

Beschreibung von Energietaxis in
Helicobacter pylori und die Rolle der
Chemosensoren

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. univ. Tobias Schweinitzer

geboren am 3. April 1979
in
München

2009

Referentin: Prof. Dr. Christine Josenhans
Koreferent: Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand
Tag der Promotion: 27. Mai 2009

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover im Zeitraum von Oktober 2004 bis September 2008 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christine Josenhans durchgeführt.

Diese Arbeiten wurden finanziell ermöglicht durch die Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projektförderung JO 344/2-2) und des BMBF (Teilprojekt im Verbund ERAnet Pathogenomics, Projektteil HELDIVnet).

1 Inhaltsverzeichnis

1	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	3
2	<u>Zusammenfassung</u>	10
3	<u>Abstract</u>	11
4	<u>Einleitung</u>	12
4.1	<i>Helicobacter pylori</i>	12
4.1.1	Entdeckung und Geschichte	12
4.1.2	Morphologie und Flagellenapparat	12
4.1.3	Physiologie von <i>H. pylori</i>	14
4.1.4	Genetische Eigenschaften und regulatorische Elemente von <i>H. pylori</i>	17
4.1.5	<i>Helicobacter pylori</i> und Säure	18
4.1.5.1	<i>Helicobacter pylori</i> als neutralophiles Bakterium	18
4.1.5.2	Mechanismen der Säureakklimatisierung von <i>H. pylori</i>	19
4.1.5.3	Regulation der Säureakklimatisierung durch <i>H. pylori</i>	21
4.2	Chemotaxis	22
4.2.1	Vom Reiz zur Reaktion – Der Mechanismus der Signalübertragung	23
4.2.2	Struktur der bakteriellen Chemorezeptoren	24
4.2.3	Supramolekulare Organisation des bakteriellen Chemotaxisapparates	26
4.2.4	Lokalisierung von bakteriellen Chemosensoren	27
4.2.5	Substratspezifitäten von bakteriellen Sensoren	28
4.2.6	Energietaxis in Bakterien	28
4.2.7	Adaptationsmechanismen in der bakteriellen Taxis	31
4.2.8	Regulation der bakteriellen Chemotaxis	32
4.2.9	Aktueller Wissenstand über Chemotaxis in <i>H. pylori</i>	33
4.2.9.1	Bedeutung der Chemotaxis von <i>H. pylori</i> in seinem Habitat	35
4.2.9.2	Regulation der Chemotaxis in <i>H. pylori</i>	36
4.3	Ziele dieser Arbeit	37
5	<u>Material</u>	38
5.1	Geräte	38
5.2	Computerprogramme für Bioinformatik und Statistik	38
5.3	Chemikalien	39
5.4	Enzyme, Antikörper, Kits und Größenmarker für Gele	39
5.5	Oligodesoxynukleotide	40
5.6	Plasmide	43
5.7	Bakterienstämme	45

6	Methoden	49
6.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	49
6.2	Anzucht von <i>H. pylori</i>	49
6.3	Methoden zur DNA-Präparation	50
6.3.1	Präparation genomischer DNA mittels des Qiagen-QiaAmp-Kits	50
6.3.2	Präparation von Plasmiden mittels des Qiagen-QiaPrep-Kits	50
6.3.3	Präparation von Plasmiden mittels des Qiagen-Plasmid-Midi-Kits	50
6.3.4	Präparation von linearen DNA-Fragmenten mit Hilfe des Qiagen-QiaSpin-Kits	51
6.4	Amplifikation von DNA mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
6.5	DNA-Modifikation	52
6.5.1	Restriktionsverdau	52
6.5.2	Dephosphorylierung	52
6.5.3	Phosphorylierung	53
6.5.4	Ligation	53
6.6	DNA-Sequenzierung	53
6.7	Agarosegelelektrophorese	54
6.8	Konstruktion von Plasmiden zur Knock-out-Mutagenese von <i>H. pylori</i>	54
6.9	Konstruktion von Expressionsplasmiden	55
6.10	Transformation von <i>H. pylori</i>	56
6.11	Transformation von <i>E. coli</i>	57
6.11.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	57
6.11.2	Transformation von <i>E. coli</i>	57
6.12	Herstellung von Knock-out-Mutanten in <i>H. pylori</i>	58
6.12.1	Herstellung von resistenzmarkierten Einzel- und Doppel-Knock-out-Mutanten in <i>H. pylori</i>	58
6.12.2	Herstellung multipler Knock-out-Mutanten in <i>H. pylori</i>	59
6.13	Bestimmung des Proteingehalts einer Probe	60
6.14	Präparation einzelner <i>H. pylori</i>-Fraktionen	61
6.15	SDS-PAGE	61
6.16	Westernblot-Analysen	62
6.17	Proteinreinigung	64
6.17.1	Nicht-denaturierende Reinigung von TlpD aus <i>H. pylori</i>	64
6.17.2	Denaturierende Reinigung von TlpD aus <i>H. pylori</i>	64
6.17.3	Proteinreinigung mit Hilfe einer SDS-PAGE	65

6.18	Ko-Präzipitation	66
6.19	Immunfluoreszenz	67
6.20	<i>temporal assays</i> zur Untersuchung bakterieller Taxis	67
6.21	<i>spatial assays</i> zur Untersuchung bakterieller Taxis	69
6.22	Bestimmung des ATP-Gehalts in Bakterien	70
6.23	Tierversuche in der Mongolischen Rennmaus	70
6.23.1	Stuhl-Antigen-Test	71
6.23.2	Inokulation und Sektion	71
6.23.3	Reisolation von <i>H. pylori</i> aus Magengewebe der Mongolischen Rennmaus	71
6.24	Motilitätsplatten für <i>E. coli</i>	72
7	<u>Ergebnisse</u>	74
7.1	Bioinformatische Analysen der Chemosensoren von <i>H. pylori</i>	74
7.1.1	Analyse der vier Chemosensoren aus <i>H. pylori</i> bezüglich ihrer Homologie zu Proteinen bekannter Funktion	74
7.1.2	Analyse der Aminosäuresequenzen der Sensoren bezüglich der Existenz von Methylierungsmotiven	79
7.1.3	Bioinformatische Vorhersage der Tertiärstruktur von TlpD aus <i>H. pylori</i>	80
7.2	Analyse der metabolischen Aktivität von <i>H. pylori</i>	81
7.2.1	Die terminale Oxidase Cbb ₃ von <i>H. pylori</i> ist essenziell für die Proliferation	81
7.2.2	Untersuchung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf den ATP-Gehalt der Bakterien	82
7.2.2.1	Die Medienzusammensetzung wirkt sich auf den ATP-Gehalt von <i>H. pylori</i> aus	83
7.2.2.2	Die Zusammensetzung der Atmosphäre wirkt sich auf den ATP-Gehalt von <i>H. pylori</i> N6 aus	84
7.2.2.3	Metabolische Inhibitoren reduzieren den ATP-Gehalt von <i>H. pylori</i>	85
7.3	Analyse des Verhaltens von <i>H. pylori</i> und der Rolle der Chemosensoren	88
7.3.1	Analyse des Verhaltens des <i>H. pylori</i> -N6-Wildstammes in Abhängigkeit von den verwendeten Medien	90
7.3.2	Analyse des Verhaltens des <i>H. pylori</i> -N6-Wildstammes unter dem Einfluss metabolischer Inhibitoren	91
7.3.3	Untersuchung des <i>H. pylori</i> -N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium ohne Serum	93
7.3.4	Bakterien des <i>H. pylori</i> -N6-Wildstammes bewegen sich in RPMI1640-Medium mit Serum ungerichtet	95

7.3.5	Konstruktion und Charakterisierung verschiedener Mutanten im Chemotaxisapparat von <i>H. pylori</i> N6	97
7.3.5.1	Bestimmung des Chemotaxis-Nullphänotyps durch Herstellung der Chemotaxis-negativen Mutante <i>cheAY2</i>	98
7.3.5.2	Der Sensor TlpD vermittelt ein dominantes energieabhängiges Verhalten	101
7.3.5.3	Vergleich verschiedener <i>H. pylori</i> -N6-Mutanten in nährstoffreicherem BHI/Hefe-Medium	104
7.3.6	Verhalten weiterer <i>H. pylori</i> -Wildstämme und ihrer <i>tlpD</i> -Mutanten	105
7.3.7	Komplementierung von <i>tlpD in trans</i> rekonstituiert das Verhalten der Bakterien	107
7.4	Untersuchung der Taxis von <i>H. pylori</i> N6 in <i>spatial assays</i>	108
7.5	Untersuchung verschiedener Substanzen in ihrer Wirkung auf das Verhalten von <i>H. pylori</i>	109
7.6	Lokalisierung von TlpD in <i>H. pylori</i> N6	110
7.6.1	TlpD ist in der löslichen und in der unlöslichen Fraktion von <i>H. pylori</i> lokalisiert	110
7.6.2	Nachweis von TlpD in intakten Bakterien durch Fluoreszenzmikroskopie	112
7.7	Charakterisierung der funktionellen Verknüpfung möglicher Interaktionspartner von TlpD	114
7.7.1	Untersuchung der Beteiligung der Histidinkinase CheAY2 und der Sensoren TlpA, TlpB und TlpC an der Lokalisierung von TlpD	114
7.7.2	Untersuchung der Beteiligung von HP0697 und HP1033 an der Lokalisierung von TlpD	116
7.7.3	Untersuchung der Beteiligung von HP0600 an der Funktion von TlpD	118
7.8	Molekulare und biochemische Charakterisierung von <i>H. pylori</i>-TlpD	120
7.8.1	Reinigung des Sensors TlpD-His ₆ aus der löslichen Fraktion von <i>H. pylori</i> N6	121
7.8.2	<i>H. pylori</i> -TlpD kann in Lösung stabile Dimere bilden	122
7.8.3	Reinigung von TlpD-His ₆ aus der Membranfraktion von <i>H. pylori</i>	123
7.8.4	Weitere Reinigung des TlpD aus der löslichen Fraktion mit Hilfe eines präparativen SDS-Gels	125
7.8.5	Massenspektrometrische Analyse und Vergleich der zytosolischen und membranären Form von <i>H. pylori</i> -TlpD	126
7.9	Identifizierung möglicher neuer Interaktionspartner von TlpD mit Hilfe einer Ko-Präzipitation aus Bakterienlysat	127

7.10 Biologische Relevanz von <i>H. pylori</i>-TlpD im Infektionsmodell der Mongolischen Rennmaus	129
7.10.1 Etablierung des <i>H. pylori</i> Stuhl-Antigen-Tests zur Überprüfung des Infektionsstatus und Infektionsverlaufs	129
7.10.2 Untersuchung des Effekts von TlpD auf Infektionsrate und Bakterienlast im Modell der Mongolischen Rennmaus	131
7.10.3 Untersuchung der Rolle von TlpD im Infektionsverlauf von der akuten zur chronischen Infektion	136
7.11 Analyse der Effekte der Sensoren von <i>H. pylori</i> im heterologen Modell von <i>E. coli</i> im Hinblick auf Verhalten, Energiewahrnehmung und mögliche Substratspezifität	140
7.11.1 Funktion der vier Sensoren TlpA, TlpB, TlpC und TlpD aus <i>H. pylori</i> in <i>E. coli</i> BT3388 gegenüber verschiedenen Zuckern in Minimalmedium	142
7.11.2 Funktion der vier Sensoren aus <i>H. pylori</i> im <i>E. coli</i> -Stamm BT3388 in Anwesenheit von Acetat, Arginin und Bicarbonat	145
7.11.3 Funktion der vier Sensoren aus <i>H. pylori</i> in <i>E. coli</i> -Stämmen RP437, BT3388 und BT3312 in Succinat-Platten	146
7.11.4 Funktion der vier Sensoren aus <i>H. pylori</i> in den <i>E. coli</i> -Stämmen RP437, BT3388 und BT3312 in Trypton-Platten	149
8 Diskussion	151
8.1 Neue Erkenntnisse aus den bioinformatische Analysen der Chemosensor-Proteine von <i>H. pylori</i>	151
8.2 Die terminale Oxidase Cbb3 in <i>H. pylori</i> ist unter den getesteten Bedingungen essenziell für die bakterielle Proliferation	153
8.3 Zusammenhang zwischen Kultivierungsbedingungen von <i>H. pylori</i> und Energiegewinnung	155
8.4 Der <i>H. pylori</i>-N6-Wildstamm zeigt energieabhängiges Verhalten und Energietaxis	156
8.5 TlpD vermittelt energieabhängiges Verhalten	159
8.6 Verschiedene Substanzen beeinträchtigen die Energiewahrnehmung von <i>H. pylori</i>	162
8.7 Potenzielle Interaktionspartner von TlpD - Beteiligung an Lokalisierung und Funktion	164
8.8 Modelle der Energiewahrnehmung in <i>H. pylori</i> durch TlpD	169
8.9 TlpA und TlpB zeigen Energietaxis im heterologen Modell gegenüber metabolisierbaren Substraten	171

8.9.1	TlpA und TlpB zeigen Energietaxis im heterologen Modell gegenüber metabolisierbaren Zuckern	172
8.9.2	Die Sensoren TlpA, TlpB und TlpD ermöglichen eine Orientierung unter mikroaeroben Bedingungen in Succinat- und Tryptonmedium	175
8.9.3	Die Sensoren aus <i>H. pylori</i> zeigen keine Reaktion zu Säuren unter den getesteten Bedingungen	177
8.10	Relevanz der Taxis von <i>H. pylori</i> und des Sensors TlpD <i>in vivo</i> im Tiermodell der Mongolischen Rennmaus	178
8.10.1	Eignung des <i>H. pylori</i> -Stuhl-Antigen-Tests zur Überprüfung der Infektion während des Infektionszeitraumes	179
8.10.2	Relevanz von TlpD aus <i>H. pylori</i> in der Infektion von Mongolischen Rennmäusen	180
8.11	Ausblick	183
<u>9</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>184</u>
<u>10</u>	<u>Literatur</u>	<u>186</u>
<u>11</u>	<u>Anhang</u>	<u>199</u>
11.1	Publikationen	199
11.2	Lebenslauf	200
11.3	Erklärung	201
11.4	Danksagung	202

„Wer die Bewegungen der Bakterien, namentlich bei starker Vergrößerung genau studirt hat, der wird sich nicht verhehlen können, dass sie so entschieden den Schein willkürlicher, intelligenter Bewegungen erwecken, wie nur irgend welche Bewegungen von Mikroorganismen entschieden thierischer Art. Dies zusammengenommen mit dem enormen O-bedürfniss und der starken CO₂-ausscheidung weist den beweglichen Bakterien mit noch grösserer Bestimmtheit einen Platz unter den „beseelten“ thierischen Wesen an, als ihre morphologischen Beziehungen sie den pflanzlichen Organismen zuordnen.“

Theodor Wilhelm Engelmann 1881

„Die zu freier Ortsbewegung befähigten Organismen sind natürlich [...] gegen Reize mannigfacher Art empfindlich, von denen wir hier jedoch nur solche berücksichtigen wollen, welche räumlich orientirend wirken, also eine durch die Angriffsrichtung des Reizes bestimmte Bewegungsrichtung hervorrufen.“

Wilhelm Pfeffer 1884

2 Zusammenfassung

Helicobacter pylori kolonisiert chronisch über die Hälfte der Weltbevölkerung und ist damit eines der erfolgreichsten humanpathogenen Bakterien. Ca. 15% Prozent der infizierten Personen entwickeln ein Magengeschwür und ca. 1% ein Adenokarzinom des Magens. Weltweit gibt es jährlich ca. 500.000 Krebserkrankungen auf Grund einer *H. pylori*-Infektion. Herkömmliche Antibiotika-Therapien gegen *H. pylori* sind vorhanden, stehen jedoch nicht als Monotherapie zur Verfügung. *H. pylori* ist obligat und spezifisch mit seinem menschlichen Wirt assoziiert und hat als chronisch kolonisierendes Bakterium eine sehr spezifische Biologie entwickelt, mit deren Hilfe er die Magennische dauerhaft besiedeln kann. Zu den für die Kolonisierung essenziellen Eigenschaften gehören die flagelläre Beweglichkeit und die damit verbundene spezifische Orientierungsfähigkeit (Taxis), die von *H. pylori* konstitutiv unter allen bisher untersuchten Bedingungen exprimiert werden.

Die Chemotaxis von *H. pylori* wurde bisher nur in Grundzügen charakterisiert und war der Hauptgegenstand der hier vorliegenden Untersuchungen. Zentrale Fragen, wie beispielsweise zu Substratspezifitäten der einzelnen Sensoren, zur Existenz von Energietaxis und deren *in vivo*-Relevanz oder zur Beteiligung einzelner Chemotaxis-Komponenten an regulatorischen Prozessen sind noch offen. In *H. pylori* konnten unter anderem bisher vier Chemosensoren (TlpA, TlpB, TlpC und TlpD), sowie ein vollständiger Satz der zentralen Komponenten des Chemotaxisapparates (CheAY2, CheY1, CheW) identifiziert werden.

In dieser Arbeit konnte nun mit Hilfe verschiedener Methoden der Molekularbiologie und Beweglichkeitsanalysen gezeigt werden, dass *H. pylori* zur Energietaxis (Orientierung abhängig von metabolischer Aktivität) fähig ist und dass dieses Verhalten unter allen bisher getesteten Bedingungen dominant ist. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde bei der Analyse von Bakterienmutanten deutlich, dass die Energietaxis zu einem großen Teil durch den Sensor TlpD bereitgestellt wird. Der Sensor TlpD vermittelt dabei weitgehend unabhängig von den anderen Sensoren Energietaxis. Der Sensor TlpD, welcher im Gegensatz zu den anderen Sensoren aus *H. pylori* keine Transmembrandomänen trägt, scheint in *H. pylori* sowohl zytosolisch als auch membranassoziiert vorzuliegen. Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Reinigung des Sensors TlpD aus *H. pylori* ermöglichte erste biochemische Charakterisierungen und die Identifikation erster möglicher Interaktionspartner.

In einem *in-vivo*-Infektionsmodell (Mongolische Rennmaus) konnte für den Sensor TlpD darüber hinaus eine Rolle in der Persistenz im Magen gezeigt werden. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit scheint dieser Sensor in der initialen Infektion von untergeordneter Bedeutung zu sein, jedoch einen deutlichen Effekt auf die Kolonisierungseffizienz von *H. pylori* im Laufe eines längeren Infektionszeitraumes zu haben.

Schließlich konnten in einem heterologen Modell (*E. coli*) nach Expression der *H. pylori*-Sensormoleküle auch erste Hinweise für eine mögliche Beteiligung der Sensoren TlpA und TlpB an der Energietaxis beobachtet werden. Damit spielten insgesamt mindestens drei der vier Sensoren aus *H. pylori* eine Rolle in der Energiewahrnehmung, was die biologische Wichtigkeit des Konzepts der Energietaxis unterstreicht.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit werden in Zukunft eine genauere biochemische Charakterisierung von TlpD, eine Analyse von Interaktionen mit anderen Proteinen und damit auch eine weitere Aufklärung des Wahrnehmungsmechanismus möglich sein. Darüber hinaus kann die Rolle der Sensormoleküle und damit auch der Energietaxis *in vivo* weiter untersucht werden, um deren Bedeutung in einer stabilen Kolonisierung zu klären. Die Fähigkeit zur Energietaxis ist nach den bisherigen Erkenntnissen für eine persistente Infektion durch *H. pylori* unabdingbar. In weiterer Zukunft könnte daher diese in dieser Arbeit erstmals für *H. pylori* beschriebene spezifische Eigenschaft als neuer Angriffspunkt für eine Therapie dienen.

Schlüsselwörter: Helicobacter pylori, Energietaxis, Chemosensor

3 Abstract

Helicobacter pylori colonizes the stomach of more than half of the human population, making it one of the most successful human pathogenic bacteria. Of all infected persons, approximately 15% develop gastric ulcer and 1% adenocarcinoma. Worldwide, there are about half a million new cases per year of gastric cancer due to *H. pylori*. A therapy based on several common antibiotics is available against *H. pylori* however an effective monotherapy is nonexistent. *H. pylori* is obligatorily associated with the human host and, during evolution, has established a highly specific biology to colonize the gastric niche persistently. Flagellar motility and targeted orientation (taxis) are essential prerequisites for a successful chronic colonization and are expressed constitutively.

In *H. pylori*, mechanisms of chemotaxis, which are the major topic of the present study, have only been poorly characterized so far. Important questions, such as the substrate specificity of certain sensors, the existence of energy taxis in *H. pylori* and its *in vivo* relevance have still not been addressed. Until now, four putative chemosensors (TlpA, TlpB, TlpC and TlpD) and all necessary central chemotaxis components (CheAY2, CheY1, CheW) have been identified in *H. pylori*.

In this study, we showed the existence of energy taxis in *H. pylori* and demonstrated that energy taxis is the dominant behaviour using different molecular biological methods and motility analysis. Furthermore, we unravelled, using the characterization of *H. pylori* mutants, that energy taxis is mainly mediated by the sensor TlpD. The function of TlpD was predominantly independent from other sensors, as shown in mutants expressing only TlpD. Concerning its subcellular localization, the sensor TlpD, carrying no transmembrane domain, was detected to localize both in the cytosol as well as associated with the membrane. In addition, TlpD was purified from *H. pylori*, which served to perform preliminary biochemical analyses of the sensor and to identify some putative interaction partners. In an *in vivo* model (Mongolian gerbil) we could demonstrate an important role of TlpD in persistent infection, whereas TlpD seemed to play a less dominant part during the initial infection.

Finally, it was shown that the sensors TlpA and TlpB participate in energy taxis in a heterologous system expressing *H. pylori* sensors in *E. coli*. Taken together, at least three sensors in *H. pylori* are able to mediate energy taxis. This supports our hypothesis of bacterial energy taxis being an important mechanism to optimize the bacterial metabolic yield within the restricted gastric niche.

Based on the results of this study, it will be possible to perform further studies of TlpD and its putative interaction partners in order to elucidate the exact mode of sensing. Also, the role of energy taxis in an *in vivo* model should be further examined to clarify its importance in bacterial persistence. Owing to its role as a carcinogenic agent, new strategies for therapy and eradication of *H. pylori* are of high general interest. To our present knowledge, energy taxis seems to be absolutely essential for stable *H. pylori* colonization thus, the specific energy sensing properties described in this study may serve as promising novel therapy targets.

Keywords: Helicobacter pylori, energy taxis, MCP

4 Einleitung

4.1 *Helicobacter pylori*

4.1.1 Entdeckung und Geschichte

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden sowohl im Magen von Tieren, als auch in dem des Menschen spiralförmige Bakterien beobachtet (Bottcher, 1874, Jaworski, 1889). Dies wurde allerdings nicht in den Zusammenhang mit Ulkuserkrankungen gebracht, da die gängige Meinung bestand, es handle sich dabei lediglich um die transiente orale Flora und der Magen sei nicht dauerhaft von Bakterien besiedelbar. Erst im Jahr 1982 gelang den beiden Australiern Barry Marshall und Robin Warren die *in vitro* Kultivierung von *H. pylori* aus humanem Magenbiopsiematerial (Warren und Marshall, 1983). Aufgrund morphologischer Kriterien wurden die Bakterien der Gattung *Campylobacter* zugeordnet und zuerst als *Campylobacter pyloridis* (Marshall und Warren, 1984) später als *Campylobacter pylori* (Marshall und Goodwin, 1987) bezeichnet. Aufgrund von 16S-RNA-Homologien und verschiedener phänotypischer Eigenschaften wurde die Spezies schließlich einem neuen Genus zugeordnet. Das Genus *Helicobacter* wurde 1989 gebildet, der Gruppe der ϵ -Proteobakterien zugeordnet und die Spezies fortan als *Helicobacter pylori* bezeichnet (Goodwin *et al.*, 1989). In der Gruppe der ϵ -Proteobakterien finden sich außerdem die Gattungen *Campylobacter*, *Wollinella* und *Arcobacter* (Vandamme *et al.*, 1991). Der Zusammenhang zwischen einer *H. pylori*-Infektion und gastrischen Ulkuserkrankungen, wie peptischen Ulkus und chronischer Gastritis, konnte durch die Selbstversuche von Marshall und Morris gezeigt werden. Nach der oralen Aufnahme der Bakterien entwickelten beide eine Gastritis, welche durch Antibiotika therapierbar war (Marshall *et al.*, 1985; Morris und Nicholson, 1987). Dadurch wurde der Zusammenhang zwischen der Infektion und einer Gastritis gezeigt. Es folgte eine Reihe von Studien, welche eine Verbindung zwischen *H. pylori* und einem gastrischen Karzinom beschrieben (Forman *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1991; Talley *et al.*, 1991) und folglich stufte die Weltgesundheitsorganisation WHO das Bakterium als Karzinogen der Klasse 1 ein (d.h. definitives Karzinogen).

4.1.2 Morphologie und Flagellenapparat

Helicobacter pylori ist ein Gram negatives Bakterium mit einer Länge von 2 bis 4 μm und einem Durchmesser von 0,5 bis 1 μm . Während die Bakterien *in vivo* überwiegend eine spiralförmige Morphologie aufweisen, treten *in vitro* auch stäbchenförmige und kokkoide

Formen auf (Goodwin und Armstrong, 1990; Bode *et al.*, 1993). Zwar weisen die kokkoiden Formen des Bakteriums noch einen minimalen Stoffwechsel auf, eine Anzucht dieser Form *in vitro* ist jedoch nicht möglich (Mizoguchi *et al.*, 1999). Die genaue Bedeutung dieser Form ist bislang unklar. *H. pylori* ist unipolar mit 4 – 6 Flagellen begeißelt (Josenhans und Suerbaum, 2002) (Abbildung 1). Die Flagellen sind einzeln von einer Membranhülle umgeben (Geis *et al.*, 1993). Die Funktion der Flagellenhülle konnte bisher nicht vollständig geklärt werden; möglicherweise stellt die Hülle einen Schutz der Flagellen gegenüber niedrigen pH-Werten dar.

Bislang wurde für etwa 60 Gene von *H. pylori* ein Zusammenhang mit der Motilität und dem strukturellen Zusammenbau der Flagellen vorhergesagt. Die Regulation der Flagellengene verläuft nach einem komplexen, hierarchischen System, entsprechend der Reihenfolge des Zusammenbaus und lässt sich in vier Klassen von Genen (frühe Gene, mittlere Gene, späte Gene, intermediäre Gene) einteilen. Die Flagellenbiosynthese wird reguliert durch das Zweikomponentensystem FlgRS, den *house-keeping* Sigmafaktor σ^{80} , den alternativen Sigmafaktoren σ^{28} und σ^{54} , sowie den Anti-Sigmafaktor FlgM (Niehus *et al.*, 2004). Die Flagellen dienen der Fortbewegung der Bakterien und bestehen aus einem ca. 3 – 5 μm langem Filament, welches über einen flexiblen Haken mit dem Antriebsapparat im Basalkörper verbunden ist. Der Basalkörper dient dabei der Weiterleitung des Antriebs an die Filamente, wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der Motor in zwei Richtungen rotieren kann: mit und entgegen dem Uhrzeigersinn (Manson *et al.*, 1998). Die Rotationsrichtung wechselt in Abhängigkeit von Signalen des Chemotaxissystems (siehe auch 4.2.1) und wird durch die Schalterstruktur FlhM des Flagellenmotors reguliert (Francis *et al.*, 1994). Für *H. pylori* wurde die Rotationsrichtung des Motors bislang nicht näher untersucht, jedoch finden sich in *H. pylori* sowohl zum Flagellenmotor selbst als auch zur Schalterstruktur homologe Proteine.

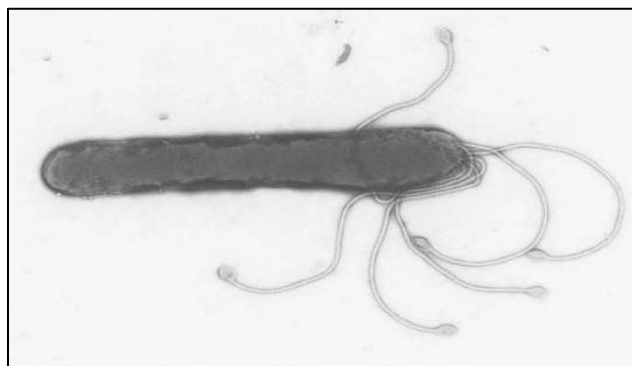


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. pylori* (Shin-Ichi Aizawa, C. Josenhans, unveröffentlicht)

4.1.3 Physiologie von *H. pylori*

Die Kultivierung der Bakterien erfolgt in komplexen Vollmedien, welche mit Blut oder Serum ergänzt werden. In der Regel erfolgt die Anzucht in einer humiden, mikroaerophilen Atmosphäre. Obligat ist eine CO₂-Anreicherung (5 – 12%), womit das Bakterium eher capnophil als mikroaerophil ist (Bury-Mone *et al.*, 2006; St Maurice *et al.*, 2007). Das Temperaturoptimum liegt bei ca. 37°, wobei von Wachstum zwischen 34°C und 42°C berichtet wurde (Scott *et al.*, 2002).

Als Kohlenhydratquelle kann Glukose über den Entner-Doudoroff-Weg und Pentosephosphat-Weg als Alternative zur Glykolyse metabolisiert werden. Aber nicht Glukose, sondern Laktat, L-Alanin, L-Serin und D-Aminosäuren sind die Hauptquellen für die Produktion von Pyruvat (Mendz *et al.*, 1994; Doig *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 2003). Das Pyruvat wird nicht von einer Pyruvatdehydrogenase unter der Bildung von NADH, sondern von einer Pyruvatoxidoreductase in Acetyl-CoA umgewandelt (Doig *et al.*, 1999; Hughes *et al.*, 1995; Hughes *et al.*, 1998). Dieser Weg ist für anaerobe Bakterien charakteristisch. Ob er in *H. pylori* dazu genutzt werden kann, mittels anaerober Atmung zu überleben, ist bislang unklar (Hoffman *et al.*, 1996), da auf Standardmedien kein anaerobes Wachstum möglich ist.

Die Existenz eines vollständigen Zitronensäurezyklus in *H. pylori* ist umstritten. Da die Enzyme α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase und Succinat-Dehydrogenase bislang weder experimentell (Pitson *et al.*, 1999) noch bei der Analyse der bekannten Genome (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006) identifiziert werden konnten, liegt der Zyklus möglicherweise in einer verzweigten Form vor (Pitson *et al.*, 1999) (Abbildung 2). Dabei würde der reduzierende Zweig der Produktion von Succinat und der oxidierende Zweig der Bildung von α -Ketoglutarat dienen. Das α -Ketoglutarat ist der Ausgangspunkt für eine Reihe von biosynthetischen Prozessen wie beispielsweise der Synthese verschiedener Aminosäuren (z.B. Lysin, Glutaminsäure). Da bislang keine α -Ketoglutarat-Dehydrogenase gefunden werden konnte fehlt vermutlich der energiegewinnende Schritt der Substratphosphorylierung (Umwandlung von α -Ketoglutarat in Succinat über Succinyl-CoA) in *H. pylori*. Stattdessen sind die beiden Zweige des Zitronensäurezyklus direkt durch die α -Ketoglutarat-Oxidase mit einander verknüpft. So kann das α -Ketoglutarat direkt zu Succinat oxidiert werden. Eine Malatdehydrogenase, welche auch die Reduktion von Oxalacetat in Malat katalysieren könnte und somit für einen reduktiven Ablauf des Zitronensäurezyklus notwendig wäre konnte zwar bisher nicht im Genom gefunden werden, jedoch konnte eine Malatdehydrogenase-Aktivität mittels biochemischer Messungen bestimmt werden (Pitson *et al.*, 1999). Der Zitronensäurezyklus hätte dann in *H. pylori* eher die Funktion der Produktion von Intermediaten der Biosynthese als die der Energiegewinnung (Pitson *et al.*, 1999).

Die Identifikation einer Malat:Quinon-Oxidoreduktase (Kather *et al.*, 2000), welche nur die Oxidation von Malat in Oxalacetat nicht jedoch die Reduktion von Oxalacetat katalysiert spricht jedoch dafür, dass dieser Zweig des Zitronensäurezyklus zumindest unter bestimmten Bedingungen in oxidativer Richtung ablaufen kann. Zudem konnte eine α -Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und eine Succinyl-CoA-Aceto-Acetyl-CoA-Transferase identifiziert werden, welche eine Umwandlung von α -Ketoglutarat in Succinat über Succinyl-CoA katalysieren (Hughes *et al.*, 1998). Dass außerdem eine Succinatdehydrogenaseaktivität, welche möglicherweise von der Fumaratreduktase vermittelt wird, gemessen werden konnte (Chen *et al.*, 1999), spricht dafür das es zumindest unter bestimmten Voraussetzungen einen vollständigen Zitronensäurezyklus in *H. pylori* gibt (Kather *et al.*, 2000) (Abbildung 2). Dieser würde sich damit von den bekannten Beispielen (z.B. *E. coli*) in drei Enzymen unterscheiden (Malat:Quinon-Oxidoreduktase; α -Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; Succinyl-CoA-Aceto-Acetyl-CoA-Transferase).

Des Weiteren konnte bisher keine Isocitratlyase identifiziert werden, was auf ein Fehlen des Glyoxylatweges (Umwandlung von Isocitrat in Malat über Glyoxylat) hindeutet. Stattdessen kann Glyoxylat direkt über die Malatsynthese in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden. Ein verzweigter, nicht-zyklischer Zitronensäurezyklus wurde bereits für *E. coli* unter anaeroben Wachstumsbedingungen beschrieben (Cronin und LaPorte, 1996).

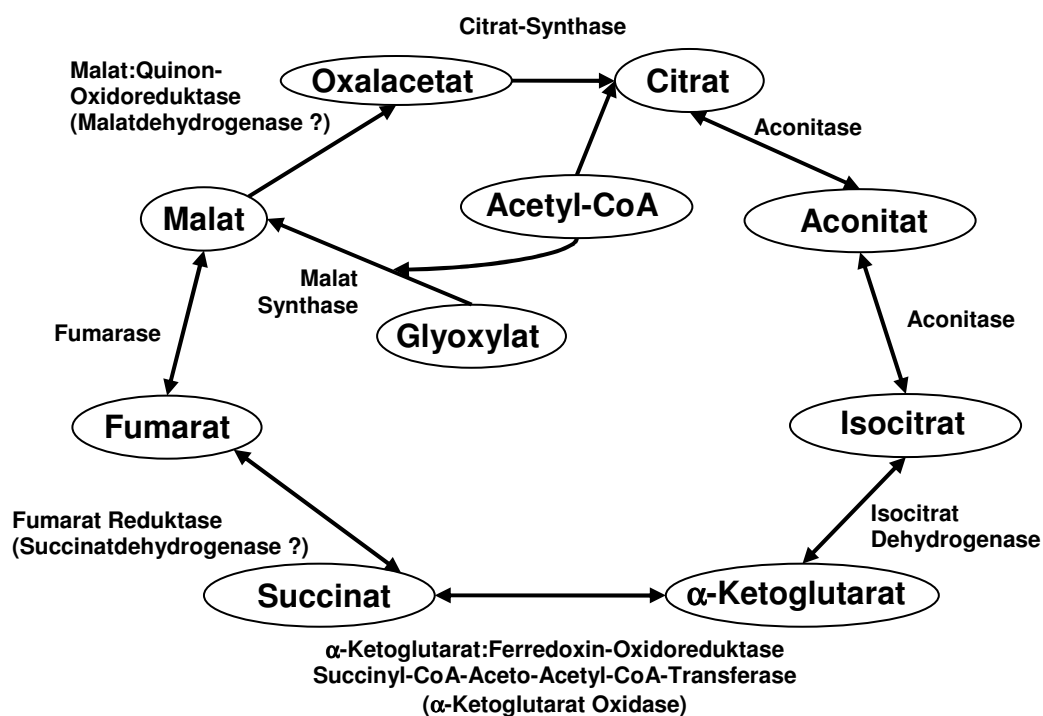


Abbildung 2: Schema des Zitronensäurezyklus von *H. pylori*. Modifiziert nach Pitson *et al.*, 1999 und Kather *et al.*, 2000. Die Existenz einer Malatdehydrogenase und einer Succinatdehydrogenase ist bislang ungeklärt.

Bezüglich der Atmungskette (Abbildung 3) von *H. pylori* wurde gezeigt, dass die NADPH-abhängige Atmung deutlich stärker ist, als die NADH-abhängige. NADPH ist folglich ein wichtigerer Elektronendonator als NADH (Chen *et al.*, 1999). Als Quinon benutzt *H. pylori* überwiegend Menaquinon (Marcelli *et al.*, 1996). Die einzige terminale Oxidase von *H. pylori* ist eine Cytochrom-Typ-cbb₃-Oxidase (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Tsukita *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 1996). Dabei handelt sich um eine Häm-Kupfer-Oxidase mit einer hohen Affinität zu Sauerstoff. Verwandte Oxidasen treten typischerweise in mikroaerophilen Bakterien auf (Pitcher *et al.*, 2002), und erlauben so beispielsweise Bakterien, mikroaerobes Gewebe oder tiefere Bodenschichten zu kolonisieren, oder Diazotrophen in der Umwelt, Stickstofffixierung vorzunehmen (Myllykallio und Liebl, 2000). Die Cytochrom-Typ-cbb₃-Oxidase unterscheidet sich von den anderen bekannten Häm-Kupfer-Cytochrom-Oxidasen in ihrer hohen Affinität zu Sauerstoff (Preisig *et al.*, 1996) und ihrer Fähigkeit, Protonen zu translozieren (Wikstrom *et al.*, 1994). Das Enzym besteht in *H. pylori* aus vier Untereinheiten (Tsukita *et al.*, 1999): CcoN, CcoO, CcoQ und CcoP. Untereinheit I (CcoN) ist ein membranständiges Typ-b-Cytochrom mit einem zweikernigen Zentrum, bestehend aus einem Eisenatom eines High-Spin-Häms und einem Kupferatom (Cu_B) eines Low-Spin-Häms. Untereinheit II und III werden von *ccoO* und *ccoP* kodiert und binden gemeinsam drei Typ-c-Cytochrome. Sie übertragen die Elektronen zur Untereinheit I. Die drei beschriebenen Untereinheiten sind sowohl für die Aktivität als auch den Zusammenbau des Enzyms essenziell. Im Gegensatz dazu fehlt die von *ccoQ* kodierte Untereinheit IV in manchen anderen Bakterienspezies und ist weder für die Aktivität noch für den Zusammenbau des Enzyms essenziell (Oh und Kaplan, 1999; Zufferey *et al.*, 1996). Die Regulation des *ccoNOQP*-Genclusters erfolgt in den einzelnen Spezies sehr unterschiedlich (Cosseau und Batut, 2004). Für die Spezies *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa* und einige andere wurde eine Regulation durch den O₂-sensitiven Regulator FNR beschrieben (Mouncey und Kaplan, 1998; Otten *et al.*, 2001; Ray und Williams, 1997). In einigen Rhizobienspezies wiederum konnte gezeigt werden, dass die Regulation durch das FNR-Paralog FixK geschieht (Fischer, 1996). Zum Teil ist auch eine gemischte Regulationen durch beide beschriebenen Mechanismen möglich (Lopez *et al.*, 2001; Schluter *et al.*, 1997). In manchen Spezies, darunter *Helicobacter* und *Campylobacter*, konnten bisher keine FNR- oder ähnliche Regulatoren im Genom identifiziert werden. Der Mechanismus der metabolischen Regulation ist in diesen Spezies somit bislang unklar. Möglicherweise wird die terminale Oxidase in *H. pylori* konstitutiv synthetisiert.

Neben der aeroben Atmung durch die terminalen Oxidase des Typs cbb₃ ist *H. pylori* in der Lage, eine Reihe alternativer Elektronenakzeptoren zu benutzen. So wurden im Genom von *H. pylori* sowohl eine Fumarat- als auch eine S/N-Oxid-Reduktase identifiziert (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006), welche es ermöglichen, Fumarat,

DMSO und TMAO als terminale Elektronenakzeptoren zu verwenden (Doig *et al.*, 1999). Für die Fumaratreduktase, welche konstitutiv synthetisiert wird, konnte bereits gezeigt werden, dass diese bei einer mikroaerophilen *in-vitro*-Kultivierung nicht essenziell ist (Ge *et al.*, 1997). In einem *in-vivo*-Modell der Maus wurde beobachtet, dass die Fumaratreduktase von *H. pylori* für eine Kolonisierung des Magens notwendig ist (Ge *et al.*, 2000). Die Rolle alternativer Elektronenakzeptoren im Stoffwechsel von *H. pylori* ist bislang unklar.

Als weiteres Substrat für die Energiegewinnung konnte außerdem molekularer Wasserstoff identifiziert werden (Olson und Maier, 2002). Der molekulare Wasserstoff wird durch die membranständige Hydrogenase oxidiert. Da eine damit einhergehende Reduktion des Cytochroms beobachtet werden konnte, scheint die Oxidation des Wasserstoffs unter anderem mit der Energie-gewinnenden Atmungskette verbunden zu sein (Abbildung 3). Die Reaktion kann aber auch mit anderen Redoxkomponenten gekoppelt werden (Benoit und Maier, 2008).

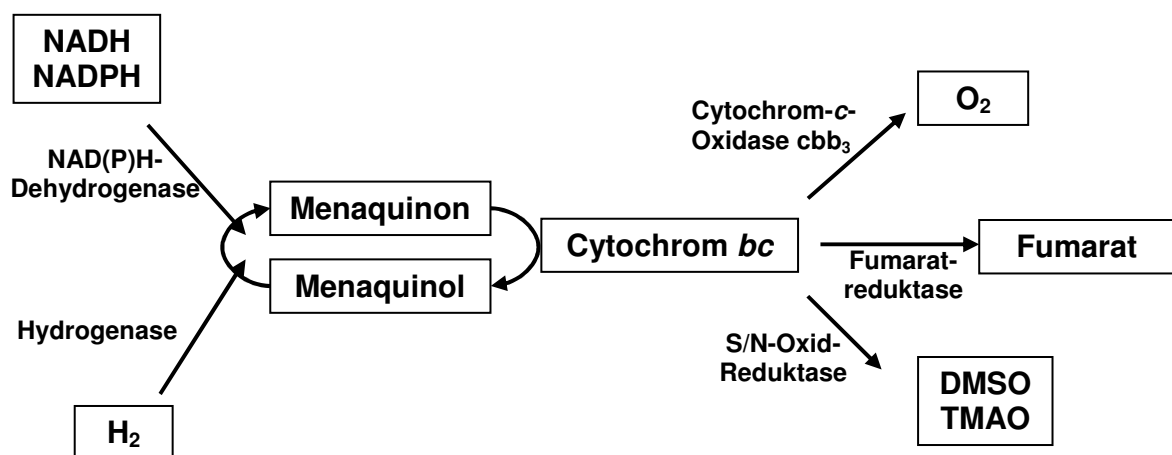


Abbildung 3: Schematische Abbildung der Hauptkomponenten der Elektronentransportkette in *H. pylori*

4.1.4 Genetische Eigenschaften und regulatorische Elemente von *H. pylori*

Das Genom von *H. pylori* ist ~1,7 Mbp groß und hat einen G+C Gehalt von ~39% (Tomb *et al.*, 1997). Ein besonderes Merkmal von *H. pylori* ist die große Diversität und Variabilität (Suerbaum *et al.*, 1998). Daraus resultiert auch, dass praktisch jede infizierte Person einen genetisch einzigartigen Stamm trägt. Die große Diversität ist wahrscheinlich die Folge der Adaptation von *H. pylori* an den jeweiligen Wirt und dessen spezifischen immunologischen Merkmalen (Kuipers *et al.*, 2000). Die genetische Variabilität beruht neben Mutationen auch

auf der Aufnahme von fremder DNA unter anderem durch die natürlichen Kompetenz von *H. pylori* (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990).

Eine weitere Besonderheit des *H. pylori* Genoms ist die Häufung von homopolymeren Sequenzen, die zu Leserasterverschiebungen führen können (Saunders *et al.*, 1998). Als Folge dieser Verschiebungen kann es zum An- oder Abschalten von Genen kommen (*slipped strand mispairing*) wie z.B. bei *flhP*, dessen Abschaltung zu einem flagellenlosen Phänotyp führt (Josenhans *et al.*, 2000). Eine weitere Folge der starken Anpassung von *H. pylori* an den Wirt ist die geringe Anzahl an regulatorischen Elementen oder Transkriptionsregulatoren (Marais *et al.*, 1999). Dies begründet sich womöglich in der obligaten Wirtsassoziation und der Anpassung an diesen. Beispielsweise besitzt *H. pylori* nur wenige Zwei-Komponentensysteme (Beier und Frank, 2000). Die zwei am besten untersuchten Systeme sind das FlgRS und ArsRS-System (siehe auch Abschnitt 4.1.5). Das erstere ist vor allem an der Regulation der Flagellensynthese, das letztere an der Säureakklimatisierung beteiligt (Spohn und Scarlato, 1999; Niehus *et al.*, 2004; Pflock *et al.*, 2006). Außerdem besitzt *H. pylori* nur wenige typische Transkriptionsregulatoren. Bisher wurden lediglich drei Sigmafaktoren identifiziert (σ^{28} , σ^{54} , σ^{80}). Darüber hinaus wurde in unserer Arbeitsgruppe in *H. pylori* DNA-Topologie als globaler, übergreifender Faktor zur Koordination der Genregulation beschrieben (Ye *et al.*, 2007). Weitere Regulationselemente werden außerdem im Abschnitt 4.1.5 (Regulation der Säureakklimatisierung) beschrieben.

4.1.5 *Helicobacter pylori* und Säure

4.1.5.1 *Helicobacter pylori* als neutralophiles Bakterium

H. pylori besiedelt die menschliche Magenschleimhaut. Trotz der sauren Bedingungen des menschlichen Magens ist *H. pylori* als neutralophiles Bakterium anzusehen. *In vivo* verlieren 100% der Bakterien bereits bei einem pH-Wert von 2 – 3 ihre Motilität in weniger als einer Minute und selbst bei einem nur leicht sauren pH-Wert von 6,0 verlieren immer noch 50% der Bakterien ihre Beweglichkeit innerhalb von 15 Minuten (Schreiber *et al.*, 2005). Zwar ließen sich in dieser Studie bis zu einem pH-Wert von 4,0 noch alle Bakterien rekultivieren, jedoch starben bereits bei einem pH-Wert von 3,0 und einer Expositionszeit von 30 Minuten alle Bakterien ab (Schreiber *et al.*, 2005). Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang auch die Magenenzyme (Pepsin A, Pepsin C, Chymosin, Cathepsin E). Insbesondere für Pepsin konnte mittels spezieller Inhibitoren gezeigt werden, dass es signifikant am Motilitätsverlust von *H. pylori in vivo* beteiligt ist. Die Kolonisierung der Magenschleimhaut findet daher bevorzugt in den tiefen Schichten des Mukus statt. Annähernd 90% der gesamten *Helicobacter pylori*-Population eines Wirtes befinden sich in den tiefsten 15 μm der mukosalen Schicht, in der der pH-Wert nahezu neutral ist (pH \sim 5,5

bis 6,5). Da der Mukus kontinuierlich sezerniert wird (Schreiber und Scheid, 1997), sind die Bakterien gezwungen, sich stetig entgegen des Mukusflusses zu orientieren, da der niedrige pH-Wert des Lumens das Wachstum inhibiert, die Motilität reduziert und letztlich zum Absterben der Bakterien führt (Schreiber *et al.*, 1999; Worku *et al.*, 1999). In der mukosalen Schicht liegen mindest drei chemische Gradienten vor: ein Protonen- bzw. pH-Gradient (Talley *et al.*, 1992), ein Bicarbonat/CO₂-Gradient (Rees *et al.*, 1982) und im Falle einer Infektion durch *Helicobacter* ein Harnstoff/Ammoniumgradient (Kim *et al.*, 1990). Schreiber *et al.* konnten *in vivo* zeigen, dass der pH-Gradient in Verbindung mit der Bicarbonatkonzentration für die Orientierung der Bakterien in den tiefen Schichten des Mukus essenziell ist. Wurde der pH-Gradient entfernt sowie der luminale pH-Wert und die luminale Bicarbonatkonzentration reduziert, akkumulierten die Bakterien nicht mehr in den tiefen Schichten des Mukus. Die Wahrnehmung eines pH-Gradienten und die Reaktion darauf kann generell in Bakterien der Energietaxis zugeordnet werden, da der pH-Wert und die Redoxverhältnisse der Umgebung einen starken Einfluss auf die *proton motive force* (PMF) und damit die Generierung von zellulärer Energie haben (Taylor *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus der pH-Wahrnehmung ist jedoch für *H. pylori* bislang ungeklärt. Die bisherigen Kenntnisse über die chemotaktischen Fähigkeiten von *H. pylori* werden ausführlich in Abschnitt 4.2.9 dargestellt.

4.1.5.2 Mechanismen der Säureakklimatisierung von *H. pylori*

Auch wenn *H. pylori* in der Lage ist, die beschriebene Nische der mukosalen Schicht zu kolonisieren, ist es vor allem bei der initialen Infektion für die Bakterien essenziell, die Säurebarriere des Lumens mit einem pH-Wert von ca. 1,4 (Teyssen *et al.*, 1995) zu überwinden und gleichzeitig Anpassungsmechanismen an Schwankungen des UmgebungspH-Werts zur Verfügung zu stellen. Es wurde gezeigt, dass die von *H. pylori* synthetisierte Urease eine essenzielle Rolle in der Akklimatisierung an Säure und der Kolonisierung von Mäusen spielt (Karita *et al.*, 1995; Tsuda *et al.*, 1994). Für die Säureakklimatisierung ist es wichtig, den periplasmatischen Raum in einem annähernd neutralen pH-Bereich abzupuffern, da dies für den Erhalt des Membranpotentials und damit unter anderem dem Protonen-getriebenen Transport von Metaboliten essenziell ist (Padan *et al.*, 1981). Das Urease-Gencluster besteht aus sieben Genen: *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG* und *ureH* (Akada *et al.*, 2000; Labigne *et al.*, 1991). Das Gen *ureI* kodiert für einen protonenaktivierten Harnstoffkanal. Unter sauren Bedingungen wird durch UreI verstärkt Harnstoff ins Cytoplasma aufgenommen und dort von der Urease, bestehend aus den Untereinheiten UreA und UreB, in H₂CO₃ und NH₃ gespalten. Die cytoplasmatische β -Carboanhydrase verwandelt das gebildete H₂CO₃ in CO₂ und H₂O. Das gebildete Ammonium und das

Kohlenstoffdioxid diffundieren ins Periplasma. Die periplasmatische α -Carboanhydrase wandelt das CO_2 zu Bicarbonat (HCO_3^-) und einem Proton (H^+) um. Das Proton wird, vom ins Periplasma diffundierten Ammonium, neutralisiert; das Bicarbonat dient der Pufferung des periplasmatischen Raumes (Abbildung 4) (Sachs *et al.*, 2008). Zusätzlich wird durch die sauren Bedingungen (ab pH $\sim 6,1$) *ureE* und *ureG*, sowie *amiE*, *amiF* und *aspA*, die Arginase (RocF), die α -Carboanhydrase (Cah) und *ureI* durch das ArsRS-Zweikomponentensystem hochreguliert und der Effekt der Säureakklimatisierung verstärkt (siehe Abschnitt 4.1.5.3). Die Proteine UreE und UreG aktivieren UreAB zur aktiven Urease. Die Enzyme AmiE, AmiF und AspA produzieren Ammonium und die Arginase RocF produziert Harnstoff aus Arginin.

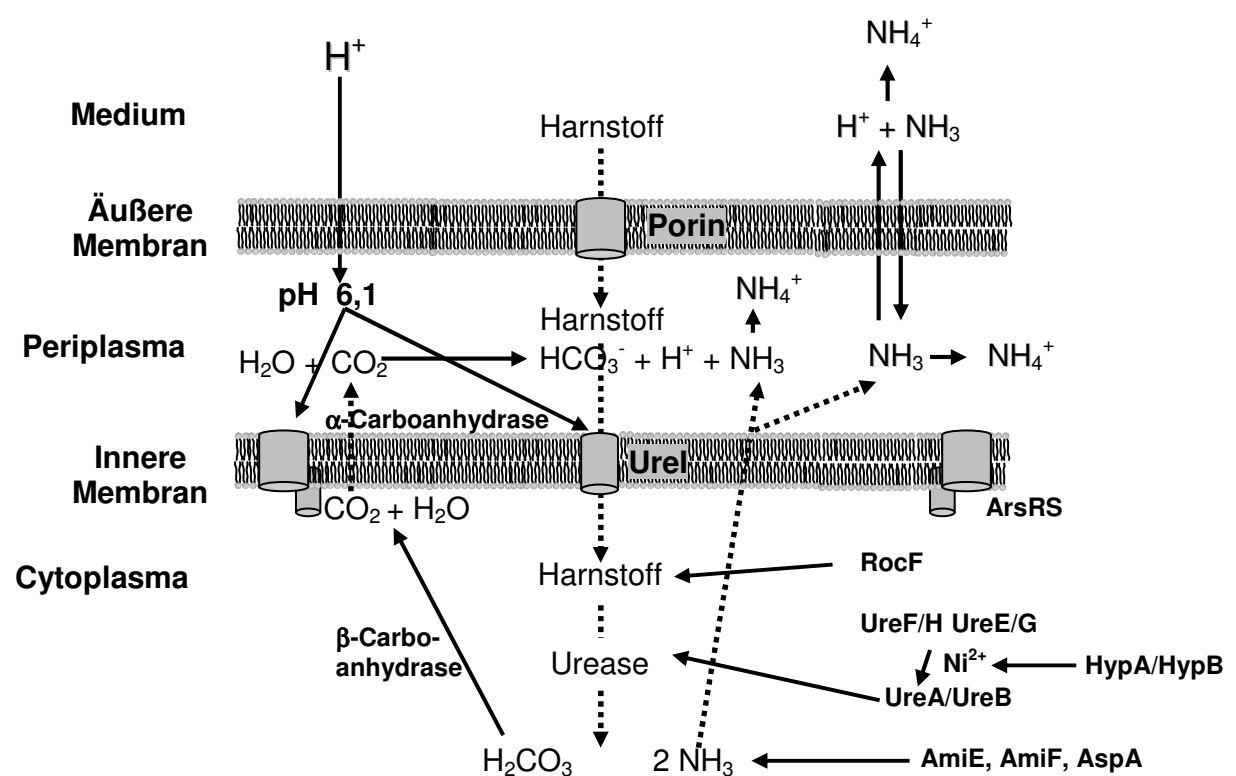


Abbildung 4: Urease-abhängiger Mechanismus der Säureakklimatisierung in *H. pylori*.
Modifiziert nach Sachs *et al.*, 2008.

Neben der Urease-abhängigen Anpassung an die Säure des menschlichen Magens wurden eine Reihe weiterer Anpassungsmechanismen beschrieben, welche zum Überleben der Bakterien in ihrer Nische beitragen. So wurde bereits die Bedeutung für die Anpassung an saure Bedingungen von WdcJ, welches am Zusammenbau der Lipopolysaccharide beteiligt ist (McGowan *et al.*, 1998), von PldA, welches in der Lipidzusammensetzung der äußeren Membran involviert ist (Tannaes *et al.*, 2001), von RecA, welches in der DNA-Reparatur beteiligt ist (Thompson und Blaser, 1995), von RocF, welches an der Harnstoffsynthese aus Arginin und Ornithin beteiligt ist (McGee *et al.*, 1999), sowie von AtpD und AtpF, welche Bestandteile der F_1F_0 -ATPase sind (Bijlsma *et al.*, 2002), gezeigt.

4.1.5.3 Regulation der Säureakklimatisierung durch *H. pylori*

Die Regulation der Gene für Säureakklimatisierung erfolgt nach derzeitigen Kenntnissen im wesentlichen über das ArsRS-Regulon (Pflock *et al.*, 2004). Die Wahrnehmung des pH-Wertes findet mit Hilfe von Histidinseitengruppen in der periplasmatischen Domäne der Histidinkinase ArsS statt (Wen *et al.*, 2008). Zehn der zwölf Gene, welche an der Urease-abhängigen Säureakklimatisierung beteiligt sind, werden durch das ArsRS-Regulon kontrolliert: Die Ureaseuntereinheiten UreA und UreB, der Harnstoffkanal UreI, die akzessorischen Proteine UreE und UreF, die Carboanhydrase Cah, die Arginase RocF, die Ammonium produzierenden Enzyme AmiE und AmiF und das in der Aktivierung der Urease involvierte HypA. Lediglich die Gene *hypB* (involviert in Aktivierung der Urease) und *aspA* (Ammonium produzierendes Enzym) werden nicht durch das ArsRS-Regulon kontrolliert (Sachs *et al.*, 2008) (Abbildung 4). Insgesamt konnten bisher 109 Gene identifiziert werden, welche unter Kontrolle des ArsRS-Regulons stehen (Pflock *et al.*, 2006; Dietz *et al.*, 2002; Forsyth *et al.*, 2002). Dabei wurden neben den Genen der Urease-abhängigen Säureakklimatisierung, Gene aus allen Bereichen der Zelle (Biosynthese, Zellhülle, DNA-Metabolismus, Energiemetabolismus, Chemotaxis) unter sowohl positiver als auch negativer Kontrolle des ArsRS-Zweikomponentensystems gefunden. Inwieweit und in welcher Form jedes einzelne dieser Gene an Prozessen der Säureakklimatisierung beteiligt ist, ist noch unklar.

Neben der ArsRS-abhängigen Antwort auf Säureexposition existieren noch weitere pH-abhängige Regulationsmechanismen in *H. pylori*. So werden unter sauren Bedingungen insgesamt ca. 200 Gene hoch- und 100 Gene herunterreguliert (Sachs *et al.*, 2008). Beispielsweise wurde erst kürzlich die Histidinkinase FlgS des Zweikomponentensystem FlgRS als essenziell für das Überleben bei niedrigen pH-Werten (< 2,5) beschrieben (Wen *et al.*, 2008). Das FlgRS-Zweikomponentensystem ist Teil des regulatorischen Netzwerkes der Flagellenbiosynthese (Niehus *et al.*, 2004). Bei einem pH-Wert von 2,5 wurde für FlgS ein regulatorischer Effekt auf über 100 Gene gezeigt, darunter auch Gene des Urease-Gencluster (*ureA*, *ureB*, *ureF*, *ureI*, *amiE* und *rocF*). Neben den Genen der Urease-abhängigen Säureakklimatisierung wurden außerdem noch Gene des Energiestoffwechsels (z.B. ATP Synthase F_1F_0 , Aconitase B), der Antwort auf Sauerstoffstress (z.B. Katalase assoziiertes Protein *kapA*) und auch aus allen sonstigen Bereichen zellulärer Prozesse als reguliert gefunden. Insgesamt sind ca. 82% der durch FlgS regulierten Gene nicht im ArsRS-Regulon enthalten. Der an der Flagellenbiosynthese beteiligte *response regulator* FlgR scheint jedoch an dieser Regulation nicht beteiligt zu sein (Wen *et al.*, 2008).

Neben den beschriebenen Zweikomponentensystemen sind auch andere regulatorische Elemente an der Anpassung an die sauren Bedingungen beteiligt. So wurde für den Eisenaufnahmeregulator Fur gezeigt, dass er ebenfalls an der Urease-abhängigen

Säureanpassung beteiligt ist. Bereits früher konnte für andere Spezies, wie *Salmonella enterica ssp. enterica* Serovar Typhimurium gezeigt werden, dass Fur eine wichtige Rolle in der Anpassung an Säureresistenz spielt (Foster, 1991). Zwar widerstehen *fur*-Mutanten in *H. pylori* einem Säureschock (Bijlsma *et al.*, 2002), jedoch ist ihr Wachstum in Abwesenheit von Harnstoff stark eingeschränkt. Fur reguliert pH-abhängig die Synthese der ammoniumproduzierenden Enzyme AmiE und AmiF (van Vliet *et al.*, 2003) und trägt so zum beschriebenen Prozess der Urease-abhängigen Säureakklimatisierung bei, in der Ammonium eine zentrale Rolle spielt (Abbildung 4).

Ein weiteres regulatorisches Element ist der NikR-Regulator, welcher unter sauren Bedingungen verstärkt synthetisiert wird. NikR hat sowohl einen induzierenden Effekt auf die Urease selbst als auch einen repressiven Effekt auf den AmiE- und AmiF-Repressor Fur (Sachs *et al.*, 2008) (Abbildung 4). Mechanismen der Säureanpassung im Kontext der bakteriellen Taxis wurden zwar in dieser Arbeit nicht bearbeitet, wir gehen aber davon aus, dass Taxis gegenüber pH-Änderungen und entsprechende Anpassungsmechanismen in der Umgebung von *H. pylori* Hand in Hand gehen.

4.2 Chemotaxis

In einer veränderlichen Umgebung ist es für Bakterien essenziell, verschiedene Stimuli wahrzunehmen und darauf zu reagieren, um sowohl ihren Metabolismus zu optimieren, als auch um eine Exposition gegenüber toxischen Substanzen zu vermeiden. Die gerichtete Bewegung auf einen chemischen Stimulus zu oder von ihm weg nennt man Chemotaxis. Erste Untersuchungen dazu gab es bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts (Engelmann, 1881; Engelmann, 1882; Pfeffer, 1884). So konnte beispielsweise T. W. Engelmann 1881 zeigen, dass sich *Bacterium termo* Cohn an einer Sauerstoffquelle akkumuliert. Engelmann beobachtete, dass sich Bakterien auf einem Objektträger um die Zellen einer sauerstoffproduzierende Alge anhäufen, solange das Objekt ausreichend beleuchtet ist. Wurde die Beleuchtung des Objekts verringert und die Sauerstoffproduktion der Algen damit vermindert, löste sich die Akkumulation von Bakterien auf. Pfeffer beobachtete 1884 die Orientierung von Bakterien in Richtung von mit Fleischextrakt gefüllten Glaskapillaren. Er füllte dazu Glaskapillaren mit 1% Fleischextraktlösung und tauchte diese in eine Bakteriensuspension mit *Bacterium termo* oder *Spirillum undula*. Beide Spezies drangen in signifikanter Anzahl in die Kapillaren ein und akkumulierten um die Öffnung.

Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhundert folgten weitere Untersuchungen zur gerichteten Bewegung von Bakterien (Adler, 1965). Inzwischen wurde die Fähigkeit von Bakterien, sich entlang eines Stoffgradienten zu orientieren, für eine Vielzahl von eubakteriellen Spezies sowie für einige Archaeen beschrieben und der grundlegende

Mechanismus der Signaltransduktion eines äußeren Stimulus hin zum Bewegungsapparat weitgehend aufgeklärt.

4.2.1 Vom Reiz zur Reaktion – Der Mechanismus der Signalübertragung

Der Stimulus wird von einem Chemorezeptor durch spezifische Ligandenbindung wahrgenommen. Die Rezeptoren sind als Homodimere organisiert und mittels eines Proteins (CheW) mit einer Histidinkinase (CheA) verbunden. Die genaue Stöchiometrie von Rezeptoren, CheW und CheA hängt dabei von der räumlichen Organisation der Sensoren ab (siehe Abschnitt 4.2.3) und kann daher zwischen verschiedenen bakteriellen Spezies variieren. Chemotaxis wurde bisher am ausführlichsten in *Enterobacteriaceae*, in der Hauptsache in *E. coli* untersucht. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass in einer Zelle auf ein CheA-Dimer 3,4 Rezeptordimere, 1,6 CheW Moleküle und 2,4 CheY Moleküle kommen (Li und Hazelbauer, 2004). In einer kristallographischen Studie werden die stöchiometrischen Verhältnisse für den Aspartat-Sensor Tar aus *E. coli* mit 6 Rezeptordimeren und 1,5 Molekülen CheW pro CheA-Dimer angegeben (Francis *et al.*, 2004).

Die Ligandenbindung des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des Moleküls und resultiert letztlich in der Autophosphorylierung der Histidinkinase CheA. Die Phosphatgruppe wird nun auf eine Aspartatgruppe des Moleküls CheY übertragen. Die phosphorylierte Form von CheY besitzt eine niedrigere Affinität zu CheA als die unphosphorylierte Form und wird daher von dem supramolekularen Rezeptorkomplex freigesetzt. Gleichzeitig erhöht sich die Affinität zu FliM (Welch *et al.*, 1993). CheY-P diffundiert durch das Cytosol und interagiert durch FliM mit dem Flagellenapparat. Die Interaktion von CheY-P mit FliM resultiert in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Flagellenrotation im Uhrzeigersinn (Bren und Eisenbach, 2000; Alexandre und Zhulin, 2001; Wadhams und Armitage, 2004). Eine Flagellenrotation im Uhrzeigersinn resultiert in *E. coli* in einer taumelnden Bewegung (*tumble*). Die *tumble*-Bewegung ermöglicht es den Bakterien, ihre Bewegungsrichtung zu ändern. Die Ausrichtung der Richtungsänderung erfolgt dabei primär zufällig. Flagellierte Bakterien bewegen sich in der Regel mit einer bestimmten Frequenz an *tumbles*. Die zwischen den *tumbles* liegenden Bewegungselemente, in denen das Bakterium einen glatten Lauf ohne plötzliche Richtungsänderung vollzieht, werden als *run* bezeichnet. Das daraus resultierende Bewegungsmuster wird als *random walk* bezeichnet, da es keine primär gerichtete Bewegung gibt. Allerdings ist die Anzahl der *runs* und *tumbles* (Richtungsänderungen) nicht zufällig, sondern kann gesteuert werden. Wird von den Bakterien nämlich ein vorteilhafter Stimulus, also ein Lockstoff wahrgenommen, verringert sich die Anzahl der *tumbles* und die Dauer der *runs* wird länger. Dem Bakterium ist

es daher möglich, sich der Quelle eines Lockstoffes anzunähern (Berg und Brown, 1972). Für den Fall, dass ein unvorteilhafter Stimulus wahrgenommen wird, verhält es sich umgekehrt. Die Anzahl der *tumbles* werden größer und die Dauer der *runs* somit kürzer. Dem Bakterium ist es durch die erhöhte Zahl an Richtungsänderungen möglich, sich von der Schreckstoffquelle wegzubewegen (Macnab und Koshland, Jr., 1972). In folgenden Teilen dieser Arbeit wird eine Reaktion auf einen Lockstoff als positive Antwort/Reaktion, eine Reaktion auf einen Schreckstoff als negative Antwort/Reaktion bezeichnet.

