

Genetische und phänotypische Variabilität von  
*Helicobacter pylori* während der Infektion und nach  
natürlicher Transmission

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität

Hannover

zur Erlangung des Grades

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Sandra Schwarz

geboren am 16. Juni 1976 in Cuxhaven

2008

Referent: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

Korreferent: Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach

Tag der Promotion: 26.02.2008

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg (Juli 2002 - Oktober 2003), sowie am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover (November 2003 - Juli 2007) unter der Leitung von Prof. Dr. Suerbaum angefertigt.

## DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Sebastian Suerbaum für die Überlassung des interessanten Themas und der damit verbundenen Möglichkeit das Fachgebiet zu wechseln, die mir viel bedeutet. Ich bedanke mich herzlich für das Engagement bei der Betreuung, die wertvollen Diskussionen, das stete Interesse und die tatkräftige Unterstützung auch für die berufliche Zukunft. Ich möchte mich weiterhin für die Möglichkeit des eigenständigen Arbeitens bedanken, sowie für die weitere Anstellung und der damit freundlicherweise gesicherten nahen Zukunft.

Herrn Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt unseren Kooperationspartnern Dr. Mark Achtman, Dr. Giovanna Morelli und Barica Kusecek vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin für die gute Zusammenarbeit, stetige Tatkraft und wertvollen Überlegungen, die zum Erfolg der Projekte beitragen.

Dr. Andrea Manica und Dr. François Balloux von der Cambridge-Universität in England danke ich für die umfangreichen statistischen Analysen der Transmissionsstudie, die leider zum Zeitpunkt des Schreibens noch nicht abgeschlossen waren und wertvollen Anregungen hierzu.

Bei PD Dr. Christine Josenhans möchte ich mich für ihr Interesse an meinen Projekten und die spontane Hilfsbereitschaft und nützlichen Anregungen bei experimentellen Fragen bedanken.

Ein „ganz grosses Dankeschön“ gilt Dr. Christian Kraft für die technische Einarbeitung zu Beginn und stetige Hilfsbereitschaft im Verlauf der Arbeit.

Bei Jessika Schulze, Birgit Brenneke, Elena Katzowitsch und Sheralee Cleland bedanke ich mich für die fleissige Sequenzier-Unterstützung bei den verschiedenen Projekten und Patrick Olbermann danke ich für die Einweisung in die Zellkultur und Adhärenzassays.

Ich möchte Dr. Bodo Linz für die hilfreichen und freundlichen Erklärungen zu verschiedenen Auswertungs-Programmen danken und Jörg Schmidtke für den Vorschlag, das Programm KStableau für die Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse in Familien zu verwenden.

Prof. Thomas Borén von der Umeå-Universität in Schweden danke ich dafür, dass er umgehend einen für die Arbeit wichtigen *H. pylori*-Stamm zur Verfügung gestellt hat.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen in Hannover und ehemaligen Mitarbeitern in Würzburg möchte mich herzlich für die tolle kollegiale Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und das Interesse bedanken - vor allem bei Dr. Torsten Sterzenbach und Stefan Kulick für ihre spontane Software-Hilfe in den letzten Stunden der Schreibphase. Auch danke ich den Mitarbeitern der Sequenzierlabore in Hannover und Würzburg für die tolle und zuverlässige Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich nocheinmal dafür danken, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und meiner Mutter danke ich ganz herzlich für die grosszügigen finanziellen Unterstützungen, die die Unterbrechungen der Fernbeziehung ermöglichten.

Meinen Freunden und allen Verwandten von Timm Schubert danke ich für das immerwährende Interesse und die moralische Unterstützung. Besonders Dr. Erika Daines danke ich für ihre wertvolle Unterstützung bei Fragen über die berufliche Zukunft.

Timm Schubert danke ich von ganzem Herzen für seine unendliche Unterstützung, tatkräftige Hilfe, Zuversicht, Geduld, Kraft, seinen Humor und für das unentwegte Engagement, das alles auf mich zu übertragen, wenn es notwendig war. Ich bin Dir so dankbar für Deine Liebe... und das seit zwei Jahren geduldige Warten am anderen Ende des Globus. Ohne Dich an meiner Seite wären die letzten Jahre so nicht möglich gewesen.

## KURZFASSUNG

*Helicobacter pylori* kolonisiert chronisch die Magenschleimhaut von über 50% der menschlichen Bevölkerung. Die Infektion kann zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Geschwüren von Magen und Zwölffingerdarm und malignen Tumoren führen. *H. pylori* weist eine ausserordentlich hohe Rekombinationsfrequenz und genetische Allelvielfalt auf. Die genetische Diversität von *H. pylori* wurde in dieser Arbeit in zwei verschiedenen Kontexten untersucht: Zum einen wurde die Diversität für die Untersuchung der Übertragungswege des Bakteriums herangezogen, über die noch wenig bekannt ist. Hierfür wurden insgesamt 142 Isolate aus 95 Individuen aus 13 verschiedenen Familien analysiert. Es wurden Familien aus industrialisierten und Entwicklungsländern einbezogen, die drastische Unterschiede in der *H. pylori*-Prävalenz und sozio-ökonomischen Bedingungen aufweisen, die mit der Prävalenz der Infektion assoziiert sind. Für die Studie wurde die hohe genetische Diversität des Bakteriums genutzt, indem die hochauflösende Multilocus-Sequenztypisierung angewandt wurde, die die Sequenzierung von sieben Housekeeping-Genfragmenten beinhaltet. Die Bestimmung der Populationszugehörigkeiten und der Sequenztypen der Isolate, sowie die Analyse der Assoziation von genetischer Verwandtschaft der Stämme und genetischer Verwandtschaft der entsprechenden Wirte bestätigte eine vorwiegend intrafamiliäre Übertragung in den industrialisierten Regionen. Im Gegensatz hierzu spielt die Übertragung innerhalb von Familien aus einer ländlichen Region in Südafrika nur eine untergeordnete Rolle und die Infektion wird vermutlich vor allem durch Personenkontakt ausserhalb der Familie erworben. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Modell der vorwiegend intrafamiliären Übertragung nicht allgemeingültig ist und die Übertragung von *H. pylori* sehr viel komplexer ist, als ursprünglich angenommen. Zum anderen wurde die genetische Variabilität im Zusammenhang mit den Bindungseigenschaften von *H. pylori* an die Rezeptoren Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> der Wirtszelloberfläche untersucht. Dynamische Bindungseigenschaften von *H. pylori* an die Epithelzellen sind vermutlich für die Persistenz der Infektion essentiell. Es ist jedoch sehr wenig über die genetische Diversität der Adhäsion-kodierenden Gene *in vivo*, sowie über die funktionellen Effekte der genetischen Diversität dieser Gene bekannt. Daher wurden von acht Paaren sequenziell isolierter Stämme chronisch infizierter Personen (zeitl. Abstand 3 Monate bis 3 Jahre) die Sequenzen der für die Adhäsine BabA und SabA kodierenden Gene analysiert und ein *in vitro*-Bindungsassay entwickelt, mit dem sich die Bindung dieser Isolate an die spezifischen Wirtszell-Rezeptoren der Adhäsine Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> bestimmen und quantifizieren lässt. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb eines Individuums Stämme mit variablen, durch Mutations- und Rekombinationsereignisse erzeugten, Adhäsion-Genen vorliegen können. Die Stämme innerhalb eines Patienten können zudem sehr stark variierende Bindungseigenschaften an Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> aufweisen. Durch Komplementationsversuche konnte zudem gezeigt werden, dass Änderungen der BabA-Sequenz quantitativ veränderte Bindungseigenschaften des Adhäsins hervorrufen. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass Mutations- und Rekombinationsereignisse in dem *babA*-Gen von funktioneller Bedeutung sind und es sich bei diesen Ereignissen vermutlich um Mechanismen von *H. pylori* handelt, die eine wichtige Rolle in der Anpassung des Bakteriums an den Wirt während der Infektion spielen.

*Schlüsselwörter: Helicobacter pylori, Übertragung, Adhärenz*

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* chronically colonizes the gastric mucosa of more than 50% of the human population. The infection may progress to severe diseases like peptic ulcer, duodenal ulcer, MALT-lymphoma and gastric cancer. *H. pylori* displays a remarkably high recombination frequency and allelic diversity. In this work the genetic diversity was analysed in two different contexts:

First, the diversity was used for the analysis of transmission pathways of *H. pylori* which are as yet poorly understood. A total of 142 isolates from 95 individuals of 13 families were analysed. The families were from both, industrialized and developing nations since they show significant differences in the prevalence of infection and socioeconomic conditions which are associated with the prevalence of *H. pylori*. Furthermore, the high resolution method multilocus sequence typing which involves the sequencing of seven housekeeping-gene fragments was used for transmission analysis to take the high genetic diversity of the bacterium into account. The isolates were assigned to populations and sequence types and the association of the genetic similarity of the strains and the kinship of their respective hosts was also investigated. The results confirm previous findings of frequent intrafamilial transmission in industrialized regions. In striking contrast to these regions transmission within families plays only a minor role in families from a rural area in South Africa and the infection might predominantly be acquired via person-to-person contact outside the family. The results suggest that transmission of *H. pylori* is more complex than previously thought and comprises different ways of transmission.

Second, the genetic variability was investigated in conjunction with the binding properties of *H. pylori* to the receptors Lewis<sup>b</sup> and sialyl Lewis<sup>x</sup> which are expressed on the epithelium. Dynamic adherence properties of *H. pylori* to gastric epithelial cells are thought to be essential for long term infection. However, very little is known about the genetic diversity of adhesin genes *in vivo* and the functional effects of changes of the gene sequence. Therefore, eight pairs of sequentially isolated strains from chronically infected individuals (3 month to 3 years apart) were analysed. The sequences of two adhesin encoding genes *babA* and *sabA* were analysed and to investigate and quantify the adherence of the isolates to the specific receptors of BabA and SabA, Lewis<sup>b</sup> and sialyl Lewis<sup>x</sup>, respectively, an *in vitro* binding assay was developed. It could be shown that due to recombination and mutation strains with varying *babA* and *sabA* gene sequences are present within the same host. Likewise, strains within the same individual can display highly variable Lewis<sup>b</sup> and sialyl Lewis<sup>x</sup> binding properties suggesting that flexible adherence to the receptors are important during infection. Complementation experiments revealed that changes of the BabA sequence within one pair of isolates generated quantitatively different binding properties of BabA. The results indicate that mutation and recombination events occurring in *babA* are of functional relevance *in vivo*. They might represent mechanisms of *H. pylori* which play an important role for the adaptation of the bacteria to the individual host and to changing environmental conditions during infection, such as immune responses.

*keywords: Helicobacter pylori, transmission, adhesion*

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APD	Acetylphenylendiamin
aphA3'	Aminoglykosid-Phosphotransferase-Kassette
BabA	Blutgruppen-Antigen-bindendes Adhäsın
BHI	Brain-Heart Infusion
β-ME	β-Mercaptoethanol
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Kassette
cDNA	copy-DNA
CIAP	alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	2'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g, g	Gramm, Erdbeschleunigung
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HPLC	high performance liquid chromatographie
HSA	menschliches Serumalbumin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K <sub>a</sub>	nicht-synonyme Substitutionsrate
KAc	Kaliumacetat
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KPO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
K <sub>s</sub>	synonyme Substitutionsrate
Km <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kV	kiloVolt
Le <sup>b</sup>	Lewis b
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
Min	Minute

mM	millimolar
MLST	Multilocus-Sequenztypisierung
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
μFd	μFarad
μg	Mikrogramm
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NaOH	Natronlauge
NeuAc	N-Acetyl-Neuraminsäure
NeuGc	N-Glykoly-Neuraminsäure
ng	Nanogramm
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub>	Ammonium
NMWL	nominal molecular weight limit
O	Ohm
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OMP	äußeres Membranprotein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RAPD	random amplification of polymorphic DNA
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur,
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SabA	Sialinsäure-bindendes Adhäsion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sLe <sup>x</sup>	Sialyl-Lewis <sup>x</sup>
ST	Sequenztyp
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TMB	Tetra-Methyl-Benzidine
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
V	Volt
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactopyranosid

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Überblick über <i>Helicobacter pylori</i>.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Entdeckung und Geschichte.....	1
1.1.2. Mikrobiologie und Taxonomie.....	2
1.1.3. Pathogenese der Infektion.....	4
1.1.4. Virulenzfaktoren.....	5
<b>1.2. Epidemiologie.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Prävalenz und geographische Verteilung.....	9
1.2.2. Übertragung und Quellen der Infektion.....	10
<b>1.3. Genetische Charakteristika.....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Genomische und genetische Diversität.....	11
1.3.2. Populationsstruktur und geographische Diversität.....	12
<b>1.4. Bakterielle Adhärenz an Wirtszellen.....</b>	<b>13</b>
1.4.1. Für die bakterielle Adhärenz relevante Strukturen der Oberfläche von Wirtszellen.....	13
1.4.1.1. Allgemeine Charakteristika.....	13
1.4.1.2. ABO- und Lewis-Blutgruppen-Antigene als Rezeptoren für <i>H. pylori</i> .....	14
1.4.2. Adhärenz-Eigenschaften von <i>H. pylori</i> und deren Bedeutung für die Kolonisierung und Virulenz.....	16
1.4.3. Adhäsine von <i>H. pylori</i> .....	18
<b>1.5. Zielsetzung.....</b>	<b>20</b>
<b>2. MATERIAL.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Geräte.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Bakterienstämme.....</b>	<b>23</b>
2.3.1. <i>H. pylori</i> .....	23
2.3.2. <i>E. coli</i> .....	26
<b>2.4. Vektoren.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5. Synthetische Oligonukleotide.....</b>	<b>27</b>

<b>3. METHODEN.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien.....</b>	<b>30</b>
3.1.1. Anzucht von <i>Helicobacter pylori</i> .....	30
3.1.2. Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	31
<b>3.2. DNA-Arbeitstechniken.....</b>	<b>32</b>
3.2.1. Extraktion von DNA aus Bakterien.....	32
3.2.1.1. Extraktion von Gesamt-DNA aus <i>H. pylori</i> .....	32
3.2.1.2. Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	32
3.2.2. Quantifizierung und Reinheitskontrolle von Nucleinsäuren.....	33
3.2.3. Techniken der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
3.2.3.1. Standard PCR mit genomischer DNA oder Plasmid-DNA als Matrize.....	34
3.2.3.2. „High Fidelity“-PCR.....	34
3.2.3.3. „Random amplification of polymorphic DNA“ (RAPD-PCR).....	35
3.2.4. Agarose-Gelelektrophorese von Nucleinsäuren.....	35
3.2.4.1. Native Agarose-Gelelektrophorese.....	35
3.2.4.2. Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	36
3.2.5. Aufreinigung von DNA.....	36
3.2.6. Enzymatische Modifikation von DNA.....	37
3.2.6.1. Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	37
3.2.6.2. Dephosphorylierung von linearer DNA mit alkalischer Phosphatase.....	37
3.2.6.3. Ligation.....	37
3.2.7. Sequenzierung von DNA nach Sanger.....	38
3.2.8. Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) und Bestimmung der Populationszugehörigkeit von <i>H. pylori</i> .....	39
3.2.9. Transformation von <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i> .....	40
3.2.9.1. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	40
3.2.9.2. Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> .....	40
3.2.9.3. Natürliche Transformation von <i>H. pylori</i> .....	41
3.2.9.4. Herstellung elektrokompenter <i>H. pylori</i> Zellen.....	41
3.2.9.5. Elektroporation von <i>H. pylori</i> .....	41
<b>3.3. RNA-Arbeitstechniken.....</b>	<b>42</b>
3.3.1. Extraktion von Gesamt-RNA aus <i>H. pylori</i> .....	42
3.3.2. Reverse Transkription von Gesamt-RNA und semiquantitative Amplifikation von cDNA (Two Step).....	43
<b>3.4. Protein-Arbeitstechniken.....</b>	<b>43</b>
3.4.1. Glykoprotein-Adhärenzassay im Mikrotiterplattenformat.....	43
3.4.2. Biotinylierung von Lewis <sup>b</sup> -HSA.....	44
3.4.3. Isolierung Lewis <sup>b</sup> -bindender <i>H. pylori</i> mit paramagnetischen Beads.....	45

<b>3.5. Zellkultur.....</b>	<b>46</b>
3.5.1. Kultivierung und Lagerung.....	46
3.5.2. Zellzahlbestimmung.....	46
3.5.5. Adhärenzassay im Mikrotiterplattenformat zur Bestimmung der Adhärenz von <i>H. pylori</i> an AGS-Zellen.....	46
<b>3.6. Bioinformatik: Datenbanken und Software .....</b>	<b>47</b>
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Analyse der genetischen Diversität von <i>H. pylori</i> in Familien mit unterschiedlicher geographischer Herkunft.....</b>	<b>49</b>
4.1.1. Genetische Diversität von <i>H. pylori</i> in Familien aus einer ländlichen Gegend in Südafrika.....	49
4.1.1.1. Populationszugehörigkeit von <i>H. pylori</i> aus südafrikanischen Familien ländlicher Herkunft.....	49
4.1.1.2. Sequenztypisierung von <i>H. pylori</i> aus südafrikanischen Familien mit ländlicher Herkunft.....	52
4.1.2. Genetische Diversität von <i>H. pylori</i> in Familien aus städtischen Gegenden... ..	53
4.1.2.1. Populationzugehörigkeit von <i>H. pylori</i> aus Familien städtischer Herkunft.....	54
4.1.2.2. Sequenztypisierung von <i>H. pylori</i> aus Familien städtischer, nicht-südafrikanischer Herkunft.....	56
4.1.3. Komplexe Mosaikstruktur in Multilocus-Haplotypen von <i>H. pylori</i> in südafrikanischen Familien.....	56
4.1.4. Genetische Verwandtschaft von <i>H. pylori</i> im Verhältnis zum Verwandtschaftsgrad der Familienmitglieder.....	58
4.1.5. Diversität von <i>H. pylori</i> im einzelnen Individuum.....	65
<b>4.2. Analyse genetischer und funktioneller Diversität der Adhäsion-kodierenden Gene <i>babA</i> und <i>sabA</i> von <i>H. pylori</i> während der chronischen Kolonisierung.....</b>	<b>69</b>
4.2.1. Allelische Diversität von <i>babA</i> und <i>sabA</i> in sequenziellen Isolaten.....	69
4.2.2. Bestimmung synonyme und nicht-synonyme Substitutionsraten von <i>babA</i> , <i>sabA</i> und Housekeeping-Genen der sequenziellen Isolate.....	74
4.2.2.1. Anzahl an Sequenzpolymorphismen in <i>babA</i> , <i>sabA</i> und Housekeeping-Genen.....	74
4.2.2.2. Bestimmung gemittelter synonyme und nicht-synonyme Substitutionsraten von <i>babA</i> , <i>sabA</i> und Housekeeping-Genen.....	75
4.2.2.3. Bestimmung synonyme und nicht-synonyme Substitutionsraten einzelner Aminosäure-Positionen von <i>babA</i> , <i>sabA</i> und Housekeeping Genen.....	77
4.2.3. Herstellung isogener <i>babA</i> - und <i>sabA</i> -Knockout-Mutanten.....	79
4.2.4. Untersuchungen zur Expression von <i>babA</i> und <i>sabA</i> sequenzieller Isolate mittels semiquantitativer RT-PCR.....	82

4.2.5. Untersuchungen zur Adhärenz sequenzieller Isolate an Lewis <sup>b</sup> und Sialyl Lewis <sup>x</sup> .....	83
4.2.6. Untersuchungen zur Adhärenz sequenzieller Isolate an die Zelllinie AGS.....	86
4.2.7. Untersuchung zur funktionellen Korrelation zwischen Sequenzvariabilität von BabA und Rezeptorbindung.....	87
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>92</b>
<b>5.1. Transmission von <i>H. pylori</i> in südafrikanischen Familien: mehr als vertikale Transmission.....</b>	<b>92</b>
<b>5.2. Genetische und funktionelle Diversität der <i>H. pylori</i>-Adhäsine <i>babA</i> und <i>sabA</i> während der chronischen Infektion.....</b>	<b>97</b>
5.2.1. Allelische Variation der Adhäsion-kodierenden Gene <i>babA</i> und <i>sabA</i> während der Infektion.....	97
5.2.2. Die Adhäsion-kodierenden Gene <i>babA</i> und <i>sabA</i> unterliegen einem positiven Selektionsdruck.....	101
5.2.3. Quantitative Bindungsunterschiede von <i>H. pylori</i> an Le <sup>b</sup> und sLe <sup>x</sup> während der Infektion.....	105
5.2.4. Phänotypische Konsequenzen der allelischen Variabilität von <i>babA</i> und <i>sabA</i> .....	107
<b>6. LITERATUR.....</b>	<b>112</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>130</b>
<b>Abb. A1: Haplots der zusammengefassten Housekeeping-Genfragmente der <i>H. pylori</i>-Isolate der südafrikanischen Familie 12.....</b>	<b>130</b>
<b>Abb. A2: Haplots der zusammengefassten Housekeeping-Genfragmente der <i>H. pylori</i>-Isolate der nicht-südafrikanischen Familien aus Houston, USA (H1, H2, H3), Seoul, Korea (K1, K3, K5), Bogota, Kolumbien (C5, C6, C7) und Belfast, Irland.....</b>	<b>132</b>
<b>Abb. A3: Multiples Alignment der abgeleiteten BabA-Sequenzen der sequenziellen Isolate.....</b>	<b>134</b>
<b>Abb. A4: Multiples Alignment der abgeleiteten SabA-Sequenzen der sequenziellen Isolate.....</b>	<b>135</b>
Publikationen.....	136
Lebenslauf.....	137
Erklärung zur Dissertation.....	138

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Überblick über *Helicobacter pylori*

### 1.1.1. Entdeckung und Geschichte

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts erschien ein erster Bericht über spiralförmige Mikroorganismen im Magen von Tieren (Bottcher, 1874). Einige Jahre später beschrieb Jaworski spiralförmige Bakterien auch im Magen des Menschen und vermutete, dass sie eine Rolle in der Entstehung gastrischer Erkrankungen spielen (Jaworski, 1889). Obwohl weitere Berichte über die Beobachtung von Bakterien im Magen des Menschen folgten (Krienitz, 1906; Konjetzny, 1928), bestand das Dogma, dass der Magen abgesehen von transienter oraler Flora steril ist, für die nächsten 100 Jahre. Nach der damaligen gängigen Lehrmeinung war Hyperazidität, u.a. als Folge von Stress, die Ursache für peptische Ulzera-Erkrankungen (Weiner *et al.*, 1957) mit dem vorherrschenden Paradigma „keine Säure-kein Ulcus“ (Schwartz, 1910). Erst die erfolgreiche Isolierung und *in vitro*-Kultivierung von *H. pylori* durch die Australier Marshall and Warren im Jahr 1982 führte zu einem Durchbruch in dem Verständnis der Entstehung von Krankheiten des Magens und der Entwicklung gegen *H. pylori* gerichteter Behandlungsstrategien (Marshall & Warren, 1983). Daraufhin wurde von Forschern weltweit das Vorkommen der Bakterien im Mukus der Magenschleimhaut bestätigt, die aufgrund morphologischer Gemeinsamkeiten zunächst der Gattung *Campylobacter* zugeordnet und als *Campylobacter pyloridis* (Marshall & Warren, 1984) und später als *Campylobacter pylori* (Marshall & Goodwin, 1987) bezeichnet wurden. Marshall und Warren vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Infektion mit *H. pylori* und der Entstehung der peptischen Ulkuskrankheit und schlugen für die Behandlung der Krankheit eine Antibiotika-Therapie vor. Die kontroversen Diskussionen über die bakterielle Genese von Magengeschwüren konnten durch Selbstversuche von Marshall und Morris beendet werden. Nach oraler Aufnahme der Bakterien entwickelten beide eine akute Gastritis, die durch die Behandlung mit Antibiotika abheilte (Marshall *et al.*, 1985; Morris & Nicholson, 1987). Hierdurch ist zum einen demonstriert worden, dass *H. pylori* den Magen des Menschen kolonisieren kann und zum anderen wurde durch die Experimente ein kausaler Zusammenhang zwischen der Infektion mit *H. pylori* und einer Gastritis hergestellt. Prospektive seroepidemiologische Studien, die eine Assoziation von *H. pylori* und Magenkrebs beschrieben (Forman *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1991; Talley *et al.*, 1991), veranlassten 1994 die Weltgesundheits-Organisation WHO, das Bakterium als Klasse 1-Karzinogen (d.h. definitives Karzinogen) einzustufen (IARC, International Agency for Research on Cancer, 1994). Im Jahr 1997, 1999 und 2006 sind die Genomsequenzen von drei unverwandten *H. pylori*-Stämmen 26695, J99 und HPAG1 veröffentlicht worden (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006). Mittlerweile ist

bekannt, dass es sich bei *H. pylori* um einen der häufigsten bakteriellen Krankheitserreger von grosser klinischer Bedeutung handelt.

### 1.1.2. Mikrobiologie und Taxonomie

*H. pylori* ist ein gram-negatives Bakterium mit einer Länge von 2 bis 4  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0,5-1  $\mu\text{m}$  (Abb. 1). Bei *H. pylori* handelt es sich um ein primär extrazelluläres Pathogen, welches in seltenen Fällen auch intrazellulär vorliegen kann (Oh *et al.*, 2005). Die Morphologie der Bakterien ist in gastrischen Biopsien überwiegend spiralförmig (Goodwin *et al.*, 1985), während Bakterien, die *in vitro* auf festem Nährmedium kultiviert werden, hauptsächlich eine stäbchenförmige Morphologie aufweisen (Goodwin & Armstrong, 1990). Nach längerer *in vitro*-Kultivierung überwiegen kokkoide Formen, die sich in *in vitro* nicht anzüchten lassen (Bode *et al.*, 1993). Die biologische Funktion bzw., ob es sich um lebensfähige Formen handelt, die infektiöse Dauerformen von *H. pylori* repräsentieren, ist bislang nicht geklärt. *H. pylori* ist unipolar mit 4-6 Flagellen begeißelt, die dem Bakterium eine hohe Beweglichkeit in dem viskosen Mukus verleihen. Die *in vitro*-Anzucht des Bakteriums erfolgt unter mikroaerober Atmosphäre mit ca. 5%  $\text{O}_2$  und 5-10%  $\text{CO}_2$  bei 37°C auf komplexen Vollmedien, die mit Blut oder Serum supplementiert werden. *H. pylori* hat ein enges Wirts- und Gewebespektrum und kolonisiert den Wirt gewöhnlich lebenslang. Dies lässt eine hochgradige Anpassung an die Nische vermuten und folglich fehlen dem Bakterium Biosynthese-Wege, die in weniger spezialisierten Enterobakterien vorkommen, wie beispielsweise die für mehrere Aminosäuren (Alm *et al.*, 1999; Doig *et al.*, 1999; Marais *et al.*, 1999). Als Kohlenhydratquelle dient Glukose, die über den Entner-Doudoroff-Weg und Pentosephosphat-Weg als Alternative zur Glykolyse, metabolisiert wird. Genomische und experimentelle Analysen deuten darauf hin, dass andere Zucker nicht abgebaut werden können (Mendz *et al.*, 1993; Nedenskov, 1994; Berg *et al.*, 1997b). Anaeroben Bakterien entsprechend, kann *H. pylori* Aminosäuren durch Fermentierung abbauen (Mendz & Hazell, 1995). *H. pylori* ist obligat mikroaerophil und toleriert keine hohen  $\text{O}_2$ -Konzentrationen, benötigt jedoch mindestens 2%  $\text{O}_2$  (Mendz *et al.*, 1997), da  $\text{O}_2$  von dem Bakterium als terminaler Elektronenakzeptor verwendet wird. Neben der aeroben Atmung ist auch die anaerobe Atmung mit Fumarat und Wasserstoff als terminale Elektronenakzeptoren für *H. pylori* beschrieben worden (Smith & Edwards, 1995; Olson & Maier, 2002). Genomische Analysen zeigen, dass als Stickstoffquelle Harnstoff, Ammoniak und einige Aminosäuren genutzt werden können (Mendz & Hazell, 1995; Tomb *et al.*, 1997).

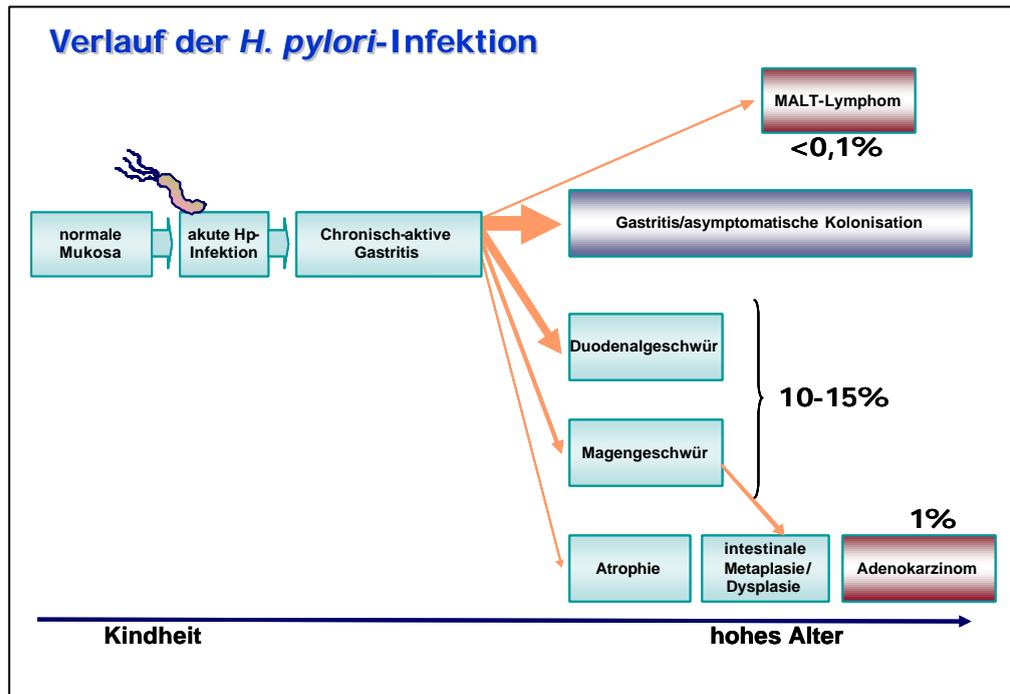


**Abb. 1. Transmissionselektronische Aufnahme von *H. pylori*, die die spiralförmige Morphologie und die unipolare Begeißelung mit mehreren Flagellen zeigt (aus Suerbaum & Josenhans, 2007).**

Zunächst wurden viele spiralförmige gram-negative Bakterien, die aus dem Gastrointestinaltrakt von Säugetieren isoliert wurden, aufgrund der ähnlichen Morphologie und ökologischen Nische, sowie der mikroaerophilen Wachstumsbedingungen der Gattung *Campylobacter* zugeordnet. Analysen der 16S rRNA-Sequenz, Fettsäure-Zusammensetzung, Nukleinsäure-Hybridisierungs-Profile und Enzymaktivitäten zeigten jedoch, dass sich *Campylobacter pylori* bzw. *H. pylori* nicht der Gattung *Campylobacter* zuweisen lässt und führten zur Ausgliederung dieser Bakterien in die neue Gattung *Helicobacter* (Romaniuk *et al.*, 1987; Goodwin *et al.*, 1989; Vandamme *et al.*, 1991). Die Gattung *Helicobacter* gehört der e-Gruppe der Proteobakterien an. Es sind in den letzten Jahren zahlreiche Arten, die aus dem Gastrointestinaltrakt von Menschen, Säugetieren und Vögeln isoliert wurden, dieser Gattung zugeordnet worden, die derzeit über 25 anerkannte Arten umfasst (Fox, 2002). Die *Helicobacter*-Arten werden in Abhängigkeit von der kolonisierten Nische in gastrische und enterohepatische Arten unterteilt, die beide eine hohe Organ-Spezifität aufweisen. Die gastrischen Arten besiedeln ausschliesslich den Magen, verursachen eine chronische Gastritis und können zu peptischer Ulzera und Magenkarzinomen führen, wie beispielweise *H. pylori* beim Menschen und *H. mustelae* in Frettchen (Fox *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1997). Die enterohepatischen Arten hingegen kolonisieren primär den Darmtrakt, manche Arten werden auch in der Leber und Gallenwegen gefunden. Für mehrere enterohepatische Arten ist eine Assoziation mit Hepatitis, Lebertumoren, Erkrankungen der Gallenwege, sowie entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben worden. Die am besten untersuchte Art dieser Gruppe ist das Maus-Pathogen *H. hepaticus* (Ward *et al.*, 1994; Fox *et al.*, 1994; Suerbaum *et al.*, 2003).

### 1.1.3. Pathogenese der Infektion

Die Infektion mit *H. pylori* erfolgt meist in der Kindheit und persistiert ohne Antibiotika-Behandlung ein Leben lang (Rowland *et al.*, 1999). Aufgrund der hohen Gewebespezifität von *H. pylori* wird das Duodenum primär nicht kolonisiert (McCull, 1997). Die Infektion führt in fast allen betroffenen Personen zu einer starken und andauernden Immunreaktion und zu einer Entzündung der Magenschleimhaut (Dooley *et al.*, 1989; Noach *et al.*, 1994). Die initiale Infektion mit *H. pylori* erzeugt zunächst eine akute Gastritis, die dann in eine chronisch-aktive Gastritis übergeht. Diese ist durch eine Infiltration der Mukosa mit neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten charakterisiert. Ausserdem induziert *H. pylori* eine lokale IgA-Antikörper-Antwort und eine systemische humorale Antwort (Rathbone *et al.*, 1986). Diese chronische Form der Gastritis bleibt zwar in 80-90% der Fälle asymptomatisch (Abb.2) (Suerbaum & Michetti, 2002), ein entzündetes Magenepithel begünstigt jedoch die Entwicklung von weiteren Erkrankungen. Etwa 10% der Infizierten entwickeln im Lauf der Infektion gastrische und duodenale Ulzera (Parsonnet, 1995). In seltenen Fällen entstehen Magenkarzinome und gastrische MALT-Lymphome und epidemiologische Studien zeigen, dass *H. pylori* mit diesen Folgekrankheiten assoziiert ist (Walsh & Peterson, 1995; Forman *et al.*, 1991; Wotherspoon *et al.*, 1993; Uemura *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass der klinische Verlauf einer persistierenden Infektion von drei Faktoren beeinflusst wird: 1. den Virulenzeigenschaften des *H. pylori*-Stamms oder der Stämme; 2. Eigenschaften des Patienten, wie Stärke der Säuresekretion im Magen, Immunstatus, genetische Prädispositionen, etc. und 3. Umweltfaktoren wie Ernährung und sozio-ökonomischen Bedingungen (Blaser & Berg, 2001; Nogueira *et al.*, 2001). Für die Eradikation wird in der Regel eine Tripeltherapie eingesetzt, die auf der Verwendung eines Säuresekretionshemmers und zweier Antibiotika basiert. Die Eradikationsrate der Tripeltherapie kann bis zu 96% betragen, wird jedoch durch die zunehmende Resistenzentwicklung von *H. pylori* beispielsweise gegen Clarythromycin beeinträchtigt (Meyer *et al.*, 2002). Die Reinfektionsraten sind in westlichen Nationen gering (Graham *et al.*, 1992). Prophylaktische und therapeutische Vakzine als alternative Behandlungs- und Prophylaxestrategie sind bislang nur im Tiermodell erfolgreich eingesetzt worden (Doidge *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Michetti *et al.*, 1999). Ein weiterer Behandlungsansatz wären Probiotika. Es ist gezeigt worden, dass *Lactobacilli H. pylori in vitro* und *in vivo* abtöten können (Coconnier *et al.*, 1998; Armuzzi *et al.*, 2001; Cats *et al.*, 2003). Eine komplette Eradikation von *H. pylori* durch die Behandlung mit Probiotika ist jedoch sehr unwahrscheinlich.



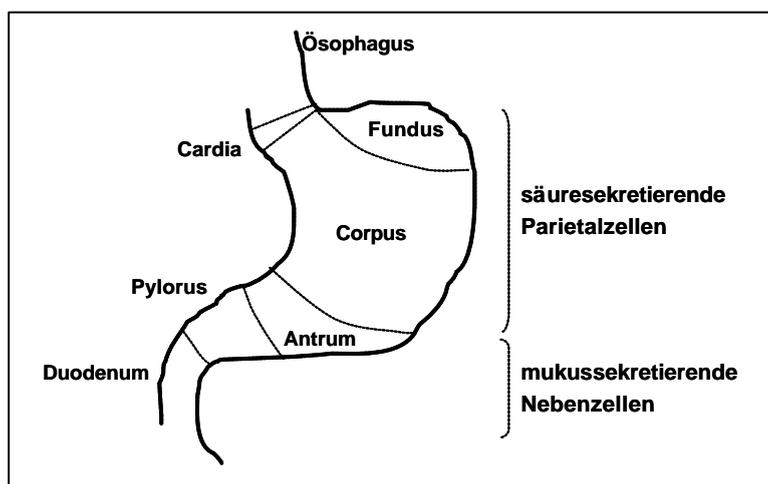
**Abb. 2. Verlauf einer *H. pylori*-Infektion.** Die Infektion findet gewöhnlich in der Kindheit statt. Die persistente Kolonisierung von *H. pylori* führt in jedem Fall zu einer chronischen Gastritis. In 80-90% der infizierten Personen entwickeln sich keine weiteren Erkrankungen und die Infektion bleibt asymptomatisch. In Abhängigkeit von bakteriellen und Wirtsfaktoren entwickeln sich in 10% der Patienten peptische Ulzera und in seltenen Fällen führt die Infektion zur Entstehung von Mukosa-assoziiertem Lymphgewebe (MALT) und Magenkrebs (modifiziert nach Suerbaum & Michetti, 2002).

#### 1.1.4. Virulenzfaktoren

Bakterielle Faktoren, die im Verlauf einer Infektion zu einer Schädigung des Wirtes und/oder zur Erhöhung der mikrobiellen Fitness im Wirt beitragen, werden als Virulenzfaktoren bezeichnet. Als Kriterien hierfür gelten eine Korrelation des Virulenzfaktors mit einer Wirtsschädigung und/oder eine Korrelation mit der Persistenz des Bakteriums *in vivo*. Weiterhin sollte die biologische Aktivität des Faktors durch eine Deletion verringert oder eliminiert werden, die durch Komplementation wiederhergestellt werden kann (Lu *et al.*, 2005). Die Virulenzfaktoren lassen sich in offensive (Toxine, Adhäsine, Invasine), defensive (Kapseln, LPS, äussere Membranproteine) und unspezifische (Eisenaufnahme, Metabolismus) Faktoren unterteilen. Es ist belegt, dass *H. pylori*-Stämme in ihren pathogenen Eigenschaften stark variieren können und ein wichtiger Ansatz in der Forschung von *H. pylori* ist die Identifizierung von Markern, die mit ernsten klinischen Symptomen assoziiert sind. Bislang ist nur für den Besitz einer funktionellen *cag*-Pathogenitätsinsel ein Zusammenhang mit der Erkrankungsschwere überzeugend gezeigt worden.

### Urease (Urea-Amidohydrolase)

Im Lumen des Magens beträgt der pH-Wert 1-2. *H. pylori* kolonisiert frei schwimmend die Mukusschicht und adhäriert an die Epithelzellen. Das Bakterium besiedelt bevorzugt den Antrumbereich (Abb. 3), in dem über der Epithelzellschicht der pH-Wert bei 6 liegt. Für die initiale Infektion und die Passage des Lumens ist eine Säureresistenz essentiell. Für diese Säureresistenz ist das Enzym Urease entscheidend verantwortlich. Das Bakterium produziert grosse Mengen des Enzyms, das bis zu 10% der Gesamtproteinmenge ausmachen kann (Bauerfeind *et al.*, 1997). Die Urease, die sowohl cytoplasmatisch als auch extrazellulär vorliegt, hydrolysiert Harnstoff in  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  (Hawtin *et al.*, 1990; Bode *et al.*, 1993). Die Protonierung von  $\text{NH}_3$  zu  $\text{NH}_4$  führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes in der Umgebung der Bakterienzelle, wodurch ein neutraler cytosolischer und periplasmatischer pH-Wert aufrechterhalten werden kann. Das native Enzym ist ein Nickel-haltiges Hexamer bestehend aus den beiden strukturellen Einheiten UreA und UreB (Dunn *et al.*, 1990; Hu & Mobley, 1990). Eine bedeutende Rolle der Urease als Virulenzfaktor wurde durch Studien verdeutlicht, die zeigten, dass das Enzym für die Kolonisierung essentiell ist. In verschiedenen Tiermodellen besaßen sogene Urease-negative Mutanten nicht die Fähigkeit den Magen zu kolonisieren, sogar dann nicht, wenn die Säuresekretion des Magens inhibiert wurde (Eaton *et al.*, 1991; Eaton & Krakowka, 1994). Demzufolge scheint das Enzym neben der Neutralisierung des pH-Wertes weitere für das Überleben notwendige Funktionen zu besitzen, wie zum Beispiel die Assimilierung von organischem Stickstoff. Desweiteren wurde für das von der Urease produzierte Ammoniak eine zellschädigende Wirkung *in vitro* nachgewiesen (Megraud *et al.*, 1992; Sommi *et al.*, 1996).



**Abb. 3. Anatomie vom Magen des Menschen.** *H. pylori* besiedelt bevorzugt den Antrumbereich des Magens, der im Vergleich zum Corpus- und Fundusbereich einen höheren pH-Wert aufweist.

### CagA und die *cag*-Pathogenitätsinsel

CagA (cytotoxin-assoziiertes Gen A) ist ein stark immunogenes Protein, welches von dem Gen *cagA* kodiert wird (Covacci *et al.*, 1993). Es ist in 50-70% der *H. pylori*-Stämme vorhanden (Cover *et al.*,

1995; Ching *et al.*, 1996). Für westliche Nationen ist gezeigt worden, dass Personen, die mit einem *cagA*-positiven Stamm infiziert sind, ein signifikant höheres Risiko besitzen, peptische Ulzera und Magenkarzinome zu entwickeln (Kuipers *et al.*, 1995; Blaser & Crabtree, 1996). Für Personen asiatischer Länder gilt dies hingegen nicht (Go & Graham, 1996; Hamlet *et al.*, 1999). Diese regionalen Differenzen könnten darauf zurückzuführen sein, dass sich die *cagA*-Sequenzen in den westlichen *H. pylori*-Isolaten von denen der ostasiatischen Isolate unterscheiden (Higashi *et al.*, 2002). Das *cagA*-Gen ist ein Marker für die Anwesenheit der genomischen *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI), die je nach Stamm aus ca. 30 Genen besteht (Censini *et al.*, 1996). Hinweise dafür, dass es sich hierbei um eine genomische Insel handelt, die mittels horizontalem Gentransfer in das Genom integriert wurde, sind der vom übrigen Genom abweichende G+C-Gehalt und die terminalen repetitiven Sequenzen (Hacker *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997). Einige Gene dieser Insel kodieren für Komponenten eines Typ IV-Sekretionssystems, durch das CagA direkt in das Cytoplasma der Wirtszelle transportiert wird (Segal *et al.*, 1999; Odenbreit *et al.*, 2000; Rohde *et al.*, 2003). Kürzlich ist gezeigt worden, dass CagL, ein weiteres Protein der *cag*-PAI, den eukaryontischen Integrin- $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor aktiviert und hierdurch die Translokation von CagA in die Wirtszelle eingeleitet wird (Kwok *et al.*, 2007). Nachdem CagA in der Wirtszelle phosphoryliert wurde (Stein *et al.*, 2002), interagiert das Protein mit verschiedenen Komponenten von Signaltransduktionswegen der Wirtszelle und führt dadurch zu morphologischen Veränderungen der Epithelzellen (Moese *et al.*, 2004; Selbach *et al.*, 2004). Die Interaktion des Typ IV-Sekretionssystems mit der Wirtszelle induziert zudem eine Aktivierung von proinflammatorischen Cytokinen (Odenbreit *et al.*, 2000). An der Induktion dieser Antwort ist zum einen CagA selbst beteiligt. Weiterhin ist offenbar auch Peptidoglykan der Bakterienzelle durch den engen Kontakt der Typ IV-Struktur mit der Epithelzelle an der Aktivierung beteiligt (Viala *et al.*, 2004). Die einzelnen Gene der PAI können eine hohe stammspezifische Sequenzvariabilität aufweisen (Andrzejewska *et al.*, 2006). Ungefähr 10% der *H. pylori*-Stämme besitzen eine inkomplette *cag*-PAI, deren Effekt auf den Krankheitsverlauf bisher nicht bekannt ist (Maeda *et al.*, 2001).

### **Vakuolisierendes Zytotoxin VacA**

Das Gen, welches für das vakuolisierende Zytotoxin VacA kodiert, ist in allen *H. pylori*-Stämmen vorhanden. VacA ist immunogen und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Entstehung von peptischen Ulzera und Magenkrebs, auch wenn der Beweis dafür letztlich noch fehlt (Atherton *et al.*, 1995; Ogura *et al.*, 2000). *In vitro* führt das Exotoxin zu einer starken Vakuolisierung von Epithelzellen (Leunk *et al.*, 1988). Das VacA-Polypeptid wird von dem Bakterium mittels einer Autotransporterdomäne sezerniert. Die Kristallstruktur der p55-Domäne, die für die Bindung von VacA an die Wirtszelle wichtig ist, ist aufgeklärt worden (Gangwer *et al.*, 2007). VacA bindet an die Wirtszelle und bildet Poren in der Zellmembran der Epithelzelle, wodurch Harnstoff, Anionen, Kationen und weitere für *H. pylori*

verwertbare Nährstoffe freigesetzt werden (Montecucco *et al.*, 2003). Membran-assoziiertes VacA kann auch in das Cytosol eindringen, Poren in den Mitochondrien-Membranen bilden und hierdurch die Apoptose der Zelle bewirken (Galmiche *et al.*, 2000; Cover *et al.*, 2003). Ein weiterer Effekt ist die Hemmung der Proliferation von T-Zellen (Gebert *et al.*, 2003) und die Hemmung der Antigenprozessierung (Molinari *et al.*, 1998). Das *vacA*-Gen ist polymorph und weist eine Mosaikstruktur von konservierten und variablen Segmenten auf (Cover *et al.*, 1994). Vakuolisierende Aktivität, die Menge an produziertem Toxin und die Rezeptoraffinität sind von dem *vacA*-Alleltyp abhängig (Atherton *et al.*, 1995) und erst kürzlich ist gezeigt worden, dass ein Alleltyp der *i*-Region des Gens mit dem Vorkommen von Magenkrebs assoziiert ist (Rhead *et al.*, 2007).

### **Motilität**

Die Motilität von *H. pylori* ist für die Kolonisierung essentiell und wird daher zu den Virulenzfaktoren gezählt. Im Tiermodell sind nicht begeisselte und somit nicht motile *H. pylori*-Varianten unfähig, eine persistente Infektion zu etablieren (Eaton *et al.*, 1996). Die Motilität ist vermutlich sowohl für die initiale Kolonisierung eines Wirtes für die Passage vom Lumen des Magens in die Mukusschicht notwendig, als auch für die Aufrechterhaltung der Infektion, da die Peristaltik des Magens und die kontinuierliche Mukussekretion ein Gegenwirken der Bakterien erfordert. Die Flagellenfilamente bestehen aus zwei strukturellen Komponenten, FlaA und FlaB und beide Einheiten sind für die Motilität und die Kolonisierung essentiell (Kostrzynska *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1993; Josenhans *et al.*, 1995; Eaton *et al.*, 1996). Die Flagellen sind von einer Membranhülle umgeben, die eine ähnliche LPS- und Protein-Zusammensetzung besitzt, wie die äussere Membran (Geis *et al.*, 1993) und dem Schutz der Flagellenproteine vor sauren pH-Werten dienen könnte. Die Motilität wird durch Chemotaxis über vermutlich vier Sensoren gesteuert. Bislang ist der TlpB-Sensor, der eine pH-Taxis vermittelt, experimentell charakterisiert (Croxen *et al.*, 2006). Die Orientierung der Bakterien erfolgt durch den Lumen-Mucus pH-Gradienten (Schreiber *et al.*, 2004).

### **Adhäsine**

Das für den experimentellen Teil dieser Arbeit wichtige Thema Adhäsine wird in Abschnitt 1.4. ausführlicher dargestellt.

### **Lipopolysaccharide (LPS)**

Lipopolysaccharide (LPS) sind für das Überleben von Bakterien essentiell. Im Gegensatz zu anderen gram-negativen Bakterien, die oft für den Wirt hoch toxische LPS-Strukturen besitzen, aktiviert das LPS von *H. pylori* und *H. hepaticus* nur schwach die Immunantwort des Wirtes (Muotiala *et al.*, 1992; Sterzenbach *et al.*, 2007). Diese Eigenschaft könnte zu einer chronischen Infektion beitragen. Lepper *et al.* (2005) und Sterzenbach *et al.* (2007) zeigten, dass eine durch *E. coli*-LPS induzierte proinflammatorische Antwort durch *H. pylori*- und *H. hepaticus*-LPS gehemmt werden kann. Die

Mehrzahl der *H. pylori*-Stämme exprimiert LPS-Strukturen, die fukosylierte Antigene enthalten, die strukturell und immunologisch mit den Lewis-Blutgruppen-Antigenen des Menschen verwandt sind (Aspinall & Monteiro, 1996; Monteiro *et al.*, 1998). Diese molekulare Mimikry zwischen dem *H. pylori*-LPS und dem Wirt führt vermutlich zu einer Immunevasion und könnte zum Überleben der Bakterien beitragen (Appelmek *et al.*, 1996). Zudem unterliegen die *H. pylori*-Lewis-Strukturen einer Antigenvariation, die zusätzlich zu einem Unterlaufen des Immunsystems beitragen können und die Th1/Th2-Antwort der Wirtes modulieren können (Bergman *et al.*, 2004). Appelmek *et al.* (2000) zeigten, dass im Tiermodell die Mimikry allerdings auch zu einer Induktion von Auto-Antikörpern führt, die wiederum eine verstärkte Entzündungsreaktion der Mukosa verursacht. Der Beitrag der Lewis-Antigene des LPS zur Adhärenz ist vermutlich gering (Mahdavi *et al.*, 2003).

## 1.2. Epidemiologie

### 1.2.1. Prävalenz und geographische Verteilung

*H. pylori* infiziert weltweit ca. 50% der Bevölkerung, wobei die Prävalenz von *H. pylori* zwischen verschiedenen Ländern und auch innerhalb eines Landes stark variieren kann (Abb. 4) (Feldman *et al.*, 2001). In Entwicklungsländern sind häufig mehr als 80% der Bevölkerung mit *H. pylori* infiziert, während in Industrieländern die Prävalenz der Infektion zwischen 25-50% liegt (Pounder & Ng, 1995; Dunn *et al.*, 1997). Zudem sind in Entwicklungsländern über 50% der Kinder *H. pylori*-positiv und in entwickelten Nationen werden hingegen weniger als 1% der Kinder infiziert. Die Prävalenz der Infektion ist invers mit dem sozio-ökonomischen Lebensstandard korreliert (Malaty & Graham, 1994) und ist in den Entwicklungsländern relativ konstant. Im Gegensatz hierzu ist die Infektionsrate in den Industrienationen deutlich gesunken, vermutlich im Zusammenhang mit der industriellen Entwicklung und den verbesserten hygienischen Bedingungen (Banatvala *et al.*, 1993; Parsonnet *et al.*, 1995). In den Entwicklungsländern steigt die Infektionsrate innerhalb der ersten fünf Lebensjahre stark an und bleibt dann konstant, ein Hinweis darauf, dass *H. pylori* in der Kindheit übertragen wird (Fiedorek *et al.*, 1991). In den entwickelten Ländern jedoch ist die Prävalenz der Infektion im frühen Kindesalter gering und steigt mit zunehmendem Alter an. Da die Inzidenz einer Infektion in diesen Nationen weniger als 1% beträgt und die Zahl *H. pylori*-positiver Personen stetig gesunken ist, reflektiert die erhöhte Prävalenz der Infektion in älteren Menschen einen Kohorten-Effekt, der durch die höheren Infektionsraten in der Vergangenheit bedingt ist (Banatvala *et al.*, 1993; Kuipers *et al.*, 1993).

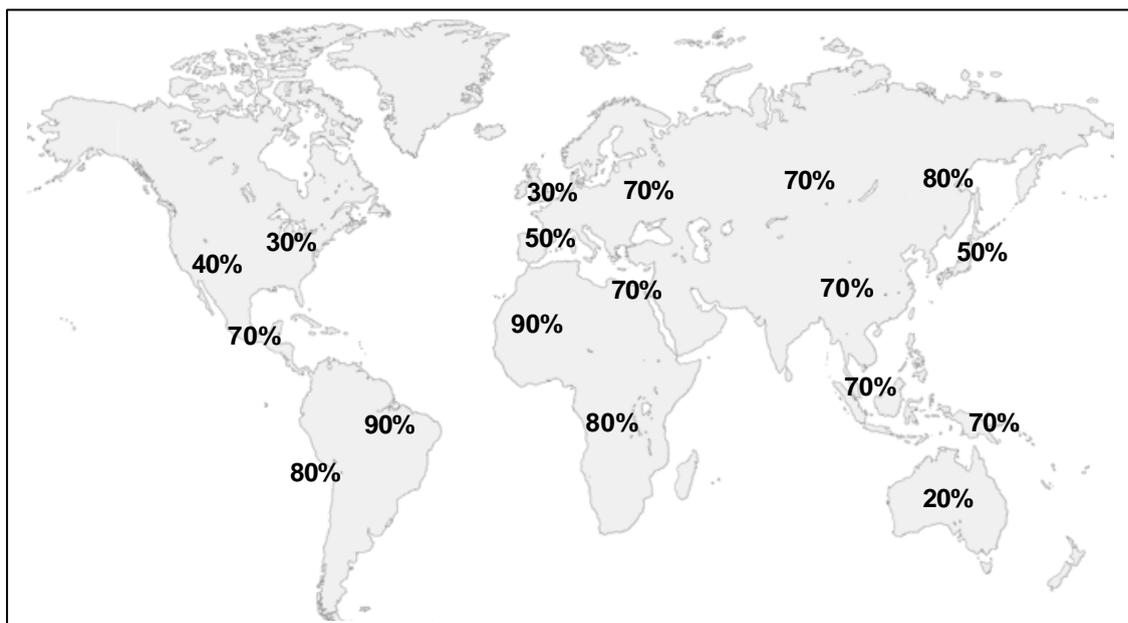


Abb. 4. Globale Variation der Prävalenz von *H. pylori*-Infektionen (Angaben von [www.helico.com](http://www.helico.com)).

### 1.2.2. Übertragung und Quellen der Infektion

Der genaue Übertragungsweg und -mechanismus von *H. pylori* ist grösstenteils unbekannt. Es wurden in den letzten Jahren zahlreiche epidemiologische Studien durchgeführt, in denen die An- und Abwesenheit einer Infektion und die genetischen Profile von *H. pylori* mittels Fingerprinting-Methoden analysiert wurden. Die Studien weisen darauf hin, dass vor allem in den Industrienationen die Infektion im Kindesalter innerhalb der Familie übertragen wird (Rowland *et al.*, 1999; Taneike *et al.*, 2001; Konno *et al.*, 2005; Rowland *et al.*, 2006). Die intrafamiliäre Übertragung lässt auf eine direkte Mensch-zu-Mensch Übertragung schliessen, die über den oral-oral, gastrisch-oral oder fäkal-oralen Weg erfolgen könnte (Parsonnet *et al.*, 1999; Solnick *et al.*, 2006). Es wäre auch denkbar, dass sich die Übertragungswege und/oder die Quellen der Infektion in den industrialisierten Ländern von denen der Entwicklungsländer, die eine sehr viel höhere *H. pylori*-Prävalenz aufweisen, unterscheiden. Weitere Quellen der Infektion ausserhalb der Familie sind diskutiert worden, die Hinweise hierfür sind jedoch wenig substantiiert und kontrovers. *H. pylori* wurde von Tieren wie Primaten und Schafen isoliert (Handt *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2001; Dore *et al.*, 2001). Eine zoonotische Übertragung ist allerdings sehr unwahrscheinlich und ist bislang auch nicht beschrieben worden. Weiterhin könnten die Bakterien durch kontaminiertes Wasser übertragen werden. Mehrere Studien beschrieben das Vorkommen von *H. pylori*-DNA in natürlichen Wasserquellen und in einer Studie ist sogar eine erfolgreiche Kultivierung von *H. pylori* aus Abwasser beschrieben worden (Enroth & Engstrand, 1995; Hegarty *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002). Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass es sich im ersten Fall um eine Kontamination mit freier DNA oder toten Bakterien handelt und im zweiten Fall um eine fäkale Kontamination.

