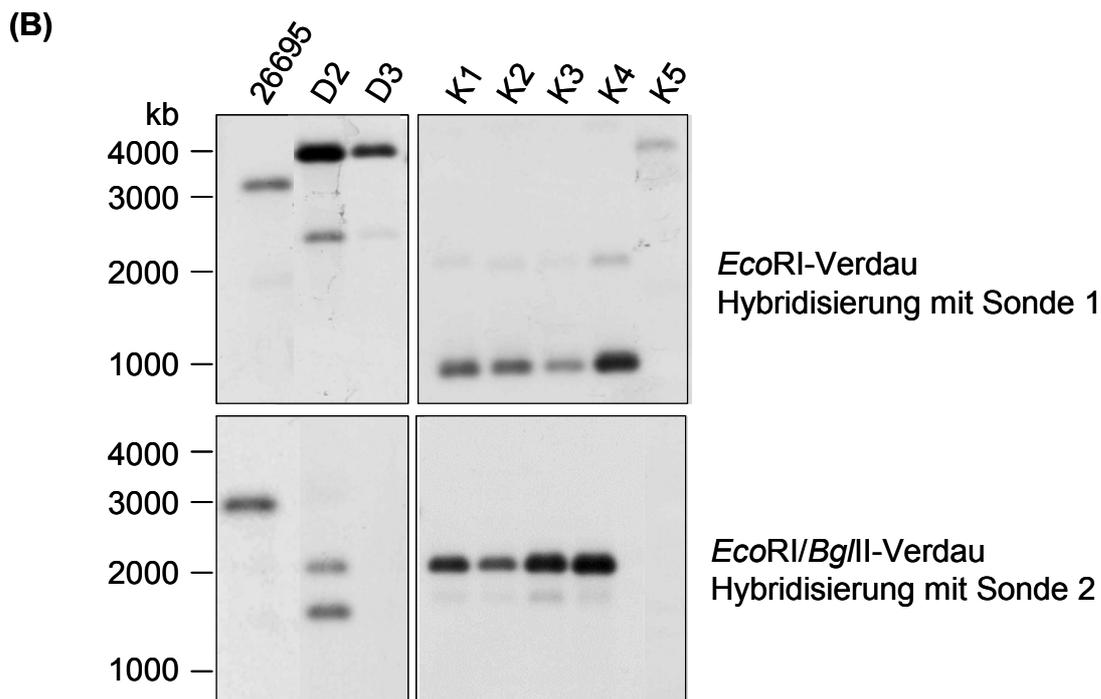
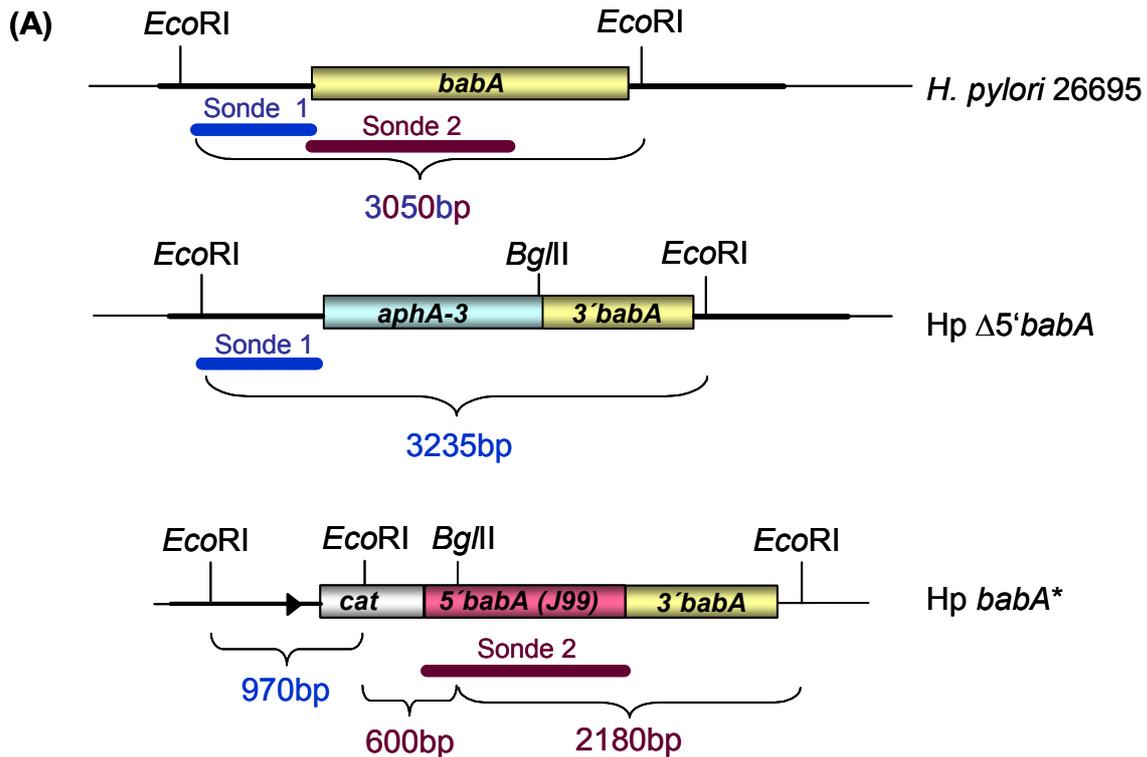


Abb. 17: Anordnung der Genfragmente in Deletionsmutanten und Komplementanten.

(A) Hybridisierung mit Sonde 1 (komplementär zu der *upstream*-Region) nach Restriktionsverdau der chromosomalen DNA mit *EcoRI*. Zur Hybridisierung befähigt ist ein Fragment der Größe 3235bp der Deletionsmutante *Hp* $\Delta 5'$ *babA* und ein Fragment der Größe 970bp der Komplementante *Hp* *babA**. Hybridisierung mit Sonde 2 (komplementär zum 5'*babA*-Bereich) nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BgIII*. Hybridisierung kann mit 2 Fragmenten der Komplementante erfolgen (600bp und 2180bp).

(B) Hybridisierung der chromosomalen DNA von *H. pylori* 26695, den Deletionsmutanten D2 und D3 und den Komplementanten K1-5 mit Sonde 1 bzw. Sonde 2 nach Restriktionsverdau (*EcoRI* bzw. *EcoRI* und *BgIII*) und Auftrennung der DNA-Fragmente über ein 1% Agarosegel.

Die Ergebnisse der Southern Blot-Versuche verifizierten die Anordnung der Genfragmente der Deletionsmutante D3, die für die Transformation mit pKE10 verwendet worden war (Abb. 17B). Es erfolgte Hybridisierung eines Fragments der Größe 3235bp mit Sonde 1 und keine Reaktion mit Sonde 2. Bei den Signalen, die im Bereich von 2000bp auftraten, handelte es sich um kreuzhybridisierende Fragmente, die auch bei der Kontrolle *H. pylori* 26695 schwach zu erkennen waren. Mutante D2 erwies sich durch erfolgte Hybridisierung mit Sonde 2 als fehlerhaft. Die Komplementanten K1-4 zeigten sowohl mit Sonde 1 wie auch mit Sonde 2 Fragmente der richtigen Länge (970bp bzw. 2180bp). Sonde 2 hybridisierte mit 2 Fragmenten der Komplementanten, wobei das Fragment der Größe 600bp außerhalb des dargestellten Bereiches lag. Mutante K5 zeigte falsche Hybridisierungsfragmente.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die homologe Rekombination erfolgreich verlaufen war und die Module der Komplementanten Hp *babA** K1, 2, 3 und 4 in der richtigen Reihenfolge angeordnet waren. Es handelt sich demzufolge bei dem, wenn auch nur schwach produzierten, BabA*-Protein von K2, 3 und 4 um ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen Teil eines aktiven und dem C-terminalen Teil eines inaktiven BabA-Proteins.

4.1.3 Lokalisierung des BabA*-Fusionsproteins

Von dem natürlich vorkommenden BabA-Protein wird aufgrund typischer Sequenzmerkmale angenommen, dass es nach Produktion im Cytoplasma über die innere Membran in das Periplasma geschleust wird. Der C-Terminus bildet eine Pore in der äußeren Membran (β -Barrel), durch die der N-Terminus nach außen geführt und anschließend an der Oberfläche präsentiert wird.

Von entscheidender Bedeutung für die Funktion des Proteins ist, ob das BabA*-Fusionsprotein auch in der äußeren Membran verankert ist und der N-Terminus auf der Oberfläche präsentiert wird.

Um die Lokalisierung der Fusionsproteine näher zu untersuchen, wurde der N-Terminus von BabA* der Komplementanten K4 und K8 nach Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durch ein Laser Scanning-Mikroskop detektiert (Abb. 18).

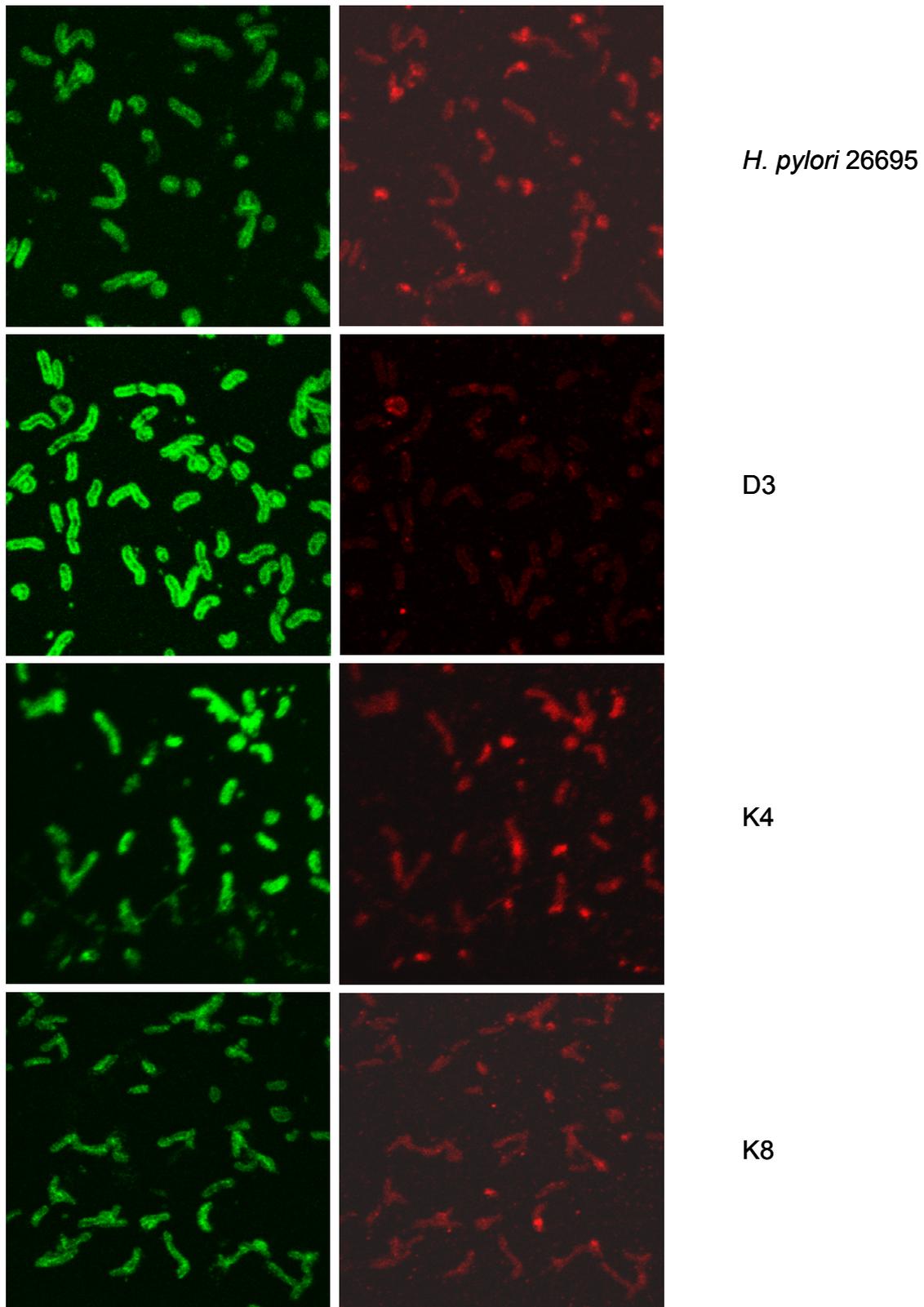


Abb. 18: Oberflächenlokalisierung von BabA*. Der N-Terminus des BabA*-Fusionsproteins der Komplementanten K4 und K8 wurde durch die Antikörper α -BabA und einen TRITC-markierten Antikörper detektiert. Die Le^x-Antigene der Seitenkette des LPS fluoreszierten nach Inkubation mit einem α -Le^x-Antikörper und einem FITC-markierten Antikörper grün und dienten der Gegenfärbung der Bakterien für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. *H. pylori* 26695 und die Deletionsmutante D3 wurden als Kontrollstämme verwendet.

Der an der Oberfläche exponierte N-Terminus von BabA bzw. BabA* konnte bei *H. pylori* 26695 und den Komplementanten K4 und K8 durch rote Fluoreszenzsignale gezeigt werden. Bei der Deletionsmutante D3 erfolgte keine Anfärbung aufgrund des fehlenden 5' *babA*-Bereichs. *H. pylori* 26695 diente als Positivkontrolle für ein an die Oberfläche exportiertes BabA.

In beiden Hp *babA** Mutanten K4 und K8 wurde der N-Terminus des BabA*-Fusionsproteins an der Oberfläche präsentiert und konnte durch Immunfluoreszenz detektiert werden. Dadurch war eine wichtige Voraussetzung der Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins BabA* erfüllt.

4.1.4 Adhäsive Eigenschaften des BabA*-Fusionsproteins

Nachdem die richtige Anordnung der Genfragmente der Komplementanten K1-4 sowie die korrekte Lokalisierung des N-Terminus des BabA*-Fusionsproteins in den Komplementanten K4 und K8 mit Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte, wurden die adhäsiven Eigenschaften untersucht.

In einem Dot Blot-Array wurden FITC-markierte Bakterien der Komplementanten K1, K2, K3, K4 und K8 auf ihr Bindungsvermögen an Le^b-Antigenen untersucht (Abb. 19).

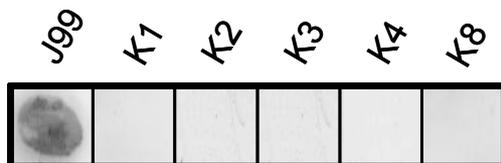


Abb. 19: Adhärenz der Komplementanten K1, K2, K3, K4 und K8 an Le^b. FITC-markierte Bakterien wurden in einem Dot Blot-Array mit Le^b-Antigenen, die auf einer Nitrocellulosemembran fixiert sind, inkubiert. Die adhärennten Bakterien wurden mit einem Fluoreszenzscanner detektiert. Als Positivkontrolle diente der Stamm J99, der über ein aktives BabA verfügt und deshalb an Le^b-Antigene bindet.

Obwohl ein BabA*-Fusionsprotein mit der korrekten Präsentation auf der Bakterienoberfläche von K4 und K8 nachgewiesen wurde, konnte keine Adhärenz der beiden Mutanten an Le^b gezeigt werden. Auch die anderen Mutanten K1, K2 und K3, die dem Southern Blot zufolge eine richtige Anordnung der Genfragmente aufwiesen, adhärten nicht.

Um zu klären, ob eine Punktmutation oder eine Leserasterverschiebung in den Komplementanten stattgefunden hatte, die die Produktion eines aktiven BabA-Adhäsins verhinderte, wurden DNA-Bereiche inklusive der drei Ligationsstellen, über die pKE10 zusammengesetzt worden war, sequenziert (Abb. 20).

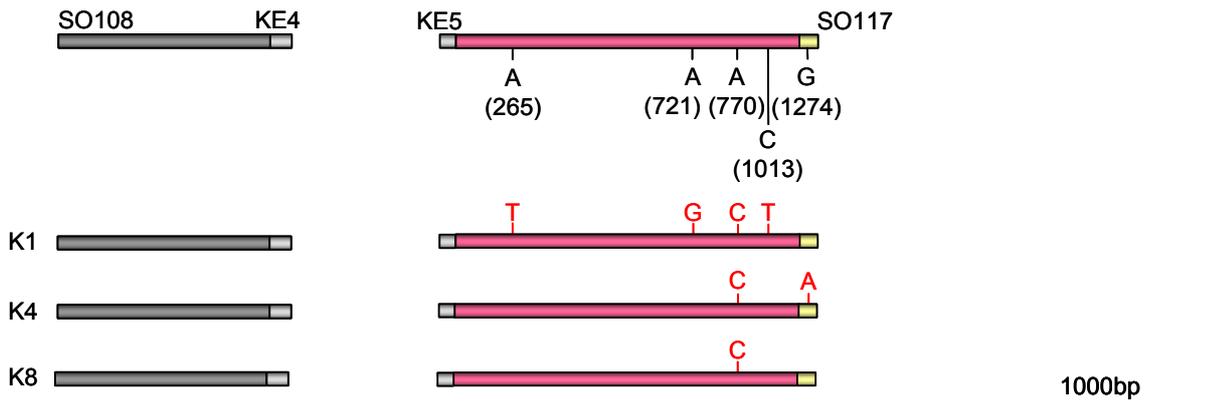
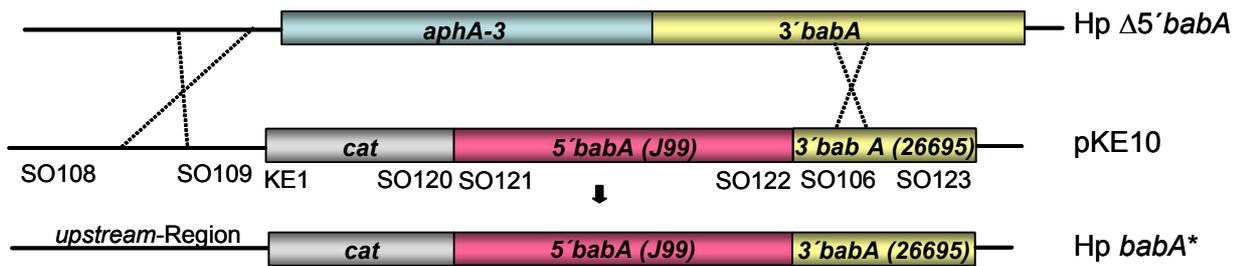


Abb. 20: Punktmutationen in den Komplementanten K1, K4 und K8. Das Primerpaar SO108/KE4 diente der Amplifizierung des Bereichs *upstream*-Region und Übergang in das *cat*-Resistenzgen. Mit KE5 und SO117 wurde der *5'babA*-Bereich sowie die angrenzenden Übergänge in das *cat*-Resistenzgen und in den *3'babA*-Bereich amplifiziert. Nach der Sequenzierung erfolgte der Basenvergleich mit den Bereichen von *H. pylori* 26695 bzw. J99. Basenaustauschpositionen beziehen sich auf ATG des *babA*-Gens von *H. pylori* J99.