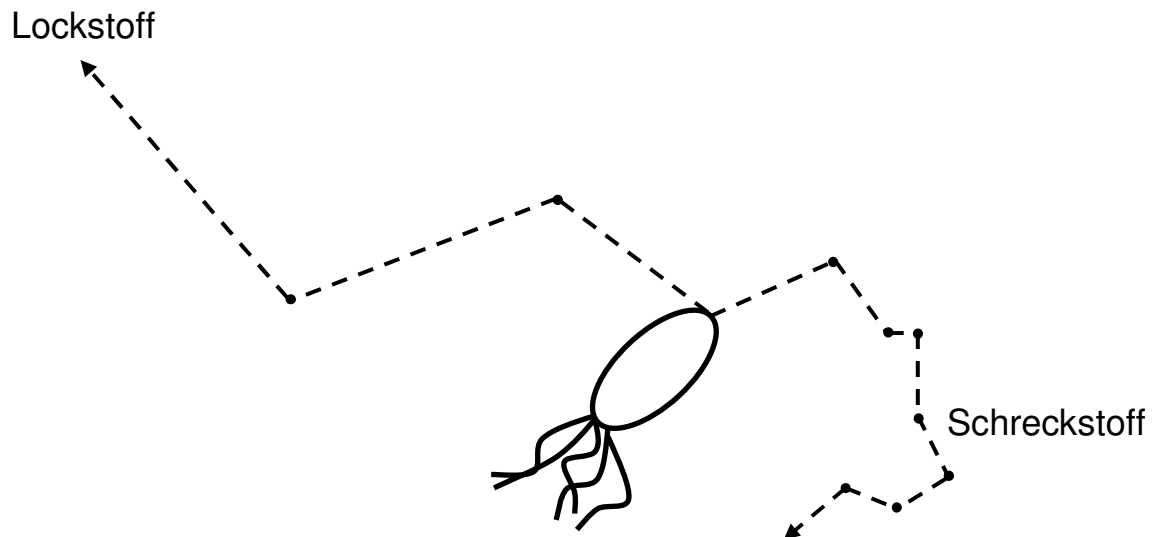


Abbildung 5: Schematisches Modell der gerichteten Bewegung eines flagellierten Bakteriums unter dem Einfluss verschiedener Reize. Modifiziert nach Lengeler und Postma, 1999

Im Falle von *H. pylori* wurde beobachtet, dass *H. pylori* keine *tumbles* zeigt, wie sie für beispielsweise *E. coli* beschrieben wurden, sondern lediglich stoppt und die Bewegungsrichtung ändert (*stops*).

4.2.2 Struktur der bakteriellen Chemorezeptoren

Chemorezeptoren liegen in der Regel membrangebunden, als Bündel zweier α -Helices vor (Abbildung 6). Identifizieren lässt sich die Klasse der Chemorezeptoren anhand ihrer stark konservierten C-terminalen cytoplasmatischen Domäne. Die cytoplasmatische oder auch MCP-Domäne (*methyl-accepting chemotaxis protein*) ist der Bereich des Proteins, welcher mit der Histidinkinase CheA interagiert. Diese Domäne lässt sich nochmals in zwei Bereiche gliedern. Der proximal zur Membran gelegene Bereich ist die namensgebende Methylierungsuntereinheit; der distal zur Membran gelegene Bereich ist die eigentliche Signalübertragungsuntereinheit. Die Methylierung ist dabei in Adaptationsprozessen beteiligt; jedoch konnten bislang nicht in allen bekannten Rezeptoren Methylierungsmotive gefunden werden (siehe Abschnitt 4.2.7). In der Membran verankert ist das Rezeptormolekül in der

Regel durch zwei Transmembrandomänen, wobei der N- und C-Terminus der Polypeptidkette in Richtung des Cytosols orientiert sind (Milburn *et al.*, 1991; Pakula und Simon, 1992). Zwischen den beiden Transmembrandomänen liegt die aus vier α -Helices bestehende Sensordomäne im periplasmatischen Raum. Da Chemorezeptoren im Allgemeinen Homodimere bilden (Milligan und Koshland, Jr., 1988), besteht die gesamte Sensordomäne somit aus acht α -Helices. Der Transmembranbereich sowie die cytoplasmatische Domäne bestehen aus jeweils vier Helices (Kim *et al.*, 1999)

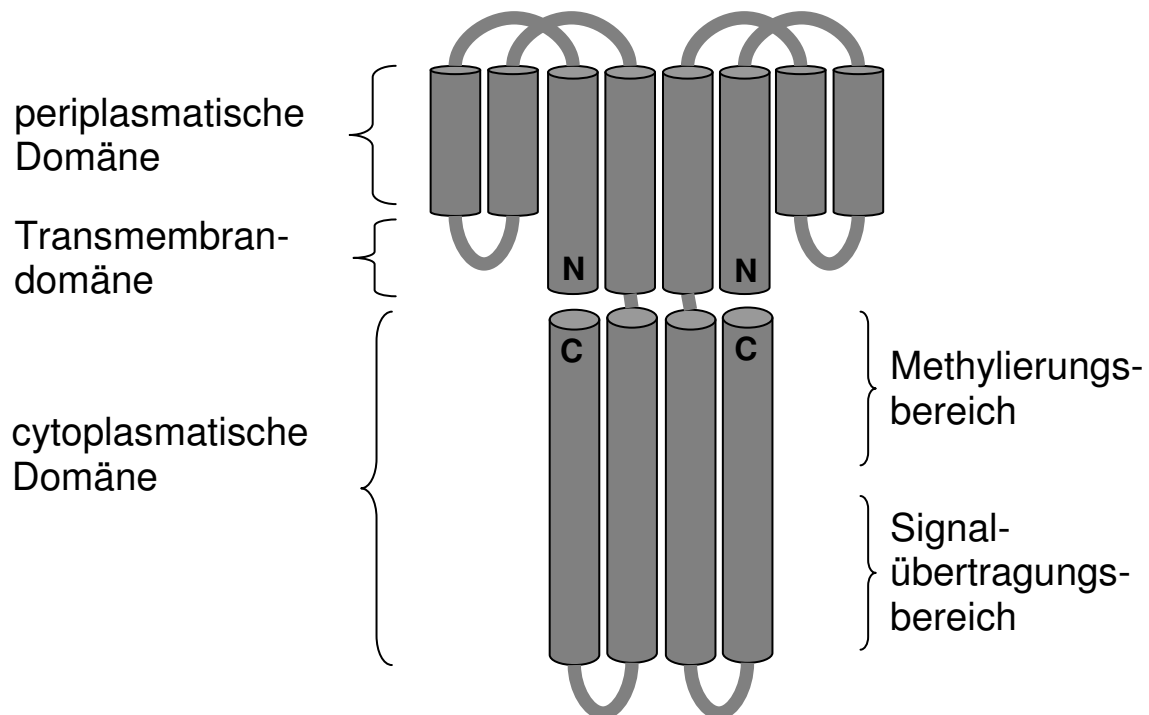


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Chemosensor-Homodimers. Die dargestellte Struktur und insbesondere ihrer Untereinheiten, wie der Methylierungsbereich stützt sich dabei überwiegend auf Kenntnisse zu Strukturen aus *E. coli*. **C**: C-Terminus; **N**: N-Terminus

Die Gruppe der Chemorezeptoren lässt sich in drei Klassen einteilen (Le Moual und Koshland, Jr., 1996). Ausschlaggebend dafür ist die Präsenz zweier Paare eines Aminosäuremotivs im C-Terminus. Das Aminosäuremotiv besteht aus zwei sich wiederholenden Folgen von sieben Aminosäuren (a-b-c-d-e-f-g) wobei die erste (a) und die vierte (d) Aminosäure in der Regel hydrophob ist. Die Chemorezeptorklassen werden nach Anzahl und Lage der Motive definiert. Rezeptoren der Klasse I besitzen das erwähnte Motiv nicht. Rezeptoren der Klasse II besitzen zwei der Aminosäurefolgen im Signalübertragungsbereich der cytoplasmatischen Domäne. Dabei ist in jeder der beiden α -Helices des Doppelbündels eine Folge lokalisiert. In Klasse III der Rezeptoren finden sich in den cytoplasmatischen Domänen vier der Motive, davon je zwei im Signalübertragungs- und Methylierungsbereich. Dabei ist wiederum jeweils ein Motiv in jeder der beiden Helices lokalisiert (Le Moual und Koshland, Jr., 1996; Szurmant und Ordal, 2004). Klasse III scheint

die ursprünglichste zu sein. Die Rezeptoren der Klasse III finden sich überwiegend bei Gram-positiven Bakterien und Archaeen. Evolutionär folgte die Klasse II und schließlich entwickelte sich wahrscheinlich mehrmals, während der Bildung der verschiedenen Klassen der Proteobakterien, die Rezeptorklasse I (Szurmant und Ordal, 2004). Die funktionelle Bedeutung der Aminosäurefolge ist noch nicht im Detail geklärt. Es wurden aber bereits Unterschiede in der Art der Methylierung und damit der Adaptation beschrieben (siehe Abschnitt 4.2.7). So setzen Rezeptoren der Klasse III aller Spezies sowohl bei negativen als auch bei positiven Stimuli Methanol frei (Kirby *et al.*, 1997). Für Rezeptoren der Klasse I trifft dies nicht zu (Kehry *et al.*, 1985). Bis auf eine Ausnahme existiert in allen Spezies nur jeweils eine Klasse von Rezeptoren. Lediglich *Clostridium acetobutylicum* besitzt neben 38 Rezeptoren der Klasse III noch einen Rezeptor der Klasse I. Dies ist vermutlich auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen (Szurmant und Ordal, 2004). Die Sensoren von *Helicobacter pylori* gehören alle der Klasse II an. Die Zahl der Chemorezeptoren schwankt stark von Spezies zu Spezies. Sie reicht von einem Chemorezeptor in beispielsweise *Mesorhizobium loti* (Szurmant und Ordal, 2004) oder *Listeria innocua* über 45 in *Vibrio cholerae* bis hin zu über 60 in *Magnetospirillum magnetotacticum* (Wadhams und Armitage, 2004).

4.2.3 Supramolekulare Organisation des bakteriellen Chemotaxisapparates

Die supramolekulare Anordnung der Rezeptordimere variiert von Spezies zu Spezies. Das am weitesten verbreitete Modell der supramolekularen Organisation ist das der Dimer-Trimere (Parkinson *et al.*, 2005; Kentner und Sourjik, 2006). Für den Rezeptor Tsr aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Rezeptordimere sich mittels der cytoplasmatischen Domäne in Trimeren anordnen. Der Kontakt zwischen den Dimeren wird durch die Spitze der Signalübertragungsdomäne hergestellt. Die Existenz der Dimer-Trimere wurde sowohl kristallographisch (Kim *et al.*, 1999) als auch mittels *in vivo crosslinking* (Studdert und Parkinson, 2004) gezeigt. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass CheW und CheA bei der Clusterbildung der Rezeptoren involviert sind, da die Clusterbildung in ihrer Abwesenheit stark abnimmt (Maddock und Shapiro, 1993; Sourjik und Berg, 2000). Die beschriebenen Dimer-Trimere können dabei aus Dimeren unterschiedlicher Rezeptoren bestehen. In *E. coli* besteht beispielsweise eine Interaktion zwischen Tsr- und Tar-Dimeren (Ames *et al.*, 2002; Studdert und Parkinson, 2005). Des Weiteren wird darüber spekuliert, ob zwei der Dimer-Trimere möglicherweise in ihrem periplasmatischen Bereich in direktem Kontakt stehen und so eine weitere Organisationsstruktur bilden (Kim *et al.*, 2002). Möglicherweise kommt es durch die Interaktionen unterschiedlicher Dimer-Trimere zu der Bildung von sogenannten

signalling teams (Parkinson *et al.*, 2005). Die Bildung der *signalling teams* schafft darüber hinaus eine zusätzliche Ebene der Adaptation. In mehreren Studien wurde bereits beobachtet, dass sich die Dichte der Rezeptoren in der Membran und die Größe der *signalling teams* durch die Rezeptormodifikation und damit durch die Ligandenbindung ändern kann (Endres *et al.*, 2008; Besschetnova *et al.*, 2008).

In *Thermotoga maritima* konnten bislang keine Trimer-Strukturen beobachtet werden. Die Rezeptordimere bilden hier Dimer-Reihen (Park *et al.*, 2006). In der Studie wird darüber hinaus postuliert, dass mehrere Dimer-Reihen durch ihre cytoplasmatische Domänen zu einem zweidimensionalen Gitter verknüpft werden.

Die supramolekulare Struktur des Chemotaxisapparates wurde in *H. pylori* noch nicht näher untersucht. Daher gibt es noch keine Erkenntnisse über die höheren Organisationsstrukturen der Rezeptoren in *H. pylori*.

4.2.4 Lokalisierung von bakteriellen Chemosensoren

Die Lokalisierung der Chemorezeptoren innerhalb der Bakterienzelle kann von Spezies zu Spezies variieren. Sie scheint jedoch zumindest zum Teil von der Struktur und der Expressionsintensität der Rezeptoren abhängig zu sein. In *E. coli* lassen sich die Rezeptoren bezüglich ihrer Expressionshöhe in zwei Klasse einteilen. So gibt es in *E. coli* die stark repräsentierten „major“ Sensoren Tsr und Tar, welche ca. 90% der vorhandenen Rezeptormoküle ausmachen und die schwach repräsentierten „minor“ Sensoren Trg und Tap (Li und Hazelbauer, 2004). Der Engergiesensor Aer (siehe Abschnitt 4.2.6) wurde in jener Studie nicht weiter untersucht. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass alle Sensoren polar und damit membranständig angeordnet sind (Maddock und Shapiro, 1993). Dabei ist auffällig, dass die beiden stark vorhandenen Rezeptoren Tsr und Tar in Clustern am Zellpol vorliegen, wohingegen die schwach repräsentierten anderen Rezeptoren zwar polar, jedoch ungeclustert vorliegen (Lybarger *et al.*, 2005). Diese vier polar lokalisierten Sensoren besitzen alle Transmembrandomänen. Der Rezeptor Aer stellt diesbezüglich eine Ausnahme da. Dieser Rezeptor besitzt keine klassischen Transmembrandomänen, welche die Wahrnehmung eines periplasmatischen Stimulus ermöglichen würden. Jedoch wurde ein hydrophobes Segment von ca. 40 Aminosäuren identifiziert, welches möglicherweise als Membrananker fungiert und so ebenfalls eine membranständige polare Lokalisierung ermöglichen könnte (Amin *et al.*, 2006; Bibikov *et al.*, 2000).

In *Rhodobacter sphaeroides* wurden bisher zwei verschiedene Rezeptorlokalisierungen identifiziert. Rezeptoren mit Transmembrandomänen sind in *R. sphaeroides* polar und membranständig lokalisiert (Harrison *et al.*, 1999; Wadhams *et al.*, 2000). Der Sensor TlpC dagegen, in welchem keine Transmembrandomänen identifiziert

werden konnten, lokalisiert in diskreten Clustern innerhalb des Cytosols (Wadhams *et al.*, 2002). Auffällig ist dabei, dass andere Komponenten des Chemotaxisapparates (CheA, CheY, CheW) ebenfalls in verschiedenen Clustern, also entweder polar oder zytosolisch, organisiert sind (Wadhams *et al.*, 2003).

In *Pseudomonas aeruginosa* schließlich konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass der Sensor McpS, welcher keine Transmembrandomänen besitzt, trotzdem polar angeordnet ist. Der genaue Mechanismus der Lokalisierung ist in diesem Fall noch ungeklärt, es wird jedoch eine Interaktion mit anderen Chemorezeptoren als Möglichkeit der Verankerung in der Membran diskutiert (Bardy und Maddock, 2005).

Für *H. pylori* gab es bisher noch keine Untersuchungen bezüglich der Lokalisierung der Chemorezeptoren oder anderer Komponenten des Chemotaxisapparates. Auch ist noch nichts über die Expression einzelner Komponenten bekannt.

4.2.5 Substratspezifitäten von bakteriellen Sensoren

Im Laufe der Jahre konnten bereits eine Reihe von Chemorezeptoren näher charakterisiert werden und ihre spezifischen Substrate identifiziert werden. Am besten untersucht wurde der Prozess der Chemotaxis bisher unter anderem in *E. coli* und *Salmonella enterica ssp. enterica* Serovar Typhimurium. In beiden Organismen konnten bisher fünf bzw. vier Rezeptoren inklusive ihrer Substrate genauer charakterisiert werden: Aer, Tsr, Trg, Tar, Tap in *E. coli* und Aer, Tsr, Trg, Tcp in *Salmonella*. Auffallend dabei war, dass Sensoren häufig mehr als nur ein spezifisches Substrat haben. So wurden für die in beiden Spezies vorhandenen Sensoren Trg und Tar Serin und Galaktose beziehungsweise Aspartat und Maltose als Liganden identifiziert. Zusätzlich kann ein Sensor sowohl negative als auch positive Chemotaxis vermitteln. Zum Beispiel vermittelt der Sensor Tcp aus *Salmonella* negative Taxis gegenüber Phenol und eine positive Antwort auf Citrat.

4.2.6 Energietaxis in Bakterien

Im Gegensatz zur Chemotaxis, welche eine Verhaltensreaktion zu Substrat ist, welches nicht metabolisiert werden kann oder in sehr geringen Mengen vorliegt, gibt es in Bakterien auch ein metabolismusabhängiges Verhalten. Bakterien nehmen dabei das zelluläre Energieniveau wahr und können so in eine räumliche Nische navigieren, die eine optimale Energieausbeute ermöglicht (Alexandre *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 1999). Dies geschieht beispielsweise durch die Orientierung entlang von Gradienten aus alternativen Elektronenakzeptoren, metabolisierbarem Substraten, Redoxpotential oder Sauerstoff als

Äquivalent des aeroben Stoffwechsels. Energietaxis wurde schon in einer Reihe von Spezies beschrieben. Am besten charakterisiert ist sie bisher in *E. coli* (Bespalov *et al.*, 1996; Bibikov *et al.*, 1997; Rebbapragada *et al.*, 1997; Bibikov *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde Energietaxis selbst oder die Existenz zu Aer (siehe unten) homologer Proteine in *Pseudomonas putida* (Nichols und Harwood, 2000), *Campylobacter jejuni* (Hendrixson *et al.*, 2001), *Azospirillum brasilense* (Alexandre *et al.*, 2000), *Rhodobacter sphaeroides* (Gauden und Armitage, 1995), *Bacillus subtilis* (Hou *et al.*, 2000), *Desulfovibrio vulgaris* (Fu *et al.*, 1994) und einer Reihe anderer Spezies beschrieben. Auf Grund der weiten Verbreitung der Energietaxis bei allen bakteriellen Spezies und der enormen Wichtigkeit der Optimierung des Energiehaushaltes von Mikroorganismen wird Energietaxis mittlerweile als ein sehr grundlegendes, universelles Konzept verstanden.

Der Mechanismus der Energiewahrnehmung ist sehr unterschiedlich. Bisher wurden drei Arten der Wahrnehmung beschrieben. Von diesen ist die Energiewahrnehmung durch PAS-Domänen-Proteine am besten verstanden ist. Das erste in Mikroorganismen identifizierte Protein dieser Art war der Sensor Aer aus *E. coli* (Bibikov *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Aer-Mutanten nicht länger in der Lage waren, sich gezielt in der Nähe von Luft anzusammeln (ursprünglich als „Aerotaxis“ bezeichnet). Der Sensor Aer, welcher keine Transmembrandomäne trägt (siehe Abschnitt 4.2.4), besitzt im N-terminalen Bereich eine PAS-Domäne (Zhulin *et al.*, 1997; Bibikov *et al.*, 2000). PAS-Domänen wurden bereits in allen drei Domänen des Lebens (Bakterien, Archaeen, Eukaryonten) gefunden (Ponting und Aravind, 1997; Taylor und Zhulin, 1999) und können verschiedene Stimuli wie Licht (Borgstahl *et al.*, 1995), Sauerstoff (Gong *et al.*, 1998) und Redoxpotential (Rebbapragada *et al.*, 1997) wahrnehmen. Der Name PAS setzt sich aus den Namen der Proteine zusammen, in denen die Domäne zuerst entdeckt wurde (**P**eriodic clock protein in *Drosophila*, der Transkriptionsfaktor **ARNT** aus Säugetieren und der Transkriptionsfaktor **SIM** aus Insekten). Mittels spektrometrischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Sensor Aer durch die PAS-Domäne das Redoxäquivalent FAD bindet (Bibikov *et al.*, 2000). Repik *et al.* (2000) zeigte, dass sich Mutationen in der PAS-Domäne sowohl auf die Fähigkeit zur FAD-Bindung des Proteins als auch auf die Energietaxis der Bakterien auswirkt. Die damalige Schlussfolgerung war, dass durch den Redox-Zustand von FAD-PAS die Bakterien den Status der zellulären Energie wahrnehmen. Veränderungen des Redoxzustandes von FAD können dabei entweder durch zytosolische Elektronendonoren oder durch eine direkte Interaktion mit der Elektronentransportkette hervorgerufen werden. Letztere Hypothese korrespondiert mit der Beobachtung, dass Aer proximal zur Membran lokalisiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Aer-vermittelte Taxis stark von der Aktivität der NADH-Dehydrogenase I abhängig ist (Edwards *et al.*, 2006). Es wurden verschiedene *E. coli*-Mehrfachmutanten in den beiden Energiesensoren Aer und Tsr, den terminalen

Oxidasen, sowie in den beiden NADH-Dehydrogenasen näher untersucht. Dabei wurde zum einen das Verhalten beobachtet, zum anderen das Membranpotential, der Sauerstoffverbrauch sowie die PMF in den Bakterien gemessen. Die Messung ergab einen Zusammenhang zwischen Aer-vermitteltem Verhalten und der NADH-Dehydrogenase I. Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch bislang nicht geklärt. Möglicherweise wird der Sensor Aer direkt von der NADH-Dehydrogenase oder einem anderen Element der Atmungskette (z.B. Ubiquinon) reduziert. Dafür spräche, dass in der Untereinheit NuoE der NADH Dehydrogenase I eine partielle PAS-Domänen Sequenz identifiziert werden konnte, welche eine direkte Interaktion der Dehydrogenase mit dem Sensor Aer ermöglichen könnte (Edwards *et al.*, 2006).

Die zweite Möglichkeit der Energiewahrnehmung durch Bakterien ist die direkte Wahrnehmung des Protonflusses über die Membran (PMF). Für den Sensor Tsr aus *E. coli* wurde beschrieben, dass er ebenfalls ein energieabhängiges Verhalten vermittelt und dass dies unabhängig von Aer ist (Rebbapragada *et al.*, 1997; Greer-Phillips *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Aer konnte zudem für Tsr eine Korrelation zwischen der Stärke der Reaktion und der Eignung des jeweiligen Substrats als Kohlenstoffquelle beschrieben werden (Greer-Phillips *et al.*, 2003). Lange gab es keinen experimentellen Beweis für die tatsächliche Wahrnehmung der PMF durch Tsr. Jedoch existierte die Hypothese, dass dies mechanistisch entweder durch die bereits früher beschriebene Fähigkeit zur pH-Wahrnehmung des Sensors (Repaske und Adler, 1981) oder durch andere geladene Seitengruppen geschieht. Schließlich konnten Edwards *et al.* 2006 zeigen, dass tatsächlich ein Zusammenhang zwischen dem Membranpotential, der PMF und dem Tsr-vermittelten Verhalten existiert. Der genaue Mechanismus ist aber auch in diesem Fall noch nicht vollständig geklärt.

Die dritte Möglichkeit der Energiewahrnehmung schließlich stellt die Gruppe der Häm-AT-Sensoren dar. In den Bakterien *B. subtilis*, *D. vulgaris* und *Halobacterium salinarium* (Fu *et al.*, 1994) wurden Sensoren identifiziert, welche Myoglobin-ähnlich sind und Häm-Gruppen besitzen. Diese Sensoren binden mittels ihrer Häm-Gruppen direkt molekularen Sauerstoff und sind so in der Lage, energieabhängiges Verhalten zu vermitteln (Fu *et al.*, 1994; Hou *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2000).

Energiewahrnehmung als solche wurde bisher nicht in *H. pylori* untersucht. Die Erkenntnisse, dass sowohl Orientierung anhand eines pH-Gradienten (Schreiber *et al.*, 2004), als auch pH-Taxis *in vitro* (Croxen *et al.*, 2006) existieren, sprechen jedoch auf Grund der engen Verknüpfung des pH-Wertes mit den energetischen Prozessen der Zelle dafür, dass dieses Verhalten auch in *H. pylori* vorkommt.

4.2.7 Adaptationsmechanismen in der bakteriellen Taxis

Für eine effiziente Reaktion der Bakterien auf einen Reiz ist häufig ein Adaptationsmechanismus von Vorteil. Erst durch die stetige Rückkehr der Bakterien zum ursprünglichen Bewegungsmuster, trotz der Präsenz eines Reizes, kann auf weitere Veränderungen der Intensität des Reizes reagiert werden und so eine Orientierung entlang eines Gradienten erfolgen. Es wurde beschrieben, dass in *E. coli* nach einer Reaktion auf einen Reiz eine Phase der Adaptation und eine Rückkehr zum ursprünglichen Bewegungsmuster folgt (Macnab und Koshland, Jr., 1972; Tsang *et al.*, 1973). In der Folge wurden verschiedene Mechanismen der Adaptation in der bakteriellen Taxis beschrieben. Der bestuntersuchte und am weitesten verbreitete Weg ist der der Methylierung. Springer *et al.* beschrieben einen Zusammenhang zwischen der Methylierung von Glutamin/Glutamat-Seitengruppen der Sensoren und dem Adaptationsprozess (Springer *et al.*, 1979). Entscheidend für eine Methylierung eines Sensors ist dabei die Existenz bestimmter Methylierungsmotive (Glx-Glx*-X-X-Ala-Ser/Thr) (Kehry und Dahlquist, 1982, Terwilliger und Koshland, Jr., 1984) sowie das Vorhandensein der entsprechenden methylierenden und demethylierenden Enzyme CheR (Springer und Koshland, Jr., 1977) und CheB (Stock und Koshland, Jr., 1978). Die Methyltransferase CheR wird durch eine Phosphorylierung von CheA aktiviert und ist somit in der Lage, die Rezeptoren in Abhängigkeit von der Aktivität der Histidinkinase CheA zu modifizieren (Toews *et al.*, 1979) und so Einfluss auf die Signalweiterleitung zu nehmen. Daneben wurde aber auch bereits methylierungsunabhängige Taxis, beispielsweise für den *E. coli* Sensor Aer (Bibikov *et al.*, 2004), gezeigt.

Neben der Adaptation durch Methylierung wurden in *Bacillus subtilis* bislang zwei weitere Systeme entdeckt und charakterisiert (Rao *et al.*, 2008). Das CheC-CheD-CheYp-System und das CheV-System. Im CheC-CheD-CheYp-System geschieht die Adaptation durch die CheYp-Phosphatase CheC und die Rezeptor-Deamidase CheD. CheD liegt gebunden an die Rezeptoren vor und hat eine positiv aktivierende Aktivität auf CheA. Wird ein Lockstoff wahrgenommen, bildet sich mehr phosphoryliertes CheY (CheYp). Phosphoryliertes CheY hat eine erhöhte Affinität zu CheC. CheC wiederum hat in Gegenwart von CheYp eine erhöhte Affinität zu CheD. Dies resultiert in einer Dissoziation von CheD vom Rezeptor zu CheC und dem damit einhergehenden Verlust der positiv aktivierenden Wirkung auf CheA.

Das CheV-System verhält sich ähnlich wie das CheC-CheD-CheYp-System. Die phosphorylierte Histidinkinase CheAp aktiviert dabei CheV durch Phosphorylierung (Karatan *et al.*, 2001). Das phosphorylierte Molekül CheVp wiederum hat eine inhibitorische Wirkung auf die Bindung der Rezeptoren zu CheA.

Die Adaptationsmechanismen in *Helicobacter pylori* sind noch völlig ungeklärt. Bisher konnte keines der bekannten Systeme in *H. pylori* identifiziert werden. Jedoch wurden im Genom von *H. pylori* drei Kopien des Gens *cheV* gefunden.

4.2.8 Regulation der bakteriellen Chemotaxis

Die Regulation der Chemotaxis ist in einzelnen Bakterienspezies sehr unterschiedlich. Sie kann dabei abhängig von Umwelteinflüssen oder z.B. der Zelldichte der Bakterienpopulation sein. Regulationsmechanismen treten vor allem dann auf, wenn in einem Organismus mehrere Sätze an Chemotaxisgenen existieren, welche die Bewegung der Bakterien unter unterschiedlichen Bedingungen steuern. Darüber hinaus können einzelne Sätze an Chemotaxisgenen selbst in der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt sein und selbst keinen unmittelbaren Einfluss auf die Bewegung der Bakterien haben. Einige Beispiele sind in den folgenden Absätzen dargestellt.

Während der Chemotaxisapparat in *E. coli* im Vergleich zu anderen Spezies sehr einfach aufgebaut ist, besteht er in *Pseudomonas aeruginosa* aus vier Sätzen an Chemotaxis Genen. Zwei der Cluster (Che, Che2) sind an der Chemotaxis im Rahmen der Flagellenbewegung beteiligt, eines (Pil-chp) an der Kontrolle der Typ-IV-Pilus-abhängigen Bewegung und eines (Wsp) an der Biofilmbildung (Guvener *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das Gencluster *che2* nur während der stationären Wachstumsphase exprimiert wird. Das *che2*-Cluster unterliegt dabei der Kontrolle des RpoS-Transkriptionsfaktors und ist folglich durch *quorum sensing* reguliert (Schuster *et al.*, 2004).

In *Vibrio cholerae* besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Expression von Virulenzgenen und Motilitäts- sowie Chemotaxis-assoziierten Genen (Boin *et al.*, 2004). So werden Gene der Chemotaxis auch durch den für die Virulenz essenziellen Regulator ToxRS reguliert (Harkey *et al.*, 1994). In *Rhodobacter sphaeroides* konnte gezeigt werden, dass zwei der drei identifizierten Chemotaxisgencluster an der Chemotaxis *in vitro* beteiligt sind, wobei die Komponenten des einen Clusters (*cheOp2*) polar, die anderen zytosolisch (*cheOp3*) lokalisiert sind. Die Gene des Clusters *cheOp2* stehen unter der Kontrolle von σ^{28} - und σ^{70} -abhängigen Promotoren, während die Gene des Clusters *cheOp3* unter der Kontrolle von σ^{54} -abhängigen Promotoren stehen (Martin *et al.*, 2006). Demnach scheint *cheOp2* durch σ^{28} an den Zellzyklus und *cheOp3* durch σ^{54} an die metabolischen Verhältnisse gekoppelt zu sein. Die Autoren diskutieren die unabhängige jedoch wahrscheinlich verknüpfte Regulation dieser beiden Regulons als eine Möglichkeit, eine sehr genaue Balance zwischen der Wahrnehmung von extrazellulären und intrazellulären Reizen zu schaffen.

Bakterienspezies, bei denen Proteine des Chemotaxisapparates selbst an regulatorischen Prozessen teilnehmen, sind z.B. *V. cholerae* und *M. xanthus*. In *Vibrio cholerae* konnte gezeigt werden, dass *in vivo* einige der Chemotaxisgene (*mcpX*, *cheZ*, *cheA2* und *cheY3*) für die Induktion des Cholera-toxins (*ctx*) notwendig sind (Lee *et al.*, 2001). In *Myxococcus xanthus* wiederum interagiert das Chemotaxisgencluster *che3* über die Histidinkinase *CheA3* direkt mit dem *response regulator* *CrdA*, welcher ein Aktivator σ^{54} -abhängiger Promotoren ist, und nimmt so Einfluss auf den Eintritt des Bakteriums in die Sporulation (Kirby und Zusman, 2003).

Insgesamt scheint in Bakterien die Regulation von Chemotaxisgenen dazu zu dienen, eine Feinabstimmung auf die zu einer bestimmten Zeit bestehenden Umweltfaktoren wie Zelldichte oder atmosphärische Bedingungen durchzuführen. *H. pylori* besitzt nur einen Satz an Chemotaxisgenen. Der bisherige Kenntnisstand über verschiedene bekannte Regulationsereignisse in *H. pylori* ist in Abschnitt 4.2.9.2 beschrieben.

4.2.9 Aktueller Wissenstand über Chemotaxis in *H. pylori*

In den annotierten Genomen von *H. pylori* wurden bislang vier Sensoren, TlpA (HP0099/JHP0091), TlpB (HP0103/JHP0095), TlpC (HP0082/JHP0075) und TlpD bzw. HylD (HP0599/JHP0546), das Protein *CheW* (HP0391/JHP0990), die Histidinkinase *CheA* (HP0392/JHP0989), der Response-Regulator *CheY* (HP1067/JHP0358), sowie drei Kopien von *CheV*: *CheV1* (HP0019/JHP0017), *CheV2* (HP0616/JHP0559), *CheV3* (HP0393/JHP0988) und eine mutmaßliche Phosphatase *CheZ* (HP0170/JHP0156) identifiziert (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Terry *et al.*, 2006). Der Response-Regulator *CheY* wurde als Teil eines Stressoperons (Beier *et al.*, 1997) identifiziert. Die Histidinkinase *CheA* besteht aus zwei Domänen: einer Histidinkinase (*CheA*) und einer Response-Regulator-domäne (*CheY*). Daher wird dieses Fusionsprotein in dieser Arbeit stets als *CheAY2* bezeichnet, während der separate Response-Regulator als *CheY1* bezeichnet wird (Foyne *et al.*, 2000). Daneben existieren drei Kopien von *CheV*. Das Protein *CheV* besteht aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne ist homolog zu *CheW* und die C-terminale Domäne ist homolog zu *CheY* (Pittman *et al.*, 2001).

Bei einer Untersuchung der Funktion von *CheY1* und *CheAY2* konnte eine unterschiedliche Rolle der beiden Gene in der Chemotaxis bestätigt werden (Foyne *et al.*, 2000). Während ein *H. pylori*-Wildstamm ein Bewegungsmuster mit kurzen *runs* und einer häufigen Zahl an plötzlichen Richtungsänderungen aufweist, zeigen Mutanten in den Genen *cheAY2* und *cheY2* eine eher lineare Bewegung mit einer geringen Anzahl an *stops* und Richtungsänderungen. Eine *cheY1*-Mutante hingegen wies eine stark erhöhte Zahl an *stops* auf. Darüber hinaus wurde in dieser Studie gezeigt, dass alle Mutanten in ihren

chemotaktischen Fähigkeiten stark beeinträchtigt waren. So bildeten sie keinen Hof mehr in Motilitätsplatten und reagierten im Gegensatz zum Wildstamm nicht mehr auf gastrisches Mucin von Schweinen in einem Kapillarentest. Zudem wurde für beide Proteine (CheY1, CheAY2) gezeigt, dass diese für eine *H. pylori*-Infektion im Mausmodell essenziell sind.

Pittman et al. (2001) untersuchten die Funktion der drei Kopien von CheV näher. Es konnte gezeigt werden, dass zwar CheV1, nicht aber CheV2 und CheV3, einen Einfluss auf das Verhalten in Motilitätsplatten hat. Eine *cheV1* Mutante zeigte ebenso wie eine *cheW*-Mutante einen stark reduzierten Motilitätshof in den Agarplatten. Hingegen wiesen in dieser Untersuchung die *cheV2*- und die *cheV3*-Mutante sowie die *cheV2/cheV3*-Doppelmutante einen dem Wildstamm ähnlichen Phänotyp auf. Anders als in beispielsweise *B. subtilis* (Rosario et al., 1994) kann in *H. pylori* die Funktion von CheW, trotz der homologen Domäne im N-Terminus, nicht von einem der CheV-Molekülen substituiert werden. Pittman et al. (2001) diskutieren darüber hinaus die Möglichkeit, dass die CheV-Moleküle als Phosphatpool fungieren und so den Grad der Phosphorylierung von CheY1 regulieren.

Bisher wurden vier Sensoren in *H. pylori* identifiziert: TlpA, TlpB, TlpC und TlpD. Die wichtigsten grundlegenden, biochemischen Eigenschaften der Proteine sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bemerkenswert ist, dass der Sensor TlpD als einziger Sensor keine vorhergesagten Transmembrandomänen besitzt. Seine Lokalisierung war bisher ungeklärt.

Tabelle 1: Biochemische Eigenschaften der Proteine TlpA, TlpB, TlpC und TlpD aus *H. pylori* KE26695 aa: Aminosäure, bp: Basenpaare; MM: Molekularmasse, kDa: Kilodalton, pl: Isoelektrischer Punkt. Alle Angaben wurden mit Hilfe des ExPASy-Servers erstellt (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Gen / Protein	<i>tlpA</i> /TlpA	<i>tlpB</i> /TlpB	<i>tlpC</i> /TlpC	<i>tlpD</i> /TlpD
Länge [aa]	675	565	673	433
Länge [bp]	2025	1695	2019	1299
MM [kDa]	74	63	75	48
vorhergesagter pl	5.8	5.8	6.9	5.8

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von chemotaktischen Reaktionen von *H. pylori* auf bestimmte Substrate beschrieben, jedoch konnten nur zum Teil Mechanismen aufgeklärt und die wahrgenommenen Substanzen einem spezifischen Sensor zugeordnet werden. Bereits 1997 wurde eine positive chemotaktische Reaktion von *H. pylori* CPY3401 zu Harnstoff, Fluorofamid (ein Ureaseinhibitor) und Bicarbonat in einem modifizierten Kapillarentest beobachtet (Mizote et al., 1997). Cerda et al. (2003) beobachteten ebenfalls in einem Kapillarentest, dass *H. pylori* KE26695 eine chemotaktische Antwort auf Asparaginsäure, Serin, Arginin und Bicarbonat zeigt und dass dieses Verhalten durch TlpA vermittelt wird. Mutanten im Gen *tlpA* zeigten keine Reaktion auf die genannten Substrate mehr, und darüber hinaus wurde bei einer heterologen Expression des Gens *tlpA* in einem *E. coli*-Stamm eine Antwort der Bakterien auf eben diese Stoffe beobachtet. Worku et al.

(2004) untersuchten die chemotaktische Reaktion von *H. pylori* auf humanes Plasma und humane Galle näher und bestätigte damit die Erkenntnisse von Mizote *et al.* und Cerda *et al.* zum Teil. Sie beobachteten die Reaktionen auf Plasmabestandteile, wie Harnstoff, zwölf verschiedene Aminosäuren und sechs verschiedene Gallensäuren. Es wurden positive Reaktionen auf Harnstoff sowie auf die Aminosäuren, Alanin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Glycin, Histidin, Leucin, Prolin, Tyrosin und Valin beobachtet. Für die Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure konnte eine negative Antwort gezeigt werden. Ebenfalls eine negative Antwort wurde für alle untersuchten Gallensäuren beobachtet (Worku *et al.*, 2004). Jedoch wurde in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Bakterien und einzelnen Sensoren gezeigt. Eine weitere Charakterisierung gelang, als für den Sensor TlpB eine negative Reaktion auf starke Säuren ($\text{pH} < 3$) *in vitro* gezeigt werden konnte (Croxen *et al.*, 2006). Die Ergebnisse von Croxen *et al.* werden ausführlich in der Diskussion in Abschnitt 8.10.2 dargestellt.

4.2.9.1 Bedeutung der Chemotaxis von *H. pylori* in seinem Habitat

Zusätzlich zu der Fähigkeit, auf bestimmte Stimuli zu reagieren, wurde in *H. pylori* auch die biologische Relevanz des Chemotaxisapparates im Allgemeinen, sowie einzelner Sensoren untersucht. Bei einer Untersuchung der Histidinkinase CheAY2, einem der zentralen Proteine der Signalübertragung, wurde gezeigt, dass dieses für eine Infektion im Mausmodell essenziell ist (Foyne *et al.*, 2000). Der Chemotaxisapparat ist also notwendig für die initiale Infektion. Dies korrespondiert mit den Erkenntnissen von McGee *et al.* (2005), die im Modell der Mongolischen Rennmaus ebenfalls eine essenzielle Rolle von CheY1 für die Infektion zeigen konnten. Bei der Verwendung von FVB/N-Mäusen zeigte sich ein anderes Bild (Terry *et al.*, 2005): Mutanten in den Genen *cheW*, *cheAY2* und *cheY1* sind zu einer Infektion der Tiere fähig. Jedoch war der Kolonisierungsgrad nach zwei Wochen deutlich geringer als bei den getesteten Wildstämmen. Bei einem Zeitraum von sechs Wochen war kein Unterschied zum Wildstamm in der Stärke der Kolonisierung mehr zu erkennen. Darüber hinaus kolonisierten die *cheW*-Mutanten im Gegensatz zum Wildstamm lediglich im Korpus des Magens und nicht im Antrum und benötigten eine höhere Infektionsdosis als der Wildstamm. Bei einer Koinfektion der Mutanten gleichzeitig oder sequenziell mit dem Wildstamm zeigte sich, dass die Mutanten im Vergleich zum Wildstamm deutlich attenuiert waren. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass der Chemotaxisapparat an der Etablierung der Infektion und der Persistenz beteiligt sind (Terry *et al.*, 2005).

Während Mutanten in den Genen *tlpA* und *tlpC* zwar *in vitro* chemotaktische Reaktionen ähnlich dem des Wildstammes aufwiesen, waren sie im Mausmodell attenuiert (Andermann *et al.*, 2002). Beide Mutanten zeigten *in vivo* über einen Infektionszeitraum von

zwei Wochen zwar bei einer Einzelinfektion eine ähnliche Kolonisierungsfähigkeit wie der Wildstamm, bei einer kompetitiven Infektion gemeinsam mit dem Wildstamm wurde nach zwei Wochen für die *tlpA*-Mutante eine 52fach niedrigere und für die *tlpC*-Mutante eine 25fach niedrigere Kolonisierungsfähigkeit beobachtet. Für den Sensor TlpB wurde ebenfalls im Mausmodell beschrieben, dass Mutanten im Gen *tlpB* des Stammes *H. pylori* SS1 eine deutlich verminderte Kolonisierungseffizienz zeigten (Croxen *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu konnte in diesem Modell kein Effekt von TlpC und TlpD auf die Kolonisierung gezeigt werden. Schließlich konnte im Mausmodell noch beobachtet werden, dass sowohl TlpA als auch TlpB einen Einfluss auf die Stärke der Entzündungsreaktion im Magen haben (Williams *et al.*, 2007). Tiere, welche mit den *tlpA*- oder *tlpB*-Mutanten infiziert wurden, zeigten dort eine signifikant geringere Entzündungsreaktion. Auf die Kolonisierungseffizienz konnte für keinen der vier Sensoren aus *H. pylori* ein Effekt in dieser Arbeit beobachtet werden.

Für den Sensor TlpB wurde darüber hinaus im Modell der Mongolischen Rennmaus gezeigt, dass dieser zwar nicht essenziell für die Infektion ist, der Grad der Entzündung im Magen jedoch deutlich schwächer ist als bei einer Infektion mit dem Wildstamm. Die Autoren diskutieren als Grund eine mögliche unpräzise Lokalisierung im Hinblick auf das Magenepithel (McGee *et al.*, 2005).

In einer Studie von Kavermann *et al.*, (2003) wurde mit einer *signature tagged mutagenesis* (STM) nach *in vivo* essenziellen Genen gesucht. Mit Hilfe einer Transposonmutagenese wurden 252 verschiedene Mutanten (960 Klone) hergestellt und Mongolische Rennmäuse mit den erhaltenen Mutanten infiziert. Gene, deren Mutanten nicht aus den Tieren reisoliert werden konnten, wurden als *in vivo* essenziell angesehen. Auf diese Art konnten insgesamt 47 essenzielle Gene identifiziert werden. Darunter waren auch zwei Gene (*cheV3*, *cheAY2*) des Chemotaxisapparates.

4.2.9.2 Regulation der Chemotaxis in *H. pylori*

Die Regulation der Chemotaxis in *H. pylori* ist noch weitgehend unklar. Vermutlich befinden sich alle Genen des Chemotaxisapparates unter σ^{80} -abhängiger Regulation (Rust *et al.*, 2008). Diese werden also zusammen mit den frühen Genen der Flagellensynthese transkribiert. Darüber hinaus wurde bisher beispielsweise ein Einfluss des Zweikomponentensystems ArsRS, der Sensorkinase FlgS, sowie des regulatorischen Netzwerkes der Flagellensynthese auf verschiedene Gene des Chemotaxisapparates gezeigt. So wurde ein Einfluss von ArsRS auf *cheY* und *cheA* gezeigt (Sachs *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass *cheY1* unter sauren Bedingungen (pH = 2,5) durch die Sensorkinase FlgS hochreguliert wird (Wen *et al.*, 2008). Außerdem wurde beobachtet, dass die Gene *cheV1*, *cheV3*, *cheY1*, *tlpB* und *tlpD* unter sauren Bedingungen ebenfalls reguliert

sind; in diesem Fall ist der Mechanismus der Regulation ungeklärt (Sachs *et al.*, 2008). Kürzlich wurde ein Einfluss der DNA-Topologie auf die Expression von *cheV3* gezeigt (Ye *et al.*, 2007). Die gemeinsame Regulation einiger Gene des Flagellenapparates und des Chemotaxissystems mit *house-keeping*-Genen korrespondiert mit dem Erkenntnis, dass sowohl Flagellen als auch Chemotaxis während einer persistenten Infektion essenziell sind und deren Gene wahrscheinlich konstitutiv exprimiert werden (Josenhans und Suerbaum, 2002).

4.3 Ziele dieser Arbeit

H. pylori verursacht chronische Infektionen des menschlichen Magens in ca. 50% der Weltbevölkerung. Dies und die Tatsache, dass bis zu 15% der infizierten Personen ein Magengeschwür und ca. 1% ein Adenokarzinom des Magens entwickeln, machen *H. pylori* zu einem medizinisch sehr bedeutsamen Bakterium. Insgesamt gibt es weltweit jährlich ca. 500.000 Krebserkrankungen auf Grund einer Infektion mit *H. pylori*. Sowohl die Motilität als auch die Fähigkeit zur Chemotaxis sind essenzielle Eigenschaften für eine Infektion und für die bakterielle Persistenz. Daher ist die Untersuchung dieser Mechanismen unabdingbar für die weitere Aufklärung der Pathogenese dieses medizinisch sehr bedeutsamen Bakteriums.

Die Chemotaxis von *H. pylori* wurde bisher nur in Grundzügen charakterisiert. Zentrale Fragen, wie beispielsweise zu Substratspezifitäten der einzelnen Sensoren, zur Existenz von Energietaxis und deren *in-vivo*-Relevanz oder zur Beteiligung einzelner Chemotaxis-Komponenten in regulatorischen Prozessen sind noch offen.

In dieser Arbeit sollten die vier *H. pylori*-Sensoren bezüglich ihrer Substratspezifitäten näher charakterisiert werden. Ebenfalls sollten die Verhaltensleistungen von *H. pylori* ganz allgemein besser definiert werden. Ein besonderer Schwerpunkt lag hierbei auf der Befähigung von *H. pylori* zur Energietaxis und auf der möglichen Bedeutung der Energietaxis im Lebenszyklus von *H. pylori*. Diese wurde aufgrund mehrerer Untersuchungen in *H. pylori* zwar vermutet, ihre Existenz und Bedeutung konnten bisher aber nicht eindeutig gezeigt werden. Ziele der Arbeit waren nun, die Fragen nach der Existenz und der Rolle von Energietaxis in *H. pylori* zu klären und gegebenenfalls die Rolle der einzelnen Sensoren dabei zu untersuchen. Der Sensor TlpD trägt keine Transmembrandomänen und ist daher ein vielversprechender Kandidat für die Wahrnehmung eines intrazellulären Stimulus, wie z.B. der metabolischen Aktivität der Bakterien. Daher sollte neben der Rolle von TlpD in der Reizwahrnehmung auch dessen Lokalisierung und dessen Relevanz unter *in-vivo*-Bedingungen untersucht werden.

5 Material

5.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte und ihre Hersteller

Anaerobentöpfe	Oxoid, Wesel/ Merck, Darmstadt
Brutschrank	BB5060; Heraeus, Hanau
SDS-Gelelektrophoresekammern	Mini Protean® 2; Bio-Rad, München
Agarose-Gelelektrophoresekammern	Keutz, Reiskirchen
Gel-Dokumentationssystem (UV-Transilluminator)	Universal Hood II; Biorad, München
Protein-Elution	<i>Electro-Eluter Model 422</i> ; Bio-Rad, München
Mikroskop	Olympus BX40; Olympus, Hamburg Olympus IX80; Olympus, Hamburg
Luminometer	Wallac 1420 VICTOR 3™ V, PerkinElmer, Waltham
Scholzen® Brutschrank	Scholzen Microbiology Systems AG, Wittenbach
Schüttelinkubator	SM30; Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen
<i>Semidry-Blotting-Apparatur</i>	Keutz, Reiskirchen
Sequenzierapparatur	ABI Prism Sequencer 3130 XL <i>Genetic Analyzer</i> ; Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsgeber	Biorad, München
Spektralphotometer	GeneQuant pro; Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg
Plattenphotometer	Multiscan MCC/340; Titertek, Meckenheim
Thermocycler	T3; Biometra, Göttingen
Ultraschall-Apparatur	Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA
Kühlung für Ultraschall-Apparatur	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Zentrifugen	Sigma 1-15K; Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz Sigma 3-15K; Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Reinraumwerkbänke	Rotana 96RCS; A.Hettich GmbH, Tuttlingen
Thermoblock	Kojair®, Tampere, Finnland
Waagen	TermoStat plus; Eppendorf, Hamburg Feinwaage; Sartorius AG, Göttingen

5.2 Computerprogramme für Bioinformatik und Statistik

Tabelle 3: Verwendete Software und ihre Bezugsquelle

Bionumerics	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
Chromas 1.45	http://www.techenlysium.co.au
Clone Manager 6	Sci Ed Central for Windows 95
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html Larkin et al., 2007
DNASTAR-Produkte:	
GeneDoc	http://www.psc.edu/biomed/genedoc
MSExcel	verwendet für <i>t</i> -Test und χ^2 -Test
Phyre 0.2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/index.cgi
SigmaStat (Systat)	verwendet für Rangsummentest
TrackIT (Olympus SIS); Version 1.2.455	Olympus, Hamburg
Yasara	http://www.yasara.org

5.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von höchstem Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), GE-Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und Roche (Mannheim) bezogen. Das HPLC-gereinigte Wasser wurde von der Firma Malinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA) erworben.

5.4 Enzyme, Antikörper, Kits und Größenmarker für Gele

Enzyme:

Tabelle 4: Verwendete Enzyme und ihre Hersteller

DNA-Polymerasen	Amersham/Pharmacia, Freiburg Roche/Böhringer, Mannheim
Alkalische Phosphatase CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	NEB, Bad Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	NEB, Bad Schwalbach

Antikörper:

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper und ihre Bezugsquelle

Kaninchen- α -His ₆ (polyklonal)	Biomol, Hamburg
Maus- α -V5 (monoklonal)	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen- α -Tsr (polyklonal)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.S. Parkinson
Kaninchen- α -TlpD (polyklonal)	Immunisierung mit im Rahmen dieser Arbeit gereinigtem TlpD (siehe Abschnitt 7.8.1), Biogenes
Kaninchen- α -FlhA (polyklonal)	Durch Immunisierung gegen rekombinantes <i>H. pylori</i> -FlhA (Teilprotein) hergestellt (Schmitz <i>et al.</i> , 1997)
POX-Ziege- α -Maus (sekundär)	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg
POX-Ziege- α -Kaninchen (sekundär)	Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg
Alexa Fluor ⁴⁸⁸ - α -Maus (sekundär)	Invitrogen, Karlsruhe

Kits:**Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits und ihrer Hersteller**

BacTiter Glo	Promega, Mannheim
BCA-Assay	Pierce, Bonn
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAspin Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quick Ligation™-Kit	NEB, Bad Schwalbach
RIDASCREEN® FemtoLab H. pylori	R-Biopharm, Darmstadt

Größenmarker für Gele:**Tabelle 7: Verwendete Größenmarker für Gele**

1 Kb Plus DNA-Ladder	Invitrogen Karlsruhe
Benchmark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen Karlsruhe
Seablue Plus2 (Größenmarker für Proteine)	Invitrogen Karlsruhe

5.5 Oligodesoxynukleotide**Tabelle 8: Verwendete Oligodesoxynukleotide** In der Tabelle sind jeweils der Name, die [5´-3´]-Sequenz, der Verwendungszweck und gegebenenfalls die Schnittstelle angeben. In der angegebenen [5´-3´]-Sequenz ist die Schnittstelle unterstrichen.

Oligonukleotid-Name	Sequenz [5´-3´]	Schnittstelle	Verwendungszweck
EcoAer_Eael_F	TAT <u>CGGCCG</u> GATAGAAAATGTTGCCCAT	Eael	Konstruktion eines Konstrukts zur Synthese eines TlpA-Aer-Hybridsensors in <i>E. coli</i>
HPccoP_419_R	TAT <u>GGATCC</u> AAGCCCTCAGCGGTGATG	<i>Bam</i> HI	Mutagenese von <i>ccoP</i>
HPccoP_521_F	TAT <u>GGATCC</u> TGCCCGCTATGGAATTGG	<i>Bam</i> HI	
HPccoP_64_F	TAT <u>AGATCT</u> TTAACCATCTATGAATCCAG	<i>Bgl</i> I	
HPccoP_845_R	TAT <u>AGATCT</u> TTT CAGTAACGCTTTAACTTG	<i>Bgl</i> I	
OLaphA3_M_F	TAT <u>CAATTG</u> CGAACCATTTGAGGTGATAG	<i>Mfe</i> I	Konstruktion eines Konstrukts zur unmarkierten Mutagenese von <i>tlpC</i>
OLaphA3_X_F	TAT <u>TCTAGAC</u> GGAACCATTTGAGGTGATAG	<i>Xba</i> I	Konstruktion eines Konstrukts zur unmarkierten Mutagenese von <i>tlpB</i>
OLFlaP_X_F	TAT <u>TCTAGAT</u> CATGCTCTTTTAAATTTTGC	<i>Xba</i> I	
OLHP0082_1s	TAA <u>AGATCT</u> TCAGCTACAAGGTTGAAAGC	<i>Bgl</i> II	Mutagenese von <i>tlpC</i>
OLHP0082_2s	AAT <u>AGATCT</u> GACTTGTAAGAATGATTAGC	<i>Bgl</i> II	

OLHP0082_3s	ATAGAATTCCATCCAAAATCCTAAAGCCAAC	<i>EcoRI</i>	
OLHP0082_5s	TATCCATGGAAGCTTCTTTAGGGTTTGCG	<i>NcoI</i>	
OLHP0082_6s	TATCCATGGCAGCGCTAAAATCAAAGTGG	<i>NcoI</i>	
OLHP0082_pTrc_1F	AAACCATGGAATCTACAAGAATTGGTTCT	<i>NcoI</i>	Expression von <i>tlpC</i> in <i>E. coli</i>
OLHP0082_pTrc_2R	ATACCATGGGACGCTCAAATTAAGGCAG	<i>NcoI</i>	
OLHP0099_1s	ATAAGATCTTAATGAGAACGATTGATCGTC	<i>BglII</i>	Mutagenese von <i>tlpA</i>
OLHP0099_2s	AATAGATCTAGAGGTTATCCACTGAGCAGC	<i>BglII</i>	
OLHP0099_NotI_F	TAAGCGGCCGCGAGCTCACGATC GCTCGCATT	<i>NotI</i>	Konstruktion eines Konstrukts zur Synthese eines TlpA-Aer-Hybridsensors in <i>E. coli</i>
OLHP0099_pTrc_1F	AAACCATGGCTAAAGGTTTGAGTATCGGT	<i>NcoI</i>	Expression von <i>tlpA</i> in <i>E. coli</i>
OLHP0099_pTrc_2R	TAACCATGGAGAGGTTATCCACTGAGCAGC	<i>NcoI</i>	
OLHP0103_1s	TAAAGATCTGTGCATTTAGAAGCTAAACTC	<i>BglII</i>	Mutagenese von <i>tlpB</i>
OLHP0103_2s	ATAAGATCTGAAAGAATGGTGTCTTCAATGG	<i>BglII</i>	
OLHP0103_3s	ATAGAATTGAGATTTATCGTTGCGATC	<i>EcoRI</i>	
OLHP0103_4s	ATAGAATTGATGAATGCTTCCATAGAGC	<i>EcoRI</i>	
OLHP0103_5s	TATCCATGGATGATGTCAAATCCATTCTGG	<i>NcoI</i>	
OLHP0103_5s	TATCCATGGATGATGTCAAATCCATTCTGG	<i>NcoI</i>	
OLHP0103_6s	TATCCATGGATCGTCGCTGTCAGTATCC	<i>NcoI</i>	
OLHP0103_6s	TATCCATGGATCGTCGCTGTCAGTATCC	<i>NcoI</i>	
OLHP0103_pTrc_1F	AAACCATGGTGTCTTCAATGTTTGC	<i>NcoI</i>	
OLHP0103_pTrc_2R	AAACCATGGTGTCTTCAATGTTTGC	<i>NcoI</i>	
OLHP0103_SpeI_3s	TATACTAGTGAGCATGATGAATGCTTCCATAG	<i>SpeI</i>	
OLHP0103_SpeI_4s	TATACTAGTGAGATTTATCGTTGCGATC	<i>SpeI</i>	
OLHP0144_1s	ATAGAATTCATGCAAGAAAATGTGCCTTTG	<i>EcoRI</i>	
OLHP0144_2s	ATAGAATTCATCTAGACATAGCGTGG	<i>EcoRI</i>	
OLHP0144_5s	ATAAGATCTGTTGATCTTGCCTTCGTGG	<i>BglII</i>	
OLHP0144_6s	ATAAGATCTAACACTCCCATATCAGCC	<i>BglII</i>	
OLHP0147_5s	ATAGAATTCGATTTAGAAAGTTTGAGAGGG	<i>EcoRI</i>	Mutagenese von HP0147
OLHP0147_6s	ATAGAATTCATCGTCATTAATAATGGTCGC	<i>EcoRI</i>	
OLHP0147_7s	TATAGATCTTGCCGCTATGGAATTGG	<i>BglII</i>	
OLHP0147_8s	TATAGATCTAAGCCCTCAGCGGTGATG	<i>BglII</i>	
OLHP0599_1s	ATAGGATCCGAAGCAGCAATACTAACGAG	<i>BamHI</i>	Mutagenese von <i>tlpD</i>
OLHP0599_2s	TAAGGATCCCACTTCATTGAATAAAATCATTCCG	<i>BamHI</i>	
OLHP0599_3s	TATGAATTCAGAACAAACCAATCTATTAGC	<i>EcoRI</i>	
OLHP0599_6s	TATGAATTCCTCCGTTGGTTGAGAGAGTC	<i>EcoRI</i>	
OLHP0599_pTrc_1F	AAACCATGGTTGGGAATAAGCAGTTGCAAC	<i>NcoI</i>	Expression von <i>tlpD</i> in <i>E. coli</i>
OLHP0599_pTrc_2R	ATACCATGGCACTTCATTGAATAAAATCATTCCG	<i>NcoI</i>	
OLHP0599_V5_F	TATGGATCCAACCCACAAAGAGAGAAAC	<i>BamHI</i>	Konstruktion eines TlpD-V5 Konstrukts zur Komplementation von <i>tlpD</i>
OLHP0599_V5_R	ATAGGATCCTCCTTCGCCTTTTTGAATTTTTTC	<i>BamHI</i>	
OLHP0600_F1	AAAGGATCCGATACCATAAAAAGCATTCC	<i>BamHI</i>	Mutagenese von HP0600
OLHP0600_F2	AAAAGATCTCATTAGTCGGCAAGAATGCTA	<i>BglII</i>	

OLHP0600_R1	AAAGGATCCGCTCGTTAGTATTGCTGC	<i>Bam</i> HI	
OLHP0600_R2	AAAAGATCTGGAGATGAAAATACAAGGCAC	<i>Bgl</i> II	
OLHP0697_1s	GAGAGATCTCCAGAATACGCTTACAAGG	<i>Bgl</i> II	Mutagenese von HP0697
OLHP0697_2s	GAGAGATCTGCTTTTCCCTTGTTAGGTGG	<i>Bgl</i> II	
OLHP0697_3s	AGAGGATCCTGTTTGTGGTGAAGATGC	<i>Bam</i> HI	
OLHP0697_4s	GAGGGATCCACACCTTCAGATACATTTGG	<i>Bam</i> HI	
OLHP0954_1s	TATAGATCTAACGCATGGGTTGCTGATTG	<i>Bgl</i> II	
OLHP0954_2s	TATAGATCTCAAGCAGGAGCATCAGATAG	<i>Bgl</i> II	
OLHP0954_3s	TACATCGATTTTTGCTCAAATGCTTGGCG	<i>Clal</i>	
OLHP0954_4s	TATATCGATCAACTCGCTGGGTCTTAAAG	<i>Clal</i>	
OLHP1033_1s	ATAAGATCTAATGAGTTTCTGCTAGAGCG	<i>Bgl</i> II	Mutagenese von HP1033
OLHP1033_2s	TATAGATCTTTGGAGCTACTACGCAAGCG	<i>Bgl</i> II	
OLHP1033_3s	ATAAGATCTAAAATGCTCTCTGGCTCATTG	<i>Bgl</i> II	
OLHP1033_4s	TATAGATCTTATCGCTTGACGGATTTGG	<i>Bgl</i> II	
OLHPcheA1	TAGGATCCGCATCACTGAAGCTGTGG	<i>Bam</i> HI	Mutagenese von <i>cheAY2</i>
OLHPcheA2	TAGGATCCACTTTACCGGTTTCAGG	<i>Bam</i> HI	
OLHpFlaAP_M_F	TATCAATTGTCATGCTCTTTTAAATTTTGC	<i>Mfe</i> I	Konstruktion eines Konstrukts zur unmarkierten Mutagenese von <i>tlpC</i>
OLpCAT_Nar_F	ATAGGCGCCGATATCGCATGCCTGCAGAG	<i>Nar</i> I	Konstruktion eines Konstrukts zur genomischen Komplementation von <i>tlpD</i> im Gen <i>rdxA</i>
OLpCAT_Nar_R	ATAGGCGCCGATATCGCATGCCTGCAGAG	<i>Nar</i> I	
OLpCJ522_His_fw	CATCACCATTGAGGATCCTCTAGAGTCGAC		Konstruktion eines TlpD-His ₆ -Konstrukts zur Komplementation von <i>tlpD</i>
OLpCJ522_His_rev2	ATGATGGTGACCTGCTGCTGAAGATCCTCC		
OLpEF6_R	ATAAGATCTAGGGCAATTCCACCACAC	<i>Bgl</i> II	Konstruktion eines TlpD-V5-Konstrukts zur Komplementation von <i>tlpD</i>
OLpTrc99_Ncol_F	AGACCATGGAATTCGAGCTC	<i>Nco</i> I	Konstruktion eines Konstrukts zur Synthese eines TlpA-Aer-Hybridsensors in <i>E. coli</i>
OLpTrc99a_MCS2	ACTTCTGAGTTCGGCATGG		Konstruktion eines Konstrukts zur Synthese eines TlpA-Aer-Hybridsensors in <i>E. coli</i>
OLV5_F	TATAGATCTTCAGCAGCAGGTGGTAAGC CTATCCCTAAC	<i>Bgl</i> II	Konstruktion eines TlpD-V5-Konstrukts zur Komplementation von <i>tlpD</i>
OLV5_R	ATAGGATCCTCACGTAGAATCGAGACCGAG	<i>Bam</i> HI	Konstruktion eines TlpD-V5-Konstrukts zur Komplementation von <i>tlpD</i>

5.6 Plasmide

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide. Angegeben sind jeweils der Name, das zu Grunde liegende Ausgangsplasmid, eine Beschreibung des Genotyps inklusive vorhandener Resistenzen und Replikationsursprünge, sowie die Quelle des Plasmids. Außerdem sind die Oligodesoxynukleotide für die Amplifikation des einklonierten Inserts und gegebenenfalls die Primer zur inversen Amplifikation des Ausgangsplasmids angegeben. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind Tabelle 8 zu entnehmen. Eine allgemeine Beschreibung der Herstellung der Plasmide findet sich außerdem in Abschnitt 6.8 und Abschnitt 6.9.