## 1.3. Genetische Charakteristika

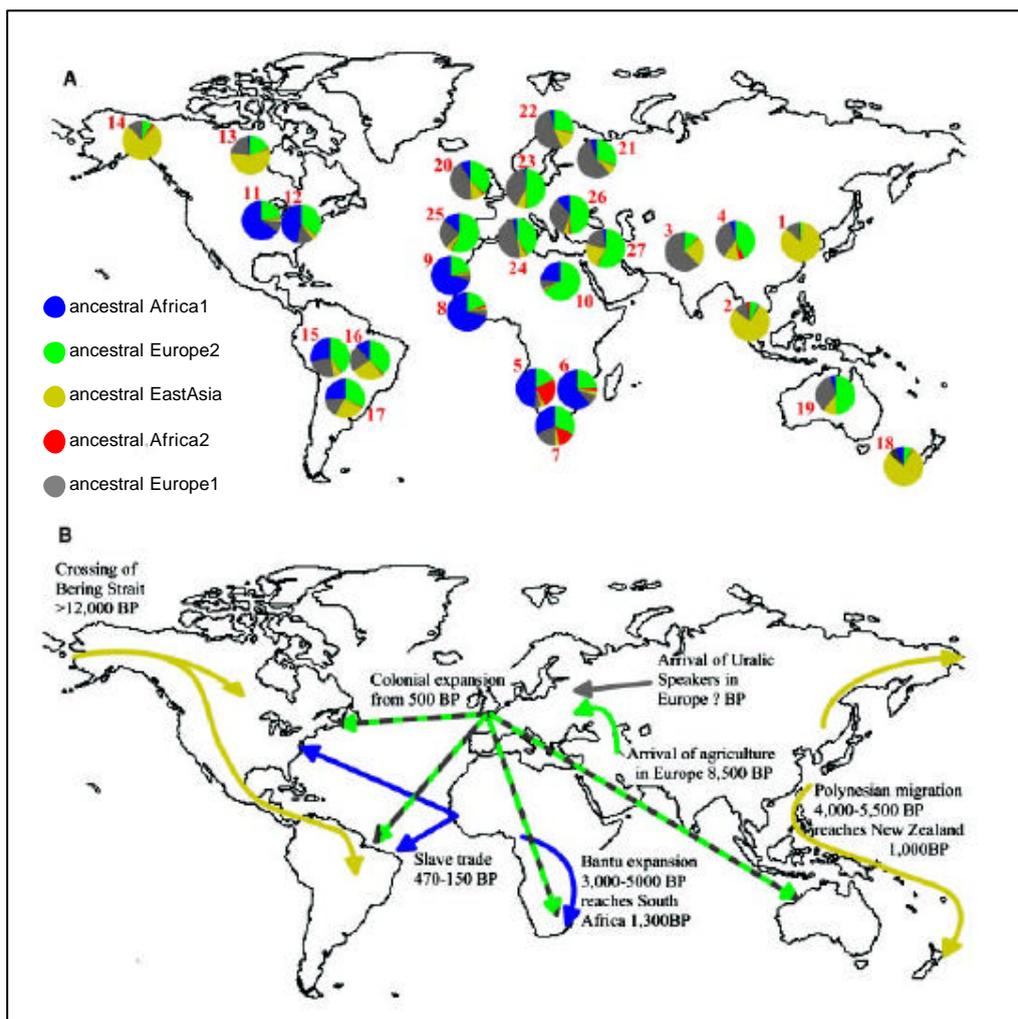
### 1.3.1. Genomische und genetische Diversität

Bereits vor der Sequenzierung der Genome der *H. pylori*-Stämme 26695, J99 und HPAG1 zeigte sich, dass das Bakterium eine ausserordentlich hohe genetische Diversität aufweist, die vermutlich höher ist als die aller bisher bekannten pathogenen Bakterien (Suerbaum *et al.*, 1998). Die Analyse von Stämmen aus unverwandten Individuen mittels Fingerprinting-Methoden wie die RAPD-PCR und RFLP zeigte, dass die Isolate unterschiedliche genetische Profile besitzen (Majewski *et al.*, 1988; Akopyanz *et al.*, 1992a; Akopyanz *et al.*, 1992b). Sogar die im Vergleich zu den Fingerprinting-Methoden sensitivere Sequenzanalyse bestätigte die genetischen Unterschiede in unverwandten Isolaten, selbst wenn nur wenige hundert Basenpaare eines Housekeeping-Gens sequenziert wurden (Kansau *et al.*, 1996). Jede *H. pylori*-positive Person scheint daher mit einem eigenen, einzigartigen Isolat oder mehreren Isolaten infiziert zu sein und darüberhinaus besitzt vermutlich jeder fast unverwandte Stamm für jedes Gen eine stammspezifische Sequenz. Die Ursache für diese hohe Alleldiversität ist zum einen eine hohe Mutationsfrequenz, die eine hohe und kontinuierliche Akkumulation von *de novo*-Mutationen bewirkt (Wang *et al.*, 1999; Björkholm *et al.*, 2001). Die Mehrheit der *H. pylori*-Stämme weist eine höhere Mutationsfrequenz auf als Wildtyp-Enterobakterien und ca. ¼ der Isolate besitzt eine Mutationsfrequenz, die höher ist als die von Mutator-Enterobakterien mit einem defekten Mismatch-Reparatur-System (Horst *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die hohe Mutationsfrequenz in *H. pylori* auf fehlende oder unvollständige DNA-Reparatursysteme zurückzuführen ist (Suerbaum, 2000). Achtman *et al.* (1999) zeigten, dass es sich bei der Mehrheit der Nukleotid-Polymorphismen in Housekeeping- und Virulenz-assoziierten Genen in *H. pylori* um synonyme Substitutionen handelt, die keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirken. Das ausserordentlich hohe Niveau der allelischen Diversität lässt sich jedoch nicht allein durch eine hohe endogene Mutationsfrequenz erklären. Erste Hinweise für stattfindende Rekombination lieferten eine Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE)-Analyse und die Sequenzierung des *vacA*-Gens, die zeigte, dass das Gen eine Mosaikstruktur aufweist, die ein Kennzeichen von homologer Rekombination ist (Atherton *et al.*, 1995; Go *et al.*, 1996). Die Durchführung eines populationsgenetischen Tests, mit dem sich Rekombination quantifizieren lässt (Homoplasie-Test; Maynard Smith & Smith, 1998), belegte, dass die allelische Variabilität von *H. pylori* vor allem durch eine sehr hohe Rekombinationsfrequenz erzeugt wird. Rekombination führt zu einer Umverteilung und Fragmentierung von Sequenzen und kann aus nur wenigen polymorphen Positionen eine grosse Anzahl an neuen Sequenzkombinationen bzw. neuen Allelen generieren (Suerbaum *et al.*, 1998). *H. pylori* ist für die Aufnahme von DNA natürlich kompetent (Nedenskov-Sørensen *et al.*, 1990) und genetische Varianten werden hauptsächlich durch intergenomische Rekombination zwischen verschiedenen Stämmen während gemischter Infektionen erzeugt (Kersulyte *et al.*, 1999; Israel *et al.*, 2001). Die durchschnittliche Importgrösse beträgt 417 Bp (Falush *et al.*, 2001). Zudem tragen

intragenomische Rekombinationen zwischen den in grosser Anzahl im Genom vorkommenden repetitiven Sequenzen zur Genomplastizität bei (Aras *et al.*, 2003). Die Verfügbarkeit von kompletten Genomsequenzen ermöglichte einen Vergleich der genomischen Eigenschaften und bestätigte die hohe intraspezifische Diversität des Bakteriums, da kein orthologes Genpaar in den Genomen der Stämme 26695 und J99 eine identische Nukleotidsequenz aufwies (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Darüberhinaus zeigte sich, dass sich das Genrepertoire in den beiden Isolaten unterscheidet und ca. 7% der Gene stammspezifisch sind. Die Genomvergleiche von weiteren, unverwandten Stämmen mit Hilfe von DNA-Microarrayhybridisierungen, bestätigten die stammspezifische An- und Abwesenheit von Genen (Salama *et al.*, 2000; Gressmann *et al.*, 2005). Eine weitere charakteristische Eigenschaft des Genoms von *H. pylori* ist die hohe Anzahl an phasenvariablen Genen. Es sind über 45 Gene beschrieben worden, die aufgrund von homopolymeren und Dinukleotid-Repeats an- und ausgeschaltet werden können (Salaun *et al.*, 2004). Diese hypermutierbaren Repeats können durch „slipped strand mispairing“ während der Replikation in ihrer Länge variieren und so im kodierenden Bereich von Genen zu einer Leserahmen-Mutation und zu einem vorzeitigen Translations-Stopp führen (Hallet *et al.*, 2001). Da die Mehrheit der phasenvariablen Gene für Zelloberflächen-lokalisierte Proteine und in die LPS-Biosynthese involvierte Proteine kodieren (Appelmek *et al.*, 1999; Peck *et al.*, 1999; Josenhans *et al.*, 2000), spielt die Phasenvariation vermutlich eine wichtige Rolle in der Pathogen-Wirt-Interaktion. Studien, die die genetische Variabilität von sequenziell isolierten Stämmen eines Individuums analysierten, weisen darauf hin, dass *H. pylori* vermutlich einer kontinuierlichen genetischen Diversifikation innerhalb eines Wirtes unterliegt, und es ist anzunehmen (Falush *et al.*, 2001; Smeets *et al.*, 2003; Kraft *et al.*, 2006), dass die hohe Genomplastizität einen selektiven Vorteil für die Anpassung an den einzelnen Wirt und die chronische Kolonisierung darstellt.

### 1.3.2. Populationsstruktur und geographische Diversität

Obwohl durch hochfrequente Rekombination klonale Strukturen effizient verwischt werden können, sind schwach klonale Gruppierungen in *H. pylori* aus verschiedenen geographischen Regionen identifiziert worden (Achtman *et al.*, 1999). Bisher sind die modernen Populationen hpAfrica1, hpAfrica2, hpEurope, hpEastAsia, hpAsia2 und hpNEAfrica beschrieben worden, die mit dem geographischen Ursprung der Isolate korrelieren und aufgrund von Migrationen aus den ancestralen Populationen Africa1, Europe1, Europe2, EastAsia und Africa2 hervorgegangen sind (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007). Die hohe allelische Heterogenität und das geringe Kopplungsungleichgewicht von *H. pylori* beinhalten ein Informationspotential für populationsgenetische Analysen. Durch die enge Assoziation mit dem Menschen gibt *H. pylori* auch Aufschlüsse über die Besiedelung der Kontinente durch den Menschen und spätere Migrationen, wie den Sklavenhandel und die koloniale Besiedelung von Südamerika und anderen Kontinenten durch die Europäer (Abb. 5) (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007).



**Abb. 5. Die möglichen ursprünglichen und sekundären Wanderungen von *H. pylori*.** A. Der durchschnittliche Anteil an ursprünglichen Nukleotiden in Abhängigkeit vom geographischen Ursprung. Die Farben geben die Populationen an: Blau, ancestral Africa 1; grau, ancestral Europe 1; grün, ancestral Europe 2; gelb, ancestral EastAsia und rot, ancestral Africa 2. B. Die Interpretation von A. Die Pfeile geben die Migrationen von Menschen und *H. pylori*-Populationen an. BP, before present (modifiziert nach Falush *et al.*, 2003).

## 1.4. Bakterielle Adhärenz an Wirtszellen

### 1.4.1. Für die bakterielle Adhärenz relevante Strukturen der Oberfläche von Wirtszellen

#### 1.4.1.1. Allgemeine Charakteristika

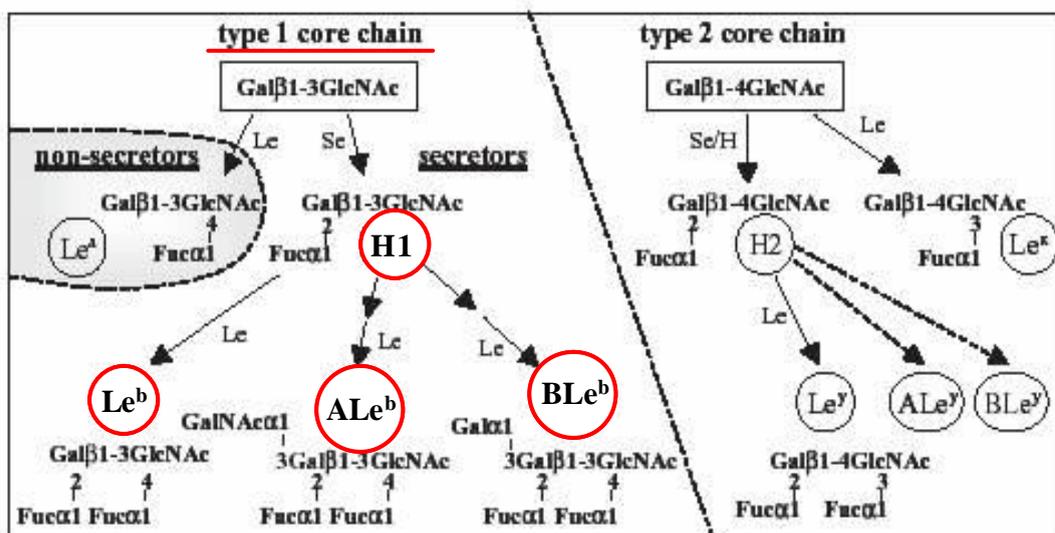
In Eukaryonten vermitteln Oligosaccharide (Glykane), die gebunden an der Zelloberfläche und an extrazelluläre Proteine und Lipide (Glykokonjugate) vorliegen, viele wichtige strukturelle und physiologische Funktionen, wie beispielsweise die Zell-Zell-Adhärenz und die Zell-Zell-Kommunikation

bei immunologischen Reaktionen (Paulson, 1989; Esko, 1991; Gahmberg & Tolvanen, 1996). Die Proteine, die diese Glykane erkennen und an diese binden (Lektine) sind nicht nur endogenen Ursprungs. Ebenso binden bakterielle Lektine an diese Strukturen und es zeigte sich, dass die Mehrheit der Strukturen an der Oberfläche von Wirtszellen, die für kommensale und pathogene Mikroorganismen als Bindungsorte fungieren, Glykokonjugate sind. Die oberflächen-lokalisieren Glykane des Wirtes spielen daher auch in der Vermittlung von Bakterien-Wirt-Interaktionen eine bedeutende Rolle. Die Expression der Kohlenhydratstrukturen ist spezifisch für die Art, das Individuum und das Gewebe, wodurch die Basis für den Tropismus einer Infektion geschaffen werden kann (Varki, 1993). Es können jedoch markante Änderungen der Expression von Glykanen während der Entwicklung, zellulären Aktivierung, Zelldifferenzierung, Entzündung und Krebsentstehung stattfinden (Sakamoto *et al.*, 1989; Tsuji, 1996). Die Glykokonjugate an der Zelloberfläche zeichnen sich durch eine ausserordentlich hohe strukturelle Komplexität und Diversität aus (Rademacher *et al.*, 1998). Über die biologische Funktion der enormen Vielfalt kann nur spekuliert werden, da bisher nur wenige Strukturen einer biologischen Funktion zugeordnet werden konnten. Eine Hypothese besagt, dass die Strukturen, die als mikrobielle Rezeptoren fungieren, kontinuierlichen Änderungen unterliegen, um die Kolonisierung mit schädlichen Mikroorganismen zu vermeiden. Veranschaulicht wird diese Hypothese durch das Beispiel der Hydroxylase, die N-Acetylneuraminsäure (NeuAc) in N-Glykolyl-Neuraminsäure (NeuGc) konvertiert und von den meisten Säugetieren produziert wird. Die Hydroxylase des Menschen ist aufgrund des fehlenden N-Terminus jedoch inaktiv. Der Stamm *E. coli* K-99, der für die initiale Adhärenz NeuGc benötigt, kann in Ferkeln und Kälbern zu einer lethalen Diarrhoe führen (Mouricout *et al.*, 1990), ist allerdings für den Menschen wegen des nicht produzierten NeuGc harmlos. Es sind über 140 verschiedene mikrobielle Glykan-Bindungsspezifitäten bekannt (zusammengefasst in Mirelman, 1986) und eine steigende Anzahl an Studien zeigt, dass die Bindung von vielen Bakterien, Pilzen und Parasiten an Glykokonjugate für die Kolonisierung und Virulenz essentiell ist (Mouricout *et al.*, 1990). Die Glykobiologie der Pathogen-Wirt-Interaktionen ist u.a. aufgrund neuer Technologien ein sich schnell entwickelndes Forschungsgebiet und für das Verständnis bakterieller Infektionen und der Entwicklung therapeutischer Ansätze von grosser Bedeutung.

#### **1.4.1.2. ABO- und Lewis-Blutgruppen-Antigene als Rezeptoren für *H. pylori***

Bei den Strukturen, die die Blutgruppen-Antigene determinieren, handelt es sich um Kohlenhydrate, die typischerweise auf der Oberfläche von Erythrozyten lokalisiert sind. Die Antigene der ABO-Blutgruppen werden unter anderem auch auf der Zelloberfläche von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert, sie werden daher auch als Histo-Blutgruppen-Antigene bezeichnet werden (Clausen *et al.*, 1989). Die Blutgruppen A und B werden durch die Tri-Saccharide des A- bzw. B-Antigens determiniert, während die Blutgruppe 0 durch das Di-Saccharid des H-Antigens bestimmt wird, das gleichzeitig die

Grundstruktur für die Synthese der A- und B-Antigene darstellt. Die Lewis-Blutgruppen-Antigene sind den AB0-Blutgruppen-Antigenen strukturell sehr ähnlich und beide werden aus denselben Vorläufer-Strukturen gebildet (Abb. 6) (Hakomori, 1981). Aus der Typ 1-Grundstruktur (Gal(β1-3)GlcNAc) werden durch verschiedene Glykosyl-Transferasen, die an die Ausgangsstruktur Fukose, Galactose oder GalNAc anhängen, die Antigene Sialyl-Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>a</sup>, und H1 synthetisiert (Abb. 6). Das H1-Antigen bleibt entweder unmodifiziert (Blutgruppe 0-Phänotyp) oder es werden durch das Anhängen von weiteren Monosacchariden die Antigene Lewis<sup>b</sup>, A1 und B1 gebildet. Aus den beiden letzteren wiederum werden durch das Anhängen von je einer Fukose die Antigene ALewis<sup>b</sup> und BLewis<sup>b</sup> synthetisiert. Die Typ 2-Kohlenhydratkette (Gal(β1-4)GlcNAc) ist die Grundstruktur für die Synthese von Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, X-, H2, Y-, A2- und B2-Antigenen. Der erste Schritt der Synthese der verschiedenen Antigene, die Modifizierung der Typ 1- und auch der Typ 2-Struktur kann durch die „secretor“-Fukosyl-Transferase (Se-Transferase) katalysiert werden, während die H-Transferase nur die Typ 2-Kette modifiziert. Die Se-Transferase die auf Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und der Speicheldrüsen, etc. und in Körpersekreten stark exprimiert wird, ist in manchen Menschen aufgrund polymorpher Gensequenzen inaktiv. Diese Menschen werden als „nonsecretor“ bezeichnet und produzieren im Gegensatz zu den Menschen mit einem "secretor"-Phänotyp Lewis<sup>a</sup> als vorherrschendes Antigen und fast keine AB0-Blutgruppen- und Lewis<sup>b</sup>-Antigene in den Körpersekreten und auf mukosalen Epithelzellen (Sakamoto *et al.*, 1989). Bei „secretor“-Individuen ist Lewis<sup>b</sup> ist das vorherrschende Blutgruppen-Antigen der gesunden gastrischen Epithelzellschicht und wird von ca. 70% der Menschen exprimiert (Sakamoto *et al.*, 1989). Weiterhin ist bei „secretor“-Individuen die Expression von sialylierten Blutgruppen-Antigenen in der gastrischen Mukosa gering, wird jedoch in entzündetem gastrischen Gewebe verstärkt. Die Antigene Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und Sialyl-Lewis<sup>a</sup> werden zudem verstärkt von Tumorzellen exprimiert (Sakamoto *et al.*, 1989). Bisherige Studien zeigen, dass *H. pylori* die Antigene H1, Lewis<sup>b</sup>, ALewis<sup>b</sup>, BLewis<sup>b</sup>, Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, Sialyl-di-Lewis<sup>x</sup> und Sialyl-Lewis<sup>a</sup> erkennt und spezifisch an diese adhärert (vgl. 1.4.3.).

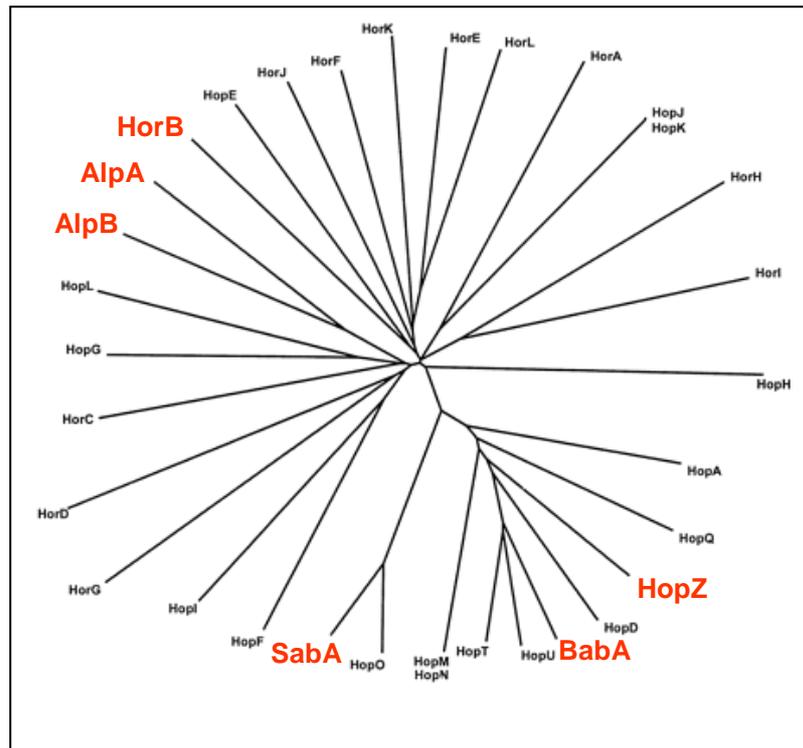


**Abb. 6 (vorherige Seite). Die Biosynthesewege der AB0- und Lewis-Blutgruppen-Antigene.** Die Typ 1- und Typ-2-Kohlenhydratketten werden durch eine Fukosyl-Transferase fukosyliert und die H1- und H2-Antigen gebildet. In Blutgruppe 0 Individuen werden die H-Antigene nicht weiter modifiziert. In Blutgruppe A- und B-Individuen werden die H-Antigene durch die weitere Verknüpfung mit Monosacchariden zu den Antigenen Lewis<sup>b</sup>, A Lewis<sup>b</sup>, B Lewis<sup>b</sup> und weiteren AB0-Antigenen umgewandelt. Die für die Adhäsion-vermittelte Bindung von *H. pylori* relevanten Antigene sind rot hervorgehoben (modifiziert nach Odenbreit, 2005).

### 1.4.2. Adhärenz Eigenschaften von *H. pylori* und deren Bedeutung für die Kolonisierung und Virulenz

Die Adhärenz von extrazellulären und invasiven pathogenen Mikroorganismen an Wirtszellen ist für die initiale Kolonisierung, die Etablierung einer Infektion und die Entwicklung von Krankheiten fast immer ein essentieller Schritt (Finlay & Falkow, 1997). Die Bindung von Bakterien an die Zelloberfläche von Wirtszellen erfolgt vermutlich einerseits unspezifisch durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Andererseits wird die Adhärenz durch spezifische Interaktionen von bakteriellen Strukturen auf der Zelloberfläche (Adhäsine), die an bestimmte, komplementäre Wirtsstrukturen (Rezeptoren) binden, vermittelt. Aufgrund der bei physiologischem pH-Wert negativ geladenen Bakterien- und Wirtszelloberfläche, die zu einer Abstossung der Zellen führen, sind diese stärkeren, hochspezifischen Bindungsinteraktionen für eine stabile Adhärenz notwendig (Ofek & Doyle, 1994). Als Adhäsine können im Allgemeinen äussere Membranproteine, Fimbrien und andere Zellansatzgebilde fungieren. Da *H. pylori* keine Fimbrien besitzt, sind die äusseren Membranproteine für die Bindungseigenschaften des Bakteriums von grösserer Bedeutung. Bakterien können verschiedene Adhäsine mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten besitzen, die nicht nur die Bindung an die Wirtszellen vermitteln, sondern auch den Tropismus für den Wirt, das Gewebe und/oder den Zelltyp. Der begrenzte Wirts-Tropismus von *H. pylori* kann beispielsweise durch die Tatsache erklärt werden, dass Lewis<sup>b</sup>, welches die Adhärenz des Bakteriums an die Magenepithelzellen vermittelt, ausschliesslich vom Menschen und von Primaten produziert wird. Desweiteren adhärert *H. pylori* spezifisch an die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, aber nicht an die Zellen des Nervensystems oder des Urogenitaltraktes (Finlay & Falkow, 1997). Die Mehrheit der *H. pylori*-Population im Magen befindet sich schwimmend in der Mukusschicht und nur wenige Bakterien adhären an die Epithelzellen (Schreiber *et al.*, 2004). Dies reflektiert vermutlich die Vor- und Nachteile einer engen Bindung an die Wirtszellen. Zum einen verhindert die Adhärenz ein Hinausspülen von *H. pylori* in das Lumen, das durch die Peristaltik und die kontinuierliche Mukusabsonderung hervorgerufen wird und ein enger Kontakt mit den Epithelzellen ermöglicht zudem eine effiziente Nutzung von Nährstoffen, die von gesunden oder beschädigten Zellen während der Entzündung freigesetzt werden (van Amsterdam & van der Ende, 2004). Zum anderen können adhärenz Bakterien eine stärkere Immunantwort auslösen (Guruge *et al.*, 1998) und sind Abwehrmechanismen des Immunsystems verstärkt ausgesetzt. Da die enge Bindung der Bakterien an die Wirtszelle für die Translokation der Effektoren CagA und VacA notwendig ist, spielen die

Adhärenzeigenschaften von *H. pylori* vermutlich auch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Folgekrankheiten der *H. pylori*-Kolonisation. Die Regulation der Bindung scheint daher ein wichtiger Faktor für die Persistenz von *H. pylori* zu sein. Ein Charakteristikum der Bindungseigenschaften von *H. pylori* ist die hohe Komplexität der Glykokonjugat-Bindungsspezifitäten, die vermutlich zu einer Besiedelung von unterschiedlichen Nischen im Magen, zur Anpassung an den jeweiligen Wirt, sowie zur Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen beiträgt. Bislang beschriebene Studien die Bindung an Sialinsäuren (Evans *et al.*, 1988), sulfatierte Lipide (Saitoh *et al.*, 1991), Heparan-Sulfat (Ascencio *et al.*, 1993), Fukose (Borén *et al.*, 1993), Ganglio-Glykolipide (Gold *et al.*, 1993), Laktosylceramide (Ångström *et al.*, 1998), Phospholipide und Phosphatidyl-Ethanolamin (Lingwood *et al.*, 1992). Die Analyse der komplett sequenzierten Genome zeigte, dass *H. pylori* ein ausserordentlich grosses Repertoire an Genen besitzt, die für vorhergesagte äussere Membranproteinen (OMPs) kodieren: ca. 4% der Gene kodieren für mehr als 60 OMPs. Die Hälfte dieser Gene wird aufgrund von N- und C-terminalen Sequenzhomologien in den sogenannten Hop- und Hor-Familien zusammengefasst (Abb. 7) (Alm *et al.*, 2000). Die Proteine der Hop-Familie besitzen konservierte N- und C-terminale Motive, während die Mitglieder der Hor (Hop-related)-Familie die N-terminalen Motive nicht aufweisen. Die OMPs dieser paralogen Familien variieren beträchtlich in der Grösse (20-130 kDa). Der konservierte C-Terminus besteht aus alternierenden hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren, die eine Funktion als membranspannende Domänen vermuten lassen (Bina *et al.*, 2000). Die zentrale Region der Proteinsequenz hingegen weist eine sehr hohe Variabilität auf und vermittelt vermutlich proteinspezifische Funktionen, beispielsweise als Bindungs epitop. Die Funktion der meisten dieser OMPs ist unbekannt, sie könnten jedoch eine Rolle in der Adhärenz von *H. pylori* spielen und die diversen Bindungsspezifitäten des Bakteriums bedingen. Bislang sind die spezifischen Interaktionen von zwei Adhäsinen, BabA und SabA, und deren Rezeptoren der Wirtszellen charakterisiert worden.



**Abb. 7.** Der phylogenetische Stammbaum der paralogen Hop- und Hor-Familie der äusseren Membranproteine von *H. pylori*. Die bislang identifizierten Proteine, die in der Adhärenz von *H. pylori* an die Wirtszellen involviert sind (BabA, SabA, AlpAB, HopZ und HorB), sind rot hervorgehoben (modifiziert nach Alm *et al.*, 2000).

### 1.4.3. Adhäsine von *H. pylori*

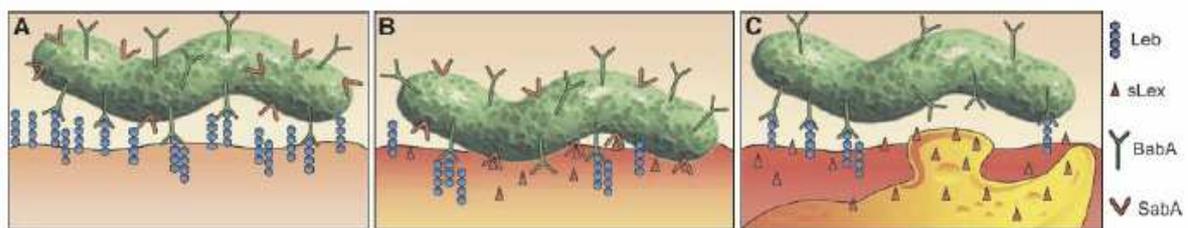
#### BabA

Borén *et al.* (1993) zeigten, dass das fukosylierte Blutgruppen-Antigen Lewis<sup>b</sup> als Rezeptor für *H. pylori* fungiert. Daraufhin ist das OMP HopS als Adhäsine für Lewis<sup>b</sup> identifiziert worden und wurde aufgrund der Bindungsspezifität als Blutgruppen-Antigen-bindendes (BabA)-Adhäsine bezeichnet (Ilver *et al.*, 1998). Die minimale Struktur von Lewis<sup>b</sup>, die von BabA erkannt wird, ist das Fuc $\alpha$ 1-2-Epitop (Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). Zudem fungieren die Blutgruppen-Antigene H1, A, ALewis<sup>b</sup> und BLewis<sup>b</sup> als Rezeptoren für BabA (Ilver *et al.*, 1998; Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). Die homologen Bereiche der Proteine der Hop- und Hor-Familie ermöglichen intra- und intergenomische Rekombinationen. In der Tat ist gezeigt worden, dass intragenomische Rekombination zwischen *babA* und dem nah verwandten *babB*-Gen, dessen Funktion nicht bekannt ist, stattfindet. Die Duplikation von *babB* in den *babA*-Locus führt zu einem Verlust der Bindung an Lewis<sup>b</sup> während der Infektion von Rhesusaffen (Solnick *et al.*, 2004) und umgekehrt kann *in vitro* die Rekombination von einem *babA*-Gen, das aufgrund eines fehlenden Translationsstarts nicht exprimiert wird, in den *babB*-Locus zu einer Expression von *babA* und somit zu einer Wiederherstellung der Adhärenz an Lewis<sup>b</sup> führen (Bäckström *et al.*, 2004). Demnach scheint dass

An- und Abschalten von *babA* durch Rekombinationsereignisse ein Mechanismus von *H. pylori* zu sein, dynamische Bindungseigenschaften während der Infektion zu erzeugen.

### SabA

Die chronische Kolonisierung von *H. pylori* führt zu einer Entzündung der gastrischen Epithelzellschicht, die mit einer verringerten Expression von fukosylierten Lewis-Antigenen und einer verstärkten Produktion von sialysierten Lewis-Antigenen wie Sialyl-Lewis<sup>a</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, einhergeht (Ota *et al.*, 1998). *babA*-negative Isolate können an diese Sialyl-Antigene und an entzündetes gastrisches Gewebe adhären. Das Protein, welches die Bindung an Sialyl-Lewis<sup>a</sup>, Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und sialyl di-Lewis<sup>x</sup> vermittelt, gehört ebenfalls zu der Hop-Familie und wird als Sialinsäure-bindendes (SabA)-Adhäsion bezeichnet (Mahdavi *et al.*, 2002; Aspholm *et al.*, 2006). Da SabA die Adhärenz von *H. pylori* an entzündetes gastrisches Gewebe verstärken könnte, trägt das Adhäsion vermutlich zur Persistenz der Infektion bei. Das minimale sialylierte Bindungsepitop ist das NeuAc $\alpha$ 2-3Gal-Disaccharid (Aspholm *et al.*, 2006). Das *sabA*-Gen und die vier weiteren OMP-kodierenden Gene *babB*, *hopZ*, *oipA* und *sabB* besitzen in dem 5'-Terminus der kodierenden Gensequenz einen CT-Dinukleotid-Repeat und werden daher wahrscheinlich durch Phasenvariation reguliert, die durch ein häufiges An- und Abschalten der Gene zu einem flexiblen Bindungsphänotyp beiträgt (Abb. 8).



**Abb. 8. Die Adhärenz von *H. pylori* an gesundes und entzündetes Magenepithel.** (A) Die Adhärenz von *H. pylori* wird durch die Interaktion von BabA und Lewis<sup>b</sup> vermittelt, das auf der Oberfläche der Wirtszelle exprimiert wird; (B) Während der chronischen Entzündung wird vermehrt Sialyl-Lewis<sup>x</sup> auf dem Epithel produziert und die Bindung erfolgt durch SabA; (C) Einer verstärkten Immunantwort können Subklone von *H. pylori* durch das An- und Abschalten von *sabA* ausweichen. (aus Mahdavi *et al.*, 2002).

### AlpA, AlpB, HopZ und HorB

Die Adhärenz-assoziierten Lipoproteine A (AlpA) und B (AlpB) sind in die Bindung von *H. pylori* an die Zelllinie Kato-III und an die Bindung von Magenbiopsieschnitten involviert (Odenbreit *et al.*, 1999; Odenbreit *et al.*, 2002). Bisher konnte der eukaryontische Rezeptor für die Adhäsine nicht identifiziert werden. Die *alpAB*-Gene lassen sich in zwei Allelgruppen (East Asian und Western) einteilen, die mit dem geographischen Ursprung der Stämme korrelieren und sich unabhängig von den adhären

Eigenschaften in der Fähigkeit das Immunsystem zu aktivieren, unterscheiden (Lu *et al.*, 2007). Da isogene Knockout-Mutanten der Gene *hopZ* und *horB* eine signifikant reduzierte Bindung an die Zelllinie AGS aufweisen, sind HopZ und HorB weitere OMPs, die eine Rolle in der Adhärenz von *H. pylori* spielen (Peck *et al.*, 1999; Snelling *et al.*, 2007). Die Wirtszell-Rezeptoren sind ebensowenig bekannt und es ist denkbar, dass HopZ und HorB nicht direkt die Bindung mit dem Rezeptor vermitteln, sondern für die korrekte Faltung und Ausrichtung anderer Adhäsine auf der Oberfläche der Bakterien verantwortlich sind.

## 1.5. ZIELSETZUNG

*H. pylori* zeichnet sich durch eine sehr hohe genetische Diversität aus, die durch eine hohe Rekombinations- und Mutationsfrequenz generiert wird. In dieser Arbeit sollte die genomische Plastizität zum einen im Kontext der Transmission des Bakteriums und der Entstehung der allelischen Diversität nach natürlicher Übertragung untersucht werden und zum anderen im Kontext der Bindungseigenschaften von *H. pylori* an Rezeptoren der Wirtszelle während der Infektion.

Die genauen Übertragungswege von *H. pylori* sind trotz intensiver Forschung weitgehend unbekannt. Epidemiologische Studien weisen auf eine Übertragung durch direkten Personenkontakt innerhalb der Familie hin und dies ist auch der bisher allgemein akzeptierte Übertragungsweg. In bisherigen Studien wurde die Übertragung von *H. pylori* jedoch hauptsächlich in Familien aus industrialisierten Ländern und städtischen Regionen untersucht, die eine geringe Prävalenz der Infektion und ähnliche sozio-ökonomische Bedingungen aufweisen. Zudem handelt es sich bei diesen Familien um kleine, zwei Generationen umfassende Familien, die nur eine Untersuchung der Übertragung von den Eltern auf das Kind oder zwischen Geschwistern ermöglichten. Weiterhin beruhen fast alle bisherigen Studien auf Methoden, die entweder keine Stammtypisierung ermöglichen, oder nur ein geringes Auflösungsvermögen besitzen. Die Prävalenz von *H. pylori* ist mit sozio-ökonomischen Bedingungen assoziiert und die im Vergleich zu entwickelten Ländern sehr viel höhere Infektionsrate in den Entwicklungsländern könnte auf unterschiedliche Übertragungswege zurückzuführen sein. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, die Übertragung von *H. pylori* in einer ländlichen Region in Südafrika zu analysieren, die eine hohe Prävalenz der Infektion aufweist und deren sozio-ökonomische Bedingungen sich von denen der industrialisierten Ländern unterscheiden. Da die Transmission von *H. pylori* über mehrere Generationen einer Familie verfolgt werden sollte, wurden zwei Familien, die drei und vier Generationen umfassen, für die Analyse herangezogen. Ein weiteres Ziel war es, die hohe genetische Diversität von *H. pylori* zu nutzen und die Isolate der Familienmitglieder mit der hochauflösenden Methode der Sequenzierung von sieben Genfragmenten (Multilocus-Sequenztypisierung, MLST) zu typisieren.

Hierdurch lässt sich zum einen die Entstehung der allelischen Diversität nach natürlicher Transmission verfolgen und zum anderen sollte eine wesentlich detailliertere Analyse der Übertragung erreicht werden. Aufgrund der Tatsache, dass die MLST bisher noch nicht für Untersuchungen der Transmission von *H. pylori* in industrialisierten Ländern eingesetzt wurde, sollten auch in Familien dieser Regionen die Übertragung mittels MLST analysiert werden. Hierfür wurden Familien aus den USA, Korea, Kolumbien, Irland und England herangezogen. Ein Vergleich der genetischen Muster von *H. pylori* innerhalb dieser Familien mit dem genetischen Muster der *H. pylori*-Isolate in den südafrikanischen Familien sollte Aufschluss geben über die Transmissionswege in den Familien, sowie über mögliche Unterschiede in der Übertragung des Bakteriums in Regionen mit einer hohen und geringen Prävalenz der Infektion.

Die Adhärenzeigenschaften von *H. pylori* spielen eine wichtige Rolle in der Etablierung einer chronischen Infektion. Die Adhäsine, die die Bindung an Rezeptoren auf der Wirtszell-Oberfläche vermitteln, unterliegen daher vermutlich einem anderen Selektionsdruck als metabolische Proteine. Dies sollte durch Sequenzanalysen und Bestimmung der synonymen und nicht-synonymen Mutationsraten der für die Adhäsine BabA und SabA und für mehrere metabolische Proteine kodierenden Gene untersucht werden, um einen Einblick in die evolutionären Mechanismen zu gewinnen, die der Anpassung des Bakteriums an den Wirt zugrundeliegen. Die kontinuierliche Entstehung von Bakterien mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften ist vermutlich für die Persistenz der Infektion essentiell. Da über die adhärenz Eigenschaften von *H. pylori* an die Rezeptoren Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> *in vivo* innerhalb des Wirtes während der Kolonisierung wenig bekannt ist, sollte die Bindung sequenziell isolierter Stämme aus chronisch infizierten Patienten (zeitl. Abstand 3 Monate bis 3 Jahre) an die Rezeptoren analysiert werden, um Hinweise auf die Bedeutung dieser Bindungsspezifitäten während der Infektion zu gewinnen. Die Untersuchung der Adhärenz der sequenziellen Isolate erfolgte *in vitro* mittels Bindungsassays mit lebenden Bakterien an die spezifischen Rezeptoren. Es wird weiterhin vermutet, dass die hohe genomische Plastizität von *H. pylori* einen selektiven Vorteil darstellt und für die Anpassung an den einzelnen Wirt und an sich ändernde Bedingungen (Immunantwort, strukturelle und histologische Veränderungen) während der Infektion von Bedeutung ist. Es gibt erste experimentelle Hinweise, die diese Hypothese unterstützen. Da es sich bei der Adhärenz um einen Phänotyp handelt, der sich quantifizieren lässt, ermöglichte die Bestimmung der BabA- und SabA-Adhäsinequenzen der sequenziellen Isolate und deren Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auch eine Analyse des funktionellen Effektes der genetischen Diversifizierung *in vivo*. Für die weitere Untersuchung möglicher funktioneller Konsequenzen der natürlichen Sequenzvariation in *babA* und *sabA*, die zu einer erhöhten oder verminderten Adhärenz führen, sollte eine Expressionsanalyse der Gene, sowie Komplementationversuche durchgeführt werden.

## 2. MATERIAL

### 2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), JT Baker, Eppendorf (Hamburg), Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Sarstedt (Nümbrecht). Die Chemikalien hatten den Reinheitsgrad "p.a." bzw. "reinst" und wurden abhängig von der Anwendung entweder in bidestilliertem Wasser oder HPLC-gereinigtem Wasser gelöst.

### 2.2. Geräte

Brutschränke	Scholzen® Brutschrank, Microbiology Systems AG, Wittenbach (Schweiz); Heraeus (Hanau)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser XCell, Bio-Rad (München)
Gelelektrophoresekammern	Bio-Rad (München)
Heizblöcke	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop	BX40, Olympus (Hamburg)
pH-Meter	pH-Meter 761 (Jürgens)
Plattenphotometer	Titertek Multiskan® MCC/340, Flow Laboratories (USA)
Reinraumwerkbänke	Kojair® (Tampere, Finnland)
Rotationsschüttler	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Schüttelinkubator	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Sequenzierer	3130xl-Kapillarsequenzierer, Applied Biosystems(USA)
Spannungsgeräte	Bio-Rad (München)
Spektralphotometer	GeneQuant <i>pro</i> , Amersham Biosciences (Freiburg).
Thermocycler	T3, Biometra (Göttingen)
UV-Transilluminator	Bio-Rad (München)
Vortexer	IKA® (Wilmington, USA)
Waagen	Feinwaage, Sartorius AG (Göttingen)
Zentrifugen	Biofuge <i>Pico</i> , Heraeus (Hanau)
	1-15 K, Sigma (Steinheim)
	4K15, Sigma (Steinheim)

## 2.3. Bakterienstämme

### 2.3.1. *H. pylori*

Tab. 1. Wildtyp-Stämme und in dieser Arbeit konstruierte Knockout-Mutanten des Bakteriums *Helicobacter pylori*.

<i>H. pylori</i> -Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz / Herkunft
26695 J99	Wildtyp Wildtyp	Tomb <i>et al.</i> , 1997 Alm <i>et al.</i> , 1999/ zur Verfügung gestellt von T. Borén, Umeå Universität, Schweden
J99 <i>babA</i>	J99 <i>babA::cat</i> , chromosomale Integration der <i>cat</i> Cassette in den <i>babA</i> -Locus (pSUS2705); Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
J99 <i>sabA</i>	J99 <i>sabA::aphA3<sup>-</sup>-III</i> , chromosomale Integration der <i>aphA3<sup>-</sup>-III</i> -Kassette in den <i>sabA</i> -Locus (pSUS2706), Km <sup>R</sup>	
J99 <i>babA/sabA</i>	J99 <i>babA::cat</i> , (pSUS2705); <i>sabA::aphA3<sup>-</sup>-III</i> , (pSUS2706); Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	

**Abkürzungen:** *cat*, Chloramphenicol-Acetyltransferase-Kassette; Cm<sup>R</sup>, Chloramphenicol-Resistenz; *aphA3<sup>-</sup>-III*: Aminoglykosid-Phosphotransferase-Kassette; Km<sup>R</sup>, Kanamycin-Resistenz

Tab. 2. Verwendete Paare sequenzieller Isolate von *H. pylori*. Sequenzielle Isolate desselben Patienten wurden durch aufeinanderfolgende Endoskopien nach unterschiedlichen zeitlichen Abständen entnommen. Vor dem Schrägstrich in der Stammbezeichnung ist das zuerst entnommene und nach dem Schrägstrich das darauf entnommene Isolat angegeben.

<i>Helicobacter pylori</i> : Herkunft Stammbezeichnung	Patient: Alter, Geschlecht	Intervall [Monate]	Referenz
<b><u>New Orleans (USA)</u></b>			
LSU1010-1 / -3	38, W	3	Taylor <i>et al.</i> , 1995
LSU1014-1 / -6	69, W	24	
LSU1037-1 / -5	53, W	12	
LSU1040-1 / -6	35, W	24	
LSU1062-1 / -3	27, M	3	
<b><u>Region Narino (Kolumbien)</u></b>			
NQ331 / 1832	?	36	Falush <i>et al.</i> , 2001
NQ352 / 1701	49, W	36	
NQ367 / 1671	38, W	36	

**Abkürzungen:** W, weiblich; M, männlich

**Tab. 3. Verwendete Isolate von *H. pylori*, die zwei oder mehr Mitgliedern einer Familie entnommen wurden.**  
Soweit nicht anders angegeben, wurde ein Isolat (Corpus oder Antrum) pro Patient entnommen.

<b><i>Helicobacter pylori</i>- Isolate: Herkunft Familien- und Stammbezeichnung</b>	<b>Patient: Alter, Verwandtschaft</b>	<b>Referenz</b>
<b><u>Houston (USA)</u></b>		Li <i>et al.</i> , 2002
<b>Familie H1</b>		
H1	57, Mutter	
H1-1	33, Tochter	
H1-2	30, Sohn	
<b><u>Familie H2</u></b>		
H2	73, Mutter	
H2-1	60, Schwester	
H2-2	70, Bruder	
H2-3	78, Bruder	
H2-4	52, Sohn	
<b><u>Familie H3</u></b>		
H3	70, Mutter	
H3-1	37, Sohn	
<b><u>Seoul (Korea)</u></b>		
<b>Familie K1</b>		
K1	67, Vater	
K1-1	33, Tochter	
K1-2	43, Sohn	
K1-3	30, Sohn	
K1-4	41, Sohn	
<b>Familie K3</b>		
K3	74, Mutter	
K3-1	32, Sohn	
K3-2	36, Tochter	
K3-3	38, Tochter	
K3-4	46, Tochter	
K3-5	48, Sohn	
<b>Familie K5</b>		
K5	56, Mutter	
K5-1	31, Sohn	
K5-2	23, Sohn	
K5-3	25, Tochter	
<b><u>Bogota (Kolumbien)</u></b>		
<b>Familie C5</b>		
C5	64, Mutter	
C5-1	21, Tochter	
C5-2	32, Tochter	
C5-3	30, Sohn	
C5-4	28, Sohn	
<b>Familie C6</b>		
C6	77, Vater	
C6-1	45, Tochter	
C6-2	48, Sohn	
<b>Familie C7</b>		
C7	74, Mutter	

---

C7-1	35, Tochter
C7-2	37, Tochter
C7-3	33, Tochter

**Belfast (Ireland)**Owen & Xerry,  
2003**Familie Belfast**

H3022	10, Sohn
H3023	34, Vater

**Coventry (England)****Familie Coventry**

H3018	18, Enkel
H3014	71, Großvater
H3016	46, Vater
H3017	50, Onkel

**Pretoria (Südafrika)**Delpport *et al.*,  
2006**Familie 12 (Antrum und Korpus****Isolate)**

SA213A,C	21, Tochter
SA214A,C	14, Sohn
SA215C	7, Tochter (Zwilling)
SA216A,C	7, Tochter (Zwilling)
SA45A,C	51, Ehemann von SA46
SA46A,C	49, Mutter
SA47A,C	17, Sohn
SA194A,C	49, Mutter
SA166A	63, Tochter
SA168A,C	39, Enkelin
SA169A,C	46, Tochter
SA170A,C	11, Enkelin
SA173A,C	21, Enkel
SA171A,C	6, Ur-Enkelin
SA172A1,A2,C	7, Ur-Enkelin
SA303A,C	nn, Ur-Enkelin
SA160A,C	8, Tochter
SA161A,C	14, Enkel
SA162A,C	11, Enkel
SA29A,C	88, Ur-Großvater
SA30A,C	55, Tochter
SA158A,C	21, Enkel
SA253A,C	29, Enkel
SA300A,C	nn, Enkel
SA31C	18, Enkel
SA226A	27, Enkelin
SA227A,C	33, Ehemann von SA226
SA251A,C	35, Enkel
SA252A,C	34, Enkel
SA163A,C	11, Ur-Enkelin
SA210A,C	5, Ur-Enkel
SA301A,C	nn, Enkelin
SA302A,C	nn, Ehemann von SA301
SA144A,C	51, Mutter
SA222A,C	60, Ehemann von SA144
SA146A,C	8, Sohn
SA155A,C	48, Mutter
SA156A,C	9, Tochter
SA157A,C	17, Tochter
SA224A,C	43, Tochter
SA164A,C	4, Enkel
SA165A	5, Enkel

---

<b>Familie 13</b>	80, Vater
SA35A,C	60, Mutter
SA36C	42, Ehemann von SA32
SA233A,C	30, Sohn
SA34A,C	19, Tochter
SA37A,C	40, Tochter
SA221A,C	46, Ehemann von SA221
SA220A,C	12, Enkelin
SA174A,C	9, Enkelin
SA175A,C	3, Enkel
SA40A,C	

**Abkürzungen:** A: Antrum-Isolat, C: Corpus-Isolat

### 2.3.2. *E. coli*

**Tab. 4. Verwendeter Stamm des Bakteriums *Escherichia coli*.**

<i>Escherichia coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5a	F, f80d <i>lacZ</i> ?M15, ? ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , ?, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983

## 2.4. Vektoren

**Tab. 5. Verwendete Plasmide.**

Plasmid	Vektor	Größe (kB)	Genotyp / Phänotyp	Referenz
	pUC18	2,7	<i>lacZ</i> , <i>bla</i> , Amp <sup>R</sup> , high copy Vektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pILL600	pBR322		Quelle der <i>aphA3</i> '-III Cassette, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Labigne-Roussel <i>et al.</i> , 1988
	pHel2		Quelle der <i>cat</i> -Cassette, Cm <sup>R</sup>	Heuermann & Haas, 1998
pSUS2703	pUC18	5,9	<i>babA</i> aus <i>H. pylori</i> J99 mit <i>Bam</i> H1-Schnittstellen in MCS kloniert; Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSUS2704	pUC18	5,1	<i>sabA</i> aus <i>H. pylori</i> J99 mit <i>Eco</i> R1-Schnittstellen in MCS kloniert; Amp <sup>R</sup>	
pSUS2705	pUC18	4,6	inverse PCR von pSUS2703 ligiert mit Cm <sup>R</sup> -Cassette; Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	
pSUS2706	pUC18	4,8	inverse PCR von pSUS2704 ligiert mit Km <sup>R</sup> -Cassette; Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	

**Abkürzungen:** Amp<sup>R</sup>, Ampicillin-Resistenz; MCS, multiple cloning site; Km<sup>R</sup>, Kanamycin-Resistenz; Cm<sup>R</sup>, Chloramphenicol-Resistenz; *cat*, Chloramphenicol-Acetyltransferase-Kassette; *aphA3*'-III: Aminoglykosid-Phosphotransferase-Kassette

## 2.5. Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten synthetischen Oligonucleotide wurden im lyophilisierten Zustand von MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen, mit HPLC-gereinigtem Wasser suspendiert (200 pmol/ $\mu$ l) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tab. 6. Verwendete Oligonukleotide für die Amplifizierung und Sequenzierung interner Fragmente von Housekeeping-Genen von *H. pylori*.**

Oligonucleotid-bezeichnung	Gensymbol (Gennummer) <sup>a</sup>	Sequenz (5' 3')	Anlagerungs-temperatur [°C]	Referenz
O_1964	<b>atpA</b> (HP1134)	GGACTAGCGTTAAACGCACG	57	www.pubmlst.org; Achtman <i>et al.</i> , 1999
O_1965		CTTGAAACCGACAAGCCCAC	55	
atpA4		TGCCCGTCTGTAATAGAAATG		
atpA7		CGCTTTGGGTGAGCCTATTG		
O_2044	<b>efp</b> (HP0177)	GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC	53	''
O_2045		CTTCACCTTTTCAAGATACTC		
O_1979	<b>mutY</b> (HP0142)	GTGGTTGTAG(CT)TGGAACCTTACAC	53	''
O_1980		CAACGCCCAAGTAACGCTCTTC		
O_3238	<b>ppa</b> (HP0620)	GGAGATTGCAATGAATTTAGA	51	''
O_3241		GTGGGGTTAA(AG)ATCGTTAAATTGTAG	57	
ppa1		GTGAGCCATGACGCTGATTCTTTGT		
ppa2		GCCTTGATAGGCTTTTATCGCTTTCT		
O_1370	<b>trpC</b> (HP1279)	TAGAATGCAAAAAGCATCGCCCTC	57	''
O_1372		TAAGCCCGCACACTTTATTTTCGCC		
O_2356	<b>ureI</b> (HP0071)	AGGTTATTCGTAAGGTGCG	51	''
O_3151		GTTTAAATCCCTTAGATTGCC	55	
ureI71S1		CAATAAAGTGAGCTTGGCGCAACT		
ureI71AS1		TCCCTTAGATTGCCAACTAAACGC		
O_1960	<b>yphC</b> (HP0834)	CACGCCTATTTTTTACTAAAAAC	55	''
O_1963		CATT(CT)ACCCTCCCAATGATGC		

<sup>a</sup> Die Gennummern beziehen sich auf die Annotation des *H. pylori*-Stammes HP26695 (TIGR-Datenbank: <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>)

**Tab. 7. Verwendetes Oligonucleotid für die „random amplification of polymorphic DNA“ (RAPD-PCR) von *H. pylori*.**

Oligonucleotid-bezeichnung	Sequenz (5' 3')	Anlagerungs-temperatur [°C]	Referenz
AP 1283	GCGATCCCCA	36	Akopyanz <i>et al.</i> , 1992b

**Tab. 8** Verwendete Oligonukleotide für die Amplifizierung und Sequenzierung der Gene *sabA* (HP0725/JHP662) und *babA* (HP1243/JHP833) aus *H. pylori*, sowie für die Konstruktion von J99*babA*-, J99*sabA*- und J99*babAsabA*-Knockout-Mutanten. Die Schnittstellen der entsprechenden in Klammern angegebenen Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Oligonukleotid-bezeichnung	Sequenz (5' 3')	Anlag. temp. [°C]	Zweck / Referenz	
babA-3	ATGAAAAAACACATCCTTTCATTA(AG)CTTTAGG	51	Amplifizierung und Sequenzierung von <i>babA</i> / diese Arbeit	
babA-3-2	AGGAGAAAAAACATGAAAAACA	51		
babA-4	TTGCATGTGGCTAAAAAGCC	53		
babA-4for	GACCACTCAAACCTTTCGC	50		
babA-420	TCAACAACCATCTTCAACAACG	55		
babA-5	AGCCTTTC AACCTTTCACG	55		
babA5-3	TTGCGCAAGGCATGCTCGC	57		
babA5-5	CGATCCAAAAGATGATCACG	53		
babA-6	TAAGCGAACAC(AG)TA(AG)TTCAAATACACGC	53		
babA-6_J99	TAATGTGAGCTTTTAATAAGCGAACACG	55		
babA-6_26695	AAAGAGCCAAACATTAGTAAGCGAAC	55		
babA-7	TATCAGATCCTCCAAACGGC	55		
babA-8	CGTTGTTTTCTTTGAGCGCG	55		
babA-8-3	CATTGTTGTTTTGAGCGCC	55		
babA-8-4	CCGTTGTTTTCTTTGAGCGC	55		
babA-9	GTAACCCCTTTAGGAAAGTGG	56		
babA-9-1	GAAACCCCTTTCAGGAAAATAG	53		
babA-10	CCACCTGAATACCGATCCC	55		
sabA-1	GTGAGCGC(GC)GGCTATCAAATC	60	Amplifizierung und Sequenzierung von <i>sabA</i> / diese Arbeit	
sabA-2	TTAAGAGCGTTGCT(CT)ACGG	51		
sabA-3	CAATCTTTGCGCTTTATCCGG	57		
sabA-4	GTAAGC(AG)AACACATAATTGAGATACACGC	55		
sabA-5	TTGAAAATACCCAATGCGGG	53		
sabA-6	GGCGAAAGCAAAGATGGGG	57		
sabA-7	CTTAAAGCCGCATCCACCCG	59		
sabA-8	ACTAACAAATCGCTCCACC	55		
sabA-14	TATCACTTCATGATATTCTTACAAC	53		
sabA-14-1	TATCATTTTAG(AG)ATATTTTA(AG)CAAC	50		
sabA-16	ACACCGGCACCACTAAAATG	55		
sabA-JHP661	TAGGGTGCTTTTACAACCTCG	53		
J99_F1_833-32	ataggatccAATACCGATTATTATAGCGC ( <i>Bam</i> H1)	53		Konstruktion von <i>babA</i> und <i>sabA</i> Mutanten / diese Arbeit
J99_R1_833-34	ataggatccTTAGTGCGTTCTTGTTAGCG ( <i>Bam</i> H1)			
J99_F2_833	ataagatctCCTAAAGTTAATGAAAGGATGTG ( <i>Bgl</i> III)	55		
J99_R2_833	ataagatctATTAAGGCTCACATTAACCC ( <i>Bgl</i> II)			
J99_F1_662	ataggatccTAGGGTGCTTTTACAACCTCGC ( <i>Bam</i> H1)	53		
J99_R1_662	ataggatccTTCCCATTTGAATACTGATGATAAG ( <i>Bam</i> H1)			
J99_F2_662	ataagatctACCATTTGCACCGCTTCGC ( <i>Bgl</i> II)	55		
J99_R2_662	ataagatctTTCAATCTCGGCTTGAGGACG ( <i>Bgl</i> III)			
Km1	CTGCTAAGGTATATAAGCTGGTGGG	50		
Km2	CATACTGTTCTTCCCCGATATCCTC			
pcat-1	AACAGCTATGACCATGATTACG	55	Suerbaum <i>et al.</i> , 1993	
pcat-2	agaggatccGATATCGCATGCCTGCAGAG ( <i>Bam</i> H1)			
pcat-5	GGAGTTACAACGATCATCAATCG	56		
pcat-6	ATATGTGCAGGGCGTATTGCC			
pUC18/M13for	GTTTTCCCAGTCACGACG	55		
pUC18/M13rev	TCACACAGGAAACAGCTATGAC			
babB_for	AAACCCTTTTACTCTCTC	50	Messing & Vieira, 1982	
babB_rev	TTGCACTTCATAACACA CC			

**Tab. 9. Verwendete Oligonukleotide für die Amplifizierung eines internen Fragmentes der 16S rRNA von *H. pylori*.**

Oligonukleotid-bezeichnung	Sequenz (5' 3')	Anlagerungs-temperatur [°C]	Referenz
16S -1	GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC	61	Schmitz <i>et</i>
16S -2	TGGCAATCAGCGTCAGGTAATG	61	<i>al.</i> , 1997

## 3. METHODEN

### 3.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

#### 3.1.1. Anzucht von *Helicobacter pylori*

##### **Kultivierung**

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte auf Blutagarplatten, denen die Antibiotika Amphotericin B (4 mg/l), Polymyxin B (3,2 mg/l), Trimethoprim (5 mg/l) und Vancomycin (10 mg/l; alle Sigma-Aldrich, Steinheim) dem Nährmedium zugesetzt wurden. Die Selektion von rekombinanten Klonen erfolgte durch den weiteren Zusatz von Kanamycin (20 mg/l) oder Chloramphenicol (10 mg/l). *H. pylori* wurde bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen in Kammern eines Scholzen® Brutschrankes, denen ein definiertes Gasgemisch zugeführt wurde (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>), oder in Anaerobentöpfen (Oxoid, Wesel) mit einem Beutel Anaerocult (8-10% CO<sub>2</sub>, 5-7% O<sub>2</sub>; Merck, Darmstadt) kultiviert. Aus auf Eis aufgetauten Einfrierkulturen wurden 50 µl bis 70 µl auf eine Blutagarplatte getropft und für 48 Stunden inkubiert. Für die weitere Kultivierung wurde nach zweitägigem Wachstum etwas Bakterienmaterial abgenommen und auf frische Platten ausgestrichen. Für die Anzucht von *H. pylori* in Flüssigmedium wurde BHI-Medium verwendet, dem 10% (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Biochrom AG, Berlin), sowie die o.g. Antibiotika für die Routinekultivierung in gleicher Konzentration zugesetzt wurden. Nach 24 h Wachstum wurden Bakterien von ein bis zwei Platten abgenommen, in 5 ml BHI-Medium suspendiert und die OD<sub>600</sub> bestimmt (OD<sub>600</sub> von 1 entspricht 3x10<sup>8</sup> *H. pylori* Zellen/ml). Zehn ml BHI-Medium wurde in 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben und die Bakteriendichte auf 2,1x10<sup>7</sup> Zellen/ml (OD<sub>600</sub> = 0,07) eingestellt. Die Gefäße wurden mit leicht angedrehten Verschlüssen mit einem Anaerocultbeutel in Anaerobentöpfen fixiert und bei 37°C und 175 Upm geschüttelt.