Das sequenzierte Fragment der *upstream*-Region und des Übergangs in das *cat*-Gen war bei allen untersuchten Mutanten identisch und stimmte mit der entsprechenden Sequenz von *H. pylori* 26695 überein. Im Bereich der 5'-Region des *babA*-Gens traten bei allen drei untersuchten Komplementanten Punktmutationen auf. K1 zeigte 4 Basenaustausche, die jeweils einen Aminosäureaustausch bedingten. In Komplementante K4 hatten 2 Punktmutationen stattgefunden, die ebenfalls zu Aminosäureaustauschen führten. In Mutante K8 konnte eine ausgetauschte Base festgestellt werden, die auch in den anderen beiden untersuchten Klonen gezeigt werden konnte. Sie basiert eventuell auf einer Punktmutation des im Labor verwendeten Stammes J99 oder ist durch die an dieser Stelle eventuell fehlerhafte Genomsequenz von *H. pylori* J99 [4] bedingt.

Aufgrund der Sequenzierungsergebnisse konnten als Ursache der geringen BabA*-Produktion eine Leserasterverschiebung sowie eine Mutation in der Promotorregion ausgeschlossen werden. Es wurden jedoch Punktmutationen im *5'babA*-Bereich

Da die Bindungsdomäne wie bereits erwähnt mit hoher Wahrscheinlichkeit in der N-terminalen Hälfte des Gens lokalisiert ist, wurden 5 verschieden lange Fragmente des *babA*-Gens amplifiziert und über Klonierung in den Vektor pET-SH3 [104] mit dem *aida*-Gen fusioniert (Abb. 22). Dieser Vektor verfügt über die AIDA-Autotransporterdomäne des *E. coli*-Stammes EPEC 2787. Die daraus resultierenden Plasmide (pKE20-24) wurden anschließend in *E. coli* UT5600 DE3 [144] transformiert. Dieser Stamm präsentiert stabil äußere Membranproteine, da er die in der äußeren Membran lokalisierte Protease OmpT nicht exprimiert.

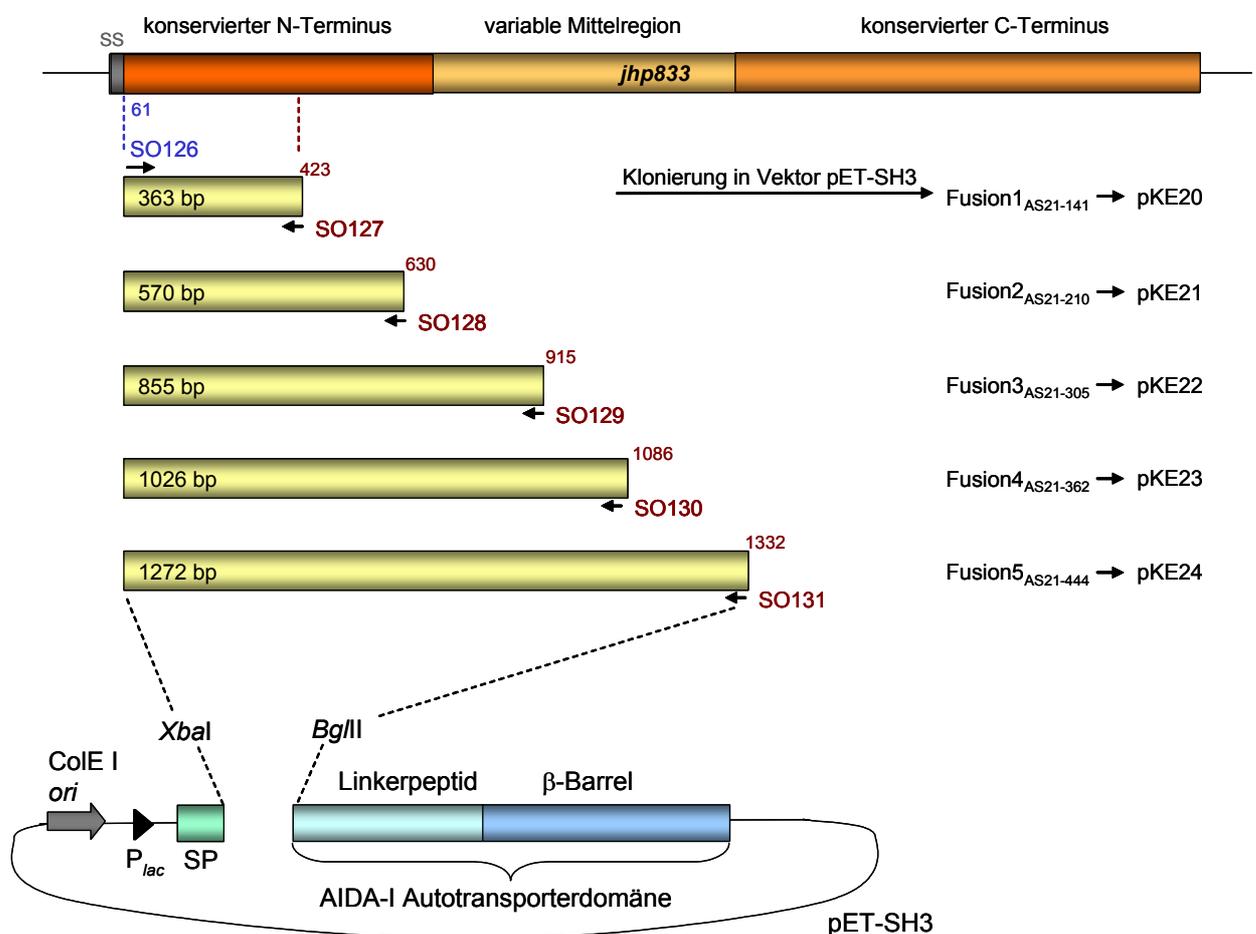


Abb. 22: Fusion von *babA*-Fragmenten mit *aida*. Fünf verschieden lange 5' *babA*-Fragmente von *jhp833* wurden mit den Primerpaaren SO126 mit SO127, SO128, SO129, SO130 und SO131 amplifiziert und über die Schnittstellen *Xba*I und *Bgl*II in den Vektor pET-SH3 kloniert (pKE20-24). Der Vektor pET-SH3 verfügt über einen *lac*-Promotor (P_{lac}), ein Signalpeptid der Untereinheit B des Cholera-toxins (SP) und die AIDA-I Autotransporterdomäne, die aus der *Linker*-Region und der β -Domäne besteht.

Die mit den Plasmiden pKE20-24 transformierten *E. coli*-Stämme wurden in Glucose-freiem AIDA-Medium angezchtet. Durch Induktion mit IPTG erfolgte die Transkription der Hybridgene. Die Produktion der Fusionsproteine wurde im Coomassie-Gel überprüft (Abb. 23A).

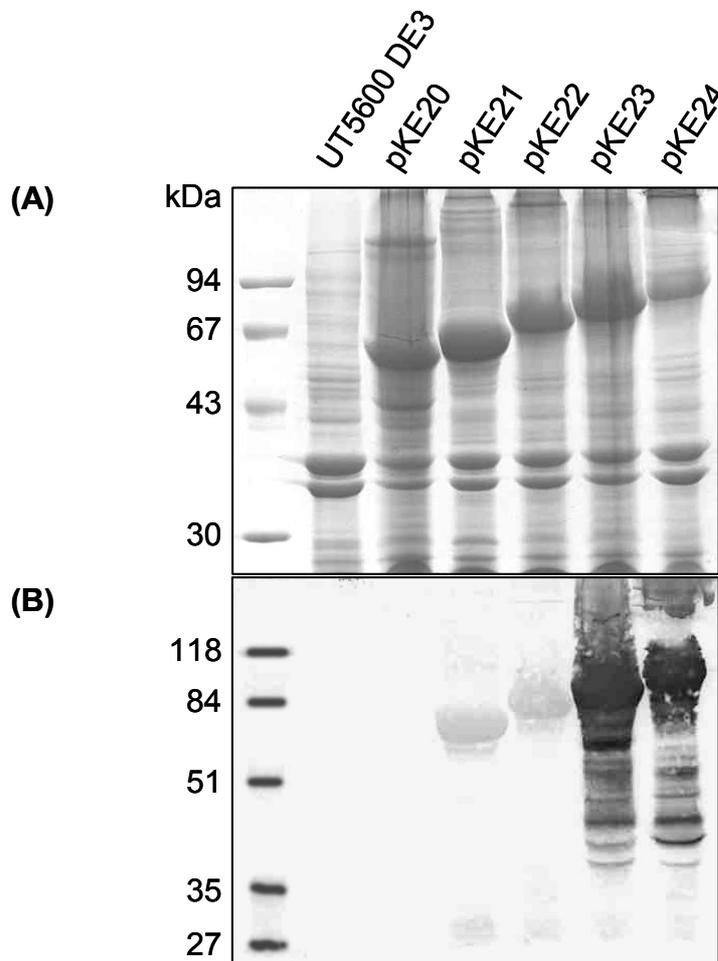


Abb. 23: Produktion der Fusionsproteine nach Induktion mit IPTG. *E. coli* UT5600 DE3 wurde mit den angegebenen Plasmiden (pKE20-24) transformiert und mit IPTG induziert. Zellysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Coomassie gefärbt (A) bzw. nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem BabA-spezifischen Antikörper (AK277) detektiert (B). Die Abb. 23A wurde freundlicherweise von Prof. Jose zur Verfügung gestellt.

Es konnte die erfolgreiche Produktion der an Länge zunehmenden Fusionsproteine aus BabA und AIDA-I durch *E. coli* UT5600 DE3 dargestellt werden. Der Immunoblot zeigte, dass die Fusion aus dem kürzesten *babA*-Fragment (SO126/SO127) offensichtlich nicht ausreichte, um von dem BabA-spezifischen Antikörper erkannt zu werden, der sich gegen Epitope des N-Terminus richtet (Abb. 23B). Die Hybridproteine, codiert von den Plasmiden pKE21 und pKE22, wurden schwach erkannt, wohingegen die Plasmide pKE23 und pKE24 die überwiegend immunogene Region exprimierten.

4.2.2 Fluoreszenz durch *gfp*-Expression

In Vorarbeiten hatte sich gezeigt, dass *E. coli* sich nicht analog zu *H. pylori* durch FITC markieren ließ. Um eine spätere Detektion zu ermöglichen, sollten die Bakterien mit einer intrinsischen Fluoreszenzaktivität ausgestattet werden und dafür mit einem *gfp*-codierenden Plasmid transformiert werden. Bakterien, die nach entsprechender Transformation GFP produzieren, fluoreszieren grün nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 395-475nm. Somit sind sie im Fluoreszenzscanner und unter dem Fluoreszenzmikroskop ohne weitere Färbungen sichtbar. Um eine Coexistenz des *aida-babA*-codierenden Plasmids und des *gfp*-codierenden Plasmids in einer Zelle zu ermöglichen, wurde das *gfp*-Gen in den Vektor pMCL200 kloniert. Dieser verfügt über einen P15A *ori* (Abb. 24A). Der *aida-babA*-codierende Vektor pET-SH3 besitzt einen ColE I *ori* (Abb. 22) und fällt damit in eine andere Inkompatibilitätsgruppe.

Die Klonierung des *gfp*-Gens in den Vektor erfolgte über eine singuläre Schnittstelle (*EcoRI*). Demnach sind 2 Insertionsrichtungen des Fragments möglich (pKE19 und pKE19a). In Plasmid pKE19 sind die beiden Promotoren (P_{lac} und P_{flaA}) in Leserichtung orientiert. Folglich kommt es zu einer starken *gfp*-Expression. Sind die Promotoren entgegengesetzt angeordnet (pKE19a), führt dies zu einer schwächeren GFP-Produktion. Die Insertionsrichtung wurde durch Restriktionsverdau bestimmt.

Um die *gfp*-Expression zu überprüfen, wurden die Plasmide pKE19 und pKE19a zunächst in *E. coli* DH5 α transformiert und die Fluoreszenz der Transformanten bestimmt (Abb. 24B). Klon 1 und Klon 2, die mit pKE19 transformiert worden waren, zeigten erwartungsgemäß eine hohe Fluoreszenz. Klon 3 und 4 zeichneten sich durch eine geringe GFP-Produktion aus, da sie mit pKE19a transformiert worden waren.

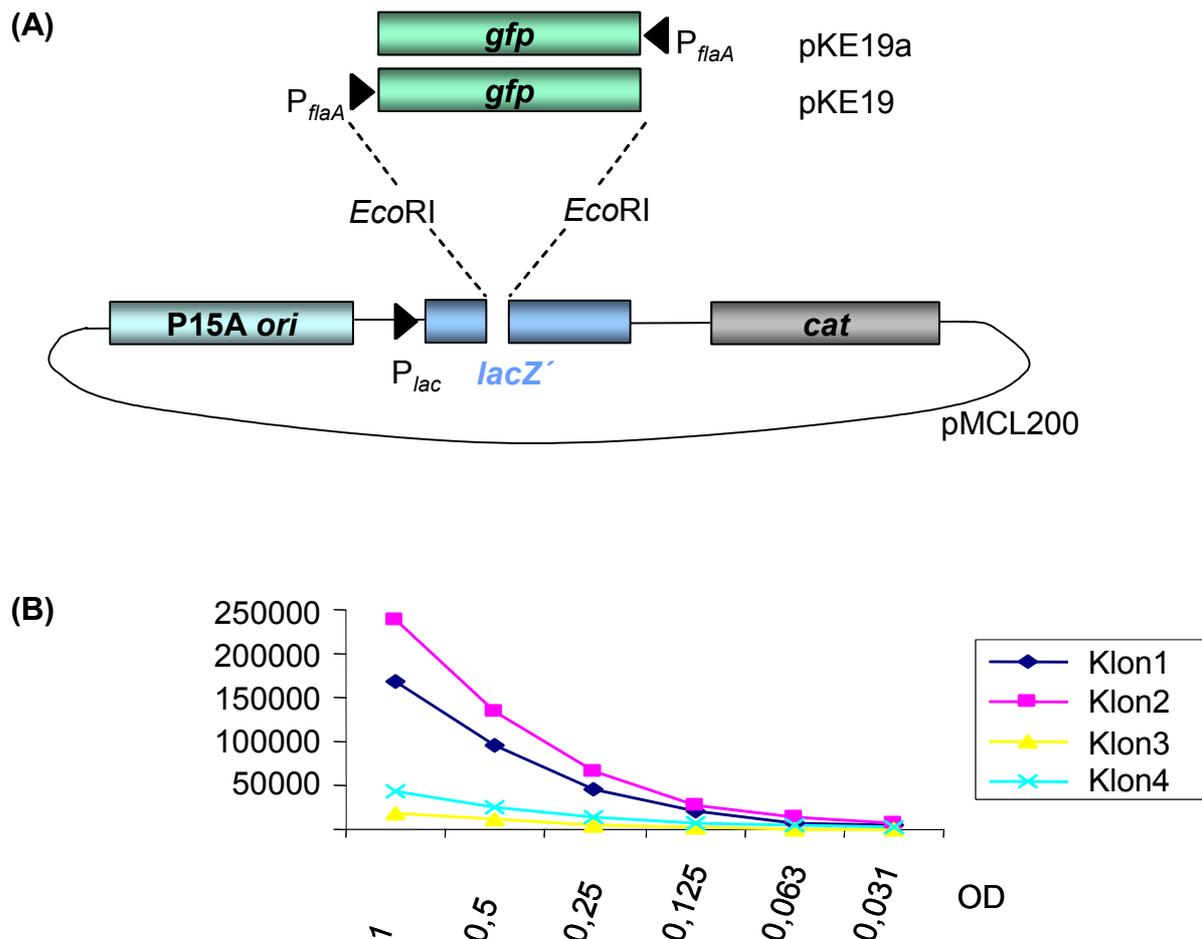


Abb. 24: GFP-Produktion nach Transformation mit Plasmid pKE19 bzw. pKE19a.

(A) **Aufbau der Plasmide pKE19 und pKE19a.** Über *EcoRI*-Schnittstellen wurde das *gfp*-Gen inklusive *flaA*-Promotor aus dem Plasmid pDH80 in den *lacZ'*-exprimierenden Vektor pMCL200 kloniert. Dieser Vektor verfügt über einen P15A *ori*.

(B) **Fluoreszenz der Klone 1-4.** Nach Transformation von *E. coli* DH5 α mit pKE19 bzw. pKE19a wurde die Fluoreszenzstärke (Y-Achse) verschiedener Verdünnungsstufen (X-Achse) der erhaltenen Transformanten mit dem Fluoreszenzscanner gemessen.

Anschließend wurden die *aida-babA*-exprimierenden *E. coli*-Stämme mit pKE19 transformiert. Durch Zugabe von IPTG wurde die Transkription der durch den *lac*-Promotor kontrollierten Gene induziert. Zur Überprüfung der *gfp*-Expression wurde die Fluoreszenzstärke der resultierten Transformanten P1920-P1924 bestimmt (Abb. 25).

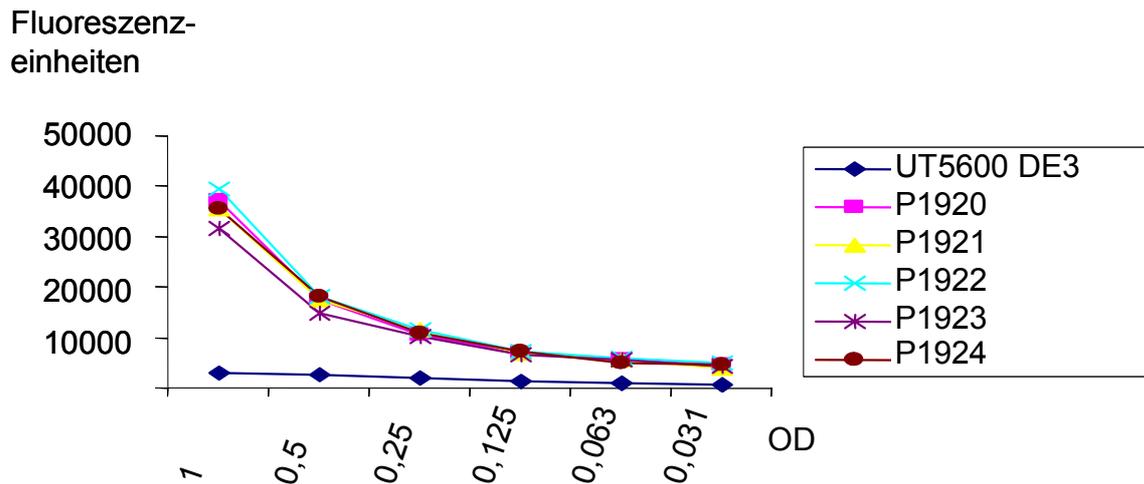


Abb. 25 Fluoreszenz von *E. coli* P1920-P1924. *E. coli* UT5600 DE3 wurde mit den Plasmid pKE19 (*gfp*-codierend) und den Plasmiden pKE20-24 (codierend für Hybridgene aus *aida* und *babA*-Fragmenten) transformiert (P1920-P1924). Die Fluoreszenzstärke (Y-Achse) wurde mittels Fluoreszenzscanner ermittelt. Auf der X-Achse ist die Bakteriendichte abzulesen.

UT5600 DE3, der weder pKE19 noch ein Plasmid, codierend für ein AIDA-BabA-Hybridprotein (pKE20-24), enthielt, fluoreszierte nicht. Die 5 Transformanden zeigten äquivalente Fluoreszenz, wodurch in späteren Adhärenzversuchen ein Vergleich der Transformanden untereinander ermöglicht wurde.