Plasmid	Ausgangs-plasmid	Beschreibung	Oligodesoxynukleotide für die Amplifikation des		Referenz
			Insert	Plasmids (invers)	
pBHcp8		Quelle der CAT-Kassette			Ge <i>et al.</i> , 1995
pCJ326	pILL570	Spec ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpD</i> ::CAT	OLHP0599_1s OLHP0599_2s	OLHP0599_3s OLHP0599_6s	C. Josenhans, unveröffentlicht
pCJ328	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpC</i>	OLHP0082_pTrc_1F OLHP0082_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ329	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpC</i> in Antisense-richtung	OLHP0082_pTrc_1F OLHP0082_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ330	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpA</i>	OLHP0099_pTrc_1F OLHP0099_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ331	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpA</i> in Antisense-richtung	OLHP0099_pTrc_1F OLHP0099_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ332	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpB</i>	OLHP0103_pTrc_1F OLHP0103_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ333	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpB</i> in Antisense-richtung	OLHP0103_pTrc_1F OLHP0103_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ401	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpD</i>	OLHP0599_pTrc_1F OLHP0599_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ401	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpD</i> in Antisense-richtung	OLHP0599_pTrc_1F OLHP0599_pTrc_2R		Josenhans, unveröffentlicht
pCJ500	pUC18	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>ccoP</i>	OLHPccoP_64_F OLHPccoP_548_R		diese Arbeit
pCJ501	pCJ500	Amp ^R , Cm ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>ccoP</i> ::CAT		OLHPccoP_521_F OLHPccoP_419_R	diese Arbeit
pCJ510	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpA</i> – <i>E. coli aer</i> Hybrid	Konstruktion siehe Abschnitt 6.9		diese Arbeit
pCJ511	pSUS252	Spec ^R , Km ^R , Sac ^S , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpC</i> ::KanSac	OLaphA3_M_F OLHpFlaAP_M_F	Aus dem Plasmid pSUS252 wurde zuvor die Km ^R Kassette mittels <i>EcoRI</i> entfernt	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pCJ512	pCJ511	Spec ^R , Km ^R , <i>H. pylori</i> 26695 Δ <i>tlpC</i> ²		OLHP0082_5s OLHP0082_6s	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pCJ513	pSUS260	Spec ^R , Km ^R , Suc ^S , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpB</i> ::KanSac	OLaphA3_X_F OLHPFlaP_X_F	OLHP0103_Spel_3s OLHP0103_Spel_4s	diese Arbeit
pCJ514	pCJ513	Spec ^R , Km ^R , <i>H. pylori</i> 26695 Δ <i>tlpB</i> ¹		OLHP0103_5s OLHP0103_6s	diese Arbeit
pCJ515	pUC18	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>ccoN</i>	OLHP0144_1s OLHP0144_2s		diese Arbeit
pCJ516	pUC18	Amp ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>ccoP</i>	OLHP0147_5s OLHP0147_6s		diese Arbeit
pCJ517	pCJ515	Amp ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>ccoN</i> ::aphA3'-III		OLHP0144_5s OLHP0144_6s	diese Arbeit
pCJ518	pCJ516	Amp ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>ccoP</i> ::aphA3'-III		OLHP0147_7s OLHP0147_8s	diese Arbeit

pCJ519	pCJ515	Amp ^R , Cm ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>ccoN::CAT</i>		OLHP0144_5s OLHP0144_6s	diese Arbeit
pCJ520	pEF6-V5	Amp ^R , Blast ^R , Rep _{Ec} , Rep _{Hp} , eukaryontischer Promoter entfernt, <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpD-V5-tag</i> -Fusion inklusive geneigener Promotor	<i>Konstruktion siehe Abschnitt 6.9</i>		Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pCJ522	pHel2	Cm ^R , Rep _{Ec} , Rep _{Hp} , <i>tlpD-V5-tag</i> -fusion, <i>tlpD</i> aus <i>H. pylori</i> 26695	<i>Konstruktion siehe Abschnitt 6.9</i>		Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pCJ523	pHel3	Km ^R , Rep _{Ec} , Rep _{Hp} , <i>tlpD-V5-tag</i> -fusion, <i>tlpD</i> aus <i>H. pylori</i> 26695	<i>Konstruktion siehe Abschnitt 6.9</i>		diese Arbeit
pCJ524	pUC18	Amp ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>rdxA</i>	OLHP0954_1s OLHP0954_2s		diese Arbeit
pCJ526	pCJ524	Amp ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>rdxA</i> mit zusätzlich eingefügter Clal-Schnittstelle		OLHP0954_3s OLHP0954_4s	diese Arbeit
pCJ530	pUC18	Amp ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 HP1033	OLHP1033_1s OLHP1033_2s		diese Arbeit
pCJ532	pCJ530	Amp ^R , Km ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 HP1033:: <i>aphA3</i> -III		OLHP1033_3s OLHP1033_4s	diese Arbeit
pCJ535	pCJ524	Amp ^R , Cm ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>rdxA::CAT</i>	OLpCAT_Nar_F OLpCAT_Nar_R		diese Arbeit
pCJ536	pUC18	Amp ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 HP0697	OLHP0697_1s OLHP0697_2s		diese Arbeit
pCJ537	pCJ536	Amp ^R , Km ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 HP0697:: <i>aphA3</i> -III		OLHP0697_3s OLHP0697_4s	diese Arbeit
pCJ542	pCJ535	Amp ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>rdxA::CAT</i> , <i>tlpD_V5</i>	<i>Das Fusionskonstrukt tlpD-V5 wurde aus pCJ522 mit BamHI ausgeschnitten und in die natürliche BamHI Schnittstelle innerhalb des rdxA Gens umklontiert.</i>		diese Arbeit
pCJ543	pUC18	Amp ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 HP0600	OLHP0600_F1 OLHP0600_R1		diese Arbeit
pCJ544	pCJ543	Amp ^R , Km ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 HP0600:: <i>aphA3</i> -III		OLHP0600_F2 OLHP0600_R2	diese Arbeit
pCJ545	pCJ522	Cm ^R , Rep _{Ec} , Rep _{Hp} , <i>tlpD-His6-tag</i> -fusion, <i>tlpD</i> aus <i>H. pylori</i> 26695	<i>Konstruktion siehe Abschnitt 6.9</i>		diese Arbeit
pEF6-V5		Amp ^R , Blast ^R , Rep _{Ec} , Rep _{Eukar.} , Quelle der V5-tag Sequenz			Invitrogen, Karlsruhe
pGH1	pTrc99a	Amp ^R , Rep _{Ec} , <i>E. coli aer</i>			Rebbapragada <i>et al.</i> , 1997
pHel2		Cm ^R , Rep _{Ec} , Rep _{Hp} , multi-copy-Shuttlevektor für <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i>			Heuermann und Haas, 1998
pHel3		Km ^R , Rep _{Ec} , Rep _{Hp} , multi-copy-Shuttlevektor für <i>E. coli</i> und <i>H. pylori</i>			Heuermann und Haas, 1998
pHPS807	pBluescript II KS(+)	Amp ^R , Cm ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpA::CAT</i>	<i>Plasmid wurde freundlicherweise von T. Mizote (Yamaguchi, Japan) zur Verfügung gestellt</i>		Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pHPS904	pBluescript II KS(+)	Amp ^R , Cm ^R , Rep _{Ec} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpC::CAT</i>	<i>Plasmid wurde freundlicherweise von T. Mizote (Yamaguchi, Japan) zur Verfügung gestellt</i>		T: Mizote, unveröffentlicht

pILL570		Spec ^R , Rep _{EC}			Labigne <i>et al.</i> , 1991
pILL600	pILL570	Spec ^R , Km ^R , Quelle der <i>aphA3</i> ^{-III} -Kassette			Labigne-Roussel <i>et al.</i> , 1988
pKSF		Quelle der <i>aphA3</i> ^{-III} - <i>sacB</i> -Kassette			Copass <i>et al.</i> , 1997
pSUS131	pUC18	Amp ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>cheAY2::aphA3</i> ^{-III}	OLHPcheA1 OLHPcheA2		Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pSUS252	pILL570	Spec ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpC::aphA3</i> ^{-III}	OLHP0082_1s OLHP0082_2s	OLHP0082_3s OLHP0082_5s	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pSUS255	pILL570	Spec ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpA::aphA3</i> ^{-III}	OLHP0099_1s OLHP0099_2s	Die Km ^R Kassette wurde in eine natürliche BamHI Schnittstelle innerhalb des Gens <i>tlpA</i> kloniert	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pSUS260	pILL570	Spec ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpB::aphA3</i> ^{-III}	OLHP0103_1s OLHP0103_2s	OLHP0103_3s OLHP0103_4s	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pSUS275	pILL570	Spec ^R , Km ^R , Rep _{EC} , <i>H. pylori</i> 26695 <i>tlpD::aphA3</i> ^{-III}	OLHP0599_1s OLHP0599_2s	OLHP0599_3s OLHP0599_6s	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
pTrc99a		Amp ^R , Rep _{EC} , Expressionsplasmid für <i>E. coli</i>			
pUC18		Amp ^R , Rep _{EC} , high-copy-Klonierungsvektor			Vieira und Messing, 1982

¹ Δ tlpB bezeichnet eine Deletion innerhalb des Gens *tlpB* von 517 bp Länge. Die Deletion wurde zwischen Position 662 und 1179 eingefügt.

² Δ tlpC bezeichnet eine Deletion innerhalb des Gens *tlpC* von 509 bp Länge. Die Deletion wurde zwischen Position 1029 und 1538 eingefügt.

5.7 Bakterienstämme

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendeten *H. pylori*-Stämme. In der Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten *H. pylori*-Stämme inklusive ihres Genotyps und gegebenenfalls der entsprechenden Referenz angegeben. Für alle Mutanten ist die Nummer (#) des Ausgangsstammes aus dem diese Mutante hergestellt wurde und das dafür verwendete Plasmid angegeben. Die grau hinterlegten Mutanten sind Endprodukte und wurden zum Teil in dieser Arbeit verwendet. Die nicht hinterlegten Mutanten sind lediglich Zwischenstufen einer mehrschrittigen Mutagenese.

#	Bakterienstamm	Genotyp	Hergestellt		Referenz
			aus	mit	
1	<i>H. pylori</i> KE26695	<i>H. pylori</i> -Wildstamm			
2	<i>H. pylori</i> 88-3887	motile Variante des <i>H. pylori</i> -26695-Wildstammes			
3	<i>H. pylori</i> B128	<i>H. pylori</i> -Wildstamm			
4	<i>H. pylori</i> HP87	<i>H. pylori</i> -Wildstamm			Wagner <i>et al.</i> , 1997
5	<i>H. pylori</i> HP87 G7	7fach durch die Mongolische Rennmaus passagierte und damit adaptierte Variante des Stammes <i>H. pylori</i> HP87			Bleich <i>et al.</i> , 2005
6	<i>H. pylori</i> L7	<i>H. pylori</i> -Wildstamm			
7	<i>H. pylori</i> N6	<i>H. pylori</i> -Wildstamm			
8	<i>H. pylori</i> 88-3887 <i>tlpD</i>	<i>H. pylori</i> 88-3887 <i>tlpD::CAT</i>	2	pCJ326	diese Arbeit
9	<i>H. pylori</i> B128 <i>hp0600</i>	<i>H. pylori</i> B128	3	pCJ544	diese Arbeit

		<i>hp0600::aphA3'-III,</i>			
10	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpA</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpA::aphA3'-III</i>	3	pSUS255	diese Arbeit
11	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpA</i> ⁻ II	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpA::CAT</i>	3	pHPS807	diese Arbeit
12	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpAB</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpA::CAT,</i> <i>tlpB::aphA3'-III</i>	15	pHPS807	diese Arbeit
13	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpAC</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpA::CAT,</i> <i>tlpC::aphA3'-III</i>	11	pSUS252	diese Arbeit
14	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpAD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpA::aphA3'-III,</i> <i>tlpD::CAT</i>	20	pSUS255	diese Arbeit
15	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpB</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpB::aphA3'-III</i>	3	pSUS260	diese Arbeit
16	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpBC</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpB::aphA3'-III,</i> <i>tlpC::CAT</i>	15	pHPS904	diese Arbeit
17	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpBD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpB::aphA3'-III,</i> <i>tlpD::CAT</i>	15	pSUS260	diese Arbeit
18	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpC</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpC::CAT</i>	3	pHPS904	diese Arbeit
19	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpCD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpC::CAT,</i> <i>tlpD::aphA3'-III</i>	18	pSUS275	diese Arbeit
20	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> B128 <i>tlpD::CAT</i>	3	pCJ326	diese Arbeit
21	<i>H. pylori</i> HP87 <i>tlpD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> HP87 <i>tlpD::CAT</i>	4	pCJ326	diese Arbeit
22	<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>cheAY2</i> ⁻	<i>H. pylori</i> HP87 <i>cheAY2::aphA3'-III</i>	5	pSUS131	diese Arbeit
23	<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>tlpD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> HP87 <i>tlpD::aphA3'-III</i>	5	pSUS275	diese Arbeit
24	<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>tlpD</i> ⁻ /TlpD-V5	<i>H. pylori</i> HP87 <i>tlpD::aphA3'-III,</i> <i>rdxA::CAT, tlpD-V5</i>	23	pCJ542	diese Arbeit
25	<i>H. pylori</i> L7 <i>hp0600</i> ⁻	<i>H. pylori</i> L7 <i>hp0600::aphA3'-III,</i>	6	pCJ544	diese Arbeit
26	<i>H. pylori</i> N6 Δ <i>tlpB</i>	<i>H. pylori</i> N6 Δ <i>tlpB</i> ¹	42	pCJ514	diese Arbeit
27	<i>H. pylori</i> N6 Δ <i>tlpC</i>	<i>H. pylori</i> N6 Δ <i>tlpC</i> ²	43	pCJ512	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
28	<i>H. pylori</i> N6 <i>cheAY2</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>cheAY2::aphA3'-III</i>	7	pSUS131	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
29	<i>H. pylori</i> N6 <i>cheAY2</i> ⁻ TlpD-V5	<i>H. pylori</i> N6 <i>cheAY2::aphA3'-III,</i> <i>tlpD-V5, Cm^R</i>	28	pCJ522	diese Arbeit
30	<i>H. pylori</i> N6 <i>hp0697</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>hp0697::aphA3'-III</i>	7	pCJ537	diese Arbeit
31	<i>H. pylori</i> N6 <i>hp1033</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>hp1033::aphA3'-III</i>	7	pCJ532	diese Arbeit
32	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::aphA3'-III</i>	7	pSUS255	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
33	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpAB</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT, ΔtlpB</i> ¹	26	pHPS807	diese Arbeit
34	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpABC</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT,</i> <i>tlpB::aphA3'-III, ΔtlpC</i> ²	44	pHPS807	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
35	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpABC</i> ⁻ II	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT, ΔtlpB</i> ¹ , <i>ΔtlpC</i> ² ,	46	pHPS807	diese Arbeit
36	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpABC</i> ⁻ /TlpD-V5	<i>H. pylori</i> N6 <i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT, ΔtlpB</i> ¹ , <i>ΔtlpC</i> ² , <i>tlpD-V5, Km^R</i>	35	pCJ523	diese Arbeit
37	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpABCD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT, ΔtlpB</i> ¹ , <i>ΔtlpC</i> ² , <i>tlpD::aphA3'-III</i>	36	pSUS275	diese Arbeit
38	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpABD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT, ΔtlpB</i> ¹ , <i>tlpD::aphA3'-III</i>	33	pSUS275	diese Arbeit
39	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpAC</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT, ΔtlpC</i> ²	27	pHPS807	diese Arbeit
40	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpACD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpA::CAT, ΔtlpC</i> ² , <i>tlpD::aphA3'-III</i>	39	pSUS275	diese Arbeit
41	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpB</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpB::aphA3'-III</i>	7	pSUS260	Schweinitzer <i>et</i>

					al., 2008
42	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpB::KanSac</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpB::KanSac</i>	7	pCJ513	diese Arbeit
43	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpB::KanSac</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpC::KanSac</i>	7	pCJ511	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
44	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpBC</i> ¹	HPN6 <i>tlpB::aphA3'</i> -III, Δ <i>tlpC</i> ²	27	pSUS260	diese Arbeit
45	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpBC</i> II	<i>H. pylori</i> <i>tlpB::KanSac</i> , Δ <i>tlpC</i> ²	27	pCJ513	diese Arbeit
46	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpBC</i> III	<i>H. pylori</i> Δ <i>tlpB</i> ¹ , Δ <i>tlpC</i> ²	45	pCJ514	diese Arbeit
47	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpBCD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpB::aphA3'</i> -III, Δ <i>tlpC</i> ² , <i>tlpD::CAT</i>	44	pCJ326	diese Arbeit
48	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpC</i>	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpC::aphA3'</i> -III	7	pSUS252	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
49	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD</i> ⁻	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD::aphA3'</i> -III	7	pSUS275	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
50	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD</i> II	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD::CAT</i>	7	pCJ326	Josenhans, unveröffentlicht
51	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD</i> ⁻ / <i>TlpD</i> -His ₆	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD::aphA3'</i> -III + pCJ545	49	pCJ545	diese Arbeit
52	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD</i> ⁻ / <i>TlpD</i> -V5	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD::aphA3'</i> -III + pCJ522	49	pCJ522	Schweinitzer <i>et al.</i> , 2008
53	<i>H. pylori</i> N6 <i>TlpD</i> -V5	<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD</i> -V5, Cm ^R	7	pCJ522	diese Arbeit

¹ Δ *tlpB* bezeichnet eine Deletion innerhalb des Gens *tlpB* von 517 bp Länge. Die Deletion wurde zwischen Position 662 und 1179 eingefügt.

² Δ *tlpC* bezeichnet eine Deletion innerhalb des Gens *tlpC* von 509 bp Länge. Die Deletion wurde zwischen Position 1029 und 1538 eingefügt.

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme. In der Tabelle sind alle in dieser in Arbeit verwendeten *H. pylori* Stämme inklusive ihres Genotyps und gegebenenfalls der entsprechenden Referenz. Das im Namen des Stammes angegebene Protein wird in dem jeweiligen Stamm überexprimiert. Der Stern (*) zeigt an, dass das genannte Gen im Plasmid eine dem Promotor entgegengesetzte Orientierung hat und somit nicht korrekt transkribiert wird. Diese Plasmide dienen als negative Kontrollen.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>thi1</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> MC1061	F ⁻ , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7696 <i>galE15</i> <i>galK16</i> Δ (<i>lac</i>)X74 <i>rpsL</i> (<i>Str</i>) <i>hsdR2</i> (<i>rKm</i> +) <i>mcrA</i> <i>mcrB1</i>	Casadaban und Cohen, 1980
<i>E. coli</i> RP437	Wildtyp-Referenzstamm für Chemotaxis; F ₋ <i>thr-1</i> <i>leuB6</i> <i>his-4</i> <i>metF159</i> <i>thi-1</i> <i>ara-14</i> <i>lacY1</i> <i>mtl-1</i> <i>xyl-5</i> <i>rpsL136</i> <i>tonA31</i> <i>tsx-78</i> <i>eda-50</i>	Parkinson und Houts, 1982
<i>E. coli</i> BT3312	<i>E. coli</i> RP437 <i>aer</i> ⁻ <i>tsr</i> ⁻	Repik <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i> BT3388	<i>E. coli</i> RP437 <i>aer</i> ⁻ <i>tsr</i> ⁻ <i>tar</i> ⁻ <i>trg</i> ⁻ <i>tap</i> ⁻	Yu <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> RP437 pTrc99a	<i>E. coli</i> RP437 + pTrc99a	diese Arbeit
<i>E. coli</i> RP437 TlpC	<i>E. coli</i> RP437 + pCJ328	diese Arbeit
<i>E. coli</i> RP437 TlpA	<i>E. coli</i> RP437 + pCJ330	diese Arbeit
<i>E. coli</i> RP437 TlpB	<i>E. coli</i> RP437 + pCJ332	diese Arbeit
<i>E. coli</i> RP437 TlpD	<i>E. coli</i> RP437 + pCJ401	diese Arbeit
<i>E. coli</i> RP437 TlpA-Aer	<i>E. coli</i> RP437 + pCJ510	diese Arbeit
<i>E. coli</i> RP3312 pTrc99a	<i>E. coli</i> RP3312 + pTrc99a	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BT3312 TlpC	<i>E. coli</i> RP3312 + pCJ328	diese Arbeit

<i>E. coli</i> BT3312 TlpA	<i>E. coli</i> RP3312 + pCJ330	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BT3312 TlpB	<i>E. coli</i> RP3312 + pCJ332	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BT3312 TlpD	<i>E. coli</i> RP3312 + pCJ401	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BT3312 TlpA-Aer	<i>E. coli</i> RP3312 + pCJ510	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BT3388 pTrc99a	<i>E. coli</i> BT3388 + pTrc99a	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BT3388 TlpC	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ328	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpC*	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ329	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpA	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ330	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpA*	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ331	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpB	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ332	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpB*	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ333	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpD	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ401	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpD*	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ402	C. Josenhans, unveröffentlicht
<i>E. coli</i> BT3388 TlpA-Aer	<i>E. coli</i> BT3388 + pCJ510	diese Arbeit

6 Methoden

6.1 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte in Luria-Bertani-Flüssigmedium (Sambrook und Russell, 2004), dem zur Herstellung fester Nährmedien vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar (Oxoid, Wesel) beigefügt wurde.

Luria-Bertani Broth (LB; Oxoid)

Bacto-Trypton 10 g
Hefeextrakt 5 g
NaCl 5g
H₂O bidest. ad. 1.000 ml

Die Indikatorplatten zur Selektion rekombinanter Klone enthielten zusätzlich 2,5 mM Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG) und 0,5 mg/l 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal).

6.2 Anzucht von *H. pylori*

Die Anzucht von *H. pylori* erfolgte auf Blutagarplatten (Oxoid, Wesel), 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) zugesetzt wurden. Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte durch den weiteren Zusatz von Kanamycin (20 mg/l), Chloramphenicol (10 mg/l) oder beidem. *H. pylori* wurde bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen in Kammern eines Scholzen[®]-Brutschrankes, denen ein definiertes Gasgemisch (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) zugeführt wurde bebrütet. Aus auf Eis aufgetauten Einfrierkulturen wurden 50 μ l bis 70 μ l 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 (Oxoid, Wesel) verwendet, dem 10% (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Biochrom AG, Berlin), Hefeextrakt (2,5 g/l [w/v]) sowie die o.g. Antibiotika für die Routinekultivierung zugesetzt wurden. Das Medium wurde mit ca. 20 h auf Platten vorkultivierten Bakterienzellen in einer OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert (OD₆₀₀ von 1 entspricht ca. 3×10^8 *H. pylori* Zellen/ml). Die Kultivierung erfolgte in einem geeigneten Gefäß (leicht angedrehtes Falconröhrchen für ein Kulturvolumen von 10 ml, bzw. Erlenmeyerkolben mit Deckel aus Alufolie für ein Kulturvolumen von 40 ml). Die

Gefäße wurden mit einem Anaerocultbeutel (8-10% CO₂, 5-7% O₂; Merck, Darmstadt) in Anaerobentöpfen (Oxoid, Wesel) fixiert und bei 37°C und 175 rpm geschüttelt.

Zur Herstellung von Motilitätsplatten wurden Brucella-Medium (Oxoid, Wesel) (2,8 g pro 100 ml) mit 0,25 g Bacto-Agar verfestigt und nach dem Autoklavieren 10% (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Biochrom AG, Berlin) sowie die o.g. Antibiotika zugesetzt.

6.3 Methoden zur DNA-Präparation

6.3.1 Präparation genomischer DNA mittels des Qiagen-QiaAmp-Kits

Für die Extraktion genomischer DNA aus *H. pylori* wurde ca. eine Impföse Bakterienmaterial von einer Platte abgenommen und in die vom Hersteller empfohlener Menge ATL-Puffer überführt. Die weitere Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 200 µl EB-Puffer. Die erhaltene DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

6.3.2 Präparation von Plasmiden mittels des Qiagen-QiaPrep-Kits

Zur Isolation von bis zu 20 µg Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Bakterien aus 1,4 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation in einer Minizentrifuge sedimentiert (1-15PK, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz; 21912 x g, 10 min). Das Sediment wurde in 500 µl P1-Puffer resuspendiert. Die weitere Präparation erfolgte mit dem Qiaprep[®]-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Das erhaltene Eluat mit Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

6.3.3 Präparation von Plasmiden mittels des Qiagen-Plasmid-Midi-Kits

Die Gewinnung größerer und reinerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli*, z.B. für Transformationen und zur Dauerkonservierung, erfolgte mit Hilfe des Qiagen-Plasmid-Midi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde zunächst mit Bakterien vom Festmedium eine LB-Flüssig-Vorkultur mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angeimpft. Aus der Übernachtskultur bei 37°C wurde am nächsten Tag die Hauptkultur in einem Volumen von 70 ml angeimpft. Aus der resultierenden stationären Übernachtskultur wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 15 min bei 5.000 x g und 4°C (4-K15, Sigma, Osterode am Harz) für die anschließende Plasmidisolierung gewonnen.

6.3.4 Präparation von linearen DNA-Fragmenten mit Hilfe des Qiagen-QiaSpin-Kits

Um DNA aus enzymatischen Reaktionen zu entsalzen und von vorhandenen Proteinen zu trennen, sowie um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe voneinander zu separieren, wurden verschiedene kommerzielle Systeme verwendet. Zur Entsalzung und Reinigung von DNA von Protein und einzelnen dNTPs wurde das Qiagen-PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Trennung von verschiedenen DNA-Fragmenten aus einem Gemisch erfolgte zunächst eine Agarosegelelektrophorese mit *low-melting*-Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt, um das spätere Schmelzen der Agarose und die Freisetzung der DNA zu erleichtern. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid wurden Fragmente der passenden Größe auf einem UV-Tisch ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die weitere Präparation erfolgte mit dem Qiagen-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers.

6.4 Amplifikation von DNA mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine PCR (Mullis und Faloona, 1987; Higuchi *et al.*, 1988) durchgeführt. Bei dieser lagern sich Oligodesoxynukleotide (MWG Biotech, Freiburg) an nach Hitzedenaturierung einzelsträngig vorliegende DNA an. Eine thermostabile DNA-Polymerase dient durch Einbau von Desoxynukleotiden der Amplifikation eines entsprechenden komplementären DNA-Stranges und führt somit zur Vervielfältigung der DNA.

Die Standard-PCR beispielsweise zur genetischen Analyse konstruierter Mutanten wurde mit der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Wurden die PCR-Produkte anschließend in weiteren Reaktionen verwendet (z.B. Klonierung) wurde für die PCR das Expand-High-Fidelity-PCR-System (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Dieser kommerziell erhältliche Enzym-Mix besteht aus *Taq*-DNA-Polymerase und *Tgo*-DNA-Polymerase. 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. Als Matrize wurden, soweit nicht anders angegeben ca. 10 ng chromosomale DNA bzw. 0,1 pg Plasmid-DNA in den Reaktionsansatz gegeben. Die Konzentration an Oligodesoxynukleotiden betrug 0,2 pmol/μl, die der dNTPs 0,32 pg/μl. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug für analytische PCR-Reaktionen 25 μl, für Reaktionsansätze zur Synthese von DNA-Abschnitten, welche noch in weiteren Experimenten (z.B. Klonierung) eingesetzt wurden 50 μl. Die Anlagerungstemperatur der Oligodesoxynukleotide wurde mit

der Formel $(2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)) - 5$ berechnet (A, T, C, G stehen hierbei für die Nukleotide Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin). Pro 1 kB zu amplifizierender DNA wurde 1 min Elongationszeit angesetzt. Die Zyklenanzahl betrug 25 bis 30. Die Denaturierung der DNA-Doppelstränge erfolgte bei 95°C, die Amplifikation des neuen DNA-Stranges erfolgte bei 72°C bzw. bei 68°C. Die PCR wurde in einem T3 Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft und bei -20°C gelagert.

6.5 DNA-Modifikation

Sowohl für die Analyse als auch für bestimmte Reaktionen war es notwendig, DNA-Fragmente zu modifizieren. Durchgeführte Modifikationen waren Ligation, Restriktionsverdau, sowie das Abspalten und Anfügen einer 5'-Phosphatgruppe an den DNA-Strang.

6.5.1 Restriktionsverdau

Zum Erzeugen von Restriktionsspaltstellen wurde DNA in Abhängigkeit von Menge und Enzym (NEB, Frankfurt am Main; Invitrogen, Karlsruhe) im mitgelieferten Puffer für 2-6 h bei der für das Enzym angegebenen Temperatur (i.d.R. 37°C) verdaut. Für den Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurde ein Puffer gewählt, der beiden Enzymen eine höchstmögliche Aktivität erlaubt (nach Angaben des Herstellers). In den Ansätzen wurde niemals mehr als 10% (v/v) an Restriktionsendonuklease, bezogen auf das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes verwendet, da ansonsten die Gefahr von unspezifischer Enzymaktivität bestand. Die Spaltungsreaktion wurde bei hitzelabilen Enzymen durch Hitzeinaktivierung beendet. Vektorielle DNA wurde zusätzlich mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Sollte die DNA für Klonierungszwecke verwendet werden, erfolgte eine Reinigung der DNA durch ein kommerzielles System (PCR-Purification-Kit, Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers.

6.5.2 Dephosphorylierung

Um im Rahmen einer Klonierung eine Religation des Vektors ohne Insert zu verhindern, wurden die 5'-Phosphate des vektoriellen DNA-Fragmentes enzymatisch entfernt. Dazu wurde nach erfolgtem Restriktionsverdau 1 U alkalischer Phosphatase (*caly intestine alkaline phosphatase*, NEB, Frankfurt am Main) zugegeben und der Reaktionsansatz für 30 Minuten

bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Hitzedenaturierung (15 min, 75°C) abgestoppt.

6.5.3 Phosphorylierung

Um ein PCR-Produkt mittels Ligation zu zirkularisieren, ist es notwendig die 5'-Enden des DNA-Fragmentes zu phosphorylieren, da die kommerziell erworbenen Oligodesoxynukleotide, welche für die PCR-Reaktion als Oligodesoxynukleotide eingesetzt wurden kein 5'-Phosphat tragen. Dazu wurde das DNA-Fragment mit 1 µl T4-Polynukleotidkinase (NEB, Bad Schwalbach) für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Hilfe des Qiagen-QiaSpin-Kits gereinigt und anschließend in der Ligation eingesetzt.

6.5.4 Ligation

Zur Erzeugung von Plasmiden mit der für die Klonierung gewählten DNA wurde entsprechend verdaut und gereinigte vektorielle DNA durch DNA-Ligase mit dem gewünschten DNA-Fragment verbunden. Für diese Reaktion wurden die vorbereitete vektorielle und die Insert-DNA in einem Mengenverhältnis von ca. 1:3 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte nach Zugabe von 2x-Quickligase-Puffer und 2.000 U T4-DNA-Ligase unter Verwendung des Quick-Ligation™-Kit (NEB, Frankfurt am Main) für 5 min bei RT. Die DNA konnte anschließend direkt für die Transformation eingesetzt werden.

6.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) mit Hilfe eines ABI 3130xl Genetic Analyzer-Kapillarsequenzierapparat (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Analyse der erhaltenen Sequenzen wurde mit der Software BioNumerics durchgeführt (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien). Für eine Sequenzierungsreaktion wurden ca. 0,1 µg PCR-Produkt bzw. 1 µg Plasmid DNA in einem Ansatz von 10 µl Gesamtvolumen verwendet.

Ansatz für eine Sequenzierungsreaktion

0,1 – 1 µg DNA
2 µl Sequenzierungspuffer
2 µl Oligodesoxynukleotid (4 pmol/µl)
1 µl Big Dye v1.1 (ABI, Weiterstadt)
ad H₂O (HPLC-gereinigt) 10 µl

Aufreinigung der Sequenzierreaktion

Um eine Auswertung der Sequenzierungsreaktion mittels des Kapillarsequenzierers zu ermöglichen wurde die Sequenzierungsansätze von u. a. überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit Sephadex-Platten. Dazu wurde die benötigte Anzahl an Kavitäten mit Hilfe des *column loader* mit der entsprechenden Menge Sephadex™ G-50 Fine (DNA Grade; Amersham Bioscience Biotech, Freiburg) und 300 µl H₂O befüllt. Um ein Quellen der Matrix zu ermöglichen wurde die Platte für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde zentrifugiert (5 min, 900 × g), der Durchfluss verworfen und anschließend jede Kavität mit 200 µl H₂O befüllt und die Platte erneut zentrifugiert (5 min, 900 × g). Das Sequenzierprodukt wurde auf die Oberfläche der Sephadex-Matrix gegeben und die Platte abermals zentrifugiert (3 min, 900 × g). Das Eluat wurde in Greiner Mikrotiterplatten mit V-Boden aufgefangen und anschließend in einer Verdünnung von 1:6 (5 µl aufgereinigtes Sequenzierprodukt + 25 µl H₂O) im Kapillarsequenzierer analysiert.

6.7 Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen Untersuchung der Amplifikation von DNA-Fragmenten und des Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Es wurden je nach Bedarf Gele mit einem Volumen von 40 bzw. 100 ml verwendet. Dazu wurde ein Gemisch aus TAE-Puffer und 1% bzw. 2% w/v Agarose durch kurzes Aufkochen homogenisiert und in eine Gelkammer mit Taschenformer gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Geltaschen wurden mit einer geeigneten Menge an DNA-Lösung befüllt. Um eine Fragmentgrößenabschätzung zu ermöglichen, wurde zusätzlich ein Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophoresedauer betrug ca. 1,5 h bei einer Feldstärke von etwa 5 V/cm. Anhand des Farbmarkers im Auftragspuffer wurde der Gellauf optisch verfolgt. Die Nukleinsäurefragmente wurden als Ethidiumbromid-Interkalationsverbindung angefärbt und mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

6.8 Konstruktion von Plasmiden zur Knock-out-Mutagenese von *H. pylori*

Zur Herstellung von Knock-out Mutanten in *H. pylori* (siehe Abschnitt 6.12) wurden geeignete Plasmide konstruiert. Alle verwendeten Oligodesoxynukleotide zur Konstruktion der Plasmide in Tabelle 9 sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Das zu mutagenisierende Gen wurde in einen Vektor ohne Replikationsursprung für *H. pylori* kloniert und anschließend durch eine Resistenzkassette unterbrochen. Das Gen wurde hierfür aus genomischer DNA des Stammes *H. pylori* KE26695 mit Hilfe geeigneter Oligodesoxynukleotide mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Die Oligodesoxynukleotide wurden so konstruiert, dass an die Enden des Fragments eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym angehängt wurde. Das PCR-Fragment und der gewählte Vektor wurden mit einem Restriktionsenzym verdaut und die Fragmente anschließend mit einander ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mittels inverser PCR amplifiziert, das resultierende Fragment und die gewählte Resistenzkassette mit Restriktionsenzymen verdaut und mit einander ligiert. Die Resistenzkassette wurde dafür jeweils aus den Plasmiden pILL600 (Kanamycin) bzw. pBHpc8 (Chloramphenicol) ausgeschnitten. Die Restriktionsenzyme wurden jeweils so gewählt, dass mit einander zu ligierende Fragmente kompatible Enden erhielten. Für Konstruktion der Plasmide pSUS131 und pSUS255 musste keine inverse PCR durchgeführt werden. Die Resistenzkassette wurde direkt in eine geeignete natürliche Restriktionsschnittstelle innerhalb des Gens eingefügt (*Pst*I bzw. *Bam*HI). Die Resistenzkassette wurde jeweils N-terminal in das zu mutagenisierende Gen eingefügt, um einen möglichst großen Teil des Gens zu zerstören.

6.9 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Expressionsplasmiden hergestellt. Deren Konstruktion ist hier kurz dargestellt.

pCJ522, pCJ523 – *H. pylori*-Plasmid zur Expression von TlpD-V5

Zur Komplementation wurde das Gen *tlpD* und sein mutmaßlicher Promotor an einen V5-tag (GKPIPPLLGLDST) mit einem *linker* (GGSSAAG) (Cantwell *et al.*, 2003) fusioniert und in den *E. coli*/*H. pylori*-Shuttle-Vektor kloniert.

Der Vektor pEF6-V5 (Invitrogen) wurde dazu invers amplifiziert. Die Oligodesoxynukleotide (OLpEF6_R, OLV5_F) wurden so gewählt, dass sie die letzten fünf Aminosäuren des 7-aa-*linker* an das 5'-Ende des kodierten V5-tag anhängen. Das PCR-Produkt wurde mit *Bgl*II verdaut und mit dem *Bam*HI verdauten PCR-Produkt des *tlpD*-Gens ligiert. Das Gen *tlpD* wurde zuvor aus genomischer DNA des Stammes *H. pylori* KE26695 amplifiziert. Die verwendeten Oligodesoxynukleotide (OLHP0599_V5_F, OLH0599_V5_R) wurden so gewählt, dass sie die ersten zwei Aminosäuren des 7-aa-*linker* an das 3'-Ende des Gens fusionierten. Das erhaltene Plasmid wurde pCJ520 benannt und die korrekte Fusion mittels PCR und Sequenzierung überprüft. Das Gen inklusive des fusionierten V5-tag wurde nun ausgehend von dem Plasmid pCJ520 mit den Oligodesoxynukleotiden

OLHP0599_V5_F und OLV5_R amplifiziert, mit *Bam*HI verdaut und in den ebenfalls *Bam*HI verdauten Vektor pHel2 bzw. pHel3 kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden als pCJ522 bzw. pCJ523 benannt.

pCJ545 *H. pylori*-Plasmid zur Expression von TlpD-His₆

Zur Expression und möglichen Reinigung von TlpD wurde das Gen *tlpD* und sein mutmaßlicher Promotor an einen His₆-tag mit einem *linker* (GGSSAAG) (Cantwell *et al.*, 2003) fusioniert und in den *E. coli/H. pylori*-Shuttle-Vektor kloniert. Dazu wurde das Plasmid pCJ522 mit den Oligodesoxynukleotiden pCJ522_His_fw und pCJ522_His-rev2 invers amplifiziert. Die Oligodesoxynukleotide wurden so gewählt, dass das Plasmid komplett erhalten blieb. Lediglich die Sequenz des V5-tag wurde durch die des His₆-tag ersetzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels einer Selbstligation zirkularisiert. Dazu wurde das PCR-Produkt zuvor phosphoryliert, da die verwendeten Oligodesoxynukleotide kein 5'-Phosphat trugen (siehe Abschnitt 6.5). Das erhaltene Plasmid wurde als pCJ545 benannt.

pCJ510 – *E. coli*-Plasmid zur Synthese des Hybridsensors TlpA-Aer

Zur Analyse des Sensors TlpA aus *H. pylori* in *E. coli* (siehe Abschnitt 6.24) wurde ein Hybridsensor aus *H. pylori*-TlpA und *E. coli*-Aer konstruiert. Dazu wurde die Signalwahrnehmungsdomäne von TlpA an die Signalübertragungsdomäne von Aer fusioniert, da die C-terminale Domäne des spezieseigenen Sensors möglicherweise besser mit dem Rest des Chemotaxisapparates interagiert, als die Signalübertragungsdomäne des speziessfremden Sensors TlpA. Zur Konstruktion des Plasmids, welches den Hybridsensors kodiert, wurde der C-terminale Bereich des Sensors TlpA aus dem Plasmid pCJ330 mit Hilfe einer PCR entfernt und durch den C-terminalen Bereich des Sensors Aer ersetzt. Dazu wurde das Plasmid pCJ330 mit den Oligodesoxynukleotiden OLHP0099_NotI_F und OLpTrc_NcoI_F invers amplifiziert und mit *NotI* verdaut. Der C-terminale Bereich des Sensors Aer wurde mittels PCR mit den Oligodesoxynukleotiden OLHPEcoAer_EaeI_F und OLpTrc99a_MCS2 amplifiziert, ebenfalls verdaut (*EaeI*) und mit dem zuvor präparierten, invers amplifizierten Plasmid ligiert. Das erhaltene Fusionskonstrukt enthält die N-terminalen 985 Basenpaare des Sensors TlpA und die 888 C-terminalen Basenpaare des Sensors Aer.

6.10 Transformation von *H. pylori*

Für die Transformation wurden 20 h auf Festmedium gewachsene Bakterien in einem Kreis auf Blutplatten ausgestrichen und für ca. 2 bis 4 h bei 37°C im Brutschrank der Firma Scholzen® bei geeigneter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden 1 µg der Plasmid-DNA auf die Bakterien getropft. Aufgrund seiner natürlichen Kompetenz wird die DNA von

H. pylori aufgenommen (Nedenskov-Sorensen *et al.*, 1990). Nach einer weiteren Inkubation für 16 bis 20 h wurden die Bakterien abgenommen und auf Selektivmedium ausgestrichen. Die erhaltenen Transformanten wurden weiter kultiviert und mit einer PCR und gegebenenfalls mittels Sequenzierung genetisch analysiert.

6.11 Transformation von *E. coli*

6.11.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Für die Transformation von *E. coli* wurden zunächst kompetente Zellen hergestellt, da *E. coli* im Gegensatz zu *H. pylori* keine natürliche Kompetenz aufweist. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit einer stationären Übernachtkultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes inokuliert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur in 50-ml-Kunststoff-Schraubdeckelröhrchen (Greiner BIO-ONE, Frickenhausen) überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 3500 x *g*, 4K15, Sigma, Osterode am Harz) wurde der Überstand verworfen und die Bakterien in 20 ml TFB I pro 100 ml Kultur resuspendiert und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 3500 x *g*, 4K15, Sigma, Osterode am Harz) wurden die Bakterien in 3 ml TFB II resuspendiert und nach einer Inkubation von 30 min auf Eis aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Verwendete Puffer:

TFB I (4°C):

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4H₂O
30 mM KAc
10 mM CaCl₂
15% v/v Glycerin
ad 50 ml HPLC- Wasser

TFB II (4°C):

10 mM MOPS pH 7,0
pH mit NaOH einstellen
10mM RbCl
75 mM CaCl₂
15% v/v Glycerin
ad 50 ml HPLC- Wasser

pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen

6.11.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit ca. 1µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz vorsichtig vermischt. Der Transformationsansatz wurde zunächst 30 Minuten auf Eis, dann für 90 Sekunden bei 42°C und anschließend noch einmal für 90 Sekunden auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl sterilem LB-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert und die Bakterien

anschließend auf Selektivmedium plattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die weitere Analyse der Transformanten erfolgte mit molekularbiologischen Mitteln entsprechend der Fragestellung.

6.12 Herstellung von Knock-out-Mutanten in *H. pylori*

6.12.1 Herstellung von resistenzmarkierten Einzel- und Doppel-Knock-out-Mutanten in *H. pylori*

Zur Herstellung von Knock-out-Mutanten in *H. pylori* wurde eine allelische Austauschmutagenese durchgeführt. Dazu wurde das zu mutagenisierende Gen in einen Vektor, welcher in *H. pylori* nicht replizieren kann (z.B. pUC18, pILL570) kloniert. Anschließend wird N-terminal in das Gen eine Resistenzkassette durch erneute Klonierung eingefügt und es damit unterbrochen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Resistenzkassette beidseitig von mindestens 500 bp des zu mutagenisierenden Gens flankiert wird. Wird *H. pylori* nun mit dem erhaltenen Plasmid transformiert, findet eine homologe Rekombination statt. Das unterbrochene Gen im Plasmid rekombiniert mit dem intakten Gen im Genom und ersetzt es (Abbildung 7). Auf Grund der Resistenzkassette wird eine Selektion mit dem entsprechenden Antibiotika ermöglicht. Da uns zwei Resistenzkassetten (Km^R , Cm^R) zu Verfügung standen, konnten auf diese Weise Einzel- und Doppel-Knockout-Mutanten hergestellt werden. Für die Herstellung einer Doppelmutante wurde die konstruierte Einfachmutante in einem zweiten Mutageneseschritt mit einem weiteren Plasmid, welches die zweite Resistenzkassette trägt, transformiert. Die Selektion erfolgte anschließend mit beiden Antibiotika (Chloramphenicol, Kanamycin). Alle erhaltenen Klone wurde genetisch mittels PCR überprüft und sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch auf morphologische Auffälligkeiten hin untersucht. Alle Mutanten sind inklusive ihrer Vorstufen und der zu ihrer Mutagenese verwendeten Plasmide in Tabelle 10 angegeben.

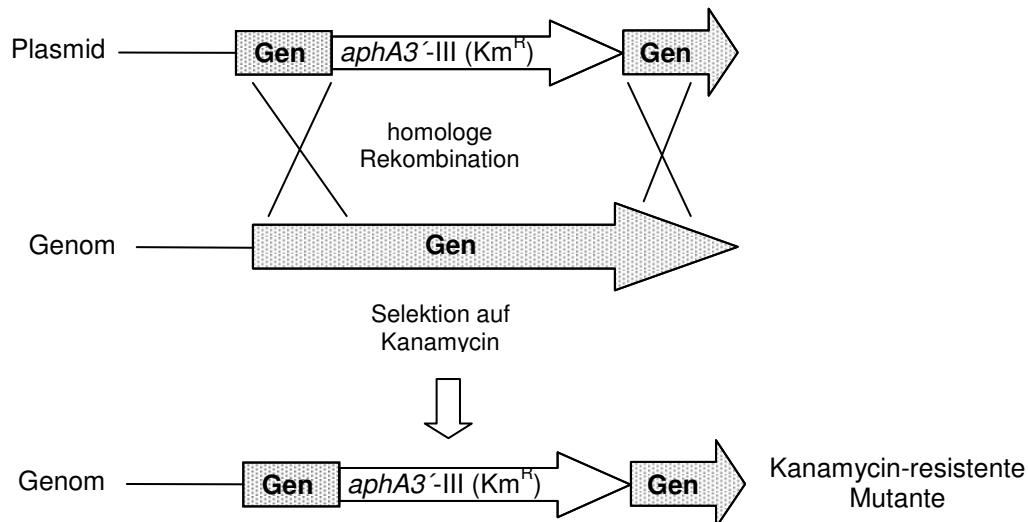


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer allelischen Austauschmutagenese mit Resistenzmarkierung. Beispielhaft wurde in dieser Abbildung eine Kanamycinresistenz gewählt

6.12.2 Herstellung multipler Knock-out-Mutanten in *H. pylori*

Für Herstellung von multiplen Knock-out-Mutanten war es notwendig, ein bzw. zwei Gene ohne Resistenzmarker zu mutagenisieren, da nur zwei Antibiotikaresistenzen zur Selektion für Verfügung standen. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die *aphA3'-III-sacB*-Mutagenese verwendet (Copass *et al.*, 1997), welche durch eine Gegenselektion mit Saccharose die Herstellung unmarkierter Mutanten in zwei Mutageneseschritten ermöglicht. Das zu mutagenisierende Gen wird in einem ersten Mutageneseschritt durch eine *aphA3'-III-sacB*-Kassette unterbrochen. Diese Kassette besteht aus einem Gen, welches für eine Kanamycinresistenz kodiert (*aphA3'-III*), sowie dem Gen *sacB* aus *B. subtilis*, welches für die Levansucrase kodiert. Das Gen *sacB* stand im vorliegenden Konstrukt unter der Kontrolle des *flaA*-Promotors aus *H. pylori*. Die Levansucrase bewirkt, unter Zugabe von Saccharose zum Medium ein Absterben der Bakterien, da diese die entstehenden langkettigen Levane nicht abbauen können. Im ersten Schritt entsteht eine kanamycinresistente, Saccharose-sensitive Mutante. Im zweiten Schritt wurde diese dann mit einem Plasmid, welche lediglich das zu mutagenisierende Gen mit einer Deletion enthält, transformiert und auf Saccharose selektiert. Die resultierenden Mutanten sind Kanamycin-sensitiv und Saccharose-resistent (Abbildung 8). Für die Herstellung einer Dreifachmutante wurden zwei weitere Gene mit einer Kanamycin- bzw. einer Chloramphenicolresistenzkassette mutagenisiert. Für die Herstellung einer Vierfachmutante wurden zuerst zwei Gene mittels der beschriebenen Methode unmarkiert mutagenisiert und anschließend zwei weitere Gene mittels der zur Verfügung stehenden Resistenzmarker ausgeschaltet. Alle erhaltenen Mutanten wurden mittels PCR und gegebenenfalls mittels Sequenzierung charakterisiert und anschließend mittels Licht- und Elektronenmikroskopie auf morphologische Auffälligkeiten hin untersucht.

Im vorliegenden Fall wurden mit dieser Methode Dreifach- und eine Vierfachmutanten in den Genen der Sensoren TlpA, TlpB, TlpC und TlpD hergestellt. Dafür wurden die Gene *tlpB* bzw. *tlpC* unmarkiert mutagenisiert. Um eventuell auftretende regulatorische Effekte zu vermeiden, wurde jeweils nur ein kleiner Teil Gens (517 bp bzw. 509 bp, Tabelle 10) deletiert und dadurch das Leseraster verschoben. Alle Mutanten sind inklusive ihrer Vorstufen und der zu ihrer Mutagenese verwendeten Plasmide in Tabelle 10 angegeben.

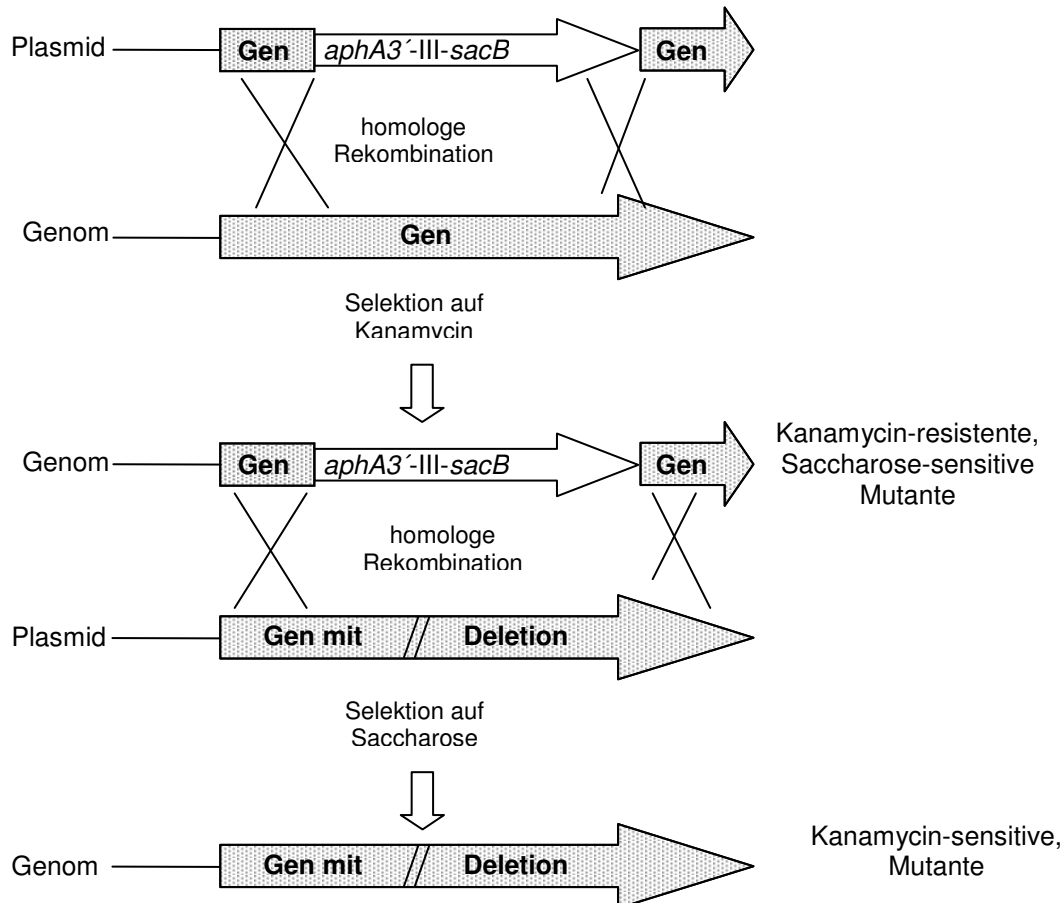


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer allelischen Austauschmutagenese zur Herstellung unmarkierter Mutanten

Alle hergestellten Mutanten und Zwischenstufen sind in Tabelle 10 zu sehen. Für die Mehrfachmutanten sind die jeweiligen Vorstufen der Tabelle zu entnehmen.

6.13 Bestimmung des Proteingehalts einer Probe

Der Gesamtproteingehalts einer Probe wurde mittels des Bicinchoninsäure-Protein-Assay-Reagenz (BCA-Assay; Pierce Biotechnology, Illinois, U.S.A.) in 96-Well-Mikrotiterplatten (PS, Greiner BIO ONE, Frickenhausen) ermittelt. Zu 10 µl der Probe in geeigneter Verdünnung wurden 200 µl einer Mischung der Reagenzien A und B (Verhältnis 50:1) gegeben und mit dieser vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 50 °C wurde die Extinktion bei 562 nm in

einem Plattenphotometer gemessen (Titertek Multiskan MCC/340, Flow Laboratories, Meckenheim) und die Proteinkonzentration mittels einer BSA-Kalibriergerade bestimmt.

6.14 Präparation einzelner *H. pylori*-Fraktionen

Zur Trennung lysierter *H. pylori*-Zellen in ihre lösliche und unlösliche Fraktion wurden für ca. 20 h auf Blutagarplatten kultivierte Zellen in einem geeigneten Volumen 0,9% NaCl aufgenommen und mittels Zentrifugation (4K-15, Sigma, Osterode am Harz, 2795 x *g*, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in einem geeigneten Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels Ultraschall bei einer Intensität von 120 W (Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, U.S.A.) für 10 min. Die vollständige Lyse der Bakterien wurde mikroskopisch kontrolliert und das Lysat zentrifugiert (4-K15, Sigma, Osterode am Harz, 9055 x *g*, 4°C, 30 min). Das Sediment wurde im Folgenden als unlösliche Fraktion angesehen, der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (4-K15, Sigma, Osterode am Harz, 9055 x *g*, 4°C, 30 min) und der erhaltene Überstand als lösliche Fraktion angesehen.

6.15 SDS-PAGE

Zur Trennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes im Rahmen ihrer weiteren Analyse wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden die Glasplatten entsprechend der Angaben des Herstellers montiert und in den Gießstand eingespannt. Das Trenngel (10,6% Acrylamid) wurde gegossen (Zusammensetzung siehe unten) und mit Wasser überschichtet. Nach ca. 20-minütiger Polymerisationszeit wurde das Wasser abgeschüttet, das Sammelgel (3% Acrylamid) gegossen und mit einem Probenkamm geeignete Taschen geformt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel aus dem Gießstand entnommen, in die Elektrophoresekammern eingespannt und die Kammer mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden in 5×-Probenpuffer mit SDS aufgenommen und für 5 min bei 100°C denaturiert und nachdem sie wiederabgekühlt waren, auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 25 mA für einen dem Molekulargewicht des Proteins von Interesse entsprechenden Zeitraum. Die Proteine konnten mit Coomassie (Roth) im Gel angefärbt und so sichtbar gemacht werden oder mittels eines Immunoblot weiter untersucht werden. Zur dauerhaften Konservierung wurden die Gele in Einpacklösung getränkt und in ebenfalls mit Einpacklösung getränkter Zellofanfolie getrocknet.

Verwendete Puffer:

4x-Trenngelpuffer
 182 g Tris
 4 g SDS
 ad 1.000 ml ddH₂O, pH 8,8

4x-Sammelgelpuffer
 60 g Tris
 4 g SDS
 ad 1.000 ml ddH₂O, pH 6,8

10x-Laufpuffer (Laemmli, 1970, modifiziert)
 30 g Tris
 141 g Glycin
 10 g SDS
 ad 1.000 ml ddH₂O, pH 8,6

5x-Probenpuffer
 50 mM Tris-HCl, pH 6,8
 2% (w/v) SDS
 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol
 0,005% (w/v) Bromphenolblau
 10% (v/v) Glycerin

Einpacklösung
 50% (v/v) Ethanol
 3% Glycerin
 ad ddH₂O

Zusammensetzung der Trenn- (10,6% Acrylamid) und Sammelgele (3% Acrylamid):

	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid (Roth) [ml]	3,2	0,5
2 M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	2,35	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]		1,25
H ₂ O bidest [ml]	3,5	3,15
Ammoniumpersulfat 10% (w/v) [µl]	30	30
TEMED [µl]	25	20
SDS 10 % (w/v) [µl]	230	50

6.16 Westernblot-Analysen

Für eine weitere Analyse der Proteine wurden die zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und mittels spezifischer Antikörper detektiert. Der Transfer der Proteine erfolgte im sogenannten *semi-dry*-Verfahren. Dazu wurden Filterpapiere (Whatman) sowie eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher und Schuell) mit Towbin-Puffer (Towbin *et al.*, 1979) getränkt und anschließend in folgender Reihenfolge auf die Anode der Transferapparatur (Keutz, Reiskirchen) gelegt: Filterpapier,

Nitrocellulose-Membran, SDS-Gel, Filterpapier. Der Transfer erfolgte bei 35 mA pro Gel für ca. 2 h.

Das Gel konnte anschließend mit Coomassie (Roth) angefärbt werden und so der Transfer der Proteine auf die Membran überprüft werden. Die Membran wurde für 1 h in TBS-T (siehe unten), welches 5% (w/v) Milchpulver enthielt, unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran für ca. 16 h bei 4 °C mit dem spezifischen Antikörper in geeigneter Verdünnung (in TBS-T mit 5% Milchpulver) inkubiert. Zur Beseitigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran dreimal für 20 min bei Raumtemperatur mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper in geeigneter Verdünnung in TBS-T mit 5% Milchpulver zugegeben und die Membran für 90 Minuten inkubiert. Die unspezifischen Bindungen wurden erneut durch dreimaliges Waschen für 20 min bei Raumtemperatur mit TBS-T entfernt.

Durch die Kopplung des Sekundärantikörpers mit der Meerrettichperoxidase konnten die Proteine nun mit Hilfe des SuperSignal-WestTM-PICO-Chemilumineszenz-Substrate (Perbio Science Deutschland, Bonn) detektiert werden. Die beiden Komponenten des Substrates wurden unmittelbar vor Bedarf im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend auf die Membran gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Lumineszenz mit Hilfe eines Röntgenfilmes detektiert und dokumentiert.

Für die Hybridisierung verwendete Puffer:

10x TBS:

24,2 g Tris-Base (200 mM)
80 g NaCl (2.000 mM)
pH 7,6
ddH₂O ad 1.000 ml

TBS-T:

1 x TBS
0,1% Tween 20 (v/v)

Towbin-Puffer (Towbin et al., 1979) :

1,62 g (25 mM) Tris
7,2 g (192 mM) Glycin
100 ml Methanol
H₂O bidest. ad 500 ml

Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4 °C.

6.17 Proteinreinigung

Um den Sensor TlpD besser in Hinblick auf seine biochemischen Eigenschaften zu untersuchen, wurde das Protein aus *H. pylori* isoliert. Dazu wurden Zellen des Stammes N6 *tlpD*/TlpD-His₆ von ca. 16 Blutagarplatten in 10 ml 0,9% NaCl aufgenommen und gewaschen ($5.000 \times g$, 15 min, 4°C). Die Bakterien wurden in 10 ml Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH = 7,8) resuspendiert und mit Ultraschall bei 120 W (Branson) für 10 Minuten lysiert. Die vollständige Lyse wurde mikroskopisch kontrolliert. Um Unterschiede bezüglich einer möglichen posttranslationalen Modifikation im Hinblick auf seine Lokalisierung zu detektieren, wurde das Protein separat aus der löslichen, zytosolischen und unlöslichen, membranären Fraktion isoliert. Dazu wurde das Lysat in lösliche und unlösliche Fraktion getrennt (siehe Abschnitt 6.14). Aus der löslichen Fraktion wurde das Protein mit nicht-denaturierenden Methoden, aus der unlöslichen Fraktion mit denaturierenden Methoden isoliert.

6.17.1 Nicht-denaturierende Reinigung von TlpD aus *H. pylori*

Für die native Aufreinigung von TlpD aus der löslichen, zytosolischen Fraktion wurde der Überstand der Fraktionierung verwendet. Der Überstand wurde mit 1 ml Ni-NTA-Agarose für 1 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde zuvor zweimal mit Lysepuffer gewaschen ($5.000 \times g$, 5 min) und so äquilibriert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Suspension wurde in 1-ml-Qiagen-Polypropylen-Säulen gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Um unspezifische Bindungen zu beseitigen, wurde anschließend die Säule mit dem zehnfachen Säulenvolumen (10 ml) Lysepuffer mit 30 mM Imidazol gewaschen und der Durchfluss in 1-ml-Fractionen aufgefangen. Um weitere unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit 4 ml Lysepuffer mit 80 mM Imidazol ein weiteres Mal gewaschen und der Durchfluss erneut in 1-ml-Fractionen aufgefangen. Das gewünschte Protein wurde nun mit 6 ml Lysepuffer mit 250 mM Imidazol eluiert und der Durchfluss in 1-ml-Fractionen aufgefangen. Die einzelnen Fractionen wurden anschließend mit einer SDS-PAGE und einem Immunoblot weiter analysiert.

6.17.2 Denaturierende Reinigung von TlpD aus *H. pylori*

Für die denaturierende Aufreinigung von TlpD aus der unlöslichen Membranfraktion wurde das in der Zellfraktionierung erhaltene Sediment verwendet. Das Präzipitat wurde in 10 ml Puffer A (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-Cl; pH = 8,0) resuspendiert und mit 1 ml entsprechend gewaschener und voräquilibrierter Ni-NTA-Agarose für 1 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die

Suspension wurde auf 1-ml-Qiagen-Polypropylen-Säulen gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Die Säule wurde anschließend zweimal mit je 6 ml Puffer D und E (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-HCl; pH = 6,3 bzw. pH = 5,9) gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Der Durchfluss wurde dabei jeweils in 1-ml-Fractionen aufgefangen. Die Elution erfolgte mit 6 ml Puffer E (8 M Harnstoff; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris-Cl; pH = 4,5). Das Eluat wurde in 1-ml-Fractionen aufgefangen und gemeinsam mit den Fractionen der Waschschrirte in einer SDS-PAGE und einem Immunoblot weiter analysiert.

6.17.3 Proteinreinigung mit Hilfe einer SDS-PAGE

Um das gereinigte Protein in einem höheren Reinheitsgrad zu erhalten, wurde nach der Affinitätschromatographie eine Proteinreinigung mittels eines präparativen SDS-Gels durchgeführt. Eine präparative SDS-Gelelektrophorese ermöglicht es, Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen und ein Protein einer definierten Größe gezielt aus dem Gel wiederzugewinnen. Dazu wurde ein SDS-Gel mit den Ausmaßen 160×135×1,5 mm gegossen. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels betrug 14%, die des Sammelgels 5% (genaue Zusammensetzung siehe unten). Vor Zugabe der Polymerisationsstarter APS und TEMED wurden die Lösungen des Sammel- und Trenngels mit Hilfe einer Vakuumpumpe für mindestens 30 min entgast. Die Elutionsfraction, aus welcher das Protein von Interesse präpariert werden sollte, wurde in die Probentasche gefüllt und das Gel bei einer Stromstärke von ca. 5 mA für ca. 24 h laufen gelassen. Das Gel wurde anschließend für dreimal 10 min gewässert um das SDS aus dem Gel zu waschen und im Anschluss mit SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen; Karlsruhe) gefärbt, bis eine deutliche Bande sichtbar wurde. Die Bande der entsprechenden Größe wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gelfragment wurde zerkleinert und kurz in Lämmli-Puffer getränkt. Anschließend wurden die Gelfragmente in die Elektroelutionsapparatur (*Electro-Eluter Model* 422; Bio-Rad, München) gefüllt. Die Elution erfolgte für 3h bei 10 mA nach Herstellerangaben. Das Eluat wurde in *membran caps* für Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 15.000 kDa aufgefangen und anschließend in 400 µl Lämmli-Puffer aufgenommen. Das Protein wurde anschließend 3 mal 24 h gegen 20 mM Tris (pH = 7,4) dialysiert und in diesem Puffer bei -20°C gelagert.

Zusammensetzung der Trenn- (14% Acrylamid) und Sammelgele (5% Acrylamid):

	Trenngel	Sammelgel
30% Acrylamid (Roth) [ml]	12,8	1,1
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	7	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]		2,5
H ₂ O bidest [ml]	6,8	5,9
Ammoniumpersulfat 1% (w/v) [μ l]	710	250
TEMED [μ l]	56	20
SDS 10 % (w/v) [μ l]	560	100

6.18 Ko-Präzipitation

Zur Analyse von Protein-Proteininteraktionen wurde eine Ko-Präzipitation durchgeführt. Hierzu wurde eine Metalaffinitäts-Matrix verwendet. Die verwendete TALON-Matrix (BD Biosciences, Erembodegem) enthält immobilisierte zweiwertige Cobaltionen, welche im Stande sind, Polyhistidinanhänge von Proteinen zu binden. Das zu untersuchende Protein wurde mit einem Polyhistidinanhang versehen (siehe Abschnitt 6.9). Wird das Zelllysate nun mit der TALON-Matrix inkubiert, binden die Cobaltionen das Protein, welches den Polyhistidinanhang trägt. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung unspezifischer Bindungen verbleiben lediglich das Protein mit Polyhistidinanhang selbst sowie die potenziellen Interaktionspartner durch die Bindung an das untersuchte Protein im Ansatz. Die Proteine können nun eluiert und weiter untersucht werden. Im Einzelnen sollte die Interaktion des Proteins TlpD mit anderen *H. pylori* Proteinen analysiert werden. Hierzu wurden für ca. 20 h auf Blutagarplatten kultivierte Bakterien in RIPA-Puffer (100 mM NaCl, 25 mM Tris HCl pH=7,5, 20 mM Imidazol, 10% Glycerol, 1% Nonidet P-40) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen. Die vollständige Lyse der Bakterien wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Lysat wurde zentrifugiert ($10.000 \times g$, 20 min, 4°C), um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen, und anschließend 25 μ l TALON (BD Biosciences, Erembodegem) zugegeben. Die TALON-Matrix wurde zuvor dreimal in eiskalten PBS gewaschen ($3.000 \times g$, 1 min, 4°C). Das Gemisch wurde unter leichtem Schütteln für 2 h bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit RIPA-Puffer ohne Nonidet P-40 und zweimal mit PBS gewaschen ($3.000 \times g$, 1 min, 4°C). Das Sediment wurde in 2x-SDS-Ladepuffer resuspendiert und auf ein SDS-Gel geladen und so näher analysiert. Im beschriebenen Versuch wurde ein *H. pylori*-Stamm verwendet, welcher ein TlpD-His₆-Fusionsprotein produziert. Zum Ausschluss falschpositiver Ergebnisse wurde zusätzlich ein Kontrollstamm (*H. pylori* N6 *tlpD*), welcher kein rekombinantes Protein trägt, verwendet. Das Eluat beider Ansätze wurde auf einem SDS-Gel analysiert. Proteinbanden, welche lediglich in der Spur des *tlpD*-His₆-exprimierenden Stammes zu sehen waren, nicht

jedoch in der Spur des Kontrollansatzes, wurden als potenzielle Interaktionspartner von TlpD angesehen, aus dem Gel ausgeschnitten und in der Massenspektrometrie näher untersucht.

6.19 Immunfluoreszenz

Zur Detektion spezifischer Proteine in Bakterienzellen wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden sterile Deckgläser mit Gelatine beschichtet. Je ein Deckgläschen wurde in eine Kavität einer Zellkulturplatte (24 Kavitäten) gegeben und mit 300 µl 0,3% Gelatine in PBS überschichtet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Gelatinelösung abgenommen und die Deckgläser für ca. 2 h getrocknet. Zur Fixierung bakterieller Zellen wurden für ca. 20 h auf Blutagarplatten kultivierte *H. pylori*-Zellen in Fixierungsreagenz (2% PFA in 100 mM KPO₄) aufgenommen, photometrisch vermessen und 1×10^8 Zellen in einem Volumen von 400 µl in jede Kavität pipettiert. Die Fixierung erfolgte für 3 h bei Raumtemperatur. Der Fixierungspuffer wurde abgenommen und anschließend jede Kavität viermal für 5 min mit 0,1% Glycin in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde nun 0,1% Triton X100 zugegeben und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Permeabilisierungspuffer wurde abgenommen und jede Kavität dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden der Ansatz nun für 30 min unter leichtem Schütteln geblockt (1% BSA, 1% FCS in PBS). Anschließend wurde spezifische Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in Blockierungspuffer zugegeben und für ca. 16 h bei 4°C inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend viermal für 5 min mit 0,1% BSA in PBS gewaschen, anschließend der entsprechende Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper in geeigneter Verdünnung zugegeben und für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde viermal mit 0,1% BSA in PBS und anschließend dreimal mit PBS für je 5 Minuten gewaschen. Die Deckgläser wurden getrocknet und dann mit 10 µl Mowiol (+2,5% DABCO) auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden über Nacht getrocknet und anschließend mit Nagellack versiegelt. Unter Verwendung geeigneter Filter konnten die Präparate nun mikroskopiert werden.