##### **Dauerkulturen**

Die Lagerung von *H. pylori* erfolgte in Einfriermedium (BHI-Medium, 10% Glycerin, 10% hitzeinaktiviertes Pferdeserum), das in Kryoröhrchen aliquotiert war. Nach zweitägiger Kultivierung wurde abhängig vom Wachstum der Bakterienrasen einer mindestens halben Blutagarplatte abgenommen, in 0,8 ml Einfriermedium suspendiert und bei -80°C eingefroren.

##### **Reinheitskontrolle**

Die Reinheitskontrolle von *H. pylori*-Kulturen beinhaltete eine mikroskopische Kontrolle, sowie die Überprüfung auf positive Urease-, Katalase- und Oxidaseaktivität. Die Ureaseaktivität wurde durch Einreiben von Bakterien in eine pH-Indikatorlösung bestimmt. Die Enzymaktivität führt zu einer Erhöhung des pH und zu einem Farbumschlag. Durch Auftropfen von 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Bakterien wurde die

Katalaseaktivität bestimmt, die durch die Spaltung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  zu einer Bläschenbildung führt. Die Überprüfung der Oxidaseaktivität erfolgte mit Microbiology Bactident<sup>®</sup> Oxidase Teststäbchen (Merck, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers.

#### Blutagarplatten

40 g Blood Agar Base No. 2 (Oxoid, Wesel)  
 100 ml Pferdeblut (Oxoid, Wesel)  
 ad A.d. 1000 ml

#### BHI-Medium

37g BHI-Broth  
 2,5 g Hefeextrakt  
 100 ml Pferdeserum  
 ad A.d. 1000 ml

#### Urease-Indikatorlösung (pH 7)

0,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 0,1% Neutralrot  
 0,1% Bromthymolblau  
 2 % Harnstoff  
 0,2 % Agar No.1 (Oxoid)

### **3.1.2. Anzucht von *Escherichia coli***

#### **Kultivierung**

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 37°C. Für die Selektion rekombinanter Klone wurde dem Medium in Abhängigkeit vom verwendeten Selektionsmarker Ampicillin (200 mg/l), Kanamycin (20 mg/l), Chloramphenicol (10 mg/l), sowie ggf. zum Nachweis einer Alpha-Komplementation Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG, 0,2 mM) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal; 1,6 mg) (alle Sigma-Aldrich, Steinheim) zugegeben. Für die Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedium wurde LB-Medium verwendet, welches mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 175 Upm geschüttelt wurde.

#### **Dauerkulturen**

In LB-Bouillon angezüchtete *E. coli* wurden nach 12-16h Wachstum bei 3000 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit LB-Medium versetzt mit Glycerin suspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C (LB-Medium, 44% Glycerin) und -80°C (LB-Medium, 20% Glycerin).

Luria Bertani Agar

10 g Trypton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
15 g Agarose  
ad A.d. 1000 ml

Luria Bertani Bouillon

10 g Trypton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
ad A.d. 1000 ml

### 3.2. DNA-Arbeitstechniken

Für die Arbeiten mit DNA wurden hitzestabile Materialien und Lösungen autoklaviert und sterile Einwegmaterialien verwendet. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (0,22 µm, Stericup®; Millipore, Badford, USA). Die Reinigung der Arbeitsflächen und Geräte erfolgte mit 70% (v/v) vergälltem Ethanol.

#### 3.2.1. Extraktion von DNA aus Bakterien

##### 3.2.1.1. Extraktion von Gesamt-DNA aus *H. pylori*

Die Isolierung von DNA erfolgte mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatographie. Größere Mengen DNA (bis 90 µg) wurden aus Bakterien gereinigt, die 24-48h auf Agarplatten angezüchtet wurden. Bakterienmaterial einer Platte wurde in 0,9% (w/v) NaCl suspendiert und für 15 min bei 5000 x g abzentrifugiert. Für die anschließende DNA-Isolierung wurden das Genomic DNA Buffer Set und Tip100/G Säulen (beides Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Extraktion von kleineren DNA Mengen wurde das QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierfür wurden Bakterien ebenfalls für 24-48 h auf Agarplatten angezüchtet und aus 1/8 bis 1/4 der Zellen pro Platte die DNA isoliert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

##### 3.2.1.2. Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab beruhte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1976). Fünf ml LB-Bouillon wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert und mit dem plasmidkodierten Antibiotikum bei 175 Upm über Nacht kultiviert. Hiervon wurden 1,4 ml abgenommen und für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und 5 min bei

RT inkubiert. Nachdem 200 µl Lösung II zugegeben wurden, wurde der Ansatz gemischt und 3 min auf Eis stehen gelassen. Die Lyse wurde durch Zugabe von 150 µl eiskalter Lösung III gestoppt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 11000 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 gemischt und bei 11000 Upm für 3 min zentrifugiert. Die plasmidhaltige Oberphase wurde abgenommen, mit dem doppelten Volumen 96%igem Ethanol versetzt und bei 11000 x g für 20 min zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und bei 11000 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet, in 30 µl 10 mM Tris HCl (pH 8) versetzt mit RNase A (10 µg/ml; Sigma, Steinheim) suspendiert und bei RT 10 min inkubiert. Die Isolierung von Plasmid-DNA in größeren Mengen (bis zu 100 µg) erfolgte mit dem QIAprep® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) mittels alkalischer Lyse und Anionenaustauscher-Säulen. Hierzu wurden 25 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und die Plasmide nach Herstellerangaben extrahiert. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C.

Lösung I

5 ml	Glucose 1M
2,5 ml	Tris-HCl (1M), pH 8
2 ml	EDTA (0,5M)
	ad 100 ml A.d.
	vor Gebrauch: + Lysozym (10 mg/ml)

Lösung II

100 µl	NaOH (10 N)
0,5 ml	SDS (10%)
4,4 ml	A.d.

Lösung III

60 ml	Kaliumacetat (5 M)
11,5 ml	konz. Essigsäure
28,5 ml	ddH <sub>2</sub> O

### 3.2.2. Quantifizierung und Reinheitskontrolle von Nucleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit von DNA und RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260nm mit folgenden Formeln berechnet:

DNA (doppelsträngig):  $c [\mu\text{g/ml}] = 50 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

RNA:  $c [\mu\text{g/ml}] = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die Reinheit der Nucleinsäuren wurde durch Berechnung des Verhältnisses von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  abgeschätzt. Reine DNA weist ein Verhältnis von 1,7-1,9 auf und reine RNA ein Verhältnis von 1,9-2,1.

### 3.2.3. Techniken der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.2.3.1. Standard PCR mit genomischer DNA oder Plasmid-DNA als Matrize

DNA-Fragmente wurden spezifisch mit der PCR-Kettenreaktion amplifiziert. Die Standard-PCR wurde mit der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Aufgereinigte Matrizen-DNA wurde in Mengen von 10-100 ng pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde mit der Formel  $(2x(A+T) + 4x(G+C)) - 5$  berechnet und pro 1 kB zu amplifizierender DNA wurde. 1 min Elongationszeit angesetzt. Die Zyklenanzahl betrug 25-30. Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden in 0,2 oder 0,5 ml Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert:

5 µl 10x Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
 8 µl dNTPs (1,25 mM; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
 0,5 µl Primer sense (20 pmol/µl)  
 0,5 µl Primer antisense (20 pmol/µl)  
 0,25 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5000 U/ml)  
 5 µl DNA (10-100 ng)  
 ad ddH<sub>2</sub>O 45 µl

Die PCR erfolgte bei folgendem Temperaturprofil:

94°C	5 min	initiale Denaturierung
94°C	1 min	Denaturierung
x °C	1 min	Primeranlagerung
72°C	x min	Polymerisation
72°C	2-7 min	Polymerisation
12°C	8	Kühlung

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.2.4.1.) überprüft und bei -20°C gelagert.

#### 3.2.3.2. „High Fidelity“ PCR

Die High Fidelity PCR wurde mit einem Mix der *Taq*-DNA-Polymerase und *Tgo*-DNA-Polymerase durchgeführt. Die *Tgo*-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, wodurch die Fehlerrate während der PCR im Vergleich zur *Taq*-Polymerase ohne Exonuklease-Aktivität verringert wird. Hierfür wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.2.4.1.) überprüft und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3.3. „Random amplification of polymorphic DNA” (RAPD-PCR)

Die „random amplification of polymorphic DNA” (RAPD-PCR) eignet sich für die Erstellung genomischer Fingerabdrücke. Es wird nur ein Primer für die PCR verwendet, der durch niedrig stringente Hybridisierungsbedingungen an mehreren Stellen im Genom bindet. So können genomspezifische Bandenmuster erzielt werden (Akopyanz *et al.*, 1992b). Die folgenden Reagenzien wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert:

2,5  $\mu\text{l}$  10x Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
4,8  $\mu\text{l}$  dNTPs (1,25 mM; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
5  $\mu\text{l}$  Primer (5 pmol/ $\mu\text{l}$ )  
0,2  $\mu\text{l}$  *Taq*-DNA-Polymerase (5000 U/ml; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
5  $\mu\text{l}$  DNA (1-10 ng / $\mu\text{l}$ )  
7,5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O

Die PCR erfolgte bei folgendem Temperaturprofil (40 Zyklen):

94°C	15 s	initiale Denaturierung
94°C	1 min	Denaturierung
36 °C	1 min	Primeranlagerung
72°C	2 min	Polymerisation
72°C	7 min	Polymerisation
12°C	8	Kühlung

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.2.4.1.) aufgetrennt. Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt auf 1,5%ige Gele aufgetragen und für ca. 3 h bei 80 V separiert.

## 3.2.4. Agarose-Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

### 3.2.4.1. Native Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Analyse von isolierter DNA und DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden abhängig von der DNA-Fragmentgröße 0,8-1,5% Agarose (SeaKem<sup>®</sup>LE Agarose, Cambrex Bio Sciences, Verviers, Belgien) durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer

gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50-60°C in einen Gelträger gegossen, in den zuvor ein Kamm für die Geltaschen eingesetzt wurde. Nach Auspolymerisieren der Agarose wurde der Gelträger in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und vollständig mit 1x TAE Puffer bedeckt. Ein bis 5 µl der DNA-Probe wurde mit 1 µl Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Als Längenstandard wurde das entsprechende Volumen der 1 kb Plus DNA ladder (100bp – 12kb; Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die DNA wurde bei einer Spannung von 80-120 V für 45-60 min separiert. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte anschließend durch Inkubation des Gels in 0,5 mg/l EtBr-Lösung (Roth, Karlsruhe) für 20-30 min. In einem UV-Transilluminator wurde das interkalierende EtBr durch UV-Licht angeregt und dokumentiert.

### 3.2.4.2. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Nach erfolgter Elektrophorese in 0,8% Agarose (NA Agarose, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 15 min Inkubation in EtBr wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die weitere Präparation erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

<u>50x TAE-Puffer</u>		<u>Ladepuffer</u>	
242 g	Tris base	0,075% (v/v)	Bromphenolblau
57,1 ml	Eisessig	0,06 M	EDTA (pH 8,0)
100 ml	Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0)	59% (v/v)	Glyzerin
	ad 1 ml ddH <sub>2</sub> O	0,1% (v/v)	SDS

### 3.2.5. Aufreinigung von DNA

PCR-Produkte und Restriktionsansätze wurden für anschließende Verwendungen wie z.B. Sequenzierungs- und Ligationsreaktionen über Anionenaustauscher-Silikate aufgereinigt und Nukleotide, Salze und Enzyme entfernt. Hierfür wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.2.6. Enzymatische Modifikation von DNA

#### 3.2.6.1. Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Plasmide und PCR-Produkte wurden mit Typ II-Restriktionsendonukleasen für analytische Zwecke und nachfolgende Ligationen an den entsprechenden Erkennungssequenzen gespalten. Die Enzyme wurden von Invitrogen und New England BioLabs bezogen und der Reaktionsbedingungen und Enzympuffer wurden gemäß den Angaben des Herstellers gewählt. Analytische Restriktionen wurden in einem Volumen von 20 µl (1 µg DNA) durchgeführt und für 1-2h bei 37°C inkubiert. Pro 1 µg DNA wurde ca. 10 U Enzym eingesetzt. Restriktionen für weitere Anwendungen erfolgten in 40 µl Ansätzen (2 µg DNA) bei 37°C für 2-4h. Aliquots der Restriktionsansätze (1-3 µl) wurden gelelektrophoretisch analysiert.

#### 3.2.6.2. Dephosphorylierung von linearer DNA mit alkalischer Phosphatase

Linearisierte Vektoren, die mit einem DNA-Fragment ligiert werden sollen, wurden vorher dephosphoryliert, um eine intramolekulare Ligation des Vektors zu verringern. Die Entfernung der endständigen Phosphatgruppen erfolgte mit der Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in folgendem Reaktionsansatz:

40 µl Restriktionsverdau  
1 µl 10x One-phor-all Puffer  
2 µl CIAP (1:20 verdünnt in 1x OPA Puffer)  
7 µl ddH<sub>2</sub>O

Nach 30 min Inkubation bei 37°C folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 85°C für 15min und die Ansätze mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

#### 3.2.6.3. Ligation

Vektor und DNA-Fragment wurden mit dem gleichen Restriktionsenzym oder mit verschiedenen Enzymen, die kompatible Enden generieren, geschnitten und mit der T4-DNA Ligase (Roche) über Nacht bei 16°C ligiert. Für die Ligation wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Anschließend wurden kompetente *E. coli*-Zellen (vgl. 3.2.8.1. und 3.2.8.2.) mit den rekombinanten Plasmiden transformiert.

### 3.2.7. Sequenzierung von DNA nach Sanger

Die Bestimmung der Basensequenz von DNA basierte auf dem Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotid-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977). Die Methode beruht auf dem Prinzip der PCR und fluoreszenzmarkierten ddNTPs, die zusätzlich zu dNTPs zum Ansatz gegeben wurden. Der Einbau von ddNTPs führt zum Kettenabbruch, wodurch amplifizierte DNA unterschiedlicher Länge entsteht, die am 3' Ende fluoreszenzmarkiert ist. Hierfür wurde das Big Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Die Reaktion erfolgte in Thermocyclern. Folgender Ansatz wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert:

50-200 ng DNA  
 0,5 µl Primer (20 pmol/µl)  
 1 µl Polymerase-Mix (Applied Biosystems)  
 ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O

Die zyklische Sequenzierung erfolgte mit folgendem Temperaturprofil (24 Zyklen):

96°C	1 min	initiale Denaturierung
96°C	10 s	Denaturierung
51 °C	5 s	Anlagerungstemperatur (abhängig von der Primersequenz ev. höher)
60°C	4 min	Polymerisation
12°C	8	Kühlung

Die Reaktionsansätze wurden anschließend aufgereinigt, um Nukleotide, Enzyme und Salze zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte abhängig von der Anzahl an Reaktionsansätzen mit Centri-Sep Spin Columns (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Herstellerangaben oder mit Sephadex<sup>™</sup> G-50 Fine (DNA Grade; Amersham Bioscience Biotech, Freiburg) in Multi Screen HV 96 Well Filtrationsplatten (Porengröße 0,45µm; Millipore, Badford, USA). Das Sephadex wurde mit einem Multi Screen Column Loader (45 µl-Wells; Millipore) in die Filtrationsplatten gefüllt, 300 µl ddH<sub>2</sub>O/Well zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Die Sequenzierproben wurden 1:2 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 10 µl in die Wells pipettiert. Nachdem die Ansätze bei 900 x g für 3 min zentrifugiert wurden, folgte eine weitere Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O (1:6). Die Elektrophorese, Detektion der Fluoreszenzsignale und dessen Übersetzung in DNA-Sequenz als Chromatogramm- und Textdatei wurde in einem Kapillar-Sequenziergerät (3130xl; Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit dem Programm BioNumerics 4.0 (Applied Math) assembliert und editiert. Die Sequenzen wurden für eine doppelsträngige Abdeckung mit sense und antisense Primern generiert.

### 3.2.8. Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) und Bestimmung der Populationszugehörigkeit von *H. pylori*

Die Methode der hochauflösenden Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) (Maiden et al., 1998) basiert auf der Sequenzierung von mehreren Housekeeping-Genen. Die Gene wurden so gewählt, dass sie auf dem Chromosom des sequenzierten Stamms 26695 (Tomb *et al.*, 1997) verteilt sind und nicht benachbart zu Genen liegen, die für hypothetische, sekretierte und putative äussere Membranproteine kodieren (Achtman *et al.*, 1999). Es ist gezeigt worden, dass die Evolutionsraten von Proteinen gekoppelter Gene ähnliche Evolutionsraten aufweisen können (Williams & Hurst, 2000) und es sollte ein Effekt von Genen, die positiven Selektionsdrücken unterliegen können, auf die Housekeeping-Gene vermieden werden. Die MLST von *H. pylori* beinhaltet die Sequenzierung von ca. 500 Bp langen Fragmenten von sieben Housekeeping-Genen (Tab. 10), die für jedes Isolat zu einer Sequenz (3406 Bp) zusammengefasst werden. Die Diversität der kombinierten Housekeeping-Gensegmente wurde charakterisiert, indem mit dem Programm BioNumerics (vgl. 3.6.) einzigartige Genfragmente willkürlichen Allelnummern zugeordnet und jedem einzigartigen Allelprofil bzw. jedem Stamm mit einem einzigartigen Allelprofil eine bestimmte, willkürliche Sequenztypnummer (ST) zugewiesen wurde. Für die Bestimmung der Populationszugehörigkeit erfolgte eine Analyse der Nukleotidsequenzen mit dem Programm STRUCTURE (vgl. 3.6.), welches mit Bayesianischer Statistik und dem „linkage Modell“ (jedes Individuum bezieht Teile des Genoms aus jeder der vier Populationen, gekoppelte Loci stammen eher aus derselben Population) die Populationszugehörigkeiten der *H. pylori*-Isolate herleitet. Die *H. pylori*-Isolate wurden den in der Arbeit von Falush *et al* (2003) identifizierten modernen Populationen hpEurope, hpAfrica1, hpAfrica2 und hpEastAsia zugeordnet.

**Tab. 10. Die für die Multilocus-Sequenztypisierung von *H. pylori* verwendeten Housekeeping-Gene und deren Funktion.**

Housekeeping-Gen	Funktion	Fragmentgrösse [Bp]
<i>atpA</i>	ATP-Synthase, F1-Untereinheit	627
<i>efp</i>	Translations-Elongationsfaktor	410
<i>mutY</i>	A/G-spezifische Adenin-Glycosylase	420
<i>ppa</i>	Anorganische Pyrophosphatase	398
<i>trpC</i>	Anthranilat-Isomerase	456
<i>ureI</i>	Urease, akzessorisches Protein	585
<i>yphC</i>	GTP-bindendes Protein-Homolog	510

### 3.2.9. Transformation von *E. coli* und *H. pylori*

#### 3.2.9.1. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5a-Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983). Fünf ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des Stamms DH5a inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt, 1 ml der Vorkultur diente zum Animpfen von 100 ml LB-Bouillon und die Kultur wurde bei einer OD<sub>550</sub> von 0,6 in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden bei 4500 Upm bei 4°C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 30 ml TFB I-Lösung auf Eis resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, das Pellet in 4 ml TFB II-Lösung aufgenommen und für 30 min auf Eis gestellt. Aliquots (150 µl) der kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

##### TFB I-Lösung

100mM RbCl<sub>2</sub>  
 50mM MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O  
 30mM KAc  
 10mM CaCl<sub>2</sub>  
 15% v/v Glycerin  
 ad 50ml ddH<sub>2</sub>O  
 pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

##### TFB II-Lösung

10 mM MOPS (pH 7)  
 10 mM RbCl<sub>2</sub>  
 75 mM CaCl<sub>2</sub>  
 15 % (v/v) Glycerin  
 ad 50 ml ddH<sub>2</sub>O

#### 3.2.9.2. Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*

Auf Eis aufgetaute kompetente *E. coli* DH5a-Zellen (150 µl) wurden mit 10 µl des Ligationsansatz (ca. 200 ng Plasmid) gemischt und für 1h auf Eis inkubiert. Nach dem „Hitzeschock“ für 1 min bei 42°C, der die Fluidität der Membran erhöht und die Aufnahme der DNA erleichtert, folgten 2 min Inkubation auf Eis und anschließend wurden 500 µl SOC-Medium zum Ansatz pipettiert. Nachdem die Bakterien für 1 h bei 37°C und 400 Upm inkubierten, wurden je 100-200 µl auf LB-Platten mit den entsprechenden Zusätzen (vgl. 3.1.2.) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die aufgenommenen Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen, PCR und ggf. Sequenzierung analysiert.

##### SOB-Medium (pH 7,0)

20 g Bacto Trypton  
 5 g Bacto Hefeextrakt  
 0,5 g NaCl  
 0,186 g KCl  
 ad 1 l ddH<sub>2</sub>O, plus 5 ml MgCl<sub>2</sub>

##### SOC-Medium

1 l SOB plus 20 ml Glucose

### 3.2.9.3. Natürliche Transformation von *H. pylori*

*H. pylori* ist natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA. Der zu transformierende Stamm wurde auf einer Blutagarplatte für 24 h kultiviert und anschließend hiervon etwas Bakterienmaterial auf eine frische Platte ohne Selektivantibiotika überimpft (Durchmesser 2-3 cm) und für 2-4 h inkubiert. Die Bakterien wurden mit 5 µl Plasmid (ca. 2 µg) mit einer Impföse gemischt. Nach 24 h Wachstum wurden die Bakterien auf Platten mit Selektivantibiotika überimpft und kultiviert. Einzelkolonien wurden vereinzelt und der genomische Einbau durch PCR und ggf. Sequenzierung analysiert (vgl. 3.2.1.1.; 3.2.3.1.; 3.2.7.).

### 3.2.9.4. Herstellung elektrokompenter *H. pylori* Zellen

Der zu transformierende *H. pylori* Stamm wurde auf 4 Agarplatten angezüchtet. Nach 48 h Wachstum wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem ESG-Puffer suspendiert und für 20 min bei 3000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden für 1 h auf Eis inkubiert und in 6 ml ESG-Puffer auf Eis aufgenommen. Je 2 ml wurden in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und für 10 min bei 5000 Upm und RT sedimentiert. Auf Eis wurde soviel Überstand abpipettiert, bis Überstand und Pellet in gleichen Volumina vorlagen. Das Pellet wurde resuspendiert und die kompetenten Zellen unmittelbar für Elektroporationen verwendet.

#### ESG Puffer

15% (v/v)	Glyzerin
9% (w/v)	Saccharose
	ddH <sub>2</sub> O

### 3.2.9.5. Elektroporation von *H. pylori*

*H. pylori*-Stämme, die sich mit Plasmiden nicht natürlich transformieren ließen, wurden elektroporiert. Hierbei werden die Zellen in Gegenwart von DNA einer hohen elektrischen Spannung ausgesetzt, wodurch kurzzeitig Poren in der Membran entstehen und eine effiziente Aufnahme der DNA in die Zelle ermöglicht wird (Neumann *et al.*, 1982). Die Transformation von *H. pylori* mit PCR-Produkten erfolgte grundsätzlich durch Elektroporation. Elektrokompente Zellen (100 µl) wurden mit 2 µl über Säulen aufgereinigtes Plasmid (ca. 200 ng) oder 2,5 µl aufgereinigtem PCR-Produkt (ca. 2,5 µg) gemischt und für 2 min auf Eis inkubiert. Hiervon wurden 80 µl luftblasenfrei in eine bei -20°C vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) pipettiert. In dem Gene Pulser XCell wurde der Ansatz einer elektrischen Spannung ausgesetzt (25 µFd, 2,5 kV, 200 O). Nach dem elektrischen Puls (4-4,5 s) wurden umgehend 100 µl auf RT erwärmtes SOC-Medium in Küvette gegeben und der Ansatz auf eine Agarplatte ohne Selektivantibiotika pipettiert. Nach 24-48 h Wachstum wurden die Bakterien auf Platten

mit entsprechenden Selektivantibiotika überimpft. Die Analyse von Einzelkolonien erfolgte wie beschrieben (vgl. 3.2.8.3.).

### 3.3. RNA-Arbeitstechniken

RNA ist besonders anfällig für enzymatische und spontane Hydrolyse und RNasen sind ubiquitär und sehr stabil. Zur Vermeidung exogener RNase-Kontaminationen wurden Einweg-Handschuhe getragen und sterile Einweg-Pipettenspitzen und -Reaktionsgefäße benutzt. Der Arbeitsplatz und Pipetten wurden mit RNaseZAP® (Fluka, Buchs, Schweiz) gereinigt. Für die Herstellung von Puffern und zum Spülen wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet, welches mit dem RNase-Inhibitor DEPC (0,1%, v/v) versetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert wurde. Gelkammern wurden für 15 min mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und mit RNase freiem ddH<sub>2</sub>O gespült. Vor der Aufreinigung der RNA mit den Säulen des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden), wurde auf Eis gearbeitet.

#### 3.3.1. Extraktion von Gesamt-RNA aus *H. pylori*

*H. pylori* wurde in 10 ml BHI-Bouillon angezüchtet, 2 ml-Aliquots der Kulturen wurden bei für 30 s bei 13000 Upm zentrifugiert und die Reaktionsgefäße mit dem Pellet in flüssigen Stickstoff gegeben. Die Bakterien-Pellets wurden entweder bei -80°C gelagert oder direkt für die Extraktion verwendet. Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) nach modifiziertem Herstellerprotokoll. Die Bakterien (ca.  $1 \times 10^9$ ) wurden in 850 µl RLT-Puffer versetzt mit β-ME (10 µl/ml) suspendiert und die Zellen mit Glaskugeln (FastRNATubes-Blue; Qbiogene, Carlsbad, USA) und einem Ribolyser (Stufe 6,5; 45 s) aufgeschlossen. Der nach Zentrifugation (13000 Upm, 2 min, 4°C) erhaltene Überstand wurde mit 500 µl 96%igem EtOH gemischt und auf die Säulen gegeben. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Um DNA zu entfernen, folgte ein DNase-Verdau (Roche), indem zum Ansatz 10 µl DNase Puffer (Roche, Mannheim) und 2,5 µl DNaseI pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Eine Kontroll-PCR wurde durch Amplifikation eines Fragmentes des *ppa*-Gens durchgeführt (P xy). Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy Kit nach dem Protokoll des Herstellers und die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurde wie unter xy beschrieben durchgeführt. Weiterhin wurden Aliquots (1-2 µl) nach elektrophoretischer Auftrennung (0,8% Agarose in 1x MOPS-Puffer) in 1x MOPS-Puffer analysiert und bei -80°C gelagert.

#### 10x MOPS-Puffer (pH 7,0)

83,72 g	MOPS
13,61 g	Na-Acetat
20 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O, 0,1% DEPC

### 3.3.2. Reverse Transkription von Gesamt-RNA und semiquantitative Amplifikation von cDNA (Two Step)

Mit der Methode der semiquantitativen RT-PCR wurden Transkriptmengen bestimmter Gene in *H. pylori* detektiert und (semi-) quantifiziert. Für die Zweischnitt-RT-PCR wurde die RNA zunächst mit zufällig bindenden Primern in cDNA umgeschrieben, die in einer zweiten Reaktion mit genspezifischen Primern amplifiziert wurde. RNA (2 µg) wurde mit 3 µl Random Hexamer Primern (100 ng/µl; Invitrogen, Karlsruhe) in einem Endvolumen von 11 µl gemischt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Die Ansätze wurden auf Eis abgekühlt und für 10 min bei RT inkubiert. Für die cDNA-Erststrangsynthese wurden weitere Reagenzien zugegeben:

4 µl	5x RT-Puffer (Invitrogen)
2 µl	1 M DTT (Invitrogen)
1 µl	dNTPs (10mM)
1 µl	RNaseOut (Invitrogen)
1 µl	SuperScript III Rnase H <sup>-</sup> (200 U/µl, Invitrogen), oder RNase-freies ddH <sub>2</sub> O als Negativkontrolle

Die reverse Transkription erfolgte bei 45°C für 2 h. Das Enzym wurde für 15 min bei 70°C gestoppt und 30 µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Für die spezifische Amplifikation von *babA*, *sabA* und 16S rRNA Fragmenten durch Standard PCR (vgl. 3.2.3.1.) wurden die Primer *babA*-3/*babA*-4, *sabA*-1/*sabA*-2 und 16S-1/16S-2 und 2,5 µl der cDNA eingesetzt. Die Anzahl der Zyklen wurde so gewählt, dass die PCR während der linearen Amplifikation gestoppt wurde und die DNA-Menge für eine gelelektrophoretische Detektion ausreichte. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

## 3.4. Protein-Arbeitstechniken

### 3.4.1. Glykoprotein-Adhärenzassay im Mikrotiterplattenformat

Die Bestimmung der Adhärenz von lebenden *H. pylori*-Zellen an Glykoproteine erfolgte modifiziert nach Gehard *et al.* (1999). Als Glykoproteine wurden die semi-synthetischen Neo-Glykoproteine Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> verwendet, die kovalent mit dem Spacer APD an HSA gebunden sind (Isosep, Tullinge, Schweden). Ein Konjugat enthält 10-20 Mol Oligosaccharide pro Mol HSA. Die Bakterien wurden für 24-48 h auf Agarplatten angezüchtet. Pro Platte wurden ca. 1/3 der Bakterien in 2 ml PBS (pH 7,2; Biochrom AG, Berlin) suspendiert, gewaschen (5000 Upm, 5 min, 4°C) und in 500 µl PBS aufgenommen. Die Bakterien ( $5 \times 10^8$  in 250 µl) wurden mit 25 µl EZ-Link<sup>TM</sup> Sulfo-NHS-LC-Biotin

(5µg/µl; Pierce, Rockford, USA) bei RT im Dunkeln für 40 min inkubiert. NHS-aktivierte Biotine bilden sehr effizient stabile Amidbindungen mit den an der Bakterienoberfläche lokalisierten primären Aminogruppen der Proteine aus (Altin *et al.*, 1995), wodurch die Bakterien markiert und durch Avidin-Enzym-Konjugate zu detektieren und quantifizieren sind. Nach der Inkubation mit Biotin folgten drei Waschschrte mit PBS (5000 Upm, 5 min, 4°C). Die Bakterien wurden in Blockierungs-Puffer aufgenommen und auf  $1 \times 10^8$  Bakterien/ml verdünnt. Mikrotiterplatten (96 Well; MediSorp™; Nunc, Dänemark) wurden mit Lewis<sup>b</sup> oder Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (200 ng/Well in 100 µl PBS) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde BSA in entsprechender Konzentration verwendet. Der Überstand wurde abpipettiert, Blockierungspuffer (200 µl/Well) dazugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Die anschließende Koinkubation von Bakterien ( $1 \times 10^7$ /Well) und Glykoprotein erfolgte bei 4°C für 2 h. Die Platten wurden dreimal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und adhärenente Bakterien mit 2% PFA in 100 mM KPO<sub>4</sub> (100 µl/Well) für 50 min bei RT fixiert. Nach drei Waschschrten mit Waschpuffer wurden die Wells mit 100 µl NeutrAvidin™ Horseradish Peroxidase Conjugate (1:10000; Pierce, Rockford, USA) für 1-1.5 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und für 10-20 min mit dem Substrat TMB (100 µl/Well; Pierce) inkubiert. Die Reaktion wurde durch 50 µl/Well 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt und die Absorption in einem Plattenphotometer bei 450 nm (Referenz 540 nm) gemessen. Die Adhärenz wurde pro Stamm in mindestens drei unabhängigen Experimenten überprüft à 2-3 Parallelen.

10x PBS Puffer

9,55 g PBS Dulbecco (Biochrom AG)

ad 1l ddH<sub>2</sub>OBlockierungspuffer

1x PBS

5% (w/v) BSA

Waschpuffer

1x PBS

0,05% (v/v) Tween®-20

1 M KPO<sub>4</sub> (pH 7.0)34 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 250 ml45,6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O in 200 ml**3.4.2. Biotinylierung von Lewis<sup>b</sup>-HSA**

Das HSA des Lewis<sup>b</sup>-HSA-Konjugates wurde mit dem primäre Aminogruppen bindenden EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) biotinyliert. Hierfür wurden 250 µl Lewis<sup>b</sup>-HSA (0,5 mg/ml) mit 250 µl Biotin (0,5 mg/ml) gemischt und bei RT 30-40 min inkubiert. Die Aufreinigung des biotinmarkierten Lewis<sup>b</sup>-Konjugates erfolgte mit Microcon® YM-30-Säulen (Millipore, Badford, USA). Die Zellulosemembran der Säulen weist ein NMWL von 30000 Dalton auf, wodurch eine Aufreinigung und

Trennung des Lewis<sup>b</sup>-HSA Konjugates (HSA: 66 kD) von überschüssigem Biotin (455,6 D) möglich ist. Vor der Anwendung wurden die Säulen mit 300 µl PBS (pH 7,2; Biochrom AG, Berlin) gespült und der Reaktionsansatz viermal mit 300 µl PBS gewaschen (10000 x g, 25 min). Das aufgereinigte Produkt wurde in 100 µl PBS suspendiert.

### 3.4.3. Isolierung Lewis<sup>b</sup>-bindender *H. pylori* mit paramagnetischen Beads

Bakterien, deren Oberflächen mit Biotin markiert sind, können mit streptavidinbeschichteten, paramagnetischen Beads angereichert werden. *H. pylori*-Zellen, die an Lewis<sup>b</sup> binden, wurden modifiziert nach dem Protokoll von Aspholm-Hurtig *et al.* (2004) aus einem Pool an Bakterien isoliert und weiterkultiviert. Die paramagnetischen Eigenschaften der Beads ermöglichen im magnetischen Feld eine Trennung der Beads von der Lösung und eine Resuspension, wenn das magnetische Feld entfernt wird. Nach 24 h Wachstum wurden Bakterien einer Platte in 2 ml PBS suspendiert und einmal in PBS gewaschen (5000 Upm, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml BHI-Medium aufgenommen und die OD<sub>600</sub> auf 0,5 (1,5x10<sup>8</sup>) eingestellt und die Bakterien mit 5 µg biotinyliertem Lewis<sup>b</sup>-HSA (vgl. 3.4.2.) für 2 h bei 37°C inkubiert. Lewis<sup>b</sup>-bindende Bakterien sind somit mit Biotin markiert und weisen eine höhere Affinität zu streptavidinbeschichteten Beads auf als nicht biotinylierte Bakterien. Zwanzig µl paramagnetische Beads (10 mg/ml; Dynabeads<sup>®</sup>M-280; Invitrogen, Karlsruhe) wurden zunächst in zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Blockierungspuffer für 1 h bei 4°C in einem Rotationschüttler (Hartenstein) inkubiert. Die Bakterien wurden zweimal mit 500 µl BHI-Medium gewaschen, in 500 µl BHI-Medium (2% BSA, w/v) aufgenommen und mit den Beads inkubiert, die vorher durch das Magnetic Separation Rack (New England Biosystems, Bad Schwalbach) an der Gefäßwand fixiert wurden, wodurch der Blockierungspuffer abpipettiert werden konnte. Nach 2 h Inkubation bei 4°C im Rotationsschüttler wurden die an den Beads gebundenen Bakterien von den nicht adhärenen Bakterien durch zwei bis drei Waschschrte mit 1 ml Waschpuffer getrennt und die Beads mit den adhärenen Bakterien in 200 µl BHI-Bouillon suspendiert und auf Agarplatten gegeben. Die Anreicherung wurde ggf. wiederholt. Die Adhärenz von Einzelklonen an Lewis<sup>b</sup> wurde im Glykoprotein-Adhärenzassay (vgl. 3.4.1.) überprüft..

#### Waschpuffer

PBS (Biochrom AG)

0,1% (v/v) Tween-20

#### Blockierungspuffer

PBS (Biochrom AG)

2% (w/v) BSA

### **3.5. Zellkultur**

Die Kultur der Zellen erfolgte mit sterilen Einwegmaterialien und autoklavierten Materialien unter der Reinraumwerkbank. Die Arbeitsfläche und Gebrauchsgegenstände wurden mit 70% (v/v) vergälltem Ethanol gereinigt. Die Vitalität und Morphologie der Zellen wurde regelmäßig mikroskopisch überprüft.

#### **3.5.1. Kultivierung und Lagerung**

Die humane Magenkarzinom-Zelllinie AGS (ATCC CRL 1739) wurde aus einem Adenokarzinom des Magenepithels isoliert. Für die Kultivierung wurden die Einfrierkulturen dem flüssigen Stickstoff entnommen und unmittelbar in ein auf 37°C vorgewärmtes Wasserbad gegeben. Nach dem Auftauen wurde die Kultur zu 10 ml auf 37°C vorgewärmtes Medium gegeben und bei 1000 Upm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium suspendiert und in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) überführt. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Das verwendete Medium bestand aus 90% RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) und 10% fetalem Kälberserum (Biochrom AG). Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen geteilt. Dazu wurden die adhärennten Zellen mit PBS vorgewaschen durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst und nach 5 min 10 ml RPMI-Medium zugegeben. Die gelösten Zellen wurden in sterile 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 1000 Upm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml RPMI-Medium suspendiert und 1 ml für die weitere Kultivierung verwendet. Für die Lagerung wurden subkonfluente Zellen wie beschrieben geerntet und in RPMI-Medium versetzt mit 10% fetalem Kälberserum und 10% sterilfiltriertem DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) suspendiert. Die Zellen wurden über Nacht zunächst bei -80°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

#### **3.5.2. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt. Der Farbstoff ermöglicht zusätzlich eine Analyse der Vitalität der Zellen, da keine lebenden, sondern ausschließlich tote Zellen angefärbt werden.

#### **3.5.5. Adhärenzassay im Mikrotiterplattenformat zur Bestimmung der Adhärenz von *H. pylori* an AGS Zellen**

AGS-Zellen wurden in 96 Well-Mikrotiterplatten eingesät ( $2 \times 10^4$  in 200 µl RPMI-Medium) und bei Erreichen 90-100%iger Konfluenz nach ca. 48 h wurde frisches RPMI-Medium ohne Serum zugegeben.

*H. pylori* wurde für 24h auf Platten angezüchtet und biotinyliert (vgl. 3.4.1.) und  $1 \times 10^7$  Bakterien in 10  $\mu$ l auf die AGS-Zellen gegeben (multiplicity of infection: 250). Als Kontrolle wurden nicht infizierte AGS-Zellen verwendet. Die Platte wurde bei 1500 Upm für 5 min zentrifugiert und bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach zwei Waschschrritten mit PBS (200  $\mu$ l/Well; Biochrom AG) wurden die Zellen mit 2% PFA in 100 mM  $KPO_4$  (100  $\mu$ l/Well) für 2 h fixiert. Es folgten drei Waschschrritte mit 200  $\mu$ l/Well PBS versetzt mit 0,1% (w/v) Glycin und 1 h Inkubation mit Blockierungspuffer. Die Wells wurden mit Waschpuffer gewaschen und für 1,5 h mit 100  $\mu$ l NeutrAvidin™ Horseradish Peroxidase Conjugate (1:10000 in Blockierungspuffer; Pierce) inkubiert. Nach sieben Waschschrritten wurde das Substrat TMB (100  $\mu$ l/Well; Pierce) zugegeben und die Reaktion nach 10-20 min durch Applikation von 50  $\mu$ l/Well  $H_3PO_4$  gestoppt. Die Absorption wurde in einem Plattenreader bei 450 nm gemessen (Referenz 540 nm). Die Bestimmung der Adhärenz pro Stamm erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten á 23 Parallelen.

Waschpuffer

1x PBS

0,05% (v/v) Tween® -20

Blockierungspuffer

1x PBS

10% (v/v) fetales Kälberserum

**3.6. Bioinformatik: Datenbanken und Software****Editierung und Analyse von DNA- und Proteinsequenzen**Bionumerics Applied Maths; <http://www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm>EditSeq DNASTar Lasergene; [www.dnastar.com](http://www.dnastar.com)

GeneDoc “

MapDraw “

**Bestimmung von synonymen und nicht synonymen Mutationen**SWAAP 1.0.2 David Pride 2000; <http://www.bacteriamuseum.org/SWAAP/SwapPage.htm>Selecton 2.2 Doron-Faigenboim *et al.*, 2005; <http://selecton.bioinfo.tau.ac.il>**Bestimmung von Verwandtschafts-Koeffizienten von Patienten**GenoPro® 1.99c [www.genopro.com](http://www.genopro.com)KStableau 4.1.3b <http://home.versatel.nl/KStableau>

### **Datenbanken, Sequenzvergleiche und Homologie Analyse**

BLAST / NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

TIGR <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?database=ghp>

Happlot Thomas Whittam; <http://www.shigatox.net/cgi-bin/stec/happlot>

ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>

### **Phylogenetische DNA-Sequenzanalyse**

*structure* 2.0 Pritchard *et al.* (2000); Erweiterungen zum Programm: Falush *et al.* (2003)

### **Statistische Analysen**

SigmaStat 3.0

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Analyse der genetischen Diversität von *H. pylori* in Familien mit unterschiedlicher geographischer Herkunft

Das Modell der vorwiegend vertikalen, intrafamiliären Transmission von *H. pylori* beruht auf epidemiologischen Studien, die eine klonale Übertragung der Bakterien in Familien aus überwiegend industrialisierten, städtischen Gegenden dokumentierten (Nwokolo *et al.*, 1992; Bamford *et al.*, 1993). In dieser Arbeit wurde die Übertragung von *H. pylori* in Familien aus einer ländlichen Gegend in Südafrika und vergleichend hierzu in Familien aus städtischen Gegenden in Nord- und Südamerika, Europa und Asien untersucht. Die genetische Verwandtschaft der Bakterien innerhalb der Familien gibt Hinweise auf die Transmissionswege und wurde mit der hochauflösenden Multilocus-Sequenzanalyse (MLST; Maiden *et al.*, 1998) bestimmt. Hierzu wurde DNA aus den einzelnen Isolaten die DNA extrahiert und sieben Housekeeping-Genfragmente (vgl. 3.2.8.) sequenziert. Die einzelnen Genfragmente wurden für jeden Stamm zu einem Multilocus-Haplotyp zusammengefasst (3406 Bp) und der Sequenztyp, sowie die Populationszugehörigkeit bestimmt.

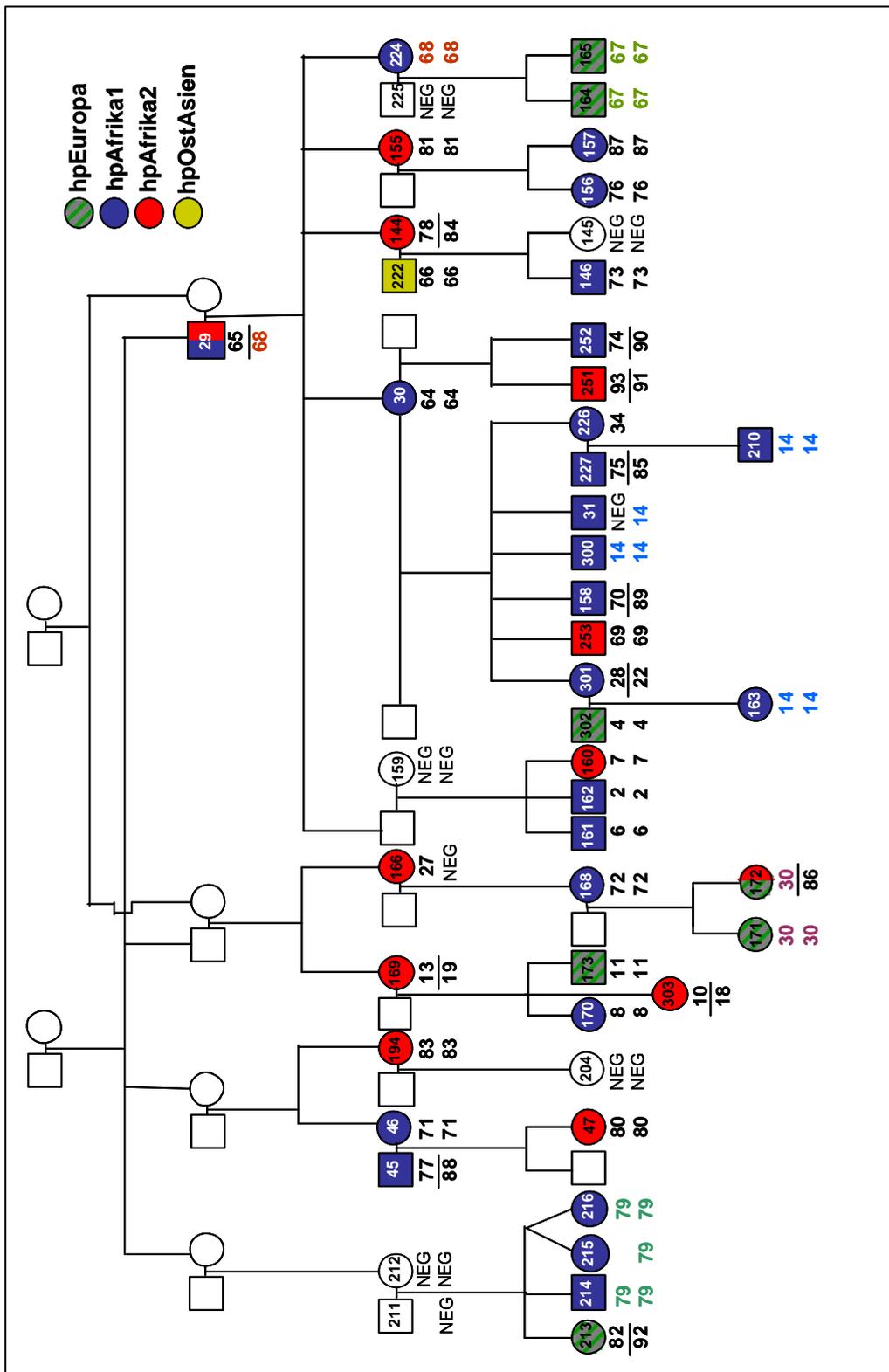
#### 4.1.1. Genetische Diversität von *H. pylori* in Familien aus einer ländlichen Gegend in Südafrika

##### 4.1.1.1. Populationszugehörigkeit von *H. pylori* aus südafrikanischen Familien ländlicher Herkunft

Die genetische Verwandtschaft von *H. pylori* wurde in zwei Familien untersucht, die aus einer ländlichen Gegend 100 km entfernt von Pretoria stammen (Ogies und Mpumulanga). Die beiden Familien 12 und 13 umfassten vier bzw. drei Generationen. Es handelte sich um eine farbige Gemeinschaft, die eine hohe Infektionsrate aufwies und an einem langfristigen Überwachungsprogramm der Epidemiologie von *H. pylori* teilnehmen (Goosen *et al.*, 2002). Die Familienmitglieder (Ogies) leben in Backsteinhäusern mit sanitären Einrichtungen und behandeltem Leitungswasser. Die Mitglieder der beiden Familien, von denen *H. pylori*-Isolate analysiert wurden, waren zwischen 4 und 88 Jahre (Familie 12) und zwischen 3 und 80 Jahre alt (Familie 13). Die Entnahme von Magenbiopsien des Antrums und Corpus erfolgte durch das Team von Dr. Schalk van der Merwe von 45 Mitgliedern der Familie 12, sowie von zehn Mitgliedern der Familie 13. Eine Antrum- oder Corpus-Biopsie wurde von drei Mitgliedern der Familie 12 entnommen. *H. pylori* konnte von 89,7% der Personen kultiviert werden, so dass die Haplotypen von insgesamt 99 Stämmen analysiert werden konnten. Von 47 Familienmitgliedern wurden Antrum- und Corpus-Isolatpaare untersucht und von fünf Personen jeweils ein Antrum- oder Corpus-Isolat.

Die Stammbäume der Familie n 12 und 13 sind zusammen mit den Ergebnissen der Zuordnung der Isolate zu Populationen und Sequenztypen (ST) in Abb. 9 und 10 dargestellt. Die Populationszugehörigkeit der Stämme wird durch die verschiedenen Farben der Kreise und Quadrate repräsentiert und die STs der Isolate des entsprechenden Familienmitglieds sind unterhalb der Symbole angegeben. *H. pylori*-Stämme, die von den 52 Mitgliedern der Familie 12 und 13 isoliert wurden, konnten insgesamt vier verschiedenen Populationen zugeordnet werden. Obwohl es sich um eine abgelegene Gegend ohne europäische und asiatische Einwohner handelt, waren sieben Mitglieder der Familie 12 und drei Personen der Familie 13 (37, 221 und 174) mit Stämmen europäischer Herkunft infiziert, die der Population hpEurope zugeordnet wurden. Hierbei handelte es sich um 18 der insgesamt 99 Isolate. Die hpEurope-Stämme wurden in der Familie 12 in zwei Geschwisterpaaren (171/172; 164/165) detektiert und die anderen hpEurope-Isolate waren über die Familie verteilt (231, 173 und 302). Drei Familienmitglieder (37, 221 und 174) der Familie 13 waren ebenfalls mit Stämmen infiziert, die hpEurope zugeordnet wurden. Das Antrum- und Corpus-Isolat des Mitglieds 222 der Familie 12 gehörte der Population hpEastAsia an und war demnach asiatischen Ursprungs. Die Mehrheit der Isolate (48 von 99) aus 24 Mitgliedern der Familie 12 und zwei Mitgliedern der Familie 13 wurden hpAfrica1 zugeordnet. Zwölf Personen der Familie 12 (29, 194, 169, 166, 244, 155, 47, 303, 172, 160, 253 und 251) und 6 Personen der Familie 13 (36, 233, 34, 40, 174 und 175) waren mit *H. pylori*-Stämmen infiziert, die einer weiteren Population afrikanischen Ursprungs, hpAfrica2, angehörten. Insgesamt wurden 31 von 99 Isolate identifiziert, die hpAfrica2 zugeordnet wurden, die über die gesamte Familie 12 verteilt waren. Das Vorkommen von Stämmen innerhalb der Familien 12 und 13, die derselben Population angehörten, schien demzufolge unabhängig vom Verwandtschaftsgrad der Personen zu sein. Die südafrikanischen Familien waren mit einer Mischung von *H. pylori*-Stämmen infiziert, die sowohl afrikanischen (hpAfrica1 und hpAfrica2) als auch nicht afrikanischen (hpEurope und hpEastAsia) Ursprungs waren. Diese Mischung an Populationen zeigte sich ebenso auf der Ebene einzelner Personen: drei Personen wiesen multiple Infektionen mit Stämmen unterschiedlicher Populationszugehörigkeit auf. Die Familienmitglieder 29 und 172 der Familie 12 waren mit hpAfrica-1 und hpAfrica2- bzw. mit hpEurope- und hpAfrica2-Stämmen infiziert. Weiterhin wurde das Corpus-Isolat des Mitglieds 174 der Familie 13 hpEurope und das Antrum-Isolat hpAfrica2 zugeordnet.