4.2.3 Untersuchung der Fusionsproteine mittels Immunfluoreszenz

Nachdem die Fusionsproteine und GFP erfolgreich von den Transformanden P1920-P1924 produziert worden waren, sollte die Frage geklärt werden, ob die BabA-Fragmente durch AIDA-I an die Oberfläche transportiert werden. Mit Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation des N-Terminus der verschiedenen Hybridproteine überprüft. Dazu wurden die Transformanden P1920, P1921, P1922, P1923 und P1924 mit einem α -BabA-Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist gegen ein Epitop im N-Terminus des *babA*-Gens gerichtet. Der zweite Antikörper war Fluoreszenzfarbstoff (TRITC)-markiert, um die Lokalisation des N-Terminus anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten zu können (Abb. 26).

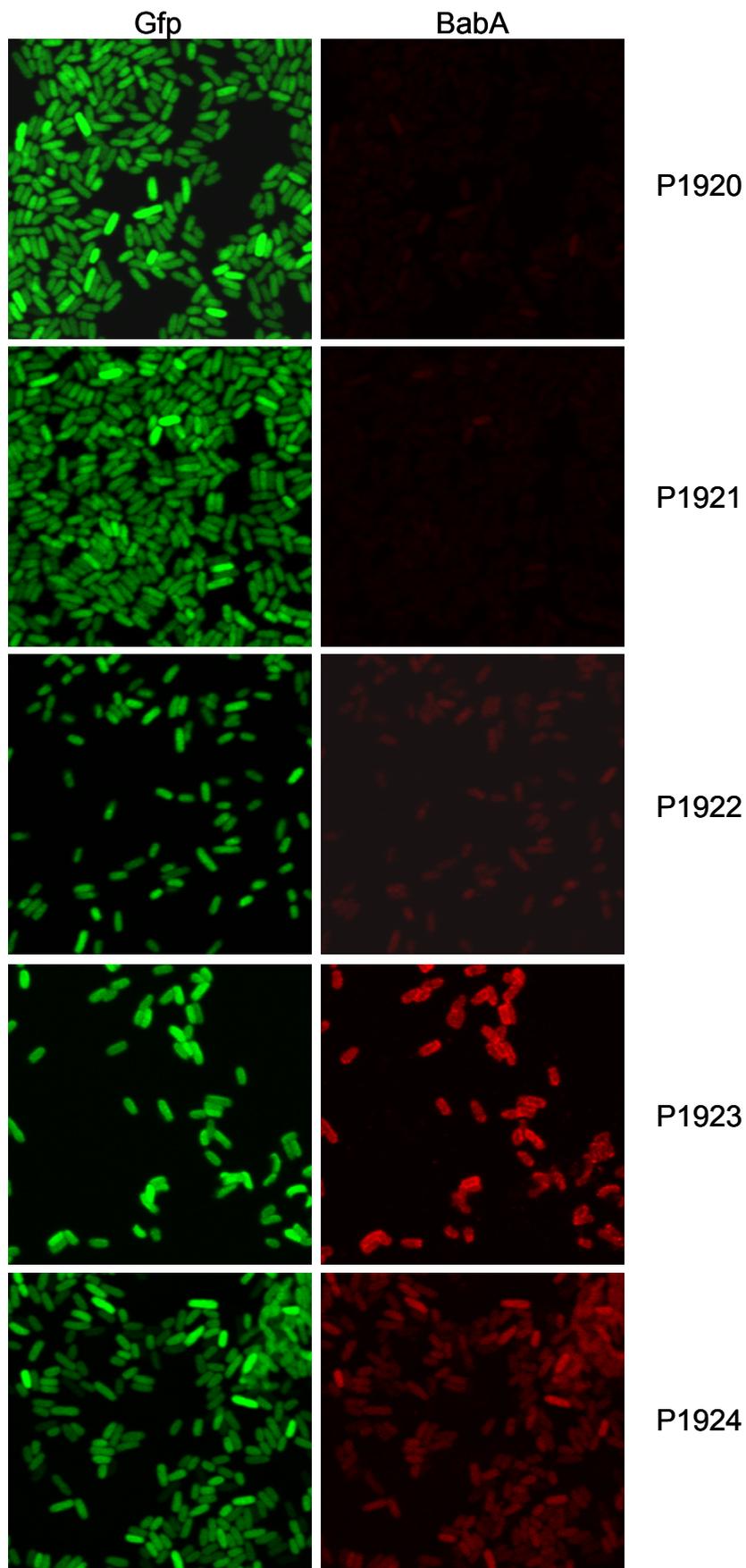


Abb. 26: Lokalisation des BabA-Bereiches der AIDA-BabA-Fusionsproteine von *E. coli* P1920-P1924. *E. coli* P1920, P1921, P1922, P1923 und P1924 wurden mit einem BabA-spezifischen Antikörper (AK277) und einem TRITC-markierten Antikörper je eine Stunde inkubiert und die Fluoreszenz im konfokalen Laser-Mikroskop detektiert.

Unter dem Mikroskop fluoreszierten alle untersuchten Transformanten durch die GFP-Produktion grün. Der BabA-Bereich von *E. coli* P1920, P1921 und P1922 wurde durch den α -BabA-Antikörper nicht detektiert. Der von *E. coli* P1923 exponierte BabA-Bereich zeigte die stärkste Fluoreszenz. Bei P1924 war die Fluoreszenz im Vergleich etwas schwächer ausgeprägt. Demzufolge wird nur in *E. coli* P1923 und P1924 das BabA-Fragment durch AIDA-I im Autodisplay-Mechanismus an die Oberfläche transportiert.

4.2.4 Untersuchung der Adhärenz an Le^b

Im Folgenden sollte das Adhärenzverhalten von *E. coli* P1920-P1924 an Le^b im Dot-Blot-Array untersucht werden (Abb. 27).

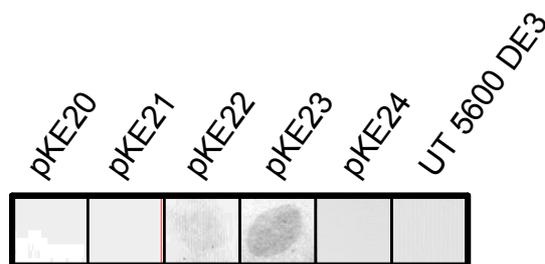


Abb. 27: Adhäsion der mit pKE19 und pKE20-24 transformierten *E. coli*-Mutanten (P1920-P1924) an Le^b. Auf einer Nitrocellulosemembran wurden pro Spot 4 μ g Le^b-Antigen aufgetragen. Die Inkubation der Membran erfolgte mit 1 ml einer Bakteriensuspension der OD=6 für 1h.

Eine deutliche Le^b-Bindung war von *E. coli* P1923 zu erkennen und ist auf den Proteinteil AS₂₁₋₃₆₂ (vgl. Abb. 22) zurückzuführen. Die Stämme P1920, P1921 und P1924 wiesen keine Adhäsion auf. *E. coli* P1922 zeigte sehr schwache Adhärenz.

Demnach reichten die Hybridproteine 1 und 2 nicht für die Le^b-Erkennung aus. Fusion 5, welche das längste *babA*-Fragment enthielt, schien zu einer ungünstigen Faltung des Proteins zu führen und damit eine Bindung zu verhindern. Für dieses Protein konnte im Unterschied zu den Fusionen 1 und 2 ein an der Oberfläche lokalisierter N-Terminus mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass das Hybridprotein 4 die stärkste Bindung an Le^b vermittelte, welches auch in der Immunfluoreszenz durch den Antikörper am besten detektiert wurde. Dies lässt auf eine BabA-Präsentation in aktiver Form von *E. coli* P1923 schließen. Die für die Adhäsion an Le^b verantwortliche Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins liegt demnach im N-terminalen Bereich des Proteins zwischen den Aminosäuren 21 und 362.

5 Untersuchungen zur Lactoferrinbindung von *H. pylori*

Im menschlichen Körper ist Eisen ein für das bakterielle Wachstum limitierender Faktor, da es an Speicher- und Transportproteine wie Ferritin, Hämoglobin, Transferrin und Lactoferrin gebunden ist. Aus diesem Grund verfügen einige Bakterien, z. B. *Moraxella spp.* oder *Neisseria spp.*, über hoch affine Aufnahmesysteme, die in der Lage sind, Eisen aus der Bindung mit menschlichen Speicherproteinen zu lösen. In der Literatur wurde für *H. pylori* ein 70 kDa großes Lactoferrin-bindendes Protein beschrieben [47].

Nachdem die Bindung von *H. pylori* an Lactoferrin gezeigt worden war, sollten in diesem Teil der Arbeit mögliche Rezeptoren für Lactoferrin identifiziert und näher charakterisiert werden. Dazu wurde Lactoferrin über einen Crosslinker mit Biotin markiert und kovalent mit möglichen Interaktionspartnern auf der bakteriellen Oberfläche verknüpft (Abb. 28A).

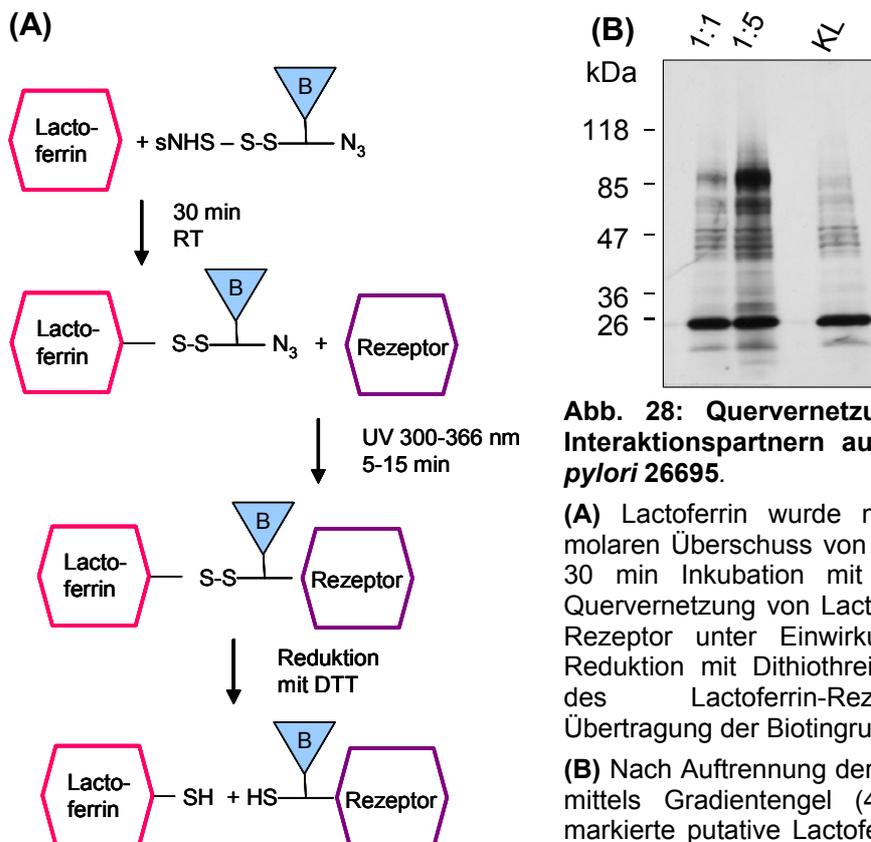


Abb. 28: Quervernetzung von Lactoferrin mit Interaktionspartnern auf der Oberfläche von *H. pylori* 26695.

(A) Lactoferrin wurde mit einem 1- bzw. 5-fach molaren Überschuss von Sulfo-SBED versetzt. Nach 30 min Inkubation mit *H. pylori* 26695 erfolgte Quervernetzung von Lactoferrin mit dem bakteriellen Rezeptor unter Einwirkung von UV-Licht. Durch Reduktion mit Dithiothreitol erfolgte eine Trennung des Lactoferrin-Rezeptor-Komplexes und Übertragung der Biotin-Gruppe auf den Rezeptor.

(B) Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE mittels Gradientengel (4-20%) wurde der Biotin-markierte putative Lactoferrin-Rezeptor von *H. pylori* 26695 im Immunoblot mit Hilfe eines Streptavidin-POX-AK detektiert. 1:1: Lactoferrin wurde mit einer äquimolaren Menge Sulfo-SBED versetzt; 1:5: 5-fach molarer Überschuss von Sulfo-SBED im Vergleich zu Lactoferrin; KL: Zelllysate unbehandelter *H. pylori* 26695

Als putativer Lactoferrin-Rezeptor konnte ein Protein der Größe von etwa 90-95 kDa identifiziert werden (Abb. 28B). In der Genomsequenz von *H. pylori* J99 wurden 3 Gene annotiert (*frpB*), die für eisenregulierte Proteine von etwa 90 kDa codieren [225] (Tab. 9).

Tab. 9: FrpB-Proteine der *H. pylori*-Stämme 26695 und J99

26695	Proteingröße (kDa)	J99	Proteingröße (kDa)
Hp1512	97,4	Jhp1405	97,6
Hp876	88,5	Jhp810	88,6
Hp916	27,8 ¹	Jhp851	90,8

¹Leserahmen unterbrochen, verkürztes Protein

Durch Transposon-Mutagenese wurden *hp1512* und *hp876* in *H. pylori* P12 bereits in früheren Arbeiten deletiert. Die resultierten Mutanten standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurden auf Bindung an Lactoferrin untersucht (Abb. 29).

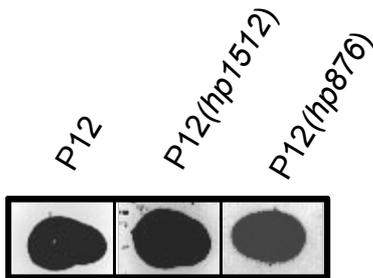


Abb. 29: Adhärenz der *frpB*-Mutanten P12(*hp1512*) und P12(*hp876*) und des Wildtypstamms P12wt an Lactoferrin. Die FITC-markierten Bakterien wurden 1h mit Lactoferrin inkubiert, welches zuvor auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht wurde.

Die beiden Mutanten P12(*hp1512*) und P12(*hp876*) zeigten keine veränderte Bindung an Lactoferrin im Vergleich zum Wildtyp. Demnach scheinen die Gene *hp1512* und *hp876* keinen dominanten Effekt auf die Lactoferrinbindung auszuüben.

6 Einfluss des Proteins OipA auf die Induktion der IL-8-Sekretion

H. pylori verfügt über einen Typ-IV Sekretionsapparat, mit dem nicht nur CagA als Effektorprotein in die Zielzelle transloziert wird, sondern auch die Synthese und Sekretion von Chemokinen, darunter IL-8, in der Wirtszelle induziert wird [67, 250].

Neben bestimmten Genen der *cag*-PAI, die bereits als essentiell für die Induktion nachgewiesen wurden, wurde auch ein äußeres Membranprotein von *H. pylori*, OipA,

in Zusammenhang mit der IL-8 Synthese gebracht. Die entsprechende isogene Mutante zeigte in Infektionsexperimenten eine um 50% reduzierte IL-8-Induktion [252]. Die Rolle von OipA in der IL-8 Sekretion wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert [161].

Aus diesem Grund sollte der Einfluss der *oipA*-Expression und des *cag*-PAI-Status auf die IL-8-Sekretion untersucht werden.

Hierfür wurden die in dieser Arbeit verwendeten klinischen *H. pylori*-Isolate nach OipA- und CagA-Produktion in vier Gruppen unterteilt (Tab. 8). Die Proteinproduktion war zuvor mittels Immunoblot untersucht worden (Tab. 6). Aufgrund der gezeigten Korrelation zwischen OipA- und CagA-Produktion (Tab. 4) war die Anzahl der Isolate, die nur eins der genannten Proteine produzierten, gering (n=6 bzw. n=17). Da die CagA-Produktion in der Regel mit einer intakten *cag*-PAI korreliert, wurde sie als Marker des positiven *cag*-PAI-Status gewählt.

Tab. 8: OipA- und CagA-Produktion von 200 klinischen *H. pylori*-Isolaten

	OipA+	OipA-
CagA+	118	6
CagA-	17	59

In den folgenden Experimenten wurden AGS-Zellen mit Vertretern der vier Gruppen infiziert und die sekretierte IL-8 Menge im Überstand mittels ELISA quantifiziert (Abb. 30). Als internen Standard wurde bei jedem Infektionsexperiment *H. pylori* 26695 gewählt, der die beiden Proteine CagA und OipA produziert.

Stämme, die sowohl *oipA* als auch *cagA* exprimierten, zeigten in der Regel starke IL-8-Induktionen, die im Vergleich zu *H. pylori* 26695 im Bereich von 60-130% lagen. Lediglich 7 der 48 untersuchten Stämme führten zu einer IL-8-Sekretion unter 60%.

Stämme, die weder CagA noch OipA produzierten, induzierten eine IL-8-Sekretion unter 20% im Vergleich zum Referenzstamm *H. pylori* 26695 (n=40).

Die 4 untersuchten Stämme des Typs CagA+/OipA- führten zu einer IL-8-Sekretion, die im Bereich von 30-50% im Vergleich zu *H. pylori* 26695 lag.

Die untersuchten CagA-/OipA+ Stämme (n=10) riefen eine Induktion unter 20% hervor.

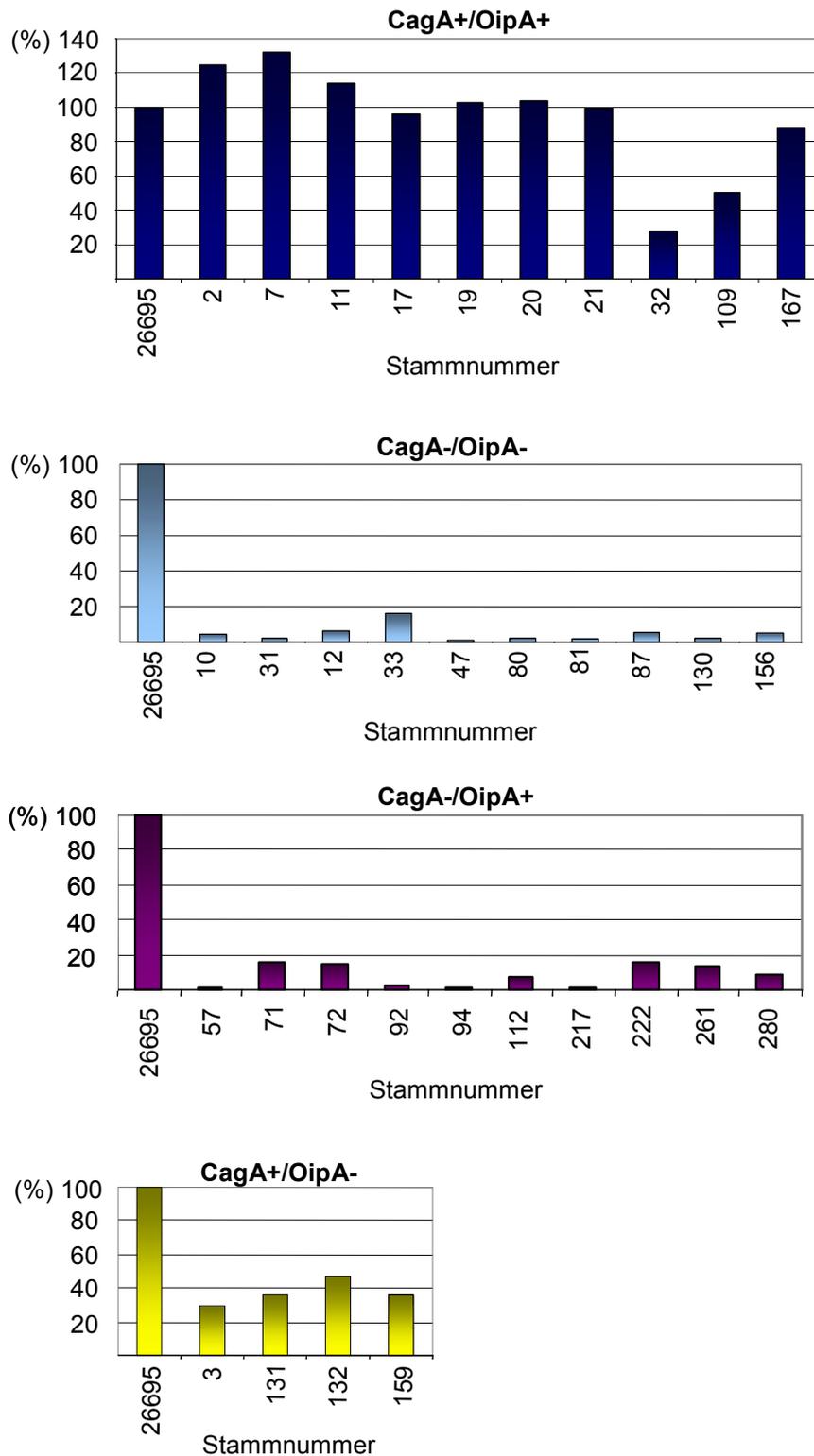


Abb. 30: IL-8-Induktion durch *H. pylori*-Isolate in AGS-Zellen. AGS-Zellen wurden mit *H. pylori* 4h infiziert und das in den Überstand sekretierte IL-8 mittels ELISA bestimmt. Die IL-8-Induktion wurde in Relation zu *H. pylori* 26695 (100%) ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die *cag*-PAI einen entscheidenden Einfluss auf die Induktion der IL-8-Sekretion ausübt. *OipA* interferiert mit der Cytokin-Induktion, jedoch im Vergleich zu der *cag*-PAI in geringerem Ausmaß.