6.20 *temporal assays* zur Untersuchung bakterieller Taxis

Zur Analyse des Verhaltens bakterieller Zellen über die Zeit wurden sogenannte *temporal assays* durchgeführt. In einem *temporal assay* wird das Bewegungsmuster von Bakterien in Flüssigmedium dokumentiert und Anzahl der *tumbles* bzw. *stops* als Kriterium der Signalwahrnehmung verwendet (Adler, 1975). Hierzu wurden für ca. 16 h auf Blutagarplatten

kultivierte Bakterien in geeignetem Medium resuspendiert und eine OD_{600} von 0,2 bis 0,3 eingestellt. Um die Beweglichkeit der Bakterien durch Abscheren der Flagellen nicht zu beeinträchtigen, wurde auf einen Waschschrift verzichtet. Die Bakterien wurde für ca. 20 min in CO_2 angereicherter Atmosphäre (5%) äquilibriert und anschließend in Zellkulturflaschen mit Filterdeckel mikroskopiert (Olympus IX80). Das Mikroskop war mit einer Inkubationkammer ausgestattet, die es ermöglichte eine für die Bakterien geeignete Atmosphäre zu schaffen (37°C, 5% CO_2 , 50% Luftfeuchtigkeit). Die Bewegungsmuster der Zellen wurden mit Hilfe der CellR-Software für einen Zeitraum von jeweils ca. 12 s dokumentiert. Hierzu wurde eine Serie digitaler Einzelbilder (20 pro s) aufgenommen und diese in eine digitale Filmsequenz konvertiert. Die Auswertung der bakteriellen Bewegungsmuster erfolgte mit Hilfe der Software TrackIt (Olympus SIS, Version 1.2.445) im halbautomatischen Modus. Hierzu wurde die Position der einzelnen Zellen in jedem Einzelbild manuell per Mausklick markiert. Die Software errechnet aus den so erhaltenen Informationen über die Positionen der einzelnen Zellen, sowie die komplette Wegstrecke und stellt diese grafisch dar. Die erhaltenen Daten wurden nach MSExcel exportiert und dort weiter analysiert. So wurde anhand der erhaltenen Zeit und Wegstrecke die durchschnittliche Geschwindigkeit der einzelnen Bakterien berechnet. Die Anzahl der *stops* wurde anhand der aufgenommen Filmsequenzen manuell gezählt. Für die Auswertung wurden lediglich Zellen berücksichtigt, die sich mindestens 3 Sekunden im Fokus befanden. Pro Experiment wurden mindest 20 Zellen analysiert. Für den Vergleich unterschiedlicher Experimente wurden die Mittelwerte und Standardabweichung berechnet und mit Hilfe geeigneter statistischer Tests auf signifikante Unterschiede überprüft.

Der beschriebene experimentelle Aufbau ermöglichte es, verschiedene Substanzen (z.B. metabolische Inhibitoren, Elektronendonoren) zu applizieren und so die Auswirkungen auf das Schwimmverhalten der Zellen zu analysieren (Alexandre *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden Myxothiazol, ein Inhibitor der Cytochrom-*bc_L*-Oxidase (Trumpower, 1990), sowie 2-n-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide (HQNO) (Axxora, Lausen), ein Quinonanalog und Ubiquinon-Inhibitor (Alexandre *et al.*, 2000), als Inhibitoren verwendet. Als Elektronendonator diente ein Gemisch aus N,N,N´N´-Tetra-1,4-Phenylendiamin (TMPD) (250 µM) und Ascorbat (500 µM), welches Elektronen direkt auf das Cytochrom *c* überträgt (Nagata *et al.*, 1996). Die eingesetzten Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren sind im Ergebnisteil bei dem jeweiligen Experiment angegeben (siehe Ergebnisse Abschnitt 7.2 und 7.3). Der genaue Wirkort der Inhibitoren und des Elektronendonors sind in Abbildung 9 veranschaulicht.

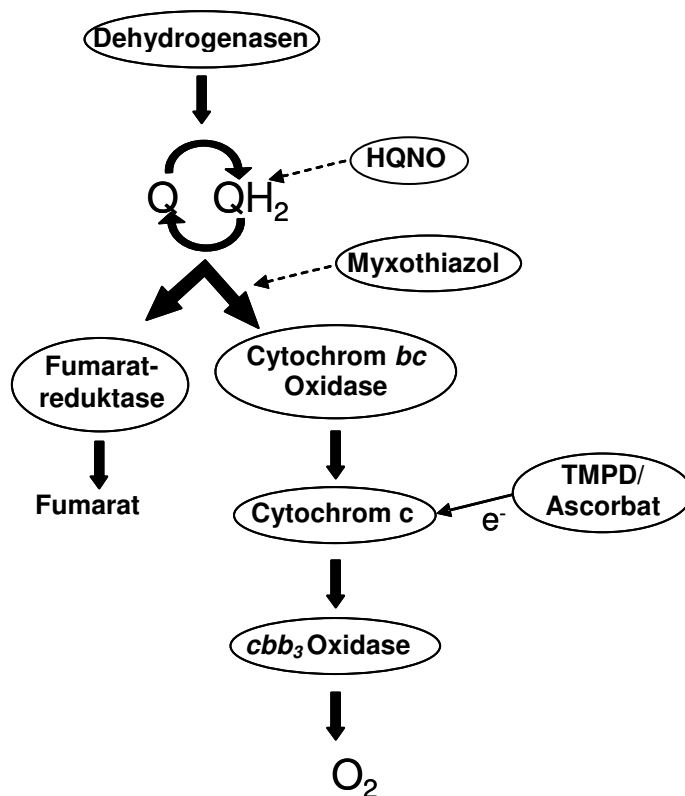


Abbildung 9: Schematischer Überblick über die Atmungskette von *H. pylori*. Es sind die jeweiligen Angriffspunkte der Inhibitoren, sowie des Elektronendonors angegeben.

6.21 *spatial assays* zur Untersuchung bakterieller Taxis

Zur weiteren Untersuchung des Verhaltens von *H. pylori* wurden so genannte räumliche Assays (*spatial assays*) durchgeführt. Dabei wird das Verhalten der Bakterien entlang eines definierten Stoffgradienten beobachtet. Der in dieser Arbeit durchgeführte Test wurde eigens für *H. pylori* etabliert, da klassische bekannte Tests wie beispielsweise der Kapillarentest (Adler, 1975) für *H. pylori* nicht geeignet waren. Hierzu wurden Chemotaxis- μ -Slides (Ibidi, Martinsried) nach Angaben des Herstellers mit geeignetem Medium befüllt. In eines der beiden Reservoirs wurden 1×10^8 Bakterien in einem Volumen von ca. 18 μ l gefüllt, in das gegenüberliegende Reservoir wurden 18 μ l (30 μ M) einer metabolisch aktiven Substanz zugegeben oder als Kontrolle das gleiche Volumen des verwendeten Mediums. Die Konzentration der Inhibitor-Stammlösung (30 μ M) wurde entsprechend der Herstellerangaben so gewählt, dass entlang der Übergangszone ein Gradient von 0 μ M bis 10 μ M entstand. Um ein Austrocknen der Kammer zu verhindern, wurden die vier Öffnungen des Systems mittels der mitgelieferten, gasdurchlässigen Deckel verschlossen. Die Kämmerchen wurde für ca. 2 h in der Klimakammer des Mikroskops inkubiert (37°C, 5% CO₂, 50% Luftfeuchtigkeit) und anschließend die Anzahl der Zellen welche von das gegenüberliegende Reservoir gewandert waren, mikroskopisch (Olympus IX80) gezählt.

Dazu wurden drei Blickfelder ($221,9 \mu\text{m} \times 167,4 \mu\text{m}$) am Rande des gegenüberliegenden Reservoirs, angrenzend zur mittleren Übergangszone, fotografiert und die Zellen anschließend manuell ausgezählt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und mittels statistischer Tests weiter analysiert.

6.22 Bestimmung des ATP-Gehalts in Bakterien

Um das Energieniveau der Zellen in Abhängigkeit von der metabolischen Aktivität zu bestimmen wurde der Gehalt an zellulärem ATP bestimmt. Hierzu wurden für ca. 20 h auf Blutagarplatten kultivierte Bakterien in geeignetem Medium resuspendiert und eine Zelldichte von 10^8 Zellen/ml und 10^7 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100 μl der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc F96 MicroWell™ White; Nunc; Darmstadt) gefüllt und für einen definierten Zeitraum mit und ohne Zugabe metabolisch aktiver Substanzen bei 37°C unter unterschiedlicher Atmosphäre inkubiert. Details über Medien, Inkubationsdauer, Atmosphären und zusätzlich applizierter Substanzen werden im Ergebnisteil bei den jeweiligen Experimenten angegeben (siehe Ergebnisse Abschnitt 7.2.2). Zur Bestimmung des ATP-Gehalts wurde das BacTiterGlo Reagenz (Promega, Mannheim) nach Herstellerangabe im Verhältnis 1:1 zu der Zellsuspension gegeben. Der Ansatz wurde für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Lumineszenz gemessen (1420 Viktor3 V). Die erhaltenen Daten wurden in MSExcel importiert und dort weiter analysiert. Mittels der gemessenen Zelldichten wurde der ATP-Gehalt pro Zelle bestimmt. Anhand eigens erstellter Kalibriergeraden für jedes verwendete Mediums wurden Umrechnungsfaktoren errechnet, um einen Vergleich verschiedener Experimente in verschiedenen Medien zu ermöglichen.

6.23 Tierversuche in der Mongolischen Rennmaus

Zur Untersuchung der biologischen Relevanz des Sensors TlpD wurden Tierversuche (AZ051067, Nds. Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Dezernat 33/Tierschutz) durchgeführt. Als Tiermodell diente das der Mongolischen Rennmaus (*Meriones unguiculatus*). Es wurden Gruppengrößen von vier bis sechs Tieren gewählt. Zum Zeitpunkt der Infektion waren die Tiere zwischen sechs und zehn Wochen alt. Die Unterbringung der Tiere fand im Zentralen Tierlabor (ZTL) der Medizinischen Hochschule Hannover statt.

6.23.1 Stuhl-Antigen-Test

Während des Infektionszeitraumes wurde der Status der Infektion mit dem Stuhl-Antigen-Test RIDASREEN® FemtoLab *H. pylori* (R-Biopharm; Darmstadt) kontrolliert. Dabei handelt es sich um einen Enzymimmunoassay. Die Detektion erfolgt mittels Peroxidase-markierter monoklonaler Antikörper. Die photometrische Messung erfolgte bei 450 nm; als Referenzwellenlänge wurden 620 nm festgelegt. Als negativ galt eine Probe mit einem Signalwert von unter 0,17. Als positiv galt eine Probe bei einer Signalstärke von größer 0,21. Im Bereich zwischen dem unteren und oberen Grenzwert, galt der Befund als nicht eindeutig. Es empfahl sich die Messung zu wiederholen. Die minimale Probenmenge für eine verlässliche Diagnose betrug nach Herstellerangabe 0,2 g. Die Proben wurden nach Herstellerangaben bearbeitet.

6.23.2 Inokulation und Sektion

Für die Inokulation wurden für ca. 16 h auf Blutplatten kultivierte Bakterien in BHI/Hefe-Medium resuspendiert und eine OD₆₀₀ von ca. 7 eingestellt (entspricht 5×10^8 Zellen pro 250 µl). Anschließend werden die Tiere mit ca. 5×10^8 Zellen in einem Volumen von 250 µl intragastral infiziert. Dazu wurden Knopfkanülen (1,20 × 60 mm; Robert Helwig GmbH, Berlin) verwendet. Die Tiere wurden ca. 16 h vor und weiter 6 h nach der Infektion gefastet. Zugang zu Trinkwasser war über die gesamte Versuchsdauer gewährleistet. Nach einem definierten Zeitraum wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation getötet, sezirt und der Magen entnommen. Aus dem Magen wurden aus Antrum (proximal zum Pylorus) und aus dem Korpus (proximal zum Ösophagus) zwei Gewebestücke entnommen. Die Gewebestücke wurden gewogen und PCR-Diagnostik sowie zur Reisolierung von *H. pylori* verwendet.

6.23.3 Reisolierung von *H. pylori* aus Magengewebe der Mongolischen Rennmaus

Die gewogenen Magengewebsproben wurden in 1 ml BHI/Hefe-Medium aufgenommen und anschließend vollständig homogenisiert (UltraTurrax). Jeweils 100 µl der erhaltenen Suspensionen wurden in geeigneten Verdünnungsstufen jeweils im Duplikat auf nicht selektiven Blutagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden im Brutschrank von Scholzen® für vier Tage inkubiert und anschließend die Anzahl der Kolonien gezählt. Stichprobenartig wurden die Reisolate mittels Urease-, Katalase- und Oxidasetest als *H. pylori* verifiziert. Darüber hinaus wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR-Diagnostik die Spezies

sowie der Genotyp bezüglich des untersuchten Genes bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden in MS Excel importiert und die Anzahl an CFU pro mg Gewebe errechnet.

6.24 Motilitätsplatten für *E. coli*

Um die Substratspezifität der Sensoren von *H. pylori* näher zu bestimmen, wurden Schwärmversuche (modifiziert nach: Adler, 1975) durchgeführt. In einem Schwärmversuch wird eine Agarplatte mit einer geringen Agarkonzentration mit einer definierten Zahl an Bakterien inokuliert. Die Bakterien werden dabei in einem definierten Volumen in der Mitte der Platte eingestochen. In Abhängigkeit von der Nährbodenzusammensetzung und der Substratspezifität der Sensoren des Bakteriums schwärmen nun die Bakterien von Einstichstelle aus. Der Durchmesser, des sich dabei bildenden Schwärmhofs dient als Kriterium, das Verhalten der Bakterien zu charakterisieren. Beispielsweise können einem Minimalmedium potenzielle Lock- oder Schreckstoffe zugesetzt werden und anschließend die Reaktion der Bakterien im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen beobachtet werden. Da *H. pylori* für Motilität komplexe, chemisch nicht-definierte Medien benötigt, also keine definierten Minimalmedien vorhanden sind, wurden diese Versuche in einem heterologen System durchgeführt. Da für *E. coli* sowohl verschiedene Schwärmassays bereits gut etabliert sind (Wolfe und Berg, 1989), als auch die heterologe Expression bakterieller Proteine in der Regel keine Probleme bereitet, wurde für die vorliegende Arbeit dieses System ausgewählt. Dazu wurden die Gene, welche für die Sensoren von *H. pylori* kodieren, in Expressionsplasmide kloniert und verschiedene *E. coli*-Stämme (RP437, BT3388, BT3312) mit den erhaltenen Plasmiden transformiert. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung des Phänomens der Energietaxis lag, wurden zwei dafür geeignete Medien verwendet. Zum einen wurden Minimalmedien, welche mit unterschiedlichen Substanzen supplementiert waren (siehe Ergebnisse 7.11) verwendet, zum anderen wurden Tryptonplatten benutzt. Die Minimalmediumplatten ermöglichten es, die Taxis gegenüber verschiedener Zucker, Aminosäuren und schwacher Säuren, welche zugegeben wurden, zu untersuchen. Die Tryptonplatten, welche als Vollmedium anzusehen sind, ermöglichen es insbesondere, Reaktionen auf Stoffwechselprodukte oder auch auf atmosphärische Veränderungen zu analysieren. Für die Herstellung des Minimalmediums (10mM PO_4^{3-} , 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 NaCl) wurde die Salze in HPLC-Wasser gelöst und 0,25% Bacto-Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Threonin, Methionin, Histidin, Leucin, Thiamin, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FeCl_2 sowie eine Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die Tryptonplatten wurden mit 1% Trypton und 0,5% NaCl (Wolfe und Berg, 1989) hergestellt.

Die Bakterien wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert und anschließend zweimal mit Chemotaxispuffer (10 mM PO_4^{3-} , 0,1 mM EDTA) gewaschen. Die

Platten wurden anschließend mittig mit 10^6 Zellen in einem Volumen von 10 μ l inokuliert und bei 30°C unter unterschiedlichen Atmosphären inkubiert (20%, 5%, 0% O₂). Nach 36 h wurde der Durchmesser des Schwärmhofes wurde bestimmt und ausgewertet.

7 Ergebnisse

7.1 Bioinformatische Analysen der Chemosensoren von *H. pylori*

7.1.1 Analyse der vier Chemosensoren aus *H. pylori* bezüglich ihrer Homologie zu Proteinen bekannter Funktion

Zu Beginn dieser Arbeit wurden verschiedene bioinformatische Analysen der vier mutmaßlichen Chemosensoren TlpA, TlpB, TlpC und TlpD von *H. pylori* durchgeführt. Ziel war es, aufgrund von Homologien zu anderen Proteinen einen Hinweis bezüglich der Substratspezifität der Sensoren zu erhalten. Dafür wurden die Aminosäuresequenzen der einzelnen Sensoren mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Version 2.2.19+) (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) auf Homologien zu anderen Proteinen (NCBI-nr-Proteindatenbank vom 7.1.2009) untersucht sowie ihre Sequenzen mit denen gut charakterisierter Sensoren anderer Spezies verglichen. Die Homologie-Werte (Ähnlichkeit, Identität) der in der BLAST-Suche identifizierten Proteine wurden anschließend mit einem paarweisen Sequenzvergleich (*pairwise alignment*: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align>; Needleman und Wunsch, 1970) bestimmt. Bei der Suche nach anderen homologen Proteinen in Sequenzdatenbanken fiel auf, dass statistische relevante Homologien lediglich im stark konservierten C-Terminus der Proteine zu finden waren. C-terminal ist die für Chemosensoren charakteristische MCP-Domäne lokalisiert, welche für die Signalweiterleitung verantwortlich ist (siehe Einleitung 4.2.2). Alle gefundenen, ähnlichen Proteine waren nicht charakterisierte bakterielle Sensoren, welche zum größten Teil der Klasse der ϵ -Proteobakterien angehören (Tabelle 12).

Tabelle 12: Homologien der Sensoren aus *H. pylori* KE26695 zu anderen Proteinen. In der Tabelle sind jeweils maximal die drei Proteine anderer Spezies mit der höchsten Homologie angegeben. Homologien zu *H. pylori* selbst und zu dem nahe verwandten *H. acinonychis* sind nicht berücksichtigt. Es wurde sowohl mit der Gesamtsequenz, als auch mit der potenziellen Sensordomäne nach Homologen gesucht. Für die Suche nach Homologen zur mutmaßlichen Sensordomänen ist der, für die Suche verwendete Bereich in der Tabelle angegeben. Die angegebenen Ähnlichkeits- und Identitätswerte wurden mittels eines *pairwise alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align>) bestimmt.

Sensor aus <i>H. pylori</i>	Beste BLAST Treffer		Annotation	Ähnlichkeit (Identität)
	Protein/ <i>accession number</i>	Spezies		
Vollsequenzsuche				
TlpA	ZP_01100569	<i>C. jejuni subsp. jejuni</i> 84-25	<i>methyl accepting protein</i>	57,5% (36,2%)
	HH0725	<i>H. hepaticus</i>	<i>hypothetical protein</i>	57,2% (36,7%)
	ZP_00370424	<i>C. upsaliensis</i>	<i>methyl accepting protein (TlpA)</i>	55,0%

				(35,0%)
TlpB	YP_00140795	<i>C. curvus</i> 525.92	<i>methyl accepting protein transducer</i>	56,6% (31,8%)
	ZP_01809998	<i>C. jejuni subsp. jejuni</i> CG8486	<i>methyl-accepting chemotaxis signal transduction protein</i>	35,4% (21,4%)
	CJE0140	<i>C. jejuni</i> RM1221	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>	34,9% (21,5%)
TlpC	ZP_00370566	<i>Campylobacter upsaliensis</i> RM3195	<i>methyl-accepting chemotaxis protein (TlpA)</i>	53,3% (34,6%)
	ZP_01100569	<i>Campylobacter jejuni subsp. jejuni</i> 84-25	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>	52,8% (32,6%)
	HH0725	<i>H. hepaticus</i>	<i>hypothetical Protein</i>	51,3% (32,0%)
TlpD	HH0891	<i>H. hepaticus</i>	<i>putative MCP</i>	62,2% (44,7%)
	Suden_0283	<i>Sulfurimonas denitrificans</i> DSM1251	<i>putative MCP</i>	58,9% (36,9%)
	Cj0448c	<i>C. jejuni</i>	<i>putative MCP</i>	42,8% (28,0%)
Suche nach Homologien in der Sensordomäne				
TlpA (AA 29 – 300)		Keine Homologien gefunden		
TlpB (AA 32 – 210)	ZP_00208105	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	<i>MCP (AA 1 – 170)</i>	44,4% (26,7%)
	YP_420580	<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	<i>MCP (AA 32 – 189)</i>	43,5% (25,8%)
	ZP_01233058	<i>Vibrio angustum</i> S14	<i>signal transduction histidine kinase (AA 24 – 201)</i>	41,0% (24,5%)
TlpC (AA 31 – 300)		Keine Homologien gefunden		
TlpD (AA 1 – 112)		Keine Homologien gefunden		

Auch bei einer gezielten Suche nach Homologien in den mutmaßlichen Sensordomänen konnten keine charakterisierten homologen Proteine gefunden werden. Für diese Analyse wurde der Bereich zwischen den beiden vorhergesagten Transmembrandomänen näherungsweise als die mutmaßliche Sensordomäne definiert. Die Lage der Transmembrandomänen wurde mit dem Programm ConPred II (<http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/>) bestimmt (Arai *et al.*, 2004). Der Sensor TlpD trägt keine Transmembrandomäne. Daher wurde die sensorische Domäne näherungsweise als der Bereich definiert (AA 1 – 112), welcher vor dem hochkonservierten C-terminalen Bereich (MCP-Domäne; AA 113 – 433) liegt.

Für einen direkten Sequenzvergleich der Sensoren aus *H. pylori* mit bekannten, gut charakterisierten Proteinen anderer Spezies wurden *alignments* der Aminosäuresequenzen

mit Hilfe des Clustal-Algorithmus des Programms MEGA erstellt und diese mit Gendoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) (Tabelle 3) visualisiert (Abbildung 10). Für den Sequenzvergleich wurden neben den vier Sensoren aus *H. pylori* die Energiesensoren Aer aus *E. coli* und *S. enterica ssp. enterica* Serovar Typhimurium (im folgenden: *S. Typhimurium*), der Aspartat-Maltose-Sensor Tar aus *E. coli*, der Dipeptid-Sensor Tap aus *E. coli*, der Citrat-Phenol-Sensor Tpc aus *S. Typhimurium*, sowie die Serin-Ribose-Sensoren (Tsr) und die Ribose-Galaktose-Sensoren (Trg) aus *E. coli* und *S. Typhimurium* verwendet. Die Sensoren aus den Spezies *E. coli* und *S. Typhimurium* wurden ausgewählt, da ihre Substratspezifität bekannt ist und zum Teil Mechanismen der Wahrnehmung aufgeklärt sind. Alle im Folgenden angegebenen Positionsangaben beziehen sich auf die in Abbildung 10 über den Sequenzen stehenden Positionsangaben des Gesamt-alignments. Bei einem direkten Sequenzvergleich mit bekannten, gut charakterisierten Proteinen anderer Spezies zeigten sich Homologien bezüglich der physiko-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren vor allem im C-Terminus. Im N-terminalen Bereich, in welchem die vermutete sensorische Domäne liegt, fanden sich wenige Ähnlichkeiten mit anderen Sensoren. Im N-Terminus wurde lediglich im Bereich bis Position 60 eine hohe Homologie zwischen den Sensoren TlpA, TlpB und TlpC aus *H. pylori* festgestellt. Diesem Bereich konnte im alignment kein entsprechender Sequenzabschnitt in den Sensoren aus *E. coli* und *S. Typhimurium* zugeordnet werden (Abbildung 10). Dieser Sequenzabschnitt stellt möglicherweise ein Signalpeptid dar. Dies deckt sich mit der Signalpeptidvorhersage mittels der Software SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; Emanuelsson *et al.*, 2007). Hier wurde für alle Sensoren aus *H. pylori* bis auf TlpD eine Wahrscheinlichkeit für ein Signalpeptid von höher als 83% vorhergesagt (Tabelle 13). Die wahrscheinlichste Spaltstelle wurde je nach Sensor zwischen den Positionen 20 bis 35 angegeben. Für alle untersuchten Sensoren aus *E. coli* und *S. Typhimurium* außer den beiden Aer-Sensoren konnte ebenfalls ein Signalpeptid vorhergesagt werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Vorhersage bezüglich der Existenz eines Signalpeptides und der wahrscheinlichsten Spaltungsstelle in den Sensoren TlpA, TlpB, TlpC und TlpD aus *H. pylori*, Aer, Tap, Tar, Tpc, Trg und Tsr aus *E. coli* bzw. *S. Typhimurium*. Erstellt mit SignalP

Sensor	Wahrscheinlichkeit eines Signalpeptids	Vorhergesagte Spaltstelle (AA)
HP_TlpA	83,5%	34/35
HP_TlpB	97,3%	20/21
HP_TlpC	97,1%	26/27
HP_TlpD	0%	--
EC_Aer	0%	--
ST_Aer	0%	--
EC_Tap	89,1%	27/28
EC_Tar	91,4%	19/20
ST_Tcp	96,3%	31/32
EC_Trq	98,9%	39/40
ST_Trq	74,2%	50/51
EC_Tsr	99,2%	34/35
ST_Tsr	99,5%	25/26

Jedoch zeigen diese mutmaßlichen Signalpeptide aus *Enterobacteriaceae* weder untereinander noch zum N-Terminus der Sensoren aus *H. pylori* eine erkennbare Homologie (Abbildung 10). Im *alignment* sind darüber hinaus vier Bereiche mit einer Länge von 10 bis 54 Aminosäuren erkennbar (I – IV in Abbildung 10), welchen überraschenderweise kein homologer Abschnitt in den Sensoren aus *E. coli* und *S. Typhimurium* zugeordnet werden konnte. Die Länge dieser Bereiche variiert zwischen den einzelnen Sensoren. So hat beispielsweise der Sequenzabschnitt III in TlpC eine Länge von 54 Aminosäuren, in TlpD dagegen nur eine Länge von 18 Aminosäuren. Sequenzabschnitt II fehlt in TlpD.

Im Bereich 310 – 330 (Position im *alignment*) ist in allen Sensoren bis auf TlpD eine Akkumulation mehrerer hydrophober Aminosäuren zu sehen, welche vermutlich eine Transmembrandomäne darstellen. In der weiteren Sequenz waren stärkere Homologien wieder ab Position 400 zu beobachten; in diesem Bereich liegt die stark konservierte MCP-Domäne, welche für Chemosensoren charakteristisch ist und auch deren Identifikation dient. In den Sensoren aus Tap, Tar, Tcp und Tsr aus *E. coli* und *S. Typhimurium* findet sich außerdem am C-Terminus das Aminosäuremotiv NWETF (bzw. NWESF in Tap) (Abbildung 10; Position 748 im *alignment*). Dieses Motiv wurde als Interaktionsposition der Methyltransferase CheR mit dem Sensorprotein beschrieben (Wu *et al.*, 1996). Dieses Motiv ist den Sensoren aus *H. pylori* sowie in den Sensoren Aer und Trg nicht zu finden.

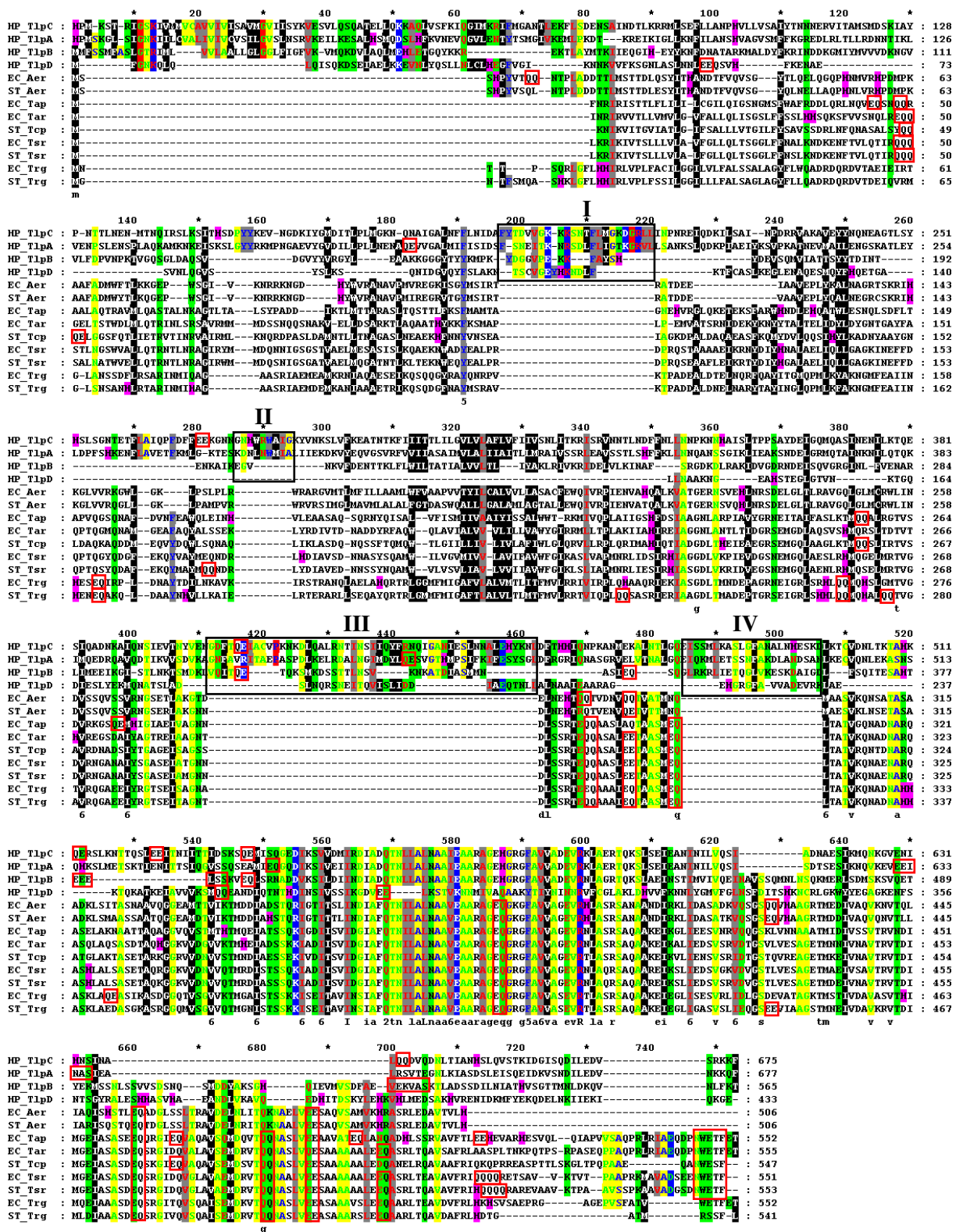


Abbildung 10: Alignment der Aminosäuresequenz der vier Sensoren aus *H. pylori* KE26695 (TlpA, TlpB, TlpC, TlpD), sowie der beschriebenen Sensoren aus *E. coli* (Aer, Tap, Tar, Trg, Tsr) und *Salmonella Typhimurium* (Tcp, Trg, Tsr) HP: *H. pylori*; EC: *E. coli*; ST: *S. Typhimurium*. Die Farben kodieren folgende physicochemische Eigenschaften: **Prolin**; **Glycin**; **sehr klein**; **klein**; **positiv**; **negativ**; **geladen**; **amphoterisch**; **polar**; **aliphatisch**; **aromatisch**; **hydrophob**. Bereiche, welche lediglich in den Sensoren aus *H. pylori* existieren sind schwarz umrandet und mit I – IV durchnummeriert. Aminosäurefolgen von zwei oder mehr Glutaminen bzw. Glutaminsäuren sowie die in Abschnitt 7.1.2 angesprochenen mutmaßlichen Aminosäurefolgen EENAS, EEELS und VEKVAS sind als potenzielle Methylierungsstellen rotumrandet. Die möglicherweise in der Energiewahrnehmung

beteiligten, protonierbaren Histidinseitengruppen (H) sind farbig markiert. Das *alignment* der Aminosäuresequenzen wurde mit dem Clustal-Algorithmus des Programms MEGA erstellt; die grafische Darstellung erfolgte mit Gendoc.

7.1.2 Analyse der Aminosäuresequenzen der Sensoren bezüglich der Existenz von Methylierungsmotiven

Neben der Sensorspezifität wurde auch nach Motiven für eine mögliche Adaptation gesucht. Eine in anderen Spezies gut untersuchte Möglichkeit der Adaptation stellt die Methylierung der C-terminalen Domäne der Sensoren da (siehe Abschnitt 4.2.7). Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt konnte in den Sequenzen der Sensoren von *H. pylori* kein bekanntes Motiv (NWET/SF) für eine mögliche Interaktionsstelle mit einer Methylase identifiziert werden. Neben der Interaktionsstelle mit der Methylase wurde auch gezielt nach bekannten Methylierungsmotiven selbst gesucht. Das Konsensus-Motiv Glx-Glx*-X-X-Ala-Ser/Thr wurde aus den Methylierungsmotiven der Sensoren Tsr, Tar, Trg aus *E. coli* gebildet (Kehry und Dahlquist, 1982; Terwilliger und Koshland, Jr., 1984; Nowlin *et al.*, 1987; Le Moual und Koshland, Jr., 1996), wobei der Stern (*) die Position der Methylierung angibt. In der Aminosäuresequenz von TlpA wurde ein entsprechendes Methylierungsmotiv gefunden (AA 629 – 634 EEINAS) (Abbildung 10). In den anderen Sensoren konnten keine eindeutigen Methylierungsmotive identifiziert werden. Lediglich in TlpB wurden zwei ähnliche Motive (AA 378 – 383 EEELSS; AA 527 – 533 VEKVAS) (Abbildung 10) gefunden, welche in drei der vier postulierten Aminosäuren übereinstimmen und wovon zumindest das erstere möglicherweise eine Methylierung ermöglicht (Abbildung 10). Da bei der Erstellung des Konsensusmotivs (Glx-Glx*-X-X-Ala-Ser/Thr) *H. pylori* und sonstige ϵ -Proteobakterien nicht berücksichtigt wurden, wurden zusätzlich im dargestellten *alignment* (Abbildung 10) alle Folgen von zwei oder mehr Glutaminen bzw. Glutamaten farbig markiert, da bereits diese Folge von zwei Aminosäuren (Glx-Glx) unter Umständen als Methylierungsmotiv in Frage kommt (Abbildung 10). Auf die Eignung von diesen Aminosäurefolgen als Methylierungsmotiv und die Wichtigkeit der CheR-Bindestelle NWET/SF wird noch ausführlich in der Diskussion eingegangen (siehe Abschnitt 8.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene der vier Sensoren verschiedener *H. pylori* Stämme sequenziert (B128, HP87, L7, 101UK, N6) und mit den Sequenzen aus öffentlich zugänglichen Datenbanken zusammengestellt (KE26696, J99, HPAG1, Shi) (Daten nicht gezeigt). Die beschriebenen möglichen Methylierungsmotive sind in allen Stämmen konserviert. Allgemein ist die Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen der Sensoren der einzelnen Stämme sehr hoch. Sie beträgt bei allen analysierten Stämmen mehr als 95%. Die einzige Besonderheit war bei TlpA zu beobachten, hier findet sich bei zwei Stämmen (L7; Shi) an Position AA246 eine Insertion von drei Aminosäuren (NGS). Die Sequenz des

Sensors TlpA scheint somit variabler als die der anderen Sensoren zu sein. Beispielsweise wurde im Stamm *H. pylori* ATCC43504 bereits früher eine Insertion an Position 318 des Gens *tlpA* mit einer Länge von 371 Basenpaaren beschrieben, die zu einem Funktionsverlust führt (Cerdea *et al.*, 2003).

7.1.3 Bioinformatische Vorhersage der Tertiärstruktur von TlpD aus *H. pylori*

Für den Sensor TlpD aus *H. pylori*, welcher in der vorliegenden Arbeit einen Schwerpunkt darstellte, wurde zusätzlich die mögliche Tertiärstruktur mit der Software Phyre vorhergesagt (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>; Bennett-Lovsey *et al.*, 2008), um auf Grund der Faltung möglicherweise weitere Informationen über Substratspezifität, Lokalisierung innerhalb der Zelle oder mögliche Interaktionspartner zu gewinnen. Die erstellte Tertiärstruktur wurde mit YASARA (<http://www.yasara.org>) (Tabelle 3) visualisiert. Das Programm berechnet die Struktur aufgrund von Homologien mit bereits bekannten Strukturen. Vergleichend wurde zusätzlich eine Vorhersage der *E. coli*-Energiesensoren Aer und Tsr erstellt. In Abbildung 11 ist bei allen drei Molekülen die für Chemosensoren charakteristische Struktur, bestehend aus einem Bündel zweier α -Helices zu erkennen. Im N- und C-terminalen Bereich war eine Vorhersage für alle drei Moleküle nicht möglich, da in diesen Bereichen die Homologie zu bekannten Strukturen zu gering war. So wurden für TlpD N-terminal die ersten 62 Aminosäuren und C-terminal die letzten 20 Aminosäuren des Moleküls nicht in die Vorhersage mit einbezogen; für Aer wurden N-terminal 270 Aminosäuren und C-terminal 48 Aminosäuren nicht in die Vorhersage mit einbezogen; für Tsr wurden N-terminal 250 Aminosäuren und C-terminal 35 Aminosäuren nicht mit einbezogen. In allen Strukturvorhersagen ist die unter physiologischen Bedingungen variabel protonierbare Aminosäure Histidin farbig hervorgehoben. Vor allem für Tsr wurde eine mögliche Beteiligung geladener Seitengruppen in der Energiewahrnehmung beschrieben (Edwards *et al.*, 2006; Rebbapragada *et al.*, 1997). Da auf Grund dieser Arbeit (siehe Abschnitt 7.3.5; Abschnitt 8.5) auch für TlpD eine Rolle in der Energiewahrnehmung und eine Beteiligung der *proton motiv force* vermutet wurde, sind auch in TlpD die protonierbaren Histidinseitengruppen von besonderem Interesse und wurden daher in Abbildung 11 farbig markiert. Auffallend bei einem Vergleich der Häufigkeit und Verteilung der Histidine in den drei Molekülen ist, dass in TlpD (16) und Aer (14) deutlich mehr Histidine als in Tsr (5) vorhanden sind.

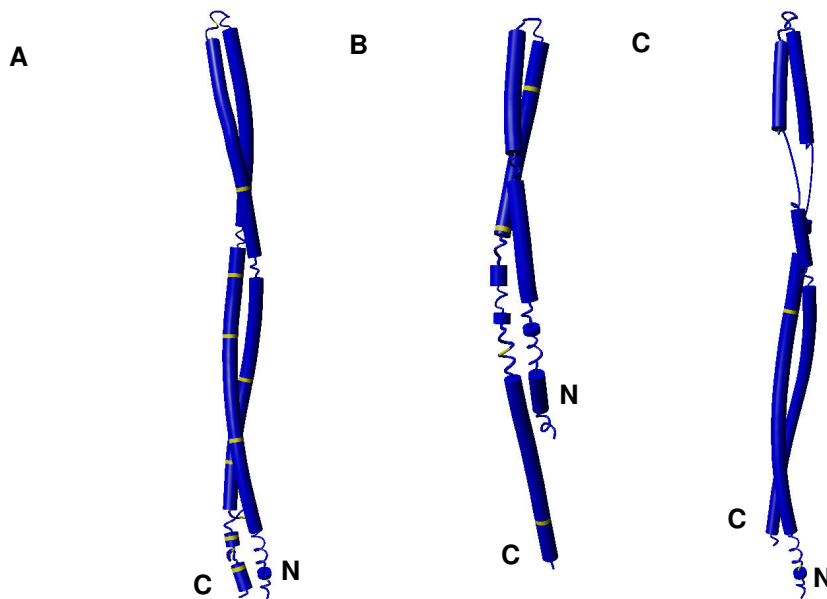


Abbildung 11: Vorhersage der 3D-Struktur von *H. pylori*-TlpD (A), *E. coli*-Aer (B) und *E. coli*-Tsr (C). Die Vorhersage wurde mit Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>) erstellt und mit YASARA (<http://www.yasara.org>) visualisiert. In der Darstellung sind die protonierbaren **Histidinseitenketten** farbig markiert. **N**: N-Terminus; **C**: C-Terminus

7.2 Analyse der metabolischen Aktivität von *H. pylori*

7.2.1 Die terminale Oxidase Cbb₃ von *H. pylori* ist essenziell für die Proliferation

Bereits vor dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der pH-Gradient innerhalb der mukosalen Schicht essenziell für die Orientierung von *H. pylori* ist (Schreiber *et al.*, 2004). Da sich die *proton motive force* aus dem Membranpotential und dem pH-Unterschied zwischen dem Periplasma und dem Cytosol zusammensetzt, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen pH-Wert der Umgebung und dem Energiehaushalt der Bakterien. Basierend auf diesen Erkenntnissen stellten wir in dieser Arbeit die Hypothese auf, die Orientierung von *H. pylori* innerhalb des mukosalen pH-Gradienten beruhe zumindest teilweise auf Energietaxis, also der Wahrnehmung der Aktivität des bakteriellen Metabolismus. Um die Existenz von Energietaxis in *H. pylori* zu überprüfen und deren Einfluss auf das Verhalten von *H. pylori* zu untersuchen, wurden verschiedene methodische Ansätze gewählt. Ein experimenteller Ansatz, der beispielsweise bei *E. coli* erfolgreich durchgeführt wurde (Edwards *et al.*, 2006), war das Gencluster der terminalen Oxidase des Typs *cbb₃* zu mutagenisieren, um deren Einfluss auf Motilität und Taxis der Bakterien näher zu untersuchen, sowie um möglicherweise metabolismusunabhängige Taxis von -abhängiger zu unterscheiden. Käme es nach der Mutagenese der terminalen Oxidase zum Verlust einer Reaktion auf bestimmte Änderungen der Umweltbedingungen, so wäre diese Reaktion

wahrscheinlich der Energietaxis zuzuschreiben. Reaktionen, die unabhängig vom Bestehen einer funktionierenden Atmungskette auftreten, also nicht durch eine Mutagenese von Atmungskettenkomponenten beeinflusst werden, würden dagegen auf metabolismusunabhängiger Taxis beruhen. Das Gencluster der terminalen Oxidase besteht in *H. pylori* aus vier Genen: *ccoN*, *ccoO*, *ccoP* und *ccoQ*. Für andere Bakterien (*Rhodobacter*, *Bradyrhizobium*) konnte bereits gezeigt werden, dass nur drei der Gene (*ccoN*, *ccoP*, *ccoQ*) für Funktion und Zusammenbau des Enzyms essenziell sind (Oh und Kaplan, 1999; Zufferey *et al.*, 1996) (siehe Einleitung 4.1.3). In dieser Arbeit wurde versucht, das Gen *ccoN* sowie auch alternativ das Gen *ccoP* von *H. pylori* zu mutagenisieren. Für beide Gene wurden für die Mutagenese jeweils ein Plasmid mit einer Kanamycinresistenz (pCJ517, pCJ518) und ein Plasmid mit einer Chloramphenicolresistenz (pCJ501, pCJ519) konstruiert (Tabelle 9). Da im Falle einer erfolgreichen Mutagenese in *H. pylori* vermutlich keine Sauerstoffatmung mehr möglich wäre, wurden den Selektivplatten zusätzlich verschiedene alternative Elektronenakzeptoren in einer Konzentration von 10 mM (Alexandre *et al.*, 2000) zugesetzt. In dieser Arbeit wurden Fumarat, DMSO, TMAO und Nitrat jeweils einzeln und alternativ alle vier Substrate gemeinsam verwendet. Eine Fumarat- sowie eine S/N-Oxid-Reduktase wurden bereits im Genom von *H. pylori* identifiziert (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Doig *et al.*, 1999). Eine Nitratreduktase konnte bislang nicht identifiziert werden. Da Nitrat jedoch ein häufig verwendeter bakterieller Elektronenakzeptor ist, wurde Nitrat ebenfalls für die anaerobe Kultivierung benutzt. Um mögliche toxische Effekte des Sauerstoffs in der Atmosphäre im Falle einer erfolgreichen Mutagenese auszuschließen, wurde das Experiment außer unter den beschriebenen mikroaerophilen Standardbedingungen (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) auch unter anaeroben Bedingungen (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) (siehe dazu auch Abschnitt 7.2.2) durchgeführt. Unter keiner der gewählten Bedingungen war es in wiederholten Versuchen möglich, *ccoN* bzw. *ccoP* Mutanten zu erhalten, so dass dieser Ansatz nicht weiterverfolgt werden konnte.

7.2.2 Untersuchung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf den ATP-Gehalt der Bakterien

Eine andere Möglichkeit speziell die Energietaxis näher zu analysieren ist die Erzeugung unterschiedlicher Umgebungsbedingungen, welche eine unterschiedlich starke metabolische Aktivität erlauben und die anschließende Beobachtung des Bewegungsmusters der Bakterien. Dazu wurden verschiedene Medien und Gasatmosphären verwendet. Zusätzlich wurde Gebrauch von verschiedenen metabolischen Inhibitoren der Atmungskette (Myxothiazol, HQNO) sowie einem Elektronendonator (TMPD/Ascorbat) gemacht (siehe Methoden 6.20). Dieser Ansatz wurde ursprünglich für *E. coli* (Bespalov *et al.*, 1996) und

Azospirillum brasilense entwickelt (Alexandre *et al.*, 2000). Veränderungen im Verhalten in Anwesenheit von metabolisierbarem Substrat, welche durch Inhibitoren unterdrückt wurden, wurden in diesen publizierten Arbeiten der Energietaxis zugeschrieben. Um sicherzustellen, dass verschiedene Medien, Atmosphären und Inhibitoren tatsächlich einen Einfluss auf die Aktivität des bakteriellen Stoffwechsels haben, wurde in der vorliegenden Arbeit der ATP-Gehalt der *H. pylori*-Zellen gemessen. Zur Bestimmung der Aktivität des bakteriellen Stoffwechsels wurde eine ATP-Messung gewählt, da *H. pylori* auch in der Lage ist, durch die Fixierung von CO₂ Energie ohne Beteiligung von Sauerstoff zu gewinnen (St Maurice *et al.*, 2007) und so andere etablierte Methoden wie beispielsweise die Messung des Sauerstoffverbrauchs in diesem Fall nicht ausreichend schienen. Eine ATP-Messung wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung der Wirkung des Protonenpumpeninhibitors Lansoprazol auf die Atmungskette von *H. pylori* angewandt (Nagata *et al.*, 2001) (siehe Diskussion 8.6).

7.2.2.1 Die Medienzusammensetzung wirkt sich auf den ATP-Gehalt von *H. pylori* aus

Im ersten Schritt wurde der ATP-Gehalt der Bakterien in verschiedenen Medien gemessen. Dies diente dazu, Bedingungen zu definieren, die es erlauben, die später folgenden Verhaltensanalysen mit Medien, welche eine unterschiedliche metabolische Aktivität zulassen, durchführen zu können. Damit sollte dann ein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Bakterien und den Kultivierungsbedingungen hergestellt werden. Für das Experiment wurden die Bakterien für ca. 16 h auf Blutagarplatten vorkultiviert, anschließend in den entsprechenden Medien (0,9% NaCl; RPMI1640-Medium ohne FCS; RPMI1640-Medium + 3% FCS; BHI/Hefe-Medium + 10% FCS) resuspendiert und eine definierte Anzahl an Bakterien (10^7 und 10^8) für die Dauer von einer Stunde inkubiert. Während des Versuchszeitraums wurde die ATP-Menge mit Hilfe eines Lumineszenz-basierten, kommerziell erhältlichen Assays (BacTiterGlo, Promega, siehe Methoden 6.22) alle 15 min quantitativ bestimmt. Das BHI/Hefe-Medium + 10% FCS wurde gewählt, da dies in unserem Labor standardmäßig zur Kultivierung von *H. pylori* benutzt wird. Das RPMI1640-Medium wurde gewählt, um ein chemisch definiertes Medium zu haben, welches die Untersuchung der Wirkung einer einzelnen zugesetzten Substanz ermöglicht. Zusätzlich wurde eine physiologische 0,9%-NaCl-Lösung verwendet, um eine nährstoffarme Vergleichskontrolle zu erhalten.

In Abbildung 12 wird gezeigt, dass sich der ATP-Gehalt der Bakterien je nach verwendetem Medium unterscheidet. Der ATP-Gehalt pro Bakterienzelle war in der nährstoffarmen, physiologischen 0,9%-NaCl-Lösung, die keine metabolisierbaren Moleküle enthält, sehr niedrig. In BHI/Hefe-Medium + 10% FCS, welches *H. pylori* Wachstum

ermöglicht, war der ATP-Gehalt dagegen am höchsten. In RPMI1640-Medium lagen die ATP-Werte zwischen den Werten in BHI/Hefe-Medium und denen in der 0,9%-NaCl-Lösung. Dabei war der ATP-Gehalt der Bakterien in RPMI1640-Medium mit Serum höher als der ATP-Gehalt der Bakterien in RPMI1640-Medium ohne Serum. In allen vier Medien blieb der ATP-Gehalt über den beobachteten Zeitraum von einer Stunde konstant.

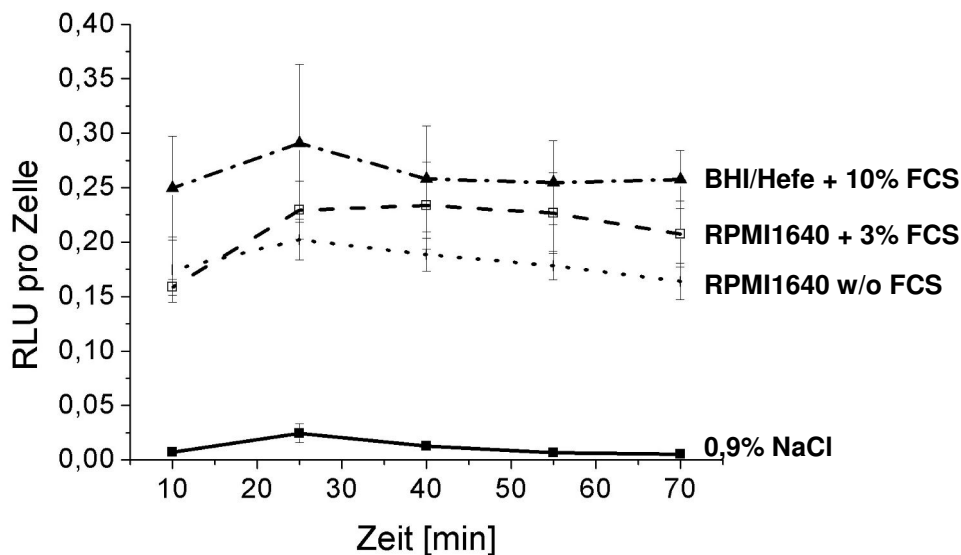


Abbildung 12: Relativer ATP-Gehalt pro Bakterienzelle (*H. pylori*-N6-Wildstamm) in verschiedenen Medien über einen Zeitraum von einer Stunde, angegeben in *relative luminescent units* (RLU). Gezeigt wird ein repräsentatives Einzelexperiment. Jede Messung wurde jeweils bei zwei verschiedenen Bakterienzahlen jeweils in der Duplikate durchgeführt.

7.2.2.2 Die Zusammensetzung der Atmosphäre wirkt sich auf den ATP-Gehalt von *H. pylori* N6 aus

Neben unterschiedlichen Medien wurde die Auswirkung unterschiedlicher Gasatmosphären auf den ATP-Gehalt der Bakterien untersucht. Dafür wurde eine für *H. pylori* geeignete Atmosphäre (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂ – im Folgenden als *H. pylori*-Atmosphäre bezeichnet), eine für *H. hepaticus* etablierte Atmosphäre (80% N₂; 10% CO₂, 10% H₂ – im Folgenden als *H. hepaticus*-Atmosphäre bezeichnet), Raumluft, mit 5% CO₂ angereicherte Raumluft und eine anaerobe 100%ige N₂-Atmosphäre verwendet. Die Bakterien wurden nach einer ca. 16-stündigen Kultivierung auf Blutagarplatten in der frühen log-Phase geerntet und für fünf Stunden in BHI/Hefe-Medium + 10% FCS in den verschiedenen Gasatmosphären inkubiert. Anschließend wurde der ATP-Gehalt bestimmt (Abbildung 13). Der gewählte Zeitraum von fünf Stunden entsprach in etwa der Verdopplungszeit der Bakterien. Auffallend war, dass nach der Inkubation mit Raumluft (0,84 RLU/Zelle) und mit 100% Stickstoff (1,45 RLU/Zelle) der ATP-Gehalt der Zellen höher war als unter den anderen atmosphärischen Bedingungen, welche zum Teil zur Kultivierung von *H. pylori* geeignet sind.

Die anderen drei atmosphärischen Bedingungen resultierten dagegen alle in ähnlichen ATP-Mengen pro Zelle (0,27 – 0,40 RLU/Zelle), wobei nach Inkubation unter der *H. hepaticus*-Atmosphäre am meisten ATP vorlag (0,40 RLU/Zelle) und unter CO₂ angereicherte Raumluft am wenigsten (0,27 RLU/Zelle). Der ATP-Gehalt nach Inkubation unter *H. pylori*-Atmosphäre (0,36 RLU/Zelle) lag zwischen den Werten der CO₂-angereicherten Raumluft und denen der *H. hepaticus*-Atmosphäre.

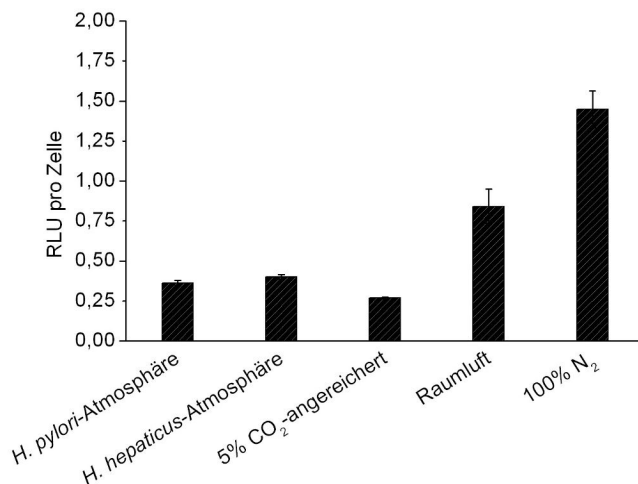


Abbildung 13: RLU pro Bakterienzelle (*H. pylori*-N6-Wildstamm) nach 5-stündiger Inkubation in BHI/Hefe-Medium + 10% FCS in verschiedenen Gasatmosphären. Gezeigt wird ein repräsentatives Einzelexperiment. Jede Messung wurde jeweils bei zwei verschiedenen Bakterienzahlen jeweils in der Duplikate durchgeführt.

7.2.2.3 Metabolische Inhibitoren reduzieren den ATP-Gehalt von *H. pylori*

Zusätzlich wurde der Einfluss der metabolischen Inhibitoren Myxothiazol und 2-*n*-Heptyl-4-Hydroxyquinolin-*N*-Oxid (HQNO) auf den ATP-Gehalt der Zellen untersucht (Abbildung 9). Myxothiazol wurde bereits als Inhibitor bakterieller Cytochrom-*bc*₁-Oxidase beschrieben (Trumppower, 1990) und für die Untersuchung von Energietaxis in dem mikroaeroben Bakterium *Azospirillum brasilense* (Alexandre *et al.*, 2000), sowie der Charakterisierung der Atmungskette von *H. pylori* eingesetzt (Kelly *et al.*, 2001; Alderson *et al.*, 1997). Hier konnte die Laktat-Atmung von *H. pylori* durch den spezifischen Cytochrom-*bc*₁-Inhibitor Myxothiazol inhibiert werden. Das Quinonanalogue HQNO wurde ebenfalls bereits für die Untersuchung von Energietaxis (Alexandre *et al.*, 2000) in *A. brasilense*, wie auch für die Untersuchung der Atmungskette von *H. pylori* (Tsukita *et al.*, 1999) als Inhibitor eingesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass Succinat in Gegenwart von HQNO nicht mehr oxidiert wird. Die Inhibitor-Konzentration von 10 µM wurde für die folgenden Experimente im Rahmen einer Verhaltensanalyse bestimmt (siehe Abschnitt 7.3; Abbildung 16).

Um die Auswirkung der Inhibitoren (Myxothiazol, HQNO) und damit der Aktivität der Atmungskette auf den ATP-Gehalt von *H. pylori* zu untersuchen, wurde der ATP-Gehalt der Bakterienzellen unter Einfluss der genannten Inhibitoren gemessen (Abbildung 14). Der ATP-Gehalt der Zellen wurde als RLU (*relative luminescence units*) angegeben. Die RLU sind direkt proportional zum ATP-Gehalt der Zelle. Die Bakterien wurden für ca. 16 h auf Blutagarplatten kultiviert, in der frühen log-Phase geerntet und in RPMI1640-Medium mit Serum aufgenommen und 10 μM des jeweiligen Inhibitors zugesetzt. Der ATP-Gehalt wurde fünfmal in einem Zeitraum von einer Stunde gemessen (0 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min). Die Inkubation zwischen den einzelnen Messungen erfolgte bei 37°C in CO₂-angereicherter (5%) Atmosphäre, da *H. pylori* als capnophiles Bakterium mit obligatem Bedarf für CO₂ beschrieben wurde (St Maurice *et al.*, 2007). Es war zu beobachten, dass innerhalb einer Stunde der ATP-Gehalt stark abnahm, der Metabolismus also durch beide Substanzen inhibiert wurde. Im Fall der Inhibition durch Myxothiazol nahm der ATP-Gehalt exponentiell ab; in Anwesenheit von HQNO nahm der ATP-Gehalt näherungsweise linear ab.

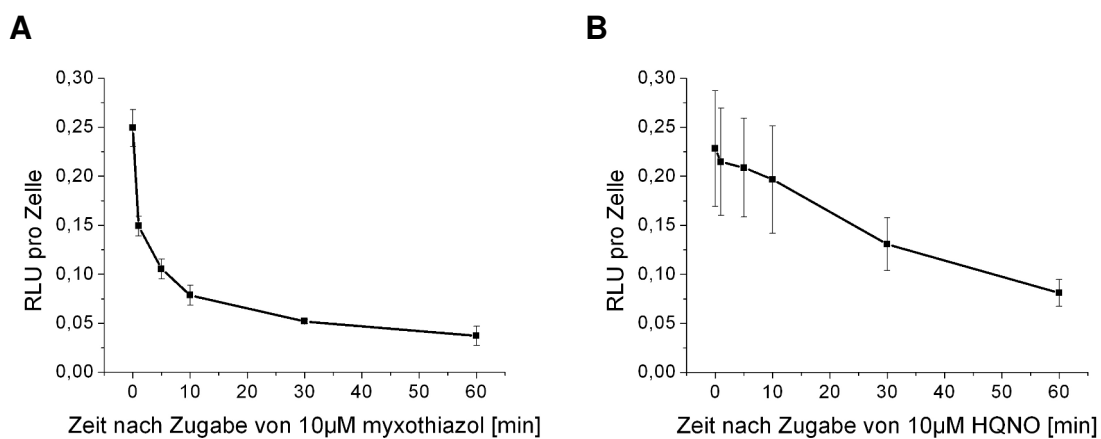


Abbildung 14: RLU pro Zelle des *H. pylori*-N6-Wildstammes unter Einfluss von 10 μM Myxothiazol (A) bzw. HQNO (B) innerhalb einer Stunde. Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Einzelexperiment. Jede Messung wurde jeweils bei zwei verschiedenen Bakterienzahlen jeweils in der Duplikate durchgeführt.

Zusätzlich zu den Inhibitoren wurde ein Gemisch aus TMPD und Ascorbinsäure verwendet, welches Elektronen direkt auf das Cytochrom *c* überträgt (Abbildung 9). Es wurde bereits gezeigt, dass TMPD in *H. pylori* als Elektronendonator dienen kann (Nagata *et al.*, 1996). Durch die Zugabe von TMPD/Ascorbat wurde in dieser Arbeit eine hohe metabolische Aktivität über Cytochrom *c* simuliert, und das Gemisch als Antagonist zu den verwendeten Inhibitoren eingesetzt. In Abbildung 15 sind die Auswirkungen verschiedener Medien und metabolisch aktiver Substanzen auf den ATP-Gehalt von *H. pylori* zusammengefasst. Die Bakterien wurden dazu nach 16-stündiger Kultivierung auf Blutagarplatten in den entsprechenden Medien resuspendiert. Bakterien, denen Myxothiazol zugesetzt wurde, wurden nach Zugabe für 30 Minuten bei 37°C in CO₂-angereicherter (5%)

Atmosphäre inkubiert. Die Einwirkzeit von TMPD/Ascorbat betrug zehn Minuten. Alle anderen Zellsuspensionen wurden parallel für den gleichen Zeitraum bei 37°C in CO₂-angereicherter (5%) Atmosphäre inkubiert. Die Zeitpunkte der Inhibitorzugabe und des Antagonisten wurden so gewählt, dass die Gesamtinkubationszeit aller Bakterien ca. 40 Minuten betrug.

Durch die Zugabe von Myxothiazol nahm der ATP-Gehalt ab, konnte aber durch die nachfolgende Zugabe von TMPD/Ascorbat und damit der direkten Elektronenübertragung auf Cytochrom *c* annähernd auf das Ausgangsniveau angehoben werden. In RPMI1640-Medium ohne Serum war die ATP-Menge pro Zelle niedriger als in RPMI1640-Medium mit 3% FCS, folglich war auch die Aktivität des bakteriellen Metabolismus niedriger. Auch in diesem Fall ließ sich der ATP-Gehalt durch die Zugabe von TMPD/Ascorbat steigern. Im Medium, welches Wachstum ermöglicht (BHI/Hefe + 10% FCS), zeigte sich ein ATP-Gehalt, der um ein Vielfaches höher lag als in RPMI1640-Medium mit Serum. Im Gegensatz dazu war der ATP-Gehalt in nährstoffarmer, physiologischer 0,9%-NaCl-Lösung minimal. Zusammenfassend zeigte sich, dass das verwendete Medium einen unmittelbaren Einfluss auf die ATP-Menge pro Zelle hatte, wobei wachstumsförderndes Medium die Aktivität des bakteriellen Metabolismus begünstigte. Die Zugabe von Serum wirkte sich ebenfalls positiv auf den ATP-Gehalt von *H. pylori* aus. Mit metabolischen Inhibitoren in einer Konzentration von 10 µM ließ sich der ATP-Gehalt der Bakterien in RPMI1640-Medium mit Serum absenken, mit einem Elektronendonator dagegen erhöhen. Daraus folgt, dass sowohl die Inhibitoren und als auch der Elektronendonator einen direkten Einfluss auf die Aktivität des bakteriellen Metabolismus haben.

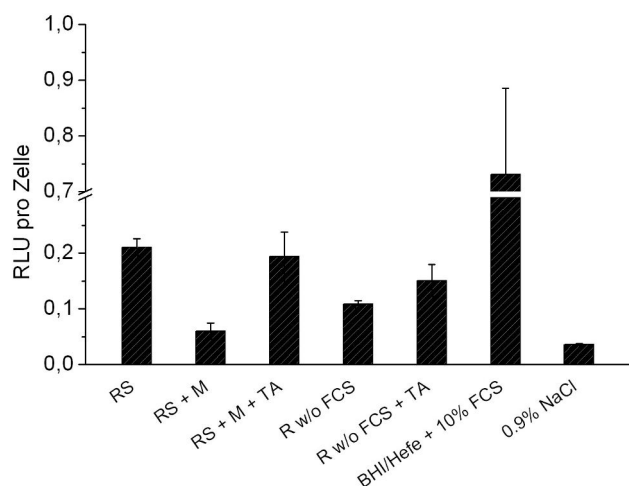


Abbildung 15: RLU pro Zelle eines *H. pylori*-N6-Wildstammes unter verschiedenen Bedingungen nach einer Gesamtinkubationsdauer von 40 Minuten. Die Einwirkzeiten von Myxothiazol und TMPD/Ascorbat betragen 30 min bzw. 10 min; **RS:** RPMI1640-Medium + 3% FCS, **RS+M:** RPMI1640-Medium + 3% FCS + 10µM Myxothiazol; **RS+M+TA:** RPMI1640-Medium + 3% FCS + 10µM Myxothiazol + TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM); **R w/o FCS:** RPMI1640-Medium; **R w/o FCS + TA:** RPMI1640-Medium + TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM). Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Einzelexperiment. Jede Messung wurde jeweils bei zwei verschiedenen Bakterienzahlen jeweils in der Duplikate durchgeführt.

7.3 Analyse des Verhaltens von *H. pylori* und der Rolle der Chemosensoren

Ziel dieser Arbeit war es das chemotaktische Verhalten von *H. pylori*, insbesondere das der Energiewahrnehmung, näher zu untersuchen und mit den oben beschriebenen Änderungen der metabolischen Aktivität zu korrelieren. Dazu wurden eine Reihe von funktionellen Analysen des Chemotaxisapparates und der Rolle einzelner Moleküle im Verhalten der Bakterien durchgeführt. Die Analyse des Bewegungsmusters und damit das genaue Verständnis des Verhaltens der Bakterien sind zur Aufklärung der taktischen Leistungen von Bakterien von zentraler Bedeutung. Daher wurde im ersten Schritt der funktionellen Analysen das Verhalten der Bakterien unter unterschiedlichen Bedingungen detailliert untersucht. Änderungen im Verhalten deuten in der Regel auf Änderungen in den wahrgenommenen Reizen hin und lassen so in Abhängigkeit von der Umgebungsveränderung einen Schluss auf die taktischen Fähigkeiten der Bakterien zu. Grundsätzlich muss dabei zwischen einem Reiz und einem Reizgradienten unterschieden werden. Liegt ein Reiz in der gesamten Umgebung des Bakteriums in gleicher Intensität vor, so zeigen alle Bakterien des Systems das gleiche Verhalten. Obwohl in diesem Ansatz über die Zeit die veränderte Umweltbedingungen von den Bakterien wahrgenommen werden können und dies in einer allgemeinen Veränderung des Verhaltens resultieren kann, sind die Bakterien in diesem Fall nicht in der Lage, sich gerichtet zu orientieren, da der Reiz ubiquitär vorliegt und damit alle Bakterien an jedem Punkt des Systems das gleiche Verhalten an den Tag legen. Untersuchungen dieser Art werden im Allgemeinen als *temporal assay* bezeichnet.