**Abb. 9 (folgende Seite). Stammbaum der Familie 12 und die Populationszugehörigkeiten und STs der *H. pylori*-Isolate.** Die Kreise und Quadrate repräsentieren weibliche und männliche Familienmitglieder. Die Nummer in den Symbolen gibt das Familienmitglied und die entsprechenden Isolate an. Leere Symbole: es wurden keine Biopsien genommen. NEG: *H. pylori* konnte von der Biopsie nicht kultiviert werden. Die Farbe der Symbole gibt die Populationszugehörigkeit zu den oben rechts angezeigten Populationen der Isolate an. Bei zwei Farben innerhalb eines Symbols gibt die Farbe der linken Hälfte die Population des Corpus-Isolates und die Farbe der rechten Hälfte die Population des Antrum-Isolates an. Die Nummern unter den Symbolen zeigen den Sequenztyp (ST) des Corpus-Isolates (obere Nummer) und des Antrum-Isolates (untere Nummer) an. Identische ST, die in mehr als einem Familienmitglied identifiziert wurden, sind durch gleiche Farben hervorgehoben. Schwarze horizontale Linien zwischen den STs Nummern zeigen an, dass die Corpus- und Antrum-Isolate der Person unterschiedlichen STs zugeordnet wurden.



#### 4.1.1.2. Sequenztypisierung von *H. pylori* aus südafrikanischen Familien mit ländlicher Herkunft

Eine weitere Analyse der genetischen Verwandtschaft von *H. pylori*, die ein höheres Auflösungsvermögen besitzt ist als die Zuordnung zu Populationen, beinhaltet die Zuordnung von einzigartigen Allelprofilen eines Isolates zu bestimmten ST Nummern, um die Transmissionswege zu verfolgen. Da Stämme unverwandter Personen genetisch nicht verwandt sind, lässt die Identifizierung von Isolaten aus verschiedenen Individuen, die identische STs aufweisen, auf klonale Transmission und somit darauf schließen, dass *H. pylori* zwischen diesen Personen übertragen wurde.

Die 99 Isolate der Familien 12 und 13 wiesen insgesamt 61 verschiedene STs auf, von denen 56 einzigartig waren (Abb. 9, 10). Innerhalb der Familie 13 wurde kein ST detektiert, der in mehr als einem Familienmitglied vorkam und die Mehrheit der Familienmitglieder der Familie 12 war mit Stämmen infiziert, die in der Familie einzigartige STs aufwiesen. Da diese STs in den Familien in nur einer Person detektiert wurden, konnte die Übertragung von *H. pylori* in diesen Fällen nicht nachvollzogen werden. Von den insgesamt 61 verschiedenen STs wurden in der Familie 12 fünf STs identifiziert, die in mehr als einem Familienmitglied vorkamen. Stämme mit identischen STs wurden hauptsächlich in Geschwistern nachgewiesen: Die Corpus- und Antrum-Isolate der Geschwister 214, 215 und 216, von denen 215 und 216 Zwillinge waren, wiesen den ST 79 auf, die Isolate der Geschwister 300 und 31 den ST 14 und die Stämme von 164 und 165 wurden dem ST 67 zugeordnet. Das Familienmitglied 172 war mit unverwandten Corpus- und Antrum-Stämmen infiziert und der ST 30 des hpEurope-Isolates stimmte mit den STs der beiden *H. pylori*-Stämme, die von der Schwester 171 entnommen wurden, überein. Ebenso war der ST 68 des Antrum-Isolates des Vaters 29 mit den STs beider Isolate der Tochter identisch. Weiterhin wiesen die Stämme der bereits erwähnten Geschwister 300 und 31 und deren Nichte 163 und Neffe 210 identische STs auf.

Die Ergebnisse der geringen genetischen Verwandtschaft bzw. hohen Diversität von *H. pylori* innerhalb der Familien 12 und 13 hinsichtlich der Populationszugehörigkeiten und der STs deuten daraufhin, dass die intrafamiliäre Übertragung der Bakterien in den südafrikanischen Familien eine untergeordnete Rolle spielt und wenn sie stattfindet, dann eher zwischen Geschwistern (horizontale Transmission) als zwischen Eltern und Nachkommen (vertikale Transmission).

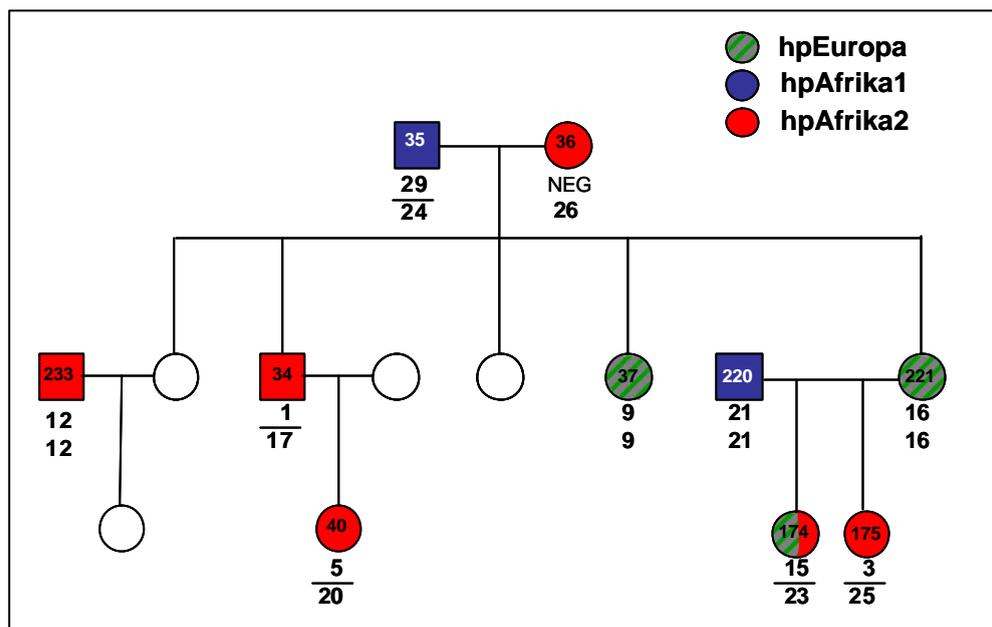


Abb. 10. Stammbaum der Familie 13 und Ergebnisse der Populationszugehörigkeiten und STs der *H. pylori*-Isolate. Siehe Legende der Abb. 9 für Details.

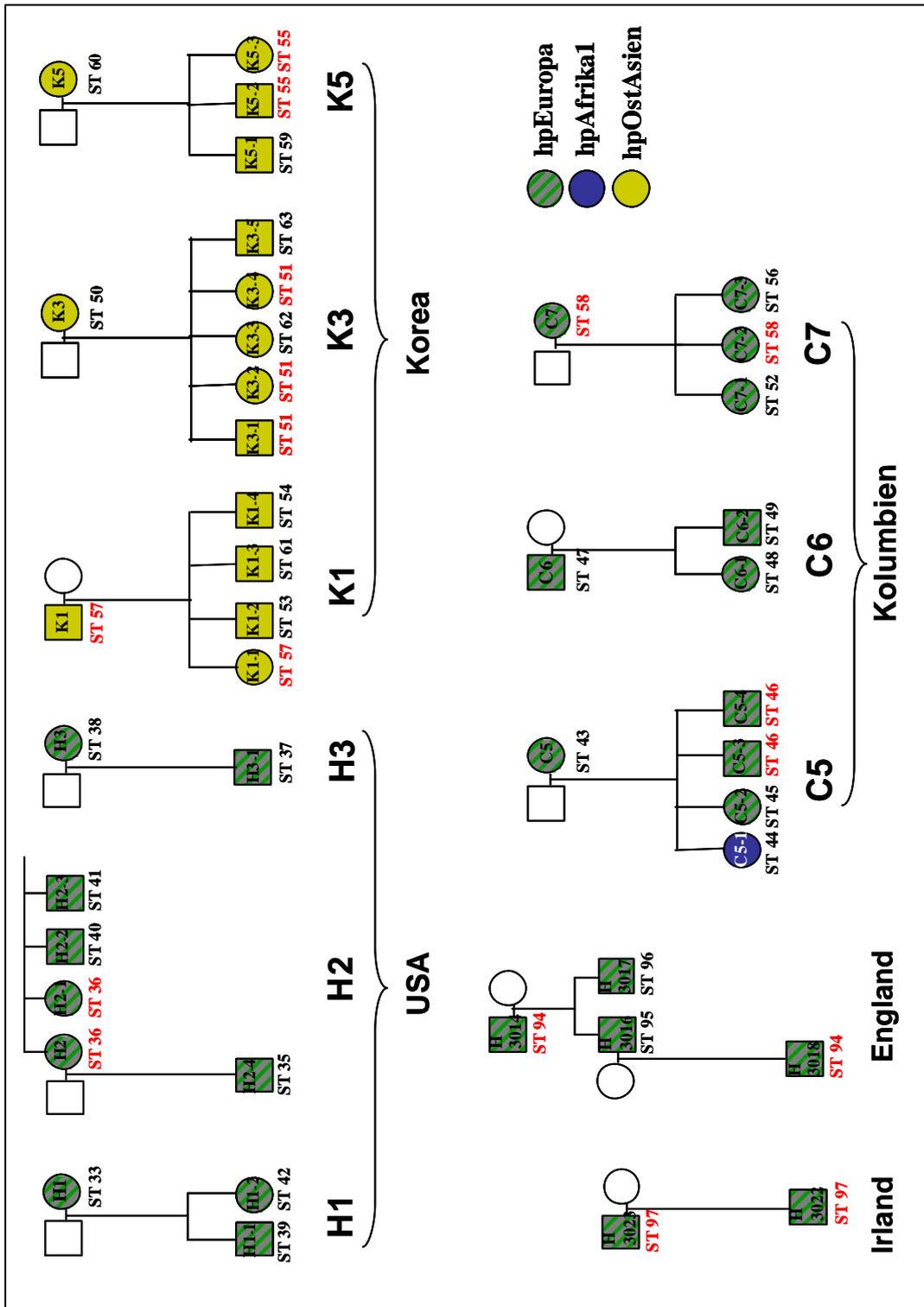
#### 4.1.2. Genetische Diversität von *H. pylori* in Familien aus städtischen Gegenden

Bisherige Studien, die zeigen, dass *H. pylori* intrafamiliär übertragen wird, basierten primär auf Fingerprinting-Methoden, sowie in seltenen Fällen auf Sequenzierung weniger Gene von Isolaten, die Familien entnommen wurden, die in Städten lebten. Um auszuschließen, dass die hohe genetische Diversität von *H. pylori* und die hieraus abgeleitete seltene intrafamiliäre Übertragung in den südafrikanischen Familien die höhere Auflösung des hier verwendeten MLST reflektiert, wurden Isolate von Familien aus Städten nochmal mittels MLST untersucht. Insgesamt wurden elf Familien analysiert. Drei Familien (H1, H2, H3) stammten aus Houston, USA, drei Familien (K1, K3, K5) aus Seoul, Korea, drei Familien (C5, C6, C7) aus Bogota, Kolumbien und je eine Familie aus Coventry, England und Belfast, Irland. Es handelte sich um Familien, die zwei Generationen umfassten, mit Ausnahme der Familie aus England, die drei Generationen umfasste. Das Alter der Familienmitglieder ist in Tab. 3 (vgl. 2.3.1.) angegeben. Von mindestens zwei Mitgliedern pro Familie wurde im Gegensatz zu den südafrikanischen Familien ein Isolat pro Person von entweder Corpus oder Antrum entnommen. Die insgesamt analysierten 43 Isolate wurden ebenfalls Populationen und STs zugeordnet.

#### 4.1.2.1. Populationzugehörigkeit von *H. pylori* aus Familien städtischer Herkunft

Fast jedes Isolat sämtlicher Familien aus den USA, Kolumbien, England und Irland wurde der geographischen Herkunft entsprechend der Population hpEurope zugeordnet (Abb. 11). Eine Ausnahme war der Stamm C5-1 der kolumbianischen Familie C5, der hpAfrica1 und nicht wie die Isolate der übrigen Familienmitglieder hpEurope zugeordnet wurde. Weiterhin gehörten sämtliche Isolate der drei Familien aus Korea ebenfalls der geographischen Herkunft entsprechend, der Population hpEastAsia an. Im Gegensatz zu den südafrikanischen Familien 12 und 13, die mit *H. pylori*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft infiziert waren, war demnach -mit Ausnahme der Familie C5- jede nicht-südafrikanische Familie mit Stämmen infiziert, die innerhalb einer Familie derselben Population angehörten bzw. denselben Ursprung aufwiesen.

**Abb. 11 (folgende Seite). Stammbäume der Familien städtischer Herkunft und die Populationszugehörigkeiten und STs der *H. pylori*-Isolate.** STs, die in mehr als einem Familienmitglied detektiert wurden, sind rot hervorgehoben. Siehe Legende der Abb. 9. für weitere Details.



#### **4.1.2.2. Sequenztypisierung von *H. pylori* aus Familien städtischer, nicht-südafrikanischer Herkunft**

Die Sequenztypisierung der insgesamt 43 Isolate der Familien städtischer Herkunft ergab 34 verschiedene STs (Abb. 11). Hiervon waren 26 einzigartig und acht ST wurden in mehr als einem Isolat detektiert. Innerhalb von acht der insgesamt elf Familien wurden *H. pylori*-Isolate aus mindestens zwei Familienmitgliedern identifiziert, die denselben ST aufwiesen. In vier dieser Familien wurden identische STs in entweder Mutter oder Vater und einem der Kinder nachgewiesen: In der koreanischen Familie K1 waren Vater (K1) und Tochter (K1-1) mit Stämmen desselben STs infiziert, in der kolumbianischen Familie C7 Mutter (C7) und Tochter (C7-2) und in der irischen Familie Vater (H3023) und Sohn (H3022). In der englischen Familie, die drei Generationen umfasste, wiesen die Isolate des Grossvaters (H3014) und des Enkels (H3018) identische STs auf. Dies deutet auf klonale Transmission zwischen einem Elternteil und Kind bzw. Enkel hin. In weiteren vier Familien sind STs identifiziert worden, die innerhalb von Geschwistern identisch waren. Jeweils zwei Geschwister der Familie H2 (H2, H2-1), K5 (K5-2, K5-3) und der Familie C5 (C5-3, C5-4) waren mit Stämmen desselben STs infiziert. In der Familie K3 wurden identische STs in drei Geschwistern (K3-1, K3-2 und K3-4) detektiert. Die Isolate der Familien H1, H3 und C6 wiesen ausschliesslich einzigartige STs auf.

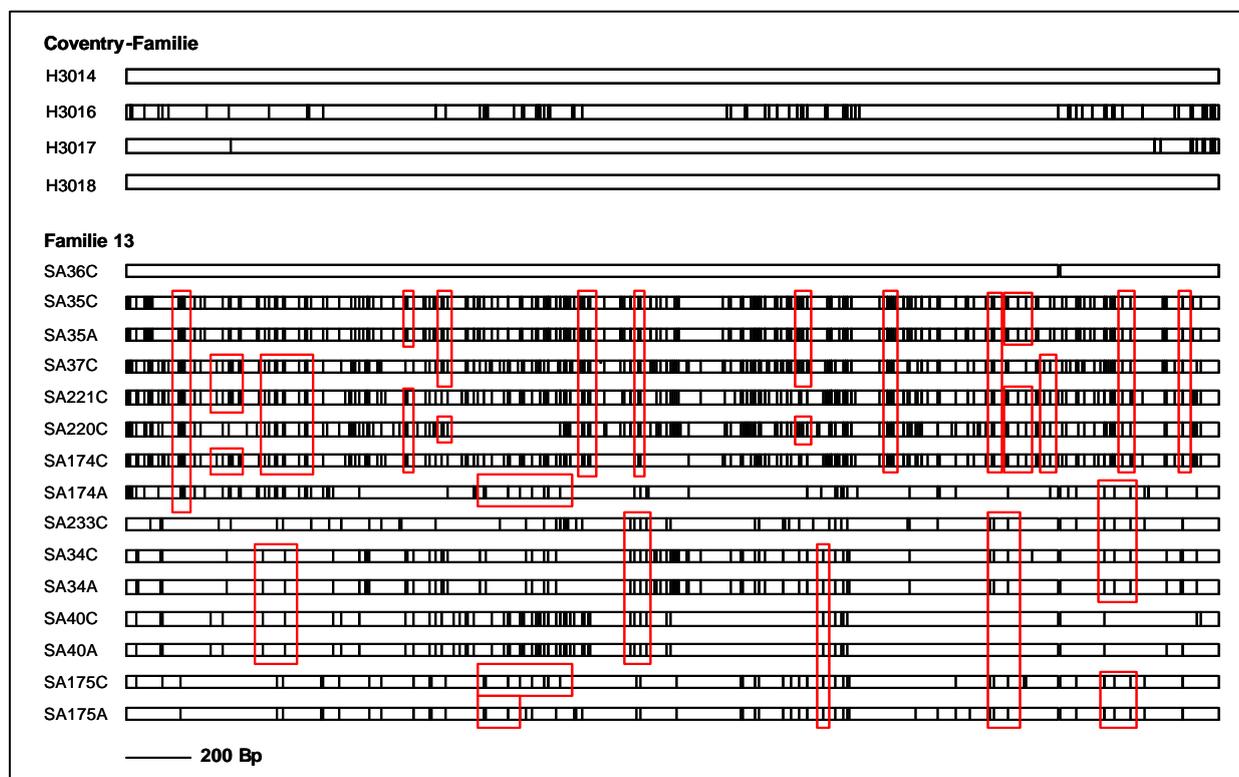
Die Ergebnisse zeigen, dass auch die Analyse von *H. pylori* Familienisolaten aus städtischen Regionen mittels hochauflösender MLST im Vergleich zu den südafrikanischen Familien eine höhere genetische Verwandtschaft der Isolate innerhalb der Familien anzeigt, die die hauptsächlich intrafamiliäre Übertragung von *H. pylori* in diesen Regionen bestätigen.

#### **4.1.3. Komplexe Mosaikstruktur in Multilocus-Haplotypen von *H. pylori* in südafrikanischen Familien**

Die allelische Diversität von *H. pylori* wird massgeblich durch Rekombination während der multiplen Infektion mit genetisch unverwandten Stämmen generiert (Falush *et al.*, 2001). Ein Anzeichen von Rekombination ist die Entstehung von Sequenz-Mosaiken, die nur selten detektiert werden können, da die Rekombination so effizient ist, dass die Mosaikstruktur der Gene durch weitere Rekombinationsereignisse fragmentiert wird. Um Rekombination in Form von Mosaikstrukturen zu identifizieren, die möglicherweise zu der hohen genetischen Diversität der südafrikanischen Isolate führten, wurden die Nukleotid-Polymorphismen der sieben Housekeeping-Gene aller Familienisolate graphisch mit dem Programm Haplot (vgl. 3.6.) visualisiert. Beispielfhaft sind hier in Abb. 12. die Ergebnisse der Familie aus England und der Familie 13 aus Südafrika gezeigt. Die Darstellung der Sequenzen der Isolate aus den übrigen Familien ist im Anhang zu finden (Abb. A1, A2). Als Referenzsequenz wurde die des Isolats SA36C verwendet.

Der Grossvater (H3014) und Enkel (H3018) der Familie aus England waren, wie bereits beschrieben, mit Stämmen identischer STs infiziert (Referenzsequenz: H3014). Die Isolate des Vaters (H3016) und des Onkels (H3017) hingegen wurden unterschiedlichen STs zugeordnet. Die im Vergleich zu den Isolaten des Grossvaters und Enkels unterschiedliche ST-Zuordnung der Isolate H3016 und H3017 ist auf Rekombinationsereignisse in mehreren Genen bzw. auf eine Punktmutation oder einen kurzen DNA-Einbau im *atpA*-Gen und Rekombination im *yphC*-Gen zurückzuführen. Obwohl die vier Stämme drei unterschiedlichen STs angehören, lässt sich aufgrund der langen, in allen vier Isolaten identischen Nukleotid-Segmente eine hohe genetische Verwandtschaft der Isolate erkennen. Die weiteren nicht-südafrikanischen Familien zeigten mit Ausnahme der Familien H1 und H3 vergleichbare intrafamiliäre Sequenzähnlichkeiten (Anhang, Abb. A2).

In der südafrikanischen Familie 13 hingegen konnten keine längeren Genfragmente detektiert werden, die in mehreren Familienmitgliedern identisch waren. Durch Rekombination wurden diese fragmentiert, so dass die Housekeeping-Gene komplexe Mosaikstrukturen aufwiesen und in den Gensequenzen der Isolate lediglich mehrere, sehr kurze Polymorphismen-Cluster vorhanden waren, die in mindestens zwei Familienmitgliedern identisch waren. Hierdurch wurde die Vielfalt an STs in Familie 12 und 13 generiert. Diese Cluster waren über die gesamte Familie verteilt und obwohl diese auf eine klonale Abstammung schliessen lassen, waren die übrigen Sequenzbereiche hochvariabel.



**Abb. 12 (vorherige Seite). Mosaikstrukturen der Housekeeping-Gene von *H. pylori* in den Familien aus England (Coventry-Familie) und Südafrika (Familie 13).** Die Balken repräsentieren die zusammengefassten Housekeeping-Gene (3406 Bp) und die schwarzen Linien geben die Position der Sequenzpolymorphismen an. Die Lücken zeigen eine 6 Bp-Deletion im *yphC*-Gen der hpAfrica2-Isolate an. Corpus- und Antrum-Sequenzen der Familienmitglieder in Familie 13 sind nur angegeben, wenn sie nicht identisch sind. Familie 13: Identische Sequenzmotive, d.h. identische SNPs oder MNPs, die in mehr als einem Familienmitglied detektiert wurden, sind rot markiert.

#### 4.1.4. Genetische Verwandtschaft von *H. pylori* im Verhältnis zum Verwandtschaftsgrad der Familienmitglieder

Wie die vorangehenden Analysen zeigten, unterscheidet sich die genetische Diversität bzw. Verwandtschaft von *H. pylori* in den südafrikanischen Familien ländlicher Herkunft im Vergleich zu den Familien städtischer Herkunft aus Europa, Asien, Nord- und Südamerika. Die Übertragung von *H. pylori* in den städtischen Regionen erfolgte vermutlich im Gegensatz zu den südafrikanischen Familien hauptsächlich intrafamiliär. Für folgende Untersuchungen werden deshalb die Isolate und Familienmitglieder in zwei Gruppen zusammengefasst: einerseits alle Stämme und Personen südafrikanischer Familien (ländlicher Herkunft) und andererseits alle Isolate und Personen nicht-südafrikanischer Familien (städtischer Herkunft).

Zunächst wurde das Verhältnis der genetischen Verwandtschaft der Bakterien und der Verwandtschaft der Familienmitglieder bestimmt, welches sich offenbar in den südafrikanischen und nicht-südafrikanischen Familien unterscheidet. Hierfür wurde die Anzahl und die Verteilung genetisch verwandter Isolate untersucht. In den südafrikanischen Familien wiesen 25% der Stämme STs auf, die zu mindestens einem weiteren Isolat identisch waren (Tab. 11). In den nicht-südafrikanischen Familien hingegen wurden 40% identische ST-Paare identifiziert. Weiterhin war der Anteil an Isolaten mit übereinstimmenden STs von Verwandten ersten Grades in den nicht-südafrikanischen (36%) höher als in den südafrikanischen Familien (17%). Die in *H. pylori* häufigen Mutations- und Rekombinationsereignisse könnten dazu führen, dass sich einzelne der insgesamt sieben analysierten Genfragmente unterscheiden, obwohl das Transmissionsereignis erst kurz zurückliegt. Dies würde dennoch dazu führen, dass die Stämme unterschiedlichen STs zugewiesen werden. Es wurde daher zusätzlich zur Bestimmung des Vorkommens identischer STs in den Familien, ein wenig stringenter willkürlicher Grenzwert von vier identischen Allelen gewählt und das Vorkommen solcher als „genetisch nah verwandt“ zu betrachtenden Stämme untersucht. Die Mehrheit der Stämme aus nicht-südafrikanischen Familien stimmte mit mindestens einem weiteren Isolat in vier oder mehr Allelen überein (67%; Tab. 11); in den südafrikanischen Familien betrug der Anteil genetisch verwandter Stämme 48%. Weiterhin wurden fast alle Stämme aus Familien städtischer Herkunft, die in mindestens vier Allelen übereinstimmten, von Personen isoliert, die einen Verwandtschaftsgrad ersten Grades aufwiesen (61% von 67%). Im Gegensatz dazu, waren nur 27% der südafrikanischen Verwandten ersten

Grades mit genetisch verwandten Stämmen infiziert. Dies bedeutet weiterhin, dass nur ca. die Hälfte der genetisch verwandten *H. pylori*-Isolate (27% von 48%) in Familienmitgliedern ersten Grades detektiert wurden und die übrigen nah verwandten Stämme in Personen mit geringerem Verwandtschaftsgrad vorkamen.

**Tab. 11. Vorkommen von *H. pylori* Isolaten mit identischen STs und Isolaten mit mindestens vier identischen Allelen in den ländlichen, südafrikanischen Familien und den nicht-südafrikanischen Familien.**

	Isolate mit identischen ST	Familienmitglieder 1. Grades mit identischen ST	Genetisch verwandte Isolate (4 identische Allele)	Familienmitglieder 1. Grades mit genetisch verwandten Isolaten (4 identische Allele)
Südafrikanische Familien (Familie 12 und 13)	25%	17%	48%	<b>27%</b>
Nicht-südafrikanische Familien (H1, H2, H3, K1, K3, K5, C5, C6, C7, Irland, England)	40%	36%	67%	<b>61%</b>

Die vorangehenden Untersuchungen der Familienisolate hinsichtlich der Populationszugehörigkeit, STs und Verteilung genetisch verwandter Stämme in den Familien zeigen, dass die klonale Übertragung von *H. pylori* zwischen Verwandten ersten Grades in den südafrikanischen Familien seltener ist als in den nicht-südafrikanischen und im Vergleich zu den Familien aus Pretoria eher in den Familien städtischer Herkunft eine Assoziation von genetischer Verwandtschaft der Familienmitglieder und genetischer Ähnlichkeit der entsprechenden Isolate zu erkennen ist.

Um die statistische Signifikanz dieser Beobachtung zu überprüfen, wurde der Verwandtschaftsgrad der Personen aus Südafrika und den übrigen Ländern berechnet und das Verhältnis der genetischen Ähnlichkeit eines jeden Stammpaares mit dem Verwandtschaftsgrad des Paares der entsprechenden Träger analysiert. Die Sequenzähnlichkeit der zusammengefassten Housekeeping-Gene für jedes Stammpaar aus den südafrikanischen und den nicht-südafrikanischen Familien wurde mit dem Programm Bionumerics bestimmt. Für die Ermittlung des Verwandtschaftsgrades der Familienmitglieder wurden zunächst mit dem Programm GenoPro<sup>®</sup> (vgl. 3.6.) die Stammbäume der einzelnen Familien in gedcom-Dateien umgewandelt, die als Eingangsdateien für das Programm KStableau (vgl. 3.6.) dienen, welches die Verwandtschaftskoeffizienten aller möglichen Paare an Familienmitgliedern berechnet. Die Berechnung basiert auf der 25%igen Wahrscheinlichkeit, dass die beiden Allele desselben Locus eines Individuums entweder von der Mutter oder vom Vater stammen. Verwandte ersten Grades besitzen daher

einen Verwandtschaftskoeffizienten von 0,25, Verwandte zweiten Grades einen Koeffizienten von 0,125, usw.. Personen von verschiedenen Familien wurden als unverwandt betrachtet und deren Koeffizient als 0 gesetzt. Da im Gegensatz zu den nicht-südafrikanischen Familien, je ein Corpus- und Antrum-Isolat von fast jedem Familienmitglied aus Pretoria vorlag, wurden für diese Familien zwei Korrelationsanalysen jeweils mit den Corpus- und Antrum-Isolaten durchgeführt. Für jedes Individuen-Paar mit einem bestimmten Verwandtschaftskoeffizienten wurde dann die Sequenzähnlichkeit der von diesen Personen entnommenen Isolate in % bestimmt. Die Ergebnisse sind als Punkteplot angegeben, bei dem ein Punkt die Sequenzähnlichkeit des Isolatpaares und den Koeffizienten des Individuen-Paares angibt (Abb. 13. A1, B1 und C1), sowie als Box-Plot, der zusätzlich die Medianwerte und die Streuung der Werte der Sequenzähnlichkeiten pro Verwandtschaftskoeffizient des Wirtes verdeutlicht (Abb. 13. A2, B2 und C2).

In dem Punktdiagramm der nicht-südafrikanischen und nicht miteinander verwandten Familienmitglieder (Verwandtschaftskoeffizient: 0) lassen sich zwei voneinander getrennte Gruppen von Stammpaaren erkennen, eine kleinere Anzahl an Paaren die eine Ähnlichkeit von 97,5-98% aufweisen und davon abgesetzt eine größere Anzahl an Stammpaaren mit einer geringeren Sequenzähnlichkeit von 95,0-96,5%. Die beiden Gruppierungen ergaben sich durch die Bestimmung der genetischen Ähnlichkeit von Stämmen, die unterschiedlichen oder derselben Population angehören. Ähnliche Gruppen zeigten sich für die verschiedenen Verwandtschaftskoeffizienten der südafrikanischen Familien.

Die paarweisen Vergleiche der jeweils 50 Corpus- und Antrum-Isolate aus insgesamt 52 Personen der beiden südafrikanischen Familien 12 und 13 ergaben 590 unverwandte Individuenpaare und deren entsprechende Isolatpaare. Weiterhin konnte die Sequenzähnlichkeit von *H. pylori*-Isolaten aus 83 Paaren Verwandter ersten Grades bestimmt werden und die Anzahl an Paaren an Familienmitgliedern, die einen Verwandtschaftskoeffizient von 0,78-12,5% aufwiesen, betrug zwischen 23 und 177. Die Spanne der Sequenzähnlichkeit der Corpus-Isolate aus nicht miteinander verwandten Personen betrug 91,77-99,33% (Abb. 13; A1 und A2.). Die Corpus-Isolate aus Individuen mit einem Verwandtschaftskoeffizienten von 1,56-12,5% wiesen eine ähnliche Spanne auf (1,56%: 91,77-99,33%; 3,13%: 91,83-99,47%; 6,25%: 91,56-100%; 12,5%: 91,68-100%) und ebenso variierte die Sequenzähnlichkeit der Stämme aus Verwandten ersten Grades von 91,59-100%. Die maximale Sequenzähnlichkeit der Isolatpaare aus Personen mit einem Koeffizienten von 0,78% war geringer (Spanne: 92,18-97,62%). Die mittlere Differenz von maximaler und minimaler Sequenzähnlichkeit von *H. pylori* aus Individuen der verschiedenen Verwandtschaftsgrade betrug 7,61%. Wie die Interquartilabstände der Boxplots (Abb. 13. A2) erkennen lassen, ist die Streuung der Werte der Sequenzähnlichkeiten der Corpus-Isolate aus unverwandten Personen bis zu Verwandten ersten Grades ähnlich und die als Box dargestellten 50% der Daten umfassten für jeden Verwandtschaftskoeffizienten einen Bereich von ca. 92,5-97% Sequenzähnlichkeit. Die Antrum-Isolate der südafrikanischen Familienmitglieder mit einem Koeffizienten von 3,13-25% wiesen eine ähnliche Spanne der

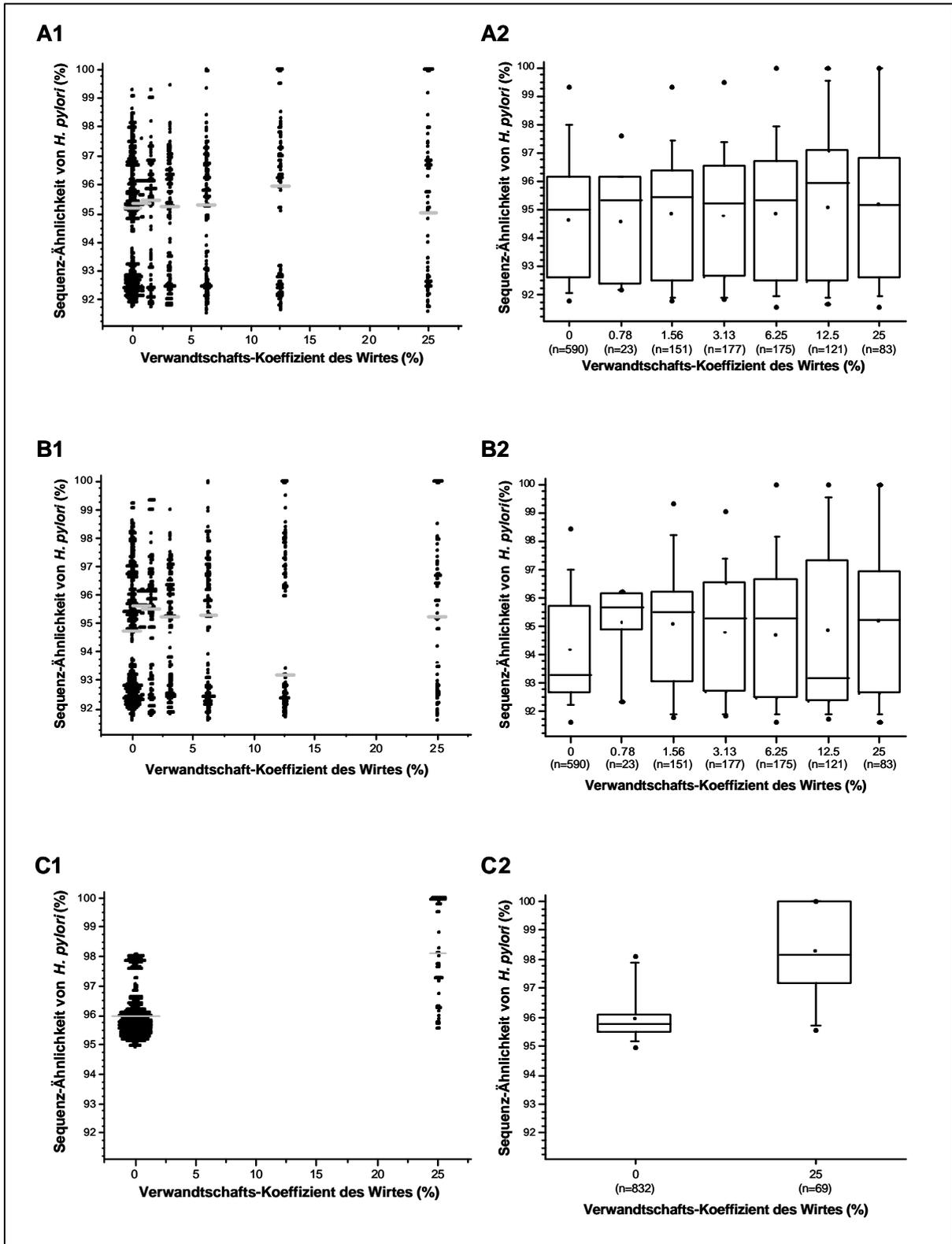
Sequenzähnlichkeit auf (3,13: 91,83-99,01%; 6,25: 91,62-100%; 12,5: 91,71-100%; 25%: 91,59-100%) (Abb. 13; B1). Die maximale Sequenzähnlichkeit der Stämme aus unverwandten Personen und Verwandten mit einem Koeffizienten von 0,78 war mit 98,42% bzw. 95,11% geringer (Spanne: 0%: 91,59-98,42%; 0,78%: 92,33-96,19%). Die mittlere Differenz der höchsten und geringsten Sequenzähnlichkeiten der Antrum-Stämme aus den unterschiedlichen Verwandtschaftsgruppen betrug 7,1% und war vergleichbar mit der Differenz der Corpus-Isolate. Mit Ausnahme der Stammpaare, die von Verwandten mit einem Koeffizienten von 0,78% entnommen wurden und eine geringe Streuung der Werte der Sequenzähnlichkeiten aufwiesen (die Sequenz von 50% der Paare differierte um maximal 1% Sequenz), war die Streuung der Werte der Antrum-Isolate der übrigen Verwandtschaftsgruppen im Vergleich zu den Corpus-Isolaten ähnlich hoch (Abb. 13; B2).

Die nicht südafrikanischen Familien bestanden mit Ausnahme der Familie aus England, die drei Generationen umfasste und der Familie H2 aus den USA (sämtliche Mitglieder dieser Familien wurden für die Analyse als Verwandte ersten Grades betrachtet), ausschliesslich aus Verwandten ersten Grades, so dass die genetische Verwandtschaft von *H. pylori* in diesen Regionen aus unverwandten Personen und Verwandten ersten Grades analysiert wurde. Die paarweisen Vergleiche der 43 Isolate der elf nicht-südafrikanischen Familien ergab 832 Stammpaare von nicht miteinander verwandten Individuen aus unterschiedlichen Familien und 69 Stammpaare von Verwandten ersten Grades. Im Gegensatz zu den Familien 12 und 13, wiesen diese Isolate deutliche Unterschiede hinsichtlich der Spanne der Sequenzähnlichkeiten pro Verwandtschaftskoeffizient und der Streuung der Werte auf (Abb. 13; C1). Die Stämme aus nicht verwandten Personen zeigten, verglichen mit den Corpus- und Antrum-Stämmen aus Südafrika, eine höhere Sequenzähnlichkeit, die von 94,95-98,09% variierte. Die Sequenzähnlichkeit von Isolaten aus Verwandten ersten Grades war ebenfalls höher als die der Antrum- und Corpus-Isolate aus südafrikanischen Verwandten ersten Grades und variierte von 95,57-100%. Im Unterschied zu den südafrikanischen Familienisolaten wurden in den Familien städtischer Herkunft keine Stammpaare detektiert, die eine Sequenzähnlichkeit geringer als 94,95% aufwiesen. Weiterhin war die mittlere Differenz der maximalen und minimalen Sequenzähnlichkeit der Stammpaare aus unverwandten Personen und Verwandten mit einem Koeffizienten von 25% mit 3,79% geringer als die der südafrikanischen Isolate (Corpus-Isolate: 7,61%, Antrum-Isolate: 7,1%). Die Streuung der Daten der Sequenzähnlichkeiten der Stämme aus den unverwandten nicht-südafrikanischen Familienmitgliedern war deutlich geringer als die der südafrikanischen Stammpaare aus unverwandten Personen. Die Hälfte der Isolatpaare unterschied sich um maximal 0,5% und die Streuung der Isolate aus Verwandten ersten Grades der Familienmitglieder städtischer Herkunft war grösser (3%) (Abb. 13; C2). Die Werte der Sequenzähnlichkeiten dieser Isolatpaare der Verwandten mit einem Koeffizienten von 25% zeigten zudem eine zu den südafrikanischen Isolaten der Verwandten ersten Grades entgegengesetzte Verteilung: über 50% der südafrikanischen Isolatpaare (Corpus und Antrum) wiesen für diesen Verwandtschaftskoeffizienten eine Sequenzähnlichkeit von weniger als 97% auf und eine geringere

Anzahl an Paaren eine Ähnlichkeit von über 97% (oberer Whisker), die Mehrheit der nicht-südafrikanischen Isolate dieser Verwandtschaftsgruppe hingegen besass eine Sequenzähnlichkeit von über 97%.

Weiterhin wurde der Mittelwert der Sequenzähnlichkeit der Isolatpaare pro Verwandtschaftskoeffizient bestimmt, um mögliche signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Verwandtschaftsgruppen der Träger zu ermitteln. Eine mögliche Korrelation der genetischen Ähnlichkeit von *H. pylori* und dem Verwandtschaftsgrad der entsprechenden Individuen stellt einen wichtigen Hinweis für den Übertragungsweg der Bakterien dar. Der Mittelwert der Sequenzähnlichkeit der Stammpaare aus unverwandten, nicht-südafrikanischen Personen betrug 95,8% und die mittlere Sequenzähnlichkeit der Isolate aus Verwandten ersten Grades war signifikant höher (98,3%;  $P < 0,001$ , Mann-Whitney-Rangsummentest). Im Gegensatz hierzu wies die mittlere Sequenzähnlichkeit der Corpus-Isolate aus unverwandten Personen (94,6%) und Verwandten ersten Grades (95,13%) keine signifikanten Unterschiede auf (Mann-Whitney-Rangsummen-Test). Ebenso zeigte eine Analyse der mittleren Sequenzähnlichkeiten der Corpus- und Antrum-Isolate aus allen Verwandtschaftsgruppen (0%-25%) keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Rangsummentest). Die Mittelwerte der Sequenzähnlichkeit der Antrum-Isolate aus Familienmitgliedern mit einem Verwandtschaftskoeffizienten von 25% (95,15%) war signifikant höher als die mittlere Sequenzähnlichkeit von Stämmen aus nicht miteinander verwandten Personen (94,14%).

**Abb. 13 (folgende Seite). Genetische Ähnlichkeit von *H. pylori* im Verhältnis zum Verwandtschaftskoeffizienten der Wirte aus südafrikanischen und nicht-südafrikanischen Familien.** (A1,A2) Corpus-Isolate der südafrikanischen Familien, (B1, B2) Antrum-Isolate der südafrikanischen Familien, (C1, C2) Isolate der nicht-südafrikanischen Familien. Die grauen Balken in den Graphen auf der linken Seite geben die Mittelwerte der Sequenzähnlichkeit von *H. pylori* für jeden Verwandtschaftskoeffizienten des Wirtes an. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse als Boxplots dargestellt. Die Boxen reichen vom 75ten Perzentil zum 25ten Perzentil und umfassen 50% der Daten. Der Median ist als horizontale Linie in den Boxen angegeben und der Mittelwert als Quadrat innerhalb der Boxen. Der obere Whisker wird durch das 95te Perzentil und der untere Whisker durch das 5te Perzentil begrenzt. Die oberen und unteren schwarzen Punkte geben den maximalen bzw. minimalen Wert pro Verwandtschaftskoeffizient an.



Um diese Unterschiede zwischen den südafrikanischen und nicht-südafrikanischen Familien zu bestätigen, wurde der Spearman-Rangsummen-Korrelationskoeffizient ( $r_s$ ) von der Sequenzähnlichkeit von *H. pylori* und dem Verwandtschaftsgrad der Familienmitglieder für diese beiden Gruppen berechnet (Sachs, 1993). Dieser Test wurde gewählt, weil die Daten nicht normalverteilt sind und im Vergleich zur Pearson-Produkt-Moment-Korrelation die Rangkorrelation nach Spearman zusätzlich robuster gegenüber Ausreißern ist (Sachs, 1993). Der Spearman-Korrelationskoeffizient ermöglicht eine Messung der Stärke der Assoziation zwischen zwei Variablen. Ein Wert von -1 gibt eine perfekte negative Korrelation an, ein Koeffizient von nahe 0 gibt eine sehr schwache bzw. keine lineare Korrelation an. Ein Koeffizient von +1 zeigt, dass zwischen den Variablen eine perfekte lineare Korrelation vorliegt.

Die für die Antrum- und Corpus-Isolate der südafrikanischen Familien aus paarweisen Vergleichen der Personen mit einem Verwandtschaftskoeffizienten von 0% und 25% und aus allen Verwandtschaftsgruppen von 0%-25% erhaltenen Korrelationskoeffizienten von 0,0389-0,066 können als sehr geringe Korrelation der Variablen der genetischen Ähnlichkeit von *H. pylori* und des Verwandtschaftsgrades des Wirtes interpretiert werden ( $r_s < 0,2$ : sehr geringe Korrelation; Bühl & Zöfel, 1995) (Tab. 12). Mit Ausnahme der Korrelation der Corpus-Isolate aus sämtlichen Verwandtschaftsgruppen mit einem Verwandtschaftskoeffizienten von 0,25% ( $P = 0,02$ ) war die sehr geringe Korrelation auch nicht signifikant ( $P > 0,05$ ).

Die genetische Verwandtschaft der nicht-südafrikanischen Familienisolate und deren Träger hingegen wies einen deutlich höheren Korrelationskoeffizienten von 0,353 ( $r_s$ : 0,2-0,5: geringe Korrelation; Bühl & Zöfel, 1995). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Korrelation des Verwandtschaftsgrades des Wirtes und der genetischen Ähnlichkeit von *H. pylori* in den städtischen, nicht-südafrikanischen Familien höher ist, als in den ländlichen, südafrikanischen Familien.

**Tab. 12. Spearman Rank Order Korrelationskoeffizient ( $r_s$ ) der genetischen Verwandtschaft von *H. pylori* und der Familienmitglieder aus Südafrika und nicht-südafrikanischen Regionen.**

<i>H. pylori</i> Isolate und der Verwandtschaftskoeffizient der Träger	Spearman Rank Order Korrelationskoeffizient ( $r_s$ )
<u>Südafrikanische Familien</u>	
Corpus-Isolate:	
0% und 25%	0,0602 ( $P > 0,05$ )
0% bis 25%	0,066 ( $P = 0,02$ )
Antrum-Isolate:	
0% und 25%	0,0632 ( $P > 0,05$ )
0% bis 25%	0,0389 ( $P > 0,05$ )
<u>Nicht-südafrikanische Familien:</u>	
0% und 25%	0,353

#### 4.1.5. Diversität von *H. pylori* im einzelnen Individuum

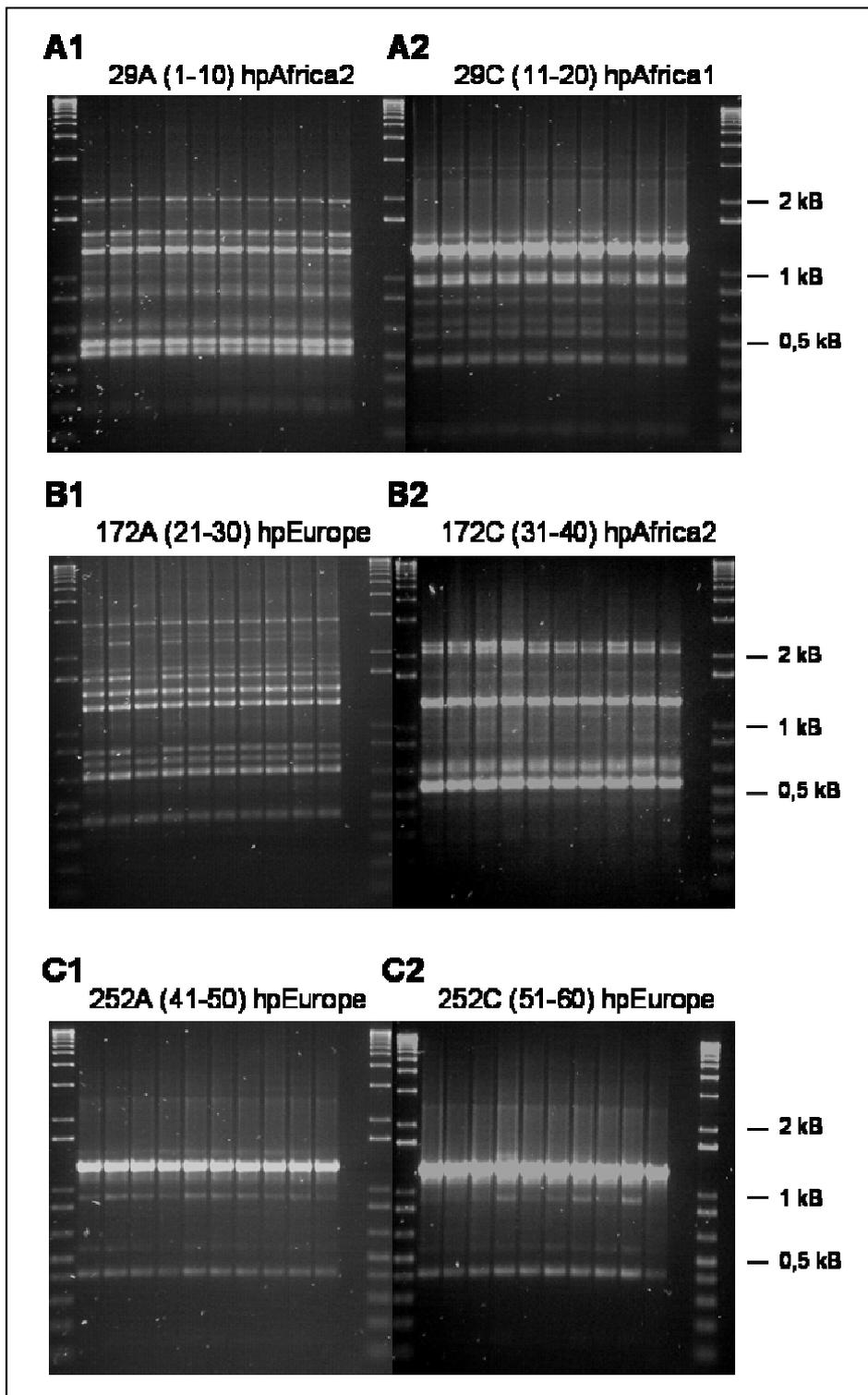
Von 47 Familienmitgliedern der südafrikanischen Familien 12 und 13 konnte je ein Corpus- und Antrumisolat kultiviert und die ST-Zugehörigkeit bestimmt werden. Dies ermöglichte zusätzlich zu den vergleichenden Analysen der genetischen Verwandtschaft von *H. pylori* aus Familien unterschiedlicher geographischer Herkunft die Untersuchung der genetischen Diversität von *H. pylori* innerhalb eines Individuums.

Die Corpus- und Antrumisolat-Paare wiesen in 26 der 38 Familienmitglieder (von denen Antrum- und Corpus-Paare entnommen wurden) der Familie 12 identische STs auf (68%). Vier von neun Mitgliedern der Familie 13 waren mit Isolatpaaren infiziert, die identischen STs zugeordnet wurden (44%). Von den Corpus- und Antrum-Isolaten der übrigen 17 Isolatpaare, die sich in den Allelprofilen unterschieden, waren zehn Paare aus Familienmitgliedern der Familie 12 (45, 144, 169, 158, 213, 227, 251, 252, 301 und 303) und vier Paare aus Individuen der Familie 13 (34, 35, 40 und 175) genetisch verwandt, da drei bis sechs der sieben sequenzierten Housekeeping-Genfragmente innerhalb dieser Paare identisch waren. Im Gegensatz hierzu waren zwei Familienmitglieder der Familie 12 (29 und 172) und ein Mitglied der Familie 13 (174) mit genetisch unverwandten Stämmen infiziert, da diese keine Allele (29, 172, und 174) gemeinsam hatten. Der geringe Anteil an Familienmitgliedern, denen genetisch unverwandte Stämme entnommen wurden (8,5%), deutet darauf hin, dass gemischte Infektionen in den südafrikanischen Familien selten sind.

Die Corpus- und Antrum-Isolate der drei Paare 29, 172 und 174, die in keinem der sieben Allele übereinstimmten, wurden unterschiedlichen Populationen zugeordnet und die Isolate des Familienmitgliedes 252 differierten zwar in vier Allelen, gehörten jedoch derselben Population an. Von den Familienmitgliedern 29 und 172, deren Antrum- und Corpus-Isolate den Populationen hpAfrica2 und hpAfrica1 bzw. hpEurope und hpAfrica2 zugewiesen wurden, sowie von dem Familienmitglied 252, deren Isolate der Population hpEurope angehörten, wurden aus der Antrum- und Corpus-Biopsie je zehn weitere Isolate angezüchtet. Da für die vorhergehenden Untersuchungen nur zwei Isolate pro Person herangezogen wurden, erfolgte eine weitere Analyse dieser zusätzlichen zehn Isolate pro Corpus und Antrum und Individuum durch RAPD-PCR, um durch eine erhöhte Anzahl an Stämmen die genetische Verwandtschaft zu den bisher analysierten Antrum- und Corpus-Paaren zu bestätigen. Sämtliche Antrum-Isolate aus den Familienmitgliedern 29, 172 und 252 zeigten jeweils identische Bandenmuster, ebenso wiesen die jeweils 10 Corpus-Isolate pro Individuum identische Bandenmuster auf, die lediglich in der Intensität einzelner Banden variierten (Abb. 14). Aufgrund der identischen Fingerprints können die Antrum-Isolate des entsprechenden Mitglieds, sowie die weiteren Corpus-Isolate pro Individuum als genetisch verwandt betrachtet werden. Wie bereits erwähnt wurden die Antrum-Isolate aus den Familienmitgliedern 29 und 172 anderen Populationen zugeordnet als die entsprechenden Corpus-Isolate.

Dies spiegelt sich auch in den Fingerprints der RAPD-Analyse wieder, die für 29 und 172 individuelle und deutlich voneinander abweichende Bandenmuster für die einerseits Antrum-Isolate und andererseits Corpus-Isolate ergaben (Abb. 14; A1, A2; B1, B2). Im Vergleich zu den Stämmen aus 29 und 172 wurden das Antrum- und Corpus-Isolat aus 252 derselben Population zugeordnet und die genetische Distanz ist zwischen diesen Isolaten weniger gering. Die genetische Verwandtschaft wird durch die RAPD-PCR bestätigt: das Bandenmuster der zehn Antrum-Isolate war identisch zu dem der Corpus-Isolate (Abb. 14; C1,C2).

**Abb. 14 (folgende Seite). RAPD-PCR-Fingerprints von *H. pylori* von jeweils zehn Antrum- und Corpus-Isolaten aus drei Mitgliedern der südafrikanischen Familie 12.** Auf der linken Seite sind die Bandenmuster der Antrum-Isolate und auf der rechten Seite die der Corpus-Isolate dargestellt. Die Populationszugehörigkeit des Original-Isolats ist jeweils über dem Bandenmuster angegeben. (A1) Antrum-Stämme aus dem Familienmitglied 29, (A2) Corpus-Stämme aus 29, (B1) Antrum-Stämme aus dem Mitglied 172, (B2) Corpus-Stämme aus 172, (C1) Antrum-Stämme aus dem Mitglied 252, (C2) Corpus-Stämme aus dem Mitglied 252. In Klammern sind die Klon-Nummern angegeben. Abkürzung: A, Antrum; C, Corpus.



Die zusammengefassten Sequenzen der Housekeeping-Genfragmente der Antrum- und Corpus-Isolate der südafrikanischen Familienmitglieder 29, 172 und 174, die unterschiedlichen Populationen zugeordnet worden sind, wurden weiterhin graphisch als Haplots dargestellt, um eventuelle Regionen identischer Sequenz innerhalb eines Paares zu detektieren, die auf einen genetischen Austausch zwischen den Stämmen schliessen lassen. Diese Darstellung zeigt deutlich die hohe genetische Variabilität in einem Individuum innerhalb eines Paares, dessen Isolate unterschiedlichen Populationen angehören. Besonders die Stämme 29A (hpAfrica2) und 29C (hpAfrica1) weisen eine hohe Anzahl an genetischen Unterschieden auf (Abb. 15). Es konnten jedoch für den Stamm 172A (hpEurope) und das Isolat 172C (hpAfrica2) drei Bereiche in zwei Genen (*atpA* und *mutY*) identifiziert werden, die in beiden Isolaten identisch waren, oder sich nur durch einen einzelnen Sequenzpolymorphismus unterschieden. Ähnlich hierzu waren einige kurze Segmente innerhalb eines Gens (*atpA*) in den Isolaten 174A und 174C identisch. Die Ergebnisse zeigen, dass ein genetischer Austausch von DNA-Fragmenten zwischen Stämmen unterschiedlicher Populationszugehörigkeit, bzw. unverwandten Stämmen während der gemischten Infektion innerhalb eines Individuums stattfinden kann.