V Diskussion

1 Variation der OMPs - Anpassung an den Wirt

H. pylori zeichnet sich durch ein großes Maß an genetischer Variabilität aus, die sowohl auf Mikro- (Unterschiede auf der Genebene) als auch auf Makrodiversität (Unterschiede auf der Genomebene) beruht [163]. Um über Jahrzehnte im menschlichen Magen persistieren zu können, muss *H. pylori* sich den verändernden Umweltbedingungen anpassen. Diese treten entweder als Folge der Immunantwort an der Magenschleimhaut auf oder werden durch Übertragung in ein anderes Wirtsindividuum verursacht. Eine wichtige Voraussetzung für die optimale Anpassung dürfte die einzigartige Vielfalt der äußeren Membranproteine von *H. pylori* sein. Mehr als 60 offene Leserahmen konnten aus den beiden Genomsequenzen der Stämme 26695 [225] und J99 [4] identifiziert werden, die für äußere Membranproteine (OMPs) codieren. Die OMPs konnten aufgrund von Sequenzhomologien in einzelne Gruppen unterteilt werden, von denen etwa 20 die HOP-Gruppe und 12 weitere Proteine die verwandte HOR-Gruppe bilden [3]. Alle bisher beschriebenen putativen Adhäsine der OMP-Familie sind Mitglieder der HOP-Gruppe, weshalb dieser eine größere Bedeutung bei der Adhärenz zugeschrieben wird.

Die Makrodiversität wird durch einen variablen Expressionsstatus der *omp*-Gene bedingt, der durch die natürliche Transformationskompetenz und genominterne Rekombination an Wirtsstrukturen angepasst wird. Für 11 *omp*-Gene, die so genannten *babA*-Paralogen, konnten stark ausgeprägte Homologien in den C- und N-Termini festgestellt werden, welche die genominterne Rekombination ermöglichen [4, 180, 225]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass eine *babA*-Mutante ihre Fähigkeit Le^b zu binden durch homologe Rekombination einer stillen *babA*-Genkopie in einen *babB*-Lokus wieder erlangte. Das daraus resultierende *babA/babB*-Hybridgen codierte für ein Fusionsprotein, welches in der Lage war, Le^b zu binden [13]. In einem Rhesusaffen-Modell wurden die Tiere mit *BabA*-positiven *H. pylori*-Stämmen infiziert. Eine Überprüfung des Genoms nach Reisolierung zeigte, dass in einem Teil der Isolate das *babB*-Gen in den *babA*-Lokus rekombiniert war. Diese Neuordnung der Gene wurde auch bei Stämmen aus Magenbiopsien beobachtet, was ihre klinische Relevanz unterstreicht [211].

Es erschien daher interessant, den Expressionsstatus verschiedener *omp*-Gene eines *H. pylori*-Kollektivs zu untersuchen, um anschließend Aussagen über mögliche Korrelationen treffen zu können. In dieser Arbeit wurde erstmals eine größere Anzahl an *H. pylori*-Stämmen (n=200) auf die Expression von 8 *omp*-Genen getestet.

Von den 200 untersuchten klinischen Isolaten produzierten alle die Proteine AlpA und AlpB und etwa 60% BabA, BabB bzw. CagA, das aufgrund der besonderen klinischen Relevanz in die Untersuchung aufgenommen worden war. BabC und Hp227, die zu der Adhäsinfamilie gezählt werden, aber noch nicht weiter charakterisiert werden konnten, wurden von 35% bzw. 73% der Stämme produziert. OipA, ein Protein, welches die IL-8-Induktion unterstützt, wurde von 68% und SabA von 38% der Isolate produziert.

Das *sabA*-Gen wird, wie auch *babB* und *oipA*, durch den SSM (*slipped-strand mispairing*)-Mechanismus reguliert. Dinucleotidwiederholungen (CT-repeats) in den 5'-Bereichen der Gene ermöglichen die zufällige Änderung der Expression [225]. Dieser Mechanismus scheint unter Pathogenen eine weit verbreitete Methode zu sein, sich Wirtsstrukturen anzupassen [84, 116, 243]. Die durch den SSM-Mechanismus variable Produktion des SabA-Adhäsins, welches an sialylierte Blutgruppenantigene der Magenschleimhaut bindet, könnte einer Subpopulation ein Entfernen von den Epithelzellen und damit ein Entkommen der Immunantwort ermöglichen [131]. Dieses Gleichgewicht zwischen Adhäsion und Ablösen von der Zelle dürfte die chronische Persistenz von *H. pylori* unterstützen.

Die Expression einzelner *omp*-Gene wurde in der Literatur bereits diskutiert. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Prozentsatz der BabA-produzierenden Isolate wurde durch andere Studien bestätigt. 40-60% europäischer Stämme produzieren demnach ein BabA-Adhäsins [72, 181]. Mit 71-96% liegt die Rate in außereuropäischen Ländern (Japan, Korea, Kolumbien, USA) deutlich höher [152, 205, 253]. Der Expressionsstatus der zitierten Studien basiert auf PCR-Analysen, die zwar auf die Anwesenheit eines Gens schließen lassen, jedoch keine Aussage über die tatsächliche Produktion des Proteins erlauben. Aus diesem Grund führten wir unsere Untersuchung unter Verwendung spezifischer Antikörper durch, die das Protein im Immunoblot detektierten.

Wir konnten zeigen, dass sich nahezu jeder *H. pylori*-Stamm durch ein individuelles OMP-Expressionsprofil auszeichnet. Unter den äußeren Membranproteinen konnte

lediglich die Korrelation zwischen der BabA- und der OipA-Produktion gezeigt werden. Alle anderen untersuchten OMPs wurden unabhängig voneinander exprimiert. Die BabA- und OipA-Produktion korrelierte zusätzlich mit jener von CagA. Dies konnte durch weitere Studien belegt werden [6, 72, 92, 249, 256]. Die beiden Proteine BabA und SabA vermitteln 2 voneinander unabhängige Phänotypen (vgl. Abb. 5). Deshalb entsprach es unseren Erwartungen, keine Korrelation ihrer Produktion nachweisen zu können, was in Einklang mit einer erst kürzlich veröffentlichten Studie steht [123].

Neben diesen drei Coexpressionen existieren möglicherweise noch weitere Korrelationen mit bisher unbekanntem oder noch nicht näher charakterisierten Adhäsinen.

In anschließenden Adhärenzversuchen konnten bekannte Bindungstypen bestätigt werden. Die meisten BabA-produzierenden Isolate adhärten an Le^b, das SabA-Adhäsine vermittelte die Bindung an Laminin. 11% der BabA-positiven und 5% der SabA-positiven *H. pylori*-Stämme waren jedoch nicht in der Lage, an ihren bekannten eukaryotischen Rezeptor zu binden und verfügten demnach über inaktive Adhäsine. Das Ausbleiben einer Le^b-Bindung trotz BabA-Produktion wurde in der Literatur bereits beschrieben [92, 102, 170]. Die Frage nach der Funktion der inaktiven Adhäsine konnte noch nicht vollständig beantwortet werden. Kürzlich wurde jedoch die Vermutung, dass sie als Adhäsine für andere Rezeptoren wirken und neue Bindungsspezifität verleihen, teilweise bestätigt.

Unter Le^b-bindenden *H. pylori*-Isolaten konnte eine Subpopulation identifiziert werden, die an Le^b-Antigene unabhängig von ihrer terminalen Modifikation adhärte (Le^b, ALe^b, BLe^b) (Abb. 31). Diese Stämme wurden daraufhin als Generalisten bezeichnet [8]. Eine weitere Gruppe der Stämme adhärte nur an unsubstituiertes Le^b, und einige zeigten alleinige ALe^b-Bindung (Spezialisten). Interessanterweise stammten die Le^b-Spezialisten aus Südamerika, in dessen Bevölkerung die Blutgruppe 0 deutlich überwiegt und hatten sich damit an die vorherrschenden Wirtsstrukturen angepasst. Das BabA-Adhäsine jener *H. pylori*-Stämme, die nur an das Antigen adhärten, wenn es mit einer Blutgruppe A-Determinanten substituiert war, erkannte die ursprüngliche Rezeptorstruktur nicht mehr und verlieh einen neuen Bindungsphänotyp [8].

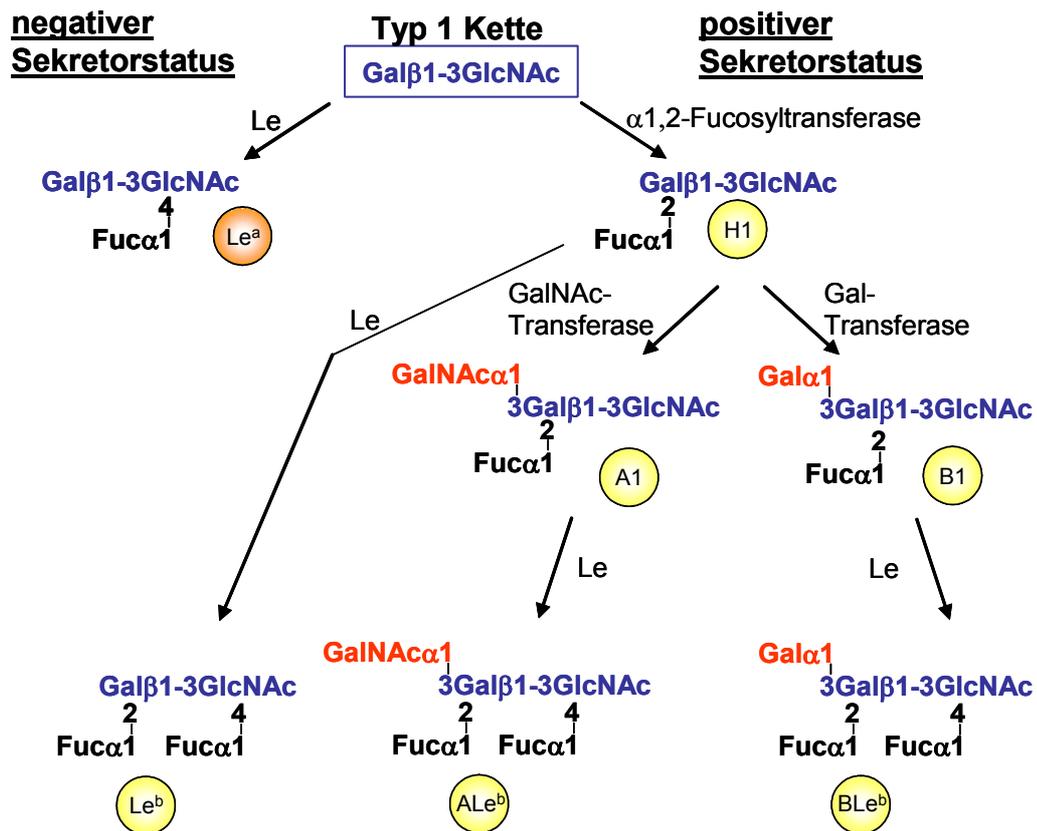


Abb. 31: Aufbau von Lewis-Antigenen. Die Übertragung von Fucose (Fuc) durch die $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase an eine terminale Galactose (Gal) führt zum H1-Antigen (Blutgruppe 0), welches durch die GalNAc- oder Gal-Transferase (Blutgruppe A oder B) modifiziert wird. Durch die Aktivität einer $\alpha 1,4$ -Fucosyltransferase (Le) werden die difucosylierten Blutgruppenantigene Le^b, ALe^b und BLe^b synthetisiert. Individuen mit einem negativen Sekretorstatus verfügen über keine $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase und exprimieren deshalb Le^a als dominantes Histo-Blutgruppenantigen der Magenschleimhaut. Eine Sialyltransferase kann aus Le^a das sialylierte Antigen s-Le^a synthetisieren (nicht dargestellt).

Als weitere Bindungspartner von *H. pylori* wurden in der Literatur Collagen IV und Fibronectin postuliert [228]. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte geklärt werden, dass der Proteinanteil von Fibronectin für die Adhärenz ausschlaggebend ist und die Kohlenhydratstrukturen daran unbeteiligt sind [239]. Alle in unserer Studie getesteten Isolate zeigten Adhäsion an Fibronectin, so dass diese Bindungseigenschaft keinem *omp*-Expressionsprofil zugeschrieben werden konnte. An Collagen IV adhärten nur 2 der 92 getesteten Stämme, wobei beide weder ein BabA- noch ein SabA-Protein produzierten. Gegenstand weiterer Studien wird die Identifizierung von Adhäsinen sein, die an diesen beiden Bindungen beteiligt sind bzw. die Abklärung, ob das Lipopolysaccharid (LPS) von *H. pylori* eventuell involviert ist.

2 Eingrenzung der Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins von *H. pylori*

Im Jahre 1993 wurde das Blutgruppenantigen Le^b als Rezeptor für *H. pylori* identifiziert [27]. Le^b stellt das dominante Antigen der Magenschleimhaut von Individuen dar, die sich durch den genetischen Status der Expression einer α 1,2-Fucosyltransferase auszeichnen (positiver Sekretorstatus) [60, 190] (vgl. Abb. 31). Dieses Enzym fucosyliert das H1-Antigen und führt damit zu der Oberflächenexposition von Le^b [78]. Der negative Sekretorstatus ist durch einen Le^a-dominanten Phänotyp der Magenschleimhaut charakterisiert.

Durch Rezeptoraffinitätschromatographie konnte das Adhäsins, welches an Le^b bindet, aufgereinigt werden (BabA) [102].

In weiteren Studien konnte Le^b auf der Oberfläche des Glycoproteins MUC5AC nachgewiesen werden [125, 233]. Seitdem die Bindung von *H. pylori* an diese Mucinkomponente bekannt ist, wird MUC5AC als primärer Rezeptor für *H. pylori* im Magen postuliert [125, 233, 234].

Aufgrund der Beobachtung inaktiver, d. h. nicht Le^b-bindender BabA-Proteine in diversen *H. pylori*-Stämmen dieser Arbeit sowie in anderen Studien [92, 102, 170], stellt sich die Frage nach der Lokalisation der Bindungsdomäne im Adhäsins. Sequenzvergleiche zwischen den *babA*-Genen von J99, CCUG17875, die für ein aktives BabA-Protein codieren und jenem von *H. pylori* 26695, welcher ein inaktives Adhäsins produziert, ließen Aminosäureabweichungen in einer variable Mittelregion erkennen, die sich an den weitgehend konservierten N-Terminus anschließt [4, 180, 225] (vgl. Abb. 13).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Hybridgen konstruiert werden, welches für ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus eines aktiven und dem C-Terminus eines inaktiven BabA-Adhäsins codiert. Durch Immunfluoreszenz konnte die korrekte Lokalisation des N-Terminus an der Oberfläche der äußeren Membran festgestellt werden, die eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität des Fusionsproteins darstellt.

Die Adhärenz der Komplementanten Hp *babA** an Le^b konnte nicht nachgewiesen werden, was auf die geringe Produktion des BabA*-Fusionsproteins zurückzuführen sein dürfte. Es konnten zwar Punktmutationen im Hybridgen gezeigt werden, die zu

Aminosäureaustauschen mit Polaritätsveränderung des Proteins führen, jedoch war der Basenaustausch an Position 770 im Genom in jeder der untersuchten Komplementanten vorhanden. Es scheint daher plausibel, dass es sich hierbei um eine Mutation des in unserem Labor verwendeten *H. pylori* J99 oder um einen Fehler in der Genomsequenz handelt [4]. Da der Modellstamm in den Adhärenzversuchen an Le^b adhärierte, sind die Punktmutationen als Ursache der fehlenden Adhäsion unwahrscheinlich.

In einem zweiten Ansatz wurden fünf verschieden lange *babA*-Fragmente translational an den N-Terminus der AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*)-Autotransporter-Domäne fusioniert und durch den Autodisplay-Mechanismus des *E. coli*-Stammes UT5600 DE3 an der Bakterienoberfläche präsentiert.

Autotransporter sind unter gramnegativen Bakterien weit verbreitet. Sie bestehen aus einer N-terminalen Passagierdomäne, einem *Linker*-Peptid und einer C-terminalen Transporterdomäne (β -Domäne) [105]. Ihre physiologische Hauptaufgabe ist die Translokation von Virulenzfaktoren durch die Zellhülle an die Oberfläche [89]. Der genaue Mechanismus, durch den die Passagierdomäne an die Oberfläche transloziert wird, ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. In dem weitgehend akzeptierten „Haarnadel-Modell“ wird das Passagierprotein durch eine Pore geschleust, die durch die β -Domäne geformt wird und sich in der äußeren Membran befindet [145, 178, 220]. Das *Linker*-Peptid dirigiert die Passagierdomäne durch die Pore und ist für die Funktion des Autotransporters essentiell [145] (vgl. Abb. 21).

Der einfache Aufbau aus einer Polypeptidkette, die alle notwendigen Eigenschaften aufweist, um eine N-terminale Passagierdomäne an die Zelloberfläche zu translozieren [91, 105], zeichnet Autotransporter als ideale Kandidaten zur Präsentation fremder Proteine aus. Dieses System wurde deshalb schon erfolgreich eingesetzt, um u. a. Epitope, die Cholera toxin B-Untereinheit und β -Lactamase an der Oberfläche von *E. coli* präsentieren zu lassen [112, 120, 144, 187].