Davon zu unterscheiden ist ein System, in welchem ein Reizgradient vorliegt. Liegt in einem System ein räumlicher Reizgradient, beispielsweise in Form eines Konzentrationsgradienten einer wahrnehmbaren Substanz vor, so ist das Verhalten eines Bakteriums abhängig von der Position an der es sich entlang des Gradienten befindet. Im Falle eines Reizgradienten ist es den Bakterien daher möglich, sich entlang des Reizgradienten gerichtet zu bewegen. Untersuchungen in solchen Systemen werden im Allgemeinen als *spatial assay* bezeichnet.

Prinzipiell existieren drei gut etablierte Methoden der Verhaltensanalyse von Bakterien, die es ermöglichen, wahrgenommene Reize zu identifizieren: Motilitätsplatten, Kapillarentests und *temporal assays* (siehe Abschnitt 6.20). Motilitätsplatten gehören in die Kategorie der *spatial assays* (siehe auch Abschnitt 6.24, 7.11) und beruhen auf dem Wachstum und der Motilität von Bakterien. Durch das Wachstum und den Metabolismus der Bakterien entsteht im Medium ein Nährstoffgradient, welcher den Bakterien eine gerichtete Bewegung radial nach außen ermöglicht. Da *H. pylori* sehr komplexe Medien zum Wachstum benötigt, welche größtenteils nicht chemisch-definiert sind, ist eine Identifizierung einer einzelnen wahrgenommenen Substanz in diesen Medien nur schwer möglich.

Motilitätsplattentests waren daher zur Untersuchung der Substratspezifitäten einzelner Sensoren in *H. pylori* bisher nicht geeignet. Jedoch wurden die Sensoren von *H. pylori* im Rahmen dieser Arbeit im heterologen System von *E. coli* in Motilitätsplatten näher untersucht (siehe Abschnitt 6.24, 7.11).

Kapillarentest gehören ebenfalls in die Kategorie der *spatial assays*, benötigen aber im Gegensatz zu Motilitätsplattentests kein bakterielles Wachstum sondern lediglich bakterielle Motilität. In Kapillarentests wiederum wird beobachtet, ob die Bakterien auf den, zwischen Glaskapillare und Reservoir bestehenden Konzentrationsgradienten der zu untersuchenden Substanz reagieren. Für *H. pylori* konnten wir beobachten, dass die Bakterien in einem bestimmten Abstand vom Meniskus schnell unbeweglich wurden. Dies lag vermutlich an der geringen Gaskonzentration innerhalb der Kapillaren, da in diesen aufgrund des geringen Durchmessers die Diffusion des Sauerstoffs der Luft nur beschränkt möglich ist. Daher waren Kapillarentests für die chemotaktischen Analysen ebenfalls nicht geeignet.

Deshalb wurden in dieser Arbeit überwiegend *temporal assays* zur Untersuchung der chemotaktischen Fähigkeiten von *H. pylori* durchgeführt. Die Durchführung von *temporal assays* erfordert, im Gegensatz zu Motilitätsplatten, keine Proliferation der Bakterien. So konnten zum Teil chemisch definierte Medien (z.B. RPMI1640) verwendet werden, welche zwar die Beweglichkeit von *H. pylori* ermöglichen jedoch das Wachstum nicht unterstützen. Die Verwendung eines chemisch definierten Mediums ist eine Grundbedingung für die Identifizierung eines wahrgenommenen Reizes.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Bakterien des *H. pylori*-Wildstammes N6 in verschiedenen Flüssigmedien (RPMI1640 mit und ohne 3% FCS, BHI/Hefe mit 10% FCS) unter einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre hinsichtlich ihres Verhaltens beobachtet (siehe Abschnitt 6.20). Die Analyse des Verhaltens sollte dabei, wie oben beschrieben, als Grundlage für das Verständnis der chemotaktischen Fähigkeiten von *H. pylori* dienen. Das Bewegungsmuster der Bakterien wurde digital mit der Software TrackIt (Tabelle 3) aufgezeichnet und bezüglich durchschnittlicher Geschwindigkeit und Anzahl der *stops* ausgewertet. Der Anzahl der *stops* spielte dabei eine besondere Rolle, da sie ein Indiz ist, ob ein Reiz (z.B. Schreckstoff, Lockstoff) wahrgenommen wird. Eine erhöhte Anzahl an *stops* lässt auf einen Schreckstoff; eine verminderte Anzahl an *stops* auf einen Lockstoff schließen (siehe Einleitung 4.2.1) (Berg und Brown, 1972; Macnab und Koshland, Jr., 1972). Es wurde bereits früher gezeigt, dass *H. pylori* im Gegensatz zu verschiedenen *Enterobacteriaceae* keine *tumble* Bewegungen zeigt, sondern meist *runs* und *stops*. In bestimmten Medien konnten auch Rückwärtsbewegungen festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte darüber hinaus mittels der Verwendung der Chemotaxis- μ -Slides der Firma Ibidi (Martinsried) ein für *H. pylori* geeigneter *spatial assay*

etabliert werden, der es ermöglichte, das Verhalten der Bakterien entlang eines Reizgradienten zu untersuchen (siehe Methoden 6.21, Ergebnisse 6.21). Dies war notwendig, da für eine umfassende Beschreibung der chemotaktischen Leistungen eines Bakteriums, neben dem Nachweis einer Verhaltensänderungen auf eine Veränderung der Reizsituation im *temporal assay*, der Nachweis einer gerichteten Bewegung entlang eines Reizgradienten im *spatial assay* unerlässlich ist.

Für die meisten der folgenden *in-vitro*-Untersuchungen fiel die Wahl auf den Stamm *H. pylori* N6, da sich dieser durch eine hohe Transformationseffizienz auszeichnet und in unserem Labor bereits etabliert ist. Zudem ist der europäische Stamm *H. pylori* N6 dem bereits sequenzierten Stamm *H. pylori* KE26695 sehr ähnlich, was beispielsweise Mutagenesen durch die bekannte Sequenz von *H. pylori* KE26695 zum Teil erleichtern kann. Da bereits früh im Verlauf der Arbeit Versuche im Tiermodell (Mongolische Rennmaus) geplant waren, wurden neben *H. pylori* N6 zum Teil weitere Stämme wie die Tier-adaptierten Stämme B128 und HP87 untersucht, um die gewonnenen *in-vitro*-Daten mit den *in-vivo*-Daten korrelieren zu können.

7.3.1 Analyse des Verhaltens des *H. pylori*-N6-Wildstammes in Abhängigkeit von den verwendeten Medien

Zu Beginn der Verhaltensanalysen galt es, den Phänotyp des Wildstammes bezüglich des Bewegungsmusters in unterschiedlichen Medien zu dokumentieren. Dies diente zum einen dazu, das Verhalten mit dem jeweiligen Medium und dessen Auswirkung auf den ATP-Gehalt der Bakterien zu korrelieren, zum anderen kann erst durch die Bestimmung eines definierten Phänotyps unter definierten Bedingungen eine Veränderung des Verhaltens einer Veränderung der Umgebungsbedingungen zugeordnet werden. Im vorliegenden Experiment wurde, die Verhaltensanalyse der Bakterien in den bereits im ATP-Assay verwendeten Medien (RPMI1640 mit und ohne 3% FCS; BHI/Hefe + 10% FCS; 0,9% NaCl) durchgeführt, um die Bewegung der Bakterien bei unterschiedlich starker metabolischer Aktivität zu untersuchen (siehe Abschnitt 7.2.2). Die Untersuchung unter Bedingungen, welche unterschiedliche starke metabolische Aktivität erlaubten, stand im Zusammenhang mit der Analyse der möglichen Energietaxis von *H. pylori*.

Die Bakterien wurden dafür ca. 16 h auf Blutagarplatten kultiviert und dann in verschiedenen Medien (RPMI1640 mit und ohne 3% FCS; BHI/Hefe + 10% FCS; 0,9% NaCl) resuspendiert und anschließend für ca. 30 Minuten in CO₂-angereicherter (5%) Atmosphäre äquilibriert. Das Bewegungsmuster der Bakterien wurde in den unterschiedlichen Medien aufgezeichnet und u.a. die Anzahl der *stops* pro 3 Sekunden sowie die durchschnittliche Geschwindigkeit bestimmt. Die gewonnenen Daten sind in Tabelle 14 zu sehen.

Tabelle 14: Verhalten des *H. pylori*-N6-Wildstammes in verschiedenen Medien. Dargestellt sind die Anzahl der *stops* pro 3 s und die durchschnittliche Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$] in RPMI1640-Medium mit und ohne 3% FCS, sowie in BHI7Hefe-Medium + 10% FCS.

Medium	<i>stops</i> pro 3 s	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]
0,9% NaCl	keine Bewegung	
RPMI1640 w/o FCS	0,13 \pm 0,35	55,97 \pm 13,7
RPMI1640 + 3% FCS	6,02 \pm 1,71	49,58 \pm 9,8
BHI/Hefe + 10% FCS	2,99 \pm 1,86	49,38 \pm 14,3

Der Wildstamm zeigte in der nährstoffarmen 0,9%-NaCl-Lösung, welche nur zu einem sehr geringen ATP-Gehalt in den Bakterien führt, keine Bewegung (siehe Abschnitt 7.2.2). In dem RPMI1640-Medium ohne Serum konnte eine schnelle Schwimmbewegung der Bakterien beobachtet werden. Sie zeigten nur eine geringe Anzahl an *stops* (0,13 \pm 0,35 pro 3 s). Das Bewegungsmuster war somit geprägt von langen nicht-durchbrochenen *runs* und nur wenigen Richtungsänderungen. Im RPMI1640-Medium mit Serum, welches in *H. pylori* zu einem höheren ATP-Gehalt führt (siehe Abschnitt 7.2.2), zeigten die Bakterien dagegen eine höhere Anzahl an *stops* (6,02 \pm 1,71 pro 3 s; $p = 6,85 \times 10^{-53}$, *t*-Test) als in RPMI1640-Medium ohne Serum. Ihr Bewegungsmuster war geprägt von zahlreichen *stops* und Richtungsänderungen. Im BHI/Hefe-Medium mit 10% FCS, welches in *H. pylori* zu dem höchsten ATP-Gehalt führt (siehe Abschnitt 7.2.2), zeigten die Bakterien weniger *stops* als im RPMI1640-Medium mit Serum (2,99 \pm 1,86 pro 3 s; $p = 3,52 \times 10^{-19}$, *t*-Test).

7.3.2 Analyse des Verhaltens des *H. pylori*-N6-Wildstammes unter dem Einfluss metabolischer Inhibitoren

Metabolische Inhibitoren sind ein geeignetes Mittel, um Energietaxis nachzuweisen. Wird eine Reaktion, verursacht durch ein bestimmtes metabolisierbares Substrat, durch Zugabe eines metabolischen Inhibitors unterdrückt, so kann auch in *H. pylori* diese Reaktion der Energietaxis zugeschrieben werden (siehe Ergebnisse 7.2). Zu Beginn der folgenden Experimente wurde die Bewegung der Bakterien in RPMI1640-Medium mit 3% FCS unter Einfluss steigender Inhibitorkonzentrationen dokumentiert und analysiert. Dies diente unter anderem auch dazu, eine geeignete Konzentration für weiterführende Experimente zu ermitteln. Die Bakterien wurden dafür ca. 16 h auf Blutagarplatten kultiviert und dann in RPMI1640-Medium mit 3% FCS resuspendiert. Vor Zugabe des Inhibitors wurde die Zellsuspension für ca. 30 Minuten in CO₂-angereicherter (5%) Atmosphäre äquilibriert. Die Durchführung des Experimentes fand ebenfalls in CO₂-angereicherter Umgebungsluft statt. Abbildung 16 zeigt in beiden Fällen zu Beginn einen Geschwindigkeitsanstieg und eine

Zunahme der *stops* bei einer niedrigen InhibitorKonzentration von ca. 1 μM – 2,5 μM (Myxothiazol, HQNO). Mit zunehmender InhibitorKonzentration nahmen sowohl die Geschwindigkeit wie auch die Anzahl an *stops* ab. Bei einer Konzentration von 10 μM Myxothiazol bzw. HQNO waren die Bakterien noch beweglich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von ca. 30 $\mu\text{m/s}$, zeigten jedoch keine *stops* mehr. Die Konzentration von 10 μM wurde für die folgenden Experimente gewählt, da unter diesen Bedingungen die Bakterien zwar noch beweglich waren, jedoch die eindeutigste Veränderung (keine *stops* mehr) im Verhalten zu beobachten war. Auch für die in Abschnitt 7.2.2 beschriebenen ATP-Messungen wurde, basierend auf diesem Experiment, eine Konzentration von 10 μM gewählt. Bei höheren InhibitorKonzentrationen nahm zusätzlich zum Verlust der *stops* die Schwimmbeweglichkeit der Bakterien noch weiter ab, um schließlich bei 60 μM (Myxothiazol) bzw. 85 μM (HQNO) vollständig zu erliegen.

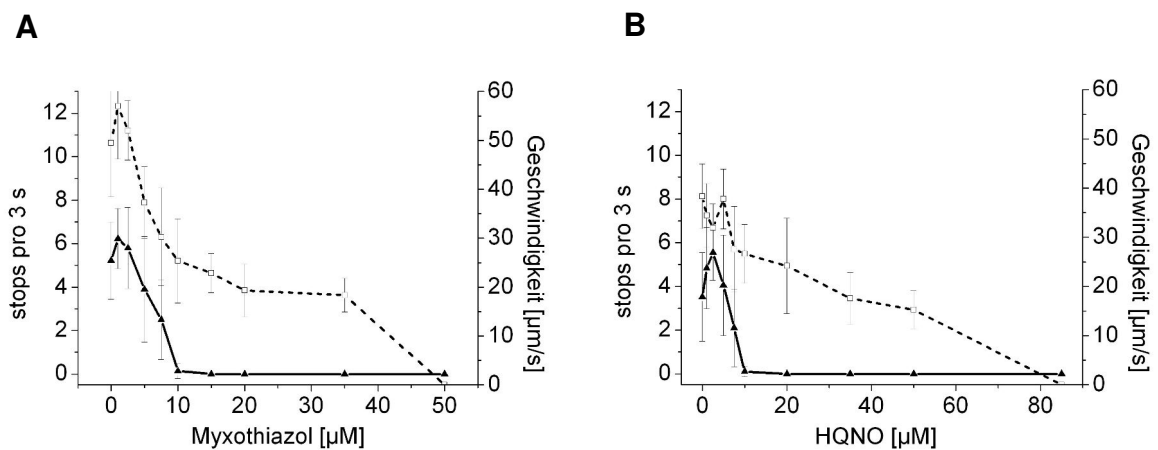


Abbildung 16: Anzahl der *stops* pro 3 Sekunden und Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$] des *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium + 3% FCS in CO_2 -angereicherter (5%) Atmosphäre in Abhängigkeit von der Konzentration von Myxothiazol (A) und HQNO (B). Die durchgezogene Linie gibt die Anzahl der *stops* pro 3 s an; die gestrichelte Linie die Geschwindigkeit in [$\mu\text{m/s}$]

Im Folgenden wurde nun der Einfluss verschiedener metabolisch-aktiver Substanzen (Myxothiazol, HQNO, TMPD/Ascorbat) auf das Verhalten der Bakterien analysiert (siehe Methoden 6.20) und untersucht inwieweit dies mit den dokumentierten energetischen Bedingungen (siehe Abschnitt 7.2.2) korreliert. Dazu wurden die Bakterien für ca. 16 Stunden auf Blutagarplatten kultiviert, in RPMI1640-Medium mit Serum aufgenommen und für 30 Minuten in CO_2 -angereicherter (5%) Atmosphäre äquilibriert. Das Experiment wurde ebenfalls in CO_2 -angereicherter Umgebungsluft durchgeführt. In Abbildung 17 ist der Effekt der beiden Inhibitoren (Myxothiazol, HQNO) sowie des Elektronendonors (TMPD/Ascorbat) auf Bakterien des *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium + 3% FCS zu sehen. Bakterien unter dem Einfluss der Inhibitoren zeigten kaum *stops*, sondern ein Verhalten, welches durch lange *runs* charakterisiert war. Nach Zugabe des Elektronendonors, also durch die Simulation metabolischer Aktivität durch die Übertragung

von Elektronen auf Cytochrom *c*, konnte die Häufigkeit der *stops* unter Einfluss von Myxothiazol (10 μ M) wieder auf das Niveau unter nicht-inhibierten Bedingungen angehoben werden (Abbildung 17).

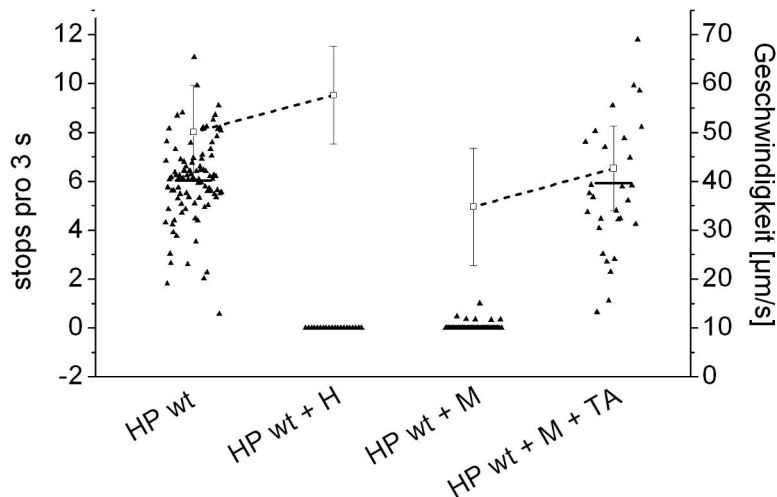


Abbildung 17: Verhalten der Zellen des *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium + 3% FCS. H: HQNO (10 μ M), **M:** Myxothiazol (10 μ M), **TA:** TMPD/Ascorbat (250 μ M/ 500 μ M) Das gefüllte Dreieck (▲) stellt die durchschnittliche Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden eines einzelnen Bakteriums da. Der waagrechte Balken (—) gibt den Median der Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden der jeweiligen Bakterienpopulation an. Das offene Quadrat (□) stellt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien inklusive der Standardabweichung da.

Beispielhaft sind in Abbildung 18 die Bewegungsmuster einzelner untersuchter Zellen dargestellt.

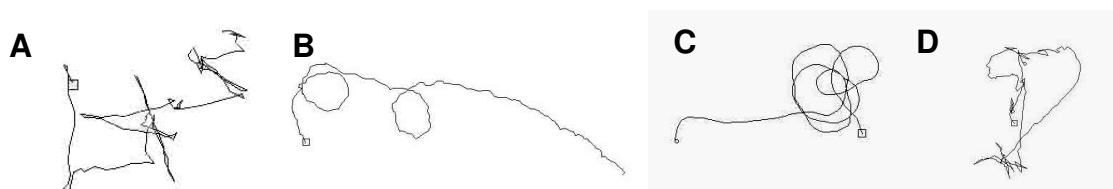


Abbildung 18: Bewegungspfad beispielhaft ausgewählter Zellen eines *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640 + 3% FCS, A: *H. pylori* N6 in RPMI1640-Medium + 3% FCS, **B:** *H. pylori* N6 in RPMI1640-Medium + 3% FCS + Myxothiazol (10 μ M), **C:** *H. pylori* N6 in RPMI1640-Medium + 3% FCS + HQNO (10 μ M), **D:** *H. pylori* N6 in RPMI1640-Medium + 3% FCS + Myxothiazol (10 μ M) + TMPD/Ascorbat (250 μ M / 500 μ M)

7.3.3 Untersuchung des *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium ohne Serum

Im Weiteren wurde vergleichend die Auswirkung der Inhibitoren und des Elektronendonors auf Bakterien in RPMI1640-Medium ohne Serum untersucht, um auch das Verhalten in einem nährstoffärmeren und chemisch vollständig definierten Medium zu testen. In RPMI1640-Medium ohne Zugabe von Serum ist der ATP-Gehalt der Bakterien niedriger, als

in Zellen in RPMI1640-Medium mit 3% Serum (Abbildung 15). Die Bakterien wurden nach einer 16-stündigen Anzucht auf Blutagarplatten in den entsprechenden Medien aufgenommen und direkt mit der Untersuchung des Bewegungsmusters begonnen. Das Experiment wurde ebenfalls in CO₂-angereicherter (5%) Umgebungsluft durchgeführt. Eine vorherige Äquilibrierung unter der verwendeten Atmosphäre erfolgte nicht, da die Bakterien in RPMI1640-Medium ohne Serum an die Gefäßwand der Zellkulturflaschen adhärten und eine Untersuchung der Bewegung nach einer 30-minütigen Inkubationsphase nicht mehr möglich gewesen wäre. Bei der Zugabe von Myxothiazol änderte sich die Anzahl der *stops* nicht. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien nahm ab (von 47,4 µm/s auf 25,1 µm/s), jedoch waren alle beobachteten Bakterien noch gut beweglich. Die Bakterien zeigten weiterhin keine *stops*, sondern lediglich *runs*. Durch die anschließende Zugabe des Elektronendonors TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM) wurden *stops* induziert (Abbildung 19A). Zum Vergleich ist in Abbildung 19B ebenfalls der zeitliche Verlauf des Verhaltens von *H. pylori* N6 in RPMI1640-Medium + 3% FCS zu sehen. Nach Zugabe von Myxothiazol bewegten sich die Bakterien ohne *stops*; nach der anschließenden Zugabe von TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM) konnten die *stops* wieder induziert werden. In beiden Fällen wurde beobachtet, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit der Bakterien mit Zugabe von Myxothiazol abnahm und nach Zugabe von TMPD/Ascorbat wieder anstieg. Der Effekt des Elektronendonors nahm nach ca. 20 Minuten wieder ab, was sich in einer Abnahme der Anzahl an *stops* auswirkte. In Abbildung 19C und D sind außerdem beispielhaft die Spuren einzelner Bakterien in RPMI1640-Medium mit und ohne FCS zur Veranschaulichung des Bewegungsmusters zu sehen. Während in Gegenwart von FCS häufige Richtungsänderungen zu beobachten waren (Abbildung 19D), war die Bewegung der Bakterien ohne FCS von langen *runs* geprägt (Abbildung 19C). Das Verhalten der Bakterien war also metabolismusabhängig.

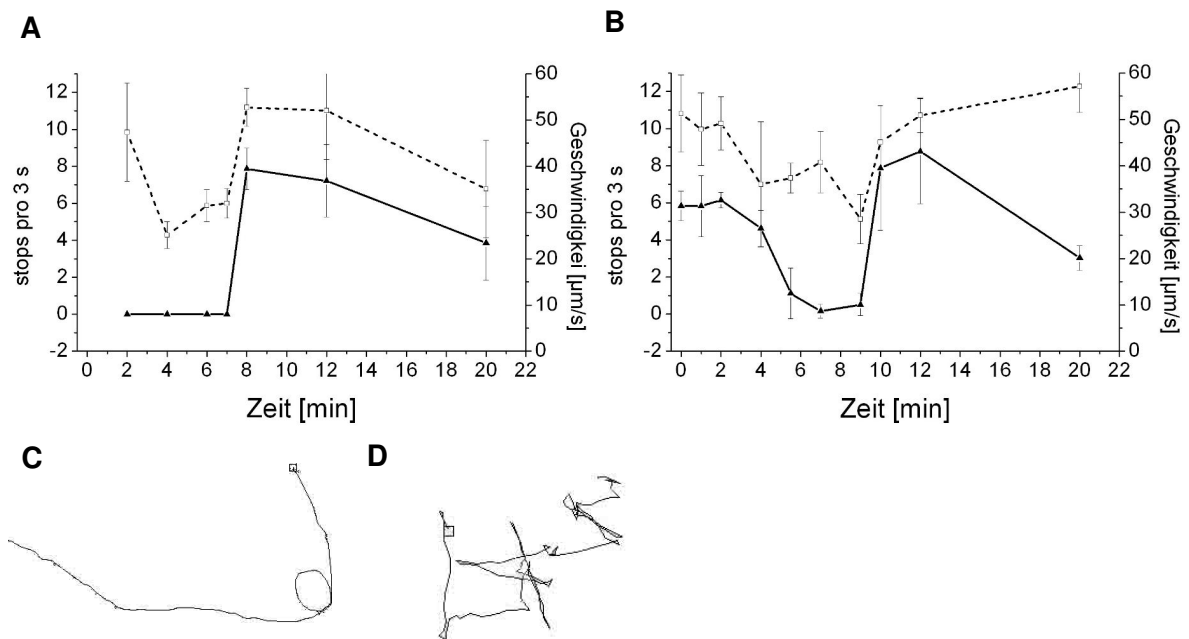


Abbildung 19: stops und Geschwindigkeit des *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium mit und ohne Serum in Abhängigkeit von der Zeit. A: RPMI1640-Medium w/o FCS; **B:** RPMI1640-Medium + 3% FCS. Das gefüllte Dreieck (\blacktriangle) gibt die durchschnittliche Anzahl an stops pro 3 Sekunden der beobachteten Bakterien an. Das offene Quadrat (\square) stellt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien dar. Nach 2 min wurde Myxothiazol zugegeben. Nach 7 min (A) bzw. 9 min (B) wurde TMPD/Ascorbat zugegeben. **C:** Bewegungspfad eines beispielhaft ausgewählten Bakteriums eines *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium w/o FCS. **D:** Bewegungspfad eines beispielhaft ausgewählten Bakteriums eines *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium + 3% FCS.

7.3.4 Bakterien des *H. pylori*-N6-Wildstammes bewegen sich in RPMI1640-Medium mit Serum ungerichtet

Flagellierte Bakterien bewegen sich in Abwesenheit eines Reizgradienten in der Regel mit einer bestimmten, konstanten Frequenz an *tumblings* bzw. *stops*, welche Richtungsänderungen ermöglichen. Die Richtungsänderung erfolgt dabei (wie in *E. coli* bestimmt) zufällig (siehe Einleitung 4.2.1). Da, wie oben dargelegt (siehe Abschnitt 7.2), alle Bakterien eines Systems ohne Gradienten das gleiche Verhalten zeigen, resultiert daraus ein zufälliges Bewegungsmuster ohne präferierte Bewegungsrichtung. Dies wird als *random walk* bezeichnet. In Anwesenheit eines Reizgradienten wäre es den Bakterien möglich, sich entlang des Gradienten gerichtet zu bewegen. Dies geschieht durch die Veränderung der Häufigkeit der *stops* pro Zeiteinheit bzw. einer Verlängerung der *runs* in Abhängigkeit von dem Gradienten. Die primär ungerichtete Bewegung in Abwesenheit eines Reizgradienten ist daher eine Grundlage des chemotaktischen Verhaltens. Für *H. pylori* wurde die Existenz eines *random walks* bisher nicht gezeigt. Um zu überprüfen ob das Bewegungsmuster des *H. pylori*-N6-Wildstammes in RPMI1640-Medium + 3% FCS tatsächlich einem Zufallsmuster (*random walk*) entspricht, wurden die Bewegungen von über 80 analysierten Bakterien über einen Zeitraum von vier Sekunden analysiert. Für diese Untersuchung wurde ein Medium

gewählt (RPMI1640 mit 3% FCS), welches den Bakterien *stops* ermöglicht und so prinzipiell die Möglichkeit zur gerichteten Bewegung verschafft. Die Bakterien bewegten sich während dieser Zeit kontinuierlich und schnell im Gesichtsfeld (Tabelle 14; Abbildung 17). Die x,y-Koordinaten der Bewegungen wurden anschließend in ein Koordinatensystem übertragen, wobei der Ausgangspunkt jedes Bakteriums auf den Ursprung (0/0) des Koordinatensystems gelegt wurde und der Endpunkt der Bewegung entsprechend im Koordinatensystem eingezeichnet wurde (Abbildung 20). Die Grafik zeigt unter den getesteten experimentellen Bedingungen keine Tendenz der Bakterien, sich regelmäßig in eine bestimmte Richtung zu bewegen. Die Endpositionen der Zellen sind gleichmäßig um den Ursprung verteilt. Die zufällige Verteilung der Bakterien nach vier Sekunden konnte statistisch (χ^2 -Test) bestätigt werden. Dazu wurden die erhaltenen karthesischen x,y-Koordinaten in Polarkoordinaten (r , φ) umgewandelt. Die Verteilung der Größe r (Radius) spielt für Beurteilung der Bewegungsrichtung keine Rolle. Daher wurde in den weiteren Berechnungen lediglich der Winkel φ einbezogen. Um eine Zufälligkeit in der Bewegungsrichtung zu bestätigen wurde nun überprüft, ob die beobachteten Ereignisse der Zufallsgröße $X=\varphi$ im Intervall $[-\pi; \pi]$ gleichverteilt war, so wie es bei einer ungerichteten Bewegung zu erwarten wäre. Dazu wurde mittels des χ^2 -Test die empirisch ermittelte Verteilung mit einer hypothetisch angenommenen Gleichverteilung verglichen. Da das statistische Merkmal $X=\varphi$ stetig war, wurde das Intervall $[-\pi; \pi]$ in 25 Unterintervalle (Klassen) gleicher Größe aufgeteilt und die Häufigkeit des Merkmals pro Unterintervall (Klasse) bestimmt. Die Prüfgröße χ^2 wurde

entsprechend der Formel
$$\chi^2 = \sum_{j=1}^m \frac{(n_j - n_{j0})^2}{n_{j0}}$$
 berechnet, wobei m die Anzahl der

festgelegten Klassen, n_j die beobachtete Häufigkeit des Merkmals $X=\varphi$ in der j-ten Klasse und n_{j0} die theoretische Häufigkeit der j-ten Klasse im Falle einer Gleichverteilung ist. Bei einer Einteilung in 25 Klassen ergab sich mit $p < 0,05$, dass die empirisch ermittelte Verteilung von $X=\varphi$ der angenommenen Gleichverteilung im Intervall $[-\pi; \pi]$ entsprach.

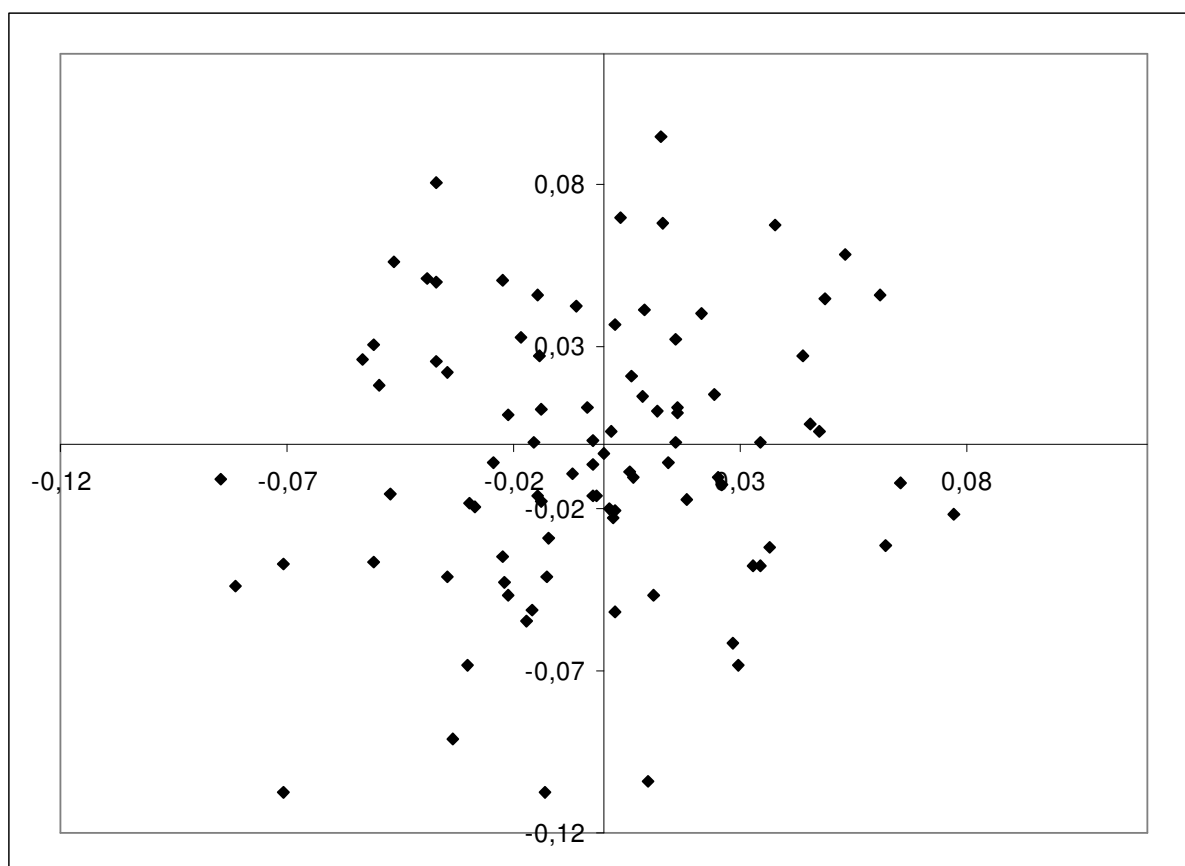


Abbildung 20: Positionen der *H. pylori*-N6-Wildstamm-Bakterien nach vier Sekunden ausgehend vom Ursprung. ◆ markiert die Position eines Bakteriums nach einer Dauer von vier Sekunden.

7.3.5 Konstruktion und Charakterisierung verschiedener Mutanten im Chemotaxisapparat von *H. pylori* N6

Wie zuvor beschrieben konnten Verhaltensänderung der Bakterien in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen, also der Verwendung verschiedener Medien oder Inhibitoren, beobachtet werden. Im Folgenden galt es zu untersuchen, ob dieses Verhalten vom Chemotaxisapparat vermittelt wird und welche Komponenten an den einzelnen Verhaltensänderungen beteiligt sind. Die Einzelmutanten *tlpA*, *tlpB*, *tlpC*, *tlpD* und *cheAY2* wurden bereits vor dieser Arbeit konstruiert und im Rahmen dieser Arbeit näher im *temporal assay* analysiert. Die Mutanten wurden wie beschrieben mittels allelischer Austauschmutagenese hergestellt und genetisch sowie mikroskopisch kontrolliert (Tabelle 9; Tabelle 10, Methoden 6.12). Alle Mutanten hatten intakte Flagellen und bewegten sich in Flüssigmedium mit ähnlicher Geschwindigkeit (C. Josenhans, unveröffentlicht).

7.3.5.1 Bestimmung des Chemotaxis-Nullphänotyps durch Herstellung der Chemotaxis-negativen Mutante *cheAY2*

Zu Beginn der Verhaltensanalysen galt es zu überprüfen ob das Verhalten tatsächlich mit dem Chemotaxisapparat zusammenhängt und wie sich der Chemotaxis-Nullphänotyp äußert. Dazu wurde eine *cheAY2*-Mutante im Stamm *H. pylori* N6 konstruiert (Tabelle 10) und analysiert. Die Histidinkinase CheAY2 ist essenziell für die Chemotaxis in *H. pylori*, da es die von den Sensoren wahrgenommenen Reize über CheY1 weiter zum Flagellenapparat leitet und so eine Änderung in der Bewegung bewirkt (Foyne *et al.*, 2000). Der Verlust der Taxis in der *cheAY2*-Mutante konnte mittels eines Motilitätstests in *Helicobacter*-Motilitätsplatten (siehe Methoden 6.2) bestätigt werden (Abbildung 21). Im Gegensatz zum Wildstamm konnten bei einer *cheAY2*-Mutante, trotz intakter Flagellen und guter Motilität in Flüssigmedium, keine Schwärmhöfe in Motilitätsplatten beobachtet werden. Die *cheAY2*-Mutante besitzt also unter den getesteten Bedingungen keine Möglichkeit zur gerichteten Bewegung mehr (Abbildung 21B).

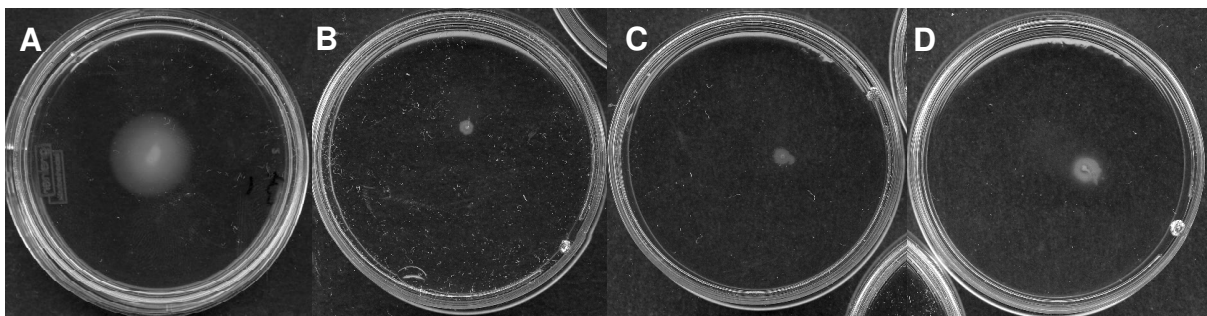


Abbildung 21: Motilität und Taxis eines *H. pylori*-N6-Wildstammes (A), einer *H. pylori*-N6-*cheAY2*-Mutante (B), einer *H. pylori*-N6-*tlpABCD*-Mutante (C) und einer *H. pylori*-N6-*tlpABC*-Mutante in Motilitätsplatten. In Abbildung D ist ein schwacher Motilitätshof für die *tlpABC*-Mutante zu sehen (siehe Ergebnisse 7.3.5.2).

Die Analyse des Bewegungsmusters der *cheAY2*-Mutante sollte daher Aufschluss darüber geben, ob sich das Verhalten von Bakterien, welche nicht mehr zur Taxis fähig sind, noch entsprechend der energetischen Bedingungen (verschiedene Medien, Inhibitoren) ändert, oder ob die Bakterien diese Fähigkeit entsprechend dem in Platten beobachteten Taxis-negativen Phänotyp verloren haben. Zudem war es durch die Untersuchung der Chemotaxis-negativen Mutante möglich, den Chemotaxis-Nullphänotyp für die gewählten Bedingungen zu definieren.

Für die folgenden *temporal assays* wurden alle Bakterien stets für ca. 16 h auf Blutagarplatten kultiviert, in den entsprechenden Medien (RPMI1640 mit und ohne 3% FCS, BHI/Hefe + 10% FCS) aufgenommen und in geeigneter Verdünnung ($OD_{600} = 0,2 - 0,3$; siehe Methoden 6.20) für 20 Minuten unter CO_2 -angereicherter (5%) Atmosphäre äquilibriert und in dieser Atmosphäre untersucht. Eine Untersuchung in 0,9% NaCl fand nicht statt, da der

Wildstamm bereits keine Bewegung mehr unter diesen Bedingungen zeigte (Tabelle 14). Die *cheAY2*-Mutante zeigte in allen verwendeten Medien keine *stops* mehr. In RPMI1640-Medium mit Serum war die Geschwindigkeit signifikant höher als die des Wildstammes (62,7 $\mu\text{m/s}$ vs. 49,58 $\mu\text{m/s}$; $p = 0,01$, t -Test).

Tabelle 15: Verhalten der *H. pylori-cheAY2*-Mutante in verschiedenen Medien. Dargestellt sind die Anzahl der *stops* pro 3 s und die durchschnittliche Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$] in RPMI1640-Medium mit und ohne 3% FCS, sowie in BHI +10% FCS.

Medium	<i>stops</i> pro 3 s	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]
RPMI1640 w/o FCS	0	59,61 \pm 14,86
RPMI1640 + 3% FCS	0	62,7 \pm 13,05
BHI/Hefe + 10% FCS	0	55,51 \pm 10,5

Wurde der *cheAY2*-Mutante in RPMI1640-Medium mit Serum ein Elektronendonator (TMPD/Ascorbat) zugesetzt, konnten keine *stops* induziert werden (Abbildung 22A). Der Chemotaxisapparat scheint also für *H. pylori* notwendig zu sein, um unter allen gewählten Bedingungen *stops* zu generieren. Der Chemotaxis-Nullphänotyp in *H. pylori* lässt sich somit als eine aus langen ununterbrochenen *runs* bestehende, Bewegung ohne *stops* definieren (Abbildung 22B). Dieser Phänotyp entspricht dem Verhalten, welches für *H. pylori* unter Einfluss von Inhibitoren, also bei geringer metabolischer Aktivität beobachtet wurde.

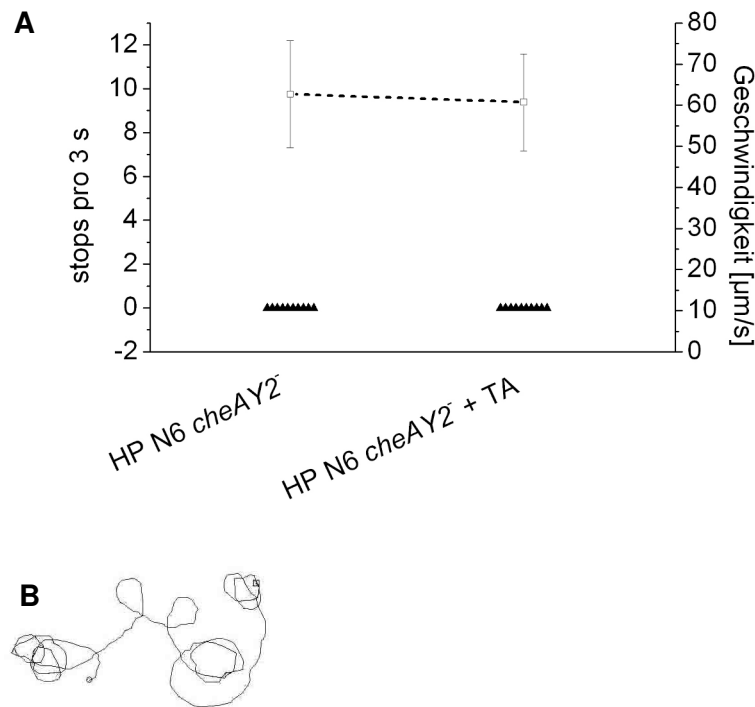


Abbildung 22: Verhalten von *H. pylori* N6 *cheAY2* in RPMI1640-Medium + 3% FCS mit und ohne Zugabe eines Elektronendonors (TMPD/Ascorbat) **A:** Anzahl der *stops* und durchschnittliche Geschwindigkeit von *H. pylori* N6 *cheAY2*; TA: TMPD/Ascorbat (250 μM / 500 μM) Das gefüllte Dreieck (▲) stellt die durchschnittliche Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden eines einzelnen Bakteriums da. Der waagrechte Balken (—) gibt den Median der Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden der jeweiligen Bakterienpopulation an. Das offene Quadrat (□) stellt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien dar. **B:** Bewegungspfad einer beispielhaft ausgewählten Bakterienzelle von *H. pylori* N6 *cheAY2* in RPMI1640-Medium + 3% FCS

Ein ähnlicher Phänotyp konnte durch die Konstruktion einer Vierfachmutante (*t1pABCD*) bestätigt werden. Diese Mutanten tragen keinen bekannten Chemosensor mehr und sind daher wahrscheinlich nicht mehr zur Chemotaxis fähig. Die Vierfachmutante bildete in Motilitätsplatten keinen Hof mehr (Abbildung 21). In einem *temporal assay* konnten in keinem der verwendeten Medien *stops* beobachtet werden. Dieser Phänotyp entspricht dem Verhalten, welches für *H. pylori* unter Einfluss von Inhibitoren, also bei geringer metabolischer Aktivität beobachtet wurde. Auch war es, ähnlich wie bei der *cheAY2*-Mutante nicht möglich *stops* durch die Zugabe von TMPD/Ascorbat zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Sensor-Vierfachmutante einem Nullphänotyp entspricht. Es scheinen also keine weiteren funktionellen Sensoren in *H. pylori* vorhanden zu sein. Die Untersuchung der Vierfachmutante erfolgte bislang rein qualitativ. Daher können hier keine quantitativen Daten dargestellt werden.

7.3.5.2 Der Sensor TlpD vermittelt ein dominantes energieabhängiges Verhalten

Im oben beschriebenen Experiment wurde gezeigt, dass der Chemotaxisapparat die *stops*, die beim Wildtyp beobachtet wurden, vorwiegend unter den gewählten Bedingungen suboptimaler metabolischer Aktivität vermittelt (siehe Ergebnisse 7.2.2). Der Chemotaxis-Nullphänotyp kann als eine Bewegung ohne *stops* definiert werden. Um zu analysieren, welche der vier Sensoren (TlpA, TlpB, TlpC, TlpD) an dem beschriebenen Verhalten (*stops* und *runs*) des Wildstammes beteiligt sind, wurden im *temporal assay* Einzelmutanten in den vier Sensorgenen (*tlpA*, *tlpB*, *tlpC* und *tlpD*) untersucht. Von allen Mutanten wurden die Bewegungsmuster in verschiedenen Medien beobachtet, dokumentiert und quantitativ analysiert. Tabelle 16 zeigt zusammenfassend das Verhalten (Anzahl der *stops* pro 3 Sekunden und die durchschnittliche Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]) der verschiedenen Mutanten in unterschiedlichen Medien (RPMI1640 mit und ohne 3% FCS, BHI + 10% FCS).

Die *tlpA*-, *tlpB*- und *tlpC*-Mutanten verhielten sich in RPMI1640 + 3% FCS ähnlich wie Bakterien des *H. pylori*-N6-Wildstammes. Die Zahl der *stops* lag zwischen 5 und 6 pro 3 Sekunden. Die durchschnittliche Geschwindigkeit lag zwischen 49 $\mu\text{m/s}$ und 55 $\mu\text{m/s}$ und war damit genau wie die Anzahl der *stops* nicht signifikant verschieden von der des Wildstammes. Im Gegensatz dazu zeigen Mutanten im Gen *tlpD* ein verändertes Verhalten. Sie stoppten nur ca. 0,07mal pro 3 Sekunden (Abbildung 23), während der Wildstamm durchschnittlich 6 *stops* pro 3 Sekunden zeigte ($p = 3,2 \times 10^{-35}$, *t*-Test). TlpD schien also unter den gewählten Bedingungen die *stops* zu vermitteln. Die Durchschnittsgeschwindigkeit lag auch hier im Bereich des Wildstammes (49,11 $\mu\text{m/s}$ vs. 49,58 $\mu\text{m/s}$).

In RPMI1640-Medium ohne Serum, also unter Bedingungen, unter denen weniger zelluläres ATP vorhanden ist (siehe Abschnitt 7.2.2), zeigten alle Mutanten wesentlich weniger *stops* als unter Bedingungen mit mehr zellulärem ATP (RPMI1640-Medium + 3% Serum) (Tabelle 16). Die *tlpC*-Mutante wies noch ca. 2,27 *stops* pro 3 Sekunden auf (vgl. 6,22 pro 3 s in RPMI1640-Medium + 3% FCS), während alle anderen Mutanten inklusive des Wildstammes kaum bzw. gar keine *stops* mehr zeigten. In diesem Medium war es aber möglich, durch die Zugabe eines Elektronendonors (TMPD/Ascorbat), also durch die Simulation metabolischer Aktivität, *stops* im Wildstamm und in den Mutanten *tlpA*, *tlpB* und *tlpC* zu induzieren. Dagegen war eine Induktion von *stops* in der Chemotaxis-negativen Mutante *cheAY2* und in der der Sensormutante *tlpD* nicht möglich (Abbildung 22, Abbildung 23A – C).

In BHI/Hefe-Medium mit 10% FCS, welches gutes Wachstum der Bakterien erlaubt und im Vergleich zu den anderen getesteten Medien den höchsten ATP-Gehalt ermöglicht (siehe Abschnitt 7.2.2), zeigte der Wildstamm weniger *stops* als in RPMI1640-Medium mit 3% Serum (2,99 vs. 6,02 pro 3 s; $p = 3,52 \times 10^{-19}$, *t*-Test). Die *tlpD*-Mutante dagegen zeigte im

BHI/Hefe-Medium mit 10% FCS mehr *stops* als im nährstoffärmeren RPMI1640-Medium mit Serum (0,54 vs. 0,07 pro 3 s; $p = 0,0001$, t -Test). Die Chemotaxis-negative *cheAY2*-Mutante zeigte wie in den anderen getesteten Medien keine *stops* mehr. Auch durch die Zugabe des Elektronendonors TMPD/Ascorbat konnten genau wie in RPMI1640-Medium (mit und ohne Serum) keine *stops* induziert werden. Die Mutanten *tlpA*, *tlpB* und *tlpC* wurden im BHI/Hefe-Medium bislang lediglich qualitativ beurteilt. Sie zeigten ein Verhalten, welches bezüglich der Geschwindigkeit und der *stops* dem Verhalten des Wildstammes ähnlich war. Sowohl im Wildstamm, als auch in den Mutanten *tlpA*, *tlpB* und *tlpC* konnten durch die Zugabe von 10 μ M Myxothiazol die *stops* in allen getesteten Medien inhibiert werden und so der Nullphänotyp erzeugt werden. Anschließend konnten durch TMPD/Ascorbat die *stops* wieder induziert werden. In der Mutante *tlpD* dagegen zeigte die Zugabe von TMPD/Ascorbat unter allen Medienbedingungen keine Veränderung der Häufigkeit der *stops*.

Tabelle 16: Verhalten verschiedener *H. pylori*-Mutanten. Dargestellt sind die Anzahl der *stops* pro 3 s und die durchschnittliche Geschwindigkeit [μ m/s]) der einzelnen Mutanten in RPMI1640-Medium mit und ohne 3% FCS sowie in BHI/Hefe-Medium + 10% FCS. N.D.: Es wurden keine quantitativen Daten erhoben

Stamm	RPMI1640 + 3% FCS		RPMI1640 w/o FCS		BHI/Hefe + 10% FCS	
	<i>stops</i> pro 3 s	Geschwindigkeit [μ m/s]	<i>stops</i> pro 3 s	Geschwindigkeit [μ m/s]	<i>stops</i> pro 3 s	Geschwindigkeit [μ m/s]
<i>wt</i>	6,02 \pm 1,71	49,58 \pm 9,8	0,13 \pm 0,35	55,97 \pm 13,7	2,99 \pm 1,86	49,38 \pm 14,3
<i>tlpA</i>	5,18 \pm 1,39	53,18 \pm 7,36	0,04 \pm 0,15	55,66 \pm 15,25	N.D.	N.D.
<i>tlpB</i>	5,66 \pm 1,59	51,96 \pm 11,41	0,01 \pm 0,05	39,97 \pm 8,9	N.D.	N.D.
<i>tlpC</i>	6,22 \pm 2,08	55,06 \pm 10,9	2,27 \pm 1,26	41,82 \pm 6,67	N.D.	N.D.
<i>tlpD</i>	0,07 \pm 0,18	49,11 \pm 9,53	0	53,83 \pm 10,68	0,54 \pm 0,68	55,34 \pm 16,9
<i>cheAY2</i>	0	62,7 \pm 13,05	0	59,61 \pm 14,86	0	55,51 \pm 10,5
<i>tlpABC</i>	1,56 \pm 0,89	35,27 \pm 9,75	0	37,67 \pm 11,48	0,70 \pm 0,93	47,55 \pm 16,7

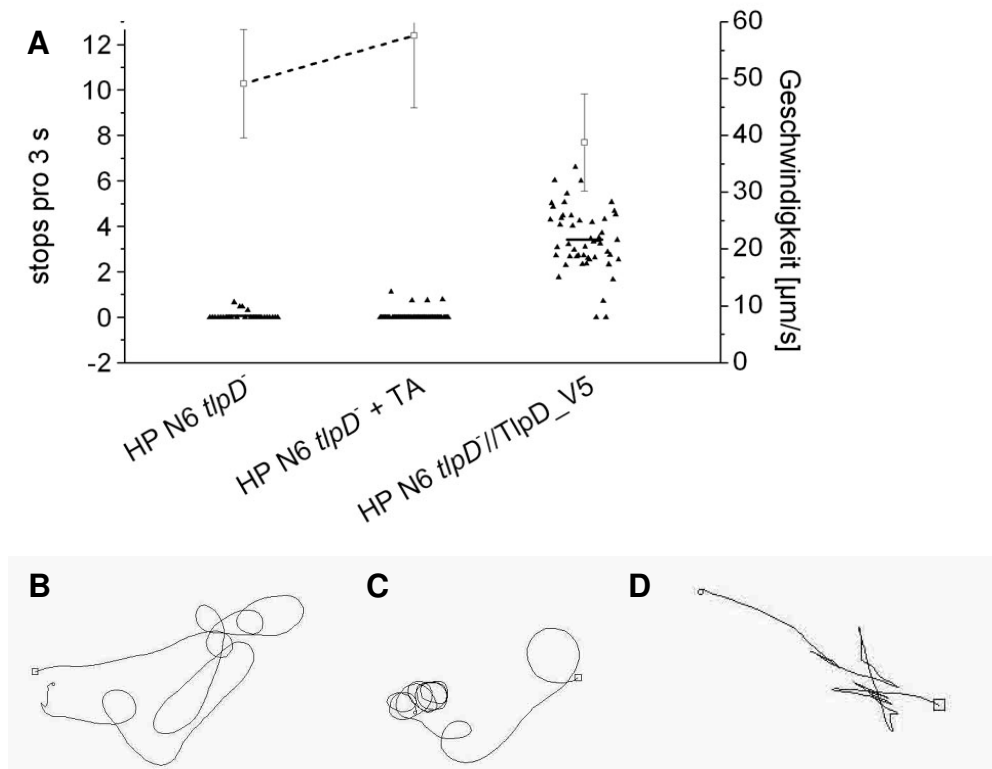


Abbildung 23: Verhalten von *H. pylori* N6 *tlpD* und *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5 in RPMI1640-Medium + 3% FCS. **A: Anzahl der *stops* und Durchschnittsgeschwindigkeit von *H. pylori* N6 *tlpD* und *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5; TA: TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM) Das gefüllte Dreieck (▲) stellt die durchschnittliche Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden eines einzelnen Bakteriums dar. Der waagrechte Balken (—) gibt den Median der Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden der jeweiligen Bakterienpopulation an. Das offene Quadrat (□) stellt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien inklusive der Standardabweichung dar. **B:** Bewegungspfad einer beispielhaft ausgewählten Zelle von *H. pylori* N6 *tlpD* in RPMI1640-Medium + 3% FCS; **C:** Bewegungspfad einer beispielhaft ausgewählten Zelle von *H. pylori* N6 *tlpD* in RPMI1640-Medium + 3% FCS + TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM); **D:** Bewegungspfad einer beispielhaft ausgewählten Zelle von *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5 in RPMI1640-Medium + 3% FCS. Zu den Daten, welche die Mutante *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5 betreffen siehe Abschnitt 7.3.7.**

Wie zuvor beschrieben, war TlpD signifikant an der Vermittlung der *stops* unter den getesteten Bedingungen beteiligt. Um nun zu untersuchen, ob TlpD alleine ausreichend ist, um das oben beschriebene metabolismusabhängige Verhalten zu vermitteln, wurde eine *tlpABC*-Dreifachmutante konstruiert (siehe Material Tabelle 7, Tabelle 8; Methoden 6.12.2), welche als einzigen Sensor TlpD trägt. Die Dreifachmutante bewegte sich in RPMI1640-Medium mit Serum mit weniger *stops* ($1,56 \pm 0,89$) als der Wildstamm ($6,02 \pm 1,71$, $p = 6,8 \times 10^{-23}$, *t*-Test) (Tabelle 16). Jedoch lag die Anzahl signifikant höher ($p = 4,1 \times 10^{-7}$, *t*-Test) als bei der *tlpD*-Mutante ($0,07 \pm 0,18$). Die durchschnittliche Geschwindigkeit ($35,27 \pm 9,75$ µm/s) war niedriger als die des Wildstammes ($49,58 \pm 9,8$ µm/s), jedoch waren alle Bakterien gut beweglich. Das Verhalten von *H. pylori tlpABC* war ebenfalls metabolismusabhängig, da die *stops* sich durch die Zugabe von Inhibitoren ausschalten und durch die Zugabe eines Elektronendonors (TMPD/Ascorbat) rekonstituieren ließ (Abbildung

24). Die ermittelten Abnahme der Anzahl der *stops* nach Zugabe von Myxothiazol und die Zunahme nach anschließender Zugabe von TMPD/Ascorbat konnten als signifikant bestätigt werden ($p = 3,2 \times 10^{-9}$ bzw. $4,8 \times 10^{-9}$, *t*-Test). Mit Hilfe von Motilitätsplatten konnte gezeigt werden, dass eine *tlpABC*-Mutante, welche nur noch den Sensor TlpD trägt, noch zur Taxis und damit zur radial nach außen gerichteten Bewegung fähig ist (Abbildung 21).

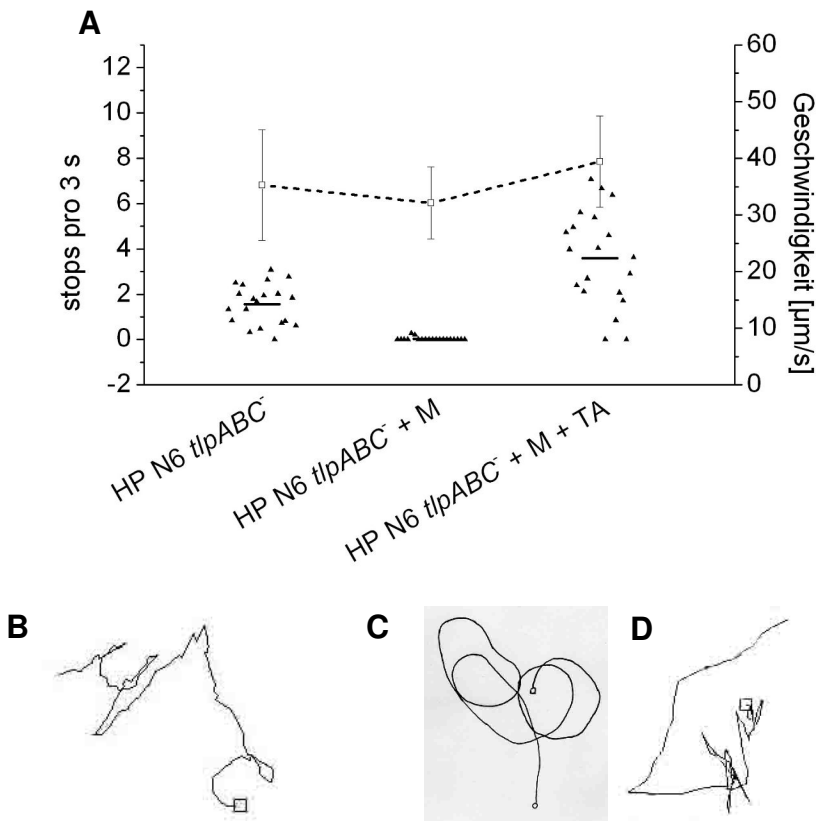


Abbildung 24: Verhalten von *H. pylori tlpABC* in RPMI1640-Medium +3% FCS; A: Anzahl der *stops* und durchschnittliche Geschwindigkeit der *H. pylori*-N6-*tlpABC*-Mutante; M: Myxothiazol; TA: TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM); Das gefüllte Dreieck (▲) stellt die durchschnittliche Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden eines einzelnen Bakteriums dar. Der waagrechte Balken (—) gibt den Median der Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden der jeweiligen Bakterienpopulation an. Das offene Quadrat (□) stellt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien inklusive der Standardabweichung dar. **B:** Bewegungspfad einer beispielhaft ausgewählten Zelle von *H. pylori* N6 *tlpABC* in RPMI1640-Medium + 3% FCS. **C:** Bewegungspfad einer beispielhaft ausgewählten Zelle von *H. pylori* N6 *tlpABC* in RPMI1640-Medium + 3% FCS + Myxothiazol (10 µM). **D:** Bewegungspfad einer beispielhaft ausgewählten Zelle von *H. pylori* N6 *tlpABC* in RPMI1640-Medium + 3% FCS + Myxothiazol (10 µM) + TMPD/Ascorbat (250 µM / 500 µM).

7.3.5.3 Vergleich verschiedener *H. pylori*-N6-Mutanten in nährstoffreicherem BHI/Hefe-Medium

In den oben beschriebenen Experimenten wurde das Verhalten von *H. pylori* stets in Medien, welche kein Wachstum der Bakterien ermöglichen, untersucht. Im folgenden Experiment sollte nun das Verhalten der Bakterien in einem Medium (BHI/Hefe + 10% FCS) beobachtet werden, welches eine gute Proliferation von *H. pylori* ermöglicht (Wachstumsrate $\mu = 0,1791$)

und einen signifikant höheren ATP-Gehalt in den Zellen ermöglicht (siehe Abschnitt 7.2.2). Sollte Energietaxis vorliegen, so wäre in einem Wachstum-ermöglichendem Medium ein deutlich anderes Verhalten zu erwarten, als in einem Medium (RPMI1640), welches kein Wachstum ermöglicht. Das Verhalten der Bakterien im nährstoffreicheren BHI/Hefe-Medium unterschied sich vom Verhalten in RPMI1640-Medium + 3% FCS (Tabelle 16; Abbildung 25). Der Wildstamm zeigte ebenso wie die *tlpABC*-Mutante signifikant weniger *stops in* BHI/Hefe-Medium als in RPMI1640-Medium mit Serum. Die *tlpD*-Mutante dagegen zeigte in BHI/Hefe-Medium eine höhere Anzahl an *stops* als in RPMI1640-Medium mit Serum. Der Kontrollstamm *H. pylori* N6 *cheAY2* stoppte in BHI/Hefe-Medium ebenso wie in RPMI1640-Medium nicht. Die durchschnittliche Geschwindigkeit aller Stämme war der in RPMI1640-Medium ähnlich.

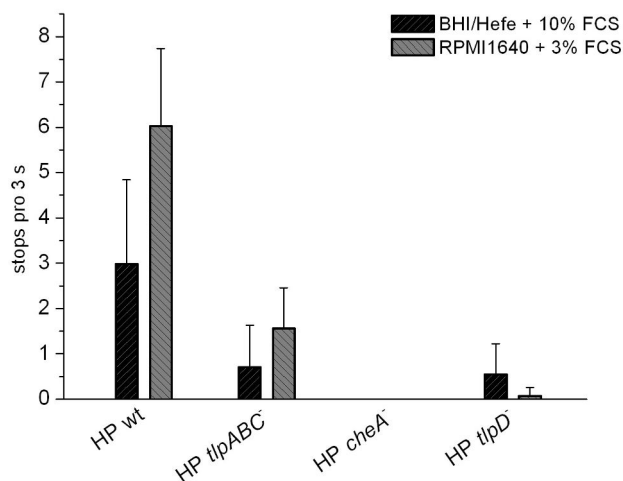


Abbildung 25: Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden in RPMI1640-Medium + 3% FCS und in BHI/Hefe-Medium+10% FCS der Stämme *H. pylori* N6, *H. pylori* N6 *tlpABC*, *H. pylori* N6 *cheAY2* und *H. pylori* N6 *tlpD*

7.3.6 Verhalten weiterer *H. pylori*-Wildstämme und ihrer *tlpD*-Mutanten

Aufgrund der hohen Variabilität von *H. pylori* können zum Teil stammspezifische Effekte bzw. Phänotypen auftreten. Es war daher wichtig auszuschließen, dass es sich bei dem beschriebenen Phänotyp der *tlpD*-Mutante um einen stammspezifischen Effekt oder ein Artefakt handelt. Daher wurden die Wildtypen und *tlpD*-Mutanten verschiedener *H. pylori*-Stämme in RPMI1640-Medium + 3% FCS untersucht. Um darüber hinaus mögliche Effekte des Kanamycin-Resistenzmarkers auszuschließen, wurde die Allelenuaustauschmutagenese von *tlpD* zusätzlich mit Hilfe einer Chloramphenicolresistenz durchgeführt. Die Konstruktion der Mutanten erfolgte in den Stämmen N6, 88-3887, B128 und HP87. Die Anzucht der Stämme erfolgte wie beschrieben (siehe Methoden 6.20). Zum Vergleich wurden quantitative Daten im *temporal assay* lediglich von den Stämmen N6 und HP87 erhoben. Die Stämme

88-3887 und B128 wurden bislang lediglich qualitativ bewertet. Bei der Verhaltensanalyse der Bakterien in RPMI1640-Medium + 3% FCS wurde festgestellt, dass sich die verschiedenen Wildstämme leicht unterschiedlich verhielten. So war die Durchschnittsgeschwindigkeit des *H. pylori*-Stammes HP87 mit 61,46 $\mu\text{m/s}$ signifikant höher als die des N6-Wildstammes (49,58 $\mu\text{m/s}$; $p = 0,0005$, *t*-Test). Auch die Anzahl der *stops* pro 3 Sekunden war im Stamm HP87 im Vergleich zu Stamm N6 höher (8,08 vs. 6,02; $p = 5,2 \times 10^{-5}$, *t*-Test). Der Phänotyp der *tlpD*-Mutanten war in allen untersuchten Stämmen dem der zuvor beschriebenen *tlpD*-Mutante in *H. pylori* N6 ähnlich. Zwar zeigten die chloramphenicolresistenten *tlpD*-Mutanten vereinzelt mehr *stops* (N6 *tlpD::Cm*: $0,67 \pm 0,94$; HP87 *tlpD::Cm*: $0,41 \pm 0,58$) als die vorher beschriebene kanamycinresistente *tlpD*-Mutante in *H. pylori* N6 ($0,07 \pm 0,18$), aber es war in beiden Fällen eine signifikante Abnahme der Anzahl an *stops* im Vergleich zum jeweiligen Wildstamm zu beobachten ($p = 6,3 \times 10^{-13}$ für N6 bzw. $p = 1,99 \times 10^{-15}$ für HP87, *t*-Test). Die Mutagenese hatte keine Wirkung auf die Bewegungsgeschwindigkeit der Bakterien. Die verschiedenen Mutanten bewegten sich mit ähnlicher Geschwindigkeit wie Bakterien des jeweiligen Wildstammes. Die Bewegungsmuster der Wildtypen und *tlpD*-Mutanten der Stämme 88-3887 und B128 wurden ebenfalls in RPMI1640-Medium mit Serum beobachtet. Da keine quantitativen Daten erhoben wurden, kann hier keine Aussage zur Durchschnittsgeschwindigkeit oder der absoluten Anzahl der *stops* gemacht werden. Auch in diesen Fällen wurde eine deutlich sichtbare Reduktion der *stops* durch eine Mutagenese des Gens *tlpD* beobachtet.