**Abb. 15. Sequenzvergleiche von drei Antrum- und Corpus-Isolatpaaren aus drei Familienmitgliedern der südafrikanischen Familien 12 und 13, die unterschiedlichen Populationen zugeordnet wurden.** Die Balken repräsentieren die zusammengefassten Fragmente der Housekeeping-Gene (3406Bp). Die schwarzen vertikalen Linien geben die Position von Nukleotid-Polymorphismen an. Die Populationen sind in Klammern angegeben. Identische oder fast identische Sequenzbereiche zwischen den Isolaten eines Paares sind rot markiert. Abkürzung: A, Antrum; C, Corpus.

## 4.2. Analyse genetischer und funktioneller Diversität der Adhäsinkodierenden Gene *babA* und *sabA* von *H. pylori* während der chronischen Kolonisierung

Grundlage der Studien, die zu dem Modell der kontinuierlichen Mikroevolution von *H. pylori* während der Infektion führten, waren Bakterienisolate, die aus demselben Patienten während aufeinanderfolgender Gastroendoskopien entnommen wurden (Falush *et al.*, 2001; Israel *et al.* 2001, Prouzet-Mauléon *et al.* 2005). Die sogenannten sequenziellen Isolate werden in einem Intervall von mehreren Monaten bis Jahren entnommen und erlauben eine *ex vivo*-Analyse genetischer und phänotypischer Veränderungen der Bakterien während der Kolonisierung in einem definierten Zeitraum. Die im folgenden beschriebenen Experimente zur Analyse der genetischen und funktionellen Variabilität von Adhäsinkodierenden Genen basierten auf acht Paaren sequenziell isolierter *H. pylori* Stämme, die in einem Intervall von drei bis 36 Monaten entnommen wurden. Fünf Paare (LSU1010, LSU1014, LSU1037, LSU1040 und LSU1062) stammten aus New Orleans, Louisiana (USA). Die Patienten, von denen die meisten Afro-Amerikaner waren, waren Teil einer klinischen Therapiestudie (Taylor *et al.*, 1995). Weitere drei Stammpaare (NQ331, NQ352 und NQ367) stammten aus Nariño (Kolumbien), deren Wirte eine multifokale atrophische Gastritis aufwiesen und ebenfalls Teil einer Interventionsstudie waren (Correa *et al.*, 2000). Das zuerst entnommene Isolat eines Paares und der darauffolgend zu einem späteren Zeitpunkt isolierte Stamm werden im folgenden vereinfachend als erstes bzw zweites Isolat bezeichnet. Sämtliche Isolate wurden aus Einzelkolonien angezüchtet.

### 4.2.1. Allelische Diversität von *babA* und *sabA* in sequenziellen Isolaten

Die *H. pylori*-Adhäsine BabA und SabA vermitteln eine spezifische Adhärenz an die Blutgruppen-Antigene Lewis<sup>b</sup> bzw. Sialyl-Lewis<sup>x</sup> des Magenepithels, deren Expression wirtsspezifisch ist und während der Infektion variiert (Varki, 1993; Ota *et al.*, 1998). Für die Untersuchung der genetischen Variabilität der Adhäsinkodierenden Gene *babA* und *sabA* während der Kolonisierung, wurde der gesamte kodierende Bereich der Gene der sequenziell entnommenen Isolate sequenziert. Aufgrund der hohen Homologie der 5'- und 3'-Regionen von *babA* und *sabA* zu anderen äusseren Membranprotein (OMP)-kodierenden Genen wurden die Primer so gewählt, dass zwei sich überlagernde Genfragmente mit jeweils einem in der zentralen Region des Gens bindenden, spezifischen Primer und einem unspezifischen Primer am Genstart bzw. Genende amplifiziert wurden (Alm *et al.*, 2000). Die Sequenzierung erfolgte mit diesen und weiteren Primern, die innerhalb der generierten PCR-Produkte binden, um eine doppelsträngige Abdeckung zu erzielen. Sequenzunterschiede innerhalb der Paare wurden durch erneute PCR und Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzähnlichkeiten, sowie der Genstatus (an- oder

ausgeschaltet) wurden mit dem Programm Bionumerics bestimmt. Gene, die einen offenen Leserahmen ohne vorzeitige Stopcodons aufwiesen, wurden als „AN“ bezeichnet. In einer vorhergehenden Studie wurden Mutations- und Rekombinationsereignisse in zehn Housekeeping-Genen und Virulenz-assoziierten Genen sequenzieller Isolate untersucht, die in einem Intervall von drei Monaten bis drei Jahren entnommen wurden (Falush *et al.*, 2001). Acht dieser Paare wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Analyse der Diversität von *babA* und *sabA* verwendet. Es handelt sich um sequenzielle Stämme, die in ein bis fünf Genen Sequenzunterschiede aufwiesen, jedoch als genetisch verwandt betrachtet wurden, da mindestens fünf Genfragmente innerhalb der Paare identisch waren.

Von Isolaten von fünf der acht Paare konnte *babA* amplifiziert werden. Von den Isolaten der Paare LSU1010, LSU1037 und LSU1040 hingegen liess sich das Gen auch mit verschiedenen Primern nicht amplifizieren und ist vermutlich in diesen Stämmen nicht vorhanden. Sämtliche *babA*-positiven Stammpaare wiesen Unterschiede in den Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen auf (Tab. 13). Die Position der Nukleotid-Polymorphismen und Aminosäureaustausche innerhalb der Paare ist zusätzlich in Abbildung 17 graphisch illustriert, wobei die Sequenz des jeweiligen ersten Isolates als Referenzsequenz verwendet wurde. Das zweite Isolat der Paare LSU1062 und NQ331 enthielt jeweils einen nicht-synonymen „Einzelnukleotid“-Polymorphismus (SNP) in der zentralen Region von *babA*, der vermutlich auf eine Punktmutation oder ein kurzes Rekombinationsereignis zurückzuführen ist. Die 36 Monate auseinanderliegenden Stämme des Paares NQ367 unterschieden sich in der 5'-Region von *babA* durch einen nicht-synonymen SNP und im 3'-Bereich durch mehrere eng nebeneinanderliegende Polymorphismen (MNPs), die zu drei Aminosäureaustauschen führten. In den Paaren LSU1014 und NQ352 haben vermutlich mehrere Rekombinationsereignisse im *babA*-Gen stattgefunden. MNPs erstrecken sich in den zweiten Isolaten über das gesamte Gen, sowie Aminosäureaustausche über die gesamte Proteinsequenz. Der DNA-Einbau von nicht verwandter *babA*-Sequenz könnte zu einer Deletion von drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden im zweiten Isolat des Paares NQ352 (NQ1701) geführt haben, wobei der offene Leserahmen jedoch erhalten blieb. Die Deletion einer G-Base in dem zweiten Isolat des Paares LSU1014 in einem Bereich von fünf aufeinanderfolgenden G-Basen im ersten Stamm führte hingegen zu einem vorzeitigen Stoppcodon am 3'-Terminus und zu einem um sieben Aminosäure kürzeren Protein.

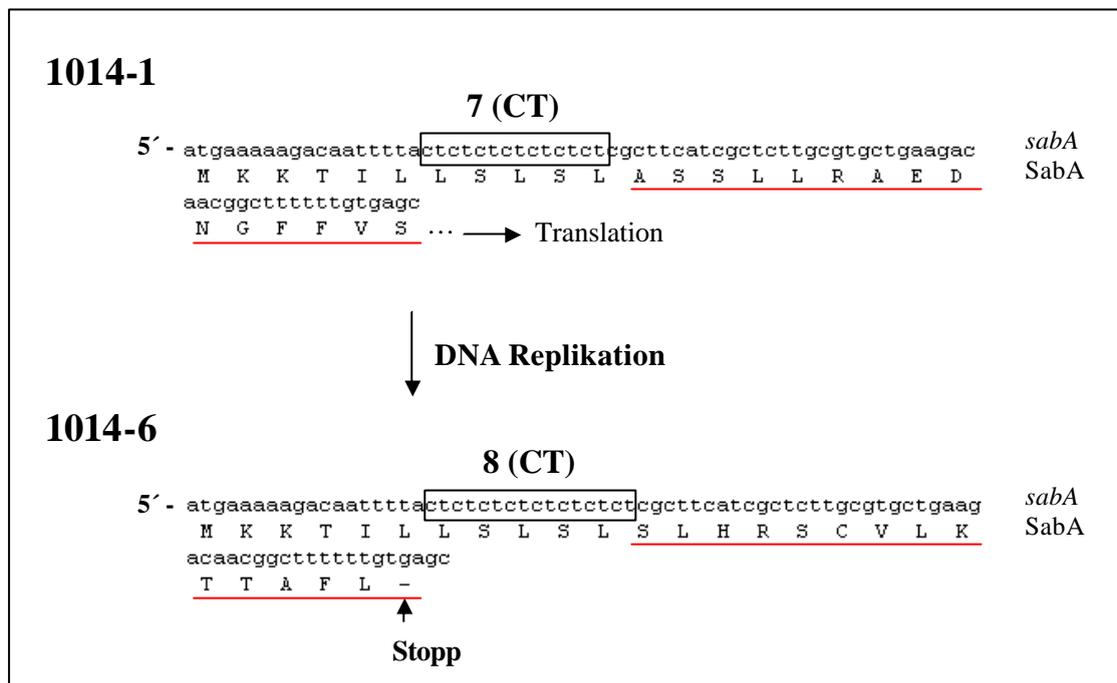
Die Genlänge aller Stämme variierte von 2208-2335 Bp und die Länge der abgeleiteten Proteinsequenz von 736-750 Aminosäuren. Die Sequenzähnlichkeit von *babA* der sequenziellen Isolate betrug 96,97-99,96% (Gen) und 97,01-99,66% (Protein) und war im Vergleich zu den Sequenzähnlichkeiten der unverwandten Stämme J99 und 26695 (Gen: 91%, Protein: 92,2%) (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999) geringer. Weiterhin wurde die Präsenz des mit *babA* nahe verwandtem *babB*-Gens in den sequenziellen Isolaten durch PCR mit *babB* spezifischen Primern überprüft und von allen Isolaten konnte ein Fragment des *babB*-Gens amplifiziert werden.

Tab. 13. Vergleich der *babA*-Gensequenzen innerhalb der sequenziellen Stammpaare.

Sequenzielle Isolate	zeitl. Abstand der Isolate [Monate]	Sequenzähnlichkeit [%]		Genlänge [Bp] 1. Isolat 2. Isolat	Genstatus
		Gen	Protein		
1010-1 1010-3	3	keine PCR-Produkte			
1014-1 1014-6	24	98,97	97,01	2335 2334	AN vorzeitiges Stoppcodon am 3' Terminus
1037-1 1037-5	12	keine PCR-Produkte			
1040-1 1040-6	24	keine PCR-Produkte			
1062-1 1062-3	3	99,96	99,92	2220 2220	AN
331 1832	36	99,97	99,91	2235 2235	AN
352 1701	36	96,97	98,41	2211 2208	AN
367 1671	36	99,16	99,66	2250 2250	AN

Sämtliche Isolate waren *sabA*-positiv (Tab. 13 und Abb. 17). Die Stämme von drei Paaren (LSU1010, LSU1040 und NQ331), die in einem Abstand von drei, 24 und 36 Monate entnommen wurden, wiesen identische *sabA*-Sequenzen auf. Jeweils ein nicht-synonymer SNP wurde in der 5'-Region von *sabA* in den Paaren LSU1037 und NQ367 nachgewiesen. Die MNPs im Paar LSU1062 und am 3'-Ende des Gens im Paar NQ352 wurden vermutlich durch mehrere bzw. ein Rekombinationsereignis und den Einbau unverwandter *sabA*-DNA generiert. Im zweiten Isolat des Paares NQ352 führte dies zum Austausch von drei Aminosäuren, während sich die Stämme des Paares LSU1062 durch mehrere nicht-synonyme Austausche in der gesamten ersten Hälfte des Gens und am 3'-Terminus unterschieden. Die in einem Intervall von 24 Monaten entnommenen Stämme des Paares LSU1014 wiesen neben MNPs im 5'-Bereich eine Deletion von zwei aufeinanderfolgenden Nukleotiden auf. Das *sabA*-Gen besitzt in der kodierenden Signalpeptidregion repetitive Di-Nukleotid (CT)-Einheiten. Repetitive DNA-Segmente sind anfällig für „slipped strand mispairing“, wodurch sich während der Replikation im Vergleich zum Matrizenstrang die Anzahl an CT-Einheiten in dem zu synthetisierenden Strang verringern oder erhöhen kann und demzufolge der translationelle Leserahmen verschoben wird. Die Isolate des Paares LSU1014 unterschieden sich in der Länge des CT-Repeats. Das erste Isolat (LSU1014-1) wies sieben CT-Wiederholungen und einen offenen Leserahmen auf, in dem zweiten Isolat (LSU1014-6) hingegen wurden acht CT-Einheiten detektiert, die zu einem vorzeitigen Stoppkodon 78 Basenpaare downstream

des Startcodons führten (Abb. 16). Die Anzahl an CT-Einheiten in allen anderen Stämmen, deren *sabA*-Gen durchweg „AN“ war, variierte von zwei bis elf (Tab. 14).



**Abb. 16.** 5'-Terminus des *sabA*-Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz des ersten (LSU1014-1) und zweiten Isolates (LSU1014-6) des Paares LSU1014. Die CT-Dinukleotidrepeats sind eingerahmt. Die Länge hat sich um eine zusätzliche CT-Einheit durch slipped strand mispairing im Isolat LSU1014-6 verändert. Rot unterstrichen sind die SabA-Aminosäuren, die sich durch die entstandene Leserahmenverschiebung in beiden Isolaten unterschieden.

Die Länge der Nukleotidsequenz von *sabA* und die abgeleitete Aminosäuresequenz sämtlicher analysierten Stämme betrug 1944-1968 Bp und 648-656 Aminosäuren. Wie auch bei *babA* war die *sabA*-Sequenzähnlichkeit innerhalb der Paare (Gen: 98,57-100%; Protein: 98,93-100%) ebenfalls höher als zwischen den nicht verwandten Stämmen J99 und 26695 (Gen: 91,7%; Protein: 92,3%).

Tab. 14. Vergleich der *sabA*-Gensequenzen innerhalb der sequenziellen Stammpaare.

Sequenzielle Isolate	zeitl. Abstand der Isolate [Monate]	Sequenzähnlichkeit [%]		Anzahl (CT)-Wiederholungen in kodierender 5'-Region	Genlänge [Bp] 1. Isolat 2. Isolat	Genstatus
		Gen	Protein			
1010-1 1010-3	3	100		2	1953 1953	AN
1014-1 1014-6	24	98,97		1014-1: 7 1014-6: 8	1956 1956	AN AUS
1037-1 1037-5	12	99,95	99,88	8	1959 1959	AN
1040-1 1040-6	24	100		2	1956 1956	AN
1062-1 1062-3	3	98,57	98,93	8	1956 1956	AN
331 1832	36	100		7	1962 1962	AN
352 1701	36	98,92	99,64	7	1944 1944	AN
367 1671	36	99,95	99,91	11	1968 1968	AN

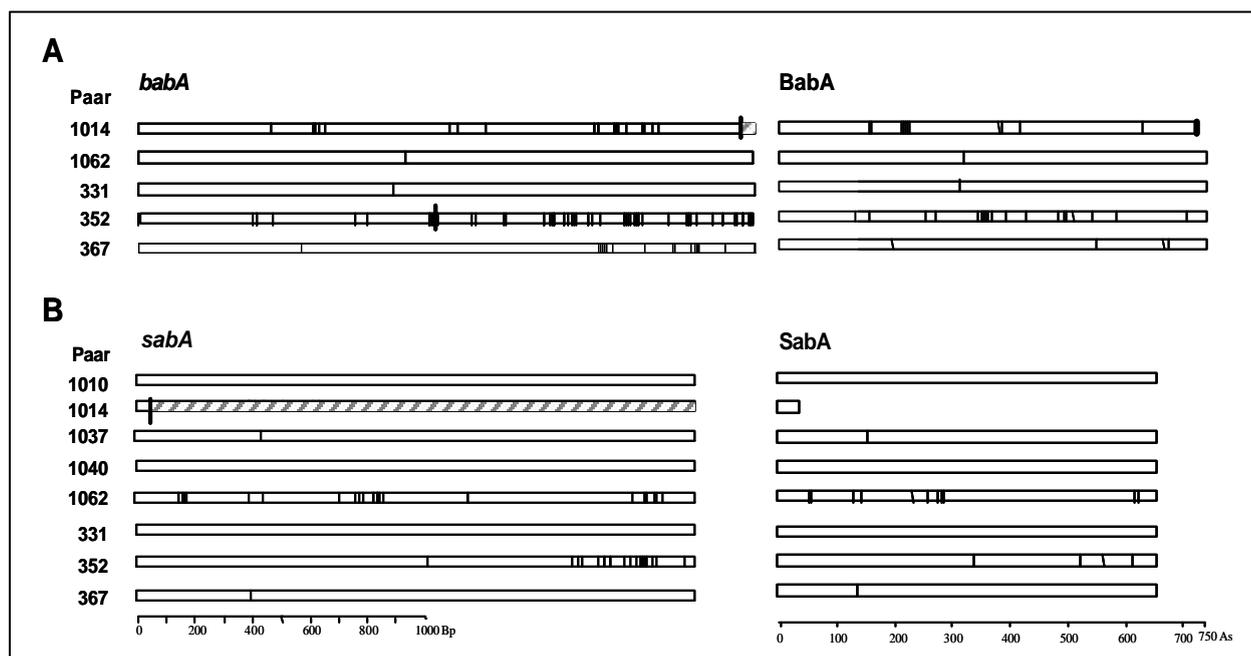


Abb. 17. Graphische Darstellung des paarweisen Vergleiches der *babA*- und *sabA*-Sequenzen der sequenziellen Isolate. (A) *babA*: 1. Gensequenzen, 2. abgeleitete Proteinsequenzen; (B) *sabA*: 1. Gensequenzen, 2. abgeleitete Proteinsequenzen. Als Referenzsequenz wurden die Sequenzen des jeweiligen ersten Isolates verwendet. Einheitlich weiße Balken stellen identische Sequenzen der Stämme eines Paares dar. Schwarze Linien repräsentieren die Position von Polymorphismen bzw. Aminosäureaustausche, die sich innerhalb eines Paares im zweiten Isolat im Vergleich zum ersten Isolat entwickelt haben. Vergrößerte vertikale Linien repräsentieren Insertions-/Deletionsereignisse und vergrößerte vertikale Linien vor schraffierten Linien zeigen vorzeitige Stoppcodons an. Verkürzte Balken weisen auf verkürzte Proteine im zweiten Isolat hin. Die Darstellungen der Gensequenzen erfolgte mit dem Programm Haplot und die der Aminosäuresequenzen wurde manuell angefertigt.

#### 4.2.2. Bestimmung synonymer und nicht-synonymer Substitutionsraten von *babA*, *sabA* und Housekeeping-Genen der sequenziellen Isolate

Bei den Adhäsinen BabA und SabA handelt es sich um äussere Membranproteine von *H. pylori*, die direkt mit Wirtszellstrukturen interagieren und direkt der Immunerkennung und den Immunantworten des Wirtes ausgesetzt sind. Eine strukturelle und funktionelle Variabilität dieser Proteine stellt vermutlich im Rahmen von Adaptationsprozessen während der Infektion einen selektiven Vorteil dar. Im Gegensatz hierzu kodieren Housekeeping-Gene für Stoffwechseleenzyme, deren Funktion für die Vitalität und Replikation der Bakterienzelle essentiell ist. Die OMPs unterliegen demzufolge höchstwahrscheinlich anderen Selektionsdrücken als die Stoffwechselproteine. Um die evolutionären Kräfte, die auf die Adhäsion-kodierenden Gene und auf die Housekeeping-Gene wirken, zu verstehen, wurden die synonymen (stillen) Mutationen und nicht-synonymen (die Aminosäuresequenz verändernde) Mutationen in den beiden Genklassen untersucht.

##### 4.2.2.1. Anzahl an Sequenzpolymorphismen in *babA*, *sabA* und Housekeeping-Genen

Zunächst wurde die Gesamtanzahl an Sequenzpolymorphismen, sowie die Anzahl an synonymen und nicht synonymen Polymorphismen in *babA*, *sabA* und Housekeeping-Genen der sequenziellen Isolate bestimmt. Hierzu wurden die Sequenzen von sieben, ca. 500 Bp langen, zentralen Housekeeping-Genfragmenten (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*) der Isolate verwendet, die in einer vorhergehenden Studie von Falush *et al.* (2001) veröffentlicht wurden. Die Anzahl an SNPs wurde um einen für die gesamten *babA*- und *sabA*-Sequenzen sämtlicher Isolate (26805 Bp) und zum anderen für die gesamten Housekeeping Gensequenzen aller Stämme (27232 Bp) bestimmt.

Die Gesamtanzahl an SNPs war in den Adhäsion-kodierenden Genen (6,03 SNPs/1 kB) 1,5 fach höher als in den Housekeeping Genen (3,9 SNPs/1 kB) (Tab. 15). Im Unterschied zu den synonymen Mutationen, deren Anzahl in den *babA/sabA* Sequenzen und den Housekeeping-Genen vergleichbar war (*babA/sabA*: 3,88/1 kB; Housekeeping Gene: 3,05/1 kB), wiesen die OMP-kodierenden Gene im Vergleich zu den Housekeeping-Genen eine 2,7 fach höhere Anzahl an nicht-synonymen SNPs auf. Das deutlich erhöhte Auftreten synonymer und besonders nicht-synonymer Polymorphismen in den Adhäsion-kodierenden Genen reflektiert vermutlich im Vergleich zu den Stoffwechsel-Genen einen höheren diversifizierenden Selektionsdruck auf BabA und SabA.

**Tab. 15. Anzahl an SNPs in den von allen sequenziellen Isolaten zusammengefassten *babA/sabA*- und Housekeeping-Gen-Sequenzen.**

<b>Genklasse</b>	<b>ges. SNPs/ 1 kB</b>	<b>synonyme SNPs/ 1 kB</b>	<b>nicht-synonyme SNPs / 1 kB</b>
<i>babA/sabA</i> (26805 Bp)	6,03	3,88	2,15
Housekeeping- Gene (27232 Bp)	3,9	3,05	0,81

#### **4.2.2.2. Bestimmung gemittelter synonymer und nicht-synonymer Substitutionsraten von *babA*, *sabA* und Housekeeping-Genen**

Eine Möglichkeit, die molekulare Evolution Protein-kodierender Gene zu analysieren ist, die Rate synonyme und nicht-synonymer Substitution zu vergleichen (Kimura, 1983a; Ohta, 1993). Da synonyme (stille) Mutationen weitgehend unsichtbar für natürliche Evolution sind und nicht-synonyme (die Aminosäuresequenz verändernde) Mutationen unter hohem Selektionsdruck sein können, stellt der Vergleich der Fixierungsrate dieser beiden Mutationstypen eine wirksame Methode zur Untersuchung des Effektes von natürlicher Selektion auf ein Protein dar.  $K_s$  gibt die Anzahl synonyme Nukleotidsubstitutionen pro synonyme Position an, die, unter der Annahme, dass synonyme Substitutionen einen geringen oder keinen Effekt auf die Fitness haben, auch als neutrale Nukleotid-Substitutionsrate bezeichnet wird.  $K_a$  gibt die Anzahl nicht-synonymer Nukleotidsubstitutionen pro nicht-synonymer Position an. Ein Verhältnis der Substitutionsraten ( $K_a/K_s$ ) von größer 1 bedeutet, dass nicht-synonyme Mutationen dem Protein/Individuum einen Fitnessvorteil verschaffen und eine höhere Fixierungswahrscheinlichkeit als synonyme Mutationen besitzen. Eine Regel besagt, dass Gene, für die ein gemittelter  $K_a/K_s$ -Quotient aller Kodonpositionen von größer 1 berechnet wird, einer positiven (diversifizierenden, adaptiven) Selektion unterliegen. Dieses Kriterium wird üblicherweise angewendet, obwohl es für die Detektion von Proteinen unter positiver Selektion sehr stringent ist (Akashi, 1999). Ein Quotient von 1 würde demnach neutrale Evolution anzeigen, da die Rate der Entwicklung synonyme und nicht-synonymer Mutationen gleich ist, während ein Quotient von kleiner 1 angibt, dass sich nicht-synonyme Substitutionen langsamer entwickeln und das Protein einem negativen (reinigenden) Selektionsdruck unterliegt.

Für die Berechnung des  $K_a/K_s$ -Quotienten von *babA*, *sabA* und Housekeeping-Genen der sequenziellen Isolate wurden die *babA*- und *sabA*-Nukleotidsequenzen sämtlicher Isolate zunächst aliniert, da die Sequenzen unterschiedliche Längen aufwiesen. Anschliessend wurde jeweils ein multiples Alignment für alle *babA*- und *sabA*-Sequenzen erstellt. Die *sabA*-Sequenz des zweiten Isolates vom Paar LSU1014 wurde aufgrund des vorzeitigen Stoppkodons am 5'-Terminus von der Analyse ausgeschlossen. Die Housekeeping-Gensequenzen der Isolate wurden, wie bereits erwähnt, aus der vorhergehenden Studie

von Falush *et al.* (2001) verwendet. Hierzu wurden die Nukleotidsequenzen der ca. 500 Bp langen Genfragmente (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*) für jeden Stamm zu einer Sequenz zusammengefasst (3406 Bp) und ein multiples Alignment erstellt. Diese Sequenzen enthielten weder Insertionen noch Deletionen. Zusätzlich wurden für die Bestimmung der Substitutionsraten *babA*- und *sabA*-Sequenzen von unverwandten Stämmen herangezogen. Für *babA* wurden zehn weitere Stämme (26695, J99 und acht weitere Stämme) und für *sabA* wurden sieben weitere Stämme (J99, HPAG1 und fünf der Genbank entnommene Sequenzen AB244084, AB244083, AB244072, AB244071 und AB244070) in den Vergleich einbezogen (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Hennig *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006). Die Berechnung der  $K_s$ - und  $K_a$ -Raten erfolgte mit dem Programm SWAAP (vgl. 3.6.) basierend auf der Methode von Nei & Gojobori (1986), die die Formel von Jukes und Cantor (1969) für die Korrektur von multiplen Substitutionen an derselben Position verwendet. Komplexe polymorphe Position bzw. Regionen werden hierbei nicht eliminiert.

Die  $K_s$ -Werte von *babA* und *sabA* waren um das zweifache bzw. 1,5-fache höher als die der Housekeeping-Gene (*babA*: 0,3278, *sabA*: 0,2429, Housekeeping-Gene: 0,1602) (Tab. 16). Die Adhäsine wiesen ausserdem im Vergleich zu den Housekeeping-Genen 8,5-fach und fünffach höhere  $K_a$  Werte auf, (*babA*: 0,0836, *sabA*: 0,0605, Housekeeping-Gene: 0,0098). Folglich war der  $K_a/K_s$ -Quotient von *babA* und *sabA* um das vierfache höher als der Quotient der Housekeeping-Gene (*babA*: 0,255, *sabA*: 0,2491, Housekeeping-Gene: 0,0613). Die synonymen und nicht-synonymen Substitutionsraten von *babA* der ausschließlich nicht verwandten Stämme entsprachen denen der *babA*-Gene der sequenziellen Isolate. Die Ergebnisse deuten zwar daraufhin, dass die Fixierungsrate synonymen und besonders nicht-synonymer Mutationen in den Adhäsingenen höher ist als in den Housekeeping-Genen, die Proteine beider Genklassen unterliegen jedoch nach oben genanntem Kriterium einer negativen Selektion, da der  $K_a/K_s$ -Quotient deutlich unter 1 liegt.

**Tab. 16. Gemittelte synonyme ( $K_s$ ) und nicht-synonyme ( $K_a$ ) Substitutionsraten von *babA*, *sabA* und Housekeeping-Genen der sequenziellen Isolate, sowie von *babA* von zehn unverwandten Stämmen und von *sabA* von sieben unverwandten Stämmen (Tomb *et al.*, 1997, Alm *et al.*, 1999, Hennig *et al.*, 2006, Oh *et al.*, 2006).**

Gene	$K_s$ (STD)	$K_a$ (STD)	$K_a/K_s$	$K_s/K_a$
<i>babA</i> <sup>a</sup>	0,3278 (0,1235)	0,0836 (0,0359)	0,255	3,92
<i>sabA</i> <sup>a</sup>	0,2429 (0,0797)	0,0605 (0,0216)	0,2491	4,02
Housekeeping-Gene	0,1602 (0,0459)	0,0098 (0,0031)	0,0613	16,35
<i>babA</i> <sup>b</sup>	0,3416 (0,0727)	0,0858 (0,0202)	0,2512	3,98
<i>sabA</i> <sup>b</sup>	0,2089 (0,0888)	0,0582 (0,0159)	0,2787	3,59

<sup>a</sup> *babA*- und *sabA*-Sequenzen der sequenziellen Isolate; <sup>b</sup> *babA*- und *sabA*-Sequenzen unverwandter Isolate; Abkürzung: STD, Standardabweichung

#### 4.2.2.3. Bestimmung synonymer und nicht-synonymer Substitutionsraten einzelner Aminosäure-Positionen von *babA*, *sabA* und Housekeeping-Genen

Da vermutlich ein grosser Anteil an Aminosäuren in vielen Proteinen aufgrund struktureller und funktioneller Einschränkungen unveränderlich ist und adaptive Evolution nur wenige Aminosäuren betrifft, wird in diesen Fällen, auch wenn positive Selektion stattgefunden hat, der über alle Kodon-Positionen gemittelte  $K_a/K_s$ -Quotient nicht höher als 1 sein. Um zu berücksichtigen, dass verschiedene Regionen der BabA- und SabA-Proteine heterogenen Selektionsdrücken unterliegen können, wurden mit dem Programm SWAAP sogenannte „sliding window“-Berechnungen durchgeführt. Die Analyse basiert auf einem abschnittswisen, paarweisen Sequenzvergleich mit einer bestimmten Kodon-Anzahl (window), in diesem Fall 45 Nukleotide, wobei der Sequenzabschnitt von 45 Basen um die zu bestimmende Kodon-Anzahl (hier 1) auf der Gensequenz weiterschoben wird. Die  $K_a/K_s$ -Quotienten werden als Mittelwerte für die einzelnen Fenster angegeben.

Anhand dieser, im Vergleich zu gemittelten Substitutionsraten sensitiveren Berechnung, liessen sich in *babA* und *sabA* Regionen nachweisen, die einen  $K_a/K_s$ -Quotient von grösser als 1 aufwiesen (Abb. 18). Für den 5'-Bereich vom Startcodon bis ca. 400 Bp, sowie für den 3' Bereich ab 1300 Bp bis zum Stoppcodon des *babA*-Gens sequenzieller Isolate wurden  $K_a/K_s$ -Quotienten berechnet, die fast durchgehend unter 0,25 lagen (Abb. A1) und vermutlich einer hohen negativen Selektion unterliegen. Die zentrale Genregion zwischen 400 und 1300 Bp hingegen beinhaltet mehrere kurze Domänen mit einem  $K_a/K_s$ -Quotienten von grösser als 1, die darauf hindeuten, dass sich die Aminosäuren in diesen Bereichen unter einem hohen adaptiven Selektionsdruck entwickeln. Die Domänen waren von Abschnitten unterbrochen, in denen der  $K_a/K_s$  Quotient kleiner als 1 und bei ca. 800, 1000 und 1250 Bp gleich 0 war. Da die sequenziellen Stämme genetisch nah verwandte Isolate bzw. Sequenzen beinhalten und die evolutionäre Zeit bzw. die Zeit seit der Divergenz der Sequenzen eine entscheidende Rolle für das Vorkommen von Substitutionen spielt, wurden die „sliding window“-Analysen auch mit den Sequenzen der Adhäsion-kodierenden Gene der unverwandten Isolate durchgeführt. Die unterschiedlichen Stammgruppen weisen für beide Gene eine ähnliche Variation des  $K_a/K_s$ -Quotienten auf (Abb. A2). Es zeigte sich eine Übereinstimmung der sequenziellen und unverwandten Isolate an Positionen, mit sehr geringen  $K_a/K_s$ -Verhältnissen (0-0,1), die Genbereiche mit  $K_a/K_s$ -Verhältnissen von grösser 1 voneinander trennten. Aus dieser übereinstimmenden Variation der  $K_a$ - und  $K_s$ -Raten der beiden unterschiedlichen Stammgruppen lässt sich schliessen, dass die ermittelten BabA-Regionen, die einem stark negativen Selektionsdruck unterliegen, sehr wahrscheinlich Gen- bzw. Protein-spezifisch sind. Die Aminosäuren im N- und C- Terminus von BabA, sowie Aminosäuren an bestimmten Positionen in der zentralen Region sind vermutlich aufgrund funktioneller und struktureller Einschränkungen konserviert ( $K_a/K_s$  Quotienten  $< 1$ ), während an anderen bestimmten Positionen im zentralen Bereich die Aminosäuren einem neutralen bis diversifizierenden Selektionsdruck unterliegen.

Für *sabA* wurden ebenfalls in der gesamten 5′- (Genstart – 350 Bp) und 3′-Region (850 Bp – Genende)  $K_a/K_s$ -Quotienten von kleiner 1 detektiert (Abb. B1, B2). Die sequenziellen Isolate und die unverwandten Stämme weisen auch eine ähnliche Variation des  $K_a/K_s$ -Quotienten von *sabA* auf. Der variable Bereich zwischen 350 und 850 Bp, der um ca. 400 Bp kürzer ist als der von *babA*, weist mehrere kurze Bereiche mit einem  $K_a/K_s$ -Quotienten grösser 1 auf, die in Übereinstimmung zu *babA* durch hochkonservierte Regionen ( $K_a/K_s$ -Quotient kleiner als 0,5) voneinander separiert sind. Die Position des zentralen Bereichs von *babA* und *sabA*, der Abschnitte mit hohen  $K_a/K_s$ -Quotienten von grösser 1 beinhaltet, stimmt mit der Position des variablen Bereichs in multiplen BabA- und SabA-Sequenz-Alignments der sequenziellen Isolate überein (Anhang: Abb. A3, A4).

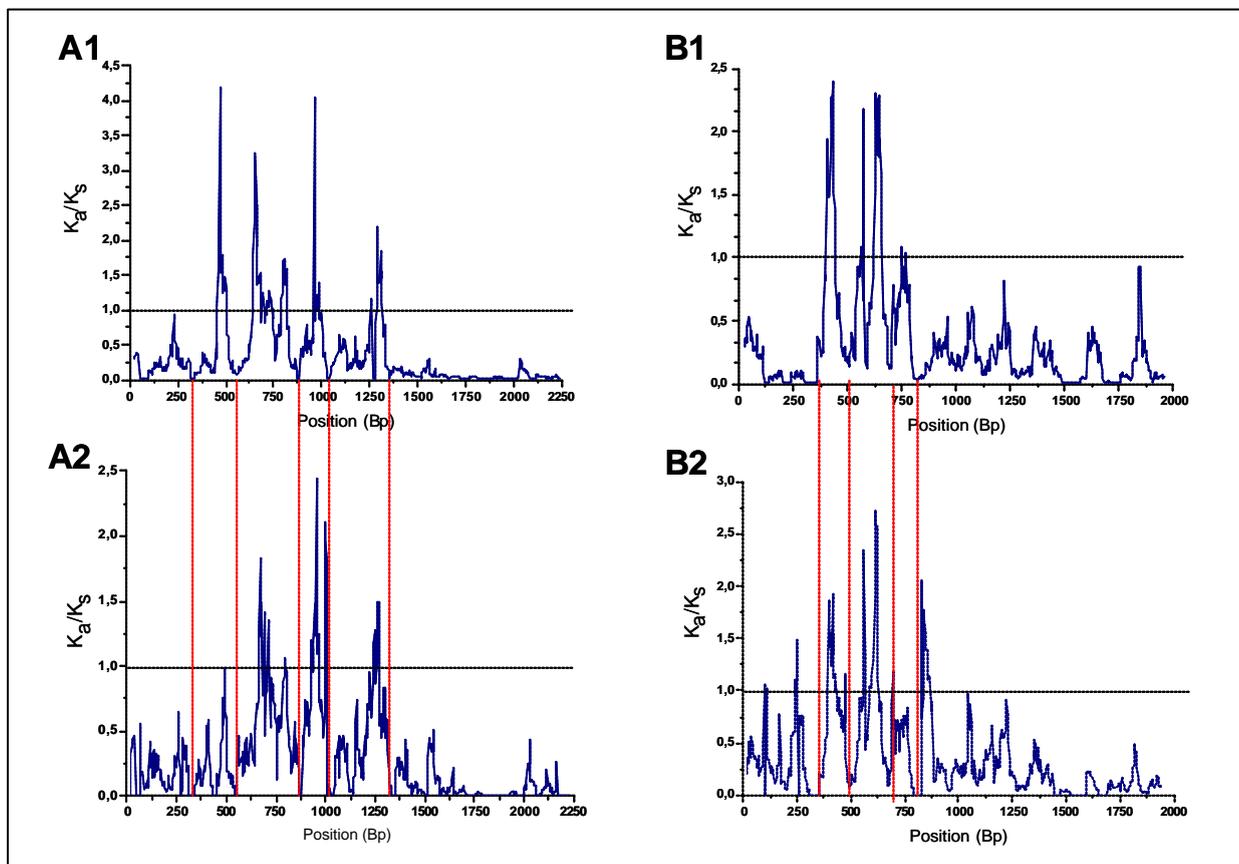
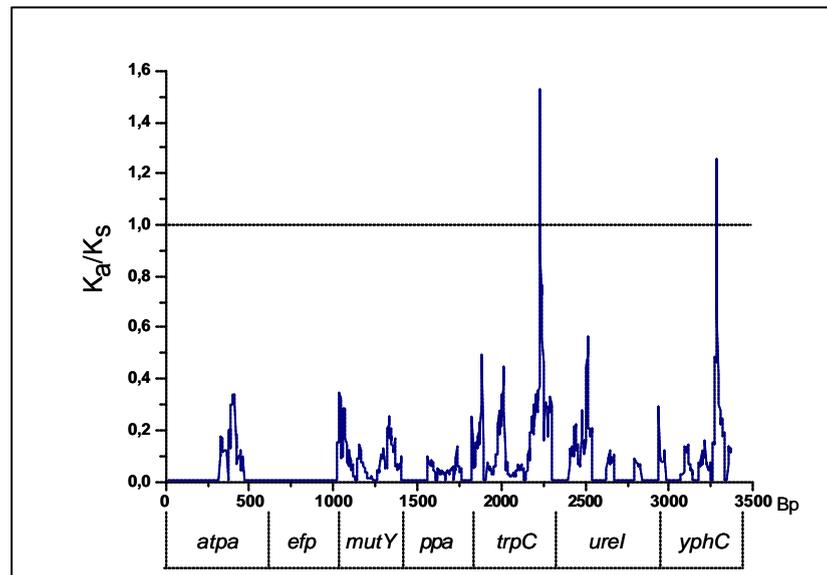


Abb. 18. Variation der  $K_a/K_s$ -Raten über (A1) *babA* sequenzieller Isolate, (A2) *babA* unverwandter Stämme, (B1) *sabA* sequenzieller Isolate und (B2) *sabA* unverwandter Stämme („sliding window“ Analyse). Die  $K_a/K_s$ -Quotienten sind als Mittelwerte der 45-Nukleotid-Fenster dargestellt. Die horizontale, graue Linie markiert ein  $K_a/K_s$ -Verhältnis von 1 (neutrale Selektion). Die vertikalen, roten Linien markieren einige der Bereiche von *babA* und *sabA*, die starker negativer Selektion unterliegen und deren Position in den sequenziellen und unverwandten Isolaten übereinstimmt.

Die  $K_a/K_s$  Quotienten von fünf der sieben analysierten Housekeeping-Genfragmente (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *ureI*) waren durchgehend geringer als 0,6 (Abb. 19). Die Fragmente der Gene *trpC* und *yphC* wiesen jeweils einen Peak mit einem  $K_a/K_s$ -Quotient grösser als 1 auf.



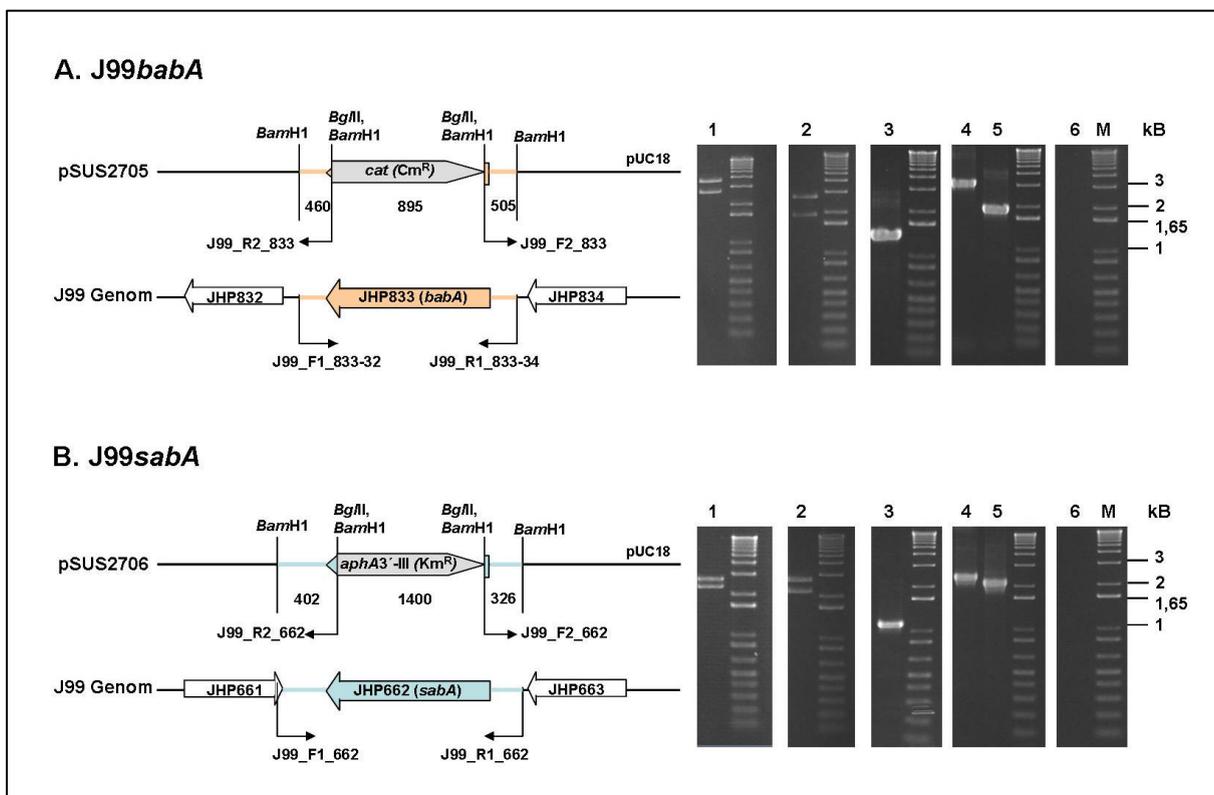
**Abb. 19. Variation der  $K_a/K_s$ -Quotienten der Housekeeping-Genfragmente der sequenziellen Isolate.** („sliding window“ Analyse). Die  $K_a/K_s$ -Quotienten sind als Mittelwerte der 45-Nukleotid-Fenster dargestellt. Die horizontale, graue Linie markiert einen  $K_a/K_s$ -Verhältnis von 1 (neutrale Selektion).

#### 4.2.3. Herstellung isogener *babA*- und *sabA*-Knockout-Mutanten

Für die im nächsten Abschnitt beschriebenen Adhärenz-Experimente von *H. pylori* an die Histo-Blutgruppen-Antigene Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> wurden isogene Knockout-Mutanten des Wildtypstamms J99 hergestellt. J99 bindet gut an Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und die für die Bindung verantwortlichen Adhäsine BabA bzw. SabA wurden durch allelischen Austausch und Insertion einer Resistenzkassette in das jeweilige Zielgen ausgeschaltet (Mahdavi *et al.*, 2002; Solnick *et al.*, 2004). Der J99-Wildtypstamm und die konstruierten J99*babA*-, J99*sabA*- und J99*babAsabA*-Knockout-Mutanten dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle für die Bindungsassays.

Hierzu wurden zunächst die Zielgene *babA* und *sabA* mit flankierenden Primern (*babA*: J99\_F1\_833-32 und J99\_R1\_833-34; *sabA*: J99\_F1\_662 und J99\_R1\_662), die *Bam*H1-Erkennungssequenzen enthielten, amplifiziert und jeweils in die „multiple cloning site“ des mit *Bam*H1 linearisierten Vektors pUC18 (2,7 kB) kloniert (Abb. 20). Hieraus ergaben sich die Plasmide pSUS2703 und pSUS2704. Die Insertgröße von pSUS2703 (*babA* plus flankierende Sequenz) betrug 3,2 kB und die von pSUS2706 (*sabA* plus flankierende Sequenz) 2,4 kb. Diese Plasmide dienten dann als Matrize für eine inverse PCR, um die zentrale Region des Zielgens zu deletieren und Erkennungssequenzen für

Restriktionsenzyme einzufügen. Die Primer, die diese Erkennungssequenzen beinhalten, wurden so gewählt, dass die kodierenden Sequenzen von *babA* und *sabA* durch die inverse Amplifikation fast vollständig deletiert wurden, so dass die Rekombination über die flankierenden Sequenzen erfolgt. Die inverse PCR erfolgte mit Primern, denen für *babA* und *sabA* *Bgl*III-Erkennungssequenzen angehängt wurden (*babA*: J99\_F2\_833 und J99\_R2\_833; *sabA*: J99\_F2\_662 und J99\_R2\_662). Die invers amplifizierten Vektoren wurden mit *Bgl*III geschnitten und mit der *Bam*H1 geschnittenen Chloramphenicol- (*babA*) und Kanamycin-Resistenzkassette (*sabA*) ligiert. Die resultierenden Plasmide pSUS2705 und pSUS2706 wiesen eine Insertgröße von 1,8 kB und 2,1 kB auf. *H. pylori* wurde mit den Plasmiden pSUS2705 und pSUS2706 natürlich transformiert. Die Konstruktion einer J99*babAsabA*-Mutante erfolgte durch natürliche Transformation von J99*babA* mit pSUS2706. Die korrekte Insertion der Resistenzkassetten in das Genom von J99 wurde durch PCR mit dem Zielgen flankierenden, *babA*- und *sabA*-spezifischen Primern, sowie für die Resistenzkassetten spezifischen (*pcat1*, *pcat2*; Km1, Km2) Primern kontrolliert. Weiterhin wurde eine PCR mit pUC18-spezifischen Primern (M13for und M13rev) durchgeführt, um eine mögliche Integration des gesamten Plasmides in das Genom durch „single-crossover“ auszuschließen.



**Abb. 20 (vorherige Seite). Konstruktion isogener *babA*- und *sabA*-Knockout-Mutanten im J99 Wildtypstamm.**

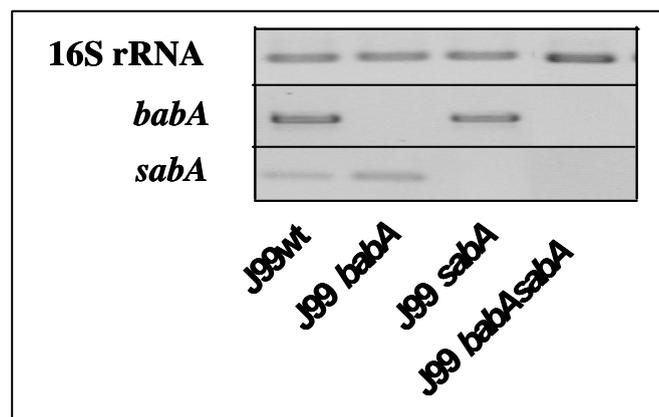
**A. J99*babA***

Spur 1: pSUS2703 + *Bam*H1  
 2: pSUS2705 + *Bam*H1  
 3: J99*babA*: PCR mit J99\_F1-833-32 und *pcat2*  
 4: J99wt: PCR mit J99\_F1\_833-32 und J99\_R1\_833-34  
 5: J99*babA*: PCR mit J99\_F1\_833-22 und J99\_R1\_833-34  
 6: J99*babA*: PCR mit M13for, M13rev  
 M: Marker

**B. J99*sabA***

Spur 1: pSUS2704 + *Bam*H1  
 2: pSUS2706 + *Bam*H1  
 3: J99*sabA*: PCR mit J99\_R1\_662 und *Km1*  
 4: J99wt: PCR mit J99\_F1\_662 und J99\_R1\_662  
 5: J99*sabA*: PCR mit J99\_F1\_662 und J99\_R1\_662  
 6: J99*sabA*: PCR mit M13for, M13rev  
 M: Marker

Eine weitere Kontrolle der konstruierten J99*babA*-, J99*sabA*- und J99*babAsabA*-Mutanten erfolgte durch semiquantitative RT-PCR, die eine Amplifikation von 16S rRNA, *babA*- und *sabA*-Fragmenten mit spezifischen Primern von der cDNA der Mutanten beinhaltete. Von der cDNA des Stamms J99*babA* und J99*sabA* konnte kein *babA*- bzw. *sabA*-Fragment amplifiziert werden und von der cDNA der Doppelmutante J99*babAsabA* liessen sich weder mit *babA*- noch mit *sabA*-spezifischen Primern PCR-Produkte erzielen, wodurch die korrekte Integration der Resistenzkassetten in die Genome zusätzlich bestätigt wurde (Abb. 21).



**Abb. 21. Expressionsanalysen von *babA* und *sabA* der Stämme J99wt, J99*babA*, J99*sabA* und J99*babAsabA* mittels semiquantitativer RT-PCR.** Dargestellt sind die von der cDNA der unten aufgeführten Stämme spezifisch amplifizierten PCR-Produkte. Auf der linken Seite sind die Gene angegeben.

#### 4.2.4. Untersuchungen zur Expression von *babA* und *sabA* sequenzieller Isolate mittels semiquantitativer RT-PCR

Innerhalb von fünf sequenziellen Paaren fanden sich allelische Unterschiede in der *babA*- und *sabA*-Gensequenz, die zu Veränderungen der Proteinsequenz führten. Die Isolate von drei Paaren wiesen identische *sabA*-Sequenzen auf. Da der Effekt der genetischen Diversität auf die Adhärenzeigenschaften der Adhäsine analysiert werden sollte und die Bindungseigenschaften der Adhäsine ebenfalls durch variierende Expressionsniveaus beeinflusst werden können, wurde zunächst die Expression von *babA* und *sabA* untersucht. Die Expressionsanalyse von *babA* und *sabA* erfolgte durch die Bestimmung der Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR, die zwar den Nachweis kleinster mRNA-Mengen ermöglicht, jedoch nur eine grobe Quantifizierung der Transkriptmengen erlaubt. *H. pylori* wurde hierzu in Flüssigkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5-2 kultiviert. Die OD<sub>600</sub> variierte innerhalb eines Paares um maximal 0,4. Von der cDNA der Isolate wurden 16S rRNA, *babA*- und *sabA*-Fragmente anhand einer Standard-PCR mit einer Anzahl von 16, 28 bzw. 30 Zyklen amplifiziert. Als interne Kontrolle vergleichbarer cDNA-Mengen innerhalb der Stammpaare wurde das 16S rRNA-Gen verwendet, dessen Transkriptmenge innerhalb sämtlicher Paare gleich war.

Das jeweils erste und zweite Isolat der Paare LSU1014, NQ331 und NQ352 wies für *babA* und *sabA* Banden gleicher Intensität auf. Dies deutet auf eine gleiche mRNA-Menge und gleiche Expressionsniveaus der Adhäsinkodierenden Gene innerhalb dieser Paare hin (Abb. 22). Die Höhe der Expression von *sabA* war innerhalb des Paares LSU1040 ebenfalls gleich. *babA* und *sabA* wurden im ersten (NQ367) und zweiten (NQ1671) Isolat des Paares NQ367 exprimiert, jedoch war die Transkriptmenge der beiden Gene in NQ1671 höher als in NQ367. *sabA*-cDNA wurde weiterhin in den Stämmen der Paare LSU1010 und LSU1037 nachgewiesen, die mRNA-Menge war im ersten Isolat (LSU1010-1) vom Paar LSU1010 deutlich geringer als im zweiten (LSU1010-3) und auch deutlich geringer im zweiten Stamm (LSU1037-5) des Paares LSU1037 im Vergleich zum ersten Isolat (LSU1037-1). *babA* und *sabA* wurden vermutlich in dem Stamm LSU1062-1 nicht exprimiert, da sich auch nach einer Erhöhung der Zyklenanzahl auf 35 keine Fragmente dieser Gene von der cDNA des Stamms amplifizieren liessen. Für das zweite Isolat LSU1062-3 des Paares hingegen wurde eine Bande für *babA*, sowie eine sehr schwache Bande für *sabA* nachgewiesen. Bei den Stämmen der Paare LSU1010, LSU1037 und LSU1040 handelte es sich sehr wahrscheinlich *babA*-negative Isolate. Wie bereits erwähnt konnte an genomischer DNA das Gen nicht amplifiziert werden (vgl. 4.2.1.) und demzufolge konnten ebensowenig *babA*-Fragmente von der cDNA dieser Isolate gewonnen werden.

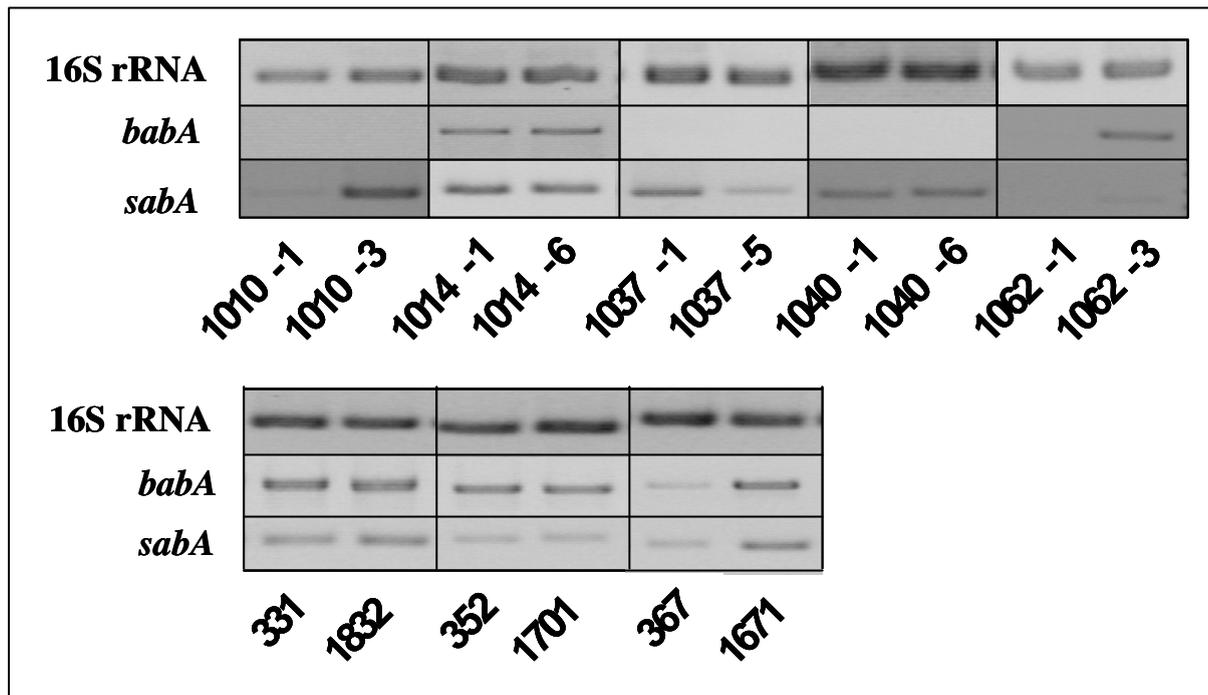


Abb. 22. Expressionsanalysen von *babA* und *sabA* der sequenziellen Isolate mittels semiquantitativer RT-PCR. Dargestellt sind die von der cDNA der unten aufgeführten sequenziellen Isolate spezifisch amplifizierten PCR-Produkte. Auf der linken Seite sind die Gene angegeben.