Mittels Immunfluoreszenz wurde der N-Terminus der Fusionsproteine der *E. coli*-Stämme P1923 und P1924 auf der Oberfläche detektiert. In anschließenden Adhärenzversuchen wurde die Bindung der BabA-präsentierenden *E. coli*-Stämme an Le^b getestet. Dabei zeigte sich, dass die Fusion 3 für ein Protein codierte, dass zwar, eventuell aufgrund einer ungünstigen Konformation, nicht durch

Immunfluoreszenz detektiert werden konnte, jedoch schwache Bindung an das Blutgruppenantigen zeigte.

E. coli P1923 produzierte ein BabA-Fusionsprotein, dessen N-Terminus an der Oberfläche optimal für den Antikörper präsentiert wurde und starke Bindung an das getestete Antigen vermittelte. Dadurch konnte die Bindungsdomäne des BabA-Adhäsins auf den Aminosäurebereich 21-362 eingegrenzt werden.

Der N-Terminus des Fusionsproteins von *E. coli* P1924 wurde an der Oberfläche präsentiert, es konnte jedoch keine Adhärenz beobachtet werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine ungünstige Faltung des Proteins bedingt durch den zusätzlichen Aminosäurebereich 363-444 im Vergleich zu Fusion 4.

In weiteren Arbeiten gilt es nun das Bindungsmotiv in dieser Region näher zu bestimmen. Das kann durch ortsspezifische Mutagenese einzelner Aminosäuren oder durch weitere Verkürzung des *babA*-Fragments für *aida*-Fusionen geschehen.

3 Einfluss des *alpAB*-Genlocus auf die Adhärenz

Wie bereits in den Vorarbeiten gezeigt werden konnte, spielen die Proteine AlpA und AlpB eine wichtige Rolle im Adhärenzgeschehen. Sie vermitteln die Bindung von *H. pylori* an Kato-III-Zellen, einer humanen Magenkarzinomzelllinie [166] und sind für die Adhärenz an Magenbiopsieschnitte essentiell [161, 167].

Laut Strukturvorhersagen ist AlpA ein integrales Membranprotein, für dessen C-Terminus eine Struktur aus 14 antiparallelen amphipathischen β -Faltblättern postuliert wurde [167]. Diese Strukturen haben die Tendenz, eine β -Fasstruktur in der äußeren Membran zu bilden, welche als Pore dienen kann. Ein C-terminaler Phenylalaninrest und die Anzahl von mindestens 14 Transmembrandomänen sind für Autotransporterproteine charakteristisch [105, 167], so dass ein Transport analog des AIDA-Adhäsins (vgl. Abb. 21) plausibel erscheint. Der N-Terminus scheint im Gegensatz zu denen von BabA und SabA im Periplasma zu liegen, da Versuche, ihn mit einem Antikörper auf der Oberfläche zu detektieren, erfolglos verliefen [167].

Den Ergebnissen der Adhärenzversuche an Gewebeschnitte zufolge lässt sich deutlich der AlpAB-vermittelte Bindungsphänotyp vom BabA-spezifischen Phänotyp unterscheiden (Abb. 5). In der vorliegenden Arbeit konnte eine *alpAB*-Abhängigkeit der Bindung an sialylierte Strukturen beobachtet werden. In Bindungsversuchen ging

die SabA-vermittelte Adhärenz der Stämme *H. pylori* J99 und CCUG17874 an Laminin, einem sialylierten Glycoprotein, nach Mutagenese der Gene *alpAB* verloren. Im Gegensatz zu der BabA-vermittelten Bindung scheint die Adhäsion durch SabA funktionell abhängig von der Expression der Gene *alpAB* zu sein.

Durch Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass SabA zwar nach Mutagenese der *alpAB*-Gene weiterhin an der Oberfläche exponiert wird, aber die Konformation verändert zu sein scheint. SabA war nach Mutagenese der *alpAB*-Gene leichter für Trypsin zugänglich und wurde stärker degradiert. Waren die Proteine AlpA und AlpB auf der Oberfläche anwesend, führte das zu einem Schutz vor Proteolyse. Zusätzlich konnte der stabilisierende Einfluss von AlpAB durch die erleichterte Extraktion von SabA aus der äußeren Membran der *alpAB*-Mutante durch Behandlung mit einem nicht-ionischen Tensid (Octyl β -glucosid) gezeigt werden. Die Verankerung von SabA in der äußeren Membran wird demnach durch die *alpAB*-Expression verstärkt (persönliche Mitteilung von Dr. Boren, Umea, Schweden).

Diese Beobachtungen sprechen für einen funktionellen Zusammenhang zwischen AlpAB und SabA und unterstützen die Theorie, dass AlpA und AlpB als eine Plattform fungieren und andere Adhäsine bei ihrer Präsentation auf der äußeren Membran unterstützen. Dabei würden AlpA und AlpB, die Sequenzvergleichen zufolge nicht der Adhäsinfamilie angehören [3], nicht selber als Adhäsine agieren. Dafür spricht auch die Tatsache, dass trotz zahlreicher Versuche noch kein Rezeptor für AlpAB identifiziert werden konnte [160] (Abb. 32).

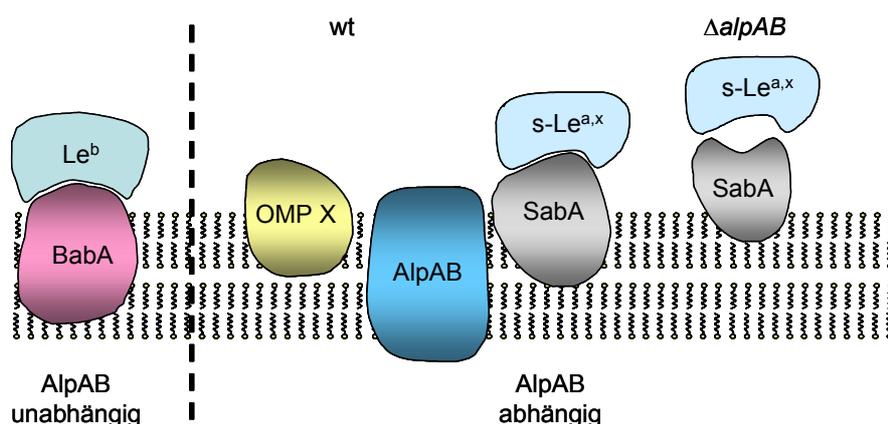


Abb. 32: AlpAB-Abhängigkeit der Adhärenzphänotypen. Das Adhäsine BabA bindet AlpAB-unabhängig an Le^b, welches auf der Oberfläche der Magenepithelzellen und des Mucinglycoproteins MUC5AC exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist die durch SabA und mögliche andere Adhäsine (OMP X) vermittelte Bindung AlpAB-abhängig. Eine Erklärung hierfür wäre, dass SabA und weitere putative Adhäsine in der *alpAB*-Mutante nicht mehr richtig präsentiert werden.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse der Adhärenzassays an Magenbiopsieschnitte lässt sich zusammenfassend eine stabilisierende Wirkung von AlpAB auf SabA und möglicherweise auf weitere Adhäsine postulieren. Das BabA-Protein vermittelt einen *alpAB*-unabhängigen Adhärenzphänotyp und wird nicht durch die *sabA*-Expression beeinflusst [131].

4 Bedeutung von *H. pylori*-Adhäsinen für die Pathogenese

Über die klinische Relevanz der Adhäsine von *H. pylori* liegen bisher wenig fundierte Ergebnisse vor. Das am besten daraufhin untersuchte Adhäsin ist das von Ilver *et al.* 1998 aufgereinigte Protein BabA [102].

Während in früheren Studien Typ-I-Stämme, also *H. pylori*-Stämme, die *cagA* und *vacA* exprimieren, mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen wie Duodenalulcus und Magenkarzinom in Verbindung gebracht wurden [10, 20, 248], sprachen sich weitere Studien für eine zusätzliche Abhängigkeit von BabA aus und prägten den Begriff der dreifach positiven Stämme (*cagA*⁺, *vacA*⁺, *babA*⁺) [72, 170, 224]. Auch die Schwere der hervorgerufenen Gastritis scheint mit der *babA*-Expression zu korrelieren [181, 183]. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung einer höheren Kolonisationsdichte von BabA-positiven *H. pylori*-Stämmen in Geweben mit hoher Le^b-Expression gestärkt [205].

In einer weiteren Studie wiesen Yamaoka *et al.* häufiger das *babA*-Gen in Isolaten aus Patienten mit Duodenalulcus nach als bei solchen aus Gastritispatienten (83-96% versus 71-89%) [253]. Da auch die Isolate aus Gastritispatienten sehr häufig BabA produzierten, resultierte daraus die Ansicht, dass sich weder die ausschließliche *babA*-Expression noch der dreifach positive Produktionsstatus von VacA, CagA und BabA als Voraussage für ein zu erwartendes Krankheitsbild eignet.

Zudem widerlegten weitere Studien den Zusammenhang zwischen der Le^b-Expression und der Entwicklung *H. pylori*-assoziiierter Erkrankungen [88, 109, 207, 230]. Zwei weitere Studien postulierten Le^a und damit den negativen Sekretorstatus als Risikofaktor für Ulcuserkrankungen [88]. Zusammenfassend erscheint das BabA-Adhäsin als Indikator für Ulzera fraglich.

Die *H. pylori*-Stämme unserer Untersuchungen stammten zu einem großen Prozentsatz aus Kindern bzw. jungen Erwachsenen, weshalb Folgeerkrankungen erwartungsgemäß selten auftraten. Alle Isolate aus Patienten, die an einem Magenkarzinom litten (n=9), produzierten BabA, wohingegen nur 50% der Stämme aus Ulcuspatienten (n=4) mit BabA assoziiert waren. Diese Ergebnisse sind konträr zu den Beobachtungen von Gerhard *et al.*, in deren Studie alle Isolate aus Patienten mit Ulcusleiden (n=23) und 77,8% der *H. pylori*-Stämme aus Patienten mit Magenkarzinom (n=27) das BabA-Protein produzierten [72].

Die Isolate aus Gastritispatienten produzierten zu 50% das BabA-Adhäsion. Damit liegt kein Unterschied in Bezug auf die BabA-Produktion zu den Stämmen aus Ulcuspatienten vor. Yamaoka *et al.* berichteten zwar über eine häufigere Produktion in Stämmen, die mit Duodenalulcus assoziiert sind, verfügten jedoch über ein größeres Kollektiv und untersuchten *H. pylori*-Isolate aus asiatischen sowie amerikanischen Ländern, die generell häufiger *babA*-Expression aufweisen [253] [152, 205].

In unseren Untersuchungen wurde BabB von allen 4 *H. pylori*-Stämmen aus Ulcuspatienten produziert. Ob hier ein Zusammenhang besteht, wird in weiteren Studien unter Einbeziehen eines größeren Kollektivs zu klären sein.

Yamaoka *et al.* zeigten eine Assoziation zwischen dem äußeren Membranprotein OipA und dem Auftreten von duodenalem Ulcus [249]. OipA stellt einen Virulenzfaktor dar, dessen Gen durch den sogenannten SSM (*slipped-strand mispairing*)-Mechanismus reguliert wird, basierend auf der Anzahl der CT-Dinucleotiden in der 5'-Region des Gens. Aufgrund häufiger Expression auch in Gastritispatienten (64%), kann der *oipA*-Status jedoch nur bedingt als Marker für das Auftreten von Ulcus (90%) als Folgeerkrankung herangezogen werden [249]. Die Stämme aus Ulcuspatienten der vorliegenden Arbeit sind zu nur 50% mit der Expression von *oipA* assoziiert.

Erschwert wird die Zuordnung von Virulenzfaktoren zu bestimmten Krankheitsbildern durch bestehende Coexpressionen. Auf die Korrelation zwischen der OipA- und BabA-, OipA- und CagA- sowie BabA- und CagA-Produktion wurde bereits eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass noch kein eindeutiger Marker für das Auftreten von Folgeerkrankungen unter den Adhäsinen gefunden wurde. Es sollte

daher in Zukunft mehr Gewicht auf Untersuchungen bezüglich der Rolle anderer Adhäsine in der Pathogenese gelegt werden. Da unserer Studie zufolge nur 68% bzw. 58% der *H. pylori*-Stämme OipA bzw. BabA produzieren, wobei letzteres auch zu einem gewissen Prozentsatz inaktiv sein kann, erscheint es plausibel, dass andere OMPs wie AlpAB oder SabA einen entscheidenden Beitrag zum Verlauf des Infektionsprozesses liefern.

5 Rolle des äußeren Membranproteins OipA bei der Induktion von IL-8

Äußere Membranproteine übernehmen nicht nur Aufgaben bei der Adhärenz, sondern können auch Signaltransduktionswege der Wirtszelle beeinflussen. Das äußere Membranprotein Invasin von *Yersinia spp.* vermittelt Adhäsion an eukaryotische $\alpha_5\beta_1$ -Intergrine. Diese Interaktion induziert sowohl die Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle als auch eine Induktion der IL-8-Sekretion über einen NF κ B-abhängigen Signalweg [197].

Für die *H. pylori*-induzierte IL-8-Sekretion in Epithelzellen kristallisierten sich zwei plausible Hypothesen heraus. Die Translokationstheorie geht von einem Effektor aus, der zusätzlich zu CagA in die Zielzelle transloziert wird. Die Rezeptor-Hypothese basiert auf einer direkten Interaktion des Sekretionsapparates mit einem noch unbekanntem Rezeptor auf der Epithelzelloberfläche [67]. In beiden Fällen kommt es zu einer anschließenden Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 [73, 157].

Zusätzlich scheint das äußere Membranprotein OipA an der IL-8-Induktion beteiligt zu sein. Die Mutagenese des *hp638*-Gens, codierend für OipA, führte in 81% der *cag*-PAI-positiven Stämme zu einer Reduktion der IL-8-Werte auf ungefähr 50% [252]. In anderen Studien konnte zwischen OipA-Produktion und IL-8-Sekretion keine Korrelation gezeigt werden [5, 164].

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der OipA-Produktion und einem *cag*-PAI-positiven Status auf die IL-8-Sekretion untersucht. Um Aussagen über die Beteiligung der beiden Proteine unabhängig voneinander treffen zu können, wurden die Infektionsexperimente mit Vertretern aus vier Gruppen durchgeführt.

CagA- und OipA-positive Stämme induzierten die IL-8-Sekretion am stärksten, wohingegen doppelt negative Stämme zu einer sehr geringen Induktion führten. Interessanterweise traten auch Unterschiede zwischen den zwei einfach positiven Gruppen auf. Während einfach CagA-positive Stämme zu einer Induktion führten, die zwischen 30-50% der IL-8-Sekretion des doppelt positiven Referenzstammes *H. pylori* 26695 lag, sank bei Abwesenheit von CagA die Sekretion auf unter 20%. Damit konnten die Ergebnisse von Yamaoka *et al.* bestätigt werden, die nach Mutagenese des *oipA*-Gens in *cag*-PAI-positiven Stämmen eine Reduktion der IL-8-Sekretion um 50% beobachteten [252]. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass vor einem *cag*-PAI-negativen Hintergrund der OipA-Einfluss vernachlässigbar gering ausfällt, d. h. OipA nicht selbst in der Lage ist, IL-8 zu induzieren.

Bedeutender hinsichtlich der IL-8-Sekretion ist der *cag*-PAI-positiv Status. Ob CagA selber als Induktor wirkt oder die *cag*-PAI, wird in der Literatur noch immer kontrovers diskutiert. Während in früheren Studien das CagA-Protein mit der Cytokinausschüttung in Zusammenhang gebracht wurde [43], wurde in den folgenden Jahren zunehmend deutlich, dass die *cag*-PAI für die IL-8-Induktion verantwortlich ist [32, 73, 200, 203]. Diese Annahme steht in Einklang mit den beiden eingangs erwähnten Theorien. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie stellten Brandt *et al.* dies jedoch erneut in Frage, indem sie doch für CagA eine unterstützende Rolle postulierten. Durch Austausch der *cagA*-Gene konnten Stämme mit ursprünglich hoher IL-8-Induktion in Stämme umgewandelt werden, die niedrige IL-8-Sekretion induzierten und vice versa [28].

In dieser Arbeit erfolgte die Einteilung der vier Gruppen aufgrund der großen Anzahl der untersuchten Stämme nach Produktion von OipA und CagA. Der Nachweis einer intakten *cag*-PAI durch Amplifizierung der entsprechenden Gene (ca. 30 offene Leseraster je nach Stamm) war im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Aus diesem Grund kann die Aussage bezüglich der IL-8-Induktion durch CagA bzw. *cag*-PAI nicht differenziert werden. In der Regel korreliert die CagA-Produktion mit einer intakten *cag*-PAI, da diese für die Translokation des Effektorproteins erforderlich ist [67].

15% der OipA- und CagA-positiven Isolate führten zu Induktionen unter 60% des Referenzwertes. Dies dürfte auf Mutationen in der *cag*-PAI zurück zu führen sein, die die CagA-Produktion nicht beeinflussen, sich jedoch auf die IL-8-Induktion in bisher

unbekannter Weise auswirken. Dieses Verhalten wurde nach Mutagenese der *cag*-PAI-Gene *hp526*, *hp538* und *hp545* beobachtet. Der Typ-IV-Sekretionsapparat der entsprechenden Deletionsmutanten war in der Lage, CagA in die Zielzelle zu translozieren, die IL-8-Induktion lag jedoch nur zwischen 40 und 80% des Wildtypstammes [67].

6 Lactoferrinbindung durch *H. pylori*

Mikrobielle Eisenaufnahmesysteme und Eisenspeicherproteine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese. Einerseits ist Eisen als Cofaktor für eine Vielzahl von Enzymen und Redoxproteinen unerlässlich, andererseits ist es ungebunden im Cytoplasma sowie im Extrazellulärraum des Organismus toxisch. Deshalb liegt Eisen sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten an Eisenträgersubstanzen wie Lactoferrin, Hämoglobin und Transferrin gebunden vor. Aufgrund der geringen Konzentration an Eisen in Geweben des menschlichen Organismus, haben insbesondere pathogene Bakterien spezielle Mechanismen entwickelt, um ihren Eisenbedarf zu decken. Ein weit verbreiteter Mechanismus ist die Synthese und Sekretion niedermolekularer Substanzen, die so genannten Siderophore, welche Fe^{3+} durch Chelatbindung aus der Bindung an Eisenspeicherproteinen des Wirts lösen. Die Bindung an Rezeptoren der äußeren Membran induziert entweder die Aufnahme des Eisen-Siderophor-Komplexes oder ungebundenen Eisens [29, 242]. Andere pathogene Bakterien, wie beispielsweise Neisserien und Pasteurellen, verfügen über spezifische Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, Eisen direkt von Trägerproteinen, wie Lactoferrin oder Transferrin, aufzunehmen [77, 80]. *N. meningitidis* verfügt über ein solches Lactoferrin-bindendes Protein (LbpA), welches eine Größe von 98 kDa aufweist und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte [177].

Im Magen unterliegt die Eisenkonzentration deutlichen Schwankungen. Beträchtliche Mengen an Eisen werden aus der Nahrung oder den Epithelzellen im Zuge der Immunantwort auf *H. pylori* freigesetzt [129, 235]. Aufgrund des niedrigen pH-Werts und der geringen Sauerstoffkonzentration im Magen, liegt Eisen überwiegend in reduzierter Form vor. *H. pylori* verfügt deshalb im Gegensatz zu anderen Bakterien sowohl über Fe^{3+} - als auch über Fe^{2+} -Citrat-Transporter [237]. Durch Komplexierung

von Eisen an der Oberfläche der Magenschleimhaut durch Lactoferrin treten für *H. pylori* auch Perioden von Eisenmangel auf [235].