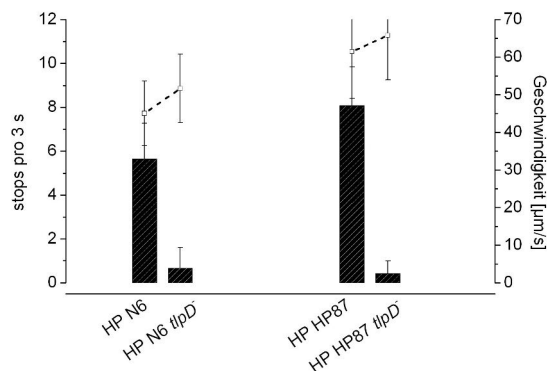


Abbildung 26: Verhalten einer *H. pylori*-N6-*tlpD::Cm*-Mutante und einer *H. pylori*-HP87-*tlpD::Cm*-Mutante in RPMI1640-Medium + 3% FCS Die Balken geben die durchschnittliche Anzahl der *stops* pro 3 Sekunden inklusive Standardabweichung an. Das offene Quadrat (\square) gibt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien inklusive Standardabweichung an.

7.3.7 Komplementierung von *tlpD* *in trans* rekonstituiert das Verhalten der Bakterien

Um auszuschließen, dass der für die *tlpD*-Mutante beschriebene Phänotyp auf polare Effekte zurückzuführen war, wurde die Mutante *in trans* komplementiert. Dazu wurde das Gen *tlpD* zusammen mit seinem eigenen Promotor 3'-terminal mit einem V5-*tag* fusioniert und in den *E. coli/H. pylori*-Shuttle-Vektor pHel2 kloniert und eine *H. pylori*-N6-*tlpD*-Mutante damit transformiert (siehe Methoden 6.9). Als Promotorregion wurden näherungsweise die 500 Basenpaare vor dem 5'-Ende des Gens definiert. Die Synthese des TlpD-V5-Fusionsproteins in der Plasmid-tragenden Transformante wurde mit Hilfe eines α -V5-Antikörpers in einer Westernblot-Analyse (siehe Methoden 6.16) überprüft und konnte bestätigt werden (Abbildung 27). In Spur 1 ist eine einzige Bande in einer für TlpD-V5 zu erwartenden Laufhöhe von ca. 50 kDa zu erkennen.

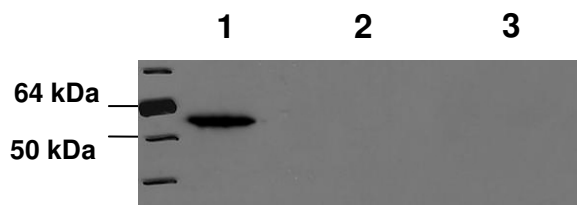


Abbildung 27: Westernblot-Analyse zur Überprüfung der Synthese des TlpD-V5-tag-Fusionsproteins in *H. pylori* N6 *tlpD*. Spur 1: Gesamtzelllysät der *H. pylori*-N6-*tlpD*/TlpD-V5-Mutante; Spur 2: Gesamtzelllysät der *H. pylori*-N6-*tlpD*-Mutante; Spur 3: Gesamtzelllysät des *H. pylori*-N6-Wildstammes; Primärer Antikörper: Maus- α -V5 (Invitrogen) 1:10.000; Sekundärer Antikörper: POX-Ziege α -Maus 1:25.000; Aufgetragen wurden jeweils 0,8 μ g pro Spur.

Die erhaltenen Klone mit dem TlpD-V5-Fusionsprotein wurden in RPMI1640-Medium mit Serum auf ihr Verhalten hin untersucht. Die Anzucht der Bakterien erfolgte wie beschrieben (siehe Methoden 6.20). Abbildung 23 zeigt eine Zunahme der Häufigkeit der *stops* in der *tlpD*/TlpD-V5-Transformante im Gegensatz zu der *tlpD*-Mutante. Im komplementierten Stamm konnten die *stops* also wieder hergestellt werden. Die Häufigkeit der *stops* (3,42 pro 3 s) lag unter der des Wildstammes (6,02 pro 3 s; $p = 2,14 \times 10^{-16}$, *t*-Test). Ein möglicher Grund hierfür könnte das unterschiedliche Expressionsniveau von TlpD im Wildstamm und im komplementierten Stamm sein. Die Geschwindigkeit des komplementierten Stammes war signifikant ($p = 2,9 \times 10^{-10}$; *t*-Test) niedriger (38,76 μ m/s) als im Wildstamm (49,58 μ m/s). Der rekonstituierte Phänotyp zeigt sich auch im Vergleich in den in Abbildung 23 beispielhaft gezeigten Bewegungsspuren einzelner Bakterien.

7.4 Untersuchung der Taxis von *H. pylori* N6 in *spatial assays*

In den *temporal assays* konnte gezeigt werden, dass sich metabolische Inhibitoren auf das Bewegungsmuster der Bakterien auswirken (siehe Abschnitt 7.2). Mit Hilfe eines *spatial assays* sollte nun untersucht werden, ob aus dem veränderten Bewegungsmuster auch ein echter taktischer Effekt, also eine räumliche Orientierung erfolgt. Dazu war es nötig das Verhalten der Bakterien entlang eines Substanzgradienten zu untersuchen. Dazu wurde ein *spatial assay* mit Chemotaxis- μ -Slides (siehe Methoden 6.21) etabliert. Die Chemotaxis- μ -Slides ermöglichen es, einen definierten Konzentrationsgradienten einzustellen und dann das Verhalten der Bakterien entlang desselben zu untersuchen. Im Vorfeld wurde gezeigt, dass niedrige Konzentrationen von Myxothiazol (1 μ M) in BHI/Hefe-Medium mit 10% Serum im Wildstamm zu einer erhöhten Anzahl an *stops* im Vergleich zu nicht-inhibierten Bedingungen führt (4,82 vs. 2,99; $p = 3,1 \times 10^{-5}$, *t*-Test; Abbildung 16). Eine erhöhte Anzahl an *stops* spricht für eine Fluchtreaktion (Macnab und Koshland, Jr., 1972). Eine Fluchtreaktion wäre im Falle von Energietaxis gegenüber metabolischen Inhibitoren zu erwarten, da die gemessenen Werte metabolischer Aktivität (ATP-Werten) in Anwesenheit metabolischer Inhibitoren graduell abfallen (siehe Abschnitt 7.2.2; Abbildung 14). In den Chemotaxis- μ -Slides ist also eine Orientierung der Bakterien entgegen der steigenden Inhibitorkonzentration zu erwarten. Zur Versuchsdurchführung wurden die Bakterien für ca. 16 Stunden auf Blutagarplatten vorkultiviert und anschließend in BHI/Hefe-Medium mit 10% FCS aufgenommen. In ein Reservoir der Slides wurden 1×10^8 Bakterien in einem Volumen von 18 μ l eingebracht; in das gegenüberliegende Reservoir wurden 18 μ l Myxothiazol (30 μ M) (siehe Methoden 6.21) eingebracht. Die Konzentration des Myxothiazols (30 μ M) wurde entsprechend der Herstellerangaben so gewählt, dass entlang der Übergangszone zwischen den beiden Reservoiren ein Konzentrationsgradient von 0 μ M bis 10 μ M vorlag. Die Beweglichkeit und die *stops* der Bakterien wurden mikroskopisch beobachtet. Als Maß für die Reaktion der Bakterien auf den Schreckstoff Myxothiazol wurde die Anzahl der Bakterien bestimmt, welche innerhalb von zwei Stunden entgegen steigender Myxothiazol-Konzentration in das gegenüberliegende Reservoir wanderten (siehe Methoden 7.2). In Tabelle 17 wird ersichtlich, dass Bakterien des *H. pylori*-N6-Wildstammes mit einer negativen Antwort auf Myxothiazol reagierten und kaum in das gegenüberliegende Reservoir ($1,4 \pm 0,2$ Bakterien) einwanderten. Lag dagegen kein Schreckstoffgradient vor, befanden sich im gegenüberliegenden Reservoir ca. 63 Bakterien, was auf eine ungehinderte Passage der Bakterien hindeutete. Im Gegensatz dazu befanden sich im Falle der *tlpD*-Mutante eine vergleichbare Anzahl an Bakterien im gegenüberliegenden Reservoir unabhängig davon, ob ein Myxothiazolgradient vorlag oder nicht (Tabelle 17). TlpD schien also unter den gewählten Bedingungen für eine Reaktion auf den Gradienten des metabolischen Inhibitors essenziell zu sein.

Die *tlpABC*-Mutante, welche als Sensor nur TlpD trägt, wies einen intermediären Phänotyp zwischen dem Wildstamm und der *tlpD*-Mutante auf. Während ohne Myxothiazolzugabe noch 48 Zellen in das zweite Reservoir wanderten, befanden sich bei Vorliegen eines Inhibitorgradienten signifikant ($p = 0,017$) weniger Zellen (ca. 26,3) im beobachteten Bereich (Tabelle 17). Der Effekt war aber geringer als im Wildstamm.

Tabelle 17: Anzahl der Bakterienzellen, die in den verwendeten Chemotaxis- μ -Slides in das zweite Reservoir wanderten.

Mutante	Anzahl der Zellen ohne Myxothiazol	Anzahl der Zellen mit Myxothiazol
<i>H. pylori</i> N6 wt	63 \pm 9,2	1,4 \pm 0,2
<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpD</i>	37 \pm 8,6	24 \pm 4,9
<i>H. pylori</i> N6 <i>tlpABC</i>	48 \pm 4,8	26 \pm 1,2

7.5 Untersuchung verschiedener Substanzen in ihrer Wirkung auf das Verhalten von *H. pylori*

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass es bei *H. pylori* eine taktische Antwort gibt, die von der Aktivität des bakteriellen Metabolismus abhängt. Der Mechanismus der Wahrnehmung ist bisher unklar. Um diesen genauer zu untersuchen, wurde die Wirkung weiterer Substanzen auf das Verhalten von *H. pylori* in Flüssigmedium und im *spatial assay* qualitativ untersucht. Es wurden Untersuchungen mit einer Reihe von Quinonen (Benzoquinon, Dichlorobenzoquinon, Methylnaphtoquinon, Naphtoquinon), einem Inhibitor der terminalen Oxidase (KCN) (Nagata *et al.*, 2001), einem Protonenpumpeninhibitor (Omeprazol), einem Katalaseinhibitor (Amino-Triazol), einem wachstumshemmenden Eisenchelator (Desferroxamin) (Dial *et al.*, 1998), einem Inhibitor der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Nitoxozanid) (St Maurice *et al.*, 2007) und verschiedenen Redox- und Energieäquivalenten (NAD, NADP, FAD, ATP) durchgeführt (siehe Diskussion 8.6).

Omeprazol ist ein Inhibitor der gastrischen H^+/K^+ -ATPase (Fellenius *et al.*, 1981) und es wurde bereits eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *H. pylori* gezeigt (Iwahi *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1991). Der exakte Wirkmechanismus von Omeprazol auf *H. pylori* ist jedoch nicht aufgeklärt (siehe Diskussion 8.6).

Statistisch auswertbare, quantitative Daten konnten bisher lediglich aus den Experimenten mit Omeprazol gewonnen werden (Abbildung 28). Erste qualitative Beobachtungen aus den Experimenten der Untersuchungen der anderen Substanzen werden daher lediglich in der Diskussion kurz angesprochen. Für die Untersuchung der Wirkung von Omeprazol wurde der *H. pylori*-N6-Wildstamm in RPMI1640-Medium + 3% FCS nach Zugabe verschiedener Omeprazolkonzentrationen beobachtet (Abbildung 28), und die Anzahl der *stops* sowie die Geschwindigkeit bestimmt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte

wie beschrieben (siehe Methoden 6.20). Die Anzahl der *stops* fiel mit steigender Omeprazolkonzentration linear ab. Ab einer Konzentration von mehr als 350 μM zeigten die Bakterien keine *stops* mehr. Die Bakterien sind mit einer Geschwindigkeit von ca. 30 $\mu\text{m/s}$ langsamer als unter ungehemmten Bedingungen, aber noch gut beweglich. Die beobachteten Verhaltensänderungen (Verringerung der Anzahl an *stops*, verlangsamte Bewegungsgeschwindigkeit) begründet sich möglicherweise in einer Hemmung der bakteriellen Atmungskette (NADH-Dehydrogenase), wie sie bereits für das nahe verwandte Lansoprazol gezeigt wurde (Nagata *et al.*, 2001) (siehe Diskussion 8.6).

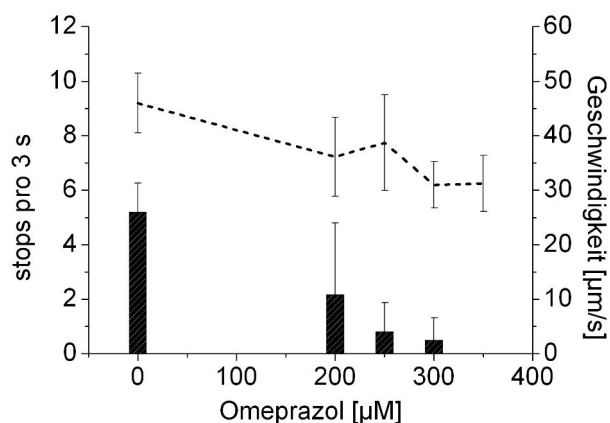


Abbildung 28: Verhalten von *H. pylori* N6 in RPMI1640-Medium + 3% FCS in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an Omeprazol. Die Balken geben die durchschnittliche Anzahl der *stops* pro 3 Sekunden inklusive Standardabweichung an. Die gestrichelte Linie gibt die durchschnittliche Geschwindigkeit der Bakterien inklusive Standardabweichung an.

7.6 Lokalisierung von TlpD in *H. pylori* N6

7.6.1 TlpD ist in der löslichen und in der unlöslichen Fraktion von *H. pylori* lokalisiert

Der Sensor TlpD, für welchen in den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit eine zentrale Rolle im metabolismusabhängigen Verhalten gezeigt wurde, besitzt im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Sensoren von *H. pylori* keine vorhergesagten Transmembrandomänen. Die genaue Lokalisierung des Proteins ist unklar. Für verschiedene bakterielle Sensoren ohne Transmembrandomänen wurden unterschiedliche Arten der Lokalisierung in der Bakterienzelle, wie zytosolisch, z.B. für TlpC aus *R. sphaeroides* oder auch membranär z.B. für McpS aus *P. aeruginosa* beschrieben (siehe Einleitung 4.2.4). Die Lokalisierung des Sensors TlpD kann möglicherweise einen Hinweis auf den Mechanismus der Reizwahrnehmung geben. Der oben beschriebene Komplementationsstamm, der eine TlpD-V5-tag-Fusion exprimiert, erleichterte aufgrund der hohen Spezifität des verfügbaren α -

V5-Antikörpers die genauere Aufklärung der Lokalisierung des Proteins, die zuerst durch eine Westernblot-Analyse einzelner bakterieller Zellfraktionen vorgenommen wurde. Bakterien der Stämme *H. pylori* N6 wt, N6 *tlpD* und N6 *tlpD/TlpD-V5* wurden für eine grobe Fraktionierung mit Ultraschall aufgeschlossen, mittels Zentrifugation in ihre löslichen und unlöslichen Bestandteile aufgetrennt (siehe Methoden 6.14) und mit SDS-PAGE und Westernblots analysiert (siehe Methoden 6.15). In Abbildung 29 ist zu sehen, dass TlpD in der unlöslichen und in der löslichen, zytosolischen Fraktion detektiert werden konnte. Dies war sowohl mit dem α -V5-Antikörper als auch mit einem α -*E. coli*-Tsr-Antiserum möglich. In der löslichen Fraktion, die vorwiegend cytoplasmatische Proteine enthält, konnte im komplementierten Stamm (*H. pylori tlpD/TlpD-V5*) mehr TlpD detektiert werden als im Wildstamm. Ein möglicher Grund hierfür ist die Plasmidlokalisierung des für TlpD-V5 kodierenden Gens. Damit kommt für dieses Gen eine auch in den Gesamtzelllysaten beobachtete Überexpression durch die Verwendung des pHel2-basierten Vektors pCJ522 zustande, welcher in zwei bis fünf Kopien in der Bakterienzelle vorliegt (Heuermann und Haas, 1998). In der Membranfraktion dagegen war die Menge an TlpD in Wildstamm und komplementierter Mutante ähnlich.

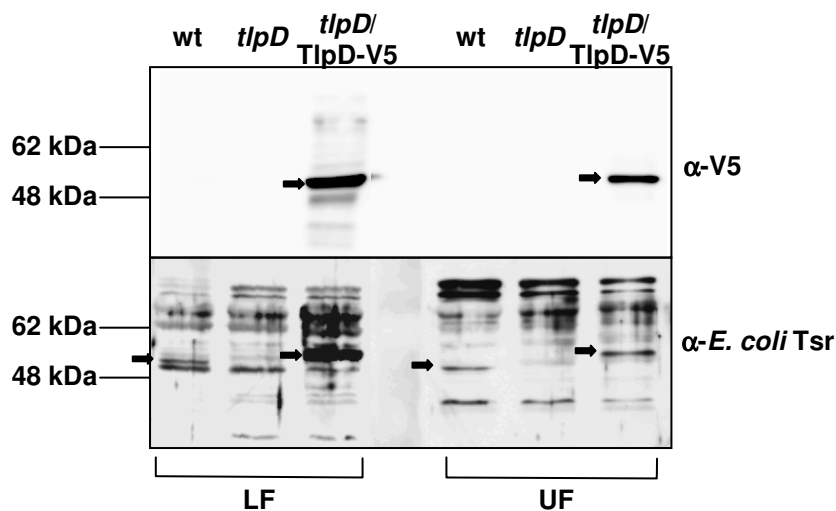


Abbildung 29: Westernblot-Analyse zum Nachweis von TlpD im *H. pylori*-N6-Wildstamm, in der *H. pylori*-N6-*tlpD*-Mutante und in der *H. pylori*-N6-*tlpD/TlpD-V5*-Mutante. LF: lösliche Fraktion; UF: unlösliche Fraktion. Die gefüllten Pfeile deuten jeweils auf die TlpD-spezifische Bande. Primärer Antikörper: Maus- α -V5 1:10.000 bzw. Kaninchen- α -Tsr 1:1.000. Sekundärer Antikörper: POX-Ziege- α -Maus 1:25.000 bzw. POX-Ziege- α -Kaninchen 1:25.000.

7.6.2 Nachweis von TlpD in intakten Bakterien durch Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisierung von TlpD innerhalb des Cytosols und der Membran genauer zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Ziel dieses Versuches war es, mögliche Cluster an Sensorprotein in Cytosol und Membran, beispielsweise an den Zellpolen, so wie sie bereits für eine Reihe andere Spezies beschrieben wurden (siehe Einleitung 4.2.4), sichtbar zu machen. Bakterien der *tlpD*/TlpD-V5-Mutante wurden fixiert, permeabilisiert und TlpD-V5 mit Hilfe eines spezifischen α -V5 Antikörpers detektiert (siehe Methoden 6.19). In Abbildung 30 ist zu sehen, dass TlpD-V5 sowohl im Cytoplasma als auch angereichert nahe der Peripherie nachgewiesen werden konnte. Eine deutliche Akkumulation in Clustern z.B. nahe den Polen konnte nicht regelmäßig festgestellt werden. In den entsprechenden Kontrollen (*H. pylori*-N6-Wildstamm, *H. pylori*-N6-*tlpD*-Mutante) konnte in Kontrollfluoreszenzpräparaten kein Signal nachgewiesen werden (Abbildung 31). Teilweise waren stärkere Anhäufungen von Signalintensität nahe an einer Polkappe oder in der mittleren Region eines Bakteriums zu beobachten (siehe Diskussion 8.7).

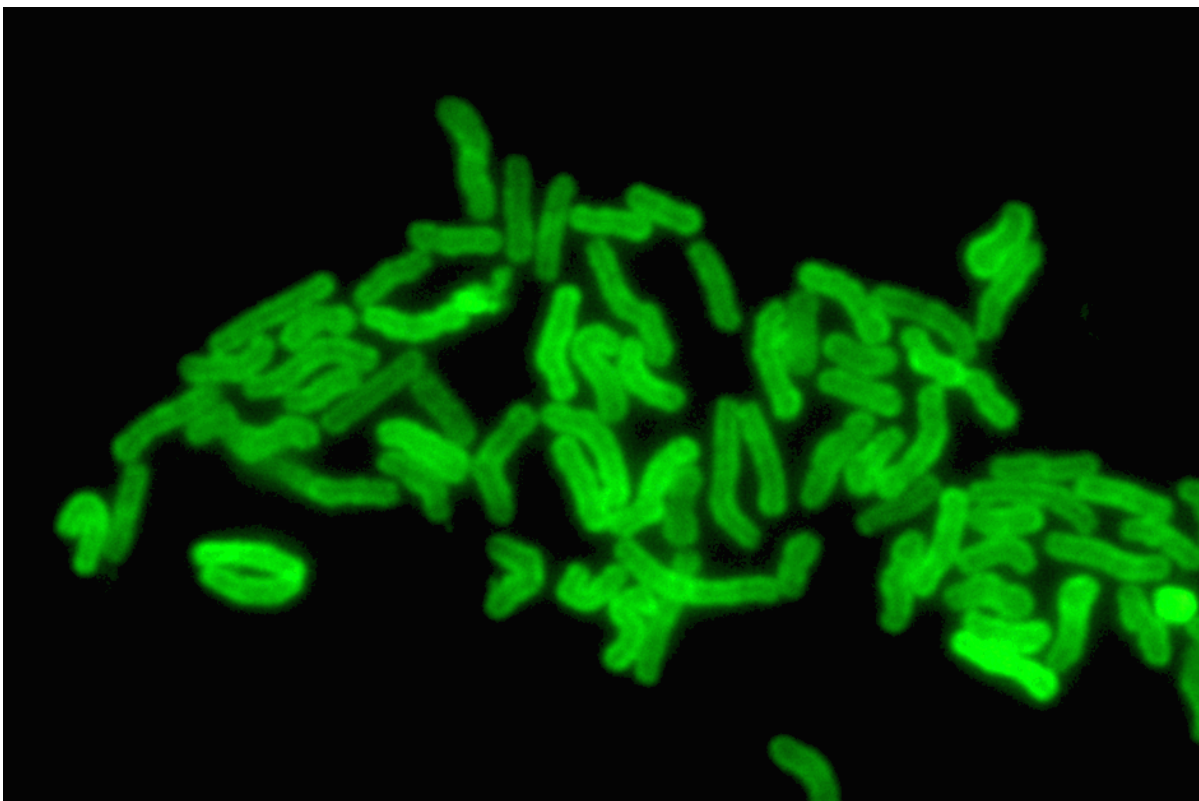


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung von *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5. Primärer Antikörper: Maus- α -V5 (1:1.000). Sekundärer Antikörper: Alexa⁴⁸⁸-Ziege α -Maus (1:5.000)

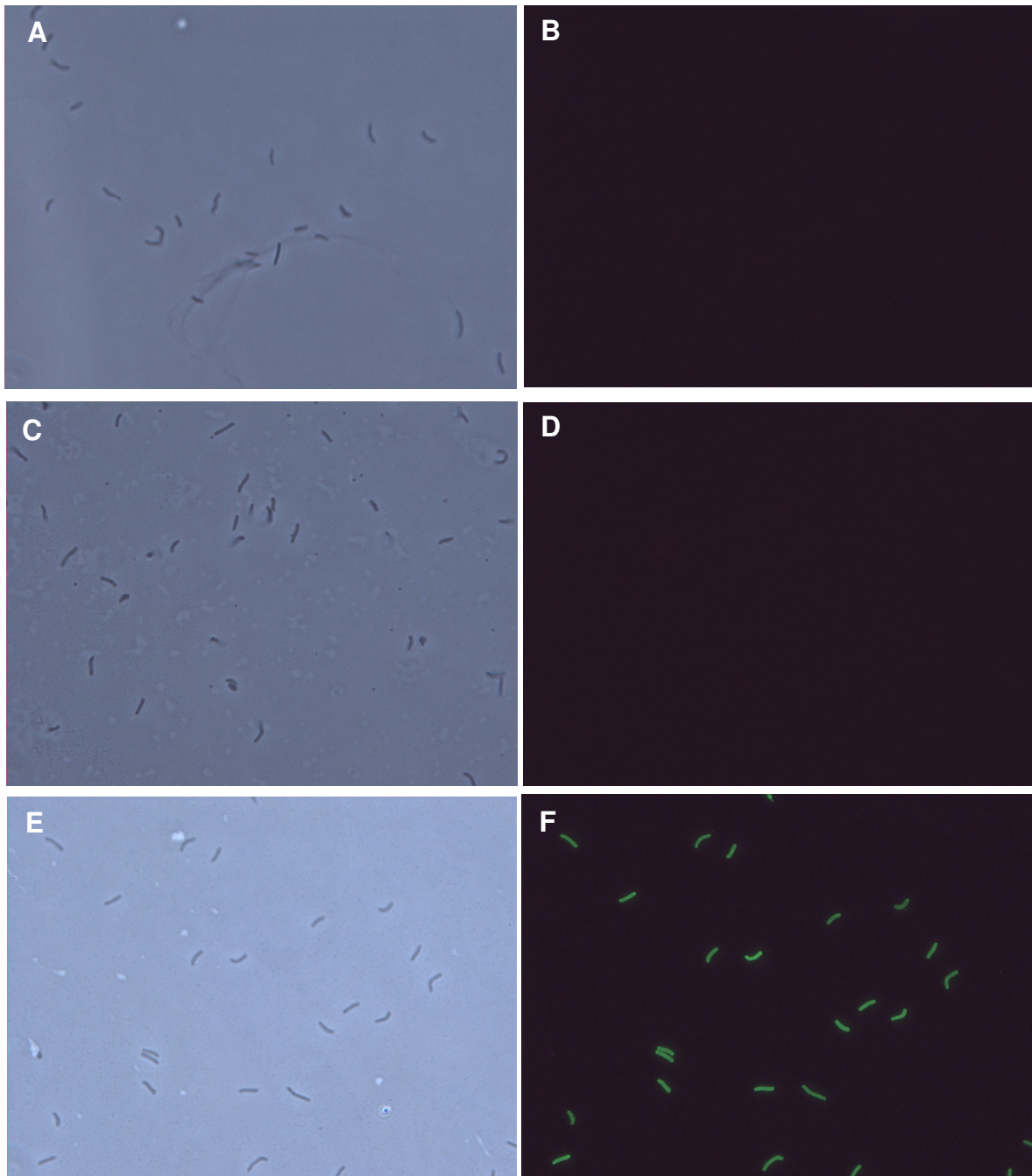


Abbildung 31: Immunfluoreszenz unterschiedlicher *H. pylori*-N6-Mutanten als Kontrolle; Primärer Antikörper: Maus- α -V5 (1:1.000). Sekundärer Antikörper: Alexa⁴⁸⁸-Ziege- α -Maus (1:5.000)
A: *H. pylori*-N6-Wildstamm; Durchlichtaufnahme; **B:** *H. pylori*-N6-Wildstamm; Fluoreszenzaufnahme;
C: *H. pylori*-N6-*tlpD*-Mutante; Durchlichtaufnahme; **D:** *H. pylori*-N6-*tlpD*-Mutante; Fluoreszenzaufnahme; **E:** *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5; Durchlichtaufnahme; **F:** *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5; Fluoreszenzaufnahme.

7.7 Charakterisierung der funktionellen Verknüpfung möglicher Interaktionspartner von TlpD

In den oben beschriebenen Experimenten (Westernblot-Analyse, Immunfluoreszenz) konnte gezeigt werden, dass sich TlpD außer in der löslichen Fraktion auch in der Membranfraktion befindet. Da TlpD keine vorhergesagten Transmembrandomänen besitzt, ist der Mechanismus der Lokalisierung in der Membran unklar. Eine mögliche Erklärung dafür ist ein Membrananker oder eine Interaktion mit einem anderen Protein, welches in der Membran verankert oder mit der Membran assoziiert ist. In den folgenden Abschnitten werden Experimente beschrieben, durch die die Auswirkungen verschiedener möglicher Interaktionspartner auf die Lokalisierung von TlpD untersucht wurden. Bisher konnte lediglich die Existenz der Energiewahrnehmung durch TlpD gezeigt werden, jedoch nicht der Mechanismus aufgeklärt werden. Daher wäre von Vorteil, wenn die Identifizierung möglicher Interaktionspartner neben der Aufklärung des Mechanismus der Membranlokalisierung auch Hinweise zu Mechanismen der Energiewahrnehmung durch TlpD liefern könnte. Da TlpD im sensorischen Bereich keine eindeutige Homologie zu charakterisierten Energiesensoren aufweist, zogen wir als alternatives Funktionsmodell in Betracht, die Energiewahrnehmung geschähe möglicherweise mit Hilfe eines Interaktionspartners.

7.7.1 Untersuchung der Beteiligung der Histidinkinase CheAY2 und der Sensoren TlpA, TlpB und TlpC an der Lokalisierung von TlpD

Die heteropolymere Molekülanordnung und Proteininteraktionen im Chemotaxisapparat in anderen Bakterienspezies (Maddock und Shapiro, 1993; Sourjik und Berg, 2000; Ames *et al.*, 2002; Studdert und Parkinson, 2005) legt eine Interaktion von TlpD mit der Histidinkinase CheAY2 sowie mit den anderen Sensoren TlpA, TlpB und TlpC nahe. Die Histidinkinase CheAY2 leitet wahrscheinlich das Signal der Sensoren über CheY1 weiter zum Flagellenapparat (siehe Einleitung 4.2.1). In *E. coli* wurde zusätzlich eine Interaktion verschiedener Sensordimere und eine daraus resultierende Stabilisierung der Funktion und Lokalisierung beschrieben (Ames *et al.*, 2002; Studdert und Parkinson, 2005). Um eine mögliche Rolle der genannten Proteine in der Lokalisierung von TlpD zu untersuchen, wurden Bakterien der Stämme *H. pylori* N6 *cheAY2* und *tlpABC* mit Ultraschall aufgeschlossen, durch Zentrifugation fraktioniert und mit Hilfe einer SDS-PAGE und eines Westernblots analysiert (siehe Methoden 6.15 und 6.16). Während in der *tlpABC*-Mutante TlpD wie beim Wildstamm in der unlöslichen Fraktion zu finden war, ließ sich das Protein in der *cheAY2*-Mutante nicht mehr in der unlöslichen Fraktion detektieren (Abbildung 32).

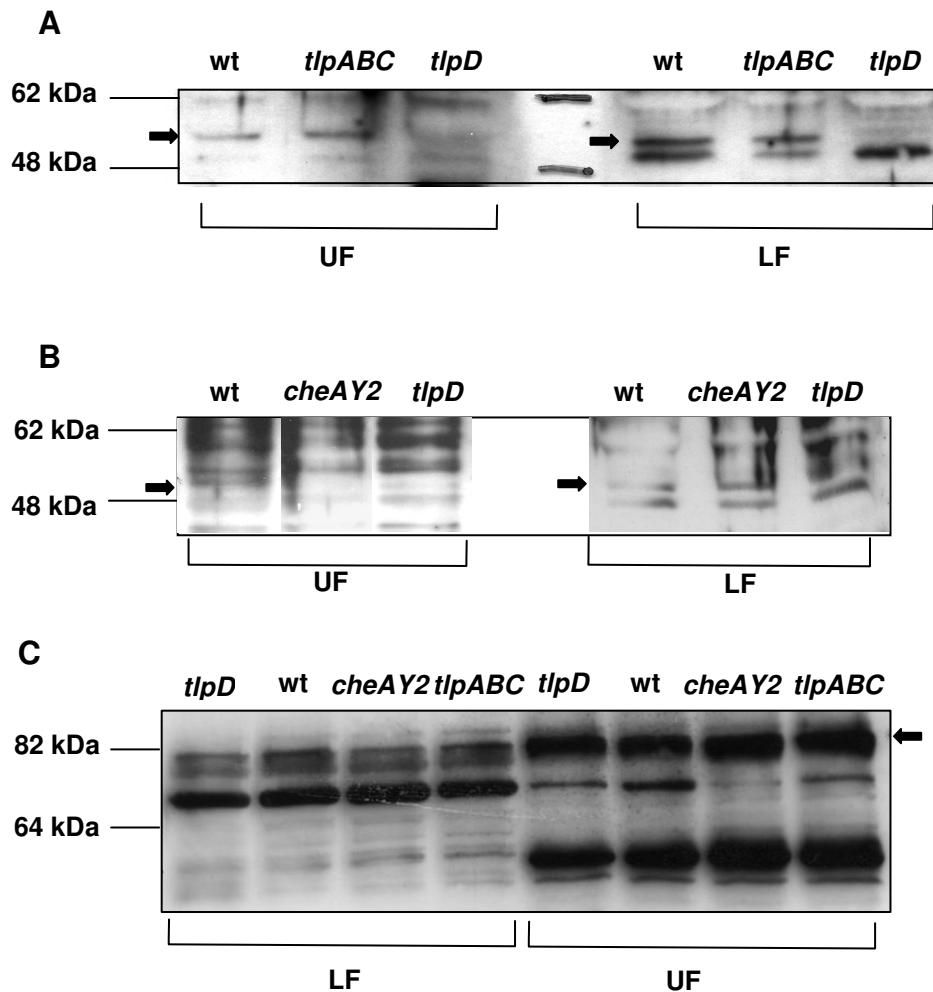


Abbildung 32: Westernblot-Analyse zum Nachweis von TlpD in der löslichen und unlöslichen Fraktion der Stämme *H. pylori* N6, *H. pylori* N6 *tlpABC* (A) und *H. pylori* N6 *cheAY2* (B). Primärer Antikörper: Kaninchen- α -*E. coli*-Tsr (1:1.000). Sekundärer Antikörper: POX-Ziege- α -Kaninchen (1:20.000). Die Pfeile deuten jeweils auf die TlpD-spezifische Bande. **C: Fraktionierungskontrolle der einzelnen *H. pylori*-Mutanten.** Primärer Antikörper: Kaninchen- α -FlhA (1:2.000). Sekundärer Antikörper : POX-Ziege- α -Kaninchen (1:10.000). Der Pfeil deutet auf die FlhA-spezifische Bande. **UF:** unlösliche Fraktion; **LF:** lösliche Fraktion

Zusätzlich wurden Mutanten analysiert, welche das TlpD-V5 überexprimierten (*H. pylori* N6 Wildstamm TlpD-V5; *H. pylori cheAY2* TlpD-V5; *H. pylori tlpABC* TlpD-V5; Tabelle 10). Die Verwendung des α -V5-Antikörpers erlaubte eine sensitivere Detektion von TlpD. Hier zeigte sich bezüglich der Membranfraktionen ein anderes Bild: TlpD-V5 konnte in den unlöslichen Fraktionen aller untersuchten Mutanten detektiert werden (Abbildung 33): Wildstamm/TlpD-V5 (Spur 6), *cheAY2*/TlpD-V5 (Spur 7) und *tlpABC*/TlpD-V5 (Spur 8). Zum Vergleich: In der *cheAY2*-Mutante war der Nachweis von nativen TlpD in der Membranfraktion mit α -*E. coli*-Tsr-Antikörper (Abbildung 32) nicht möglich. Für die löslichen Fraktionen der verschiedenen Mutanten konnten die erhaltenen Ergebnisse reproduziert werden. TlpD-V5 konnte in der löslichen Fraktion des Wildstammes (Spur 1), der

cheAY2/TlpD-V5-Mutante (Spur 2), der *tlpABC*/TlpD-Mutante (Spur 3) und der *tlpD*/TlpD-V5-Mutante (Spur 4) nachgewiesen werden (Abbildung 33). Kein TlpD-V5 wurde im Gesamtzelllysat der *tlpD*-Mutante (Spur 5) gefunden. Auffällig war, dass sowohl in der *cheAY2*- (Spur 7) als auch in der *tlpABC*-Mutante (Spur 8) weniger TlpD-V5 in der unlöslichen Fraktion zu finden war als in der unlöslichen Fraktion des Wildstammes. Dies spricht womöglich für einen stabilisierenden Effekt der Proteine CheAY2 bzw. TlpA, TlpB und TlpC auf die Lokalisierung von TlpD-V5 in der Membran (siehe Diskussion 8.7).

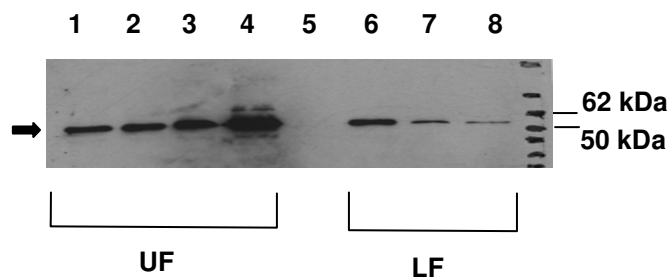


Abbildung 33: Westernblot-Analyse zum Nachweis von TlpD-V5 in der löslichen und unlöslichen Fraktion der Stämme *H. pylori* N6 TlpD-V5, *H. pylori* N6 *tlpABC*/TlpD-V5 und *H. pylori* N6 *cheAY2*/TlpD-V5. Primärer Antikörper: Maus α -V5 (Invitrogen) (1:10.000). Sekundärer Antikörper: POX-Ziege- α -Maus (1:25.000); **LF**: lösliche Fraktion. **UF**: unlösliche Fraktion. Der Pfeil deutet auf die TlpD-V5-spezifische Bande. **1**: *H. pylori* N6 TlpD-V5; lösliche Fraktion; **2**: *H. pylori* N6 *cheAY2*/TlpD-V5; lösliche Fraktion; **3**: *H. pylori* N6 *tlpABC*/TlpD-V5; lösliche Fraktion; **4**: *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-V5; lösliche Fraktion; **5**: *H. pylori* N6 *tlpD*; Gesamtzelllysat; **6**: *H. pylori* N6/TlpD-V5; unlösliche Fraktion; **7**: *H. pylori* N6 *cheAY2*/TlpD-V5; unlösliche Fraktion, **8**: *H. pylori* N6 *tlpABC*/TlpD-V5; unlösliche Fraktion

7.7.2 Untersuchung der Beteiligung von HP0697 und HP1033 an der Lokalisierung von TlpD

Sowohl die membranäre Lokalisierung von TlpD, als auch die Wahrnehmung der metabolischen Verhältnisse hängt möglicherweise mit einem bislang unbekanntem Interaktionspartner zusammen. Daher sind in diesem Zusammenhang die Proteine von Interesse, für die Hinweise auf eine Interaktion mit TlpD vorliegen. Zwei weitere potenzielle Interaktionspartner des Proteins TlpD wurden mit Hilfe einer Yeast-Two-Hybrid-Analyse (Hybrigenics, <http://pim.hybrigenics.com>) identifiziert und von uns in Datenbanken gefunden. Laut der öffentlich zugänglichen Datenbank von Hybrigenics ist das Produkt des Gens HP1033 ein TlpD-Interaktionspartner der Kategorie A (e-Wert: 10^{-500}). Das Produkt des Gens HP0697 wurde als Interaktionspartner der Kategorie B klassifiziert (e-Wert: 10^{-8}). Die e-Werte, die die Fehlerwahrscheinlichkeit für die gefundene Interaktion angeben, sind sehr niedrig. Daher ist im vorliegenden Fall die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die gefundenen experimentellen Interaktionen eine echte Interaktion *in vivo* bedeuten. Die Kategorie gibt entsprechend des e-Wertes die Verlässlichkeit der beobachteten Interaktion an, wobei

Interaktionen der Kategorie A die verlässlichsten sind. Aufgrund dieser zuverlässigen Vorhersagen wurden Mutanten in den Genen HP0697 und HP1033 für weitere Untersuchungen konstruiert. Das Gen HP1033 ist bislang nicht annotiert und weist keine Homologien zu charakterisierten Proteinen in den Datenbanken auf (BLAST-Suche in NCBI-nr-Datenbank vom 7.01.2009; Version 2.2.19+). Seine Funktion ist somit unbekannt. Das Gen HP0697 kodiert für die Gammauntereinheit der Acetocarboxylase (Annotation des homologen Gens HPAG_0682 im Stamm *H. pylori* HPAG1; Oh *et al.*, 2006). Die Gene wurden jeweils mittels der Plasmide pCJ532 bzw. pCJ537 in einer allelischen Austauschmutagenese durch eine Kanamycinresistenzkassette unterbrochen und so ausgeschaltet (Tabelle 9, Tabelle 10, Methoden 6.12). Nächstes Ziel war, zu beobachten, ob sich TlpD-vermittelte Funktionen oder die Lokalisierung von TlpD in den Mutanten ändern. Die Mutanten wurden für ca. 16 h auf Blutagarplatten angezüchtet und anschließend in 0,9% NaCl aufgenommen und gewaschen. Die Bakterien wurden mit Ultraschall aufgeschlossen, mittels Zentrifugation fraktioniert und mit Hilfe einer SDS-PAGE und einer Westernblot-Analyse in Bezug auf die Lokalisierung von TlpD hin analysiert (siehe Methoden 6.14, 6.15 und 6.16). In Abbildung 34 ist zu sehen, dass TlpD in beiden Mutanten in den unlöslichen Fraktionen detektiert wurde (Spur 2 und 4). Auffallend war, dass in der Mutante HP0697 TlpD nicht in der löslichen Fraktion detektiert wurde (Spur 1).

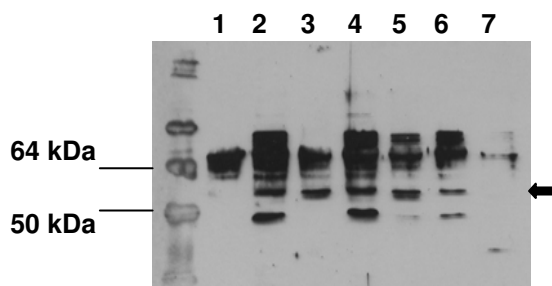


Abbildung 34: Westernblot-Analyse zum Nachweis von TlpD in der löslichen und unlöslichen Fraktion der Stämme *H. pylori* N6, *H. pylori* N6 HP0697 und *H. pylori* N6 HP1033. Primärer Antikörper: Maus- α -*E. coli*-Tsr (1:1.000). Sekundärer Antikörper: POX-Ziege- α -Maus (1:20.000). Der Pfeil deutet auf die TlpD-spezifischen Bande. **1:** *H. pylori* N6 HP0697; lösliche Fraktion; **2:** *H. pylori* N6 HP0697; unlösliche Fraktion; **3:** *H. pylori* N6 HP1033; lösliche Fraktion; **4:** *H. pylori* N6 HP1033; unlösliche Fraktion; **5:** *H. pylori* N6; lösliche Fraktion; **6:** *H. pylori* N6; unlösliche Fraktion; **7:** *H. pylori* N6 *tlpD*; Gesamtzelllysat

Darüber hinaus wurden die beiden Mutanten auch in Flüssigmedium (RPMI1640 + 3% FCS) bezüglich ihres Verhaltens untersucht. Bislang wurden keine quantitativen Daten erhoben. Es fand lediglich eine qualitative Beurteilung des Phänotyps statt. Es konnten dabei keine offensichtlichen Unterschiede im Vergleich zum Verhalten des Wildstammes festgestellt werden. Die übrigen aus publizierten Arbeiten (Hybrigenics) ersichtlichen potenziellen Interaktionspartner der Gene HP0697 und HP1033 wurden ebenfalls dokumentiert und auf einen möglichen Zusammenhang zum Chemotaxisapparat überprüft.

Alle bekannten potenziellen Interaktionspartner der Genprodukte von HP0697 und HP1033 erlaubten bisher keine weitere Hypothese bezüglich der Art und Funktion der Interaktion von HP0697 und HP1033 mit TlpD (Tabelle 18).

Tabelle 18: Potenzielle Interaktionspartner von HP0697 und HP1033. In der Tabelle sind jeweils die Gennamen und die Annotation der potenziellen Interaktionspartner angegeben. Außerdem wird die statistische Klassifizierung der Interaktion angegeben. Alle Angaben laut <http://pim.hybrigenics.com>

Protein	Interaktionspartner	Annotation	Kategorie (e-Wert)
HP0697	DnaG	DNA Primase	A (10^{-500})
	HP0696	N-Methylhydantoinase	A (10^{-28})
	HP1423	Vorhergesagte kodierende Region	A (10^{-17})
	AroQ	3-Dehydroquinat-dehydratase	B (10^{-11})
	TlpD	Chemosensor	B (10^{-8})
	HypF	Transkriptionsregulator	C (10^{-5})
HP1033	TlpD	Chemosensor	A (10^{-500})
	FutB	Alpha1,3-fucosyltransferase	C (10^{-4})

Weitere mögliche Interaktionspartner von TlpD konnten im Interaktom von *C. jejuni* gefunden werden (Parrish *et al.*, 2007). Das zu TlpD homologe Protein Cj0488c zeigte Interaktionen zu den Proteinen CheV, TrpF (N-(5-phosphoribosyl)-Anthranilat-Isomerase), PyrH (Uridylat-Kinase), Cj0854c und Cj1680c. Zu den Genen *cheV*, *trpF* und *pyrH* finden sich die entsprechenden Homologen in *H. pylori*, lassen jedoch zur Zeit keine Hypothese zum Mechanismus der Energiewahrnehmung zu. Zu Cj1680c findet sich in *H. pylori* kein homologes Protein. Das zu Cj0854c homologe Protein ist das hypothetische, periplasmatische Protein HP0236. Da zu diesen möglichen Interaktionspartnern bislang keine weiteren experimentellen Untersuchungen stattgefunden haben, wird auf diese Möglichkeiten der Interaktion lediglich in der Diskussion näher eingegangen (siehe Diskussion 8.7).

7.7.3 Untersuchung der Beteiligung von HP0600 an der Funktion von TlpD

Als weiterer möglicher Kandidat für eine Interaktion mit TlpD erschien das Produkt des unmittelbar benachbarten, im gleichen Operon organisierten, nicht annotierten Gens HP0600 (Stamm KE26695). Eine Analyse der Sequenz (siehe Methoden 6.6) im Stamm *H. pylori* N6

im Vorfeld einer möglichen Mutagenese ergab, dass das Gen HP0600 im Stamm *H. pylori* N6 im Vergleich zum sequenzierten Stamm KE26695 nur unvollständig vorliegt. Lediglich 26 bp am 5´-Ende und 86 bp am 3´-Ende des Gens sind als zusammenhängender kleiner offener Leserahmen vorhanden; die dazwischen liegenden 1670 bp sind deletiert (Abbildung 35). HP0600 spielt also vermutlich keine Rolle in Funktion und Lokalisierung von TlpD in der Membran im Stamm *H. pylori* N6, da das Gen HP0600 praktisch nicht existiert. Zusätzlich wurden Allelenaustauschmutanten im Gen HP0600 in den Stämmen B128 (an die Mongolische Rennmaus adaptierter Stamm) und L7 (asiatisches Isolat mit guter Transformierbarkeit) konstruiert (Tabelle 10), um den Effekt des Verlust des Gens in Wildstämmen mit einer funktionellen Kopie des Gens HP0600 zu untersuchen. Bei der Untersuchung der Allelenaustauschmutanten im Gen HP0600 in *temporal assays* in den Stämmen *H. pylori* B128 und L7 in RPMI1640-Medium + 3% FCS konnten keine offensichtlichen phänotypischen Auffälligkeiten in Bezug auf Anzahl der *stops* und Geschwindigkeit beobachtet werden. Da, basierend auf den Untersuchungen im Stamm *H. pylori* N6, eine Beteiligung des Gens HP0600 in der Funktion von TlpD unwahrscheinlich erschien, fand die Beurteilung des Phänotyps der Mutanten HP0600 in B128 und L7 bisher lediglich qualitativ statt. Quantitative Daten wurden nicht erhoben.

```

N6      : *          20          *          40          *          60          *          80          *          100         *          120
KE26695 : ATGCAAAACACAAAGGATACCATAAAAGCATTTCCTCTAAGGACTTTCATTTTACTCTATAAAAGCTCACCAAAATGTGTGTGGCATCAATTACAGTGTCTATTTATCGGCATTATT : 26
          ATGCAAAACACAAAGGATACCATAAAAGCATTTCCTCTAAGGACTTTCATTTTACTCTATAAAAGCTCACCAAAATGTGTGTGGCATCAATTACAGTGTCTATTTATCGGCATTATT : 120
          ATGCAAAACAC AA GGATACCATAAA

N6      : *          140         *          160         *          180         *          200         *          220         *          240
KE26695 : CCATCTATAAATATTTCTTGTATGATAAGATTGATTGATATTGGTAAACCTATTGCAAAAATCATACGCATTTTGAATACAGCTTGCTGTTACCAACTTTGCTACTATGGGGAGCCTTTG : 240

N6      : *          260         *          280         *          300         *          320         *          340         *          360
KE26695 : DTGTTTTTAACGCATGTGTTCTCAGGAATTTTCATCAAGCTTGCAAAACCAATTATTGCTGAACAATTTTCTATAAAACATCATCACTCAGCTTGCTAATAAACTCACAAAAGTTAAAAATCTA : 360

N6      : *          380         *          400         *          420         *          440         *          460         *          480
KE26695 : AAATTTTTTGA AAAACAAGATCACACTATTAAGCTTAACGCTATCCACAACGGTCTATACATCCGTCGCCCTAAATTTATGTCAGTAATCTATTTTTTAACTTGCAACGCATTATAGGGCTT : 480

N6      : *          500         *          520         *          540         *          560         *          580         *          600
KE26695 : GTGAGTCTGTTGGGATATTTTCCATTAGTATTTTACTACCCCTTTATAATGATTTTTGCAACAGTGCCTTGTATTTTCATCTCCAATCATATAGCAAAAAACATAGCCGCTCCCAT : 600

N6      : *          620         *          640         *          660         *          680         *          700         *          720
KE26695 : GATAAGCTTCAAGCAAAAAGAGAGCATACAAAATTTATCTATATCTGGACTAGATAACCAAAAAGAACAGGATAACCTATATTTAACTTCATGCTAAATTTTCATACATAAATTCATT : 720

N6      : *          740         *          760         *          780         *          800         *          820         *          840
KE26695 : GAAAACAAGAATTATATATCAATCATTTTGTGAAATCGCCCAAAAAAATTAACGCTTACCATATATGCTGATATTTTAAACAACCATCTAAGTATCGCACTATTTTTCTAAATGGTT : 840

N6      : *          860         *          880         *          900         *          920         *          940         *          960
KE26695 : TTTATTATCCTTTCAAAAATTAATTTGGTGTGGGAGCAATTGCTGGGTATATCCAAGCGTTTAGCTACACTGAGCAGCAACTACAATATTTGTCGTTTTATGGAAAGTGGTTTTTTGCTATC : 960

N6      : *          980         *          1000        *          1020        *          1040        *          1060        *          1080
KE26695 : AATAAATACTTTGAAAATTTATTTCTGTATTTTAGATTACAAAATGCCAAAACAGAAACACAAATCAGATTAGAAGAAAAATCCATAGCATTACATTTGAAAATATTAGTTTCTCTTAT : 1080

N6      : *          1100        *          1120        *          1140        *          1160        *          1180        *          1200
KE26695 : CCTAATTCAAACTTATTTTGA AAAACTTTAATCTCTCTTTACACTCTAATAAAAATTTATGCATTAGTCGGCAAGAAATGCTAGCGGAAAAACACGCTGATTAATTTATGCTAGGGTTT : 1200

N6      : *          1220        *          1240        *          1260        *          1280        *          1300        *          1320
KE26695 : TATACCCCAAAATTCAGGTCAAATATCATTAATAACAAATACCACTACAAGACTTGAACATAAATAGTACCATCAACAAATGAGTGCATATTCCTAAGATTTTCTCTTTATGCTGGG : 1320

N6      : *          1340        *          1360        *          1380        *          1400        *          1420        *          1440
KE26695 : TATAGCATTGATGATAATCTCTTCATGCAAAACAACCCACAAAGAGAGAACTAAAAACA AAAAGAGAAAATACTAAAATCTTTTGTGAAAATTTTCAAAAATGTCCTAATGATTATAGC : 1440

N6      : *          1460        *          1480        *          1500        *          1520        *          1540        *          1560
KE26695 : AACGCATTATTTGGAACACAATATAATGGTGTAGATTTTCTCTAGGTCAA AAAGCAACGCATAGCCACTATAAGAGCCTTTTTAAAACCAAGTCATTGCATGTTTTAGATGAGCCAAGC : 1560

N6      : *          1580        *          1600        *          1620        *          1640        *          1660        *          1680
KE26695 : AGCACCATCGATCCCAATTATAGAAAAAGAGTTTTTGGATTTTATTTTTAAAAAATCGCAATCTAAGATGGCTTTAATCATTACACCCGCATGAATAGTGTCAAGCAGGCTGATGAAAT : 1680

N6      : *          1700        *          1720        *          1740        *          1760        *          1780
KE26695 : ATTTGTTAGATCAAGGCAAACTATAGAACAGGGCAACTTTGAAACCTTATGAAAAACAAGGATTATTTTACGAATTGTTTTGAAAGCAACAATACTAA : 113
          GGCAAACT ATAGAACAGGGCAACTTTGAAAC CTTATGAAAAACAAGGATTATTTTACGAATTGTTTTGAAAGCAACAATACTAA : 1782
          GGCAAACT ATAGAACAGGGCAACTTTGAAAC CTTATGAAAAACA GGATTATTTTACGAATTGTTTTGAAAGCA CAATACTAA

```

Abbildung 35: *Alignment* der Nukleotidsequenzen des Gens HP0600 aus *H. pylori* KE26695 und *H. pylori* N6. Erstellt mit <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align>.

7.8 Molekulare und biochemische Charakterisierung von *H. pylori*-TlpD

Obwohl in den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit klar gezeigt werden konnte, dass TlpD beim metabolismusabhängigen Verhalten von *H. pylori* eine wesentliche Rolle spielt, war der genaue Mechanismus der Beteiligung von TlpD an der Energietaxis weiterhin unklar. Zusätzliche Hinweise in Bezug auf Struktur und Funktion des Proteins können weitere biochemische Analysen des isolierten TlpD-Moleküls geben. Eine konkrete Fragestellung die sich im Zusammenhang mit der Struktur des Proteins ergab, war beispielsweise die Frage nach kovalenten Modifikationen. Da es aus vorangegangenen Experimenten (Abbildung

32A), den Hinweis gab, dass TlpD, welches vermutlich in der Membranfraktion (unlöslich) vorlag, eine höhere molekulare Masse hat als das zytosolische TlpD und somit eventuell modifiziert sei, wurde von Anfang an vorgesehen TlpD getrennt aus der löslichen und der unlöslichen Fraktion von *H. pylori* zu reinigen. Ebenfalls wurde aus diesem Grund entschieden, TlpD direkt aus *H. pylori* und nicht aus *E. coli* zu reinigen, damit Informationen aus dem nativen System zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus kann nativ gereinigtes TlpD die Identifizierung möglicher (oder tatsächlich noch gebundener) Interaktionspartner und Liganden erleichtern. Die Isolierung aus *H. pylori* war auch deswegen wünschenswert, da gezielt nach den angesprochenen Modifikationen gesucht wurde, welche bei einer heterologen Expression in z.B. *E. coli* vermutlich nicht vorliegen würden. Von besonderem Interesse waren dabei mögliche Modifikation wie Glykosylierungen oder Acylierungen, welche möglicherweise zu einer Verankerung in der Membran beitragen könnten. Zur Durchführung der Reinigung wurde ein TlpD-His₆-Fusionsprotein kodierendes Plasmid (pCJ545) konstruiert (siehe Methoden 6.9) und eine *H. pylori*-N6-*tlpD*-Mutante damit transformiert. Die erhaltene *tlpD*/TlpD-His₆-Mutante wies einen ähnlichen Phänotyp bezüglich des Verhaltens auf, wie *tlpD*/TlpD-V5-Mutante. Dies bestätigte die Funktionalität des TlpD-His₆-Proteins. Die Isolierung des Proteins aus *H. pylori* erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie mit einer stationären Phase an Ni-NTA-Agarose. Bei einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie erfolgt die Bindung des Proteins durch einen His₆-tag, welcher die Metallionen chelatiert und so das Protein an der Matrix immobilisiert. Für die Elution gibt es, je nach Anwendung, verschiedene Herangehensweisen, welche in den folgenden beiden Abschnitten näher erläutert werden (siehe Abschnitt 7.8.1; Abschnitt 7.8.3). Die TlpD-His₆-synthetisierenden Bakterien wurden für ca. 16 Stunden auf Blutagarplatten kultiviert, mit Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation fraktioniert (siehe Methoden 6.14). Das Protein wurde anschließend aus der löslichen Fraktion auf native und aus der unlöslichen Fraktion auf denaturierende Weise aufgereinigt.

7.8.1 Reinigung des Sensors TlpD-His₆ aus der löslichen Fraktion von *H. pylori* N6

Die Reinigung des Proteins TlpD-His₆ aus der löslichen Fraktion konnte auf native Weise erfolgen. Die Elution erfolgte bei der nativen Reinigung durch einen Imidazolgradienten (siehe Methoden 6.17.1). Imidazol destabilisiert die Bindung des His₆-tag zu den matrixgebundenen Ni²⁺-Ionen. Daher wurde mit steigenden Imidazolkonzentrationen gewaschen, um nach und nach unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Die Elution von TlpD-His₆ erfolgte mit einer Imidazolkonzentration von 250 µM. Für dieses Experiment wurde ein Waschschrift mit 30 mM Imidazol (10 ml) und ein weiterer mit 80 mM Imidazol

(3 ml) durchgeführt. Die Fraktionen der Waschschriffe und des Eluats wurden mit einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 36). In den ersten beiden Spuren (1, 2) sind die lösliche Fraktion der Bakterien vor der Zugabe zu der Affinitätsmatrix, sowie der Durchfluss nach Auftrag auf die Säule zu sehen. TlpD-His₆ ist in diesen Fraktionen nicht als spezifische Bande identifizierbar. Während des Waschens mit 30 mM Imidazol wurden der erste und der letzte Milliliter des 10-ml-Volumens gesammelt und analysiert (Spur 3, 4). Zu Beginn des Waschens wurde noch eine beträchtliche Menge an unspezifisch gebundenen Proteinen eluiert (Spur 3), in der letzten Fraktion dieses Waschschriffes wurde nur wenig unspezifisch gebundenes Protein detektiert (Spur 4). Vermutlich konnte der Großteil der unspezifisch gebundenen Proteine entfernt werden. Bei dem Waschschriff mit 80 mM Imidazol wurde eine beträchtliche Menge an TlpD-His₆ eluiert (Spur 5 bis 7), jedoch mit Verunreinigungen durch andere entweder unspezifisch gebundene oder ko-gereinigte Proteine. In Spur 7 wurden nur noch wenige Proteine im Waschschriff detektiert. Somit war ein großer Teil der Verunreinigungen entfernt worden. Der Waschschriff mit 80 mM Imidazol wurde wegen der großen Menge an vorzeitig eluiertem TlpD lediglich mit einem Volumen von 3 ml durchgeführt. Beim letzten Elutionsschriff mit 250 mM (Spur 8 bis 12) wurde das Protein mit wenigen Nebenbanden eluiert. Die größte Menge an TlpD-His₆ war in den Fraktionen 8 bis 10 zu finden.

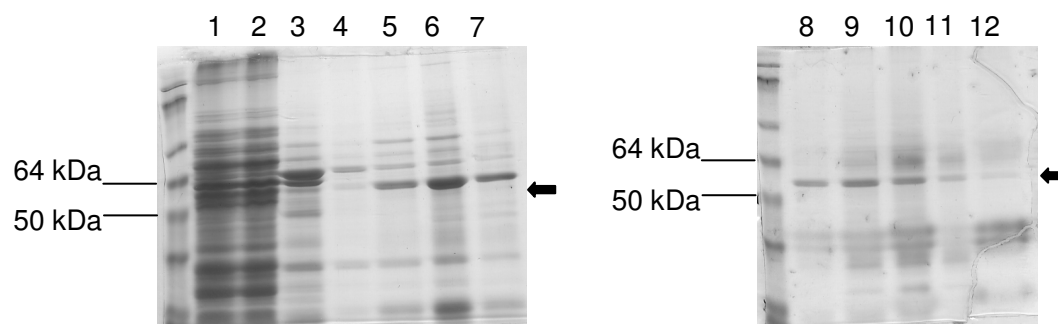


Abbildung 36: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen der Reinigung von TlpD-His₆ aus dem Cytosol. Spur 1: Lösliche Fraktion von *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-His₆; **Spur 2:** Durchfluss durch die Säule nach Zugabe der Zytosol-Ni-NTA-Agarose-Suspension; **Spur 3 bis 4:** Waschschriff mit 30 mM Imidazol; **Spur 5 bis 7:** Waschschriff mit 80 mM Imidazol; **Spur 8 bis 12:** Elution mit 250 mM Imidazol

7.8.2 *H. pylori*-TlpD kann in Lösung stabile Dimere bilden

Die Fraktionen der nativen Reinigung wurden mit einer SDS-PAGE und einer Westernblot-Analyse weiter untersucht. Dabei fiel auf, dass in den Fraktionen des 80-mM-Imidazol-Waschschriffes trotz der denaturierenden Auftrennung eine weitere schwache Bande bei einer Größe von ca. 100 kDa mit dem α -His₆-Antikörper zu detektieren war (Abbildung 37).

Dies entspricht der Größe eines möglichen TlpD-Dimers. Die mutmaßliche Dimerbildung war am deutlichsten in der Fraktion 1 des 80-mM-Imidazol-Waschschrilles zu erkennen.

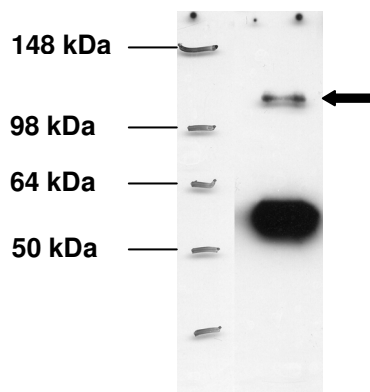


Abbildung 37: Westernblot-Analyse der ersten Fraktion eines 80-mM-Imidazolwaschschrilles einer nativen Proteinreinigung von TlpD-His₆ aus *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-His₆. Primärer Antikörper: Kaninchen- α -His₆ (1:2.500). Sekundärer Antikörper: POX-Maus- α -Kaninchen (1:20.000). Der Pfeil deutet auf die Bande mit einer TlpD-His₆-Dimer-spezifischen Größe.

7.8.3 Reinigung von TlpD-His₆ aus der Membranfraktion von *H. pylori*

Um TlpD-His₆ aus der unlöslichen Fraktion einer Bakterienzelle zu isolieren, kann eine denaturierende Methode oder eine Detergenz-basierte Methode verwendet werden (siehe Methoden 6.17.2). So wurde bei der Lyse der Zellen ein 8 M Harnstoffpuffer verwendet, um das Protein in Lösung zu bringen. Das Waschen und Eluieren erfolgte anschließend mittels eines pH-Gradienten. In Abbildung 38 sind die gesammelten Fraktionen der Reinigung nach Auftrennung in einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zu sehen. Auch hier sind keine Unterschiede zwischen der unlöslichen Fraktion vor Zugabe zur Säule (Spur 1) und dem Durchfluss (Spur 2) erkennbar. Allgemein befindet sich in der unlöslichen Fraktion der Bakterien weniger Protein (Abbildung 38, Spuren 1 bis 20) als in der löslichen Fraktion (Abbildung 36). Während des Waschens mit Puffer C (Spuren 3 bis 8) und D (Spuren 9 bis 14) wurden verschiedene unspezifisch gebundene Proteine eluiert. Ein vorzeitiges Eluieren und damit ein Verlust an TlpD-His₆, so wie es bei der Reinigung aus der löslichen Fraktion der Fall war, wurden auf dem Coomassie gefärbten Gel nicht beobachtet. Beim abschließenden Elutionsschritt mit Puffer E (Spuren 15 bis 20) wurde TlpD-His₆ eluiert. Der Großteil des gereinigten Proteins war in den Fraktionen 15 und 16 zu finden. Im Rahmen der denaturierenden Reinigung konnte keine Dimerbildung des Sensors TlpD-His₆ in den Fraktionen beobachtet werden.

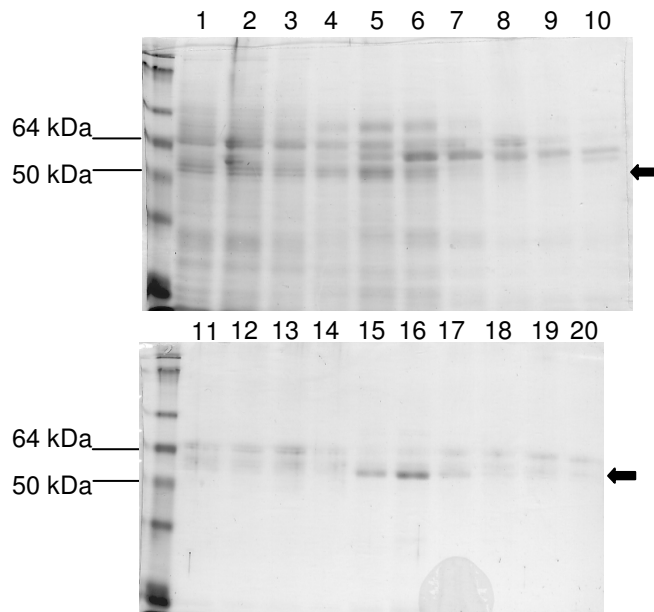


Abbildung 38: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen der Reinigung von TlpD-His₆ aus der unlöslichen Fraktion. Spur 1: Unlösliche Fraktion von *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-His₆; **Spur 2:** Durchfluss durch die Säule nach Zugabe der Membran-Ni-NTA-Agarose-Suspension. **Spur 3 bis 8:** Waschschrift mit Puffer C. **Spur 9 bis 14:** Waschschrift mit Puffer D. **Spur 15 bis 20:** Elution mit Puffer E. Der Pfeil deutet auf die TlpD-His₆-spezifische Bande.