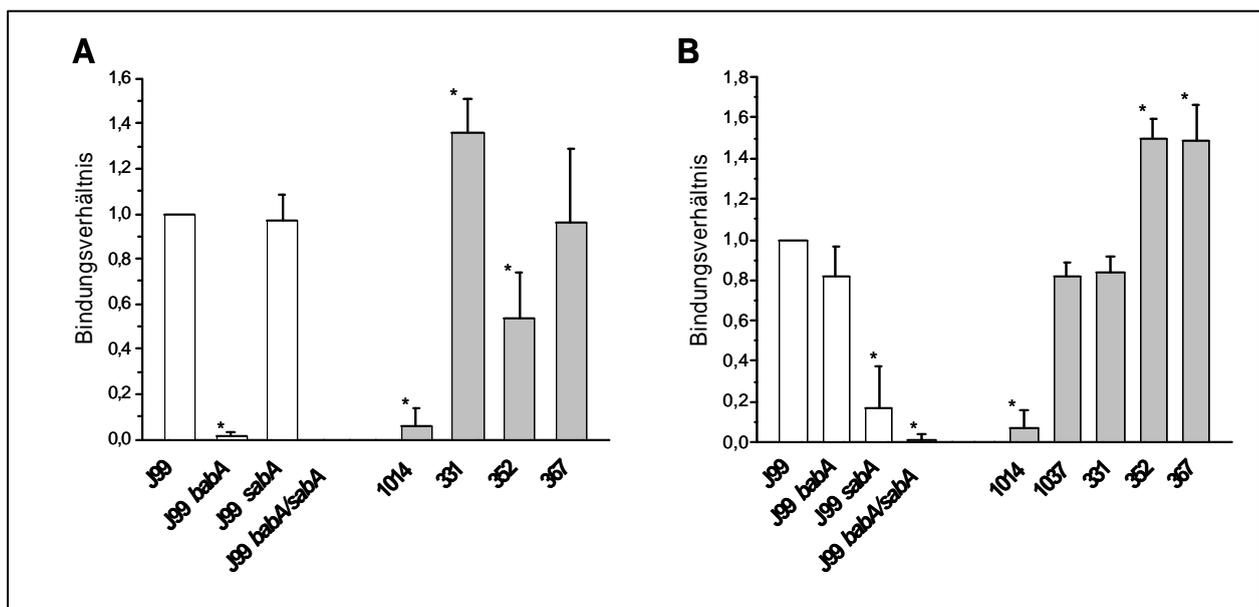
#### 4.2.5. Untersuchungen zur Adhärenz sequenzieller Isolate an Lewis<sup>b</sup> und Sialyl-Lewis<sup>x</sup>

Die Bindung von *H. pylori* an Lewis<sup>b</sup> (Le<sup>b</sup>) und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) wird durch die Adhäsine BabA bzw. SabA vermittelt und kann stammspezifische Unterschiede aufweisen. J99 beispielsweise bindet an beide Rezeptoren, 26695 hingegen weder an Le<sup>b</sup> noch an sLe<sup>x</sup> (Ilver *et al.*, 1998; Pride *et al.*, 2001; Aspholm *et al.*, 2006). Ob *H. pylori* während der Infektion Änderungen der Bindungseigenschaften an die Blutgruppen-Antigene entwickelt, wurde durch die Bestimmung der Adhärenz der sequenziellen Isolate an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> untersucht. Die unter 4.2.1. beschriebenen Änderungen der Proteinsequenz bzw. -struktur von BabA und SabA, die sich durch Rekombinations- und Mutationsereignisse innerhalb der sequenziellen Stammpaare entwickelt haben, könnten die Bindungseigenschaften der Adhäsine beeinflussen. Um einen möglichen Effekt der genetischen Diversität der Adhäsine-kodierenden Gene zu untersuchen, wurde die Bindung der Isolate an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> analysiert und mit den Ergebnissen der Proteinsequenzen und Expressionsanalysen verglichen. Für die Bestimmung der Bindungseigenschaften wurde ein *in vitro* Glykoprotein-Bindungsassay entwickelt. Hierfür werden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit den semisynthetischen Glykoproteinen Le<sup>b</sup>-HSA bzw. sLe<sup>x</sup>-HSA beschichtet und mit den entsprechenden (lebenden) Isolatn inkubiert (vgl. 3.4.1.). Als Positivkontrolle wurde der Wildtypstamm J99 verwendet und als Negativkontrollen die Mutanten J99*babA*, J99*sabA* und

*J99babAsabA*. Die Isolate, die im Vergleich zur Negativkontrolle BSA einen Adhärenz-Quotienten von mindestens 2 aufwiesen, wurden als adhärent betrachtet. Die Adhärenz der J99-Mutanten wurde in Relation zum Wildtyp berechnet und die Bindung der Isolate eines Stammpaares ist als Verhältnis der OD<sub>450</sub> vom zweiten zum ersten Stamm angegeben (Abb. 23). Die Signifikanz der Bindungsunterschiede innerhalb eines Paares und zwischen den J99-Knockout-Mutanten und dem Wildtypstamm J99 wurden mit dem t-Test oder dem Mann-Whitney-Rangsummentest ermittelt.

*J99babA* verlor die Eigenschaft, an den BabA-Rezeptor Le<sup>b</sup> (0,011) zu adhären, während die Bindung an sLe<sup>x</sup> nicht signifikant verändert war (0,821) (Abb. 23 A,B). Die Inaktivierung von *sabA* in J99 führte zu einer signifikant verringerten Adhärenz an den SabA-Rezeptor sLe<sup>x</sup> (0,175) und die Bindung an Le<sup>b</sup> (0,972) war vergleichbar zu der des Wildtyps J99. Die Doppelmutante *J99babAsabA* wies weder eine Bindung an Le<sup>b</sup> (0) noch an sLe<sup>x</sup> auf (0,015). Jeweils drei Paare zeigten signifikante Veränderungen der Bindung an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> und zwei Paare wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Adhärenz an sLe<sup>x</sup> auf. Das erste Isolat des Paares LSU1014 (LSU1014-1) war *babA*- und *sabA*-positiv und adhärierte gut an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup>. Das zweite Isolat (LSU1014-6), welches 24 Monate später entnommen wurde, verlor die Fähigkeit der Bindung an beide Rezeptoren und wies für Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> ein Bindungsverhältnis auf, das mit dem der Negativkontrollen vergleichbar war (Le<sup>b</sup>: 1014-6: 0,059; *J99babA*: 0,011; sLe<sup>x</sup>: 1014-6: 0,069; *J99sabA*: 0,169). Die Expressionsniveaus von *babA* und *sabA* waren in LSU1014-1 und LSU1014-6 gleich. Die beiden Stämme unterschieden sich jedoch durch mehrere Aminosäureaustausche in ihrer BabA-Sequenz und das zweite Isolat wies zudem ein um sieben Aminosäuren kürzeren BabA-C-Terminus auf. Der Verlust der Bindung des Isolates LSU1014-6 an sLe<sup>x</sup> ist sehr wahrscheinlich auf das vorzeitige Stoppcodon im 5' Terminus von *sabA* zurückzuführen, das zu einem verkürzten SabA-Adhäsine führte (vgl. 3.4.1.). Die Adhärenzeigenschaften der Stämme des Paares NQ352, die in einem Abstand von 36 Monaten entnommen wurden, unterschieden sich ebenfalls deutlich. Das zweite Isolat (NQ1701) adhärierte im Vergleich zum ersten Stamm signifikant verringert an Le<sup>b</sup> (0,452), wobei die Bindung deutlich höher war als die der Negativkontrollen *J99babA* (0,011) und *J99babAsabA* (0). Die Adhärenz von NQ1701 an sLe<sup>x</sup> war verglichen mit der des ersten Isolates NQ352 signifikant erhöht (1,5). Die *babA*- und *sabA*-Transkriptmengen waren in beiden Isolaten vergleichbar. Die Adhäsine wiesen im zweiten Stamm des Paares zahlreiche Aminosäureaustausche im BabA-Protein und mehrere Aminosäureaustausche im SabA-Protein auf, die möglicherweise zu einer veränderten Le<sup>b</sup>- bzw. sLe<sup>x</sup>-Bindungsspezifität des Stamms NQ1701 führten. Die beiden Isolate des Paares NQ331, die in einem Intervall von 36 Monaten entnommen wurden, adhärierten an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup>. Während die Bindung des zweiten Isolates NQ1832 an Le<sup>b</sup> signifikant höher war (1,36) als die des ersten Isolates NQ331, wiesen beide Stämme keine signifikant unterschiedliche Adhärenz an sLe<sup>x</sup> auf (0,836). Die vergleichbare Bindung der Isolate an sLe<sup>x</sup> ist konsistent mit den den *sabA*-Sequenzergebnissen und Expressionsniveaus; beide Stämme besitzen identische *sabA*-Sequenzen und –Expressionsniveaus. Die höhere Adhärenz des Isolates NQ1832 an Le<sup>b</sup> könnte auf den einzelnen Aminosäureaustausch in der zentralen SabA-Region

zurückzuführen sein. Ebenfalls signifikant erhöht war die Bindung des zweiten, nach 36 Monaten entnommenen Isolats NQ1671 des Paares NQ367 an  $sLe^x$  (1,483). Der Grund hierfür könnte die nicht-synonyme Punktmutation im mittleren Bereich von *sabA* sein und/oder die deutlich höhere *sabA*-Transkriptmenge im Stamm NQ1671. Bis auf eine Ausnahme wurden für sämtliche Paare konsistente Ergebnisse mit dem Adhärenzassay erzielt: entweder adhärierte der erste oder zweite Stamm stärker an die Blutgruppen-Antigene, oder beide Isolate zeigten keine Unterschiede. Im Gegensatz hierzu konnten für das Paar NQ367 keine konsistenten Ergebnisse der Bindung an  $Le^b$  mit dem Adhärenzassay erzielt werden. Nach sieben unabhängigen Experimenten wiesen beide Isolate des Paares zwar stets eine Adhärenz an  $Le^b$  auf, die des ersten Stamms war jedoch entweder nicht verändert, höher oder geringer als die des ersten Stamms. Die Ursachen für diesen extrem instabilen Phänotyp sind nicht bekannt. Innerhalb des Paares LSU1037 gab es keine signifikanten Unterschiede in der Adhärenz an  $sLe^x$ . Das zweite Isolat (LSU1037-5) wies nur eine nicht signifikante verringerte Bindung (0,816) auf, obwohl die *sabA*-Transkriptmenge deutlich geringer war als im ersten Isolat (LSU1037-1) und sich die *SabA*-Sequenzen in einer Aminosäure unterschieden. Beide Stämme des Paares adhärten nicht an  $Le^b$ . Die Isolate von drei Paaren (LSU1010, LSU1040 und LSU1062) adhärten weder an  $Le^b$  noch an  $sLe^x$ . Da von den Paaren LSU1010 und LSU1040, sowie von LSU1037 das *babA*-Gen auch nicht amplifiziert werden konnte, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Isolate *babA*-negativ sind. Das erste (LSU1062-1) und zweite Isolat (LSU1062-3) des Paares LSU1062 besaß das *babA*- und *sabA*-Gen. Im Gegensatz zum Isolat LSU1062-3 wurden diese Gene in LSU1062-1 vermutlich nicht exprimiert, worauf der nicht adhärente Phänotyp basieren könnte. Obwohl der Stamm LSU1062-3 *babA* und *sabA* exprimiert und die Stämme der Paare LSU1010 und LSU1040 *sabA* exprimieren, wurde von diesen Isolaten keine Adhärenz an  $sLe^x$  detektiert.



**Abb. 23 (vorherige Seite). Adhärenz der sequenziellen Isolate und der Kontrollstämmen J99wt, J99babA, J99sabA und J99babAsabA an (A) Le<sup>b</sup> und (B) sLe<sup>x</sup>.** Die Bindung von J99babA, J99sabA und J99babAsabA an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> ist relativ zur Bindung von J99wt angegeben. Die Adhärenz der sequenziellen Isolate ist als Verhältnis der Bindung vom zweiten zum ersten Isolat dargestellt. Stammpaare, deren erstes und zweites Isolat nicht adhären ist, sind nicht aufgeführt.

#### 4.2.6. Untersuchungen zur Adhärenz sequenzieller Isolate an die Zelllinie AGS

Die Adhärenz der sequenziellen Isolate an die Magenkarzinom-Zelllinie AGS wurde analysiert, um die Bindungseigenschaften der Stämme in einem System zu untersuchen, welches eher mit *in vivo*-Bedingungen vergleichbar ist. Der J99-Wildtypstamm, sowie die Mutanten J99babA, J99sabA und J99babAsabA wurden als Kontrollstämmen verwendet. Die Unterschiede der mittleren Bindung der Isolate eines Paares und der J99-Knockout-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurden mittels ttest oder Mann-Whitney-Rangsummentest auf Signifikanz getestet.

Sämtliche sequenziellen Isolate und Kontrollstämmen adhärten gut an AGS-Zellen (Bindungsverhältnis von grösser 2 im Vergleich zu nicht infizierten Zellen). Die Deletion von *babA* in J99 hatte keinen Effekt auf die Bindung (0,986) (Abb. 24). J99sabA und J99babAsabA wiesen hingegen eine signifikant verringerte Adhärenz auf (0,765; 0,575). Hieraus lässt sich schliessen, dass die Adhäsine BabA und SabA für die Bindung an die Zellen nicht essentiell sind und noch weitere Adhärenzfaktoren eine Rolle spielen. Dies wurde durch die Ergebnisse der sequenziellen Stämme bestätigt, da, alle Stämme an die AGS-Zellen banden, obwohl die Isolate der Paare LSU1010, LSU1040 und LSU1062 nicht an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> adhärten und die des Paares LSU1037 nicht Le<sup>b</sup>-adhären waren. Dies weist ferner daraufhin, dass die detektierten Verringerungen der Bindung an die Zelllinie innerhalb dieser Paare und vermutlich auch der anderen Paare (ausser LSU1037 und NQ367, welche keine signifikant unterschiedliche Adhärenz aufwiesen), wahrscheinlich nicht durch die Unterschiede des Le<sup>b</sup>- und sLe<sup>x</sup>-Bindungsphänotypen hervorgerufen wurden. Die Isolate des Paares NQ331 wiesen die höchste Differenz in der Bindung an die Zellen auf, der zweite Stamm, der eine 1,4-fach höhere Adhärenz an Le<sup>b</sup> und gleiche Bindung an sLe<sup>x</sup> zeigte, adhärte 1,6-fach höher als der erste Stamm an die Zelllinie. Ein Verlust der Adhärenz an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> innerhalb des Paares LSU1014 führte zwar zu einer signifikant verringerten Adhärenz des zweiten Isolats 1014-6 an die AGS-Zellen (0,907), jedoch zu keinem Verlust der Bindung. Die Bindung war nicht so stark verringert wie die der J99babAsabA-Mutante im Vergleich zum Wildtyp J99.

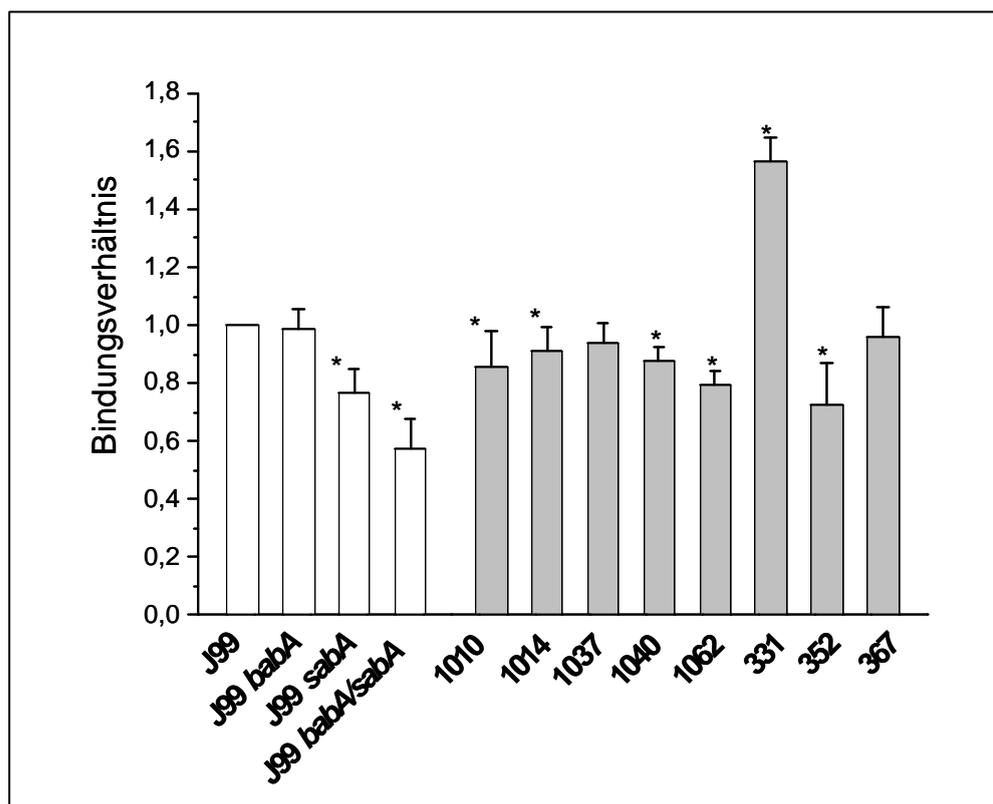


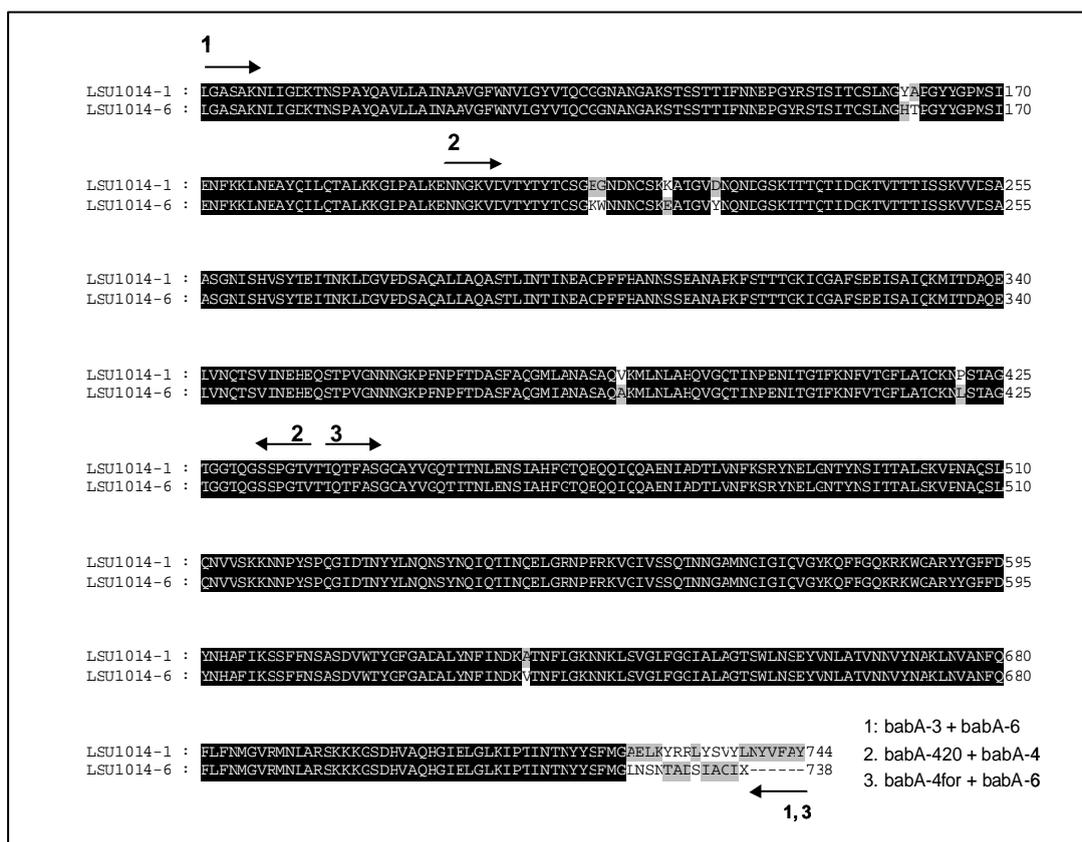
Abb. 24. Adhärenz der sequenziellen Isolate und der Kontrollstämme J99, J99*babA*, J99*sabA* und J99*babAsabA* an die Magenkarzinom-Zelllinie AGS. Die Bindung der J99-Knockout-Mutanten ist relativ zur Bindung vom J99-Wildtypstamm angegeben. Die Adhärenz der sequenziellen Isolate ist als Verhältnis der Bindung vom zweiten zum ersten Isolat dargestellt.

#### 4.2.7. Untersuchung zur funktionellen Korrelation zwischen Sequenzvariabilität und Rezeptorbindung von BabA

Das zweite Isolat des Paares LSU1014 wies im Vergleich zum ersten Isolat Unterschiede in der BabA-Proteinsequenz auf und zeigte einen kompletten Verlust der Bindung an Le<sup>b</sup>. Da im Gegensatz zur Proteinsequenz der Expressionsniveaus von *babA* innerhalb dieses Paares nicht differierte, könnte allein die veränderte Sequenz von BabA einen unterschiedlichen Bindungsphänotyp erzeugen. Für die weitere funktionelle Charakterisierung des möglichen Effektes der durch Rekombinations- und Mutationsereignissen generierten Unterschiede der Proteinsequenz bzw. Proteinstruktur, wurde dieses Paar ausgewählt. Da der sLe<sup>x</sup>-negativ-adhärente Phänotyp auf eine Leserahmenverschiebung durch unterschiedlich lange *sabA*-CT-Repeats in den Isolaten basierte, beschränkte sich die weitere Analyse auf BabA und die Adhärenz an Le<sup>b</sup>.

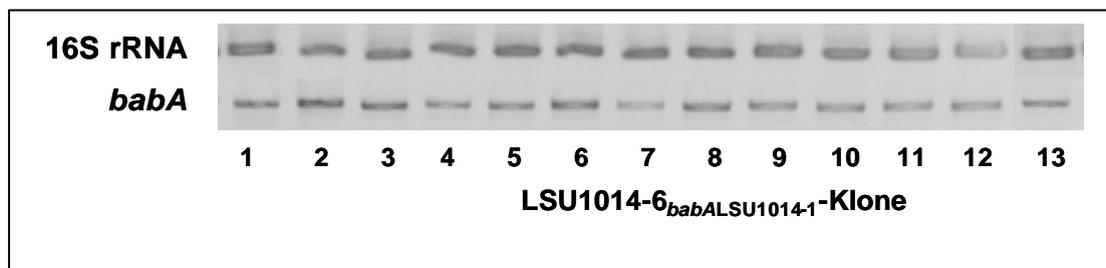
Ob die nicht-synonymen Polymorphismen im *babA*-Gen den negativ-adhärenten Bindungstyp des Isolats LSU1014-6 an Le<sup>b</sup> generierten, wurde durch Komplementationsexperimente untersucht. Hierbei

wurde der Stamm LSU1014-6 mit *babA*-DNA des adhärenen Stamms LSU1014-1 transformiert und die Bindung erfolgreich transformierter LSU1014-6-Klone an  $Le^b$  im Glykoproteinassay getestet. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation mit PCR-Produkten. Zunächst wurde von genomischer DNA des Isolats LSU1014-1 das gesamte *babA*-Gen mit Primern (*babA*-3/*babA*-6), die am Genstart und -Ende lagen (Abb. 25) durch High-Fidelity-PCR amplifiziert. Mit dem Einbau der gesamten kodierenden *babA*-Sequenz des Stamms LSU1014-1 in den Stamm LSU1014-6 sollte eine funktionelle Komplementation der Adhärenz an  $Le^b$  erzielt werden. Ausserdem wurden Transformationen mit PCR-Produkten durchgeführt, die ausschliesslich die zentrale, variable *babA*-Region abdeckten (Primer *babA*-420/*babA*-4), oder die zweite Hälfte des Gens, die den verkürzten 3'-Terminus beinhalteten (Primer *babA*-4for/*babA*-6). Durch die Transformation und den Einbau verschiedener *babA*-DNA-Segmente des Stamms LSU1014-1 in den negativen Adhärenzhintergrund von LSU1014-6 sollten LSU1014-6 Klone mit variierenden BabA-Sequenzen generiert werden, die ferner eine Bestimmung der BabA-Region(en) ermöglichen, die als Bindungsepitope die Adhärenz mit dem Rezeptor  $Le^b$  vermitteln.



**Abb. 25. Paarweises Alignment der BabA-Aminosäuresequenz der sequenziellen Isolate LSU1014-1 und LSU1014-6.** Aminosäuren, die in beiden Stämmen identisch sind, sind schwarz hinterlegt. Stammspezifische Aminosäuren sind grau und weiss hinterlegt. Die Pfeile geben die Position der unten rechts benannten Primerkombinationen an. Die Ziffern bezeichnen die drei verschiedenen *babA*-Segmente, die vom Stamm LSU1014-1 amplifiziert und für die Transformation des Isolats LSU1014-6 verwendet wurden; Amplifikation von 1: gesamtes *babA*-Gen, 2: zentrale, variable Region, 3. zweite Genhälfte.

Nach der Elektroporation wurden aus dem Pool transformierter und nicht-transformierter Bakterien die transformierten LSU1014-6-Klone angereichert. Die Anreicherung erfolgte über die nach erfolgreicher Transformation veränderte Adhärenz an  $Le^b$ . Nach der Inkubation mit biotinyliertem  $Le^b$  wurden die positiv-adhärenenten Bakterien über Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads angereichert (vgl. 3.4.3.) und weiterkultiviert. Der Einbau von LSU1014-1-DNA wurde zunächst durch die Sequenzierung des *babA*-Gens der LSU1014-6-Einzelklone kontrolliert. Anschliessend erfolgte die Bestimmung der Adhärenz der rekombinanten Klone an  $Le^b$  in drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse der Bindung an den Rezeptor sind für sämtliche LSU1014-6<sub>babA1014-1</sub>-Klone in Abb. 28 dargestellt, unabhängig davon, ob sie nach der Definition des zweifach höheren Bindungsverhältnis im Vergleich zur Negativkontrolle BSA  $Le^b$ -adhärent oder nicht-adhärent waren. Die Bindung der Klone ist als Verhältnis zur Adhärenz des Stamms LSU1014-1 angegeben. Die *babA*-Expression dieser Klone wurde mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft. Für sämtliche analysierte LSU1014-6<sub>babA1014-1</sub>-Klone konnte *babA*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 26).



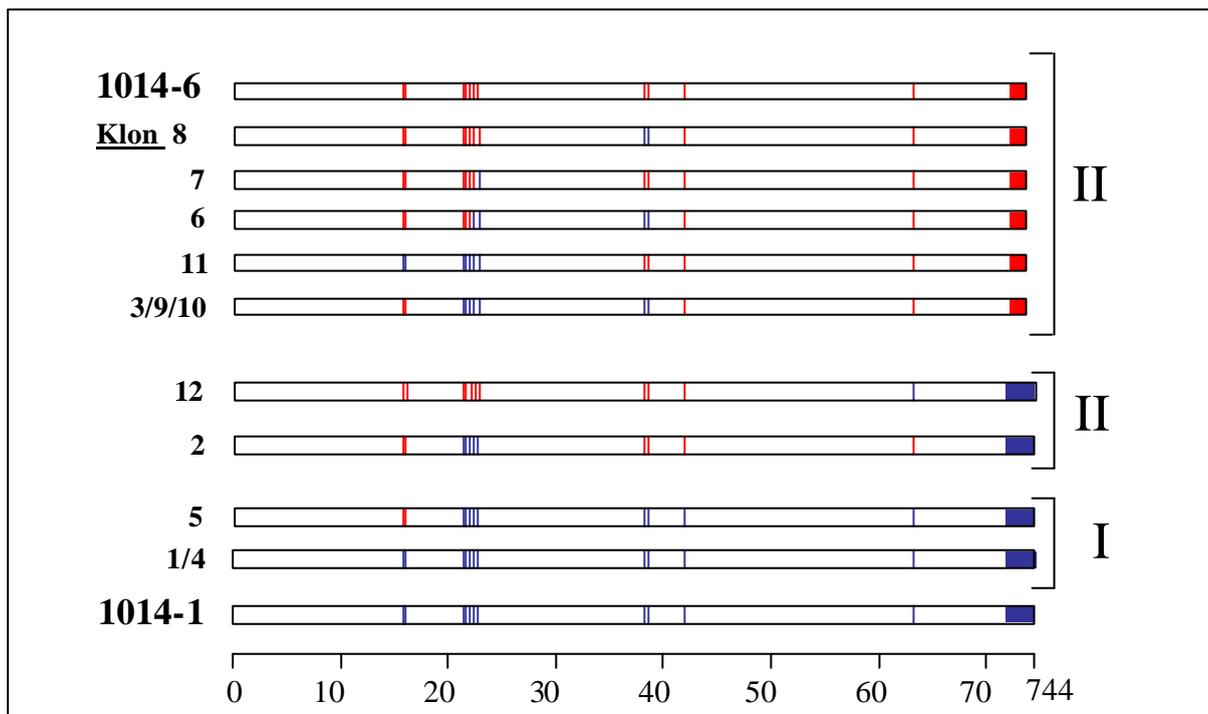
**Abb. 26. *babA*-Expressionsanalyse der LSU1014-6<sub>babA1014-1</sub>-Klone mittels semiquantitativer RT-PCR.** Dargestellt sind die von der cDNA der unten aufgeführten Klone spezifisch amplifizierte PCR-Produkte. Auf der linken Seite sind die Gene angegeben.

Es wurden insgesamt zwölf LSU1014-6-Klone analysiert, die entweder die DNA des gesamten LSU1014-1-spezifischen *babA*-Gens in den *babA*-Locus inkorporierten, oder chimäre *babA*-Mosaikgene aufwiesen, die aus LSU1014-1-spezifischen und LSU1014-6-spezifischen Segmenten bestanden (Abb. 27).

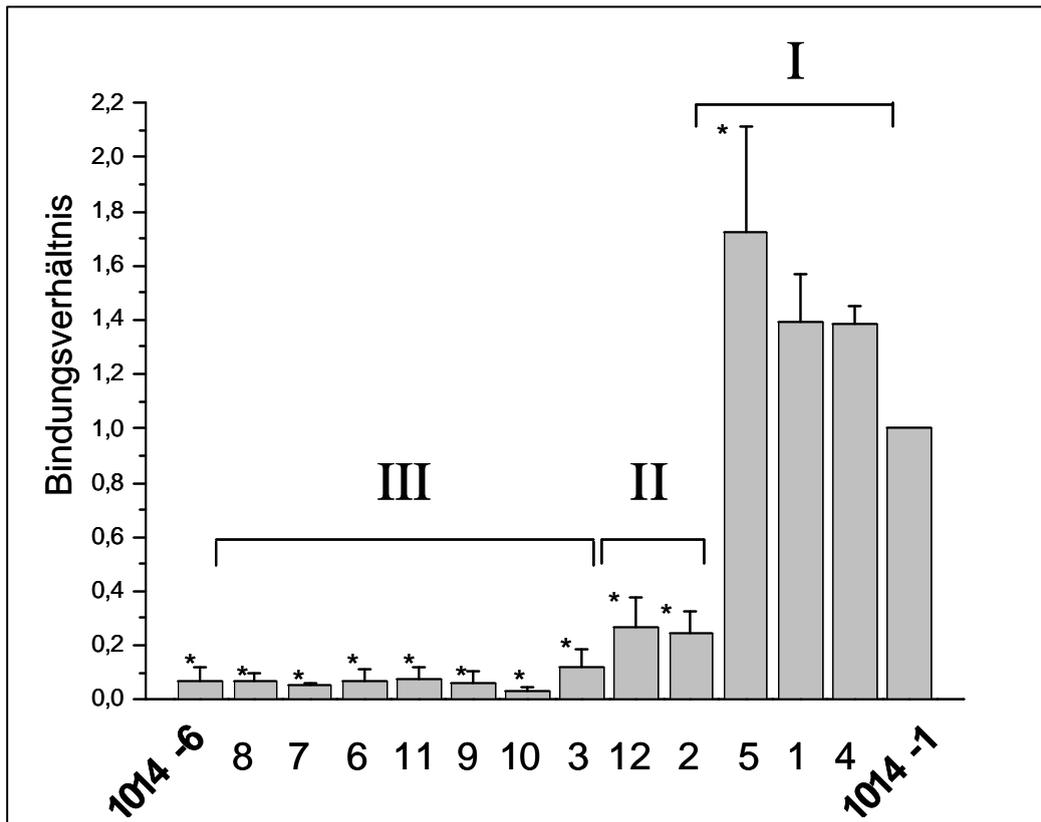
Die Klone 1 und 4 hatten das *babA*-Gen des Stamms LSU1014-1 komplett in das Genom integriert, was zu einer Wiederherstellung der Fähigkeit zur Bindung an  $Le^b$  führte (Abb. 27; 28). Die Bindung an  $Le^b$  war im Verhältnis zum Stamm LSU1014-1 signifikant erhöht (Klon 1: 1,383; Klon 4: 1,389). Die Klone 5-13 besaßen *babA*-Mosaikgene. Klon 5 wurde entsprechend zu den Klonen 1 und 4 durch Transformation der gesamten LSU1014-1-*babA*-Sequenz gewonnen und wies zwar eine zum Isolat LSU1014-1 überwiegend ähnliche BabA-Sequenz auf, unterschied sich jedoch durch zwei Aminosäuren im N-terminalen Bereich, die spezifisch für LSU1014-6 waren. Dieser Klon 5 zeigte ebenfalls einen  $Le^b$ -adhärenenten Phänotyp, der im Vergleich zu LSU1014-1 signifikant erhöht war (1,723). Die Klone 2 und 13

besaßen BabA-Sequenzen, die im zentralen Bereich des Adhäsins und am C-Terminus bzw. ausschliesslich im C-terminalen Bereich LSU1014-1-spezifische Aminosäuren aufwiesen. Die übrige Proteinsequenz war identisch zum Stamm LSU1014-6. Diese Klone wiesen im Vergleich zu LSU1014-6 eine signifikant erhöhte Adhärenz an Le<sup>b</sup> (1014-6: 0,077; Klon 2: 0,244, Klon 13: 0,261) auf, die aber nicht die Stärke der Bindung vom Stamm LSU1014-1 erreichte.

Der mittlere Bereich der BabA-Proteinsequenz der Klone 3 und 6-11 bestand aus LSU1014-1- und LSU1014-6-spezifischen Aminosäuren in variierender Anzahl und Position und der C-Terminus war verkürzt (LSU1014-6-spezifisch). Die Adhärenz dieser Klone an Le<sup>b</sup> blieb im Vergleich zu LSU1014-6 unverändert (Klon 3: 0,119, Klon 6: 0,071, Klon 7: 0,049; Klon 8: 0,067, Klon 9: 0,055; Klon 10: 0,03; Klon11: 0,073).



**Abb. 27. Graphische Darstellung der BabA-Aminosäuresequenzen der LSU1014-6<sub>babA 1014-1</sub>-Klone (1-12) und der sequenziellen Isolate LSU1014-1 und LSU1014-6.** Ein Balken repräsentiert die BabA-Proteinsequenz der links angegebenen Stämme bzw. Klone. Weisse Bereiche: identische Sequenz; Rote Balken: spezifische Aminosäuren des nicht an Le<sup>b</sup>-adhärenenten Stamms LSU1014-6; Blaue Balken: spezifische Aminosäuren des Le<sup>b</sup>-adhärenenten Stamms LSU1014-1. I: Klone mit intaktem C-Terminus, die an Le<sup>b</sup> adhären; II: Klone mit intaktem C-Terminus, die nicht an Le<sup>b</sup> binden; III: Klone mit verkürztem C-Terminus, die nicht an Le<sup>b</sup> adhären.



**Abb.28. Adhärenz der 1014-6<sub>bab</sub>ALSU1014-1-Klone und der sequenziellen Isolate LSU1014-1 und LSU1014-6 an Le<sup>b</sup>.** Die Bindung ist im Verhältnis zum Le<sup>b</sup>-adhärenten Stamm LSU1014-1 angegeben. I: Klone mit intaktem C-Terminus, die an Le<sup>b</sup> adhären; II: Klone mit intaktem C-Terminus, die nicht an Le<sup>b</sup> binden; III: Klone mit verkürztem C-Terminus, die nicht an Le<sup>b</sup> adhären.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Transmission von *H. pylori* in südafrikanischen Familien: mehr als vertikale Transmission

Trotz intensiver Forschung seit über 20 Jahren ist noch wenig über die Übertragungswege von *H. pylori* bekannt. Die Infektion mit *H. pylori* ist weltweit endemisch und es ist aufgrund einer Vielzahl an epidemiologischen Studien allgemein anerkannt, dass die Übertragung hauptsächlich im frühen Kindesalter durch direkten Personenkontakt in der Familie stattfindet (Rowland *et al.*, 1999; Malaty *et al.*, 2002). Diese Art der Übertragung wird ferner durch Tierexperimente bestätigt (Karita *et al.*, 2005; Solnick *et al.*, 2006). Die Untersuchung von *H. pylori*-Stämmen aus Familien ist ein Zugangsweg zum besseren Verständnis der Übertragungswege dieses Krankheitserregers. Ein Anlass für unsere Analyse der Übertragung von *H. pylori* in Multigenerations-Familien aus einer ländlichen Region in Südafrika war, dass fast alle bisherigen Studien an kleinen Familien aus Industrieländern mit ähnlicher geographischer Herkunft und sozio-ökonomischen Verhältnissen durchgeführt wurden. Da jedoch die Prävalenz der Infektion mit sozio-ökonomischen Faktoren korreliert ist (Malaty & Graham, 1994) und die Prävalenz von *H. pylori* in den Entwicklungsländern (70-90%) sehr viel höher ist als in den industrialisierten Nationen (20-50%) (Dunn *et al.*, 1997), sollte eine Analyse von Stämmen aus Familien, die in Entwicklungsländern leben für das Verständnis der Transmission von *H. pylori* neue Hinweise geben können. Zweitens bietet eine Untersuchung von *H. pylori* aus grösseren Familien, die mehrere Generationen umfassen, die Möglichkeit, genetische Veränderungen der Bakterien über mehrere Generationen (und wahrscheinlich mehrere Transmissionereignisse) zu verfolgen. Weiterhin ist es in diesen Familien eher möglich, eine Homogenisierung klonaler Sequenzstrukturen durch Rekombination während der Infektion und nach der Transmission zu beobachten. Der dritte Anlass war, dass bisherige Studien, die die Übertragungswege von *H. pylori* untersucht haben, auf Methoden basierten, die keine Stammtypisierung ermöglichen (z.B. Serologie, <sup>13</sup>C-Harnstoff-Atemtests) oder Typisierungsmethoden mit geringem Auflösungsvermögen angewendet wurden (Ribotypisierung, RAPD-PCR, Sequenzierung von Einzelgenen) (Drumm *et al.*, 1990; Malaty *et al.*, 1991; Nwokolo *et al.*, 1992; Dominici *et al.*, 1999; Taneike *et al.*, 2001). Es wurde daher eine grossangelegte Studie durchgeführt, die insgesamt 142 Stämme aus 95 Individuen aus 13 Familien aus den USA, Korea, England, Irland, Kolumbien, und Südafrika umfasste. Die hochauflösende MLST (Maiden *et al.*, 1998) erschien geeignet, um die Transmission und genetische Diversität von *H. pylori* in Familien wesentlich detaillierter als bisher zu untersuchen. Von den einzelnen Isolaten wurden sieben Housekeeping-Genfragmente (vgl. 3.2.8.) sequenziert, die zu einem Multilocus-Haplotyp zusammengefasst und Populationen und STs zugeordnet wurden. Während die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der nicht-südafrikanischen Familienisolate mit

dem bislang weitgehend akzeptierten Konzept einer klonalen intrafamiliären Übertragung übereinstimmen, zeigte die Analyse der südafrikanischen Isolate ein viel komplexeres Muster der genetischen Diversität von *H. pylori* ohne vorwiegende klonale Transmission innerhalb der Familien.

Sämtliche Familienisolate aus den städtischen Familien aus Nord- und Südamerika, Europa und Asien wurden bis auf eine Ausnahme ihrer geographischen Herkunft entsprechend entweder der Hauptpopulation hpEurope oder hpEastAsia zugeordnet. Die Populationszugehörigkeit war in zehn der insgesamt elf Familien einheitlich. Im Gegensatz hierzu wurden die Stämme der Familien aus Pretoria vier verschiedenen Populationen zugeordnet, obwohl die Familien in einer abgelegenen Region ansässig sind, in der Kontakt mit migrierenden Personen, die mit *H. pylori*-Isolaten anderer nicht-afrikanischer Herkunft infiziert sein könnten, weniger wahrscheinlich ist. *cag*-positive hpAfrica1-Stämme, *cag*-negative hpAfrica2-Isolate, hpEurope-Isolate und sogar zwei hpEastAsia-Stämme zirkulieren gleichzeitig in den Familien. Folglich zeigt sich selbst auf der Populationsebene, die nur eine geringe Auflösung hat und für die Untersuchung lokaler Transmission üblicherweise nicht geeignet ist, dass die Stämme in der südafrikanischen Gemeinschaft eine beachtliche Diversität aufweisen.

Aufgrund der Tatsache, dass es fast ausgeschlossen ist, *H. pylori*-Isolate mit identischen STs aus unverwandten Individuen zu isolieren, deuten Stämme mit übereinstimmenden STs aus zwei verschiedenen Personen auf eine nur kurze Zeit zurückliegende Übertragung hin. Daher wurden auch die STs der Isolate in den einzelnen Familien bestimmt. In den nicht-südafrikanischen Ländern wurden Gruppen von zwei bis drei Stämmen mit identischen Allelprofilen in acht der elf Familien detektiert, entweder zwischen einem Elternteil und Kind oder zwischen Geschwistern. Diese Ergebnisse deuten auf eine häufige intrafamiliäre Transmission hin. Zudem wurden in 61% der Verwandten ersten Grades genetisch nah verwandte *H. pylori*-Isolate identifiziert. Im Gegensatz hierzu unterschieden sich fast alle stichprobenartig genommenen Isolate aus unverwandten Individuen in jeder der sieben Gensequenzen. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Daten, die ebenfalls anhand von Fingerprinting-Methoden klonale Stämme von *H. pylori* innerhalb der Familie beschrieben (Han *et al.*, 2000; Kivi *et al.*, 2003; Konno *et al.*, 2005). Drei weitere Studien, die mittels Sequenzierung von zwei bis drei Genfragmenten die Verwandtschaft von *H. pylori* in Familien aus Europa bzw. aus einer französischen Familie mit algerischer Herkunft untersuchten, beschreiben ebenfalls, dass die Transmission der Bakterien hauptsächlich innerhalb der Familie stattfindet (Suerbaum *et al.*, 1998; Owen und Xerry 2003; Raymond *et al.*, 2004). Für den genauen Übertragungsweg in industrialisierten Ländern sind fast alle denkbaren Routen innerhalb einer Familie aufgrund klonaler Übertragung beschrieben worden: von der Mutter auf das Kind (Taneike *et al.*, 2004), vom Vater auf das Kind (Suerbaum *et al.*, 1998), zwischen Ehepaaren (Georgopoulos *et al.*, 1996; Suerbaum *et al.*, 1998) und zwischen Geschwistern (Goodman & Correa, 2000; Rothenbacher *et al.*, 2000).

Von den südafrikanischen Familien wurden zwei Isolate pro Individuum analysiert. Im Vergleich zu den Familien städtischer Herkunft wiesen die Isolate in den Familien 12 und 13 eine höhere Diversität der STs auf. Innerhalb der Familie 13 gab es kein einziges Stammpaar mit identischen STs; jedes Familienmitglied trug einen Stamm mit eigenem ST. In der Familie 12 wurden *H. pylori*-Paare mit übereinstimmenden STs in vier Geschwisterpaaren, in zwei Onkeln und deren Nichte und Neffe und zwischen Vater und Tochter gefunden. Die übrigen 29 Familienmitglieder der insgesamt 42 Mitglieder der Familie 12 trugen Isolate mit einzigartigen STs. Eine direkte vertikale Transmission von den Eltern auf das Kind scheint demnach in den südafrikanischen Familien selten zu sein. Ferner waren im Vergleich zu den städtischen Individuen nur wenige der Verwandten ersten Grades mit genetisch nah verwandten Stämmen infiziert (61% vs 27%).

Falls eine vertikale Übertragung von *H. pylori* der vorwiegende Übertragungsweg ist, sollten der Grad der genetischen Ähnlichkeit zwischen zwei Bakterienstämmen mit dem Verwandtschaftsgrad der beiden menschlichen Wirte korrelieren. In der Tat konnte dies für die Familien städtischer Herkunft gezeigt werden: die Sequenzähnlichkeit von *H. pylori* war in unverwandten Personen signifikant geringer als in Verwandten ersten Grades. In den südafrikanischen Familien hingegen war dies nicht der Fall. Darüber hinaus war der Spearman-Rangsummen-Korrelationskoeffizient in den nicht-südafrikanischen Familien höher als in den Familien 12 und 13. Insgesamt stimmen die Ergebnisse und die Schlussfolgerungen mit denen einer Studie überein, in der die Isolate der Familien 12 und 13 und weiterer südafrikanische Familien analysiert wurden, um die Übertragung der Bakterien mit statistischen Modellen zu charakterisieren (Delport *et al.*, 2006). In dieser Studie, in der direkt vom Biopsiematerial die Amplifikation von drei Housekeeping-Genen durchgeführt wurde, konnten die Isolate jedoch weder Populationen noch STs zugeordnet werden. Es war ebensowenig möglich, bestimmte Aussagen hinsichtlich der Sequenzähnlichkeit zu treffen, da durch den direkten PCR-Ansatz nicht ausgeschlossen werden kann, dass die amplifizierten Fragmente von unterschiedlichen Genomen stammen.

Rekombination ist die treibende Kraft der allelischen Diversität von *H. pylori* (Suerbaum *et al.*, 1998). Mosaiksequenzen, die eigentlich ein Kennzeichen von Rekombination sind, sind jedoch nur selten beschrieben worden (z.B. für das Zytotoxin *vacA*; Avilez-Jimenez *et al.*, 2004), da aufgrund der hohen Rekombinationsfrequenz in unverwandten Stämmen die Mosaikstrukturen randomisiert wurden und nicht mehr erkennbar sind. Bei Familienisolaten liegt nur eine kurze Zeitspanne von wenigen Jahren zwischen Transmission und Isolierung, so dass die Wahrscheinlichkeit, noch Mosaikstrukturen zu finden, höher ist. Die komplexen Mosaikstrukturen der Housekeeping-Gene, die in den südafrikanischen Familien im Gegensatz zu den nicht-südafrikanischen Familien detektiert wurden, veranschaulichen den Effekt der Rekombination auf die Genstruktur in *H. pylori*, die beispielsweise in der Familie 13 so effektiv die Mosaik fragmentiert, dass nur noch sehr kurze Polymorphismen-Cluster als solche zu identifizieren sind.

Wenige zusätzliche Rekombinationsereignisse würden dann zu einer vollkommenen Unkenntlichkeit der Mosaikstrukturen führen.

Die Daten der südafrikanischen Familienisolate sprechen dafür, dass die vertikale Übertragung von *H. pylori* in der Familie nur eine untergeordnete Rolle spielt und die Bakterien auch über horizontale Transmission von aussen in die Familien gelangen. Über die Quelle dieser Übertragungen kann zur Zeit nur spekuliert werden. Zum einen wäre ein intensiver Kontakt zu Personen ausserhalb der Familie, wie beispielsweise zwischen Kindern unterschiedlicher Familien oder zwischen Kindern und Erziehungspersonen eine plausible Möglichkeit der Übertragung. Andererseits könnte eine allgemeine abiotische Quelle in der Umwelt zu einer Infektion führen. Zoonotische Übertragungen sind für *H. pylori* bisher nicht beschrieben worden. Die Möglichkeit, dass Wasser (Klein *et al.*, 1991; Bunn *et al.*, 2002) und/oder Lebensmittel (Hopkins *et al.*, 1993) als Reservoir für *H. pylori* fungieren ist wenig fundiert und sehr spekulativ und bisher stehen keine Daten zur Verfügung, die sich auf Genotypisierungen basieren und eine Übertragung von kontaminiertem Wasser, Lebensmitteln oder Haustieren auf den Menschen bestätigen (Brown *et al.*, 2001). Da die südafrikanischen Familien über behandeltes Leitungswasser und sanitäre Einrichtungen verfügen, ist kontaminiertes Wasser als Quelle der Infektion eher unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse der nicht-südafrikanischen Familienisolate könnten ferner darauf hinweisen, dass der Prozess der Umwandlung in eine entwickelte, industrialisierte Nation den horizontalen Übertragungsweg stärker beeinflusst als den vertikalen, so dass die vertikale Transmission schliesslich dominiert. Die Verringerung der Transmissionseffizienz würde dann zu einem verringerten Vorkommen von *H. pylori*-Infektionen führen und darüber hinaus die Möglichkeit gemischter Infektionen verringern. Es ist auf der anderen Seite aber ebenso in entwickelten Ländern gezeigt worden, dass Kinder mit Isolaten infiziert sind, die sich von denen beider Elternteile unterscheiden und deren Herkunft nicht bestimmt werden kann. Infektionen finden deshalb wahrscheinlich auch in diesen Ländern ausserhalb der Familie statt. Die Übertragungswege sind allerdings unklar. In einer Studie von Tindberg *et al.* (2001) ist gezeigt worden, dass eine Transmission zwischen schwedischen Schulkindern eher unwahrscheinlich ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse ist mit Abstand die grösste Studie zur Untersuchung der Transmission und genetischen Variabilität von *H. pylori* in Familien. Eine Limitation dieser Studie ist allerdings, dass nicht von allen Mitgliedern einer Familie die Isolate analysiert wurden. In der Familie 12 zum Beispiel wurden von mehreren Elternteilen keine Biopsien entnommen oder *H. pylori* konnte aus diesen nicht kultiviert werden. Das eventuelle Vorkommen von weiteren vertikalen klonalen Übertragungen von *H. pylori* in den südafrikanischen Familien kann demnach nicht ausgeschlossen werden. In den nicht-südafrikanischen Familien wurde *H. pylori* ebenfalls nicht von allen Mitgliedern einer Familie untersucht und dennoch konnten mehrere vertikale Linien nachgewiesen werden, obwohl in

jeder dieser Familien das Isolat von nur einem der Elternteile analysiert wurde. Eine weitere Limitation dieser und der meisten anderen Studien von Familienisolaten ist, dass die genetische Diversität von *H. pylori* innerhalb eines Individuums nur unvollständig bestimmt worden ist. Allerdings gehört diese Untersuchung zu den wenigen, bei denen mehr als ein Bakterienstamm pro Individuum analysiert wurde. Um die Diversität der Isolate in einem Wirt zu berücksichtigen, wurden in den Familien 12 und 13 zwei Stämme aus zwei verschiedenen Regionen des Magens pro Familienmitglied untersucht. Selbst durch diese begrenzte Annäherung sind gemischte Infektionen bei 68% der Mitglieder in Familie 12 und 44% der Personen in Familie 13 detektiert worden. Diese Ergebnisse stimmen mit weiteren Studien überein, die eine Kolonisierung mit multiplen Stämmen beschrieben (Jorgensen *et al.*, 1996; van der Ende *et al.*, 1996; Kersulyte *et al.*, 1999; Taylor *et al.* 1995). Raymond *et al.* (2004) untersuchten eine Familie, deren Eltern aus Algerien stammen und deren vier Kinder in Frankreich geboren sind, indem Biopsien des Corpus und Antrum entnommen und hieraus jeweils zehn Einzelkolonien durch Sequenzierung von zwei Housekeeping-Genen analysiert wurden. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls eine hohe Heterogenität von Stämmen aus einem Individuum und gemischte Infektionen sind in allen sechs Familienmitgliedern gefunden worden. Weiterhin scheinen gemischte Kolonisierungen in Ländern mit einer hohen *H. pylori*-Prävalenz häufiger zu sein als in Nationen, die eine geringere Prävalenz aufweisen (Berg *et al.*, 1997a; Wang *et al.*, 1999; Gonzales-Valencia *et al.*, 2000).

Die hier durchgeführte Analyse zeigt, dass die Übertragung von *H. pylori* viel komplexer ist als die bisherigen Studien in entwickelten Ländern suggerierten. Für ein besseres Verständnis der Übertragungswege von *H. pylori* sollten zukünftige Studien in einem noch grösseren Massstab eine grosse Anzahl an Individuen aus Familien oder anderen Gemeinschaften mit unterschiedlichen geographischen und sozio-ökonomischen Hintergründen, sowie eine grosse Anzahl an Isolaten pro Wirt umfassen, die so ein grosses Potential an Informationen der Übertragung von *H. pylori* und dessen Populationsgenetik bergen.

## 5.2. Genetische und funktionelle Diversität der *H. pylori*-Adhäsine *babA* und *sabA* während der chronischen Infektion

*H. pylori* kolonisiert persistent den Magen des Menschen und wird deshalb als hoch adaptiert an diese Nische betrachtet. Auch wenn dies experimentell bisher nicht belegt wurde, erscheint es als unwahrscheinlich, dass dieses Bakterium ohne die Adhärenz an und ohne die Interaktion mit den Wirtszellen eine lebenslange Infektion etablieren kann. Das durch die Entzündungsreaktion geschädigte Magenepithel fungiert einerseits vermutlich als Nahrungsquelle und eine Adhärenz der Bakterien würde hierdurch favorisiert werden (Papini *et al.*, 1998). Ein direkter Kontakt mit dem Epithel könnte andererseits aber auch schädlich für die Bakterien sein, weil sie dort in Kontakt mit dem Immunsystem kommen. Es erscheint daher sinnvoll, dass die Bakterien die Adhärenz dynamisch regulieren können. Eine wichtige Voraussetzung ist hierfür die im Vergleich zu anderen Bakterien-Spezies hohe genetische Diversität von *H. pylori* (Go *et al.*, 1996b; Suerbaum *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hatten zum Ziel, die genetischen und funktionellen Eigenschaften von *babA* und *sabA* in sequenziellen *H. pylori*-Isolaten zu untersuchen, um die evolutiven Mechanismen der Diversität, sowie die funktionelle Bedeutung der genetischen Diversität von *babA* und *sabA* und die Rolle der Bindung an die Rezeptoren Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> während der natürlichen Infektion zu beleuchten.