Da die Siderophor-Produktion von *H. pylori* bisher kontrovers diskutiert wird [99, 101] und gezeigt werden konnte, dass *H. pylori* humanes Lactoferrin als Eisenquelle nutzen kann [99], scheint die Existenz eines Lactoferrin-bindenden Proteins (Lbp) plausibel. Bei der Annotierung des Genoms von *H. pylori* ließen sich jedoch keine Lbp zuordnen [4, 225].

Durch Quervernetzung mit Lactoferrin konnte in dieser Arbeit ein ca. 90 kDa großes Protein als Bindungspartner auf der Bakterienoberfläche von *H. pylori* identifiziert werden. Die Quervernetzung wurde mit dem trifunktionalen quervernetzenden Molekül Sulfo-SBED durchgeführt, welches bereits bei der Charakterisierung der BabA-Le^b-Interaktion erfolgreich eingesetzt worden war [102]. Die Trifunktionalität dieses Reagenz ermöglicht die Detektion des Proteins direkt im Immunoblot über eine Biotingruppe und bietet somit eine Erleichterung bei der Größenbestimmung uncharakterisierter Proteine.

Aufgrund von Sequenzhomologien zu dem FrpB-Protein von Neisserien wurden 3 Gene von *H. pylori* als *frpB* annotiert. FrpB von *N. meningitidis* ist ein Eisen-reguliertes äußeres Membranprotein (OMP) [18], welches unter eisenarmen Kulturbedingungen produziert wird [176].

In *H. pylori* J99 codieren die *frpB*-Gene für drei ca. 90 kDa große Proteine. Eine Rastermutation in *H. pylori* 26695 bedingt die Verkürzung des Leserahmens von *hp916*, welches demnach für ein deutlich kürzeres Protein codiert. Auch wenn das FrpB-Protein bei Neisserien keine Lactoferrin-Bindung vermittelt, ist es eine interessante Fragestellung, ob die bisher uncharakterisierten FrpB-Proteine von *H. pylori* diese Aufgabe übernehmen.

Nach Mutagenese von *hp876* bzw. *hp1512* zeigte *H. pylori* in Bindungsversuchen keine verminderte Adhärenz an Lactoferrin, weshalb ein dominanter Einfluss der beiden Gene diesbezüglich ausgeschlossen werden kann.

Ziel weiterer Arbeiten wird es sein, Doppel- und Tripelmutanten herzustellen, um additive Einflüsse auf die Lactoferrinbindung in Adhärenzversuchen zu untersuchen.

Desweiteren wird versucht werden, das quervernetzte Protein näher zu charakterisieren. Ein möglicher Ansatz wäre hierzu die massenspektroskopische Untersuchung nach Auftrennung über 2-D-Gelelektrophorese.

Die Klärung dieser Fragestellung ist auch für die Therapie einer *H. pylori*-Infektion von besonderem Interesse. Es wurde bereits gezeigt, dass oral zugeführtes Lactoferrin die Effizienz der bisherigen Therapieschemata erhöht [48]. Die kompetitive Hemmung der Bindung an Lactoferrin der Magenschleimhaut, welches bei Patienten mit ausgeprägter Gastritis in erhöhtem Maße exprimiert wird [129], wird durch die antimikrobielle Eigenschaft von Lactoferrin begleitet [149].

VI Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CA	Karzinom
Cam	Chloramphenicol
C-Terminus	carboxyterminaler Teil eines Proteins
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphat
DR	<i>direct repeats</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbend assay</i>
EPEC	enteropathogener <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	und andere
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
(x)g	x-faches der Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HSA	humanes Serumalbumin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IgX	Immunglobulin der Klasse X
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kDa	kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
Le ^x	Lewis ^x
LPS	Lipopolysaccharid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure

mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	Anzahl
NBT	Nitrotetrazoliumblauschlorid
NF κ B	Nukleärer Faktor kappa B
N-Terminus	aminoterminaler Teil eines Proteins
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x
OMP	äußeres Membranprotein
<i>orf</i>	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
P _{<i>flaA</i>}	Promotor des <i>flaA</i> -Gens von <i>H. pylori</i>
P _{<i>lac</i>}	Promotor des <i>lac</i> -Gens von <i>E. coli</i>
POX	Meerrettichperoxidase
x ^R	x-resistent
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SBED	Sulfosuccinimidyl-2-[6-(Biotinamido)-2-(<i>p</i> -Azidobenzamido)Hexanamido] Ethyl-1,3'-Dithiopropionat)
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>spp.</i>	<i>sub species</i>
Tab.	Tabelle
TAMRA	5-(und 6-)Carboxytetramethylrhodamin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tn	Transposon
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
U	Unit
UV	ultraviolett
v/V	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Einheiten

A	Ampere
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
F	Farad

g	Gramm
h	Stunde
kb	kilo-Basenpaare
l	Liter
M	Mol pro Liter
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt

Gennamen

<i>aida</i>	<i>adhesin involved in diffuse adherence</i>
<i>alpA, alpB</i>	<i>adherence-associated lipoprotein A und B</i>
<i>aphA3</i>	<i>Aminoglycosid-3-Phosphotransferase II</i>
<i>babA</i>	<i>blood group antigen binding adhesin A</i>
<i>cagA</i>	<i>cytotoxin-associated gene A</i>
<i>cag-PAI</i>	<i>cag-Pathogenitätsinsel</i>
<i>cat</i>	<i>Chloramphenicol-Acetyl-Transferase</i>
<i>frpB</i>	<i>Fe-regulated protein B</i>
<i>lacZ</i>	<i>β-Galactosidase</i>
<i>oipA</i>	<i>outer inflammatory protein A</i>
<i>sabA</i>	<i>sialic acid binding adhesin A</i>
<i>vacA</i>	<i>vacuolating cytotoxin A</i>

2 OMP-Expressionsprofil

Tab. A1: OMP-Expressionsprofil der 200 klinischen *H. pylori*-Isolate

Stamm- nummer	Alp A AK 214	Alp B AK 262	Bab A AK 277	Sab A AK 278	Bab B AK 276	Hp 317 AK 275	Hp 227 AK 281	Oip A AK 282	CagA AK 257
1	++	++	++	-	++	++	++	++	++
2	++	++	-	-	+	++	++	++	++
3	++	++	+	-	-	-	++	-	++
4	++	++	-	+	-	++	++	++	-
5	++	++	++	+	++	-	++	++	++
6	++	++	+	-	-	-	++	++	++
7	++	++	++	-	-	-	-	++	++
8	++	++	-	-	++	++	-	-	-
10	++	++	-	-	+	-	+	-	-
11	++	++	++	+	++	-	+	++	++
12	++	++	-	-	++	-	-	-	-
14	++	++	-	-	++	-	-	-	-
16-1	++	++	-	-	-	-	-	-	-
16-2	++	++	-	-	++	-	-	-	-
17	++	++	++	-	++	-	+	++	++
19	++	++	++	-	-	-	-	++	++
20	++	++	++	-	-	-	+	++	++
21	++	++	++	+	++	-	+	++	++
22	++	++	++	++	-	++	++	++	++
23	++	++	++	++	-	+	++	+	++
24	++	++	++	++	-	-	++	++	++
25	++	++	-	+	++	++	++	++	++
27	++	++	-	-	++	++	++	-	+
28	++	++	-	-	-	-	-	-	-
31	++	++	+	-	++	++	-	-	-
32	++	++	++	++	++	++	-	++	++
33	++	++	+	-	-	++	-	-	-
36	++	++	-	-	-	-	+	-	-
37	++	++	++	-	-	-	-	+	++
38	++	++	-	+	-	-	++	++	+
39	++	++	-	+	-	-	++	++	+
40	++	++	++	-	-	-	++	++	++
41	+	++	-	-	-	-	+	+	+
42	++	+	++	+	+	++	++	++	+
43	+	++	-	-	-	++	++	+	-
45	++	++	++	++	-	++	++	+	++
46	++	++	+	++	++	++	-	-	-
47	++	++	-	-	++	++	++	-	-
48	++	++	++	+	-	+	++	+	++
49	+	++	-	-	++	+	+	-	-
50-1	++	++	++	-	-	-	++	++	++
50-2	++	++	++	-	-	-	++	++	++
52	++	++	+	+	++	++	++	++	++
54	++	++	-	+	++	-	++	+	++
55	++	++	++	-	++	-	+	+	++
56	++	++	++	++	-	-	+	++	++
57	++	++	+	-	++	-	++	++	-
59	++	++	+	-	-	++	++	++	+
60	++	++	++	-	++	-	++	++	++
61	++	++	-	-	-	-	++	-	-

Stamm- nummer	Alp A AK 214	Alp B AK 262	Bab A AK 277	Sab A AK 278	Bab B AK 276	Hp 317 AK 275	Hp 227 AK 281	Oip A AK 282	CagA AK 257
63	+	++	-	++	-	++	-	++	-
65	++	++	+	-	++	++	++	++	++
67	++	++	+	++	-	++	++	++	-
70-1	++	++	-	-	+	-	++	-	-
70-2	++	++	-	-	-	-	++	-	-
71	++	++	++	-	-	+	++	++	-
72	++	++	++	-	++	++	-	++	-
73	++	++	++	-	++	-	++	++	++
74	++	++	++	+	-	-	++	++	++
76	++	++	++	-	-	-	-	++	++
77	++	++	++	+	-	++	++	++	++
78	++	++	++	-	-	-	++	+	++
79	++	++	++	+	++	++	++	++	++
80	++	++	-	-	+	++	+	-	-
81	++	++	-	-	+	-	+	-	-
85	++	++	++	-	-	-	++	++	++
87	++	++	-	-	++	+	-	-	-
88	+	++	-	-	-	-	-	+	+
89	+	++	++	-	++	-	-	++	-
90	++	++	+	+	+	-	++	++	++
92	+	++	+	+	++	-	++	++	-
94	++	++	++	++	-	-	-	+	-
96	++	++	+	+	-	-	++	-	-
98	+	++	-	-	++	-	++	++	++
100	+	++	-	++	++	-	++	++	++
101	+	++	++	-	-	+	+	++	++
104	+	++	++	-	++	-	+	++	++
105	++	++	-	++	-	+	+	++	++
106	++	++	++	-	++	-	-	++	++
107	++	++	++	-	++	-	++	++	++
109	++	++	++	++	-	-	++	++	++
110	++	++	++	+	++	++	++	++	++
112	++	++	-	-	++	-	++	+	-
113	+	++	++	++	-	-	++	-	-
114	++	++	-	-	++	+	-	-	-
116	+	++	++	++	-	-	++	-	-
123	+	++	++	+	-	-	++	++	++
124	+	++	++	+	-	-	-	++	++
127	+	++	+	-	-	+	++	-	-
128	++	++	++	+	++	-	++	++	++
129	+	++	++	-	-	-	++	++	++
130	+	++	-	-	-	-	++	-	-
131	++	++	++	-	-	-	-	-	++
132	++	++	++	-	++	-	++	-	++
133	++	++	-	+	-	++	++	++	++
134	++	++	-	-	++	-	++	-	-
135	++	++	++	-	-	-	++	++	++
138	++	++	++	+	++	++	-	++	+
139-1	++	++	++	+	-	-	++	++	++
139-2	++	++	++	+	++	+	+	++	++
140	++	++	-	-	++	++	-	-	-
142	+	++	-	-	-	+	-	-	-
143	+	++	-	-	-	-	++	-	-
144	+	++	-	-	+	-	+	+	++

Stamm- nummer	Alp A AK 214	Alp B AK 262	Bab A AK 277	Sab A AK 278	Bab B AK 276	Hp 317 AK 275	Hp 227 AK 281	Oip A AK 282	CagA AK 257
145	+	++	-	-	+	-	++	+	+
146	++	++	-	-	++	++	-	-	-
148	++	++	++	+	++	-	+	++	++
150	++	++	+	+	++	-	+	++	+
151	++	++	-	-	-	-	+	++	+
152	++	++	-	-	++	+	+	++	-
154	+	++	+	-	-	-	+	++	+
155	++	++	++	-	-	-	+	-	-
156	++	++	-	-	+	+	+	-	-
157	+	++	-	+	-	-	++	++	+
158	++	++	-	-	++	-	+	++	+
159	+	++	-	-	++	-	+	-	+
160	++	++	++	-	++	-	+	++	+
161	+	++	++	++	++	-	+	++	+
163-1	++	++	-	-	++	-	-	-	-
163-2	++	++	-	-	-	-	-	-	-
164	+	++	-	-	++	-	++	-	-
165	++	++	+	-	-	-	++	++	+
166	++	++	-	-	++	-	++	-	-
167	++	++	++	++	-	-	++	++	+
168	++	++	++	++	-	+	++	++	++
171	++	++	-	-	-	+	++	++	++
172	++	++	++	-	++	+	++	-	-
173	++	++	+	-	++	-	++	-	-
175	++	++	++	++	++	-	++	+	++
176	++	++	++	+	-	-	-	++	++
177	++	++	+	-	++	-	-	++	++
179	++	++	++	-	++	++	++	++	++
180	++	++	-	-	-	-	++	++	++
183	++	++	+	+	-	+	++	++	++
184	++	++	++	+	++	-	+	++	++
185	++	++	-	-	++	++	-	-	-
186	++	++	-	+	++	-	-	++	+
187	++	++	+	-	+	-	++	++	+
188	++	++	-	-	-	-	-	-	-
189	++	++	+	+	++	-	++	++	++
190	++	++	-	-	++	+	-	++	++
193	++	++	-	-	++	-	++	++	++
194	++	++	-	-	-	-	-	-	-
195	++	++	++	+	++	-	+	++	++
196	++	++	+	+	-	-	++	++	++
197	++	++	+	+	++	++	++	++	++
198	++	++	-	++	-	-	++	++	++
199	+	++	-	-	-	-	-	-	+
201	++	++	+	++	-	-	++	++	+
202	++	++	-	++	++	-	+	-	-
203	++	++	+	-	++	++	-	-	-
204	++	++	++	+	++	-	+	++	++
205	++	++	++	-	++	-	+	++	++
207	++	++	++	-	++	-	++	++	+
208	++	++	-	-	+	++	-	-	-
210	++	++	-	-	-	++	++	++	++
211	++	++	+	-	++	-	++	++	++
212	++	++	-	++	-	-	++	++	+

Stamm- nummer	Alp A AK 214	Alp B AK 262	Bab A AK 277	Sab A AK 278	Bab B AK 276	Hp 317 AK 275	Hp 227 AK 281	Oip A AK 282	CagA AK 257
213	++	++	++	-	++	-	++	++	+
214	++	++	-	-	++	-	++	-	-
215	++	++	++	-	++	-	-	++	+
216	++	++	-	++	++	-	++	-	-
217	++	++	-	-	++	-	-	+	-
218	++	++	++	++	++	-	++	++	++
219	++	++	++	-	-	+	-	++	+
220	++	++	++	-	++	-	+	++	++
222	++	++	++	-	++	-	++	++	-
223	++	++	++	-	++	-	-	-	-
226	++	++	++	-	-	-	++	-	-
228	++	++	-	++	++	-	-	-	-
229	++	++	++	++	++	-	-	++	++
230	++	++	-	++	+	++	++	-	-
231	++	++	++	++	+	+	+	++	++
232	++	++	++	++	-	+	++	++	++
233	++	++	++	-	-	++	++	-	-
235	++	++	++	-	-	-	-	++	++
236	++	++	++	-	++	-	++	++	++
237	++	++	-	-	++	+	+	-	-
238	++	++	-	-	++	-	-	-	-
239	++	++	-	++	++	+	++	++	++
240	++	++	+	-	-	++	++	++	++
241	++	++	-	-	++	-	++	++	+
244	++	++	-	-	++	+	++	-	-
245	++	++	++	-	++	+	++	++	++
246	++	++	+	-	-	++	-	-	-
247	++	++	-	-	++	++	++	-	-
248	++	++	-	-	++	++	-	-	-
251	++	++	++	++	++	++	++	++	+
253	++	++	-	++	++	-	-	-	-
255	++	++	++	-	-	-	+	++	+
260	++	++	-	-	++	++	++	++	-
261	++	++	-	-	++	-	-	++	-
262	++	++	-	++	++	-	-	++	-
264	++	++	+	++	++	++	++	-	-
265	++	++	-	++	++	++	++	++	++
266	++	++	++	-	-	-	++	++	++
268	++	++	+	-	-	-	++	++	++
270	++	++	++	+	++	++	++	++	++
280	++	+	-	+	+	-	+	+	-
336	++	++	++	++	++	-	-	+	+

-: keine Produktion des Proteins; + bis ++: zunehmende Expressionsstärke

Stammnummern wurden aus der ursprünglichen Stammsammlung der Arbeitsgruppe übernommen.

VII Literaturverzeichnis

1. 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. **61**:1-241.
2. **Aebischer, T., B. Lucas, J. Koesling, D. Bumann, and T. F. Meyer.** 2000. How CD4(+) T cells may eliminate extracellular gastric *Helicobacter*? J. Biotechnol. **83**:77-84.
3. **Alm, R. A., J. Bina, B. M. Andrews, P. Doig, R. E. Hancock, and T. J. Trust.** 2000. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. Infect. Immun. **68**:4155-4168.
4. **Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature **397**:176-180.
5. **Ando, T., R. M. Peek, Jr., Y. C. Lee, U. Krishna, K. Kusugami, and M. J. Blaser.** 2002. Host cell responses to genotypically similar *Helicobacter pylori* isolates from United States and Japan. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **9**:167-175.
6. **Ando, T., R. M. Peek, D. Pride, S. M. Levine, T. Takata, Y. C. Lee, K. Kusugami, E. A. van der, E. J. Kuipers, J. G. Kusters, and M. J. Blaser.** 2002. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. J. Clin. Microbiol. **40**:239-246.
7. **Asfeldt, A. M., M. L. Lochen, B. Straume, S. E. Steigen, J. Florholmen, R. Goll, O. Nestegard, and E. J. Paulssen.** 2004. Accuracy of a monoclonal antibody-based stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Scand. J. Gastroenterol. **39**:1073-1077.
8. **Aspholm-Hurtig, M., G. Dailide, M. Lahmann, A. Kalia, D. Ilver, N. Roche, S. Vikstrom, R. Sjostrom, S. Linden, A. Backstrom, C. Lundberg, A. Arnqvist, J. Mahdavi, U. J. Nilsson, B. Velapatino, R. H. Gilman, M. Gerhard, T. Alarcon, M. Lopez-Brea, T. Nakazawa, J. G. Fox, P. Correa, M. G. Dominguez-Bello, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, S. Normark, I. Carlstedt, S. Oscarson, S. Teneberg, D. E. Berg, and T. Boren.** 2004. Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. Science **305**:519-522.
9. **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J. Biol. Chem. **270**:17771-17777.
10. **Atherton, J. C., R. M. Peek, Jr., K. T. Tham, T. L. Cover, and M. J. Blaser.** 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology **112**:92-99.
11. **Backert, S., S. Moese, M. Selbach, V. Brinkmann, and T. F. Meyer.** 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. Mol. Microbiol. **42**:631-644.
12. **Backert, S., E. Ziska, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Fauconnier, P. R. Jungblut, M. Naumann, and T. F. Meyer.** 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. Cell. Microbiol. **2**:155-164.