Zur Bestätigung der Identität des eluierten TlpD-His₆, sowie zur dessen weiterer Analyse wurde dieses auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend eine Westernblot-Analyse durchgeführt (siehe Methoden 6.15 und 6.16). Zum einen sollte die Qualität der Reinigung überprüft werden, zum anderen aber auch mögliche Größenunterschiede zwischen der löslichen und nicht löslichen Form von TlpD-His₆ näher untersucht werden. Der Westernblot diente der Identitätsbestimmung der Proteine. Von den beiden Aufreinigungen wurde jeweils die Fraktion, mit der größten Menge an mutmaßlichem TlpD-His₆ (nativ: Fraktion 9, Abbildung 36; denaturierend: Fraktion 16, Abbildung 38) mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Westernblot analysiert. Im SDS-Gel (Abbildung 39A) zeigte sich, dass speziell bei der Reinigung aus dem Cytosol noch Verunreinigungen vorlagen (Spur 1). Als Ursache dieser Nebenbanden kommen neben unspezifisch gebundenen Proteinen auch ko-gereinigte Proteine und Abbauprodukte von TlpD-His₆ in Frage. Das, aus der unlöslichen Fraktion gereinigte TlpD-His₆ schien reiner vorzuliegen (Spur 2). Im SDS-Gel waren keine Verunreinigungen mehr zu erkennen. Ein Größenunterschied, wie er in früheren Fraktionierungen aufgefallen war (Abbildung 29), ließ sich in diesem Fall nicht nachweisen. In dem vorliegenden Gel hatte TlpD-His₆ aus beiden Fraktionen die gleiche Laufweite (Abbildung 39A). Die TlpD-His₆-Detektion im Westernblot (Abbildung 39B) erfolgte mittels eines α -His₆-Antikörpers. In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass die prominente Bande mit der Größe von ca. 50 kDa mit dem α -His₆-Antikörper erkannt wurde und es sich somit um

das TlpD-His₆-Fusionsprotein handelt. In der Elutionsfraktionen der Reinigung konnte keine Dimerbildung des Sensors TlpD-His₆ beobachtet werden (siehe Diskussion 8.7).

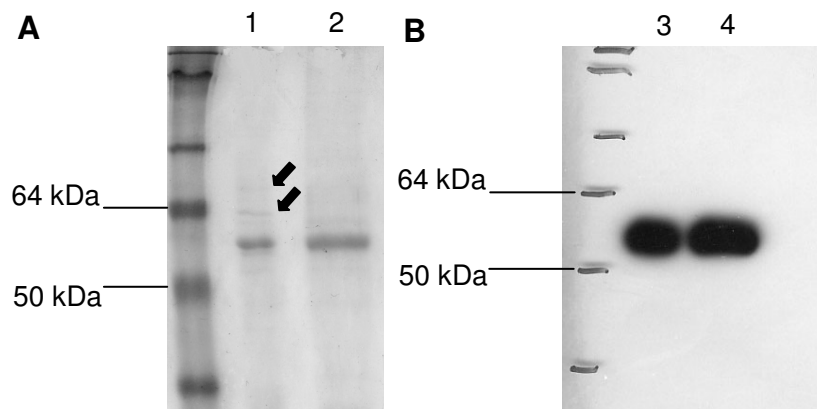


Abbildung 39: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE und Westernblot der Fraktion 9 der nativen und der Fraktion 16 der denaturierenden Reinigung (Abbildung 36; Abbildung 38) A: SDS Gel: Spur 1: Fraktion 9 der nativen Reinigung. Spur 2: Fraktion 16 der denaturierenden Reinigung B: Westernblot: Spur 3: Fraktion 9 der nativen Reinigung; Spur 4: Fraktion 16 der denaturierenden Reinigung. Primärer Antikörper: Kaninchen- α -His₆ (1:2.500). Sekundärer Antikörper: POX-Maus- α -Kaninchen (1:20.000). Die Pfeile deuten auf mögliche Kontaminationen des Eluats der nativen Reinigung hin.

7.8.4 Weitere Reinigung des TlpD aus der löslichen Fraktion mit Hilfe eines präparativen SDS-Gels

Da in dem SDS-Gel (Abbildung 39A) noch Verunreinigungen durch andere Proteine, in der löslichen Fraktion detektiert wurden, wurde ein präparatives SDS-Gel angefertigt (siehe Methoden 6.17.3). Die vollständige Fraktion 9 (Abbildung 36) der Isolation aus dem Cytosol wurde auf ein präparatives SDS-Gel aufgetragen und nach einem Lauf von ca. 30 h bei 1 mA kurz gewässert (3 mal 10 min), um das SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel kurz mit SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen; Karlsruhe) angefärbt und die Proteinbande mit der entsprechenden Größe von TlpD-His₆ (ca. 50 kDa) ausgeschnitten. Aus den ausgeschnittenen Gelfragmenten wurde das Protein elektroeluiert (siehe Methoden 6.17.3), mit Hilfe eines SDS-Gels in Bezug auf Qualität und Menge analysiert und anschließend die Identität im Westernblot bestätigt. Auf dem Gel in Abbildung 40A ist zu sehen, dass das Protein ohne detektierbare Verunreinigungen vorlag. Die Identität des Proteins konnte im Westernblot bestätigt werden (Abbildung 40B). Das Vorliegen des gereinigten TlpD-His₆ ermöglichte nun eine Reihe von Experimenten zu biochemischen Charakterisierung des Proteins und die Herstellung von Antikörpern gegen TlpD. Das Auftragen eines BSA-Standards ermöglichte es, eine Konzentrationsabschätzung des gereinigten Proteins vorzunehmen. Da pro Spur 10 μ l des Eluats aufgetragen wurden, wurde die Konzentration von TlpD-His₆ im Eluat auf ca. 50 μ g/ml geschätzt.

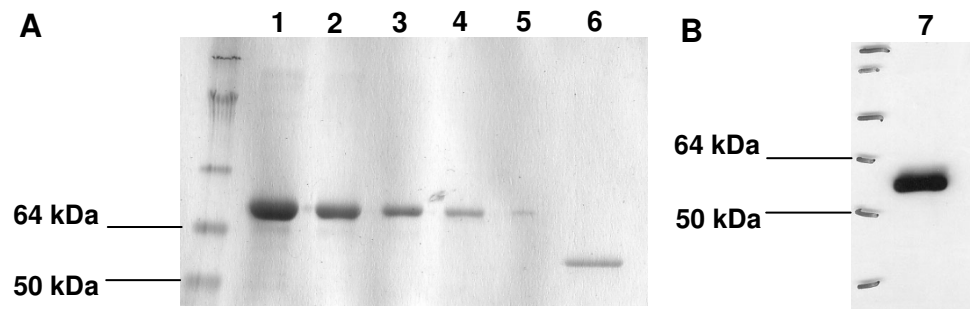


Abbildung 40: A: SDS-Gel des Elektroeluats von TlpD-His₆ aus der löslichen Reinigung zur Qualitäts- und Mengenabschätzung. Spur 1 bis 6: BSA-Mengenstandard: Spur 1: 5 µg; Spur 2: 2,5 µg; Spur 3: 1 µg; Spur 4: 0,5 µg; Spur 5: 0,1 µg; Spur 6: 10 µl des Eluats aus der Proteinreinigung mittels präparativem SDS-Gel B: Westernblot zur Bestätigung der Proteinidentität. Spur 7: 10 µl des Eluats aus der Proteinreinigung mittels präparativem SDS-Gels.

7.8.5 Massenspektrometrische Analyse und Vergleich der zytosolischen und membranären Form von *H. pylori*-TlpD

Um der Frage nachzugehen, ob in TlpD Proteinmodifikationen vorliegen bzw. ob speziell der unlösliche, möglicherweise membrangebundene Anteil von TlpD-His₆ im Vergleich zum löslichen Anteil modifiziert vorliegt, wurden die entsprechenden Proteinbanden nach Affinitätsreinigung aus SDS-Gelen ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von bzw. in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. G.-F. Gerlach und Dr. F. Büttner am Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. Die Proteine wurden vor der Analyse im Massenspektrometer tryptisch verdaut und das Peptidgemisch teilweise zusätzlich mittels einer Nano-Liquid-Chromatography (Nano-LC) aufgetrennt. Diese Methode ermöglicht eine hochauflösende Unterscheidung von Peptidgemischen. Bei der konventionellen Massenspektrometrie wird ein aus einem tryptischen Verdau resultierendes Peptidgemisch auf einmal analysiert. Durch die Vielzahl verschiedener Signale ist es schwierig, jedes einzelne Peptid zu identifizieren und somit kleine Unterschiede zwischen zwei Gemischen und damit zwischen zwei Proteinen festzustellen. Durch die vorherige Größenauftrennung der Peptide eines Proteins in der Nano-LC werden diese nacheinander, mit einer reproduzierbaren Retentionszeit, im Massenspektrometer analysiert. Diese sensitivere Methode ermöglicht es, Massenunterschiede in nur einem Peptid des Proteins festzustellen und damit einen Hinweis auf eine mögliche Modifikation zu geben.

Bisher konnte lediglich festgestellt werden, dass in der löslichen Fraktion das TlpD-His₆ wahrscheinlich unmodifiziert vorliegt, da mit Ausnahme von zwei Peptiden alle Peptide des tryptischen Verdau von TlpD-His₆ unmodifiziert identifiziert werden konnten. Eine vergleichende Analyse des aus der unlöslichen Fraktion gereinigten TlpD war bisher nicht möglich.

7.9 Identifizierung möglicher neuer Interaktionspartner von TlpD mit Hilfe einer Ko-Präzipitation aus Bakterienlysat

Neben den bisher beschriebenen Möglichkeiten zur Identifizierung eines möglichen Interaktionspartners von TlpD wurde auch ein weiterer experimenteller Ansatz mittels Massenspektrometrie verfolgt. Um weitere mögliche Interaktionspartner des Sensors TlpD in *H. pylori* zu identifizieren, wurde zuerst eine Ko-Präzipitation durchgeführt (siehe Methoden 6.18). Für dieses Experiment wurden Gesamtzelllysate der Stämme *H. pylori* N6 *tlpD* und *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-His₆ jeweils mit der TALON-Matrix inkubiert, die Matrix anschließend gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert (Ko-Präzipitation). Die TALON-Matrix enthält immobilisierte Co²⁺-Ionen, welche den His₆-tag binden. Der Stamm *H. pylori* N6 *tlpD* diente als Kontrolle für die Ko-Präzipitation, da er kein TlpD-His₆ und auch kein TlpD synthetisiert. Zur Berechnung der in der Präzipitation einzusetzenden Proteinmenge von TlpD-His₆ wurde in einem Westernblot mit α -His₆-Antikörper die Menge an TlpD-His₆ mittels einer Vergleichsprobe des gereinigten Proteins abgeschätzt. Für die Ko-Präzipitation wurden nach Analysen in Westernblots im Vergleich zu gereinigtem TlpD in jedem Gesamtansatz ca. 3,5 μ g TlpD-His₆ in jeweils ca. 700 μ g Gesamtzellprotein eingesetzt (Talon-Matrix kann ca. 5 μ g His-Protein binden). Die Eluate wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Banden, die nur im Eluat des Stammes *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-His₆ zu sehen waren, nicht jedoch im Eluat des Stammes *H. pylori* N6 *tlpD*, wurden als mögliche Interaktionspartner von TlpD-His₆ angesehen, aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die prominente Bande bei einer Größe von ca. 50 kDa in Spur 2 entspricht TlpD-His₆ und wurde daher nicht weiter analysiert. Dieser Versuch wurde dreimal mit sehr reproduzierbaren Ergebnissen im Coomassie-Gel durchgeführt und zweimal per Massenspektrometrie analysiert. Die massenspektrometrischen Untersuchungen der so isolierten Proteinbanden wurden von unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. G.-F. Gerlach und Dr. F. Büttner am Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

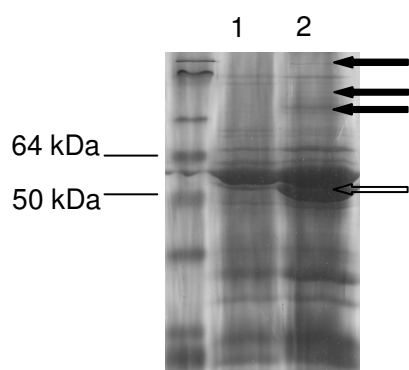


Abbildung 41: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Eluate der Ko-Präzipitation. 1: Eluat des Stammes *H. pylori* N6 *tlpD*; 2: Eluat des Stammes *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-His₆. Die gefüllten Pfeile deuten auf Proteinbanden welche nur im Eluat des Stammes *H. pylori* N6 *tlpD*/TlpD-His₆ nicht jedoch in der Vergleichskontrolle (Spur 1) zu sehen sind. Der offene Pfeil deutet auf die TlpD-His₆-spezifische Bande.

Eine Übersicht über die identifizierten möglichen Interaktionspartner von TlpD-His₆ ist in Tabelle 19 zu sehen. Als mögliche Interaktionspartner wurden neben der Histidinkinase (CheAY2), die das Funktionieren des experimentellen Ansatzes bestätigt (siehe Diskussion 8.7), auch andere Proteine identifiziert. Die Anzahl der detektierten Peptide kann bedingt als Hinweis auf die Menge an Protein und damit möglicherweise indirekt auch auf die Stärke der Interaktion dienen. Beispielsweise wurde von der Katalase pro Experiment nur ein Peptid identifiziert, während von der Aconitat-Hydratase fünf bzw. acht Peptide identifiziert wurden. Demnach läge eine stärkere Interaktion zur Aconitat-Hydratase und Isoleucyl-tRNA-Synthetase und eine eher schwächere Interaktion zur Katalase KatA, zur Protein-Translokase SecA und zur Histidinkinase CheAY2 vor. Die Massenspektrometrie wurden zweimal von zwei separat durchgeführten Ko-Präzipitationen durchgeführt. Die Analyse erfolgte in beiden Fällen mit einer *electrospray injection quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* (ESI Q-TOF MS/MS) (Q-TOF Ultima, Waters, Milford, MA, USA).

Tabelle 19: Potenzielle Interaktionspartner von TlpD-His₆. In der Tabelle werden jeweils das in der Massenspektrometrie identifizierte Protein sowie die Anzahl der detektierten Peptide pro Experiment genannt.

Protein	Anzahl an gefundenen Peptiden (Experiment 1/ Experiment 2)
Histidinkinase (CheAY2)	2/1
Aconitat-Hydratase (AcnB)	5/8
Isoleucyl-tRNA-Synthetase (IleS)	3/2
Katalase (KatA)	1/1
Protein-Translokase (SecA)	1/1
DNA-abhängige RNA-Polymerase (RpoBC)	-/7

7.10 Biologische Relevanz von *H. pylori*-TlpD im Infektionsmodell der Mongolischen Rennmaus

Um die biologische Relevanz des Sensors TlpD zu untersuchen, wurde die Rolle des Proteins in der Infektion im Tiermodell analysiert. Für diese Arbeit wurde das Modell der Mongolischen Rennmaus (*Meriones unguiculatus*, engl.: *gerbil*) gewählt, da diese in einigen physiologischen Eigenschaften eine gewisse Ähnlichkeit zum Menschen aufweist (siehe Einleitung 4.2.9.1). So ist zum Beispiel der pH-Gradient im Magenschleim dem des Menschen ähnlicher als beispielsweise dem der Maus (Schreiber *et al.*, 2005), die nur einen flachen pH-Gradienten und insgesamt im Magen einen höheren pH-Wert als der Mensch aufweist. Die weitere Eignung des gewählten Tiermodells im Vergleich zu anderen Modellen wird darüber hinaus intensiv in der Diskussion erörtert.

7.10.1 Etablierung des *H. pylori* Stuhl-Antigen-Tests zur Überprüfung des Infektionsstatus und Infektionsverlaufs

Für den Nachweis des Infektionsstatus und Infektionsverlaufs während eines laufenden Versuchs galt es, zusätzlich einen nicht-invasiven diagnostischen Test zu etablieren. Dies war wünschenswert, da die finale quantitative Auswertung der Infektion im Rahmen einer Sektion zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Infektion nur Aufschluss über den zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Status und nicht über den gesamten Infektionsverlauf gibt. Für eine umfassende Untersuchung der biologischen Relevanz des Sensors TlpD ist jedoch der Infektionsverlauf über den gesamten Infektionszeitraum von Interesse. Beispielsweise konnte bereits für die Proteine CheW, CheAY2 und CheY1 in FVB/N-Mäusen gezeigt werden, dass *H. pylori*-Mutanten in den entsprechenden Genen zwei Wochen nach Infektion noch eine Kolonisierungsdefekt im Vergleich zum Wildstamm vorliegt, dieser jedoch nach ca. sechs Wochen verschwindet (Terry *et al.*, 2005). Mit einem Stuhl-Antigen-Test ist im Menschen nach Herstellerangabe (R-Biopharm AG, Darmstadt) keine quantitative Beurteilung der Infektion möglich, jedoch kann damit eine qualitative Aussage über den Erfolg der Infektion gemacht werden. So wurde im ersten Schritt mit zwei Gruppen mit je drei Tieren der Stuhl-Antigen-Test RIDASREEN® FemtoLab *H. pylori* (siehe Methoden 6.23.1) auf seine Eignung hin getestet, den Infektionsstatus der Tiere während des Experimentes nachzuweisen. Es wurden eine Gruppe mit dem *H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm infiziert und die zweite Gruppe lediglich mit sterilem BHI/Hefe-Medium inokuliert. Bei dem Stamm *H. pylori* HP87 G7 handelt es sich um eine an die Mongolische Rennmaus adaptierte Variante des Stammes *H. pylori* HP87 (Bleich *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 1997). Eine Woche vor Infektion und über einen Zeitraum von sechs Wochen nach Infektion wurden wöchentlich Stuhlproben genommen und mit dem *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Test analysiert. Die Proben der

uninfizierten Kontrolltiere zeigten über den gesamten Zeitraum kein Signal oberhalb des Schwellenwertes (Abbildung 42A). Die Signalstärke der infizierten Tiere schwankte, lag aber im Durchschnitt höher als die der uninfizierten (Abbildung 42B). Aus der Gruppe der infizierten Tiere wurde zu jedem Zeitpunkt mindestens ein Tier positiv auf *H. pylori* getestet. Insgesamt ist bei den infizierten Tieren ein Anstieg der Signalstärke über die Zeit zu beobachten. Der *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Test eignet sich also zur Überprüfung des Infektionsstatus der Tiere vor allem gegen Ende des Infektionszeitraumes.

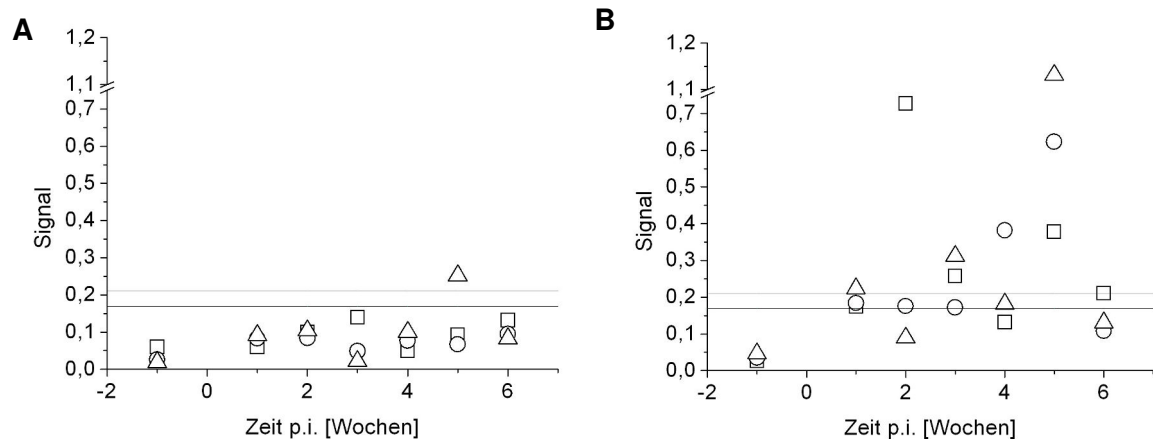


Abbildung 42: *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Test der uninfizierten Kontrolltiere (A) und der infizierten Tiere (B). Die Symbole Δ , \square , ∇ , und \circ zeigen die Signalstärke der Probe eines einzelnen Tieres an. Die beiden waagrechten Linien geben jeweils den Grenzbereich an, in dem keine Aussage über den Infektionsstatus möglich ist. Unterhalb der unteren Linie (0,190) gilt eine Probe, bezogen auf menschliches Untersuchungsmaterial (siehe Diskussion 8.10.1), nach Herstellerangaben als *H. pylori*-frei; oberhalb der oberen Linie (0,210) gilt eine Probe als *H. pylori*-positiv.

Sechs Wochen nach Inokulation wurden die Tiere mittels CO₂-Inhalation getötet und pro Tier wurden zwei Gewebeproben aus dem Antrum entnommen. Die Gewebeproben wurden zur PCR-Diagnostik und zur Reisolation von *H. pylori* aus dem Gewebe verwendet. Sowohl die PCR als auch die Reisolation der Bakterien diente der Überprüfung des Infektionsstatus. In der PCR Diagnostik konnten alle infizierten Tiere mit gattungs- (16S: Spuren 1 bis 3) und speziesspezifischen (*mutY*: Spuren 10 bis 12) Primern (Tabelle 8) als positiv auf *H. pylori* bestätigt werden. Die Kontrolltiere waren negativ (Abbildung 43).

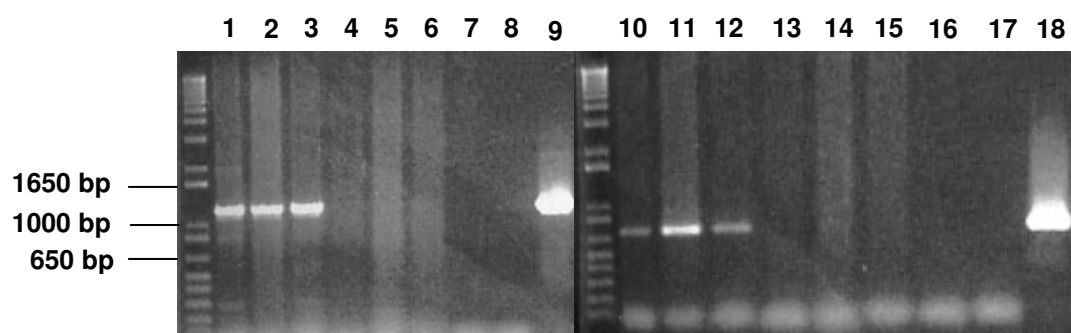


Abbildung 43: Agarosegele der diagnostische PCRs der aus dem Magengewebe der Mongolischen Rennmäuse isolierten DNA. Spur 1 bis 9: Gattungsspezifische Primer (16S – erwartete Größe 1200 bp); **Spur 1 bis 3:** Tier 1 bis 3 (BHI-Gruppe); **Spur 4 bis 6:** Tier 4 bis 6 (Wildstamm-Gruppe); **Spur 7:** Negativkontrolle der DNA-Isolierung (Eluat einer Leersäule); **Spur 8:** PCR-Negativkontrolle; **Spur 9:** PCR-Positivkontrolle (*H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm-DNA); **Spur 10 bis 18:** Speziespezifische Primer (*mutY* – erwartete Größe 700 bp); **Spur 10 bis 12:** Tier 1 bis 4 (BHI-Gruppe); **Spur 13 bis 15:** Tier 10 bis 13 (Wildstamm-Gruppe); **Spur 16:** Negativkontrolle der DNA-Isolierung (Eluat einer Leersäule); **Spur 17:** PCR-Negativkontrolle; **Spur 18:** PCR-Positivkontrolle (*H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm-DNA)

Für die Reisolation von *H. pylori* aus den entnommenen Gewebsstücken wurde das Gewebe in BHI/Hefe-Medium homogenisiert und je 100 µl in geeigneten Verdünnungen (10^0 bis 10^{-4}) selektiv für *H. pylori* auf Blutagarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation von vier Tagen wurden die *H. pylori*-Kolonien gezählt und die Menge an CFU (*colony forming units*) pro Milligramm Magengewebe berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt. Auch durch die Reisolation von *H. pylori* aus dem Magengewebe der Tiere konnte die erfolgreiche Infektion der Tiere bestätigt werden. Die bakterielle Last pro Milligramm Antrumgewebe schwankte um ca. eine log-Stufe (176 – 2626 cfu/mg). Aus den uninfizierten Kontrolltieren konnte kein *H. pylori* reisoliert werden.

Tabelle 20: CFU pro mg Magengewebe. Angegeben ist die berechnete Anzahl der cfu pro mg Magengewebe (Antrum), die Tiernummer und die Art des Inokulums.

Inokulum/Tier #	CFU pro mg Magengewebe
BHI	1 0
	2 0
	3 0
<i>H. pylori</i> HP87 G7	4 176,28
Wildstamm	5 455,00
	6 2626,77

7.10.2 Untersuchung des Effekts von TlpD auf Infektionsrate und Bakterienlast im Modell der Mongolischen Rennmaus

Um den Einfluss des Sensors TlpD auf die Infektion zu untersuchen, wurden von dem Stamm *H. pylori* HP87 G7 ebenfalls eine Reihe von Mutanten hergestellt. Es wurden Mutanten in den Genen *cheAY2* und *tlpD* mit den Plasmiden pSUS131 bzw. pSUS275 hergestellt (Tabelle 9; Tabelle 10). Es muss angemerkt werden, dass die Transformationseffizienz im Vergleich zu anderen in dieser Arbeit verwendeten Stämmen (N6, B128, 88-3887) und auch im Vergleich zum nicht-Tier-adaptierten Ausgangsstamm

H. pylori HP87 niedriger war. So waren sowohl für die Mutagenese von *tlpD* als auch für die Mutagenese von *cheAY2* über 30 Transformationen von Nöten, um eine geringe Anzahl an Transformanten zu erhalten. Bei der Mutagenese der meisten anderen Stämme wurden bereits durch eine Transformation ca. 100 Transformanten erhalten. Noch schwieriger gestaltete sich die Komplementation des Gens *tlpD*. Anfangs wurde versucht, das Gen mittels des Plasmids pCJ522, welches bereits für den Stamm N6 erfolgreich verwendet wurde, zu komplementieren. Da dies nach wiederholten Versuchen keinen Erfolg brachte, wurde schließlich das Gen genomisch mittels des Plasmid pCJ542 komplementiert (siehe Material, Tabelle 9, Tabelle 10). Dazu wurde eine Kopie des Gens *tlpD* in das genomische Gen durch Allelenaustausch *rdxA* inseriert. Die Insertion von Genen in das Gen *rdxA* ist eine in *H. pylori* bereits etablierte Komplementationstechnik (Kwon *et al.*, 2000). Zur Selektion wurde zusätzlich eine Chloramphenicolresistenzkassette eingefügt. Das Protein TlpD trägt bei dieser Komplementation ebenfalls einen V5-tag. Die erhaltene Mutante wurde als *H. pylori* HP87 G7 *tlpD*/TlpD-V5 benannt.

Für die Untersuchung des Einflusses von TlpD auf die Infektion wurden drei Gruppen mit je vier (Wildstamm, *cheAY2*-Mutante) bis fünf (*tlpD*-Mutante) Tieren verwendet. Um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede sehen zu können bestand die *tlpD*-Gruppe aus drei weiblichen und zwei männlichen Tieren. Da die Phänotypen der *cheAY*-Mutante und des Wildstammes bereits ausreichend beschrieben wurden, wurde in diesem Fall auf eine gemischtgeschlechtliche Gruppe verzichtet. Die Wildstamm-Gruppe bestand aus vier männlichen Tieren und diente als positive Kontrolle. Tiere dieser Gruppe wurden mit dem *H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm inokuliert. Die *cheAY2*-Gruppe bestand aus vier weiblichen Tieren und diente als negative Kontrolle. Tiere dieser Gruppe wurden mit der nichtinfektiösen Chemotaxis-negativen Mutante *cheAY2* inokuliert. Die dritte Gruppe wurde mit *tlpD*-Mutanten inokuliert. Der Infektionszeitraum betrug sechs Wochen. Der Infektionsverlauf wurde wöchentlich mit dem *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Test über den gesamten Versuchszeitraum hinweg überprüft (siehe Methoden 6.23.1) (Abbildung 44). Vor der Inokulation lagen alle Messungen unterhalb des Schwellenwertes und bestätigten, dass zu Beginn des Experimentes keine Infektion vorlag. Tiere der *cheAY2*-Kontrollgruppe zeigten über den kompletten Zeitraum zu keinem Zeitpunkt eine Signalstärke oberhalb des Schwellenwertes (Abbildung 44A). Dies deutete darauf hin, dass keine Kolonisierung stattgefunden hatte. Wildstamm-inokulierte Tiere dagegen zeigten über den gesamten Infektionszeitraum höhere Signalstärken (Abbildung 44C). Zwar wiesen gerade zu Beginn des Versuchszeitraums einige Tiere eine Signalstärke unterhalb des Schwellenwertes auf, gegen Ende des Zeitraumes (6 Wochen) lagen jedoch alle Messungen oberhalb des Grenzwertes und wiesen darauf hin, dass in diesem Fall eine erfolgreiche Kolonisierung stattgefunden hatte. Die Tiere der mit den *tlpD*-Mutanten infizierten Gruppe zeigten

überwiegend eine geringere Signalstärke, als die des Wildstammes (Abbildung 44B). Zu Beginn des Zeitraums (Woche 1 bis 3), wiesen einzelne Tiere Signalstärken oberhalb des Schwellenwertes bzw. innerhalb des Grenzbereiches auf (siehe Diskussion 8.10.2). Dieser Effekt war in der zweiten Hälfte des Infektionszeitraumes nicht mehr zu beobachten. In diesem Zeitraum lagen alle Messungen stets unterhalb des Grenzbereiches.

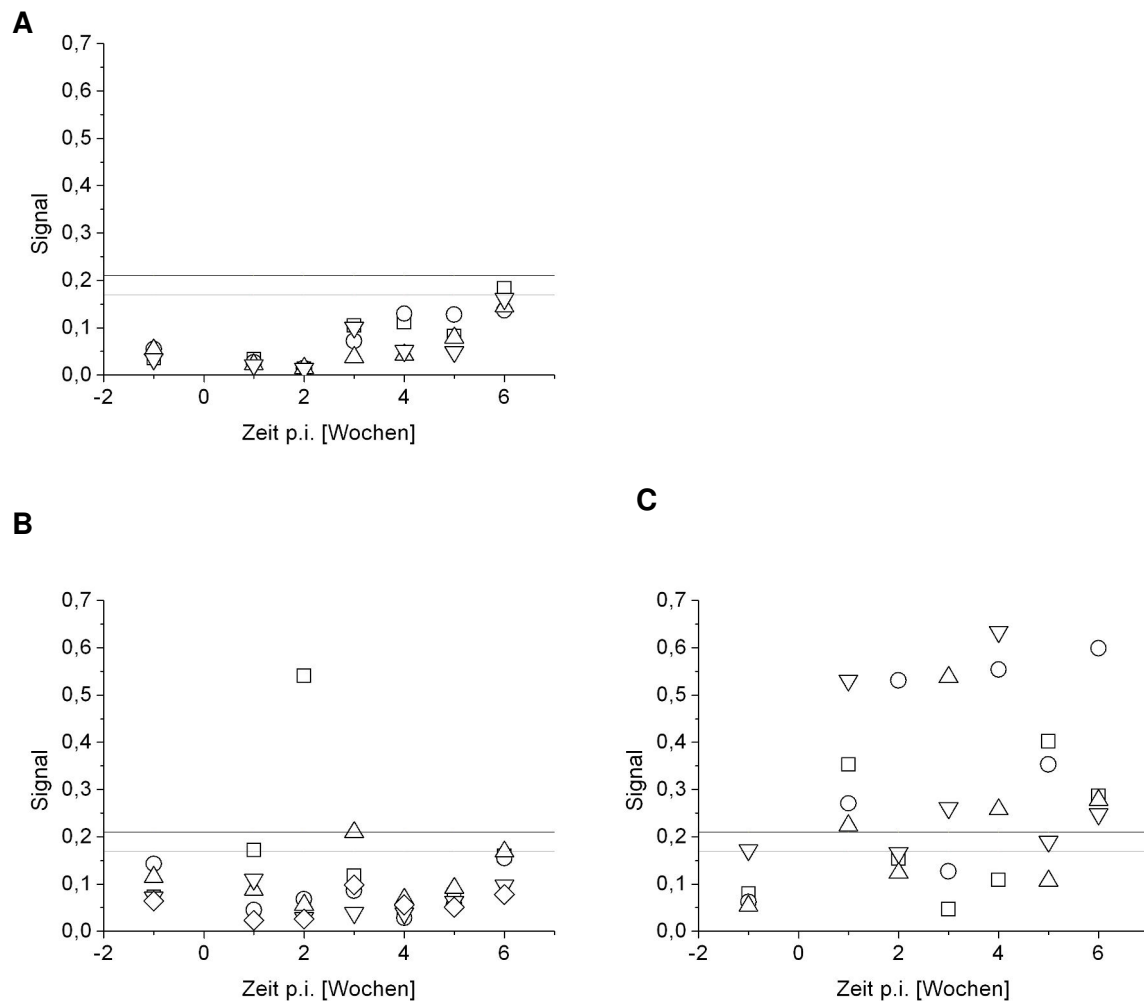


Abbildung 44: Ergebnisse des *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Tests während eines sechswöchigen Versuchszeitraumes. **A:** *H. pylori* HP87 G7 *cheAY2*; Tier 1 bis 4 **B:** *H. pylori* HP87 G7 *tlpD*; Tier 5 bis 9 **C:** *H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm; Tier 10 bis 13. Die Symbole \square (Tier 1, 5 und 10), \circ (Tier 2, 6 und 11), \triangle (Tier 3, 7 und 12), ∇ (Tier 4, 8 und 13) und \diamond (Tier 9) zeigen die Signalstärke der Probe eines einzelnen Tieres an. Die beiden waagrechten Linien geben jeweils den Grenzbereich an, in dem keine Aussage über den Infektionsstatus möglich ist. Unterhalb der unteren Linie (0,190) gilt eine Probe als *H. pylori*-frei; oberhalb der oberen Linie (0,210) gilt eine Probe als *H. pylori*-positiv. **Geschlechtsverteilung:** Tier 1 bis 7: weiblich. Tier 8 bis 13: männlich.

Nach sechs Wochen wurden die Tiere euthanisiert und jeweils zwei Gewebeproben aus dem Antrum des Magen entnommen. Die zwei Proben wurden mit Hilfe einer diagnostischen PCR auf *H. pylori* überprüft. Zusätzlich wurde aus weiteren Gewebeproben *H. pylori* reisoliert und die Keimzahl pro Milligramm Magengewebe bestimmt. Tabelle 21 und

Abbildung 45 zeigen, dass in der Kontrollgruppe *cheAY2* keine Infektion nachgewiesen werden konnte. In der Wildstamm-Gruppe konnte aus allen Tieren *H. pylori* reisoliert werden; die durchschnittliche Bakterienlast lag bei ca. 2000 cfu/mg Gewebe. Im Gegensatz dazu konnte in der *tlpD*-Gruppe nur in zwei von fünf Tieren eine Infektion nachgewiesen werden. Zudem lag die mittlere bakterielle Last der *tlpD*-infizierten Tiere deutlich niedriger (Median = 0,2) als es bei der Wildstamm-Gruppe (Median = 1852) der Fall war. Die erhaltenen Daten wurden mittels eines Rangsummentests auf Signifikanz überprüft. Die Unterschiede waren signifikant ($p = 0,029$ für *cheAY2* und $p = 0,016$ für *tlpD*; Rangsummentest). Es konnte kein Unterschied bezüglich des Geschlechts der Tiere festgestellt werden, da es in der *tlpD*-Gruppe sowohl ein infiziertes weibliches als auch ein infiziertes männliches Tier gab.

Tabelle 21: CFU pro mg Gewebe. Angegeben ist die berechnete Anzahl der CFU pro mg Gewebe, die Tiernummer, das Geschlecht, das in Abbildung 45 verwendete Symbol und die Art des Inokulums

Inokulum/Tier # (Geschlecht) - Symbol	CFU pro mg Magengewebe
<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>cheAY2</i>	
1 (♀) □	0
2 (♀) ○	0
3 (♀) △	0
4 (♀) ▽	0
<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>tlpD</i>	
5 (♀) □	2,30
6 (♀) ○	0
7 (♀) △	0
8 (♂) ▽	274,09
9 (♂) ◇	0
<i>H. pylori</i> HP87 G7	
10 (♂) □	2248,70
11 (♂) ○	1857,49
12 (♂) △	1847,58
13 (♂) ▽	1724,40

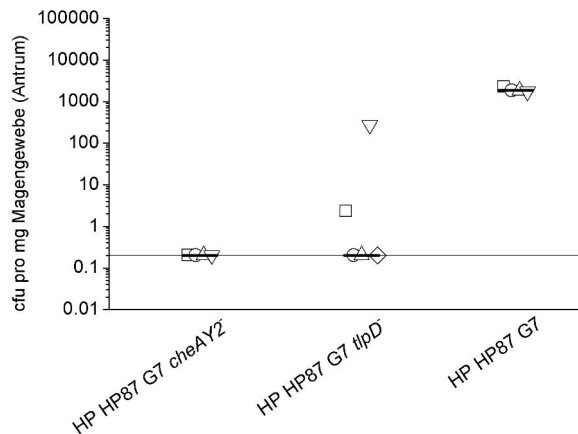


Abbildung 45: Bakterielle Last pro Milligramm Gewebe [cfu/mg] 6 Wochen p.i. für die Stämme *H. pylori* HP87G7, *H. pylori* HP87 G7 *cheAY2* und *H. pylori* HP87 G7 *tlpD*. Gezeigt wird die Menge an CFU pro Gewebe, die anhand der Reisolation bestimmt wurden. Die Symbole \square (Tier 1, 5 und 10), \circ (Tier 2, 6 und 11), \triangle (Tier 3, 7 und 12), ∇ (Tier 4, 8 und 13) und \diamond (Tier 9) zeigen die bakterielle Last eines einzelnen Tieres an. — stellt den Median der Bakterienlast der jeweiligen Gruppe dar. Die waagrechte Linie markiert das Detektionslimit von 0,2 cfu/mg.

Der Infektionsstatus der Tiere konnte mittels PCR bestätigt werden (Abbildung 46). So waren alle mit dem Wildstamm-inokulierten Tiere *H. pylori* positiv bei der Verwendung von gattungs- (Spur 13 bis 16) und speziesspezifischen (Spur 27 bis 30) Primern, während in der *tlpD*-Gruppe eine Infektion nur in einem der Tiere mit gattungsspezifischen Primern bestätigt werden konnte (Spur 8). Innerhalb der *cheAY2*-Gruppe konnte für keines der Tiere eine Infektion nachgewiesen werden (Spur 1 bis 4 bzw. 18 bis 21).

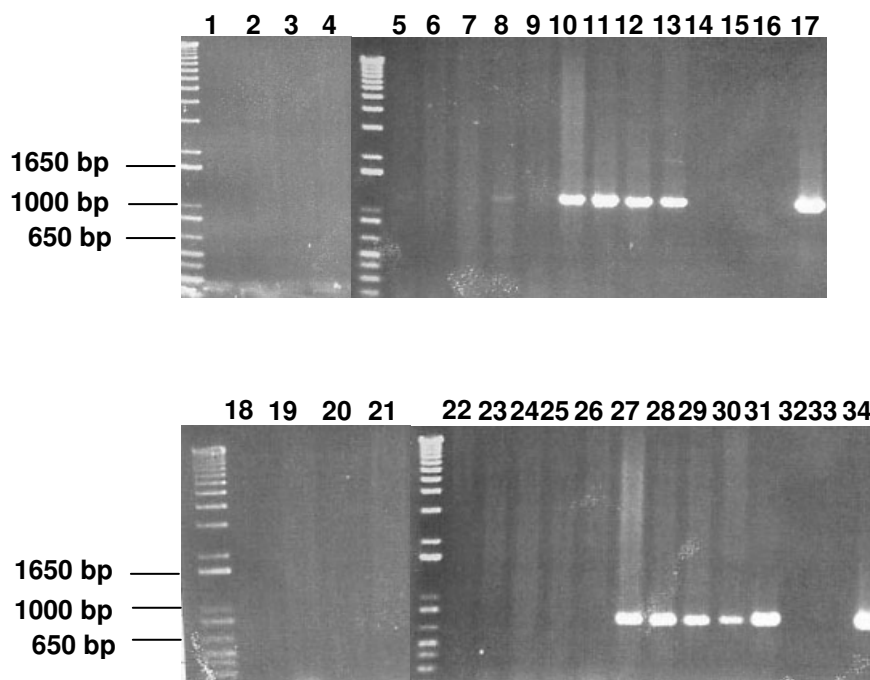


Abbildung 46: Agarosegele der diagnostischen PCRs der aus dem Magengewebe der Mongolischen Rennmäuse isolierten DNA.

Spur 1 bis 17: Gattungsspezifische Primer (16S – erwartete Größe 1200 bp): **Spur 1 –bis 4:** Tier 1 bis 4 (*cheAY2*-Gruppe); **Spur 5 bis 9:** Tier 5 bis 9 (*tlpD*-Gruppe); **Spur 10 bis 13:** Tier 10 bis 13 (Wildstamm-Gruppe); **Spur 14:** Probe aus Tier 1 versetzt mit einer Kolonie des *H. pylori*-HP87-G7-Wildstammes vor der DNA-Isolierung; **Spur 15:** Negativkontrolle der DNA-Isolierung (Eluat einer Leersäule); **Spur 16:** PCR-Negativkontrolle **Spur 17:** PCR-Positivkontrolle (*H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm-DNA);

Spur 18 bis 34: Speziesspezifische Primer (*mutY* – erwartete Größe 700 bp): **Spur 18 bis 21:** Tier 1 bis 4 (*cheAY2*-Gruppe); **Spur 22 bis 26:** Tier 5 bis 9 (*tlpD*-Gruppe); **Spur 27 bis 30:** Tier 10 bis 13 (Wildstamm-Gruppe); **Spur 31:** Probe aus Tier 1 versetzt mit einer Kolonie des *H. pylori*-HP87-G7-Wildstammes vor der DNA-Isolierung; **Spur 32:** Negativkontrolle der DNA-Isolierung (Eluat einer Leersäule); **Spur 33:** PCR-Negativkontrolle; **Spur 34:** PCR-Positivkontrolle (*H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm-DNA)

7.10.3 Untersuchung der Rolle von TlpD im Infektionsverlauf von der akuten zur chronischen Infektion

Aufgrund der Abnahme der Signalstärken im *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Tests während des Versuchszeitraums (siehe Abschnitt 7.10.2; Abbildung 44), konnte für diese Arbeit die Hypothese aufgestellt werden, TlpD sei vor allem für die Persistenz nicht jedoch für die initiale Infektion durch die Bakterien essenziell. So traten im ersten Infektionsexperiment zu Beginn des Zeitraumes (Woche 2 und Woche 3) in der *tlpD*-Gruppe im *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Test noch positive Tiere auf, während dies gegen Ende nicht mehr der Fall war (Abbildung 44).

In einem weiteren Infektionsexperiment wurde mittels zweier Sektionszeitpunkte der Infektionsverlauf näher untersucht. Eine erste Sektion fand zwei Wochen nach der Inokulation statt und sollte die Verhältnisse zu Beginn der Infektion abbilden, eine zweite Sektion fand sechs Wochen nach der Infektion statt und sollte die Verhältnisse zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Infektion, welcher bereits unter Einfluss persistierender Effekte steht, aufklären. Während des kompletten Infektionszeitraumes wurde der Infektionsstatus der Tiere wöchentlich mittels des Stuhlantigentests überprüft.

Um darüber hinaus Rückschlüsse auf die Lokalisierung der *tlpD*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp innerhalb des Magens zu ziehen, wurden im Rahmen dieses Experimentes Proben aus dem Antrum und dem Korpus des Tiermagens entnommen. Es ist bekannt, das *H. pylori* überwiegend das Antrum des menschlichen Magens besiedelt. Zudem unterscheiden sich Antrum und Korpus stark in Bezug auf den pH-Wert und die Gewebestruktur (Schubert und Peura, 2008). In diesem Experiment wurde die Fähigkeit zur Infektion der verschiedenen Mutanten sowohl nach Infektionsrate als auch nach der vorhandenen bakteriellen Last pro Milligramm Magengewebe in jedem einzelnen Tier beurteilt. Als Infektionsrate wurde der Prozentsatz an Tieren, welche pro Gruppe infiziert waren, definiert. Zur Bestimmung der bakteriellen Last wurde die Anzahl der Bakterien pro Milligramm Gewebe bestimmt.

Zwei Wochen nach der Infektion lag die Infektionsrate des Wildstammes sowohl im Antrum als auch im Korpus bei 100% (Abbildung 47, Tabelle 22). In der Gruppe der mit der *tlpD*-Mutante infizierten Tiere dagegen lag der Anteil an kolonisierten Tieren lediglich bei 50% (3 von 6 Tieren) im Antrum bzw. bei 16% (1 von 6 Tieren) im Korpus (Abbildung 47). Die Fähigkeit zur Infektion in der *tlpD*-Mutante, vor allem im Korpus, ist folglich abgeschwächt. Auffallend ist, dass sich zwei Wochen nach Inokulation bezüglich der Bakterienlast ein sehr uneinheitliches Bild ergibt, sowohl in der *tlpD*-Gruppe als auch in der Wildstamm-Gruppe schwankt die Anzahl der cfu/mg Gewebe um mehrere log-Stufen. Im Antrum unterschied sich die mittlere bakterielle Last pro Milligramm Gewebe zwischen den mit Wildstamm (3708 cfu/mg) und den mit der *tlpD*-Mutante (20 cfu/mg) infizierten Tieren nicht signifikant ($p = 0,352$; Rangsummentest). Im Korpus dagegen war bereits zu diesem frühen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der mittleren bakteriellen Last zwischen Wildstamm-infizierten (869 cfu/mg) und Sensormutante-infizierten (2 cfu/mg) Tieren zu sehen ($p = 0,038$; Rangsummentest). Es bestand folglich ein Unterschied in der Verteilung der Bakterien innerhalb des Magens zwischen Wildstamm und *tlpD*-Mutante. Zu keinem Zeitpunkt konnte in der *cheAY2*-Gruppe eine Infektion nachgewiesen werden.

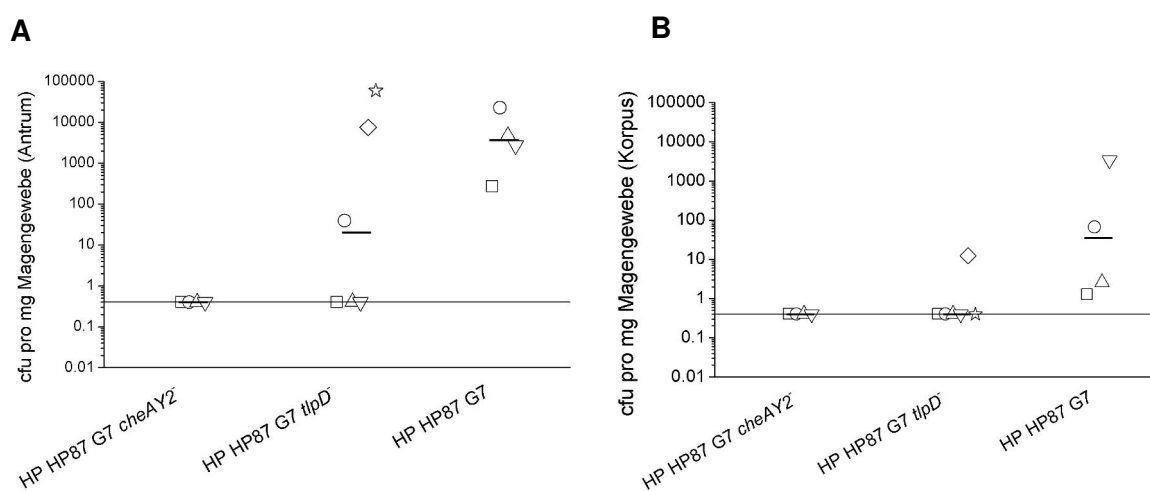


Abbildung 47: Bakterielle Last im Antrum (A) und Korpus (B) 2 Wochen p.i. für die Stämme *H. pylori* G7 HP87, *H. pylori* HP87 G7 *cheAY2* und *H. pylori* HP87 G7 *tlpD* Gezeigt wird die Menge an CFU pro Gewebe, die anhand der Reisolation bestimmt wurden. Die Symbole \square (Tier 1, 9 und 21), \circ (Tier 2, 10 und 22), \triangle (Tier 3, 11 und 23), ∇ (Tier 4, 12 und 24), \diamond (Tier 13) und \star (Tier 14) zeigen die bakterielle Last eines einzelnen Tieres an. — stellt den Median der Bakterienlast der jeweiligen Gruppe dar. Die waagrechte Linie markiert das Detektionslimit von 0,4 cfu/mg.

Tabelle 22: CFU pro mg Gewebe zwei Wochen nach Inokulation. Angegeben ist die berechnete Anzahl der CFU pro mg Gewebe in Antrum und Korpus, die Tiernummer, das Geschlecht, das in Abbildung 47 verwendete Symbol und die Art des Inokulums.

Inokulum/Tier # (Geschlecht) - Symbol	CFU pro mg Magengewebe		
	Antrum	Korpus	
<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>cheAY2</i>	1 (♀) □	0	0
	2 (♀) ○	0	0
	3 (♂) △	0	0
	4 (♂) ▽	0	0
<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>tlpD</i>	9 (♀) □	0	0
	10 (♀) ○	39,74	0
	11 (♀) △	0,41	0
	12 (♂) ▽	0	0
	13 (♂) ◇	7505,64	12,42
	14 (♂) ☆	58944,15	0
<i>H. pylori</i> HP87 G7	21 (♀) □	269,59	1,27
	22 (♀) ○	22551,15	67,39
	23 (♂) △	4700,12	2,55
	24 (♂) ▽	2717,01	3406,70

Sechs Wochen nach der Inokulation verhielten sich die Infektionsraten ähnlich wie zum früheren Zeitpunkt. Der *H. pylori*-HP87-G7-Wildstamm infizierte sowohl im Antrum als auch im Korpus mit einer Infektionsrate von 100% (Abbildung 48A und B). Die *H. pylori*-HP87-G7-*tlpD*-Mutante infizierte dagegen lediglich mit einer Infektionsrate von 66% (4 von 6 Tieren) im Antrum bzw. 33% (2 von 6 Tieren) im Korpus. Die bakterielle Last pro Milligramm Gewebe war sechs Wochen nach Infektion stabiler als nach zwei Wochen. So zeigten sich vor allem im Antrum kaum Schwankungen in der bakteriellen Last zwischen den einzelnen Tieren einer Gruppe. Die mittlere bakterielle Last unterschied sich zu dem späteren Zeitpunkt im Antrum signifikant zwischen dem Wildstamm- (375 cfu/mg) und den *tlpD*-Mutanten-infizierten (20 cfu/mg) Tieren bestand ($p = 0,01$; Rangsummentest). Im Korpus dagegen war der Unterschied zwischen dem Wildstamm (165 cfu/mg) und der Mutante (0,5 cfu/mg) sehr stark, aber nicht statistisch signifikant ($p = 0,114$; Rangsummentest).

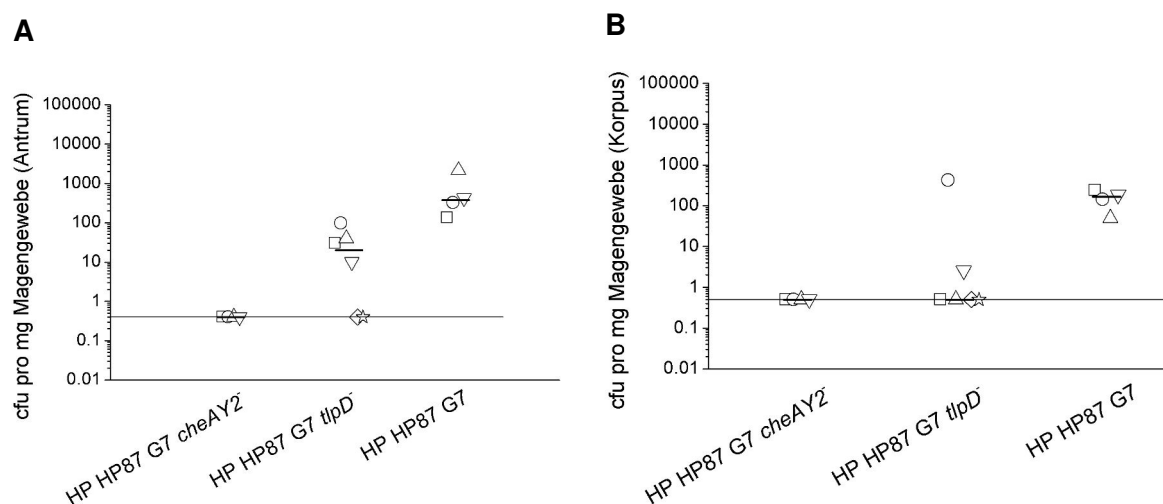


Abbildung 48: Bakterielle Last im Antrum (A) und Korpus (B) sechs Wochen p.i. für die Stämme *H. pylori* HP87 G7, *H. pylori* HP87 G7 *cheAY2* und *H. pylori* HP87G7 *tlpD* Gezeigt wird die Menge an CFU pro Gewebe, die anhand der Reisolation bestimmt wurden. Die Symbole \square (Tier 5, 15 und 25), \circ (Tier 6, 16 und 26), Δ (Tier 7, 17 und 27), ∇ (Tier 8, 18 und 28), \diamond (Tier 19) und \star (Tier 20) zeigen die bakterielle Last eines einzelnen Tieres an. — stellt den Median der Bakterienlast der jeweiligen Gruppe dar. Die waagrechte Linie markiert das Detektionslimit von 0,4 cfu/mg (A) bzw. 0,5 cfu/mg (B).

Tabelle 23: CFU pro mg Gewebe sechs Wochen nach Inokulation. Angegeben ist die berechnete Anzahl der CFU pro mg Gewebe in Antrum und Korpus, die Tiernummer, das Geschlecht, das in Abbildung 48 verwendete Symbol und die Art des Inokulums.

Inokulum/Tier # (Geschlecht) - Symbol	CFU pro mg Magengewebe		
	Antrum	Korpus	
<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>cheAY2</i>	5 (♀) \square	0	0
	6 (♀) \circ	0	0
	7 (♂) Δ	0	0
	8 (♂) ∇	0	0
<i>H. pylori</i> HP87 G7 <i>tlpD</i>	15 (♀) \square	30,26	0
	16 (♀) \circ	98,33	428,28
	17 (♀) Δ	39,51	0
	18 (♂) ∇	10,01	2,56
	19 (♂) \diamond	0	0
	20 (♂) \star	0	0
<i>H. pylori</i> HP87 G7	25 (♀) \square	136,43	241,04
	26 (♀) \circ	327,28	143,25
	27 (♂) Δ	2145,99	49,20
	28 (♂) ∇	423,67	185,86

Bezüglich des Geschlechts der Tiere und dessen Einfluss auf die Kolonisierbarkeit gegenüber der *tlpD*-Mutante lässt sich bislang keine Aussage treffen. Während zwei Wochen nach der Inokulation noch die männlicher durch die *tlpD*-Mutante stärker kolonisiert zu werden als weiblichen (Tabelle 22), scheinen nach sechs Wochen eher die weiblichen kolonisiert zu werden als die männlichen (Tabelle 23). Bislang sind wahrscheinlich die Gruppengrößen zu gering, um an dieser Stelle eine statistisch abgesicherte Aussage treffen zu können (siehe Diskussion).

7.11 Analyse der Effekte der Sensoren von *H. pylori* im heterologen Modell von *E. coli* im Hinblick auf Verhalten, Energiewahrnehmung und mögliche Substratspezifität

Als ein möglicher Ansatz zur näheren Charakterisierung der Sensoren und ihrer Substratspezifität diene das heterologe Modell von *E. coli*. Die Untersuchung von *E. coli* in verschiedenen Schwärmmedien im Hinblick auf spezielles Verhalten ist bereits etabliert. Des Weiteren existieren verschiedene Minimalmedien, in welchen eine Identifikation des potenziellen Stimulus leichter fällt als in den komplexen Medien, welche für *H. pylori* benötigt werden. Für die Plattenmotilitätstests (hier auch teilweise als „Schwärmtests“ bezeichnet, obwohl nicht die Eigenschaft des Schwärmens auf der Plattenoberfläche sondern das Schwimmen in der Agarschicht untersucht wird) wurden die Gene der einzelnen *H. pylori* Sensoren (*tlpA*, *tlpB*, *tlpC* und *tlpD*) in das Expressionsplasmid pTrc99a kloniert und verschiedene *E. coli*-Stämme damit transformiert. Es wurde ein Chemotaxis-Referenz-Wildstamm (RP437), ein Stamm ohne Chemosensoren (BT3388) und ein Stamm ohne die bekannten Energiesensoren Aer und Tsr (BT3312) verwendet (Tabelle 11). Der Stamm ohne Chemosensoren BT3388 diene in den Experimenten als negative Kontrolle, da dieser Stamm nicht mehr zu Taxis fähig ist. Der Stamm BT3312 diene als negative Kontrolle bezüglich Energietaxis, da er noch zur Chemotaxis aber nicht mehr zur Energietaxis fähig ist. Zur besseren Übersicht sind alle erhaltenen konstruierten Stämme in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme. Angegeben sind der Name, die synthetisierten Sensoren und der Verwendungszweck. Die Energiesensoren (Aer, Tsr) wurden **fett** dargestellt.

<i>E. coli</i> -Stamm	synthetisierte Sensoren	Verwendungszweck
BT3388(pTrc99a)	--	negative Kontrolle
BT3388(pCJ328)	TlpC aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpC
BT3388(pCJ330)	TlpA aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpA
BT3388(pCJ332)	TlpB aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpB
BT3388(pCJ401)	TlpD aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpD
BT3388(pCJ510)	TlpA-Aer-Hybridsensor	funktionelle Analyse von TlpA
BT3388(pGH1)	Aer aus <i>E. coli</i>	positive Kontrolle bezüglich Aer-abhängiger Energietaxis
RP437(pTrc99a)	Tar, Trg, Tap, Aer, Tsr aus <i>E. coli</i>	positive Kontrolle
RP437(pCJ328)	Tar, Trg, Tap, Aer, Tsr aus <i>E. coli</i> TlpC aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpC
RP437(pCJ330)	Tar, Trg, Tap, Aer, Tsr aus <i>E. coli</i> TlpA aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpA
RP437(pCJ332)	Tar, Trg, Tap, Aer, Tsr aus <i>E. coli</i> TlpB aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpB
RP437(pCJ401)	Tar, Trg, Tap, Aer, Tsr aus <i>E. coli</i> TlpD aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpD
RP437(pCJ510)	Tar, Trg, Tap, Aer, Tsr aus <i>E. coli</i> TlpA-Aer	Funktionelle Analyse von TlpA
BT3312(pTrc99a)	Tar, Trg, Tap aus <i>E. coli</i>	Energietaxis-negative Kontrolle
BT3312(pCJ328)	Tar, Trg, Tap aus <i>E. coli</i> TlpC aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpC
BT3312(pCJ330)	Tar, Trg, Tap aus <i>E. coli</i> TlpA aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpA
BT3312(pCJ332)	Tar, Trg, Tap aus <i>E. coli</i> TlpB aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpB
BT3312(pCJ401)	Tar, Trg, Tap aus <i>E. coli</i> TlpD aus <i>H. pylori</i>	funktionelle Analyse von TlpD
BT3312(pCJ510)	Tar, Trg, Tap aus <i>E. coli</i> TlpA-Aer	funktionelle Analyse von TlpA

Die heterologe Synthese der einzelnen Sensoren in *E. coli* BT3388 wurde mittels Westernblot-Analyse (siehe Methoden 6.15) überprüft. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer stationären Übernachtskultur der einzelnen Stämme inokuliert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurde die Synthese der Proteine (TlpA, TlpB, TlpC, TlpD) mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden 1,5 ml der Zellsuspension geerntet, die Bakterien sedimentiert und in 0,5 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Die Bakterien wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und der Proteingehalt des Lysats mit einem BCA-Assay bestimmt (siehe Methoden 6.13). Die Synthese der einzelnen Sensoren im Vergleich zu einer Negativkontrolle konnte bestätigt werden. In den einzelnen Spuren wurde jeweils eine spezifische Bande bei einer Größe von ca. 75 kDa, 74 kDa, 63 kDa bzw. 48 kDa und eventuelle proteolytische Abbaubanden detektiert (Abbildung 49). Diese Banden entsprachen den Proteinen TlpC, TlpA, TlpB und TlpD (Tabelle 1).

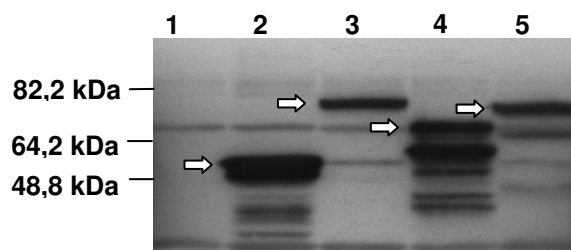


Abbildung 49: Westernblot-Analyse zum Nachweis der heterologen Expression der Sensorgene von *H. pylori* in *E. coli* BT3388. Aufgetragen wurden Gesamtzelllysate der Stämme **1:** *E. coli* BT3388(pTrc99a); negative Kontrolle des Expressionsstammes **2:** *E. coli* BT3388(pCJ401) (TlpD) **3:** *E. coli* BT3388(pCJ328) (TlpC), **4:** *E. coli* BT3388(pCJ332) TlpB und **5:** *E. coli* BT3388(pCJ330) (TlpA); Primärer Antikörper: Kaninchen- α -TlpD-3387 (1:10.000), sekundärer Antikörper: POX-Ziege- α -Kaninchen (1:20.000); Die offenen Pfeile deuten jeweils auf spezifische Bande entsprechender Größe. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ g Protein pro Spur.

7.11.1 Funktion der vier Sensoren TlpA, TlpB, TlpC und TlpD aus *H. pylori* in *E. coli* BT3388 gegenüber verschiedenen Zuckern in Minimalmedium

Im ersten Schritt der Motilitätstests wurde die Reaktion auf verschiedene Zucker getestet. Damit sollte die Hypothese überprüft werden, ob sich durch die Zufuhr von Nährstoffen das Beweglichkeitsverhalten der transformierten *E. coli* ändert. Zum einen sind aus anderen Spezies Sensoren für verschiedene Zucker in niedrigen Konzentrationen bekannt (z.B. *E. coli*-Trg bzw. *S. Typhimurium*-Trg für Ribose und Galaktose, *E. coli*-Tar für Maltose), zum anderen kann durch die Verwendung von metabolisierbaren Substanzen in hohen Konzentrationen (> 1 mM) möglicherweise Energietaxis nachgewiesen werden (Greer-Phillips *et al.*, 2003). Dazu wurden dem Minimalmedium (siehe Methoden 6.24) jeweils ein Zucker (Saccharose, Glucose, Ribose, Succinat, Fumarat, oder Pyruvat) mit einer finalen Konzentration von 5 mM zugesetzt. Der Versuch wurde in aerober (Raumluft – ca. 20% O₂),

mikroaerob (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) und anaerob (0% O₂, 100% N₂) Atmosphäre durchgeführt, da *H. pylori* andere atmosphärische Anforderungen hat als *E. coli* (Mikroaerophilie, Capnophilie) (siehe Einleitung 4.1.3). In *E. coli* wiederum wird der Stoffwechsel in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration reguliert. Damit sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Sensoren aus *H. pylori*, welche für einen mikroaeroben Stoffwechsel optimiert sind, eher in Anwesenheit von metabolischen Prozessen reagieren, welche unter mikroaeroben Bedingungen in *E. coli* bevorzugt ablaufen (siehe Diskussion 8.9.1). Die Bakterien wurden wie beschrieben angezüchtet und vorbereitet (siehe Methoden 6.24) und die Schwärmhöfe der verschiedenen Stämme in den einzelnen Motilitätsplatten vermessen. Die Größe des Hofes wurde dabei als Hinweis darauf gewertet, ob eine Substanz direkt oder indirekt wahrgenommen wurde oder nicht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 25 zu sehen.

Tabelle 25: Größe der Beweglichkeitshöfe [cm] der verschiedenen *E. coli*-Stämme in Motilitätsplatten. Angegeben ist jeweils der Durchmesser des beobachteten Hofes [cm] unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen und in Gegenwart unterschiedlicher Zucker. Die grau hinterlegten Zellen heben Werte hervor, welche sich deutlich von den angegebenen Kontrollen unterscheiden und auch im Text angesprochen werden.

Zucker	Atmosphäre	RP437 pTrc99a	BT3388 pTrc99a	BT3388 (pCJ328) TlpC	BT3388 (pCJ330) TlpA	BT3388 (pCJ332) TlpB	BT3388 (pCJ401) TlpD
Glukose	aerob	1,80	1,40	1,50	1,50	1,20	1,40
	mikroaerob	2,20	1,60	1,60	2,35	2,05	1,70
	anaerob	1,60	1,30	1,20	2,20	1,55	1,20
Ribose	aerob	2,25	1,20	1,00	1,50	1,00	1,20
	mikroaerob	3,50	1,10	1,20	1,60	1,15	1,15
	anaerob	0,60	0,70	0,60	0,60	0,50	0,60
Succinat	aerob	4,30	1,00	1,00	1,30	1,10	1,10
	mikroaerob	4,60	1,20	1,10	1,40	1,20	1,20
	anaerob	0,65	0,50	0,60	0,60	0,60	0,50
Fumarat	aerob	2,60	1,00	0,80	0,95	1,05	1,00
	mikroaerob	3,10	1,40	1,40	2,15	1,80	1,35
	anaerob	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Pyruvat	aerob	2,15	0,85	0,80	1,05	0,80	0,85
	mikroaerob	2,95	1,15	1,00	1,75	1,05	0,90
	anaerob	2,5	0,95	0,85	0,80	1,05	0,95
Saccharose	aerob	0,60	0,60	0,60	0,60	0,50	0,60
	mikroaerob	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,50
	anaerob	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

In dem vorliegenden Experiment wurde das taktische Verhalten verschiedener *E. coli*-Stämme gegenüber verschiedenen Zuckern in Motilitätsplatten untersucht. Aufgrund der genomischen Information von *H. pylori* wurde vermutet, dass alle Zucker bis auf Saccharose wahrscheinlich in *H. pylori* verstoffwechselt werden können. In unserem heterologen Modell von *E. coli* sollten alle Zucker inklusive Saccharose verstoffwechselt werden. Die Positivkontrolle zeigte unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen außer zu Saccharose gegenüber allen Substraten eine deutliche Reaktion in Form eines großen Hofes. Unter anaeroben Bedingungen zeigte die Positivkontrolle nur eine Reaktion zu Glucose (\varnothing 1,6 cm) und Pyruvat (\varnothing 2,5 cm). Die Negativkontrolle zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle unter allen Bedingungen eine schwächere radiale Motilität.