### 5.2.1. Allelische Variation der Adhäsinkodierenden Gene *babA* und *sabA* während der Infektion

Es wird angenommen, dass die hohe genetische Variabilität von *H. pylori* ein wichtiger Mechanismus der Anpassung an den individuellen Wirt ist, wobei u.a. die Immunantwort und Veränderungen der Magenphysiologie einen Selektionsdruck ausüben könnten. Studien, die sequenzielle Isolate in einem Abstand von mehreren Jahren analysierten, beschrieben Änderungen der Nukleotidsequenz und die Aufnahme und den Verlust von Genen in den Isolaten (Kuipers *et al.*, 2000; Israel *et al.*, 2001; Prouzet-Mauléon *et al.*, 2005). Da die sequenziellen Isolate trotz der genetischen Unterschiede verwandt waren, sind sie vermutlich aus demselben Ursprungsstamm hervorgegangen und haben sich durch unabhängige genetische Ereignisse während der Kolonisierung verändert. Weiterhin gibt es Hinweise auf den genetischen Austausch zwischen verschiedenen Stämmen während der gemischten Infektion (Danon *et al.*, 1998; Kersulyte *et al.*, 1999; Smeets *et al.*, 2003). Die Studien führten zu dem Konzept der kontinuierlichen genetischen Diversifikation von *H. pylori* im Verlauf der persistenten Kolonisierung. Da die Adhäsine BabA und SabA mit Wirtsrezeptoren interagieren, vermitteln die Gene *babA* und *sabA* einen sehr wahrscheinlich für Persistenz und Pathogenität der Bakterien wichtigen Phänotyp. Eine Analyse der genetischen Variabilität dieser Gene während der Infektion innerhalb eines Wirtes wurde

jedoch bislang nicht durchgeführt. Daher wurden in dieser Arbeit die Gensequenzen von *babA* und *sabA*, sowie die abgeleiteten Proteinsequenzen von acht Paaren sequenzieller Isolate analysiert. Die Stämme waren Teil einer vorherigen Studie, in der mittels Sequenzierung die genetische Variabilität von sieben Housekeeping-Genen und drei Virulenz-assoziierten Genen in 26 Paaren von sequenziellen Isolaten untersucht wurde (Falush *et al.*, 2001). Die hiervon für diese Arbeit ausgewählten acht Paare, die in einem Intervall von drei bis 36 Monaten entnommen wurden, wiesen SNPs und/oder MNPs in einem oder mehreren Housekeeping-Gen und/oder Virulenz-assoziierten Genen auf, was darauf hinweist, dass bei den Paaren eine zumindest transiente gemischte Kolonisation und somit Gelegenheit zur Rekombination vorlag. Die Sequenzanalyse der Adhäsion-kodierenden Gene zeigte, dass aufgrund von Rekombination und/oder Mutation alle *babA*-positiven Stammpaare Unterschiede in der *babA*-Sequenz und die meisten Stammpaare Unterschiede in der *sabA*-Sequenz aufwiesen. Bei vielen der Polymorphismen handelte es sich zudem um nicht-synonyme Basenaustausche.

Jedes der Isolate war *sabA*-positiv. *babA* konnte hingegen nur von fünf der acht Stammpaare amplifiziert werden. Da verschiedene Primerkombinationen für Isolate der übrigen drei Paare zu keinem positiven PCR-Ergebnis führten und die Isolate auch nicht an Le<sup>b</sup> adhärten (vgl. 5.2.3.), wurden sie als *babA*-negativ bezeichnet. Dies stimmt mit Studien überein, die basierend auf PCR, Immunoblotting und DNA-Mikroarray-Hybridisierungen zeigten, dass das Vorhandensein von *babA* und auch das von *sabA* stammspezifisch ist und die Gene zwar in der Mehrheit, aber nicht in allen Stämme vorhanden sind (Gerhard *et al.*, 1999; Salama *et al.*, 2000; Sheu *et al.*, 2006; Yamaoka *et al.*, 2006). In einer Studie von Sheu *et al.* (2003) ist gezeigt worden, dass alle analysierten 188 *H. pylori*-Isolate aus Taiwan *babA*-positiv waren. Die Prävalenz des Gens scheint demnach in unterschiedlichen geographischen Regionen zu variieren. In unseren Untersuchungen war *babA* entweder in beiden Isolaten eines Paares vorhanden oder abwesend, ein Verlust oder eine Aufnahme des Gens während der Infektion in dem Zeitraum zwischen dem ersten und zweiten Isolat hat somit vermutlich nicht stattgefunden. In Übereinstimmung hierzu beschrieben Kraft *et al.* (2006), dass die Mikroevolution von *H. pylori* primär durch Sequenzvariation und nicht durch eine Aufnahme oder den Verlust von Genen generiert wird.

Im Allgemeinen sind Oberflächen-exponierte und sezernierte Proteine häufig polymorph (Li *et al.*, 1995). In der Tat sind zahlreiche Rekombinations- und Mutationsereignisse innerhalb der sequenziellen Paare detektiert worden, die in allen *babA*-positiven Stammpaaren zu Unterschieden in der BabA-Aminosäuresequenz führten und in fünf von acht Paaren zu unterschiedlichen SabA-Aminosäuresequenzen: In drei bzw. zwei Paaren führten ein oder mehrere Rekombinationsereignisse zusammen mit Punktmutationen zu Änderungen der *babA*- bzw. *sabA*-Sequenz und zu mehreren Aminosäure-Austauschen innerhalb der Paare und jeweils zwei Paare wiesen einen nicht-synonymen SNP im *babA*- und *sabA*-Gen auf. Bei den Rekombinationsereignissen handelt es sich sehr wahrscheinlich um intergenomische Rekombination zwischen unverwandten Stämmen während gemischter Kolonisierungen.

Bisherige Studien dokumentierten eine hohe genetische Heterogenität der Adhäsion-kodierenden Gene in unverwandten Isolaten (Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004; Aspholm *et al.*, 2006). Auf globaler Ebene ist für *H. pylori*-Stämme aus unterschiedlichen geographischen Regionen gezeigt worden, dass das *babA*-Gen hochvariabel ist und die Evolution des Gens hauptsächlich durch Rekombination angetrieben wird (Alm *et al.*, 1999; Pride *et al.*, 2001; Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). Für *sabA* ist bisher keine systematische Analyse der globalen Diversität durchgeführt worden. Die genetische Diversität von *babA* und *sabA* ist zwar in den sequenziellen Paaren geringer als zwischen den unverwandten Isolaten 26695 und J99, die Analyse der sequenziellen Isolate zeigt dennoch, dass Rekombination, die in Stämmen verschiedener Individuen zu einer hohen Alleldiversität der Adhäsion-kodierenden Gene geführt hat, auch *in vivo* innerhalb eines Wirtes sehr variable *babA*- und *sabA*-Sequenzen generieren kann. Solnick *et al.* (2004) zeigten zudem, dass es durch intragenomische Rekombination während der experimentellen Infektion von Rhesusaffen zu einem Verlust des *babA*-Gens kommen kann. Durch Duplikation von *babB*, einem zu *babA* homologen OMP-Gen mit noch unbekannter Funktion, in den *babA*-Locus, ist *babA* in den *babA*-positiven input-Stämme durch *babB* ersetzt worden. Die erfolgreiche Amplifikation eines zentralen *babB*-Fragmentes von den sequenziellen Isolaten, lässt vermuten, dass sich in dem *babB*-Gen keine genetischen Veränderungen, wie beispielsweise die Rekombination von *babA* in den *babB*-Locus, innerhalb der Paare ereigneten.

Für viele andere Pathogene spielen intragenomische Rekombination und horizontaler Gentransfer ebenfalls eine wichtige Rolle für die Entstehung polymorpher Gene, die für Adhäsine und OMPs kodieren. Studien, die unverwandte Stämme untersuchten, belegten, dass intergenomische Rekombination beispielsweise für die Evolution des Adhäsins Intimin von *E. coli*, der *opa*-Gene von *Neisseria meningitidis*, die für antigenisch variable OMPs kodieren und der *pmp*-Gene von *Chlamydia trachomatis* die für Membranproteine kodieren, ein entscheidender Mechanismus ist (McGraw *et al.*, 1999; Hobbs *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 2006). Hinsichtlich der genetischen Variabilität der Adhäsine oder OMPs anderer Spezies *in vivo* gibt es bislang nur wenige Studien. Zum Beispiel ist gezeigt worden, dass in *Mycoplasma genitalium* durch intragenomische Rekombination zwischen dem Adhäsion-Gen *mgpB* und den nah verwandten *MgPar*-Repeat-Sequenzen während der natürlichen Infektion variable Adhäsionsequenzen entstehen (Iverson-Cabral *et al.*, 2006) Weiterhin scheinen sich die *opa*-Gene von *N. gonorrhoeae* *in vivo* primär durch intergenomische Rekombination zu verändern (Martin *et al.*, 2003). Die genaue Funktion der genetischen Diversifikation ist wie für *H. pylori* nicht bekannt. Es wird jedoch auch hier vermutet, dass es sich um einen Anpassungsmechanismus handelt, wodurch die Bindungseigenschaften, die Antigenität oder der Gewebe-Tropismus der Bakterien äusseren Bedingungen angepasst wird.

Die Expression von *sabA* und vier weiteren OMP-Genen (*babB*, *sabB*, *hopZ* und *oipA*) wird aufgrund des CT-Repeats im 5'-Terminus der kodierenden Region vermutlich durch Phasenvariation reguliert. Bislang ist dies für das *babA*-Gen nach Rekombination in den *babB*-Locus und *hopZ*

experimentell bestätigt worden (Peck *et al.*, 1999; Bäckström *et al.*, 2004). Phasenvariation, die in diesen Genen durch „Slipped strand mispairing“ in den Dinukleotid-Repeats verursacht wird, ist ein Mechanismus, der zu einem hochfrequenten, reversiblen und wahrscheinlich zufälligen An- und Ausschalten von Genen bzw. Phänotypen führt. Lehours *et al.* (2004) analysierten den funktionellen Status von *sabA* in 82 unverwandten *H. pylori* Isolaten und zeigten, dass die Anzahl an CT-Einheiten in den Stämmen von drei bis zwölf variierte und ungefähr die Hälfte der Isolate einen „AN“-Genstatus von *sabA* besaßen, während die anderen Isolate ein vorzeitiges Stoppcodon besaßen. In unserer Studie wiesen die verschiedenen Stammpaare eine ähnliche Variation der CT-Einheiten auf (2-11). Mit Ausnahme eines Isolats war das *sabA*-Gen „AN“. Ein Stammpaar unterschied sich in der Länge des CT-Repeats und die Insertion von einer CT-Einheit in dem zweiten Isolat führte zu einer Verschiebung des Leserasters und zu einem vorzeitigen Stopp der Translation. Dies zeigt, dass die Variation der Repeatlänge in *sabA*, die in Stämmen verschiedener Wirte detektiert wurde, auch *in vivo* stattfindet und eine durch Phasenvariation generierte Modulation der Adhärenzeigenschaften von *H. pylori* möglich ist. Das metastabile An- und Ausschalten des SabA-Adhäsins in einem Stamm erlaubt die Ausbildung von Subpopulationen mit unterschiedlichem Bindungsverhalten an sLe<sup>x</sup> und somit eine dynamische Regulation der Intensität der Bindung an das Epithel. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zur *in vivo*-Variation von *babA* und *sabA* weisen Parallelen zu Phasenvariationsereignissen auf, die für die Gene *hopZ* und *babB* von *H. pylori*, die ebenfalls für OMPs kodieren, während der experimentellen Infektion von Mäusen beobachtet wurden (Salaün *et al.*, 2005). Die Mäuse wurden mit Stämmen infiziert, die einen offenen *hopZ*- und *babB*- Leserahmen besaßen (AN) und nach 360 Tagen der Infektion wiesen beide Gene einen AUS-Phänotyp auf. Phasenvariation ist in vielen pathogenen Bakterien vor allem für Gene, die für Proteine kodieren, die an der Interaktion mit dem Wirt involviert sind, beschrieben worden und hat vermutlich eine adaptive Funktion (Weiser *et al.*, 1998; Prendergast *et al.*, 2004; Rytönen *et al.*, 2004). Die durch Phasenvariation generierte, hochfrequente Diversität führt dazu, dass ein Teil der Bakterien einen Phänotyp besitzt, der bereits veränderten Bedingungen angepasst ist, wenn diese sich ändern (Dybvig, 1993). Für *H. pylori* spielt Phasenvariation als Mechanismus zum An- und Abschalten von Genen, vermutlich eine entscheidende Rolle, da sie eine Alternative zu dem Mangel an Zwei-Komponenten-Regulationssystemen in *H. pylori* (Beier & Frank, 2000) darstellen könnte.

Da die Adhäsine einerseits Ziele des Immunsystems und andererseits Virulenzfaktoren von *H. pylori* darstellen, handelt es sich bei den Änderungen der *babA*- und *sabA*-Sequenzen in einem Paar sehr wahrscheinlich um Anpassungsmechanismen während der Infektion. Es kann allerdings nicht eindeutig bestimmt werden, ob das zweite Isolat, welches in einem bestimmten Zeitraum nach dem ersten Isolat entnommen wurde, schon vor der Entnahme vorhanden war, oder ob sich die genetischen Unterschiede in dem Zeitraum in dem ersten Isolat entwickelten und zu dem zweiten Stamm führten. Die Sequenzunterschiede der Adhäsinkodierenden Gene innerhalb eines Paares könnten sich daher entweder während der Infektion entwickelt haben, oder die Isolate befanden sich gleichzeitig im Wirt. Für die hier

durchgeführten Analysen war die Bestimmung der Geschwindigkeit von genetischen Veränderungen nicht relevant. Es ist vielmehr von Bedeutung, dass die Ergebnisse eindeutig belegen, dass Stämme mit unterschiedlichen, durch Rekombinations- und Mutationsereignisse generierten, BabA- und SabA-Aminosäuresequenzen in einem Individuum vorkommen können.

### 5.2.2. Die Adhäsion-kodierenden Gene *babA* und *sabA* unterliegen einem positiven Selektionsdruck

Die unter 5.2.1. beschriebene hohe Frequenz von beobachteten Rekombinationsereignissen und Mutationen in *babA* und *sabA* spricht für die Hypothese, dass während der Kolonisierung positive Selektion auf die Adhäsine wirkt. Daher ist in dieser Arbeit untersucht worden, unter welchen selektiven Bedingungen sich die Adhäsion-kodierenden Gene *babA* und *sabA* im Vergleich zu Housekeeping-Genen entwickeln. Hierzu wurden auf Nukleotid-Ebene die synonymen und nicht-synonymen Substitutionen analysiert, da im Gegensatz zur Analyse auf Aminosäuresequenz-Ebene (Gu & Vander Velden, 2002) die Analyse auf Nukleotid-Ebene, eine simultane Detektion von negativer, neutraler und positiver Selektion ermöglicht. Für die Analyse der *babA*- und *sabA*-Sequenzen der sequenziellen Isolate wurden zum Vergleich zusätzlich die Sequenzen von ausschliesslich unverwandten *H. pylori*-Stämmen herangezogen. Die Analyse führte zu dem Ergebnis, dass die zentrale Region der Adhäsine BabA und SabA (vgl. 1.4.2.) geringeren funktionellen Zwängen unterliegt und durch einen diversifizierenden Selektionsdruck bzw. durch vermehrte Fixierung nicht-synonymer Substitutionen schneller evolviert als die analysierten Fragmente der Housekeeping-Gene, die einem negativen Selektionsdruck unterliegen.

Ein Vergleich der absoluten Anzahl an SNPs in allen zusammengefassten Housekeeping-Genen mit der aller zusammengefassten *babA*- und *sabA*-Sequenzen der Isolate lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass die metabolischen Proteinsequenzen konservierter sind als die Adhäsionsequenzen. Die Anzahl der gesamten SNPs und synonymen SNPs war in den Housekeeping-Gensequenzen deutlich geringer als in den Adhäsion-Gensequenzen. Vor allem war die Frequenz der nicht-synonymen SNPs in den metabolischen Nukleotidsequenzen um mehr als die Hälfte geringer als die Frequenz in den zusammengefassten *babA*- und *sabA*-Sequenzen. Dieser Unterschied wird weiterhin durch die Berechnung der über die gesamte Gensequenz gemittelten  $K_a/K_s$ -Quotienten bestätigt. Die  $K_a/K_s$ -Quotienten von *babA* und *sabA* ergaben für beide Gene einen fast identischen Wert (*babA*: 0,24; *sabA*: 0,25). Die synonymen und nicht-synonymen Mutationsraten, sowie die  $K_a/K_s$ -Quotienten für *babA* und *sabA* der sequenziellen Isolate waren zudem mit den Ergebnissen der unverwandten Stämme vergleichbar. Die teilweise hohe genetische Verwandtschaft der sequenziellen Isolate hatte somit keinen

Effekt auf die Bestimmung der  $K_a$ - und  $K_s$ -Raten. Im Vergleich zu *babA* und *sabA* wiesen die Housekeeping-Gensequenzen einen  $K_a/K_s$ -Quotienten auf, der um das vierfache geringer war. Die Fixierungsrate synonyme und/oder nicht-synonyme Mutationen scheint demnach in den Adhäsinkodierenden Genen deutlich höher zu sein. Achtman *et al.* (1999) ermittelten für dieselben Housekeeping-Gene einer globalen Stammkollektion für jedes Gen das  $K_s/K_a$ -Verhältnis, das von 8,6 für das Gen *trpC* bis 49,6 für das *atpA*-Gen variierte. Der für alle Gene gemittelte  $K_s/K_a$ -Quotient von 24 entsprach ungefähr dem in unserer Analyse für alle Housekeeping-Gene der sequenziellen Stämme gemitteltem  $K_s/K_a$ -Quotienten von 16,4. Die fast identischen  $K_s/K_a$ -Quotienten von *babA* (0,24) und *sabA* (0,25) deuten ferner darauf hin, dass beide Adhäsine einem vergleichbaren Selektionsdruck unterliegen. Die Berechnung des  $K_a/K_s$ -Quotienten der zentralen variablen *babA*-Region von 42 Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft führte zu einem höheren Wert von 0,42 (Pride *et al.*, 2001). Ein Kriterium besagt, dass Gene mit einem  $K_a/K_s$ -Quotienten kleiner als 1 einer negativen Selektion und Gene mit einem Quotienten grösser als 1 einer adaptiven, positiven Selektion unterliegen (Crandall *et al.*, 1999). Demzufolge würden entwickeln sich *babA*, *sabA* und die für metabolische Proteine kodierenden Gene unter einem negativen Selektionsdruck, da sie einen deutlich geringeren Quotienten als 1 aufweisen.

Wie bereits beschrieben, würde ein  $K_a/K_s$ -Quotient von grösser als 1 auf positive Selektion hinweisen. Dies ist ein sehr stringentes Kriterium, da es sich um einen Mittelwert aller Aminosäure-Positionen handelt und die Detektion einzelner Position unter adaptiver Selektion durch die Mittelung der  $K_a$ - und  $K_s$ -Werte nur bedingt möglich ist. *BabA* und *SabA* sind Membranproteine, die sehr wahrscheinlich einerseits aus strukturell bedeutenden und konservierten Region(en) bestehen, die das Protein in der äusseren Bakterienmembran verankern und andererseits exponierte und variable Bereiche für die Bindung des Rezeptors aufweisen, die vermutlich tolerant gegenüber funktionellen Zwängen sind (Alm *et al.*, 2001; Glaser *et al.*, 2003; Melamed *et al.*, 2004). Folglich wurden die synonymen und nicht-synonymen Substitutionsraten für jede Aminosäure-Position bestimmt. In der Tat wurden mittels der „sliding window“-Analyse in beiden Adhäsinen der sequenziellen Isolate in der zentralen Region mehrere Bereiche identifiziert, die einen  $K_a/K_s$ -Quotienten von grösser als 1 aufwiesen, die auf adaptive Selektion hindeuten. Diese Peaks waren von kurzen Bereichen mit einem Quotienten von kleiner als 0,5 unterbrochen, die demnach einer hohen negativen Selektion unterliegen. Der Vergleich der Variation der Quotienten von *babA* und *sabA* der sequenziellen Isolate mit der der unverwandten Stämme offenbarte, dass die Positionen der Peaks hoher Quotienten (>1) und vor allem die Peaks mit einem Quotienten von kleiner als 0,5 in beiden Stammgruppen für jeweils *babA* und *sabA* nahezu identisch waren. Dies lässt darauf schliessen, dass die detektierten konservierten und variablen Positionen in den sequenziellen und unverwandten Stämmen Protein-spezifisch sind. Die Ergebnisse von *BabA* stimmen mit einer vorherigen Studie überein, in der die variable Mittelregion von *babA* aus 66 Isolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft untersucht wurde (Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). Anhand der Maximum-Likelihood-Analyse, mit der sich nur Positionen unter adaptiver Selektion bestimmen lassen, wurden

ebenfalls mehrere Aminosäuren (23) unter diversifizierender Selektion identifiziert. Eine genaue Aussage über den evolutionären Druck, der auf die übrigen Aminosäuren in dieser Region wirkt, lässt sich mit dieser Methode jedoch nicht treffen. Die Substitutionsraten der Regionen ausserhalb des zentralen, variablen Bereichs von BabA und SabA sind bislang noch nicht untersucht worden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der C und N-Terminus von BabA und SabA durchgehend einen  $K_a/K_s$ -Quotienten von kleiner 1 und überwiegend einen Quotienten von kleiner 0,5 aufweisen, der auf eine starke negative Selektion schliessen lässt. Die positiv selektierten Aminosäuren befinden sich demnach nur im zentralen Bereich der BabA- und SabA-Aminosäuresequenzen. Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um den extrazellulären Bereich der Adhäsine handelt, der in die Bindung an die jeweiligen Rezeptoren Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> involviert ist und direkt mit dem Wirt interagiert. Positive Selektion in dieser Region könnte bewirken, dass die Funktion der Adhäsine oder deren Antigenität diversifiziert wird, wodurch eine Anpassung des Proteins/Bakteriums an den Wirt und an veränderte Bedingungen während der Infektion erreicht werden würde. Die „sliding window“-Analyse zeigte, dass die Aminosäuren in dieser Region von BabA und SabA, die einem diversifizierenden Selektionsdruck unterliegen, durch Aminosäuren unter negativer oder neutraler Selektion in der Primärsequenz voneinander getrennt sind. Es wäre jedoch möglich, dass sie in der dreidimensionalen Struktur, die weder für BabA noch für SabA bekannt ist, als Bindungsepitope zusammenliegen. So wurde zum Beispiel für Gene der Major Histocompatibility Klasse I-Komplexe gezeigt, dass die Positionen unter positiver Selektion in der primären Sequenz verteilt sind, allerdings in der dreidimensionalen Struktur als Cluster vorliegen (Yang & Swanson, 2002). Aufgrund der amphipathischen Aminosäure-Motive im C-Terminus der grösseren Adhäsine der Hop- und Hof-Familie, wie BabA und SabA, wird vermutet, dass dieser Bereich des Proteins und eventuell auch der N-Terminus Transmembran-Domänen darstellen (Alm *et al.*, 2001). Die hier detektierte reinigende Selektion des N- und C-Terminus unterstützt diese Vermutung, da der Austausch von Aminosäuren die Hydrophobizität der Transmembrandomänen verändern könnte und einen zu grossen Effekt auf die Verankerung in der Membran hätte. Ähnliches würde für den N-Terminus gelten, in dem sich zusätzlich die Signalpeptid-Region befindet. Obwohl eine beträchtliche Variation der Sequenz in den Hop-, Hof- und Hof-Proteinen erlaubt ist (Alm *et al.*, 2000), könnten nicht-synonyme Mutationen dazu führen, dass die Signalsequenz von der Sec-Sekretionsmaschinerie nicht mehr erkannt wird. Die Variation der  $K_a/K_s$ -Quotienten im N- und C-Terminus und in der zentralen Region von BabA und SabA reflektiert daher sehr wahrscheinlich die Funktion der unterschiedlichen Bereiche der Adhäsine.

Die ausschliessliche Lokalisation von Aminosäuren unter adaptiver Selektion in der zentralen, möglichen extrazellulären Bindungsdomäne von BabA und SabA, bestätigt vorherige Studien, in denen der Effekt der natürlichen Selektion auf äussere Membranproteine in anderen Bakterienarten untersucht wurde. So befinden sich Aminosäuren, die einer positiven Selektion unterliegen, ausschliesslich in den exponierten Bereichen des Porins PorB in *Neisseria meningitidis* (Urwin *et al.*, 2002). Petersen *et al.* (2007) beschrieben durch strukturelle Analysen, dass in *E. coli* positiv selektierte Aminosäuren fast

ausschliesslich in den extrazellulären Regionen mehrerer Porine lokalisiert sind, welche Zielmoleküle für Phagen und das Immunsystem des Wirtes darstellen. Ebenfalls ist für *E. coli* gezeigt worden, dass sich die Mehrheit der nicht synonymen Mutationen in dem periplasmatischen und dem extrazellulären C-Terminus des Adhäsins Intimin befinden (Tarr & Whittam, 2002). Da der C-Terminus in die Bindung an Wirtszellen involviert ist (Liu *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2000), lässt die genetische Diversität auf eine funktionelle Bedeutung schliessen.

Eine Analyse der genetischen Diversität von *babA* aus 42 unverwandten Isolaten zeigte, dass Rekombination in *babA* stattfindet und die Rekombinationsfrequenz zudem sehr hoch ist (Pride *et al.*, 2001). Die multiplen Alignments von *babA* und *sabA*, sowie der Sequenzvergleich innerhalb der sequenziellen Paare zeigten, dass Rekombination auch in den hier verwendeten Stämmen stattgefunden hat. Vermutlich wird die Protein-Divergenz von BabA und SabA durch Rekombination und (episodische) positive Selektion angetrieben. Die Möglichkeit, dass genetische Drift bzw. Neutralität (Kimura, 1983b) allein die Grundlage für die Diversität von *babA* und *sabA* ist, ist sehr unwahrscheinlich, da durch die zufällige Fixierung von synonymen und nicht-synonymen Substitutionen die positionsspezifischen Unterschiede der  $K_s$ - und  $K_a$ -Werte in *babA* und *sabA* nicht erklärbar sind. Ob Selektion genetische Drift begünstigt oder nur aus durch genetische Drift oder Rekombination entstandenen Variationen auswählt, ist schwer zu beurteilen. In einem *in vitro*-Experiment mit *Salmonella enterica* ist beschrieben worden, dass die selektiven Bedingungen nicht die Mutationsrate erhöhen, sondern das Wachstum von angepassten Bakterien fördern (Kugelberg *et al.*, 2006).

Fünf der sieben Housekeeping-Genfragmente wiesen in der „sliding window“-Analyse durchgehend einen  $K_a/K_s$ -Quotient von kleiner als 0,6 auf. In den *trpC*- und *yphC*-Genen wurde jeweils ein sehr kurzer Bereich mit einem  $K_a/K_s$ -Quotienten von grösser als 1 detektiert, der auf adaptive Selektion hindeutet. Es handelt sich bei TrpC und YphC um metabolische Proteine, die nicht direkt mit dem Wirt interagieren. Diversifizierende Selektion hat in diesem Fall vermutlich keinen direkten Effekt auf die Pathogenität oder Antigenität, könnte aber eine Selektion für verbesserte metabolische Funktionen repräsentieren. Für einen *E. coli*-Stamm ist allerdings auch beschrieben worden, dass eine Mutation in dem *cad*-Operon, welches für das metabolische Lysin-Decarboxylase-System kodiert, einen Effekt auf die Adhärenz der Bakterien bzw. auf die Pathogenität hat (Torres *et al.*, 2005) und ebenso ist für *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben worden, dass die Malat-Synthase als Laminin-bindendes Adhäsion fungieren kann (Kinhikar *et al.*, 2006). In einer vorherigen Studie sind weitere 13 Gene in den Genomen 26695 und J99 identifiziert worden, die für metabolische Proteine kodieren und sich unter adaptiver Selektion entwickeln (Davids *et al.*, 2002). Ein potenzieller Einfluss dieser Proteine auf die Virulenz ist jedoch nicht untersucht worden.

### 5.2.3. Quantitative Bindungsunterschiede von *H. pylori* an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> während der Infektion

Sowohl die Hinweise auf positive Selektion in den zentralen Regionen von BabA und SabA, sowie die Änderungen der BabA- und SabA-Sequenz bei den sequenziellen Isolaten weisen auf eine funktionelle Bedeutung der Alleldiversität in *babA* und *sabA* hin. Da zudem die Adhärenz von *H. pylori* an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> während der Kolonisierung des Magens des Menschen bislang nicht untersucht worden ist, wurde ein *in vitro*-Bindungsassay entwickelt, mit dem sich die Bindung der Isolate an die Rezeptoren quantifizieren lässt. Insgesamt wiesen die Stämme eine sehr hohe Variabilität in der Bindung an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> auf. Vier Paare adhärten nicht an Le<sup>b</sup> und drei nicht an sLe<sup>x</sup>. Von den Stammpaaren, von denen ein Isolat oder beide an Le<sup>b</sup> (vier Paare) und/oder sLe<sup>x</sup> (fünf Paare) banden, wiesen drei Paare signifikant veränderte Bindungseigenschaften an Le<sup>b</sup> auf und drei Paare signifikante Unterschiede in der Adhärenz an sLe<sup>x</sup>.

Nicht alle sequenziellen Stämme adhärten an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup>. Wie bereits erwähnt, waren die Isolate von drei Paaren *babA*-negativ und wiesen auch keine Bindung an Le<sup>b</sup> auf. Dies bestätigt vorherige Studien, die zeigten, dass *babA*-negative Bakterien nicht an Le<sup>b</sup> adhärten, wodurch zudem die Spezifität der Bindung von BabA an Le<sup>b</sup> bestätigt wird. Die Stämme eines weiteren *babA*-positiven Paares adhärten ebenfalls nicht an den Rezeptor. Dies könnte zum einen auf eine fehlende Expression des Gens oder auf sequenzspezifische Eigenschaften des Adhäsins zurückzuführen sein. Sämtliche Isolate besaßen das *sabA*-Gen. Es wurden auch drei Paare, bei denen beide Stämme nicht an sLe<sup>x</sup> adhärten, identifiziert. Bei diesen Paaren handelte es sich um Paare, die auch nicht an Le<sup>b</sup> adhärten. In drei Individuen sind folglich Isolate identifiziert worden, die weder an Le<sup>b</sup> noch an sLe<sup>x</sup> adhärten. Eine Analyse der Bindungseigenschaften von unverwandten europäischen *H. pylori* Isolaten ergab ebenfalls, dass nicht alle untersuchten Stämme an die Rezeptoren adhärten: von 95 Stämmen adhärten 66% an Le<sup>b</sup> und 37% an sLe<sup>x</sup> (Ilver *et al.*, 1998; Mahdavi *et al.*, 2002). In vier Individuen sind Stämme mit signifikanten Unterschieden der Adhärenz an Le<sup>b</sup> und/oder sLe<sup>x</sup> detektiert worden. In einem Wirt adhärte das erste Isolate an beide Rezeptoren, das zweite Isolat hingegen, welches in einem Abstand von zwei Jahren entnommen wurde, verlor die Fähigkeit an Le<sup>b</sup> und auch an sLe<sup>x</sup> binden. Der zweite Stamm aus einem weiteren Individuum wies im Vergleich zum ersten eine signifikant erhöhte Adhärenz an Le<sup>b</sup> auf und eine nicht signifikante veränderte Bindung an sLe<sup>x</sup>. In dem dritten Wirt adhärte das zweite Isolat signifikant verringert an Le<sup>b</sup> und signifikant erhöht an sLe<sup>x</sup>. Die beiden Stämme aus dem vierten Individuum adhärten zwar an Le<sup>b</sup>, eine reproduzierbare Quantifizierung der Bindung an Le<sup>b</sup> war aber für diese Stämme nicht möglich. Das zweite Isolat dieses Paares adhärte signifikant höher an sLe<sup>x</sup> als das erste. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die natürliche Kolonisierung positiv- und negativ-adhärenente Phänotypen, sowie einen Verlust, eine Verringerung oder Erhöhung der Bindung an Le<sup>b</sup> und sLe<sup>x</sup> beinhaltet. Hierbei ist zu bedenken, dass nicht nur signifikante Veränderungen der

Bindung an die Rezeptoren, sondern auch nicht signifikante, geringfügige Änderungen für die Anpassung von Bedeutung sein können. Anhand der Analyse der sequenziellen Isolate konnte somit gezeigt werden, dass Stämme mit stark variierenden Bindungseigenschaften an  $Le^b$  und  $sLe^x$  auch während der natürlichen Infektion in einem Wirt vorhanden sein können.

Die hohe Variabilität der Adhärenzeigenschaften der sequenziellen Isolate reflektiert vermutlich die komplexe und dynamische Interaktion der Bakterien mit dem Wirt. Aufgrund der Immunreaktion, der Immunerkennung, sowie der zeitlichen und räumlichen Änderungen der Wirtsstrukturen während der Infektion, stellt ein variabler Bindungsphänotyp für *H. pylori* sehr wahrscheinlich einen selektiven Vorteil dar. Die Expression von  $Le^b$  ist zum Beispiel auf die Mukus-produzierenden Zellen begrenzt (Boren *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu  $Le^b$ , das auf dem gesunden Epithelzellen des Magens exprimiert wird, ist die Expression von sialylierten Konjugaten auf den Epithelzellen des Magens gering (Filipe, 1979; Madrid *et al.*, 1990). Die Expression von fukosylierten Blutgruppen-Antigenen sinkt während der Entzündungsreaktion und sialinsäurehaltige Kohlenhydrate wie  $sLe^x$  werden auf dem entzündeten Gewebe verstärkt exprimiert (Madrid *et al.*, 1990). Tumorzellen weisen ebenfalls eine sehr hohe Expression an sialylierten Konjugaten auf, wie beispielsweise  $sLe^a$  (Hakomori *et al.*, 1999; Amado *et al.*, 1998). Zusätzlich kann die gastrische Epithelzellschicht durch Entzündungsreaktionen zerstört werden. Hierdurch wird die extrazelluläre Matrix freigelegt, die wiederum andere Strukturen auf der Oberfläche exprimiert als die Epithelzellen. Auch bei sich nicht verändernden Strukturen auf der Oberfläche der Wirtszelle können flexible Bindungseigenschaften für die Persistenz essentiell sein. Eine unveränderte und auch eine erhöhte Adhärenz an  $Le^b$  und/oder  $sLe^x$  in den sequenziellen Isolaten könnte darauf hinweisen, dass ein enger Kontakt mit den Wirtszellen vorteilhaft ist und die lokale Immunantwort sehr schwach ist. Stämme, die nicht oder nur schwach an einen oder beide Rezeptoren binden, können sich vermutlich leichter von den Epithelzellen lösen und so einer Immunantwort ausweichen. Guruge *et al.* (1998) beschrieben, dass die Infektion von  $Le^b$ -produzierenden Mäusen mit *H. pylori* zu einem schwerwiegenderen Krankheitsbild führte, als in Mäusen, die den Rezeptor nicht exprimieren. Ein nicht adhärenter Stamm wäre daher gleichbedeutend mit einem weniger virulentem Stamm und es ist vorstellbar, dass *H. pylori* die Bindung an  $Le^b$  und/oder  $sLe^x$  vorübergehend verringert und dadurch die Aktivierung des Immunsystems verringert wird. Aufgrund der Tatsache, dass *H. pylori* ein grosses Repertoire an putativen OMPs besitzt (Alm *et al.*, 2001), ist es zudem sehr wahrscheinlich, dass weitere Adhäsine mit anderen Bindungsspezifitäten eine Adhärenz an die Wirtszellen vermitteln. Unterstützt wird diese Vermutung durch Studien, die beschrieben, dass *H. pylori* an zahlreiche weitere Moleküle bindet, wie beispielsweise Collagen, Fibronectin, Laminin und Heparansulfat, deren bakterieller Interaktionspartner bislang unbekannt ist (Trust *et al.*, 1991; Ascencio *et al.*, 1993; Valkonen *et al.*, 1993).

Um zu überprüfen, ob sich die nachgewiesenen Veränderungen in der Fähigkeit zur Bindung an  $Le^b$  und/oder  $sLe^x$  auch in einem Zellkulturmodell als Veränderung der Adhärenz manifestieren, wurde die Adhärenz der sequenziellen Isolate an die Magenepithelzelllinie AGS überprüft. Alle Stämme adhärten an die AGS-Zellen. Auch Isolate, die nicht an  $Le^b$  oder  $sLe^x$  oder an beide Rezeptoren adhären, wiesen eine Bindung auf. Innerhalb der sequenziellen Paare sind zwar Unterschiede in der Adhärenz detektiert worden, eine Korrelation zu den  $Le^b$ - und  $sLe^x$ -Bindungseigenschaften war jedoch nicht nachzuweisen. Die Bindung von *H. pylori* an AGS-Zellen ist daher vermutlich unabhängig von den  $Le^b/sLe^x$ -Epitopen. Die von der BabA- $Le^b$ -Interaktion unabhängige Bindung an AGS-Zellen bestätigt die Ergebnisse einer Studie, in der die Adhäsion von *H. pylori* Wildtyp-Stämmen an acht Zelllinien untersucht wurde (Su *et al.*, 1998). Die  $Le^b$ -Expression der Zellen wurde ebenfalls analysiert und es zeigte sich, dass *H. pylori* nicht nur an AGS-Zellen, die  $Le^b$  schwach exprimieren, bindet, sondern auch an  $Le^b$ -negative Zelllinien. Daher scheint die Untersuchung der Adhärenz der sequenziellen Isolate an die Zelllinie nicht geeignet zu sein. Es ist geplant, die Veränderung der Bindungsfähigkeit der Isolate an Gewebeschnitten des Magens und im Tiermodell zu analysieren.

#### 5.2.4 Phänotypische Konsequenzen der allelischen Variabilität von *babA* und *sabA*

Die Sequenzierung der Adhäsingene *babA* und *sabA* für die sequenziellen Paare zeigte zahlreiche Unterschiede in den Nuklein- und Aminosäuresequenzen. Daher war es interessant, die Auswirkungen der Sequenzunterschiede auf die Funktion der Adhäsine zu untersuchen.

Die Isolate eines Paares mit identischen *sabA*-Sequenzen zeigten auch keine Unterschiede in der Adhärenz an  $sLe^x$ . Umgekehrt zeigten Paare mit Sequenzveränderungen in BabA und/oder SabA auch signifikante Unterschiede in ihrer Bindung an  $Le^b$  und/oder  $sLe^x$ . Dies lässt auf einen Zusammenhang der Sequenzeigenschaften der Adhäsine und deren Funktion schließen. Da variierende Bindungseigenschaften der Adhäsine von dem Expressionsniveau von *babA* und *sabA* beeinflusst werden können, wurden zudem die Transkriptmengen durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. Mit Ausnahme eines Isolats wurde in allen *babA*-positiven Stämmen *babA*-Transkript nachgewiesen. In Übereinstimmung hierzu zeigten Boonjakuakul *et al.* (2004) durch direkte RNA-Isolierung aus der infizierten Mukosa des Magens, dass *babA* *in vivo* exprimiert wird. Desgleichen exprimierten bis auf ein Isolat alle Stämme *sabA*. Die Stämme, in denen kein *babA*- und/oder *sabA*-Transkript nachgewiesen wurde, adhärten auch nicht an den entsprechenden Rezeptor. Bei fünf Stämmen, die *sabA* exprimierten, und einem Stamm, der *babA* exprimierte konnte keine Adhärenz  $sLe^x$  bzw.  $Le^b$  nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits mit der Proteinsequenz bzw. -struktur zusammenhängen, die die Interaktion mit dem Rezeptor verhindert. Andererseits könnte dies darauf hindeuten, dass noch weitere Faktoren, wie beispielsweise der Transport des Proteins zur äußeren Membran oder die Interaktion mit anderen

Proteinen für eine korrekte Ausrichtung in der Membran hier eine Rolle spielen. In den Isolaten von drei Paaren sind gleiche *babA*-Transkriptmengen detektiert worden. Diese Paare wiesen einen oder mehrere Aminosäure-Austausche der BabA-Sequenz und signifikant veränderte Bindungseigenschaften an Le<sup>b</sup> auf. Entsprechendes gilt für *sabA* und die Adhärenz an sLe<sup>x</sup> von zwei Stammpaaren. Die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Isolate dieser Paare sind daher vermutlich nicht auf variierende Expressionsniveaus der Adhäsins-kodierenden Gene zurückzuführen, sondern sind wahrscheinlich durch die Rekombinations- und Mutationsereignisse in *babA* und *sabA* erzeugt worden.

Für das Stammpaar LSU1014 wurde ein möglicher funktioneller Effekt der Sequenzvariabilität von BabA auf den Verlust der Adhärenz an Le<sup>b</sup> des zweiten Isolates näher untersucht, indem das gesamte *babA*-Gen aus dem Le<sup>b</sup>-adhärenten Stamm LSU1014-1 amplifiziert und in den nicht adhären Stamm LSU1014-6 transformiert wurde. Falls die unterschiedlichen Bindungsphänotypen der beiden Isolate auf die Unterschiede in der Aminosäuresequenz von BabA zurückzuführen sind, sollte der Einbau des *babA*-Gens aus dem Stamm LSU1014-1 in das Genom von LSU1014-6 einen an Le<sup>b</sup> adhären Stamm LSU1014-6 erzeugen. In der Tat konnte hierdurch die Bindung des Stamms LSU1014-6 an Le<sup>b</sup> wiederhergestellt werden. Zwei LSU1014-6<sub>*bab*ALSU1014-1</sub>-Klone integrierten das gesamte *babA*-Gen des Stamms LSU1014-1 in das Genom, besaßen eine zum Stamm LSU1014-1 identische BabA-Sequenz und adhärten an Le<sup>b</sup>. Da für die Transformation nur die kodierende Region von *babA* verwendet wurde, wird das Gen aus dem Stamm LSU1014-1 in den beiden Klonen unter dem Promotor des Stamms LSU1014-6 exprimiert. Dies ist zusätzlich zu den gleichen *babA*-Transkriptmengen in den Isolaten LSU1014-1 und LSU1014-6 ein weiterer Hinweis darauf, dass unterschiedliche *babA*-Expressionsniveaus in den Stämmen LSU1014-1 und LSU1014-6 nicht der Grund für die verschiedenen Bindungsphänotypen der Stämme sind. Die zwei LSU1014-6<sub>*bab*ALSU1014-1</sub>-Klone besaßen identische BabA-Sequenzen und wiesen ein fast identisches Bindungsverhältnis auf. Dies verdeutlicht zusätzlich, dass die Adhärenz an Le<sup>b</sup> in den Klonen durch den Einbau der *babA*-Sequenz aus dem Stamm LSU1014-1 verursacht wird. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Verlust der Bindung an Le<sup>b</sup> des Isolats LSU1014-6 eine inhärente Eigenschaft der BabA-Aminosäuresequenz/-struktur ist. Die durch Rekombination und Mutation hervorgerufene allelische Diversität von *babA* bedingt demnach quantitativ unterschiedliche Le<sup>b</sup>-Bindungsphänotypen und ist somit von funktioneller Relevanz. Die BabA-Sequenz des Isolates LSU1014-6 unterschied sich durch mehrere Aminosäureaustausche von der Sequenz des Stamms LSU1014-1 und die Mehrheit der LSU1014-6-spezifischen Aminosäuren, wies zudem andere physikochemische Eigenschaften auf als die LSU1014-6-spezifischen Aminosäuren. Daher könnte der Verlust der Le<sup>b</sup>-Bindung des Isolates LSU1014-6 darauf zurückzuführen sein, dass LSU1014-6-spezifische Aminosäuren in der Region von BabA lokalisiert sind, die die Bindung an den Rezeptor vermittelt und diese Aminosäuren bzw. deren physikochemische Eigenschaften die Erkennung, Affinität und/oder Bindung an Le<sup>b</sup> verhindern. Anstelle oder zusätzlich hierzu wäre auch ein Effekt der spezifischen Aminosäuren im C-terminalen Bereich von BabA auf die Interaktion des Adhäsins mit dem

Rezeptor denkbar. Aufgrund des vorzeitigen Stoppcodons am 3'-Ende des Gens besitzt die Proteinsequenz des Isolats LSU1014-6 zwölf stammspezifische aufeinanderfolgende Aminosäuren und ist zudem um sieben Aminosäuren kürzer als das BabA des Stamms LSU1014-1. Diese Sequenzunterschiede befinden sich höchstwahrscheinlich in dem Bereich des Proteins, der in der äusseren Membran verankert ist und die Adhärenz des Stamms LSU1014-6 an den Rezeptor könnte indirekt durch eine veränderte Verankerung in der Membran bzw. durch Konformationsänderungen des gesamten Proteins, die sich wiederum auf die Konformation des Bindungsepitops auswirken, beeinträchtigt werden. Die beiden Klone des Stamms LSU1014-6, die das gesamte *babA*-Gen aus dem Stamm LSU1014-1 inkorporierten, wiesen eine signifikant höhere Adhärenz an Le<sup>b</sup> auf, als das LSU1014-1-Isolat, dessen *babA*-DNA für die Transformation verwendet wurde. Die Ursachen hierfür sind nicht bekannt. Eine mögliche Rekombination von *babA* in den Locus von *babB* (Bäckström *et al.*, 2004) als theoretisch denkbarer alternativer Mechanismus der erhöhten *babA*-Expression in den Klonen, hat vermutlich nicht stattgefunden, da ein internes *babB*-Fragment mit spezifischen *babB*-Primern erfolgreich amplifiziert werden konnte. Das für die Transformation verwendete komplette *babA*-Gen des Stamms LSU1014-1 wurde mit Primern amplifiziert, durch die vermutlich auch die Amplifikation eines weiteren, zu *babA* homologen OMP-kodierenden Gens (HP0317) mit unbekannter Funktion ermöglicht wurde. Da die Bindung von *H. pylori* an Le<sup>b</sup> ausschliesslich durch BabA vermittelt wird, ist die signifikant höhere Adhärenz der Klone sehr wahrscheinlich nicht auf eine zusätzliche Inkorporation des Gens HP0317 zurückzuführen.

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass Rekombination und Mutation im *babA*-Gen quantitativ unterschiedliche Bindungseigenschaften des Adhäsins innerhalb eines Wirts während der Infektion erzeugen können. Diese Befunde sind mit Ergebnissen vorheriger Studien konsistent, die die allelische und funktionelle Diversität von *babA* in *in vitro*-Experimenten, im Tiermodell und in unverwandten Isolaten untersucht haben. Bäckström *et al.* (2004) beschrieben, dass das *babA*-Gen des Stamms CCUG17875, welches aufgrund eines fehlenden Translationstartcodons nicht exprimiert wird, *in vitro* in den *babB*-Locus rekombinieren kann. Hierdurch entstand ein chimäres *babA/babB*-Gen, es konnte BabA gebildet und die Adhärenz an Le<sup>b</sup> wiederhergestellt werden. Weiterhin kann während der experimentellen Infektion von Rhesusaffen *babB* in den *babA*-Locus rekombinieren; der Verlust des *babA*-Gens führte zu einem Verlust der Adhärenz an Le<sup>b</sup> (Solnick *et al.*, 2004). Ob während der Infektion der Makaken die Deletion von *babA* oder die Duplikation von *babB* favorisiert wird, oder beides, bleibt zu untersuchen. Die Autoren identifizierten in vier von zwanzig klinischen Isolaten aus dem Menschen ebenfalls eine Duplikation von *babB* und das Fehlen des *babA*-Gens. Desweiteren ist gezeigt worden, dass die allelische Diversität von *babA* in unverwandten Isolaten auch qualitativ veränderte Bindungseigenschaften des Adhäsins generieren kann. Von 188 *H. pylori*-Isolaten von Europäern, Japanern und Inuit adhärten 95% an Le<sup>b</sup> und an ALe<sup>b</sup>, die als Bindungsgeneralisten („generalist binders“) bezeichnet werden (Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). Im Gegensatz hierzu wiesen 40% von 77 südamerikanischen Stämmen

(Amerind, Mestizo) ein engeres Bindungsspektrum auf und adhären ausschließlich an Le<sup>b</sup> (Bindungsspezialisten, „specialist binders“). Die Transformation eines „specialist binders“ mit genomischer DNA eines „generalist binders“, wandelte den „specialist binder“ in einen Stamm um, der auch an ALe<sup>b</sup> adhärert. Für SabA ist ebenfalls beschrieben worden, dass die Bindungsaffinität für sLe<sup>a</sup> in verschiedenen klinischen Isolaten variieren kann und die unterschiedlichen Affinitäten eine inhärente Eigenschaft des Proteins sind (Aspholm *et al.*, 2006).

Die Regionen von BabA, die mit Le<sup>b</sup> interagieren und die Bindung vermitteln, sind bisher nicht identifiziert worden. Der negative Bindungsphänotyp des Isolats LSU1014-6 ermöglichte eine Bestimmung der für die Adhärenz relevanten Aminosäuren/Regionen von BabA, indem der Stamm mit bestimmten Abschnitten des *babA*-Gens des adhären Isolats LSU1014-1 transformiert wird. Eine erzeugte Erhöhung oder Wiederherstellung der Adhärenz an Le<sup>b</sup> durch bestimmte Sequenzabschnitte würde so auf bindungsrelevante Bereiche hinweisen. Es wurden zehn LSU1014-6<sub>*babA*LSU1014-1</sub>-Klone gewonnen, die eine Mosaikstruktur von BabA aufwiesen und LSU1014-1- und LSU1014-6-spezifische Aminosäuren besaßen. Sieben dieser Klone besaßen den LSU1014-6-spezifischen verkürzten C-Terminus und adhären nicht an Le<sup>b</sup>. Drei weitere Klone besaßen den intakten C-Terminus und weitere LSU1014-1-spezifische Aminosäuren in variierender Anzahl und Position. Einer dieser Klone besaß bis auf zwei LSU1014-6-spezifische Aminosäuren in der zentralen variablen BabA-Region eine zum Stamm LSU1014-1 identische Proteinsequenz. Die Inkorporation der fast kompletten *babA*-DNA erzeugte einen Le<sup>b</sup>-adhären Phänotyp. Die beiden LSU1014-6-spezifischen Aminosäuren scheinen daher nicht die Ursache für den Verlust der Adhärenz im Stamm LSU1014-6 zu sein. Die beiden anderen Klone mit intaktem C-Terminus adhären zwar signifikant stärker an den Rezeptor als der Stamm LSU1014-6, wiesen jedoch keine vollständige Wiederherstellung der Adhärenz auf. Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der Bindung an Le<sup>b</sup> mit einem verkürzten C-Terminus assoziiert ist und auch mit den Sequenzeigenschaften in der mittleren Region von BabA. Anhand der hier gewonnenen Klone und deren Sequenzmuster war eine Identifizierung der Bindungsdomäne bisher nicht möglich. Hierzu sind weitere *babA*-Sequenz-Kombinationen von Aminosäuren des LSU1014-1- LSU1014-6-Stamms notwendig. In weiteren Experimenten soll die Rolle der in der mittleren BabA-Region liegenden Aminosäuren in der Bindung untersucht werden. Hierfür liesse sich zudem die gerichtete Mutagenese für eine gezielte Analyse einzelner Aminosäuren anwenden.

Ein Effekt der Sequenzvariabilität von *sabA* auf die Bindungseigenschaften zeigte sich in einem Paar, in dem im zweiten Stamm das *sabA*-Gen im 5'-Terminus ein vorzeitiges Stoppcodon aufwies: Der Stamm adhärte nicht an sLe<sup>x</sup> und der negative Bindungsphänotyp wird vermutlich durch das ausgeschaltete *sabA*-Gen verursacht. Variierende CT-Repeatlängen und vorzeitige Stoppcodons im *sabA*-Gen sind bislang nur für Isolate aus unterschiedlichen Individuen beschrieben worden (Alm *et al.*, 1999; Mahdavi *et al.*, 2002; Lehours *et al.*, 2004). Das Ergebnis des sequenziellen Stammpaares zeigt

darüberhinaus, dass die Phasenvariation auch während der Infektion von Bedeutung sein könnte und der Verlust der Bindung an sLe<sup>x</sup> des Isolats mit dem vorzeitigen Stoppcodon im *sabA*-Gen verdeutlicht zudem die funktionellen Auswirkung der Phasenvariation.

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass während der Infektion die Mechanismen zur Generierung genetischer Diversität, Rekombination und Mutation, im *babA*-Gen von funktioneller Relevanz sind und vermutlich eine entscheidende Rolle in der Anpassung von *H. pylori* an den Wirt spielen. Die hohe genetische und funktionelle Variabilität von BabA und SabA in den sequenziellen Isolaten deutet zudem daraufhin, dass *in vivo* die Selektion für funktionelle Diversität für die Evolution der Adhäsine von Bedeutung ist.

## 6. LITERATUR

- Achtman, M., T. Azuma, D. E. Berg, Y. Ito, G. Morelli, Z. J. Pan, S. Suerbaum, S. A. Thompson, A. van der Ende, and L. J. van Doorn.** 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* **32**:459-70.
- Akashi H.** 1999. Within- and between-species DNA sequence variation and the 'footprint' of natural selection. *Gene* **238**:39-51
- Akopyanz, N., N. O. Bukanov, T. U. Westblom, and D. E. Berg.** 1992a. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* **20**:6221-5.
- Akopyanz, N., N. O. Bukanov, T. U. Westblom, S. Kresovich, and D. E. Berg.** 1992b. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **20**:5137-42.
- 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**:176-80.
- 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**:4155-68.
- Amado, M., F. Carneiro, M. Seixas, H. Clausen, and M. Sobrinho-Simoes.** 1998. Dimeric sialylLe(x) expression in gastric carcinoma correlates with venous invasion and poor outcome. *Gastroenterology* **114**:462-70.
- Andrzejewska, J., S. K. Lee, P. Olbermann, N. Lotzing, E. Katzowitsch, B. Linz, M. Achtman, C. I. Kado, S. Suerbaum, and C. Josenhans.** 2006. Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J Bacteriol* **188**:5865-77.
- Angstrom, J., S. Teneberg, M. A. Milh, T. Larsson, I. Leonardsson, B. M. Olsson, M. O. Halvarsson, D. Danielsson, I. Naslund, A. Ljungh, T. Wadstrom, and K. A. Karlsson.** 1998. The lactosylceramide binding specificity of *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **8**:297-309.
- Appelmek, B. J., I. Simoons-Smit, R. Negrini, A. P. Moran, G. O. Aspinall, J. G. Forte, T. De Vries, H. Quan, T. Verboom, J. J. Maaskant, P. Ghiara, E. J. Kuipers, E. Bloemena, T. M. Tadema, R. R. Townsend, K. Tyagarajan, J. M. Crothers, Jr., M. A. Monteiro, A. Savio, and J. De Graaff.** 1996. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* **64**:2031-40.
- Appelmek, B. J., S. L. Martin, M. A. Monteiro, C. A. Clayton, A. A. McColm, P. Zheng, T. Verboom, J. J. Maaskant, D. H. van den Eijnden, C. H. Hokke, M. B. Perry, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters.** 1999. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase genes. *Infect Immun* **67**:5361-6.
- Appelmek, B. J., M. C. Martino, E. Veenhof, M. A. Monteiro, J. J. Maaskant, R. Negrini, F. Lindh, M. Perry, G. Del Giudice, and C. M. Vandenbroucke-Grauls.** 2000. Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* **68**:5928-32.
- Aras, R. A., J. Kang, A. I. Tschumi, Y. Harasaki, and M. J. Blaser.** 2003. Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13579-84.

- Armuzzi, A., F. Cremonini, V. Ojetti, F. Bartolozzi, F. Canducci, M. Candelli, L. Santarelli, G. Cammarota, A. De Lorenzo, P. Pola, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. 2001. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. *Digestion* **63**:1-7.
- Ascencio, F., L. A. Fransson, and T. Wadstrom. 1993. Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *J Med Microbiol* **38**:240-4.
- Aspholm, M., F. O. Olfat, J. Norden, B. Sonden, C. Lundberg, R. Sjostrom, S. Altraja, S. Odenbreit, R. Haas, T. Wadstrom, L. Engstrand, C. Semino-Mora, H. Liu, A. Dubois, S. Teneberg, A. Arnqvist, and T. Boren. 2006. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog* **2**:e110.
- 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**:519-22.
- Aspinall, G. O., and M. A. Monteiro. 1996. Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* **35**:2498-504.
- 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**:17771-7.
- Aviles-Jimenez, F., D. P. Letley, G. Gonzalez-Valencia, N. Salama, J. Torres, and J. C. Atherton. 2004. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. *J Bacteriol* **186**:5182-5.
- Backstrom, A., C. Lundberg, D. Kersulyte, D. E. Berg, T. Boren, and A. Arnqvist. 2004. Metastability of *Helicobacter pylori* babA adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16923-8.
- 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**:1348-50.
- Banatvala, N., K. Mayo, F. Megraud, R. Jennings, J. J. Deeks, and R. A. Feldman. 1993. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* **168**:219-21.
- Bauerfeind, P., R. Garner, B. E. Dunn, and H. L. Mobley. 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut* **40**:25-30.
- Beier, D., and R. Frank. 2000. Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**:2068-76.
- Berg, D. E., R. H. Gilman, J. Lelwala-Guruge, K. Srivastava, Y. Valdez, J. Watanabe, J. Miyagi, N. S. Akopyants, A. Ramirez-Ramos, T. H. Yoshiwara, S. Recavarren, and R. Leon-Barua. 1997a. *Helicobacter pylori* populations in Peruvian patients. *Clin Infect Dis* **25**:996-1002.
- Berg, D. E., P. S. Hoffman, B. J. Appelmelk, and J. G. Kusters. 1997b. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol* **5**:468-74.
- Bergman, M. P., A. Engering, H. H. Smits, S. J. van Vliet, A. A. van Bodegraven, H. P. Wirth, M. L. Kapsenberg, C. M. Vandenbroucke-Grauls, Y. van Kooyk, and B. J. Appelmelk. 2004. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med* **200**:979-90.