13. **Bäckström, A., C. Lundberg, D. Kersulyte, D. E. Berg, T. Boren, and A. Arnqvist.** 2004. Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:16923-16928.
14. **Bamford, K. B., J. Bickley, J. S. Collins, B. T. Johnston, S. Potts, V. Boston, R. J. Owen, and J. M. Sloan.** 1993. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. Gut **34**:1348-1350.
15. **Bamford, K. B., X. Fan, S. E. Crowe, J. F. Leary, W. K. Gourley, G. K. Luthra, E. G. Brooks, D. Y. Graham, V. E. Reyes, and P. B. Ernst.** 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. Gastroenterology **114**:482-492.
16. **Bayerdorffer, E., A. Neubauer, B. Rudolph, C. Thiede, N. Lehn, S. Eidt, and M. Stolte.** 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. Lancet **345**:1591-1594.
17. **Beachey, E. and I. Ofek.** 1976. Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. J. Exp. Med. **143**:759-771.
18. **Beucher, M. and P. F. Sparling.** 1995. Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding FrpB, a major iron-regulated, outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. **177**:2041-2049.
19. **Bjorkholm, B., M. Sjolund, P. G. Falk, O. G. Berg, L. Engstrand, and D. I. Andersson.** 2001. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:14607-14612.
20. **Blaser, M. J.** 1996. The bacteria behind ulcers. Sci. Am. **274**:104-107.
21. **Blaser, M. J.** 1999. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. J. Infect. Dis. **179**:1523-1530.
22. **Blaser, M. J., G. I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, G. N. Stemmermann, and A. Nomura.** 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. **55**:2111-2115.
23. **Bock, K., M. E. Breimer, A. Brignole, G. C. Hansson, K. A. Karlsson, G. Larson, H. Leffler, B. E. Samuelsson, N. Stromberg, C. S. Eden, and .** 1985. Specificity of binding of a strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal alpha 1-4Gal-containing glycosphingolipids. J. Biol. Chem. **260**:8545-8551.
24. **Bode, G., P. Malfertheiner, A. Strohle, F. Mauch, M. Nilius, and H. Ditschuneit.** 1992. [Polymorphism in *Helicobacter pylori*-a key function in recurrence of infection?]. Med. Klin. (Munich) **87**:179-184.
25. **Bode, G., F. Mauch, and P. Malfertheiner.** 1993. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiol. Infect. **111**:483-490.
26. **Boettcher, A.** 1874. Zur Genese des perforierenden Magengeschwürs. Dorpater Med. Z. **5**:148.
27. **Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science **262**:1892-1895.
28. **Brandt, S., T. Kwok, R. Hartig, W. Konig, and S. Backert.** 2005. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**:9300-9305.

29. **Braun, V. and H. Killmann.** 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**:104-109.
30. **Brenner, H., V. Arndt, C. Stegmaier, H. Ziegler, and D. Rothenbacher.** 2004. Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am. J. Epidemiol.* **159**:252-258.
31. **Buhrdorf, R., C. Forster, R. Haas, and W. Fischer.** 2003. Topological analysis of a putative virB8 homologue essential for the *cag* type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:213-217.
32. **Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14648-14653.
33. **Christie, P. J.** 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* **179**:3085-3094.
34. **Churin, Y., E. Kardalidou, T. F. Meyer, and M. Naumann.** 2001. Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection. *Mol. Microbiol.* **40**:815-823.
35. **Correa, P.** 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **5**:477-481.
36. **Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burrone, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5791-5795.
37. **Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli.** 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**:1328-1333.
38. **Cover, T. L. and M. J. Blaser.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**:10570-10575.
39. **Cover, T. L., U. S. Krishna, D. A. Israel, and R. M. Peek, Jr.** 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* **63**:951-957.
40. **Cover, T. L., M. K. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser.** 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* **269**:10566-10573.
41. **Craanen, M. E., W. Dekker, P. Blok, J. Ferwerda, and G. N. Tytgat.** 1992. Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. *Gut* **33**:16-20.
42. **Crabtree, J. E.** 1996. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10 Suppl 1**:29-37.
43. **Crabtree, J. E., S. M. Farmery, I. J. Lindley, N. Figura, P. Peichl, and D. S. Tompkins.** 1994. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J. Clin. Pathol.* **47**:945-950.
44. **Czajkowsky, D. M., H. Iwamoto, T. L. Cover, and Z. Shao.** 1999. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:2001-2006.

45. **D'Elíos, M. M., M. Manghetti, M. De Carli, F. Costa, C. T. Baldari, D. Burróni, J. L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete.** 1997. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* **158**:962-967.
46. **Daffe, M. and G. Etienne.** 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber. Lung Dis.* **79**:153-169.
47. **Dhaenens, L., F. Szczebara, and M. O. Husson.** 1997. Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65**:514-518.
48. **Di Mario, F., G. Aragona, N. Dal Bo, G. M. Cavestro, L. Cavallaro, V. Iori, G. Comparato, G. Leandro, A. Pilotto, and A. Franze.** 2003. Use of bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication. *Dig. Liver Dis.* **35**:706-710.
49. **Dixon, M. F.** 1995. Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* **9**:467-486.
50. **Donnenberg, M. S.** 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* **406**:768-774.
51. **Dowsett, S. A. and M. J. Kowolik.** 2003. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **14**:226-233.
52. **Drumm, B., G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, and P. M. Sherman.** 1990. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **322**:359-363.
53. **Dubnau, D.** 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:217-244.
54. **Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:720-741.
55. **Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **59**:2470-2475.
56. **Eaton, K. A., S. Suerbaum, C. Josenhans, and S. Krakowka.** 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect. Immun.* **64**:2445-2448.
57. **Edwards, N. J., M. A. Monteiro, G. Faller, E. J. Walsh, A. P. Moran, I. S. Roberts, and N. J. High.** 2000. Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. *Mol. Microbiol.* **35**:1530-1539.
58. **El Serag, H. B., A. Sonnenberg, M. M. Jamal, J. M. Inadomi, L. A. Crooks, and R. M. Feddersen.** 1999. Corpus gastritis is protective against reflux oesophagitis. *Gut* **45**:181-185.
59. **Engvall, E.** 1977. Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. *Med. Biol.* **55**:193-200.
60. **Evans, D. J., Jr. and D. G. Evans.** 2000. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter.* **5**:183-195.
61. **Evans, D. J., Jr., D. G. Evans, T. Takemura, H. Nakano, H. C. Lampert, D. Y. Graham, D. N. Granger, and P. R. Kviety.** 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* **63**:2213-2220.
62. **Falk, P., T. Boren, and S. Normark.** 1994. Characterization of microbial host receptors. *Methods Enzymol.* **236**:353-374.

63. **Fan, X. J., A. Chua, C. N. Shahi, J. McDevitt, P. W. Keeling, and D. Kelleher.** 1994. Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H pylori* colonisation. *Gut* **35**:1379-1384.
64. **Ferrero, R. L., V. Cussac, P. Courcoux, and A. Labigne.** 1992. Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J. Bacteriol.* **174**:4212-4217.
65. **Finlay, B. B. and S. Falkow.** 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**:210-230.
66. **Fischer, W., R. Buhrdorf, E. Gerland, and R. Haas.** 2001. Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **69**:6769-6775.
67. **Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**:1337-1348.
68. **Fischer, W., D. Schwan, E. Gerland, G. E. Erlenfeld, S. Odenbreit, and R. Haas.** 1999. A plasmid-based vector system for the cloning and expression of *Helicobacter pylori* genes encoding outer membrane proteins. *Mol. Gen. Genet.* **262**:501-507.
69. **Fox, J. G., B. M. Edriss, E. B. Cabot, C. Beaucage, J. C. Murphy, and K. S. Probst.** 1986. *Campylobacter*-like organisms isolated from gastric mucosa of ferrets. *Am. J. Vet. Res.* **47**:236-239.
70. **Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099-1102.
71. **Geis, G., S. Suerbaum, B. Forsthoff, H. Leying, and W. Opferkuch.** 1993. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **38**:371-377.
72. **Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, and C. Prinz.** 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12778-12783.
73. **Glocker, E., C. Lange, A. Covacci, S. Bereswill, M. Kist, and H. L. Pahl.** 1998. Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappaB activation. *Infect. Immun.* **66**:2346-2348.
74. **Gold, B. D., M. Huesca, P. M. Sherman, and C. A. Lingwood.** 1993. *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* bind to common lipid receptors in vitro. *Infect. Immun.* **61**:2632-2638.
75. **Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Collins, L. Sly, W. McConnel, and W. E. S. Harper.** 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:397-405.
76. **Granström, M., Y. Tindberg, and M. Blennow.** 1997. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol.* **35**:468-470.
77. **Gray-Owen, S. D. and A. B. Schryvers.** 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* **4**:185-191.
78. **Green, C.** 1989. The ABO, Lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. *FEMS Microbiol. Immunol.* **1**:321-330.

79. **Gribbon, L. T. and M. R. Barer.** 1995. Oxidative metabolism in nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate-enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3379-3384.
80. **Griffith, E.** 1987. The iron-uptake system of pathogenic bacteria, p. 69-138. *In* J. J. Bullen and E. Griffith, Iron and infection: molecular, physiological and clinical aspects. John Wiley&Sons, Chichester, United Kingdom.
81. **Haas, R., T. F. Meyer, and J. P. van Putten.** 1993. Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **8**:753-760.
82. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer, and H. Tschäpe.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.
83. **Hahn, H. P.** 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Gene* **192**:99-108.
84. **Hammerschmidt, S., A. Muller, H. Sillmann, M. Muhlenhoff, R. Borrow, A. Fox, J. van Putten, W. D. Zollinger, R. Gerardy-Schahn, and M. Frosch.** 1996. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol. Microbiol.* **20**:1211-1220.
85. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
86. **Harris, P. R., H. L. Mobley, G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, and P. D. Smith.** 1996. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* **111**:419-425.
87. **Heilmann, K. L. and F. Borchard.** 1991. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut* **32**:137-140.
88. **Hein, H. O., P. Suadicani, and F. Gyntelberg.** 1997. Genetic markers for peptic ulcer. A study of 3387 men aged 54 to 74 years: the Copenhagen Male Study. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**:16-21.
89. **Henderson, I. R. and J. P. Nataro.** 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* **69**:1231-1243.
90. **Henderson, I. R., J. P. Nataro, J. B. Kaper, T. F. Meyer, S. K. Farrand, D. L. Burns, B. B. Finlay, and G. J. St, III.** 2000. Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **8**:352.
91. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **6**:370-378.
92. **Hennig, E. E., R. Mernaugh, J. Edl, P. Cao, and T. L. Cover.** 2004. Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA. *Infect. Immun.* **72**:3429-3435.
93. **Hessey, S. J., J. Spencer, J. I. Wyatt, G. Sobala, B. J. Rathbone, A. T. Axon, and M. F. Dixon.** 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* **31**:134-138.
94. **Heuermann, D. and R. Haas.** 1995. Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene* **165**:17-24.

95. **Heuermann, D. and R. Haas.** 1998. A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **257**:519-528.
96. **Higashi, H., A. Nakaya, R. Tsutsumi, K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ishikawa, M. Higuchi, A. Takahashi, Y. Kurashima, Y. Teishikata, S. Tanaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2004. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J. Biol. Chem.* **279**:17205-17216.
97. **Ho, S. B., K. Takamura, R. Anway, L. L. Shekels, N. W. Toribara, and H. Ota.** 2004. The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig. Dis. Sci.* **49**:1598-1606.
98. **Holmes, D. S. and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
99. **Husson, M. O., D. Legrand, G. Spik, and H. Leclerc.** 1993. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. *Infect. Immun.* **61**:2694-2697.
100. **Igarashi, M., Y. Kitada, H. Yoshiyama, A. Takagi, T. Miwa, and Y. Koga.** 2001. Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.* **69**:816-821.
101. **Illingworth, D. S., K. S. Walter, P. L. Griffiths, and R. Barclay.** 1993. Siderophore production and iron-regulated envelope proteins of *Helicobacter pylori*. *Zentralbl. Bakteriol.* **280**:113-119.
102. **Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373-377.
103. **Itoh, T., Y. Wakatsuki, M. Yoshida, T. Usui, Y. Matsunaga, S. Kaneko, T. Chiba, and T. Kita.** 1999. The vast majority of gastric T cells are polarized to produce T helper 1 type cytokines upon antigenic stimulation despite the absence of *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol.* **34**:560-570.
104. **Jose, J. and S. Handel.** 2003. Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *Chembiochem.* **4**:396-405.
105. **Jose, J., F. Jahmig, and T. F. Meyer.** 1995. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol. Microbiol.* **18**:378-380.
106. **Karttunen, R., T. Karttunen, H. P. Ekre, and T. T. MacDonald.** 1995. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut* **36**:341-345.
107. **Kato, S., K. Nakayama, T. Minoura, M. Konno, H. Tajiri, T. Matsuhisa, and K. Iinuma.** 2004. Comparison between the ¹³C-urea breath test and stool antigen test for the diagnosis of childhood *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol.* **39**:1045-1050.
108. **Katoh, M., D. Saito, T. Noda, S. Yoshida, Y. Oguro, Y. Yazaki, T. Sugimura, and M. Terada.** 1993. *Helicobacter pylori* may be transmitted through gastrofiberscope even after manual Hyamine washing. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**:117-119.
109. **Keller, R., K. C. Dinkel, S. U. Christl, and W. Fischbach.** 2002. Interrelation between ABH blood group O, Lewis(B) blood group antigen, *Helicobacter pylori* infection, and occurrence of peptic ulcer. *Z. Gastroenterol.* **40**:273-276.
110. **Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.

111. **Klein, P. D., D. Y. Graham, A. Gaillour, A. R. Opekun, and E. O. Smith.** 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology. Working Group. *Lancet* **337**:1503-1506.
112. **Konieczny, M. P., M. Suhr, A. Noll, I. B. Autenrieth, and S. M. Alexander.** 2000. Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**:321-332.
113. **Konno, M., N. Fujii, S. Yokota, K. Sato, M. Takahashi, K. Sato, E. Mino, and T. Sugiyama.** 2005. Five-Year Follow-Up Study of Mother-to-Child Transmission of *Helicobacter pylori* Infection Detected by a Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting Method. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2246-2250.
114. **Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect. Immun.* **69**:5080-5087.
115. **Kudo, T., Z. Z. Nurgalieva, M. E. Conner, S. Crawford, S. Odenbreit, R. Haas, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka.** 2004. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and *oipA* gene switch status. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2279-2281.
116. **Kupsch, E. M., B. Knepper, T. Kuroki, I. Heuer, and T. F. Meyer.** 1993. Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells. *EMBO J.* **12**:641-650.
117. **Labigne, A., V. Cussac, and P. Courcoux.** 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J. Bacteriol.* **173**:1920-1931.
118. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
119. **Langenberg, W., E. A. Rauws, J. H. Oudbier, and G. N. Tytgat.** 1990. Patient-to-patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. *J. Infect. Dis.* **161**:507-511.
120. **Lattemann, C. T., J. Maurer, E. Gerland, and T. F. Meyer.** 2000. Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* **182**:3726-3733.
121. **Lee, A., J. Fox, and S. Hazell.** 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect. Immun.* **61**:1601-1610.
122. **Lee, A., S. L. Hazell, J. O'Rourke, and S. Kouprach.** 1988. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect. Immun.* **56**:2843-2850.
123. **Lehours, P., A. Menard, S. Dupouy, B. Bergey, F. Richy, F. Zerbib, A. Ruskone-Fourmestreaux, J. C. Delchier, and F. Megraud.** 2004. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect. Immun.* **72**:880-888.
124. **Leying, H., S. Suerbaum, G. Geis, and R. Haas.** 1992. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* **6**:2863-2874.
125. **Linden, S., H. Nordman, J. Hedenbro, M. Hurtig, T. Boren, and I. Carlstedt.** 2002. Strain- and blood group-dependent binding of *Helicobacter pylori* to human gastric MUC5AC glycoforms. *Gastroenterology* **123**:1923-1930.
126. **Lindholm, C., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, and A. M. Svennerholm.** 1998. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**:5964-5971.

127. **Lingwood, C. A., M. Huesca, and A. Kuksis.** 1992. The glycerolipid receptor for *Helicobacter pylori* (and exoenzyme S) is phosphatidylethanolamine. *Infect. Immun.* **60**:2470-2474.
128. **Lingwood, C. A., G. Wasfy, H. Han, and M. Huesca.** 1993. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **61**:2474-2478.
129. **Luqmani, Y. A., T. A. Campbell, C. Bennett, R. C. Coombes, and I. M. Paterson.** 1991. Expression of lactoferrin in human stomach. *Int. J. Cancer* **49**:684-687.
130. **Mahdavi, J., T. Boren, C. Vandenbroucke-Grauls, and B. J. Appelmelk.** 2003. Limited role of lipopolysaccharide Lewis antigens in adherence of *Helicobacter pylori* to the human gastric epithelium. *Infect. Immun.* **71**:2876-2880.
131. **Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**:573-578.
132. **Majewski, S. I. and C. S. Goodwin.** 1988. Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J. Infect. Dis.* **157**:465-471.
133. **Makristathis, A., A. M. Hirschl, P. Lehours, and F. Megraud.** 2004. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* **9 Suppl 1**:7-14.
134. **Malaty, H. M., D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., and D. Y. Graham.** 1992. *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology* **103**:813-816.
135. **Malaty, H. M. and D. Y. Graham.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**:742-745.
136. **Malfertheiner, P.** 2000. *Helicobacter pylori-Von der Grundlage zur Therapie.* Thieme-Verlag **2.Auflage.**
137. **Malfertheiner, P., F. Megraud, C. O'Morain, A. P. Hungin, R. Jones, A. Axon, D. Y. Graham, and G. Tytgat.** 2002. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**:167-180.
138. **Marchetti, M., B. Arico, D. Burroni, N. Figura, R. Rappuoli, and P. Ghiara.** 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* **267**:1655-1658.
139. **Marshall, B. and C. S. Goodwin.** 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:68.
140. **Marshall, B. J., J. A. Armstrong, D. B. McGeachie, and R. J. Glancy.** 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* **142**:436-439.
141. **Marshall, B. J., L. J. Barrett, C. Prakash, R. W. McCallum, and R. L. Guerrant.** 1990. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* **99**:697-702.
142. **Marshall, B. J. and J. R. Warren.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-1315.
143. **Mattsson, A., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, I. Ahlstedt, and A. Svennerholm.** 1998. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**:2705-2712.

144. **Maurer, J., J. Jose, and T. F. Meyer.** 1997. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:794-804.
145. **Maurer, J., J. Jose, and T. F. Meyer.** 1999. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J. Bacteriol.* **181**:7014-7020.
146. **Megraud, F., V. Neman-Simha, and D. Brugmann.** 1992. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**:1858-1863.
147. **Merz, A. J. and M. So.** 2000. Interactions of pathogenic *neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:423-457.
148. **Messing, J. and J. Vieira.** 1992. A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. 1982. *Biotechnology* **24**:202-209.
149. **Miehlke, S., R. Reddy, M. S. Osato, P. P. Ward, O. M. Conneely, and D. Y. Graham.** 1996. Direct activity of recombinant human lactoferrin against *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2593-2594.
150. **Mitchell.** 1992. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J. Infect. Dis.* **166**:149-153.
151. **Miyabayashi, H., K. Furihata, T. Shimizu, I. Ueno, and T. Akamatsu.** 2000. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **5**:30-37.
152. **Mizushima, T., T. Sugiyama, Y. Komatsu, J. Ishizuka, M. Kato, and M. Asaka.** 2001. Clinical relevance of the *babA2* genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2463-2465.
153. **Mobley, H. L., M. J. Cortesia, L. E. Rosenthal, and B. D. Jones.** 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **26**:831-836.
154. **Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco.** 1998. Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* **187**:135-140.
155. **Morgner, A., N. Lehn, L. P. Andersen, C. Thiede, M. Bennedsen, K. Trebesius, B. Neubauer, A. Neubauer, M. Stolte, and E. Bayerdorffer.** 2000. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* **118**:821-828.
156. **Nakano, Y., Y. Yoshida, Y. Yamashita, and T. Koga.** 1995. Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors. *Gene* **162**:157-158.
157. **Naumann, M. and J. E. Crabtree.** 2004. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol.* **12**:29-36.
158. **Nedenskov-Sorensen, P., G. Bukholm, and K. Bovre.** 1990. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* **161**:365-366.
159. **Novak, R. and E. Tuomanen.** 1999. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* **14**:209-217.
160. **Odenbreit, S.** 2005. Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**:317-324.

161. **Odenbreit, S., G. Faller, and R. Haas.** 2002. Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:247-256.
162. **Odenbreit, S., B. Gebert, J. Püls, W. Fischer, and R. Haas.** 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell. Microbiol.* **3**:21-31.
163. **Odenbreit, S. and R. Haas.** 2002. *Helicobacter pylori*: impact of gene transfer and the role of the cag pathogenicity island for host adaptation and virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **264**:1-22.
164. **Odenbreit, S., H. Kavermann, J. Püls, and R. Haas.** 2002. CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from alpAB, HopZ and bab group outer membrane proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:257-266.
165. **Odenbreit, S., J. Püls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**:1497-1500.
166. **Odenbreit, S., M. Till, and R. Haas.** 1996. Optimized BlaM-transposon shuttle mutagenesis of *Helicobacter pylori* allows the identification of novel genetic loci involved in bacterial virulence. *Mol. Microbiol.* **20**:361-373.
167. **Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas.** 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.* **31**:1537-1548.
168. **Odenbreit, S., B. Wieland, and R. Haas.** 1996. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J. Bacteriol.* **178**:6960-6967.
169. **Ogura, K., S. Maeda, M. Nakao, T. Watanabe, M. Tada, T. Kyutoku, H. Yoshida, Y. Shiratori, and M. Omata.** 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* **192**:1601-1610.
170. **Olfat, F. O., Q. Zheng, M. Oleastro, P. Volland, T. Boren, R. Karttunen, L. Engstrand, R. Rad, C. Prinz, and M. Gerhard.** 2005. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **44**:151-156.
171. **Osaki, T., H. Yamaguchi, H. Taguchi, M. Fukuda, H. Kawakami, H. Hirano, S. Watanabe, A. Takagi, and S. Kamiya.** 1998. Establishment and characterisation of a monoclonal antibody to inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* **47**:505-512.
172. **Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelman, and G. D. Friedman.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med* **330**:1267-1271.
173. **Pathak, C. M., D. K. Bhasin, and K. L. Khanduja.** 2004. Urea breath test for *Helicobacter pylori* detection: present status. *Trop. Gastroenterol.* **25**:156-161.
174. **Pellicano, R., S. Fagoonee, G. Palestro, M. Rizzetto, N. Figura, and A. Ponzetto.** 2004. [The diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: guidelines from the Maastricht 2-2000 Consensus Report]. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* **50**:125-133.
175. **Perez-Perez, G. I., D. Rothenbacher, and H. Brenner.** 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* **9 Suppl 1**:1-6.

176. **Pettersson, A., A. Maas, D. van Wassenaar, L. P. van der, and J. Tommassen.** 1995. Molecular characterization of FrpB, the 70-kilodalton iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **63**:4181-4184.
177. **Pettersson, A., L. P. van der, J. T. Poolman, and J. Tommassen.** 1993. Molecular characterization of the 98-kilodalton iron-regulated outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **61**:4724-4733.
178. **Pohlner, J., R. Halter, K. Beyreuther, and T. F. Meyer.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**:458-462.
179. **Prakobphol, A., T. Boren, W. Ma, P. Zhixiang, and S. J. Fisher.** 2005. Highly glycosylated human salivary molecules present oligosaccharides that mediate adhesion of leukocytes and *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* **44**:2216-2224.
180. **Pride, D. T., R. J. Meinersmann, and M. J. Blaser.** 2001. Allelic Variation within *Helicobacter pylori* *babA* and *babB*. *Infect. Immun.* **69**:1160-1171.
181. **Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard.** 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* **61**:1903-1909.
182. **Puls, J., W. Fischer, and R. Haas.** 2002. Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **43**:961-969.
183. **Rad, R., M. Gerhard, R. Lang, M. Schoniger, T. Rosch, W. Schepp, I. Becker, H. Wagner, and C. Prinz.** 2002. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J. Immunol.* **168**:3033-3041.
184. **Ramirez-Ramos, A., R. H. Gilman, R. Leon-Barua, S. Recavarren-Arce, J. Watanabe, G. Salazar, W. Checkley, J. McDonald, Y. Valdez, L. Cordero, and J. Carrasco.** 1997. Rapid recurrence of *Helicobacter pylori* infection in Peruvian patients after successful eradication. Gastrointestinal Physiology Working Group of the Universidad Peruana Cayetano Heredia and The Johns Hopkins University. *Clin. Infect. Dis.* **25**:1027-1031.
185. **Ribeiro, M. L., A. P. Godoy, Y. H. Benvengo, C. C. Ecclissato, S. Mendonca, and J. Pedrazzoli, Jr.** 2004. The influence of endoscopic procedures upon the contamination of *Helicobacter pylori* cultures. *Arq. Gastroenterol.* **41**:100-103.
186. **Ringner, M., M. Paulsson, and T. Wadstrom.** 1992. Vitronectin binding by *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Immunol.* **5**:219-224.
187. **Rizos, K., C. T. Lattemann, D. Bumann, T. F. Meyer, and T. Aebischer.** 2003. Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* **71**:6320-6328.
188. **Rossi, G., D. Fortuna, L. Pancotto, G. Renzoni, E. Taccini, P. Ghiara, R. Rappuoli, and G. Del Giudice.** 2000. Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **68**:4769-4772.
189. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
190. **Sakamoto, S., T. Watanabe, T. Tokumaru, H. Takagi, H. Nakazato, and K. O. Lloyd.** 1989. Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res.* **49**:745-752.

191. **Saldinger, P. F., N. Porta, P. Launois, J. A. Louis, G. A. Waanders, H. Bouzourene, P. Michetti, A. L. Blum, and I. E. Corthesy-Theulaz.** 1998. Immunization of BALB/c mice with *Helicobacter urease B* induces a T helper 2 response absent in *Helicobacter* infection. *Gastroenterology* **115**:891-897.
192. **Salomon, H.** 1896. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentralbl. Bakteriologie*. **19**:433-441.
193. **Sambrook, J.** 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
194. **Satin, B., G. Del Giudice, B. Della, V. S. Dusi, C. Laudanna, F. Tonello, D. Kelleher, R. Rappuoli, C. Montecucco, and F. Rossi.** 2000. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J. Exp. Med.* **191**:1467-1476.
195. **Schmitt, W. and R. Haas.** 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* **12**:307-319.
196. **Schreiber, S., R. Bucker, C. Groll, M. Azevedo-Vethacke, D. Garten, P. Scheid, S. Friedrich, S. Gatermann, C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 2005. Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*. *Infect. Immun.* **73**:1584-1589.
197. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* **14**:1471-1484.
198. **Schwarz-Linek, U., M. Hook, and J. R. Potts.** 2004. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol. Microbiol.* **52**:631-641.
199. **Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14559-14564.
200. **Segal, E. D., C. Lange, A. Covacci, L. S. Tompkins, and S. Falkow.** 1997. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:7595-7599.
201. **Selbach, M., S. Moese, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **277**:6775-6778.
202. **Sharma, S. A., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and L. D. Kerr.** 1998. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J. Immunol.* **160**:2401-2407.
203. **Sharma, S. A., M. K. Tummuru, G. G. Miller, and M. J. Blaser.** 1995. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. *Infect. Immun.* **63**:1681-1687.
204. **She, F. F., J. Y. Lin, J. Y. Liu, C. Huang, and D. H. Su.** 2003. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World J. Gastroenterol.* **9**:516-520.
205. **Sheu, B. S., S. M. Sheu, H. B. Yang, A. H. Huang, and J. J. Wu.** 2003. Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in *babA2* genopositive infection. *Gut* **52**:927-932.
206. **Sipponen, P.** 1997. *Helicobacter pylori* gastritis-epidemiology. *J. Gastroenterol.* **32**:273-277.

207. **Sipponen, P., M. Aarynen, I. Kaariainen, P. Kettunen, T. Helske, and K. Seppala.** 1989. Chronic antral gastritis, Lewis(a+) phenotype, and male sex as factors in predicting coexisting duodenal ulcer. *Scand. J. Gastroenterol.* **24**:581-588.
208. **Smith, K. D., E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. A. Bergman, S. L. Barrett, B. T. Cookson, and A. Aderem.** 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* **4**:1247-1253.
209. **Smith, M. F., Jr., A. Mitchell, G. Li, S. Ding, A. M. Fitzmaurice, K. Ryan, S. Crowe, and J. B. Goldberg.** 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**:32552-32560.
210. **Sobala, G. M., J. E. Crabtree, M. F. Dixon, C. J. Schorah, J. D. Taylor, B. J. Rathbone, R. V. Heatley, and A. T. Axon.** 1991. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* **32**:1415-1418.
211. **Solnick, J. V., L. M. Hansen, N. R. Salama, J. K. Boonjakuakul, and M. Syvanen.** 2004. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:2106-2111.
212. **Solnick, J. V. and D. B. Schauer.** 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:59-97.
213. **Sommi, P., V. Ricci, R. Fiocca, M. Romano, K. J. Ivey, E. Cova, E. Solcia, and U. Ventura.** 1996. Significance of ammonia in the genesis of gastric epithelial lesions induced by *Helicobacter pylori*: an in vitro study with different bacterial strains and urea concentrations. *Digestion* **57**:299-304.
214. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
215. **Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci.** 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1263-1268.
216. **Stingl, K., K. Altendorf, and E. P. Bakker.** 2002. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol.* **10**:70-74.
217. **Stolte, M.** 1992. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric MALT-lymphoma. *Lancet* **339**:745-746.
218. **Suerbaum, S., C. Josenhans, and A. Labigne.** 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* **175**:3278-3288.
219. **Suerbaum, S. and P. Michetti.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **347**:1175-1186.
220. **Suhr, M., I. Benz, and M. A. Schmidt.** 1996. Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* **22**:31-42.
221. **Suzuki, M., S. Miura, M. Suematsu, D. Fukumura, I. Kurose, H. Suzuki, A. Kai, Y. Kudoh, M. Ohashi, and M. Tsuchiya.** 1992. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am. J. Physiol.* **263**:G719-G725.
222. **Szabo, I., S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J. L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, and M. Zoratti.** 1999. Formation of anion-selective channels in the

- cell plasma membrane by the toxin *VacA* of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* **18**:5517-5527.
223. **Takenaka, R., K. Yokota, K. Ayada, M. Mizuno, Y. Zhao, Y. Fujinami, S. N. Lin, T. Toyokawa, H. Okada, Y. Shiratori, and K. Oguma.** 2004. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology* **150**:3913-3922.
224. **Thoreson, A. C., A. Hamlet, J. Celik, M. Bystrom, S. Nystrom, L. Olbe, and A. M. Svennerholm.** 2000. Differences in surface-exposed antigen expression between *Helicobacter pylori* strains isolated from duodenal ulcer patients and from asymptomatic subjects. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3436-3441.
225. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, J. C. Venter, and .** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.
226. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.
227. **Tran, V. N. and R. R. Isberg.** 1993. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J.* **12**:1887-1895.
228. **Trust, T. J., P. Doig, L. Emody, Z. Kienle, T. Wadstrom, and P. O'Toole.** 1991. High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **59**:4398-4404.
229. **Tummuru, M. K., T. L. Cover, and M. J. Blaser.** 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* **61**:1799-1809.
230. **Umlauft, F., E. B. Keeffe, F. Offner, G. Weiss, H. Feichtinger, E. Lehmann, S. Kilganoogler, G. Schwab, A. Propst, K. Grussnewald, and G. Judmaier.** 1996. *Helicobacter pylori* infection and blood group antigens: lack of clinical association. *Am. J. Gastroenterol.* **91**:2135-2138.
231. **Vakil, N. and D. Vaira.** 2004. Non-invasive tests for the diagnosis of *H. pylori* infection. *Rev. Gastroenterol. Disord.* **4**:1-6.
232. **Valkonen, K. H., T. Wadstrom, and A. P. Moran.** 1997. Identification of the N-acetylneuraminyllactose-specific laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65**:916-923.
233. **Van de Bovenkamp, J. H., J. Mahdavi, A. M. Korteland-Van Male, H. A. Buller, A. W. Einerhand, T. Boren, and J. Dekker.** 2003. The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter* **8**:521-532.
234. **Van den Brink, G. R., K. M. Tytgat, R. W. Van der Hulst, C. M. Van der Loos, A. W. Einerhand, H. A. Buller, and J. Dekker.** 2000. *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* **46**:601-607.
235. **van Vliet, A. H., J. Stoof, R. Vlasblom, S. A. Wainwright, N. J. Hughes, D. J. Kelly, S. Bereswill, J. J. Bijlsma, T. Hoogenboezem, C. M. Vandenbroucke-Grauls, M. Kist, E. J. Kuipers, and J. G. Kusters.** 2002. The role of the Ferric Uptake Regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *Helicobacter* **7**:237-244.

236. **Vandamme, P., E. Falsen, R. Rossau, B. Hoste, P. Segers, R. Tytgat, and J. De Ley.** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:88-103.
237. **Velayudhan, J., N. J. Hughes, A. A. McColm, J. Bagshaw, C. L. Clayton, S. C. Andrews, and D. J. Kelly.** 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37**:274-286.
238. **Walker, M. M. and M. F. Dixon.** 1996. Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10 Suppl 1**:119-128.
239. **Walz, A., S. Odenbreit, J. Mahdavi, T. Boren, and S. Ruhl.** 2005. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology*
240. **Wang, X., E. Sturegard, R. Rupar, H. O. Nilsson, P. A. Aleljung, B. Carlen, R. Willen, and T. Wadstrom.** 1997. Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **46**:657-663.
241. **Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs.** 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**:482-485.
242. **Weinberg, E. D.** 1978. Iron and infection. *Microbiol. Rev.* **42**:45-66.
243. **Weiser, J. N., J. M. Love, and E. R. Moxon.** 1989. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell* **59**:657-665.
244. **Welin, M., N. M. Holmgren, P. Nilsson, and H. Enroth.** 2003. Statistical model of the interactions between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer development. *Helicobacter* **8**:72-78.
245. **Wirth, H. P., M. H. Beins, M. Yang, K. T. Tham, and M. J. Blaser.** 1998. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect. Immun.* **66**:4856-4866.
246. **Wolle, K., A. Leodolter, P. Malfertheiner, and W. Konig.** 2002. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000. *J. Med. Microbiol.* **51**:705-709.
247. **Wotherspoon, A. C., C. Doglioni, M. de Boni, J. Spencer, and P. G. Isaacson.** 1994. Antibiotic treatment for low-grade gastric MALT lymphoma. *Lancet* **343**:1503.
248. **Xiang, Z., S. Censini, P. F. Bayeli, J. L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**:94-98.
249. **Yamaoka, Y., S. Kikuchi, H. M. el Zimaity, O. Gutierrez, M. S. Osato, and D. Y. Graham.** 2002. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* **123**:414-424.
250. **Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, S. Imamura, T. Ohno, N. Sawai, A. Ishimaru, J. Imanishi, and D. Y. Graham.** 2002. *Helicobacter pylori* infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation. *Gastroenterology* **123**:1992-2004.
251. **Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, K. Kashima, and J. Imanishi.** 1997. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* **41**:442-451.
252. **Yamaoka, Y., D. H. Kwon, and D. Y. Graham.** 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7533-7538.

253. **Yamaoka, Y., J. Soucek, S. Odenbreit, R. Haas, A. Arnvist, T. Boren, T. Kodama, M. S. Osato, O. Gutierrez, J. G. Kim, and D. Y. Graham.** 2002. Discrimination between cases of duodenal ulcer and gastritis on the basis of putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2244-2246.
254. **Ye, W., M. Held, J. Lagergren, L. Engstrand, W. J. Blot, J. K. McLaughlin, and O. Nyren.** 2004. *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**:388-396.
255. **Yolken, R. H.** 1978. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. *Hosp. Pract.* **13**:121-127.
256. **Zambon, C. F., F. Navaglia, D. Basso, M. Rugge, and M. Plebani.** 2003. *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J. Clin. Pathol.* **56**:287-291.

Danksagung

Dass ich diese Arbeit schließlich mit dem gewünschten Erfolg in der angestrebten Zeit abschließen konnte, verdanke ich zahlreichen Umständen und vor allem Personen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und Herrn Prof. Dr. Rainer Haas möchte ich für die Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn PD Dr. Stefan Odenbreit danke ich für die interessante Fragestellung meiner Dissertation, die exzellente Betreuung während meiner Arbeit und die Hilfe bei der Einarbeitung in zahlreiche Methoden der Mikrobiologie.

Ein großer Dank gilt Claudia Höfler, die gerade am Anfang mich sehr bei der Lösung biologischer Fragestellungen unterstützte. Während der gesamten Arbeit waren ihre Anregungen eine wertvolle Hilfe.

Ebenso möchte ich mich bei Xaver Sewald bedanken. Seine aufmunternde Art war im Laboralltag oft eine willkommene Unterstützung. Nicht zuletzt durch seine große Hilfsbereitschaft und die kritische Durchsicht des Manuskripts hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Daniela Massong danke ich für die Unterstützung bei einigen Aufgaben im Labor.

Evelyn Weiss stand mir spontan in brenzligen Situationen mit ihrem weitreichenden Erfahrungsschatz zur Seite, wofür ich mich bedanken möchte.

Bei allen anderen nicht namentlich erwähnten Kollegen bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Betriebsklima.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund Peter Swoboda. Er unterstützte mich unter anderem mit seinem medizinischen Fachwissen und gab mir in schwierigen Situationen Rückhalt.

Schließlich habe ich meinen Eltern, deren moralische und finanzielle Unterstützungen mir das Studium und damit die Dissertation ermöglicht haben, viel zu verdanken. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kirstin Verena Engel
Anschrift: Elisabethstr. 73
80797 München
Geburtsdatum: 26.06.1977
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983-1987 Grundschole in Köln und München
1987-1996 Gymnasialausbildung in München

Akademische Ausbildung

Mai 1997- Nov. 2001 Studium der Pharmazie an der LMU München
November 2001 2. Staatsexamen
Dezember 2002 3. Staatsexamen
Approbation als Apothekerin
Feb. 2003-Nov. 2005 Promotion „Untersuchungen zur Rolle der äußeren Membranproteine bei der Adhärenz von *Helicobacter pylori*“ am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in München unter Anleitung von PD Dr. Stefan Odenbreit

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle Erkenntnisse aus dem Schrifttum, die ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet und wurden nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

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

München, November 2005

Kirstin Engel