- Bina, J., M. Bains, and R. E. Hancock.** 2000. Functional expression in *Escherichia coli* and membrane topology of porin HopE, a member of a large family of conserved proteins in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**:2370-5.
- Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.
- 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 U S A* **98**:14607-12.
- Blaser, M. J., and D. E. Berg.** 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* **107**:767-73.
- Blaser, M. J., and J. E. Crabtree.** 1996. CagA and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Clin Pathol* **106**:565-7.
- Bode, G., P. Malfertheiner, G. Lehnhardt, M. Nilius, and H. Ditschuneit.** 1993. Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*. *Med Microbiol Immunol* **182**:233-42.
- Bode, G., F. Mauch, and P. Malfertheiner.** 1993. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* **111**:483-90.
- Boonjakuakul, J. K., M. Syvanen, A. Suryaprasad, C. L. Bowlus, and J. V. Solnick.** 2004. Transcription profile of *Helicobacter pylori* in the human stomach reflects its physiology in vivo. *J Infect Dis* **190**:946-56.
- 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**:1892-5.
- Bottcher, G.** 1874. *Dorpat. Med. Z.* **5**:184
- Boyd, E. F., and D. L. Hartl.** 1998. Diversifying selection governs sequence polymorphism in the major adhesin proteins fimA, papA, and sfaA of *Escherichia coli*. *J Mol Evol* **47**:258-67.
- Brown, L. M., T. L. Thomas, J. L. Ma, Y. S. Chang, W. C. You, W. D. Liu, L. Zhang, and M. H. Gail.** 2001. *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand J Infect Dis* **33**:686-91.
- Bunn JE, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT.** 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett Appl Microbiol.* **34**:450-4.
- Cats, A., E. J. Kuipers, M. A. Bosschaert, R. G. Pot, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters.** 2003. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Aliment Pharmacol Ther* **17**:429-35.
- 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 U S A* **93**:14648-53.
- Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela.** 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127**:1550-7.
- Ching, C. K., B. C. Wong, E. Kwok, L. Ong, A. Covacci, and S. K. Lam.** 1996. Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *Am J Gastroenterol* **91**:949-53.
- Clausen, H., and S. Hakomori.** 1989. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* **56**:1-20.

- Coconnier, M. H., V. Lievin, E. Hemery, and A. L. Servin.** 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol* **64**:4573-80.
- Correa, P., E. T. Fontham, J. C. Bravo, L. E. Bravo, B. Ruiz, G. Zarama, J. L. Realpe, G. T. Malcom, D. Li, W. D. Johnson, and R. Mera.** 2000. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst* **92**:1881-8.
- Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and et al.** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5791-5.
- 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**:10566-73.
- Cover, T. L., Y. Glupczynski, A. P. Lage, A. Burette, M. K. Tummuru, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1995. Serologic detection of infection with *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* **33**:1496-500.
- 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**:951-7.
- Croxen, M. A., G. Sisson, R. Melano, and P. S. Hoffman.** 2006. The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol* **188**:2656-65.
- Danon, S. J., B. J. Luria, R. E. Mankoski, and K. A. Eaton.** 1998. RFLP and RAPD analysis of *in vivo* genetic interactions between strains of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **3**:254-9.
- Dauids, W., J. Gamiieldien, D. A. Liberles, and W. Hide.** 2002. Positive selection scanning reveals decoupling of enzymatic activities of carbamoyl phosphate synthetase in *Helicobacter pylori*. *J Mol Evol* **54**:458-64.
- Delport, W., M. Cunningham, B. Olivier, O. Preisig, and S. W. van der Merwe.** 2006. A population genetics pedigree perspective on the transmission of *Helicobacter pylori*. *Genetics* **174**:2107-18.
- Doidge C, Crust I, Lee A, Buck F, Hazell S, Manne U.** 1994. Therapeutic immunisation against *Helicobacter* infection. *Lancet* **343**(8902):914-5
- Doig, P., B. L. de Jonge, R. A. Alm, E. D. Brown, M. Uria-Nickelsen, B. Noonan, S. D. Mills, P. Tummino, G. Carmel, B. C. Guild, D. T. Moir, G. F. Vovis, and T. J. Trust.** 1999. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:675-707.
- Dominici, P., S. Bellentani, A. R. Di Biase, G. Saccoccio, A. Le Rose, F. Masutti, L. Viola, F. Balli, C. Tiribelli, R. Grilli, M. Fusillo, and E. Grossi.** 1999. Familial clustering of *Helicobacter pylori* infection: population based study. *Bmj* **319**:537-40.
- Dooley, C. P., H. Cohen, P. L. Fitzgibbons, M. Bauer, M. D. Appleman, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1989. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* **321**:1562-6.
- Dore, M. P., A. R. Sepulveda, H. El-Zimaity, Y. Yamaoka, M. S. Osato, K. Mototsugu, A. M. Neddu, G. Realdi, and D. Y. Graham.** 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol* **96**:1396-401.
- 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**:359-63.

- Duim, B., L. van Alphen, P. Eijk, H. M. Jansen, and J. Dankert.** 1994. Antigenic drift of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* major outer membrane protein P2 in patients with chronic bronchitis is caused by point mutations. *Mol Microbiol* **11**:1181-9.
- Dunn, B. E., G. P. Campbell, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **265**:9464-9.
- Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* **10**:720-41.
- Dybvig, K.** 1993. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol Microbiol* **10**:465-71.
- 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**:2470-5.
- Eaton, K. A., and S. Krakowka.** 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **62**:3604-7.
- 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**:2445-8.
- Enroth, H., and L. Engstrand.** 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microbiol* **33**:2162-5.
- Esko, J. D.** 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **3**:805-16.
- Evans, D. G., D. J. Evans, Jr., J. J. Moulds, and D. Y. Graham.** 1988. N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect Immun* **56**:2896-906.
- Falush, D., C. Kraft, N. S. Taylor, P. Correa, J. G. Fox, M. Achtman, and S. Suerbaum.** 2001. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:15056-61.
- Falush, D., M. Stephens, and J. K. Pritchard.** 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**:1567-87.
- Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitsch, X. Wang, M. Achtman, and S. Suerbaum.** 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**:1582-5.
- Feldman, R. A.** 2001. Review article: would eradication of *Helicobacter pylori* infection reduce the risk of gastric cancer? *Aliment Pharmacol Ther* **15** Suppl 1:2-5.
- Fiedorek, S. C., H. M. Malaty, D. L. Evans, C. L. Pumphrey, H. B. Casteel, D. J. Evans, Jr., and D. Y. Graham.** 1991. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics* **88**:578-82.
- Filipe, M. I.** 1979. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. *Invest Cell Pathol* **2**:195-216.
- Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:136-69.
- Forman, D., D. G. Newell, F. Fullerton, J. W. Yarnell, A. R. Stacey, N. Wald, and F. Sitas.** 1991. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Bmj* **302**:1302-5.

- Fox, J. G., P. Correa, N. S. Taylor, A. Lee, G. Otto, J. C. Murphy, and R. Rose.** 1990. *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets. An animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans. *Gastroenterology* **99**:352-61.
- Fox, J. G., F. E. Dewhirst, J. G. Tully, B. J. Paster, L. Yan, N. S. Taylor, M. J. Collins, Jr., P. L. Gorelick, and J. M. Ward.** 1994. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* **32**:1238-45.
- Fox, J. G., and A. Lee.** 1997. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Lab Anim Sci* **47**:222-55.
- Fox, JG.** 2002. The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* **50**(2):273-83.
- Gahmberg, C. G., and M. Tolvanen.** 1996. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* **21**:308-11.
- Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet.** 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *Embo J* **19**:6361-70.
- Gangwer, K. A., D. J. Mushrush, D. L. Stauff, B. Spiller, M. S. McClain, T. L. Cover, and D. B. Lacy.** 2007. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16293-8.
- Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099-102.
- 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**:371-7.
- Georgopoulos, S. D., A. F. Mentis, C. A. Spiliadis, L. S. Tzouveleakis, E. Tzelepi, A. Moshopoulos, and N. Skandalis.** 1996. *Helicobacter pylori* infection in spouses of patients with duodenal ulcers and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut* **39**:634-8.
- 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 U S A* **96**:12778-83.
- Go, M. F., and D. Y. Graham.** 1996. Presence of the *cagA* gene in the majority of *Helicobacter pylori* strains is independent of whether the individual has duodenal ulcer or asymptomatic gastritis. *Helicobacter* **1**:107-11.
- Go, M. F., V. Kapur, D. Y. Graham, and J. M. Musser.** 1996. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol* **178**:3934-8.
- 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**:2632-8.
- Gomes, J. P., A. Nunes, W. J. Bruno, M. J. Borrego, C. Florindo, and D. Dean.** 2006. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol* **188**:275-86.
- González-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, la Garza AM, Torres J.** 2000. *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis.* **182**(5):1450-4.
- Goodman, K. J., and P. Correa.** 2000. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet* **355**:358-62.

- Goodwin, C. S., E. D. Blincow, J. B. Warreb, T. E. Waters, C. R. Sanderson u. L. Easton.** 1985. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.* **38**:1127-1131
- Goodwin, C. S., and J. A. Armstrong.** 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**:1-13.
- Goodwin, C. S., W. McConnell, R. K. McCulloch, C. McCullough, R. Hill, M. A. Bronsdon, and G. Kasper.** 1989. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J Clin Microbiol* **27**:938-43.
- Goosen, C., J. Theron, M. Ntsala, F. F. Maree, A. Olckers, S. J. Botha, A. J. Lastovica, and S. W. van der Merwe.** 2002. Evaluation of a novel heminested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of *Helicobacter pylori* in saliva and dental plaque. *J Clin Microbiol* **40**:205-9.
- Graham, D. Y., G. M. Lew, H. M. Malaty, D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., P. D. Klein, L. C. Alpert, and R. M. Genta.** 1992. Factors influencing the eradication of *Helicobacter pylori* with triple therapy. *Gastroenterology* **102**:493-6.
- Gressmann, H., B. Linz, R. Ghai, K. P. Pleissner, R. Schlapbach, Y. Yamaoka, C. Kraft, S. Suerbaum, T. F. Meyer, and M. Achtman.** 2005. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet* **1**:e43.
- Gu X, Vander Velden K.** 2002. DIVERGE: phylogeny-based analysis for functional-structural divergence of a protein family *Bioinformatics.* **18**(3):500-1.
- Guruge, J. L., P. G. Falk, R. G. Lorenz, M. Dans, H. P. Wirth, M. J. Blaser, D. E. Berg, and J. I. Gordon.** 1998. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3925-30.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**:1089-97.
- Hakomori, S.** 1981. Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Semin Hematol* **18**:39-62.
- Hakomori S.** 1999. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta.* **1473**(1):247-66.
- Hallet, B.** 2001. Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:570-81.
- Hamlet, A., A. C. Thoreson, O. Nilsson, A. M. Svennerholm, and L. Olbe.** 1999. Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in *cagA* genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology* **116**:259-68.
- Han, S. R., H. C. Zschausch, H. G. Meyer, T. Schneider, M. Loos, S. Bhakdi, and M. J. Maeurer.** 2000. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol* **38**:3646-51.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
- Handt, L. K., J. G. Fox, F. E. Dewhirst, G. J. Fraser, B. J. Paster, L. L. Yan, H. Rozmiarek, R. Rufo, and I. H. Stalis.** 1994. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infect Immun* **62**:2367-74.
- Hawtin, P. R., A. R. Stacey, and D. G. Newell.** 1990. Investigation of the structure and localization of the urease of *Helicobacter pylori* using monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol* **136**:1995-2000.

- Hegarty, J. P., M. T. Dowd, and K. H. Baker.** 1999. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J Appl Microbiol* **87**:697-701.
- Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Nataro.** 1999. Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol. Microbiol.* **33**:919-932.
- Hennig, E. E., J. M. Allen, and T. L. Cover.** 2006. Multiple chromosomal loci for the *babA* gene in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **74**:3046-51.
- 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**:519-28.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2002. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14428-33.
- Hobbs, M. M., A. Seiler, M. Achtman, and J. G. Cannon.** 1994. Microevolution within a clonal population of pathogenic bacteria: recombination, gene duplication and horizontal genetic exchange in the *opa* gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **12**:171-80.
- Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Sotomayor V, Russell RG, Wasserman SS, Morris JG Jr.** 1993. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J Infect Dis.* **168**(1):222-6
- Horst JP, Wu TH, Marinus MG.** 1999. *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol.* **7**(1):29-36.
- Hu, L. T., and H. L. Mobley.** 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **58**:992-8.
- 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**:373-7.
- Israel, D. A., N. Salama, U. Krishna, U. M. Rieger, J. C. Atherton, S. Falkow, and R. M. Peek, Jr.** 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14625-30.
- Iverson-Cabral, S. L., S. G. Astete, C. R. Cohen, E. P. Rocha, and P. A. Totten.** 2006. Intrastrain heterogeneity of the *mgpB* gene in *Mycoplasma genitalium* is extensive *in vitro* and *in vivo* and suggests that variation is generated via recombination with repetitive chromosomal sequences. *Infect Immun* **74**:3715-26.
- Jaworski, W.** 1889. Podrecznik Chorob zoladka. Wydawnictwa Dziel Lakarskich Polskich. **32**
- Jorgensen M, Daskalopoulos G, Warburton V, Mitchell HM, Hazell SL.** 1996. Multiple strain colonization and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*-infected patients: identification from sequential and multiple biopsy specimens. *J Infect Dis.* Sep. **174**(3):631-5
- Josenhans, C., K. A. Eaton, T. Thevenot, and S. Suerbaum.** 2000. Switching of flagellar motility in *Helicobacter pylori* by reversible length variation of a short homopolymeric sequence repeat in *fliP*, a gene encoding a basal body protein. *Infect Immun* **68**:4598-603.
- Josenhans, C., A. Labigne, and S. Suerbaum.** 1995. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* **177**:3010-20.
- Jukes, T.H., and Cantor, C.R.** (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*. Munro, H.N. (ed.). New York: Academic Press, pp. 21–132.

- Kansau, I., J. Raymond, E. Bingen, P. Courcoux, N. Kalach, M. Bergeret, N. Braimi, C. Dupont, and A. Labigne.** 1996. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* **147**:661-9.
- Karita, M., S. Matsumoto, T. Kamei, K. Shinohara, and T. Sugiyama.** 2005. Direct transmission of *H. pylori* from challenged to nonchallenged mice in a single cage. *Dig Dis Sci* **50**:1092-6.
- Kersulyte, D., H. Chalkauskas, and D. E. Berg.** 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Mol Microbiol* **31**:31-43.
- Kimura, M.** 1983a. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. *Mol Biol Evol* **1**:84-93.
- Kimura, M.** 1983b. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge United Kingdom.
- Kinhikar, A. G., D. Vargas, H. Li, S. B. Mahaffey, L. Hinds, J. T. Belisle, and S. Laal.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin. *Mol Microbiol* **60**:999-1013.
- Kivi, M., Y. Tindberg, M. Sorberg, T. H. Casswall, R. Befrits, P. M. Hellstrom, C. Bengtsson, L. Engstrand, and M. Granstrom.** 2003. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol* **41**:5604-8.
- Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO.** 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet*. **337**:1503-6.
- Konjetzny, GE.** 1928. Die Entzündung des Magens. Handbuch der speziellen pathologischen. Anatomie und Histologie IV **2**: 768-1116.
- Konno, M., N. Fujii, S. Yokota, K. Sato, M. Takahashi, 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**:2246-50.
- Kostrzynska, M., J. D. Betts, J. W. Austin, and T. J. Trust.** 1991. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J Bacteriol* **173**:937-46.
- Kraft, C., A. Stack, C. Josenhans, E. Niehus, G. Dietrich, P. Correa, J. G. Fox, D. Falush, and S. Suerbaum.** 2006. Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori* infection. *J Bacteriol* **188**:249-54.
- Krienitz, W.** 1906. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Formen im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *Dtsch. Med. Wochenschr* **28**:872
- Kugelberg, E., E. Kofoed, A. B. Reams, D. I. Andersson, and J. R. Roth.** 2006. Multiple pathways of selected gene amplification during adaptive mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17319-24.
- Kuipers, E. J., A. S. Pena, G. van Kamp, A. M. Uytterlinde, G. Pals, N. F. Pels, E. Kurz-Pohlmann, and S. G. Meuwissen.** 1993. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet* **342**:328-31.
- Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. Meuwissen, and M. J. Blaser.** 1995. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* **87**:1777-80.
- Kuipers, E. J., D. A. Israel, J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. Weel, A. van Der Ende, R. W. van Der Hulst, H. P. Wirth, J. Hook-Nikanne, S. A. Thompson, and M. J. Blaser.** 2000. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* **181**:273-82.
- Kwok, T., D. Zabler, S. Urman, M. Rohde, R. Hartig, S. Wessler, R. Misselwitz, J. Berger, N. Sewald, W. König, and S. Backert.** 2007. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**:862-6.

- Labigne-Roussel, A., P. Courcoux, and L. Tompkins.** 1988. Gene disruption and replacement as a feasible approach for mutagenesis of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **170**:1704-8.
- Lee, C. K., R. Weltzin, W. D. Thomas, Jr., H. Kleanthous, T. H. Ermak, G. Soman, J. E. Hill, S. K. Ackerman, and T. P. Monath.** 1995. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* **172**:161-72.
- Lehours, P., A. Menard, S. Dupouy, B. Bergey, F. Richey, F. Zerbib, A. Ruskone-Fourmesttraux, 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**:880-8.
- Lepper, P. M., M. Triantafilou, C. Schumann, E. M. Schneider, and K. Triantafilou.** 2005. Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol* **7**:519-28.
- Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* **26**:93-9.
- Li, J., H. Ochman, E. A. Groisman, E. F. Boyd, F. Solomon, K. Nelson, and R. K. Selander.** 1995. Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7252-6.
- Li, L., R. M. Genta, M. F. Go, O. Gutierrez, J. G. Kim, and D. Y. Graham.** 2002. *Helicobacter pylori* strain and the pattern of gastritis among first-degree relatives of patients with gastric carcinoma. *Helicobacter* **7**:349-55.
- Lingwood, C. A., M. Huesca, and A. Kuksis.** 1992. The glycerolipid receptor for *Helicobacter pylori* (and exoenzyme S) is phosphatidylethanolamine. *Infect Immun* **60**:2470-4.
- Linz, B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum, and M. Achtman.** 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445**:915-8.
- Liu, H., L. Magoun, S. Luperchio, D. B. Schauer, and J. M. Leong.** 1999. The Tir-binding region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* intimin is sufficient to trigger actin condensation after bacterial-induced host cell signalling. *Mol Microbiol* **34**:67-81.
- Lu, H., J. Y. Wu, E. J. Beswick, T. Ohno, S. Odenbreit, R. Haas, V. E. Reyes, M. Kita, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka.** 2007. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem* **282**:6242-54.
- Lu, H., Y. Yamaoka, and D. Y. Graham.** 2005. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. *Curr Opin Gastroenterol* **21**:653-9.
- Lu, Y., T. E. Redlinger, R. Avitia, A. Galindo, and K. Goodman.** 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol* **68**:1436-9.
- Luo, Y., E. A. Frey, R. A. Pfuetschner, A. L. Creagh, D. G. Knoechel, C. A. Haynes, B. B. Finlay, and N. C. Strynadka.** 2000. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**:1073-7.
- Madrid, J. F., J. Ballesta, M. T. Castells, and F. Hernandez.** 1990. Glycoconjugate distribution in the human fundic mucosa revealed by lectin- and glycoprotein-gold cytochemistry. *Histochemistry* **95**:179-87.

- Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, Shiratori Y, Omata M** 1999. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* **44**(3):336-41
- 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**:2876-80.
- 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**:573-8.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3140-5.
- 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**:465-71.
- Malaty, H. M., A. El-Kasabany, D. Y. Graham, C. C. Miller, S. G. Reddy, S. R. Srinivasan, Y. Yamaoka, and G. S. Berenson.** 2002. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* **359**:931-5.
- Malaty, H. M., and D. Y. Graham.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**:742-5.
- Malaty, H. M., D. Y. Graham, P. D. Klein, D. G. Evans, E. Adam, and D. J. Evans.** 1991. Transmission of *Helicobacter pylori* infection. Studies in families of healthy individuals. *Scand J Gastroenterol* **26**:927-32.
- Marais, A., G. L. Mendz, S. L. Hazell, and F. Megraud.** 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:642-74.
- Marshall B.J., Warren J.R.** 1983. Unidentified Curved Bacilli on gastric epithelium in active gastritis. *Lancet* 1273-1275.
- Marshall, B. J., and J. R. Warren.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-5.
- 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**:436-9.
- Marshall B.J., Goodwin C.S.** 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol* **37**:68
- Martin, I. M., A. Ghani, G. Bell, G. Kinghorn, and C. A. Ison.** 2003. Persistence of two genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* during transmission. *J Clin Microbiol* **41**:5609-14.
- Maynard Smith J, Smith NH.** 1998. Detecting recombination from gene trees. *Mol Biol Evol* **15**(5):590-9
- McColl, KE.** 1997. *Helicobacter pylori* and acid secretion: where are we now? *Eur J Gastroenterol Hepatol* **9**(4):333-5.
- McGraw, E. A., J. Li, R. K. Selander, and T. S. Whittam.** 1999. Molecular evolution and mosaic structure of alpha, beta, and gamma intimins of pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **16**:12-22.

- 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**:1858-63.
- Mendz, G. L., and S. L. Hazell.** 1995. Aminoacid utilization by *Helicobacter pylori*. *Int J Biochem Cell Biol* **27**:1085-93.
- Mendz, G. L., S. L. Hazell, and B. P. Burns.** 1993. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol* **139**:3023-8.
- Mendz, G. L., A. J. Shepley, S. L. Hazell, and M. A. Smith.** 1997. Purine metabolism and the microaerophily of *Helicobacter pylori*. *Arch Microbiol* **168**:448-56.
- Messing, J., and J. Vieira.** 1982. A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene* **19**:269-76.
- Meyer, J. M., N. P. Silliman, W. Wang, N. Y. Siepman, J. E. Sugg, D. Morris, J. Zhang, H. Bhattacharyya, E. C. King, and R. J. Hopkins.** 2002. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med* **136**:13-24.
- Michetti, P., C. Kreiss, K. L. Kotloff, N. Porta, J. L. Blanco, D. Bachmann, M. Herranz, P. F. Saldinger, I. Corthesy-Theulaz, G. Losonsky, R. Nichols, J. Simon, M. Stolte, S. Ackerman, T. P. Monath, and A. L. Blum.** 1999. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* **116**:804-12.
- Mirelman D.** 1986. Microbial lectins and agglutinins:properties and biological activity. New York: John Wiley & Sons.
- Mirsky, I. A., M. F. Reiser, M. Thaler, and H. Weiner.** 1957. Etiology of duodenal ulcer. I. Relation of specific psychological characteristics to rate of gastric secretion (serum pepsinogen). *Psychosom Med* **19**:1-10.
- Moese, S., M. Selbach, T. Kwok, V. Brinkmann, W. Konig, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2004. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun* **72**:3646-9.
- Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco.** 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* **187**:135-40.
- Montecucco, C., and M. de Bernard.** 2003. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect* **5**:715-21.
- Monteiro, M. A., K. H. Chan, D. A. Rasko, D. E. Taylor, P. Y. Zheng, B. J. Appelmelk, H. P. Wirth, M. Yang, M. J. Blaser, S. O. Hynes, A. P. Moran, and M. B. Perry.** 1998. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem* **273**:11533-43.
- Morris, A., and G. Nicholson.** 1987. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* **82**:192-9.
- Mouricout, M., J. M. Petit, J. R. Carias, and R. Julien.** 1990. Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis. *Infect Immun* **58**:98-106.
- Muotiala, A., I. M. Helander, L. Pyhala, T. U. Kosunen, and A. P. Moran.** 1992. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* **60**:1714-6.

- Nedenskov, P.** 1994. Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* **60**:3450-3.
- Nedenskov-Sorensen, P., G. Bukholm, and K. Bovre.** 1990. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis* **161**:365-6.
- Nei, M., and T. Gojobori.** 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**:418-26.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H Hofschneider.** 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1**:841-5.
- Noach, L. A., N. B. Bosma, J. Jansen, F. J. Hoek, S. J. van Deventer, and G. N. Tytgat.** 1994. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* **29**:425-9.
- Nogueira, C., C. Figueiredo, F. Carneiro, A. T. Gomes, R. Barreira, P. Figueira, C. Salgado, L. Belo, A. Peixoto, J. C. Bravo, L. E. Bravo, J. L. Realpe, A. P. Plaisier, W. G. Quint, B. Ruiz, P. Correa, and L. J. van Doorn.** 2001. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol* **158**:647-54.
- Nomura, A., G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, I. Kato, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1991. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* **325**:1132-6.
- Nwokolo, C. U., J. Bickley, A. R. Attard, R. J. Owen, M. Costas, and I. A. Fraser.** 1992. Evidence of clonal variants of *Helicobacter pylori* in three generations of a duodenal ulcer disease family. *Gut* **33**:1323-7.
- 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**:1537-48.
- Odenbreit, S., J. Puls, 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**:1497-500.
- 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**:247-56.
- Odenbreit, S.** 2005. Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int J Med Microbiol* **295**:317-24.
- Ofek I, Doyle RJ.** 1994. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman and Hall, New York, pp 54-135
- 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**:1601-10.
- Oh, J. D., S. M. Karam, and J. I. Gordon.** 2005. Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:5186-91.
- Oh, J. D., H. Kling-Backhed, M. Giannakis, J. Xu, R. S. Fulton, L. A. Fulton, H. S. Cordum, C. Wang, G. Elliott, J. Edwards, E. R. Mardis, L. G. Engstrand, and J. I. Gordon.** 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:9999-10004.
- Ohta, T.** 1993. The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annu.Rev.Ecol. Syst.* **23**:263-286

- Olson, J. W., and R. J. Maier.** 2002. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science* **298**:1788-90.
- Ota, H., T. Katsuyama, S. Nakajima, H. El-Zimaity, J. G. Kim, D. Y. Graham, and R. M. Genta.** 1998. Intestinal metaplasia with adherent *Helicobacter pylori*: a hybrid epithelium with both gastric and intestinal features. *Hum Pathol* **29**:846-50.
- Owen, R. J., and J. Xerry.** 2003. Tracing clonality of *Helicobacter pylori* infecting family members from analysis of DNA sequences of three housekeeping genes (*ureI*, *atpA* and *ahpC*), deduced amino acid sequences, and pathogenicity-associated markers (*cagA* and *vacA*). *J Med Microbiol* **52**:515-24.
- Papini, E., B. Satin, M. de Bernard, M. Molinari, B. Arico, C. Galli, J. R. Telford, R. Rappuoli, and C. Montecucco.** 1998. Action site and cellular effects of cytotoxin *VacA* produced by *Helicobacter pylori*. *Folia Microbiol (Praha)* **43**:279-84.
- Parsonnet, J., G. D. Friedman, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelman, N. Orentreich, and R. K. Sibley.** 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* **325**:1127-31.
- Parsonnet, J.** 1995. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**:45-51.
- Parsonnet, J., H. Shmuely, and T. Haggerty.** 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *Jama* **282**:2240-5.
- Paulson, J. C.** 1989. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* **14**:272-6.
- Peck, B., M. Ortkamp, K. D. Diehl, E. Hundt, and B. Knapp.** 1999. Conservation, localization and expression of *HopZ*, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* **27**:3325-33.
- Petersen, L., J. P. Bollback, M. Dimmic, M. Hubisz, and R. Nielsen.** 2007. Genes under positive selection in *Escherichia coli*. *Genome Res* **17**:1336-43.
- Pounder, R. E., and D. Ng.** 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* **9 Suppl 2**:33-9.
- Prendergast, M. M., D. R. Tribble, S. Baqar, D. A. Scott, J. A. Ferris, R. I. Walker, and A. P. Moran.** 2004. *In vivo* phase variation and serologic response to lipooligosaccharide of *Campylobacter jejuni* in experimental human infection. *Infect Immun* **72**:916-22.
- Pride, D. T., R. J. Meinersmann, and M. J. Blaser.** 2001. Allelic Variation within *Helicobacter pylori babA* and *babB*. *Infect Immun* **69**:1160-71.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-59.
- Prouzet-Mauleon, V., M. A. Hussain, H. Lamouliatte, F. Kauser, F. Megraud, and N. Ahmed.** 2005. Pathogen evolution in vivo: genome dynamics of two isolates obtained 9 years apart from a duodenal ulcer patient infected with a single *Helicobacter pylori* strain. *J Clin Microbiol* **43**:4237-41.
- Rademacher, T. W.** 1998. Recent advances in glycoconjugate analysis and glycobiology. *Curr Opin Biotechnol* **9**:74-9.
- Rathbone, B. J., J. I. Wyatt, B. W. Worsley, S. E. Shires, L. K. Trejdosiewicz, R. V. Heatley, and M. S. Losowsky.** 1986. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. *Gut* **27**:642-7.

- Raymond, J., J. M. Thiberg, C. Chevalier, N. Kalach, M. Bergeret, A. Labigne, and C. Dauga.** 2004. Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerg Infect Dis* **10**:1816-21.
- Rhead, J. L., D. P. Letley, M. Mohammadi, N. Hussein, M. A. Mohagheghi, M. Eshagh Hosseini, and J. C. Atherton.** 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* **133**:926-36.
- Rohde, M., J. Puls, R. Buhrdorf, W. Fischer, and R. Haas.** 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol* **49**:219-34.
- Romaniuk, P. J., B. Zoltowska, T. J. Trust, D. J. Lane, G. J. Olsen, N. R. Pace, and D. A. Stahl.** 1987. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J Bacteriol* **169**:2137-41.
- Rothenbacher, D., G. Bode, and H. Brenner.** 2000. *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet* **355**:1998; author reply 1999.
- Rowland, M., C. Imrie, B. Bourke, and B. Drumm.** 1999. How should *Helicobacter pylori* infected children be managed? *Gut* **45 Suppl 1**:I36-9.
- Rowland, M., L. Daly, M. Vaughan, A. Higgins, B. Bourke, and B. Drumm.** 2006. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **130**:65-72; quiz 211.
- Rytönen, A., B. Albiger, P. Hansson-Palo, H. Kallstrom, P. Olcen, H. Fredlund, and A. B. Jonsson.** 2004. *Neisseria meningitidis* undergoes PilC phase variation and Pile sequence variation during invasive disease. *J Infect Dis* **189**:402-9.
- Sachs, L.** 1993. *Statistische Methoden - Planung und Auswertung*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 312 pp.
- Saitoh, T., H. Natomi, W. L. Zhao, K. Okuzumi, K. Sugano, M. Iwamori, and Y. Nagai.** 1991. Identification of glycolipid receptors for *Helicobacter pylori* by TLC-immunostaining. *FEBS Lett* **282**:385-7.
- Sakamoto, S., T. Watanabe, T. Tokumaru, H. Takagi, H. Nakazato, and K. O. Lloyd.** 1989. Expression of Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>b</sup>, Lewis<sup>x</sup>, Lewis<sup>y</sup>, sialyl-Lewis<sup>a</sup>, and sialyl-Lewis<sup>x</sup> blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res* **49**:745-52.
- Salama, N., K. Guillemin, T. K. McDaniel, G. Sherlock, L. Tompkins, and S. Falkow.** 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:14668-73.
- Salaun, L., B. Linz, S. Suerbaum, and N. J. Saunders.** 2004. The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **150**:817-30.
- Salaun, L., S. Ayraud, and N. J. Saunders.** 2005. Phase variation mediated niche adaptation during prolonged experimental murine infection with *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **151**:917-23.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
- Schmitz, A., C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 1997. Cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *flbA* gene, which codes for a membrane protein involved in coordinated expression of flagellar genes. *J Bacteriol* **179**:987-97.
- Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. O. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5024-9.

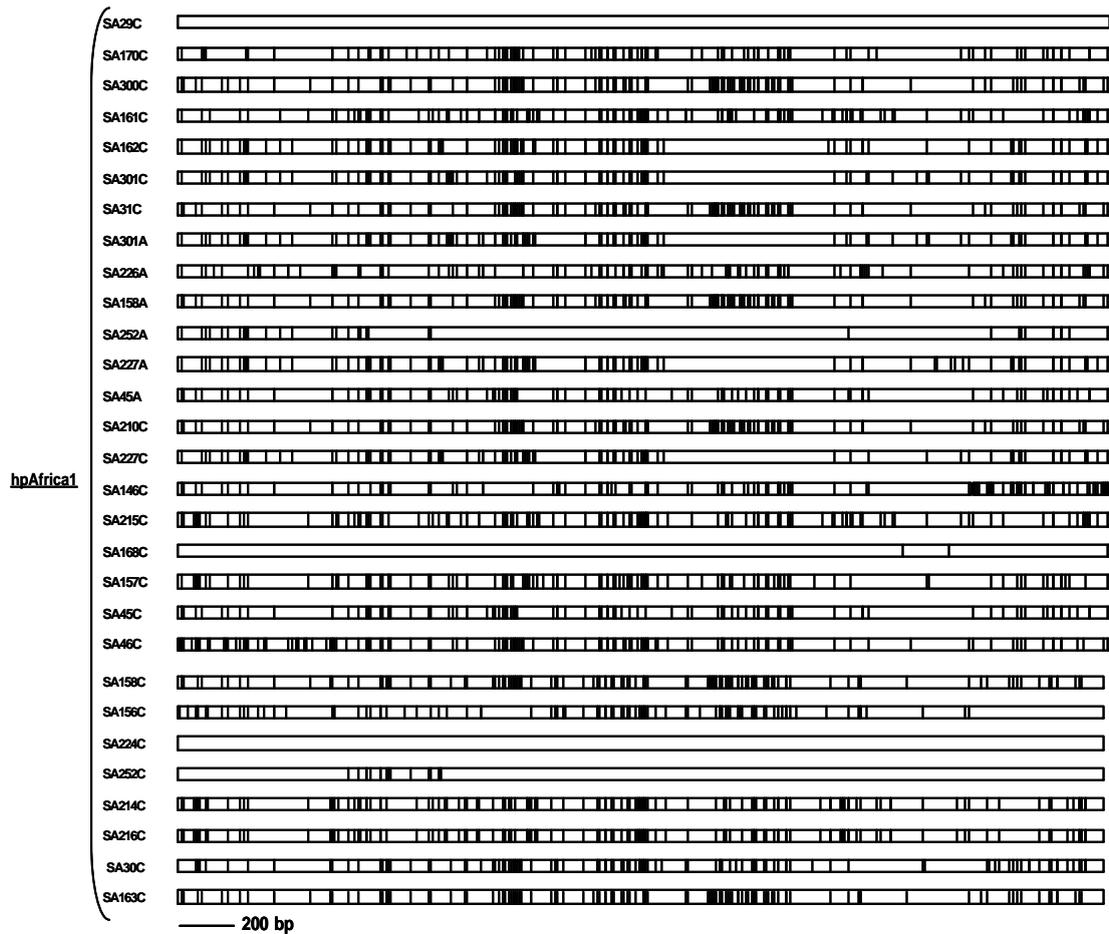
- Schwartz, K.** 1910. Über penetrierende Magen- und Jejunal-Geschwüre. *Beitr Klin Chir* **67**:96-128.
- Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14559-64.
- Selbach, M., S. Moese, S. Backert, P. R. Jungblut, and T. F. Meyer.** 2004. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics* **4**:2961-8.
- Sheu, B. S., S. Odenbreit, K. H. Hung, C. P. Liu, S. M. Sheu, H. B. Yang, and J. J. Wu.** 2006. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen. *Am J Gastroenterol* **101**:36-44.
- 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**:927-32.
- Smeets, L. C., N. L. Arents, A. A. van Zwet, C. M. Vandenbroucke-Grauls, T. Verboom, W. Bitter, and J. G. Kusters.** 2003. Molecular patchwork: Chromosomal recombination between two *Helicobacter pylori* strains during natural colonization. *Infect Immun* **71**:2907-10.
- Smith, M. A., and D. I. Edwards.** 1995. The influence of microaerophilia and anaerobiosis on metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* **36**:453-61.
- Snelling, W. J., A. P. Moran, K. A. Ryan, P. Scully, K. McGourty, J. C. Cooney, H. Annuk, and P. W. O'Toole.** 2007. HorB (HP0127) is a gastric epithelial cell adhesin. *Helicobacter* **12**:200-9.
- Solnick, J. V., J. Fong, L. M. Hansen, K. Chang, D. R. Canfield, and J. Parsonnet.** 2006. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques is most consistent with oral-oral transmission. *J Clin Microbiol* **44**:3799-803.
- 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 U S A* **101**:2106-11.
- 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.
- Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W. J. Fantl, and A. Covacci.** 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* **43**:971-80.
- Sterzenbach, T., S. K. Lee, B. Brenneke, F. von Goetz, D. B. Schauer, J. G. Fox, S. Suerbaum, and C. Josenhans.** 2007. Inhibitory effect of enterohepatic *Helicobacter hepaticus* on innate immune responses of mouse intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **75**:2717-28.
- Su, B., P. M. Hellstrom, C. Rubio, J. Celik, M. Granstrom, and S. Normark.** 1998. Type I *Helicobacter pylori* shows Lewis(b)-independent adherence to gastric cells requiring *de novo* protein synthesis in both host and bacteria. *J Infect Dis* **178**:1379-90.
- 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**:3278-88.
- Suerbaum, S., J. M. Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N. H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, and M. Achtman.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12619-24.
- Suerbaum, S.** 2000. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* **290**:175-81.

- Suerbaum, S., and P. Michetti.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**:1175-86.
- Suerbaum, S., C. Josenhans, T. Sterzenbach, B. Drescher, P. Brandt, M. Bell, M. Droge, B. Fartmann, H. P. Fischer, Z. Ge, A. Horster, R. Holland, K. Klein, J. Konig, L. Macko, G. L. Mendz, G. Nyakatura, D. B. Schauer, Z. Shen, J. Weber, M. Frosch, and J. G. Fox.** 2003. The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7901-6.
- Suerbaum, S., and C. Josenhans.** 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* **5**:441-52.
- Talley, N. J., A. R. Zinsmeister, A. Weaver, E. P. DiMagno, H. A. Carpenter, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser.** 1991. Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *J Natl Cancer Inst* **83**:1734-9.
- Taneike, I., Y. Tamura, T. Shimizu, Y. Yamashiro, and T. Yamamoto.** 2001. *Helicobacter pylori* intrafamilial infections: change in source of infection of a child from father to mother after eradication therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:731-9.
- Tarr, C. L., and T. S. Whittam.** 2002. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:479-87.
- Taylor, N. S., J. G. Fox, N. S. Akopyants, D. E. Berg, N. Thompson, B. Shames, L. Yan, E. Fontham, F. Janney, F. M. Hunter, and et al.** 1995. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* **33**:918-23.
- 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, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Wathley, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-47.
- Torres, A. G., R. C. Vazquez-Juarez, C. B. Tutt, and J. G. Garcia-Gallegos.** 2005. Pathoadaptive mutation that mediates adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111. *Infect Immun* **73**:4766-76.
- 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**:4398-404.
- Tsuji, S., N. Kojima, and S. Hitoshi.** 1996. New evidence for the occurrence of a glycolipid-mediated signal transduction system. *J Lipid Mediat Cell Signal* **14**:289-94.
- Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R. J. Schlemper.** 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* **345**:784-9.
- Urwin, R., E. C. Holmes, A. J. Fox, J. P. Derrick, and M. C. Maiden.** 2002. Phylogenetic evidence for frequent positive selection and recombination in the meningococcal surface antigen PorB. *Mol Biol Evol* **19**:1686-94.
- Valkonen, K. H., M. Ringner, A. Ljungh, and T. Wadstrom.** 1993. High-affinity binding of laminin by *Helicobacter pylori*: evidence for a lectin-like interaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**:29-37.
- van Amsterdam, K., and A. van der Ende.** 2004. Nutrients released by gastric epithelial cells enhance *Helicobacter pylori* growth. *Helicobacter* **9**:614-21.

- van der Ende, A., E. A. Rauws, M. Feller, C. J. Mulder, G. N. Tytgat, and J. Dankert. 1996. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* **111**:638-47.
- 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.
- Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**:97-130.
- Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, S. Memet, M. R. Huerre, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, P. J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D. J. Philpott, and R. L. Ferrero. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**:1166-74.
- Walsh, J. H., and W. L. Peterson. 1995. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N Engl J Med* **333**:984-91.
- Wang, G., M. Z. Humayun, and D. E. Taylor. 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* **7**:488-93.
- Ward, J. M., M. R. Anver, D. C. Haines, and R. E. Benveniste. 1994. Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am J Pathol* **145**:959-68.
- Weiser, J. N., J. B. Goldberg, N. Pan, L. Wilson, and M. Virji. 1998. The phosphorylcholine epitope undergoes phase variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **66**:4263-7.
- Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **342**(8871):575-7.
- Yamaoka, Y., O. Ojo, S. Fujimoto, S. Odenbreit, R. Haas, O. Gutierrez, H. M. El-Zimaity, R. Reddy, A. Arnqvist, and D. Y. Graham. 2006. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* **55**:775-81.
- Yang, Z., and W. J. Swanson. 2002. Codon-substitution models to detect adaptive evolution that account for heterogeneous selective pressures among site classes. *Mol Biol Evol* **19**:49-57.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19.

## 7. ANHANG

Abb. A1: Haplots der zusammengefassten Housekeeping-Genfragmente der *H. pylori*-Isolate der südafrikanischen Familie 12.



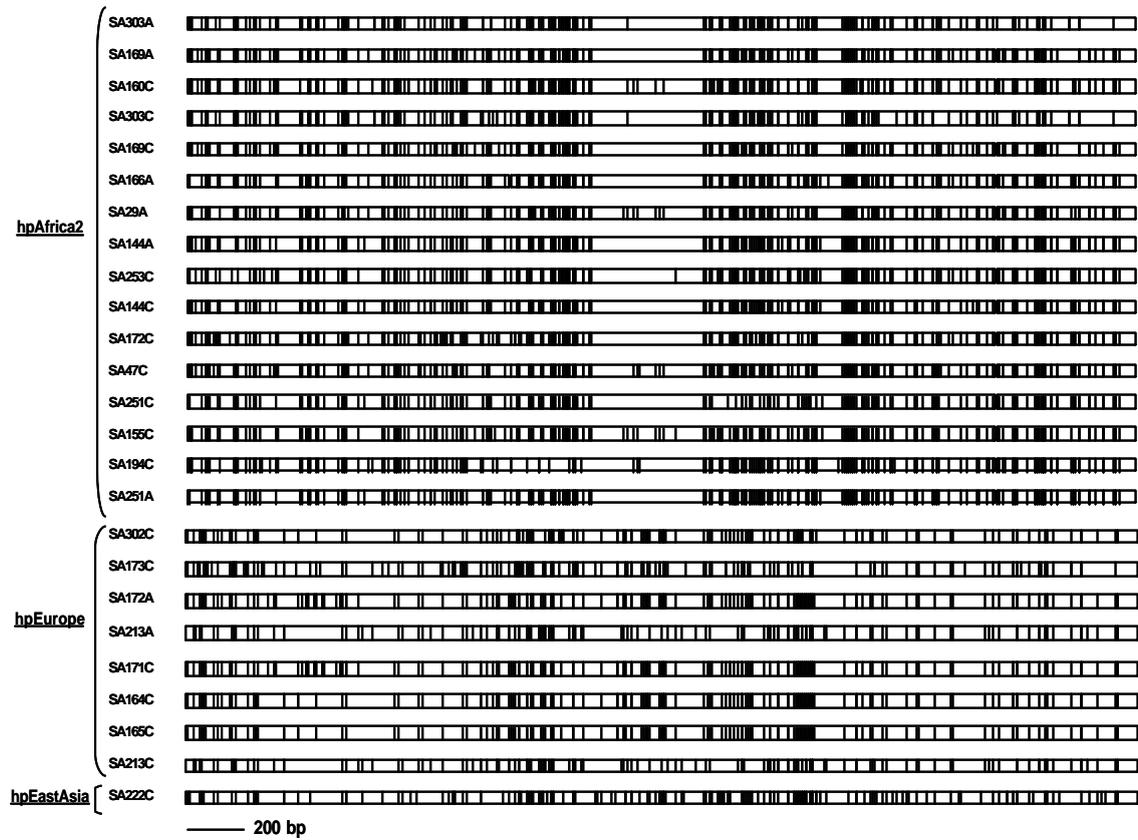
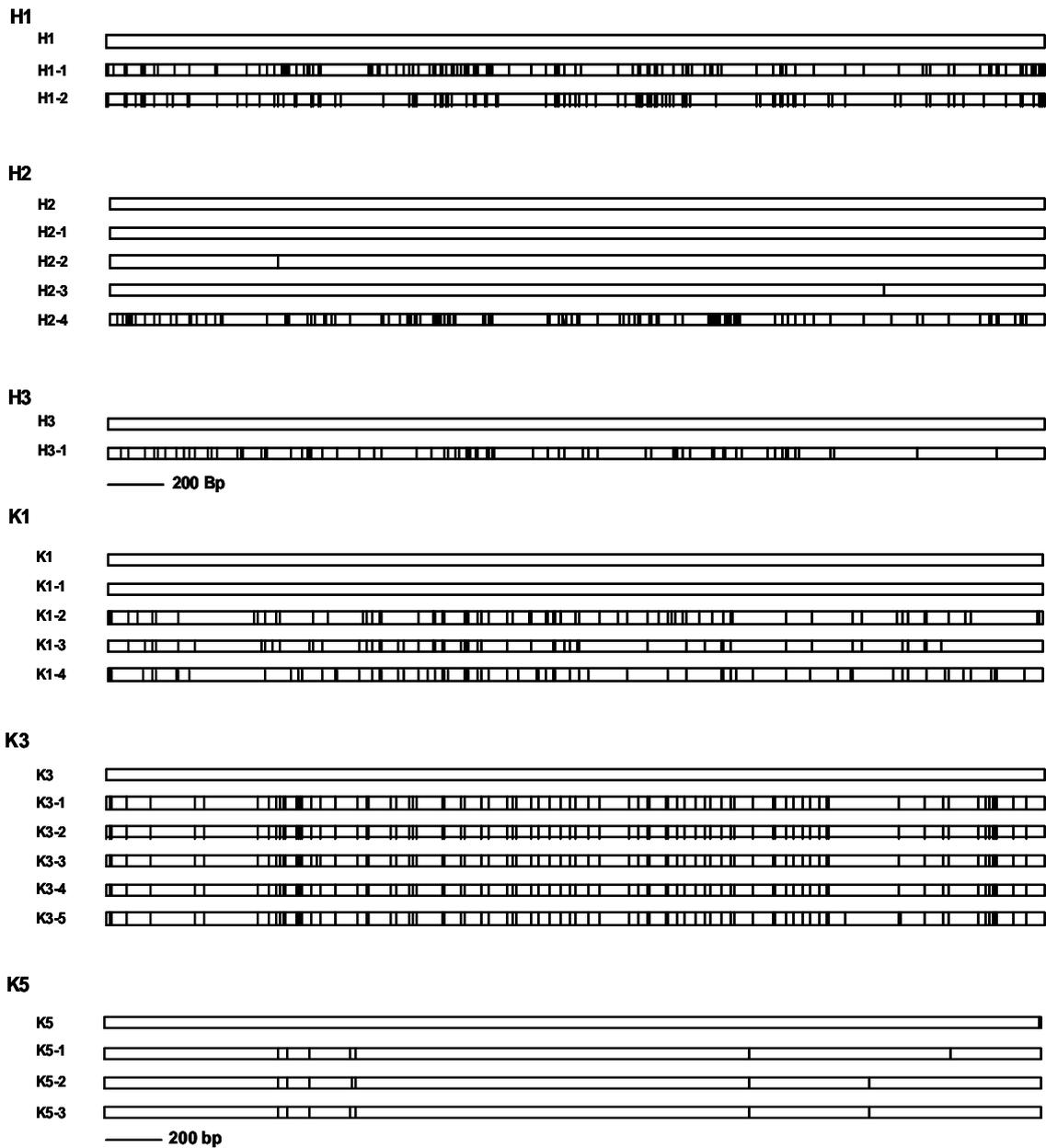


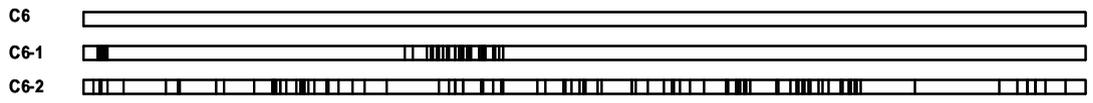
Abb. A2: Haplots der nicht-südafrikanischen Familien aus Houston, USA (H1, H2, H3), Seoul, Korea (K1, K3, K5), Bogota, Kolumbien (C5, C6, C7) und Belfast, Irland.



**C5**



**C6**



**C7**



**Irland**

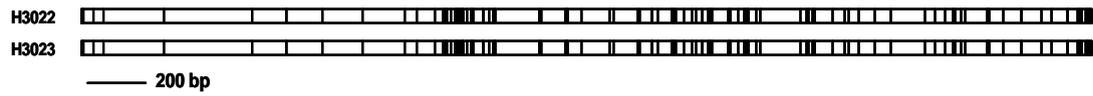


Abb. A3: Multiples Alignment der abgeleiteten Baba-Sequenzen der sequenziellen Isolate

J99	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
LSU1014-1	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
LSU1014-6	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
LSU1062-1	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
LSU1062-3	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
NQ331	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
NQ1832	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
NQ352	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
NQ1701	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
NQ367	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
NQ1671	MKKHILSLDGLSLVSTLSAEDDGFYTSVGYQIGEAACMVNTKGIQ	QLSDNYEENKLNLRYSLENTL	IKKLSADPSAINVAR	ENLIGASAKNLIG	KANS	PAYQAVLLA	INA	112																																																																										
J99	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
LSU1014-1	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
LSU1014-6	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
LSU1062-1	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
LSU1062-3	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
NQ331	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
NQ1832	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
NQ352	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
NQ1701	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	223																														
NQ367	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	222																														
NQ1671	AVGFWNVVGY	TQCGGNANG	SKSIS	TI	FNNP	CV	RSTSI	TCS	ING	HS	EGY	GM	ST	EN	FK	LNE	AY	Q	L	CH	AL	K	G	L	P	AL	K	B	N	N	G	K	V	N	-	V	T	Y	T	C	S	G	B	C	N	N	S	Q	V	T	G	222																														
J99	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	328
LSU1014-1	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	328
LSU1014-6	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	328
LSU1062-1	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	328
LSU1062-3	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	323
NQ331	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	323
NQ1832	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	323
NQ352	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	328
NQ1701	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	319
NQ367	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	319
NQ1671	WNNQK	D	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	334
J99	SAIQKMITDAQELVNGTSAINNSHQ	SSIS	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I	T	G	I	C	G	F	S	E	I	439
LSU1014-1	SAIQKMITDAQELVNGTSAINNSHQ	SSIS	---	ST	R	K	I	Q	I	D	G	K	S	V	T	I	S	S	W	V	S	R	A	D	E	N	T	G	V	S	T	E	I	T	N	K	E	V	P	S	A	Q	L	L	A	Q	A	S	T	I	N	T	I	N	A	C	P	Y	H	I	S	N	S	E	A	N	P	K	E	S	T	I										



## PUBLIKATIONEN

### *Manuskript*

Sandra Schwarz, Giovanna Morelli, Robert J. Owen, David Y. Graham, Schalk van der Merwe, Mark Achtman and Sebastian Suerbaum. "Horizontal plus vertical transmission of *Helicobacter pylori* in South African multigeneration families"

Sandra Schwarz, Elena Katzowitsch, Sheralee Cleland, Patrick Olbermann, Christine Josenhans and Sebastian Suerbaum. "Allelic variation of the *Helicobacter pylori* adhesin genes *babA* and *sabA* during chronic infection is associated with quantitative differences of adhesion to Lewis<sup>b</sup> and sialyl Lewis<sup>x</sup>".

### *In Vorbereitung*

Sandra Schwarz, Giovanna Morelli, *et al.*, "Microevolution of *Helicobacter pylori* during chronic infection and after natural transmission: Analysis of rates of mutation and recombination in genes belonging to different functional categories"

### *Buchkapitel*

Sebastian Suerbaum, Sandra Schwarz, and Christine Josenhans (2006). "Pathogenomics of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species". In: Pathogenomics. Hacker, J., Dobrindt, U. (eds.). Wiley-VCH, Weinheim

## TAGUNGEN UND WORKSHOP-PRÄSENTATIONEN

### *Vorträge*

1. Sandra Schwarz, Giovanna Morelli, Barica Kusecek, Schalk van der Merwe, David Y. Graham, Robert J. Owen, Mark Achtman, Sebastian Suerbaum (2006). "Genetic relationships between *Helicobacter pylori* strains isolated from members of families from different geographical regions". Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg, Deutschland
2. Sandra Schwarz, Elena Katzowitsch, Sheralee Cleland, Patrick Olbermann, Christine Josenhans and Sebastian Suerbaum (2007). "Allelic variation of the *Helicobacter pylori* adhesin genes *babA* and *sabA* during chronic infection is associated with quantitative differences of adhesion to Lewis<sup>b</sup> and sialyl Lewis<sup>x</sup>".  
International workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation, Istanbul, Türkei  
Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen, Deutschland

### *Poster*

Sandra Schwarz, Elena Katzowitsch, Sebastian Suerbaum (2003). "Selective Cloning and Characterization of Novel Genes from Asian *Helicobacter pylori* Strains". Report des Europäischen Graduiertenkollegs der Universitäten Würzburg and Umeå "Gene regulation in and by microbial pathogens", Umeå, Schweden

Sandra Schwarz, Giovanna Morelli, Barica Kusecek, Schalk van der Merwe, David Y. Graham, Robert J. Owen, Mark Achtman, Sebastian Suerbaum (2006). "Genetic relationships between *Helicobacter pylori* strains isolated from members of families from different geographical regions". Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie, Jena, Deutschland

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name Sandra Schwarz  
Geburtsdatum 16.06.1976  
Geburtsort Cuxhaven

### Schulbildung

1988-1995 Lichtenberg-Gymnasium, Cuxhaven  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1995-2001 Studium der Biologie (Diplom)  
Carl-von-Ossietzky Universität, Oldenburg  
2000-2001 Diplomarbeit bei PD Dr. Wolfgang Schmidt, Universität Oldenburg  
"Induktion von Proteoidwurzeln bei *Lupinus albus*"  
2001 Verteidigung der Diplomarbeit

### Promotion

2002-2008 Promotion zum Thema „Genetische und Phänotypische Variabilität von *Helicobacter pylori* während der Infektion und nach natürlicher Transmission" bei Prof. Dr. Sebastian Suerbaum  
2002-2003: Insitut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg  
Assoziiertes Mitglied des europäischen Graduiertenkollegs der Universitäten Würzburg und Umeå (Schweden) "Gene Regulation in and by Microbial Pathogens", koordiniert von Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker  
2003-2008: Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Medizinische Hochschule Hannover

## Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Genetische und phänotypische Variabilität von *Helicobacter pylori* während der Infektion und nach natürlicher Transmission" selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den