In der Regel war für Sensoren aus *H. pylori* unter anaeroben Bedingungen keine Beweglichkeitsreaktion zu beobachten. Lediglich in Gegenwart von Glucose gab es unter anaeroben Bedingungen eine Reaktion (\varnothing 2,2 cm) des Sensors TlpA im Vergleich zur Negativkontrolle *E. coli* BT3388(pTrc99a) (\varnothing 1,3 cm). Der Effekt des *H. pylori*-Sensors TlpA (\varnothing 2,2 cm) war in Gegenwart von Glucose noch größer als der der Positivkontrolle *E. coli* RP437(pTrc99a) (\varnothing 1,6 cm). Im Gegensatz zur Positivkontrolle zeigte unter anaeroben Bedingungen kein Sensor aus *H. pylori* eine Reaktion zu Pyruvat.

Unter aeroben Bedingungen war stets eine sehr deutliche Antwort der Positivkontrolle (RP437(pTrc99a)) zu beobachten. Außerdem konnte für den Sensor TlpA im Vergleich zur Negativkontrolle (\varnothing 1,2 cm; 1,0 cm bzw. 0,85 cm) eine deutliche Reaktion bei einer Verwendung der Zucker Ribose (\varnothing 1,5 cm), Succinat (\varnothing 1,3 cm) und Pyruvat (\varnothing 1,05 cm) beobachtet werden. Die anderen Sensoren aus *H. pylori* (TlpB, TlpC und TlpD) zeigten unter aerober Atmosphäre unter den getesteten Bedingungen keine Reaktionen.

Unter mikroaeroben Bedingungen zeigte der Sensor TlpA (BT3388(pCJ330)) zu allen Zuckern außer Saccharose eine Reaktion (Tabelle 25). Die Reaktion gegenüber Ribose, Succinat und Pyruvat fiel unter mikroaeroben Bedingungen deutlicher aus als unter aeroben Bedingungen. Unter mikroaeroben Bedingungen konnte zusätzlich für den Sensor TlpB eine Reaktion gegenüber Glucose (\varnothing 2,05 cm) und Fumarat (\varnothing 1,8 cm) im Vergleich zur Negativkontrolle (\varnothing 1,6 cm bzw. 1,4 cm) festgestellt werden. Für die Sensoren TlpC und TlpD konnte unter keiner der getesteten Bedingungen ein Einfluss auf die Größe des Taxishofes festgestellt werden.

Beispielhaft sind in Abbildung 50 fumaratsupplementierte Motilitätsplatten mit den Motilitätshöfen einzelner untersuchter Mutanten zu sehen. Die gezeigten Platten wurden unter mikroaerober Atmosphäre inkubiert (5% O₂). Zusätzlich zu den in der Tabelle 25 aufgeführten Stämmen wurden hier auch die entsprechenden Negativ-Kontrollen (BT3388(pCJ329), BT3388(pCJ331) und BT3388(pCJ333); Tabelle 11), sowie eine weitere Positivkontrolle (BT3388(pGH1)), welche den *E. coli*-Sensor Aer trägt und ein Stamm,

welcher einen TlpA-Aer-Hybrid-Sensor trägt (pCJ510; siehe Methoden 6.9) aufgetragen. Es konnte eine Reaktion für die Sensoren TlpA und TlpB beobachtet werden. Die Schwärzhöfe waren größer als die der jeweiligen korrespondierenden Kontrollen (pCJ331, pCJ333) und der der Negativkontrolle (BT3388). Keine Änderung der Größe des Schwärzhofes war dagegen im Falle von TlpC und TlpD im Vergleich zu den jeweiligen spezifischen Kontrollen (BT3388(pCJ329); BT3388(pCJ401)) oder zu dem chemotaxisnegativen Stamm (BT3388(pTrc99a)) zu erkennen. Auch zeigte der TlpA-Aer-Hybrid-Sensor keine positive Reaktion unter den getesteten Bedingungen. In diesem Fall erschien die Größe des Schwärzhofes sogar noch geringer als die der Negativkontrolle (BT3388(pTrc99a)). Die beiden Positivkontrollen (RP437(pTrc99a), BT3388(pGH1)) zeigten jeweils einen größeren Schwärzhof als die Negativkontrolle (BT3388(pTrc99a)).

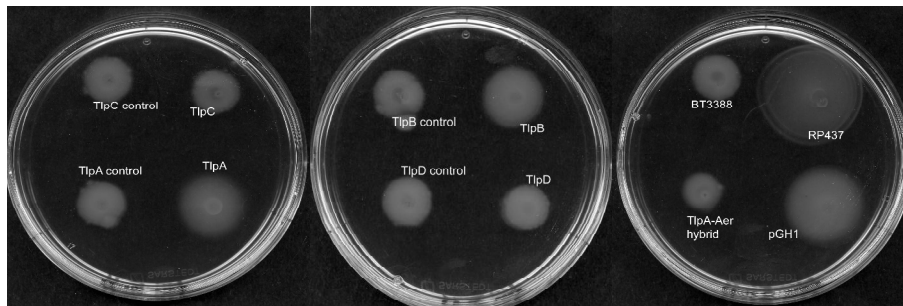


Abbildung 50: Motilitätsplatten mit 5 mM Fumarat. Gezeigt werden Motilitätsplatten bestehend aus Minimalmedium supplementiert mit 5 mM Fumarat. Die Platten wurden mit jeweils 10^6 Bakterien der unterschiedlichen Stämme in einem Volumen von 10 μ l inokuliert und für 36 h bei 5% O_2 inkubiert. Der Name der Stämme ist jeweils in der Abbildung vermerkt.

Zusammenfassend konnte im beschriebenen Experiment festgestellt werden, dass der Sensor TlpA vor allem unter mikroaeroben Bedingungen ein positives taktisches Verhalten in Anwesenheit verschiedener metabolisierbarer Zucker vermittelt. Eine ähnliche jedoch schwächere Reaktion konnte auch für TlpB gezeigt werden. Auch dieser Sensor vermittelt ein positives Schwärmverhalten in Anwesenheit mancher Zucker. Für TlpB konnte dies ausschließlich unter mikroaeroben Bedingungen beobachtet werden, während für TlpA auch Reaktionen unter aeroben und anaeroben Bedingungen beobachtet werden konnten.

7.11.2 Funktion der vier Sensoren aus *H. pylori* im *E. coli*-Stamm BT3388 in Anwesenheit von Acetat, Arginin und Bicarbonat

Im Mukus des menschlichen Magens liegt ein pH- und eine Bicarbonat/ CO_2 -Gradient vor. Erst bei einer Änderung beider Gradienten (Absenkung des luminalen pH-Wertes und der luminalen Bicarbonatkonzentration) verlieren die Bakterien ihre Fähigkeit zur Orientierung innerhalb des Mukus, wie im Modell der Mongolischen Rennmaus gezeigt werden konnte

(Schreiber *et al.*, 2004) (siehe Einleitung 4.1.5.1). Daher sollte im Folgenden der Einfluss von verschiedenen schwachen Säuren und von Bicarbonat auf das Schwärmverhalten untersucht werden. Dazu wurden die Reaktionen der verschiedenen Sensoren in Minimalmediumplatten, welche mit Acetat, Arginin oder Bicarbonat supplementiert wurden, untersucht. Da keines der genannten Substrate für *E. coli* als Wachstumssubstrat geeignet ist, wurden 5 mM Fumarat (als Stoffwechselsubstrat) mit Acetat, Arginin oder Bicarbonat in verschiedenen Konzentrationen (0,5 mM und 5 mM) kombiniert. Die schwachen organischen Säuren könnten wiederum zusätzliche Hinweise auf den Mechanismus der Energiewahrnehmung verschaffen. Der pH-Wert der Umgebung hat einen unmittelbaren Einfluss auf die *proton motive force* und damit auch auf den Energiehaushalt der Bakterien, da sich die PMF aus dem elektrischen Membranpotential und der pH-Differenz zwischen dem Periplasma und dem Cytosol zusammensetzt. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Art der Reaktion auf unterschiedliche Substrate auch auf den Mechanismus (Tsr oder Aer) der Energiewahrnehmung schließen lassen (Greer-Phillips *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2006) (siehe Diskussion 8.9). Als Kontrolle wurden Minimalmediumplatten ausschließlich mit Fumarat (5 mM) supplementiert.

Die Bakterien wurden wie beschrieben angezüchtet und vorbereitet (siehe Methoden 6.24). Unter allen atmosphärischen Bedingungen waren die beobachteten Schwärmhöfe stets denen der Fumaratkontrolle ähnlich. Die verwendeten Säuren und das Bicarbonat beeinflussten unter den untersuchten Bedingungen das taktische Verhalten der Bakterien nicht. Eine Acetatkonzentration von 5 mM stellte sich als toxisch für die Bakterien heraus. In diesem Fall wurde unter keiner atmosphärischen Bedingung Wachstum beobachtet.

7.11.3 Funktion der vier Sensoren aus *H. pylori* in *E. coli*-Stämmen RP437, BT3388 und BT3312 in Succinat-Platten

In den bisher durchgeführten Experimenten wurde das basale Expressionslevel des unter der Kontrolle des *lac*-Promotor stehenden Expressionsplasmids pTrc99a als ausreichend angesehen. Möglicherweise war das Expressionsniveau einzelner Sensoren (TlpC, TlpD) nicht hoch genug, um im vorliegenden heterologen Modell eine Reaktion zu zeigen, daher wurde im folgenden Experiment die Reaktion zu Succinat (1 mM) nach Induktion mit IPTG in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mM; 0,5 mM; 1,0 mM) untersucht. Da außerdem die Möglichkeit bestand, einzelne Sensoren würden eine negative Taxis-Antwort, also eine Fluchtreaktion, vermitteln, welche in einem chemotaxisnegativen Hintergrund (BT3388) nur schwer zu sehen wäre, wurden zusätzlich die vier Sensoren aus *H. pylori* und der konstruierte Hybridsensor TlpA-Aer (siehe Methoden 6.9) in einem anderen genetischen Hintergrund untersucht. So wurden die Sensoren (TlpA, TlpB, TlpC, TlpD, TlpA-Aer) auch in

die *E. coli*-Stämme RP437 und BT3312 eingebracht und die erhaltenen Stämme in den einzelnen Experimenten untersucht. Als Kohlenstoffquelle wurde Succinat gewählt, da sich dies besonders für die Untersuchung von Aer-abhängiger Energietaxis in *E. coli* eignet. Der Energiesensor Aer aus *E. coli* reagiert auf Substrate, welche schnell oxidierbar sind (z.B. Succinat), unabhängig davon wie gut sie als Wachstumssubstrat geeignet sind oder nicht (Greer-Phillips *et al.*, 2003) (siehe Diskussion 8.9). Zudem ist im verwendeten Succinatmedium kein Substrat enthalten, für welches bereits Chemotaxis in *E. coli* beschrieben wurde. In Succinatplatten kommt es aufgrund der starken Atmung der Bakterien zur Bildung eines Sauerstoffkonzentrationsgradienten. Dabei nimmt die Sauerstoffkonzentration ausgehend von der Bakterienkolonie von innen nach außen radial zu. *E. coli*-Bakterien, welche zur Energietaxis fähig sind, orientieren sich dabei in Richtung steigender Sauerstoffkonzentrationen (Bibikov *et al.*, 1997).

Die Bakterien wurden wie beschrieben angezüchtet und vorbereitet (siehe Methoden 6.24). Die Ergebnisse wurden in Tabelle 26 zusammengefasst. Für die vier Sensoren aus *H. pylori* wurden keine Unterschiede in der Größe der Schwärnhöfe in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration beobachtet. Im genetischen Hintergrund des chemotaxisnegativen Stammes *E. coli* BT3388 wurde unter keiner atmosphärischen Bedingung eine Veränderung der Größe des Schwärnhofes durch die Sensoren aus *H. pylori* festgestellt. Lediglich der Hybridsensor TlpA-Aer schien unter aeroben Bedingungen eine Reduktion der Schwärnhofgröße im Vergleich zum Kontrollstamm (BT3388(pTrc99a)) zu verursachen (\emptyset 0,3 cm bzw. 0,7 cm) (Tabelle 26). Die verwendete Positivkontrolle BT3388(pGH1), welche den Sensor Aer trägt, zeigte unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen eine leichte Vergrößerung des Schwärnhofes im Vergleich zur Negativkontrolle BT3388(pTrc99a), welche keinen Sensor trägt. Im genetischen Hintergrund der Stämme *E. coli* BT3312 und *E. coli* RP437 verursachte die Anwesenheit der Sensoren TlpA, TlpB und TlpD eine Reduktion der Größe des Hofes im Vergleich zu den Kontrollen BT3312(pTrc99a) und RP437(pTrc99a). Dieser Effekt war im genetischen Hintergrund von *E. coli* RP437 unter allen atmosphärischen Bedingungen zu beobachten. Im Hintergrund von *E. coli* BT3312 war dieser Effekt lediglich unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen zubeobachten. Der Sensor TlpC zeigte unter keiner der getesteten Bedingungen einen Effekt auf die Größe des Schwärnhofes (siehe Diskussion Abschnitt 8.9.3). Die Stämme *E. coli* BT3312(pCJ510) und RP437(pCJ510), welche den Hybridsensor TlpA-Aer trugen, zeigten kein taktisches Motilitätsverhalten mehr (dominant negativer Phänotyp) (Tabelle 26).

Tabelle 26: Größe der Schwärnhöfe [cm] der verschiedenen *E. coli*-Stämme in Succinat-Motilitätsplatten. Angegeben ist jeweils der Durchmesser des beobachteten Beweglichkeitshofes [cm] unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen und in Gegenwart unterschiedlicher IPTG-Konzentrationen. Die grau hinterlegten Zellen heben Werte heraus, welche sich von den angegebenen Kontrollen unterscheiden und auch im Text angesprochen werden.

	Aerob 20% O ₂			Mikroaerob 5% O ₂			Anaerob 0% O ₂			
	IPTG [mM]			IPTG [mM]			IPTG [mM]			
	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	
RP437	pTrc99a	2	2,4	2,7	2,1	2,3	2,6	1,4	1,5	1,5
	pCJ328	2	2,2	2,0	1,9	1,7	2,0	1,0	0,9	0,7
	pCJ330	0,8	0,7	0,8	0,9	0,8	0,7	0,5	0,3	0,5
	pCJ332	1,5	1,4	1,0	1,0	1,0	0,9	0,5	0,3	0,3
	pCJ401	0,8	1,4	1,2	1,4	1,3	1,5	0,5	0,9	0,5
	pCJ510	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0
BT3312	pTrc99a	2,3	2,1	1,8	2,0	1,9	2,0	0,2	0,5	0,3
	pCJ328	2,1	1,9	1,7	2,1	1,8	1,8	0,2	0,3	0,3
	pCJ330	0,8	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8	0,2	0	0,2
	pCJ332	1,5	1,1	0,9	1,5	1,0	0,9	0,2	0,3	0,3
	pCJ401	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2	1,5	0,2	0,0	0,0
	pCJ510	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5	0,0	0,0	0,0
BT3388	pTrc99a	0,7	0,8	0,7	0,8	1,0	0,9	0,5	0,7	0,9
	pCJ328	0,7	0,6	0,8	0,8	0,7	0,8	0,3	0,7	0,8
	pCJ330	0,7	0,5	0,7	0,7	0,8	0,8	0,4	0,2	0,4
	pCJ332	0,7	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	0,3	0,3	0,5
	pCJ401	0,7	0,6	1,0	0,7	0,7	0,9	0,2	0,2	0,3
	pCJ510	0,3	0,3	0,4	0,7	0,7	0,8	0	0,2	0,2
pGH1	0,9	1	1,1	1,2	1,7	1,3	0,4	0	0,5	

Beispielhaft sind in Abbildung 51 Motilitätsplatten der Stämme *E. coli* RP437 und *E. coli* BT3312 nach mikroaerober Inkubation zu sehen. Im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 51A) konnte für die Sensoren TlpA (B), TlpB (C) und TlpD (D) eine Reduktion des Schwärnhofes beobachtet werden. Der größte Unterschied konnte für TlpA (B) beobachtet werden. Im genetischen Hintergrund des Stammes *E. coli* BT3312 konnte ein ähnliches Bild beobachtet werden. Während für TlpC keine Reduktion des Durchmessers des Motilitätshofes im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden konnte (Abbildung 51E), war für TlpA, TlpB (E) und für TlpD (F) eine Reduktion des Motilitätshofes zu beobachten.

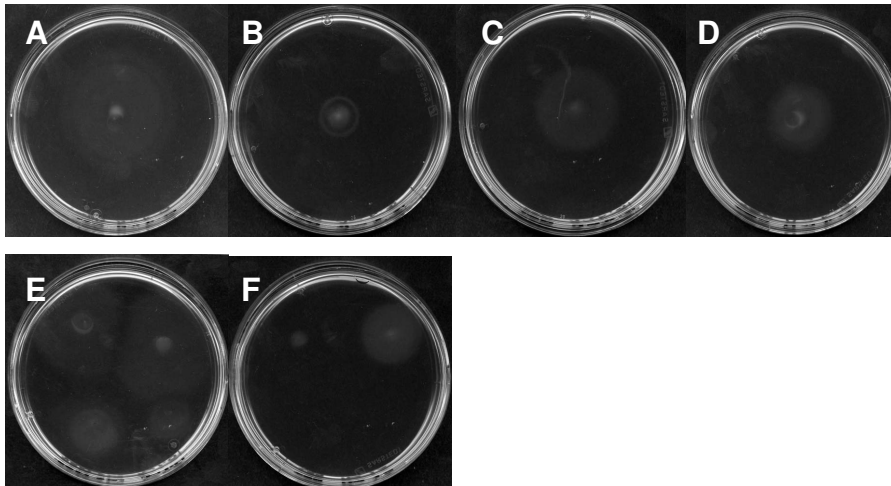


Abbildung 51: Motilitätsplatten mit 5 mM Succinat und 0,1 mM IPTG in Minimalmedium. Die Platten wurden mit jeweils 10^6 Bakterien der unterschiedlichen Stämme in einem Volumen von 10 μ l inokuliert und für 36 h bei 5% O_2 inkubiert; **A:** *E. coli* RP437(pTrc99a); **B:** *E. coli* RP437(pCJ330) (TlpA); **C:** *E. coli* RP437(pCJ332) (TlpB); **D:** *E. coli* RP437(pCJ401) (TlpD); **E:** oben links: *E. coli* BT3312(pCJ328) (TlpC), oben rechts: *E. coli* BT3312(pTrc99a), unten rechts: *E. coli* BT3312(pCJ330) (TlpA), unten links: *E. coli* BT3312(pCJ332) (TlpB); **F:** oben rechts: *E. coli* BT3312(pCJ510) (TlpA-Aer), oben links: *E. coli* BT3312(pCJ401) (TlpD)

7.11.4 Funktion der vier Sensoren aus *H. pylori* in den *E. coli*-Stämmen RP437, BT3388 und BT3312 in Trypton-Platten

Um die Auswirkung unterschiedlicher atmosphärischer Bedingungen auf die Funktion und Wirkung der Sensoren näher zu analysieren, wurde das taktische Verhalten, der konstruierten Stämme in verschiedenen Gasatmosphären in Vollmedium (1% Trypton, 0,5% NaCl) untersucht. In diesem Experiment ist die Antwort weitgehend unabhängig von der Art der Nährstoffe, da diese im Überfluss vorhanden und gleich verteilt sind. Eine mögliche Änderung des Verhaltens resultiert eher aus Veränderungen in den atmosphärischen Bedingungen oder der Entstehung toxischer Stoffwechselprodukte. Ähnlich wie bei den Succinatplatten wird in den Tryptonplatten durch die metabolische Aktivität Sauerstoff verbraucht (Adler, 1966a; Wolfe und Berg, 1989). Den entstehenden Gradienten können die Bakterien unter Umständen nutzen, um sich in Richtung steigender Sauerstoffkonzentrationen zu orientieren. Die Bakterien wurden wie beschrieben angezüchtet und vorbereitet (siehe Methoden 6.24). Im vorliegenden Experiment wurden die vier Sensoren aus *H. pylori* und der TlpA-Aer-Hybridsensor im genetischen Hintergrund von *E. coli* RP437 untersucht. Zusätzlich wurden die Stämme *E. coli* BT3388(pTrc99a) und *E. coli* BT3312(pTrc99a) als Kontrollen verwendet. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 27 zusammengefasst. Die Positivkontrolle *E. coli* RP437(pTrc99a) zeigte unter allen atmosphärischen Bedingungen einen großen Beweglichkeitshof (\varnothing 7,3 – 8,0 cm), während die Negativkontrolle *E. coli* BT3388(pTrc99a) keine radiale Beweglichkeit (\varnothing 0,9 – 1,0 cm)

zeigte. Für die Sensoren TlpB, TlpC und TlpD konnte kein Effekt beobachtet werden (Tabelle 27). Der Sensor TlpA dagegen zeigte in unter allen atmosphärischen Bedingungen eine Reduktion der Größe des Beweglichkeitshofes (\varnothing 2,9 – 4,4 cm). Das Verhalten war vergleichbar mit dem von *E. coli* BT3312 (\varnothing 2,7 – 4,2 cm).

Tabelle 27: Größe der radialen Beweglichkeitshöfe [cm] der verschiedenen *E. coli*-Stämme in Trypton-Motilitätsplatten. Angegeben ist jeweils der Durchmesser des beobachteten Hofes [cm] unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen in Tryptonmedium. Die grau hinterlegten Zellen heben Werte hervor, welche sich von den angegebenen Kontrollen unterscheiden und auch im Text angesprochen werden. Der Wert >8,0 wurde angegeben, wenn der Rand des Schwärmhofes den Rand der Petrischale erreicht hatte und folglich eine genauere Angabe der Schwärmhofgröße nicht möglich war.

<i>E. coli</i> Stamm	Plasmid (Sensor)	aerob	anaerob	mikroaerob
RP437	pTrc99a	> 8.0	7.6	7.3
RP437	pCJ328 (TlpC)	> 8.0	7.4	7.5
RP437	pCJ330 (TlpA)	4.4	2.9	3.45
RP437	pCJ332 (TlpB)	> 8.0	7.4	7.3
RP437	pCJ401 (TlpD)	> 8.0	7.4	7.7
RP437	pCJ510 (TlpA-Aer)	> 8.0	7.1	7.4
BT3312	pTrc99a	4.2	2.7	3.1
BT3388	pTrc99a	0.95	1	0.9

In Abbildung 52 sind beispielhaft einige Motilitätsplatten mit Tryptonmedium zu sehen. Während der Taxis-Hof der Positivkontrolle *E. coli* RP437(pTrc99a) nahezu die gesamte Petrischale einnahm (A), wirkte sich der Sensor TlpA aus *H. pylori* in einer Reduktion des Hofes (D) aus. Das Verhalten entsprach dem des *E. coli*-Stammes BT3312(pTrc99a) (C). Die Negativkontrolle *E. coli* BT3388 zeigte im vorliegenden Experiment kein taktisches Verhalten (B).

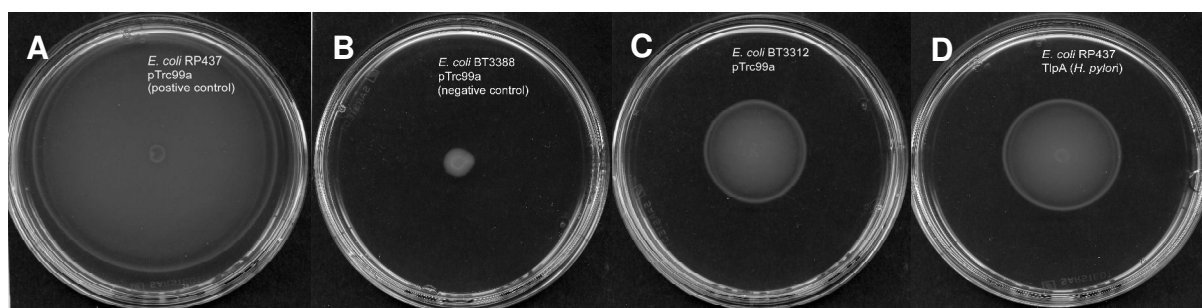


Abbildung 52: Taktisches Verhalten verschiedener *E. coli*-Stämme in Trypton-Motilitätsplatten. Die Platten wurden mit jeweils 10^6 Bakterien der unterschiedlichen Stämme in einem Volumen von 10 μ l inokuliert und für 36 h bei 5% O_2 inkubiert; **A:** *E. coli* RP437(pTrc99a); **B:** *E. coli* BT3388(pTrc99a); **C:** *E. coli* BT3312(pTrc99a); **D:** *E. coli* RP437(pCJ330) (TlpA).

8 Diskussion

H. pylori benötigt für das Überleben und die dauerhafte Besiedlung der menschlichen Magenschleimhaut die Flagellen-vermittelte Motilität und Taxis (Eaton *et al.*, 1996; Kavermann *et al.*, 2003; Josenhans *et al.*, 1999; Schreiber *et al.*, 2005; Ottemann und Lowenthal, 2002). Die Orientierung der Bakterien *in vivo* ist dabei abhängig von dem in der Magenschleimhaut bestehenden pH-Gradienten (Schreiber *et al.*, 2004). Der saure pH-Wert und die enzymatische Aktivität z.B. von Pepsin können Komponenten der Flagellen und dadurch ihre Funktion schädigen (Schreiber *et al.*, 2005). Daher ist eine Orientierung der Bakterien in Richtung der tiefen Mukusschichten notwendig, da dort ein höherer pH-Wert (pH ~ 5,5 bis 6,5) vorliegt (Schreiber *et al.*, 2004). Zur Orientierung und zur gerichteten Bewegung besitzt *H. pylori* einen vollständigen Chemotaxisapparat (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999), darunter vier potenzielle Sensoren (TlpA, TlpB, TlpC und TlpD). Die Orientierung an einem pH-Gradienten (Schreiber *et al.*, 2004) ist ein Indiz für Energietaxis, da sich die *proton motive force* aus dem elektrischen Membranpotential ($\Delta\psi$) und der pH-Differenz (ΔpH) zwischen Periplasma und Cytosol zusammensetzt und somit unmittelbar mit dem pH-Wert zusammenhängt. Die Tatsache, dass TlpD keine Transmembrandomänen besitzt und somit möglicherweise zytosolisch vorliegt, ist ein erster Hinweis auf die Wahrnehmung eines intrazellulären Reizes, wie beispielsweise die energetischen Verhältnisse.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze gewählt, um die Substratspezifität der einzelnen Sensoren zu analysieren. Da in den Untersuchungen ein besonderer Schwerpunkt auf der möglichen Energietaxis lag, wurden die Experimente entsprechend entworfen. Darüber hinaus lag ein weiterer Schwerpunkt auf dem Sensor TlpD, der außer in seiner Funktion und Struktur auch näher in seiner Lokalisierung und seiner biologischen Relevanz charakterisiert werden sollte.

8.1 Neue Erkenntnisse aus den bioinformatische Analysen der Chemosensor-Proteine von *H. pylori*

Die vier Sensoren aus *H. pylori* wurden im Rahmen dieser Arbeit ausführlich bioinformatisch untersucht, um mögliche Hinweise auf Substratspezifitäten und sensorische Mechanismen zu erhalten. Es konnten keine Homologien in der Sensordomäne zu bisher charakterisierten Sensoren gefunden werden. Homologien in einzelnen möglicherweise funktionell entscheidenden Aminosäuren werden noch ausführlicher in Abschnitt 8.8 diskutiert.

Um Hinweise auf möglichen Mechanismen der Adaptation zu erhalten, wurde nach Möglichkeiten der Methylierung gesucht, da Methylierung die bisher am besten beschriebene Form der Adaptation ist. Es konnten in allen Sensoren von *H. pylori* Folgen von zwei oder mehr Glutaminen bzw. Glutamaten gefunden werden. Diese Folgen kommen womöglich als Methylierungsmotive in Frage (Le Moual und Koshland, Jr., 1996). Basierend auf *E. coli* (Tsr, Trg) und *S. Typhimurium* (Tar) beschrieben LeMoual und Koshland ein Methylierungskonsensusmotiv (Glx-Glx*-X-X-Ala-Ser/Thr), welches auch in zahlreichen anderen Spezies identifiziert werden konnte (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Caulobacter crescentus*, *Clostridium thermocellum*, *Myxococcus xanthus*, u.a.) (Le Moual und Koshland, Jr., 1996). Dabei wird in der Regel ein Glutamat-Rest methyliert; ein Glutamin-Rest kann vor der Methylierung zu Glutamat deamidiert werden (Rollins und Dahlquist, 1981; Kehry *et al.*, 1983). In *H. pylori* konnten bereits einige Amidasen (Stark *et al.*, 1997; Bury-Mone *et al.*, 2006; Cappelletti *et al.*, 2008) identifiziert werden. Das volle Konsensusmotiv Glx-Glx*-X-X-Ala-Ser/Thr wurde in *H. pylori* nur im Sensor TlpA identifiziert. Gewisse Abweichungen von dem beschriebenen Konsensusmotiv wären in *H. pylori* durchaus vorstellbar. In den Sensoren von *H. pylori* fehlt das C-terminale NWET/SF-Motiv (mutmaßliche Bindestelle der Methyltransferase CheR und der Methylesterase CheB in *E. coli* und *S. enterica*) (Wu *et al.*, 1996); allerdings muss hier angemerkt werden, dass bereits bakterielle Chemosensoren (z.B. aus *Thermotoga maritima*) beschrieben wurden, welche zwar methyliert werden können, jedoch kein NWET/SF-Motiv am C-Terminus aufweisen (Perez und Stock, 2007). Eine weitere Unklarheit bezüglich der Methylierung ist das scheinbare Fehlen der beteiligten Enzyme CheR (Methyltransferase) und CheB (Methylesterase) im Genom von *H. pylori* (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006). Theoretisch denkbar ist aber ein funktioneller Ersatz der Enzyme CheR und CheB durch andere Proteine oder die Existenz von CheR- und CheB-Proteinen mit nur geringer Homologie zu bekannten Proteinen, welche dann möglicherweise auch abweichende Methylierungs- und Bindemotive hätten. So konnte beispielsweise benachbart zur Aspartatkinase CheY1 (HP1067) eine Methyltransferase unbekannter Funktion (HP1068) identifiziert werden, welche im gleichen Operon wie CheY1 organisiert ist (Beier *et al.*, 1997).

Möglicherweise geschieht die Adaptation in *H. pylori* zusätzlich durch die CheV-Proteine. CheV1-3 besitzen eine CheW- und eine CheY-Domäne und sind somit sowohl zur Interaktion mit den Sensoren als auch mit CheAY2 in der Lage. Eine Rolle von CheV in der Adaptation wurde bereits für *B. subtilis* beschrieben (Rao *et al.*, 2008). In *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass CheV mit dem Rezeptor-CheW-CheA-Komplex interagiert und dass dessen CheY-Domäne durch CheA in Abhängigkeit von der Rezeptoraktivität phosphoryliert werden kann. Das phosphorylierte CheVp wiederum hat eine inhibitorische Wirkung auf die Bindung zwischen Rezeptor und Histidinkinase CheA (Karatan *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2008).

Insgesamt zeigte die Sequenzanalyse deutliche Unterschiede der Chemosensoren von *H. pylori* gegenüber anderen bisher gut charakterisierten Bakterien auf, die auf funktionelle Diversifizierung hindeuten.

8.2 Die terminale Oxidase Cbb3 in *H. pylori* ist unter den getesteten Bedingungen essenziell für die bakterielle Proliferation

Zu Beginn dieser Arbeit wurde versucht, die terminale Oxidase *cbb₃* von *H. pylori* zu mutagenisieren, um einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Elektronentransportkette und dem Verhalten der Bakterien zu untersuchen (siehe Ergebnisse Abschnitt 7.2.1). Beispielsweise konnte so in *Azospirillum brasilense* und *E. coli* die These eines metabolismusabhängigen Verhaltens gestützt werden, da eine Mutation in der terminalen Oxidase *cbb₃* die Wahrnehmung und Reaktion auf ein metabolisierbares Substrat unter mikroaeroben Bedingungen deutlich reduzierte (Alexandre *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2006).

Trotz der Verwendung verschiedener alternativer Elektronenakzeptoren (Fumarat, Nitrat, DMSO, TMAO) und verschiedener Kultivierungsbedingungen (mikroaerob, anaerob) gelang es in dieser Arbeit nicht, einen *knock-out* in einem der Gene der terminalen Oxidase zu erhalten. *H. pylori* besitzt nur eine terminale Oxidase (Tomb *et al.*, 1997, Alm *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Doig *et al.*, 1999), daher fände im Falle einer erfolgreichen Mutagenese keine aerobe Atmung mehr statt. Da in dieser Arbeit Gene verschiedener Untereinheiten der terminalen Oxidase zur Mutagenese ausgewählt wurden (*ccoN*, *ccoO*) (siehe Ergebnisse Abschnitt 7.2.1) und verschiedene alternative Elektronenakzeptoren zur anaeroben Atmung eingesetzt wurden, liegt der Schluss nahe, dass *H. pylori* durch anaerobe Atmung nicht ausreichend Energie zur Proliferation gewinnen kann, obwohl im Genom eine Fumaratreduktase (Ge *et al.*, 1997) und eine S/N-Oxid-Reduktase (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999) identifiziert werden konnten. Zwar konnte eine essenzielle Rolle der Fumaratreduktase in der Kolonisierung (Ge *et al.*, 2000) bereits nachgewiesen werden, jedoch ist die Rolle des Enzyms im Stoffwechsel von *H. pylori* unklar, zumal die Fumaratreduktase in *H. pylori*, im Gegensatz zu anderen Spezies (Thauer *et al.*, 1977), konstitutiv exprimiert wird (Ge *et al.*, 2000). In *E. coli* konnte zudem eine Rolle der Fumaratreduktase in der Flagellenbewegung gezeigt werden. Die Fumaratreduktase scheint dabei an den Flagellenmotor zu binden und eine Änderung der Flagellenbewegung in Richtung des Uhrzeigersinns (resultiert in *tumblings*) zu begünstigen (Montrone *et al.*, 1998; Cohen-Ben-Lulu *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 1998).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Wichtigkeit der terminalen Oxidase ist Toxizität des Sauerstoffs. Die Bakterien wurden überwiegend (nach der Transformation;

nach der Überführung auf Selektivplatten) anaerob (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) inkubiert, aber die Bakterien wurden dabei kurze Zeit der Umgebungsluft ausgesetzt (z.B. Überführung auf Selektivplatten). Im Genom von *H. pylori* wurde eine Reihe von Sauerstoff-entgiftenden Enzymen identifiziert: Superoxiddismutase (HP0389), Katalase (HP0875), zwei Peroxidasen (HP0390, HP1563) (Doig *et al.*, 1999; Hazell *et al.*, 1991; Spiegelhalder *et al.*, 1993), aber es wurden auch toxische Effekte des Sauerstoffs auf die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR), verschiedene Eisen-Schwefel-Proteine, die NADPH Oxidase, sowie auf Flavoproteine und Nitroreduktasen in *H. pylori* beschrieben (Chen *et al.*, 1999; Hazell *et al.*, 2001; Krieg und Hoffman, 1986; Wang und Maier, 2004). Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang möglicherweise der Inhibierung der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) durch Sauerstoff zu. Die PFOR ist durch CO₂-Fixierung ebenfalls an der Energiegewinnung beteiligt (St Maurice *et al.*, 2007). Dieser Weg der Energiegewinnung trägt neben der aeroben Atmung womöglich einen entscheidenden Anteil zum Energiestoffwechsel in *H. pylori* bei, was aber nun durch den unveratmeten Sauerstoff inhibiert werden kann.

Ein gegenteiliges Ergebnis, was die Notwendigkeit der terminalen Oxidase betrifft, konnten Salama *et al.* in ihrer Untersuchung 2004 zeigen (Salama *et al.*, 2004). Sie untersuchten mit Hilfe einer ungerichteten Transposonmutagenese das Genom von *H. pylori* auf essenzielle Gene. In dieser Studie schien das Gencluster *ccoNOQP* nicht essenziell für *H. pylori* zu sein. So konnten in zwei der vier Gene (*ccoN*, *ccoO*) eine geringe Anzahl an Mutanten (5 bzw. 4) detektiert werden, welche das Transposon in dem jeweiligen Gen trugen. Die Detektion der Lage der Transposon erfolgte in dieser Studie anhand der Amplifikation des mutagenisierten Bereiches mittels semi-random-PCR und anschließender Hybridisierung des Amplifikats mittels eines Microarrays. Daher ist es, so wie es die Autoren auch selbst diskutieren, stets möglich, dass das Transposon in einem der unmittelbar benachbarten Gene liegt und es somit zu falsch-negativen Ergebnissen kommt. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass das Transposon möglicherweise auch weit am 3'-Ende eines Gens inseriert und daher die Funktion des Gens nicht vollständig zerstört. Aufgrund von (I) diesen möglichen Erklärungen für falsch-negative Ergebnisse, (II) der Tatsache, dass auch in der Studie von Salama *et al.* nur zwei (*ccoN*, *ccoO*) der vier Gene des Genclusters scheinbar zu mutagenisieren waren und (III) unseren Ergebnissen postulierten wir, dass die terminale Oxidase *cbb₃* und damit die aerobe Atmung für die Proliferation von *H. pylori* essenziell ist.

Dies korrespondiert mit einer Studie von Donelli *et al.* (1998). In dessen Untersuchung wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf das Wachstum von *H. pylori* untersucht. Die Bakterien wurden dazu nach einer Anzucht über Nacht in Brucella-Medium mit 2% FCS in 1-ml-Mengen aliquotiert und unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen (0% bis

5% O₂) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Bakterien auf Festmedium (Brucella) ausplattiert und so die Anzahl der CFU (*colony forming units*) bestimmt. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 1% und weniger reduzierte sich die Anzahl der CFU (*colony forming units*) pro Milliliter Medium innerhalb von 72 Stunden um 1 – 2 log-Stufen. Nach einer Inkubation von sieben Tagen konnten bei diesen Sauerstoffkonzentrationen keine Bakterien mehr angezüchtet werden (Donelli *et al.*, 1998). Dies spricht ebenfalls dafür, dass die aerobe Atmung für die Proliferation von *H. pylori* essenziell ist.

8.3 Zusammenhang zwischen Kultivierungsbedingungen von *H. pylori* und Energiegewinnung

Da im Rahmen dieser Arbeit die terminale Oxidase von *H. pylori* nicht mutagenisiert werden konnte, wurde die Energietaxis auf anderem Wege analysiert. Dazu wurde das Verhalten von *H. pylori* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht. Für diese Analysen wurde zuerst dokumentiert, inwieweit sich die verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf die Aktivität des Metabolismus von *H. pylori* auswirkten. In dieser Arbeit konnte für eine Reihe verschiedener Kultivierungsbedingungen ein unmittelbarer Zusammenhang mit der Stoffwechselaktivität von *H. pylori* gezeigt werden (siehe Ergebnisse 7.2.2). Zur Messung der Aktivität des bakteriellen Metabolismus wurde in dieser Arbeit der ATP-Gehalt der Zellen gemessen. Der ATP-Gehalt der Bakterien hing direkt mit dem Nährstoffgehalt des Mediums zusammen. Während das Vollmedium (BHI/Hefe + 10% FCS) die höchste Aktivität des bakteriellen Stoffwechsels erlaubte, war die Aktivität in nährstofffreier, physiologischer Kochsalzlösung am niedrigsten. In dem Medium RPMI1640 mit und ohne FCS lag der Energiegehalt dazwischen, wobei sich der Zusatz von FCS zum RPMI1640-Medium in einer leichten Erhöhung des ATP-Gehalts im Vergleich zum RPMI1640-Medium ohne Serum auswirkte.

Auch die unterschiedlichen Atmosphären wirkten sich auf den ATP-Gehalt der Bakterien aus (siehe Ergebnisse 7.2.2). So war der ATP-Gehalt in zur Kultivierung ungeeigneten Gasgemischen (Raumluft / 100% N₂) am höchsten. In den drei CO₂-reichen Atmosphären war der zelluläre ATP-Gehalt der Bakterien dagegen deutlich niedriger (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ / 85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂ / Raumluft mit 5% CO₂), obwohl mindestens zwei dieser Atmosphären für eine Kultivierung von *H. pylori* geeignet sind. Bei *H. pylori* handelt es sich um ein capnophiles Bakterium, für welches die Anwesenheit von CO₂ in der Atmosphäre essenziell ist (St Maurice *et al.*, 2007; Bury-Mone *et al.*, 2006). *H. pylori* besitzt die Fähigkeit, mittels CO₂-Fixierung Pyruvat zu gewinnen (St Maurice *et al.*, 2007). Möglicherweise lässt sich der erhöhte ATP-Gehalt in den CO₂-armen Atmosphären damit erklären, dass unter diesen Bedingungen kein vollständig funktionierender

Metabolismus vorliegt und keine ATP-verbrauchenden anabolischen Prozesse ablaufen, zumal das durch CO₂-Fixierung entstehende Pyruvat der Ausgangspunkt der Gluconeogenese ist (St Maurice *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten metabolisch aktiven Substanzen tatsächlich einen Einfluss auf den Metabolismus der Bakterien haben (siehe Ergebnisse 6.22). So konnte durch den Inhibitor der Cytochrom-*bc*₁-Oxidase Myxothiazol (Trumpower, 1990; Alderson *et al.*, 1997) und das Quinonanalogue HQNO (Alexandre *et al.*, 2000) der ATP-Gehalt der Bakterien signifikant abgesenkt werden und durch die Zugabe des Elektronendonors TMPD/Ascorbat (Nagata *et al.*, 1996) wieder gesteigert werden (Abbildung 13, Abbildung 14). TMPD/Ascorbat überträgt Elektronen direkt auf das Cytochrom *c* und simuliert somit eine metabolische Aktivität.

8.4 Der *H. pylori*-N6-Wildstamm zeigt energieabhängiges Verhalten und Energietaxis

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass im *H. pylori*-N6-Wildstamm ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt der Bakterien und dem Verhalten besteht. So trat im Medium (BHI/Hefe + 10% FCS), in welchem die Bakterien den höchsten ATP-Gehalt aufwiesen, nur eine geringe Anzahl an *stops* pro 3 Sekunden auf (Tabelle 14). Eine geringe Anzahl an *stops* deutet in der Regel auf das Fehlen eines Schreckstoffes oder die Anwesenheit eines positiven Reizes hin (Macnab und Koshland, Jr., 1972; Berg und Brown, 1972; Einleitung 4.2.1). Im vorliegenden Fall korrespondierte dies mit der gezeigten positiven Wirkung von BHI/Hefe + 10% FCS auf den bakteriellen Stoffwechsel (Abbildung 15) und der Tatsache, dass das Medium zur Kultivierung von *H. pylori* geeignet ist. In RPMI1640-Medium mit Serum, welches in *H. pylori* einen geringeren ATP-Gehalt ermöglicht als das BHI/Hefe-Medium (Abbildung 15), lagen dagegen deutlich mehr *stops* als in BHI/Hefe-Medium vor (Tabelle 14). Da *H. pylori* nicht zum Wachstum in diesem Medium fähig ist und *stops* in der Regel dann auftreten, wenn ein ungünstiger Reiz wahrgenommen wird (Macnab und Koshland, Jr., 1972), spricht dies womöglich für eine Fluchtreaktion. In RPMI1640-Medium ohne Serum, welches zu einem noch geringeren ATP-Gehalt in den Bakterien führt als RPMI1640-Medium mit Serum (Abbildung 15), zeigte *H. pylori* keine *stops* mehr (Tabelle 14). Dies deutet darauf hin, dass es womöglich einen Schwellenwert an Aktivität im Metabolismus gibt, der notwendig ist, um überhaupt chemotaktisches Verhalten zu ermöglichen. Fällt die Aktivität des Metabolismus darunter ab, zeigen sich keine *stops* mehr. Ein Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt der Zellen und dem Verhalten konnte auch bei der Verwendung der Inhibitoren (Myxothiazol, HQNO) und des Elektronendonors (TMPD/Ascorbat) gezeigt werden. Die *stops*, welche als Grundlage des chemotaktischen

Verhaltens anzusehen sind, konnten nahezu vollständig durch die Zugabe eines Inhibitors (Myxothiazol, HQNO) und damit der Absenkung des zellulären ATP-Gehalts inhibiert werden (Abbildung 14 bis Abbildung 17). Die anschließende Zugabe von TMPD/Ascorbat, welches auch in einer Erhöhung des zellulären ATP-Gehalts resultierte, induziert die *stops* wieder. Auch in diesem Fall war also zu sehen, dass *H. pylori* nahezu keine *stops* mehr zeigt, wenn die Aktivität des Metabolismus sehr niedrig ist, und dass durch Erhöhung des zellulären ATP-Gehalts die *stops* wieder induzierbar sind. Vergleichbar dazu konnten in RPMI1640-Medium ohne Serum, welches alleine nicht genügend Energie zur Verfügung stellt, um in *H. pylori stops* zu ermöglichen, durch die Zugabe von TMPD/Ascorbat, also durch Erhöhung der Aktivität der Elektronentransportkette, ebenfalls *stops* induziert werden (Abbildung 15; Abbildung 17).

Die Bakterien zeigten sowohl unter Zugabe von Myxothiazol als auch in RPMI1640-Medium ohne Serum noch eine sehr geringe Anzahl an *stops* (Abbildung 17, Tabelle 14). Diese sind vermutlich auf eine geringe Restaktivität bzw. unvollständige Inhibition des Metabolismus zurückzuführen. So konnten bei der Verwendung von HQNO (10 µM) und der Verwendung von Myxothiazol in höheren Konzentrationen (> 10 µM) die *stops* vollständig inhibiert werden (Abbildung 16, Abbildung 17). Dies spricht dafür, dass in *H. pylori* ähnlich wie in *Azospirillum. brasilense* (Alexandre *et al.*, 2000) Chemotaxis nur in Gegenwart eines intakten Elektronentransports möglich ist und es wahrscheinlich keine metabolismusunabhängige Taxis gibt.

Die Abhängigkeit des Verhaltens von *H. pylori* von der Aktivität des Metabolismus konnte auch in weiteren Medien bestätigt werden. Sowohl in Ham's-F12-Medium als auch in Brucella-Medium konnte beobachtet werden, dass die *stops* durch die beschriebenen Inhibitoren (Myxothiazol, HQNO) inhibierbar und durch den Elektronendonator (TMPD/Ascorbat) rekonstituierbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei Ham's F12 handelt es sich um ein chemisch definiertes Medium, welches in seiner Zusammensetzung dem RPMI1640-Medium ähnelt. Brucella-Medium hingegen ist ein chemisch nicht definiertes Vollmedium, das zur Kultivierung von *H. pylori* geeignet ist.

Da es also möglich war (I) die *stops* von *H. pylori* in allen bisher untersuchten Medien durch metabolische Inhibitoren zu inhibieren und durch einen Elektronendonator zu rekonstituieren und (II) zudem ein Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt der Bakterien und Anzahl der *stops* gezeigt werden konnte, lässt sich schlussfolgern, dass *H. pylori* metabolismusabhängiges Verhalten zeigt und dass dies nur oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes der Aktivität des Metabolismus möglich ist. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bereits in *A. brasilense* beobachtet (Alexandre *et al.*, 2000). Die Autoren diskutieren darin ebenfalls, dass ein funktioneller Elektronentransport notwendig ist, um Chemotaxis zu

ermöglichen, da sich sowohl metabolische Inhibitoren (Myxothiazol, HQNO) als auch eine Mutation in der terminalen Oxidase auf die Taxis von *Azospirillum brasilense* auswirkten.

Im Weiteren wurde untersucht, ob das beschriebene Bewegungsmuster, welches aus *runs* und *stops* besteht und in Zusammenhang mit dem ATP-Gehalt der Bakterien steht, mit dem Chemotaxisapparat zusammenhängt. Eine Mutante im Gen der Histidinkinase *cheAY2* zeigte keine *stops* in den getesteten Medien (RPMI1640-Medium mit und ohne 3% FCS, BHI/Hefe-Medium mit 10% FCS) (Tabelle 15, Abbildung 22). Mutanten im Gen der Histidinkinase *CheAY2* sind nicht mehr zur Chemotaxis fähig (Foynes *et al.*, 2000; siehe Ergebnisse 7.3.5.1). Auch konnten durch Zugabe des Elektronendonors TMPD/Ascorbat keine *stops* induziert werden. Die *stops* hängen also unmittelbar mit der Aktivität der Histidinkinase *CheAY2* zusammen. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass sich die Aktivität von *CheA* über *CheY* und *FlhM* unmittelbar auf die Flagellenrotation auswirkt (Welch *et al.*, 1993; Bren und Eisenbach, 1998). Für die *tlpABCD*-Vierfachmutante konnte in den bisher getesteten Medien (siehe Ergebnisse 7.3.5.1) ein identischer Phänotyp beobachtet werden (RPMI1640-Medium mit und ohne 3% FCS, BHI + 10% FCS). Diese Mutante trägt keinen bekannten Chemosensor mehr und ist damit, genau wie die *cheAY2*-Mutante, nicht mehr zur Taxis fähig. Es war zu beobachten, dass diese Mutante in allen getesteten Medien ebenfalls keine *stops* mehr zeigte und diese auch nicht durch TMPD/Ascorbat induzierbar waren. Daraus konnten wir zudem schlussfolgern, dass es keinen weiteren bisher nicht-identifizierten Chemosensor in *H. pylori* mehr gibt. Dies ist auch ein weiteres Indiz dafür, dass die *stops* eine direkte Folge eines funktionierenden Chemotaxisapparates sind und erlaubte es uns somit, den Chemotaxis-Nullphänotyp zu definieren. Als Nullphänotyp wurde also fortan eine Bewegung ohne *stops* definiert, da ohne funktionierenden Chemotaxisapparat (*cheAY2*-Mutante, *tlpABCD*-Mutante) unter keinen der gewählten Bedingungen *stops* beobachtet werden konnten. Vergleichbare Beobachtungen wurden schon früher bei der Untersuchung der Histidinkinase *CheAY2* in *H. pylori* SS1 (Foynes *et al.*, 2000) und in anderen Spezies wie beispielsweise *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (Parkinson, 1976; Parkinson und Houts, 1982; Masduki *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1999) gemacht. In allen genannten Spezies konnte gezeigt werden, dass die Mutagenese der Histidinkinase *CheA* in einem linearen Bewegungsmuster mit sehr wenigen *tumblings* bzw. *stops* resultierte. In *E. coli* konnte zudem gezeigt werden, dass eine Mutante (BT3388; Yu *et al.*, 2002), welche keine Sensoren mehr trägt, ebenfalls keine *stops* mehr in Chemotaxispuffer (10 mM PO_4^{3-} , 0,1 mM EDTA; 20 mM Laktat) zeigt (Greer-Phillips *et al.*, 2003).

Dass das beschriebene Verhalten im *H. pylori*-N6-Wildstamm geeignet ist, eine gerichtete Bewegung zu vermitteln, wird zudem gestützt von den *spatial assays*. Wir konnten zeigen, dass sich das Verhalten, welches durch den metabolischen Inhibitor Myxothiazol

induzierbar ist, auch tatsächlich in einer räumlichen Umorientierung auswirkt. So zeigten Bakterien gegenüber Myxothiazol in niedrigen Konzentrationen eine größere Anzahl an *stops* (Abbildung 16). Eine erhöhte Anzahl an *stops* wird in der Regel durch einen Schreckstoff oder einen ungünstigen Reiz verursacht (Macnab und Koshland, Jr., 1972; siehe Einleitung 4.2.1). Im vorliegenden Fall reagieren also die Bakterien auf die steigenden Myxothiazolkonzentration, welche zu einem Abfallen des zellulären ATP-Gehalts führen würde, mit einer Fluchtreaktion und orientierten sich in einem Inhibitorgradienten entgegen der steigenden Konzentration (siehe Ergebnisse 7.4, Tabelle 17). Zudem sind Bakterien des Wildstammes in der Lage in Motilitätsplatten eine radial nach außen gerichtete Bewegung zu zeigen und sich damit an dem entstehenden Nährstoffgradienten zu orientieren (Abbildung 21).

Aus den bisherigen Ergebnissen konnten wir schlussfolgern, dass *H. pylori* Energietaxis zeigt, weil (I) das Verhalten der Bakterien unter allen getesteten Bedingungen mit dem ATP-Gehalt korreliert, (II) die Anzahl der *stops* mit dem Chemotaxisapparat zusammenhängt und (III) eine Änderung des Verhaltens geeignet ist, um eine Fluchtreaktion von metabolisch ungünstigen Bedingungen (Myxothiazol) zu erzeugen.

8.5 T_pD vermittelt energieabhängiges Verhalten

Da also gezeigt werden konnte, dass das Verhalten von *H. pylori* unter den untersuchten Bedingungen metabolismusabhängig ist und, dass ein Zusammenhang zwischen dem Chemotaxisapparat und dem Verhalten besteht, wurde in den folgenden Experimenten analysiert, welcher der Sensoren von *H. pylori* das gezeigte metabolismusabhängige Verhalten vermittelt. In allen vier Genen der Chemosensoren wurden Einzelmutanten hergestellt und diese in einem *temporal assay* untersucht. Die Mutanten *tlpA*, *tlpB* und *tlpC* zeigten in RPMI1640-Medium mit 3% FCS ein dem Wildstamm ähnliches Verhalten. Die Anzahl der *stops* pro 3 Sekunden entsprach in etwa der des Wildstammes und die *stops* waren bei den drei genannten Mutanten durch die Zugabe der Inhibitoren (Myxothiazol, HQNO) inhibierbar und durch TMPD/Ascorbat rekonstituierbar. Lediglich die *tlpD*-Mutante unterschied sich deutlich in ihrem Verhalten vom Wildstamm und den anderen Sensormutanten. Sie zeigte in RPMI1640-Medium mit 3% FCS nur eine sehr geringe Anzahl an *stops* (0,07 pro 3 s) und es waren auch keine *stops* durch die Zugabe eines Elektronendonors induzierbar. Die Anzahl der *stops* der *tlpD*-Mutante war vergleichbar mit der des Wildstammes unter inhibierten Bedingungen (0,06 pro 3 s) bzw. mit der des Wildstammes in RPMI1640-Medium ohne Serum (0,13 pro 3 s) (Abbildung 17, Tabelle 14). In RPMI1640-Medium ohne Serum zeigten die *tlpA*-, *tlpB*- und *tlpD*-Mutante genau wie der Wildstamm keine *stops* mehr. Während sich in der *tlpA*- und *tlpB*-Mutante, ähnlich wie im

Wildstamm, die *stops* durch Zugabe des Elektronendonors wieder induzieren ließen, war dies in der *tIpD*-Mutante nicht möglich. Die *tIpC*-Mutante zeigte unter den gleichen Bedingungen (RPMI1640-Medium ohne Serum) noch 2,27 *stops* pro 3 s. Dies lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklären, es ist jedoch vorstellbar, dass TIpC an regulatorischen Prozessen beteiligt ist, welche sich womöglich auf den Metabolismus und somit auch auf das Verhalten auswirken. In BHI/Hefe-Medium zeigte die *tIpD*-Mutante zwar auch weniger *stops* als der Wildstamm, jedoch deutlich mehr (0,54 pro 3 s) als in dem nährstoffärmeren RPMI1640-Medium mit 3% FCS. Die Tatsache, dass (I) durch die Mutagenese von *tIpD* die *stops* von *H. pylori* in allen getesteten Medien fast vollständig inhibiert werden und (II) sich keine *stops* durch Zugabe von TMPD/Ascorbat induzieren lassen, deutet darauf hin, dass das für den Wildstamm beschriebene metabolismusabhängige Verhalten zu einem großen Teil durch TIpD vermittelt wird.

Die in der *tIpD*-Mutante noch auftretenden *stops* wurden durch die anderen Sensoren (TIpA, TIpB und TIpC) verursacht. Da die Anzahl der *stops* in der *tIpD*-Mutante in Medien unterschiedlichen Nährstoffgehalts (RPMI1640-Medium + 3% FCS, BHI/Hefe-Medium + 10% FCS) unterschiedlich sind (0,07 bzw. 0,54 pro 3 s) und sich die *stops* inhibieren (Daten nicht gezeigt) lassen, lässt sich schlussfolgern, dass die verbleibende Antwort ebenfalls zumindest teilweise metabolismusabhängig ist. Dabei spielen die Sensoren TIpA, TIpB und TIpC anscheinend eine größere Rolle unter Bedingungen, welche einen höheren ATP-Gehalt ermöglichen (BHI/Hefe-Medium), da sie hier mehr *stops* (0,54 pro 3 s) verursachen als unter Bedingungen, welche einen geringeren ATP-Gehalt ermöglichen (RPMI1640-Medium mit 3% FCS) (0,07 pro 3 s). Dementsprechend scheint der Sensor TIpD eher eine Rolle unter Bedingungen zu spielen, welche einen geringeren ATP-Gehalt ermöglichen. Die starke Abnahme der Anzahl der *stops* durch die Mutagenese von *tIpD* unter den getesteten Bedingungen (von 6,02 auf 0,07 in RPMI1640-Medium mit 3% FCS; von 2,99 auf 0,54 in BHI/Hefe-Medium mit 10% FCS) deutet auf eine dominante Rolle des Sensors TIpD im Verhalten des Wildstammes hin.

Durch die Konstruktion einer *tIpABC*-Dreifachmutante, welche als einzigen Sensor nur noch TIpD trug und immer noch ein metabolismusabhängiges Verhalten zeigte (Abbildung 24), konnte gezeigt werden, dass TIpD anscheinend auch alleine für die Vermittlung eines metabolismusabhängigen Verhaltens ausreichend ist. Dass das Verhalten der *tIpABC*-Mutante noch immer metabolismusabhängig ist, zeigt sich darin, dass (I) die Anzahl der *stops* von der Art des Mediums abhängig ist (0,7 pro 3 s in BHI/Hefe-Medium; 1,56 pro 3 s in RPMI1640-Medium mit FCS) (Tabelle 16) und dass (II) die *stops* durch Myxothiazol inhibierbar und durch TMPD/Ascorbat rekonstituierbar sind (Abbildung 24). Das metabolismusabhängige Verhalten von *H. pylori* N6 *tIpABC* zeigt, dass die Funktion von TIpD weitgehend unabhängig von den anderen Sensoren auftritt. Auch in den *spatial assays*

war eine *tlpABC*-Dreifachmutante noch im Stande, Energietaxis zu zeigen und sich wie der Wildstamm entgegen steigender Myxothiazol-Konzentrationen zu orientieren, wenn auch im Vergleich zum Wildstamm reduziert. Im Gegensatz dazu war dies für eine *tlpD*-Mutante nicht möglich. Dies unterstreicht die bereits oben angesprochene Dominanz von TlpD im Verhalten des Wildstammes.

Allerdings zeigte die *tlpABC*-Mutante deutlich weniger *stops* als der Wildstamm (Tabelle 16) und auch die Fähigkeit, sich im *spatial assay* entgegen steigender Myxothiazol-Konzentrationen zu orientieren, war leicht abgeschwächt (Tabelle 17). Dies deutet darauf hin, dass in *H. pylori* eine Interaktion der Sensoren untereinander vorliegt, welche sich möglicherweise auf die Lokalisierung oder die Funktion der Sensoren auswirkt. Dieses Phänomen wurde schon ausführlich für beispielsweise *E. coli* beschrieben (Parkinson *et al.*, 2005). So konnte gezeigt werden, dass insbesondere zwischen dem Serin- und Energiesensor Tsr und dem Aspartat-Maltose-Sensor Tar eine Interaktion vorliegt. Beispielsweise zerstörte eine Mutation in dem Abschnitt des Tsr Moleküls, welcher mit Tar zur Bildung eines Dimer-Trimeres interagiert, auch die Funktion von Tsr. Zudem konnte gezeigt werden, dass bestimmte Mutationen in Tsr auch die Funktion von Tar zerstörten, wenn das mutierte Tsr zusätzlich zu dem Wildtyp Tsr in den Bakterien exprimiert wurde (Ames *et al.*, 2002).

Wir postulieren an dieser Stelle also eine Dominanz von TlpD im Verhalten des Wildstammes, weil (I) die Mutagenese von TlpD zu einer fast vollständigen Inhibierung der *stops* führte und weil (II) die *tlpABC*-Mutante unabhängig von den Sensoren TlpA, TlpB und TlpC im *temporal assay* noch ein metabolismusabhängiges Verhalten zeigte und (III) weil *H. pylori* alleine mit dem Sensor TlpD im *spatial assay* zu einer Fluchtreaktion vor steigenden Myxothiazolkonzentrationen fähig war.

Die Tatsache, dass auch in der *tlpABC*-Mutante in Motilitätsplatten noch eine radial nach außen gerichtete Bewegung zu beobachten war (Abbildung 21), zeigt dass TlpD nicht nur eine Fluchtraktion vermitteln kann, sondern auch in der Lage ist, eine Annäherung an einen positiven Reiz zu vermitteln. Prinzipiell auszuschließen ist für TlpD neben der Rolle in der Energietaxis eine Rolle in der Wahrnehmung anderer Signale nicht. Jedoch fehlen bisher experimentelle Hinweise für eine Rolle von TlpD in Wahrnehmung anderer Stimuli als der energetischen Verhältnisse.

8.6 Verschiedene Substanzen beeinträchtigen die Energiewahrnehmung von *H. pylori*

Der genaue Mechanismus der Energiewahrnehmung in *H. pylori* durch TlpD ist noch unklar. Bisher wurden drei Mechanismen der Energiewahrnehmung in Bakterien beobachtet (siehe Einleitung 4.2.6): (I) Die Wahrnehmung mittels eines PAS-Domänen-Proteins, welches als Kofaktor FAD trägt. Die Energiewahrnehmung wird möglicherweise durch den Redox-Zustand des Kofaktors FAD bewerkstelligt (Bibikov *et al.*, 1997; Repik *et al.*, 2000). Zudem wurde auch ein Zusammenhang mit der Aktivität der NADH-Dehydrogenase I festgestellt (Rebbapragada *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2006). Dieser ist jedoch noch im Detail unklar. (II) Die direkte Wahrnehmung der *proton motive force* (PMF) durch Sensoren wie beispielsweise Tsr durch geladene Seitengruppen (Edwards *et al.*, 2006), wobei auch hier der genaue Mechanismus unklar ist und noch keine spezifischen Aminosäuren, welche für die Energiewahrnehmung essenziell sind, identifiziert werden konnten und (III) die direkte Wahrnehmung von Sauerstoff durch Sensoren, welche Häm-Gruppen tragen (Hou *et al.*, 2000).

Der Sensor TlpD aus *H. pylori* weist zu keinen Vertretern der drei Gruppen von Proteinen hinreichende Ähnlichkeiten in der Primärsequenz auf, um das Protein eindeutig einem der beschriebenen Mechanismen zuzuordnen (siehe Ergebnisse 7.1). Es existieren homologe Sensoren in beispielsweise *H. hepaticus* (HH0891) (Suerbaum *et al.*, 2003) und *C. jejuni* (Cj0448c) (Marchant *et al.*, 2002). Diese besitzen ebenfalls weder Transmembrandomänen noch eine PAS-Domäne und sind bisher ebenfalls nicht weiter charakterisiert.

Die Tatsache, dass auch in Abwesenheit von Sauerstoff noch ein TlpD-abhängiges Verhalten beobachtet werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt) spricht dafür, dass Sauerstoff selbst nicht der wahrgenommene Reiz ist. Um den genauen Mechanismus aufzuklären, wurden neben den erwähnten Inhibitoren auch beispielsweise ein Inhibitor der **Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase** (PFOR) (Nitoxozanid), ein Eisenchelator (Desferroxamin), ein Katalaseinhibitor (Amino-Triazol) und verschiedene Redox- und Energieäquivalente (NAD, NADP, FAD, ATP) den Bakterien zugesetzt (siehe Ergebnisse 7.5). Der PFOR-Inhibitor wurde eingesetzt, um den in *H. pylori* sehr wichtigen Stoffwechselweg der CO₂-Fixierung zu inhibieren. Der Eisenchelator wurde eingesetzt, um einen möglichen Effekt auf die eisenhaltigen Proteine der Atmungskette zu untersuchen. Der Katalase-Inhibitor wurde eingesetzt, da es aus der Ko-Präzipitation Hinweise darauf gab, dass eine Interaktion zwischen der Katalase und TlpD vorliegt (siehe Ergebnisse 7.9). Es konnten bisher keine auffälligen Veränderungen im Verhalten beobachtet werden. Lediglich bei der Testung verschiedener Quinone gab es erste Hinweise, dass Dichlorobenzoquinon ebenfalls als Schreckstoff wirkt. Bisher liegen aber lediglich erste qualitative Beurteilungen

und noch keine quantitativen Daten vor. Die Tatsache, dass also bisher lediglich Substanzen (Myxothiazol, HQNO, TMPD, Dichlorobenzoquinon), welche direkt mit der Elektronentransportkette interagieren, nicht jedoch Inhibitoren und Substrate früherer metabolischer Prozesse (Nitoxoxid, NAD, etc) (siehe Einleitung 4.1.3, Abbildung 9) die Taxis beeinflussen und in niedrigen Konzentration auch Fluchtreaktionen erzeugen können (siehe Ergebnisse 7.4), spricht zum jetzigen Zeitpunkt dafür, dass eine direkte oder indirekte Interaktion von TlpD mit der Elektronentransportkette oder der PMF stattfindet (Alexandre *et al.*, 2000) (Abbildung 53). Aufgrund der Angriffspunkte der Inhibitoren und des Elektronendonors liegt der Schluss nahe, dass sich der Interaktionsort von TlpD mit der Elektronentransportkette unterhalb des Cytochrom *c* befindet. Dafür spricht auch, dass mit KCN, einem Inhibitor der terminalen Oxidase (Nagata *et al.*, 1996), die *stops* anscheinend inhibiert werden konnten und in diesem Fall keine Rekonstituierung durch TMPD/Ascorbat möglich war. Die terminale Oxidase liegt unterhalb des Cytochrom *c*, auf welches von TMPD/Ascorbat die Elektronen übertragen werden. Die Versuche mit KCN wurden nicht im Ergebnisteil dargestellt, da durch die Verwendung von KCN die Beweglichkeit der Bakterien allgemein stark eingeschränkt war und so zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann, dass es bei dem veränderten Verhalten lediglich um unspezifische Effekte handelt.

Der Effekt von Omeprazol auf das Verhalten von *H. pylori* lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur schwer deuten (siehe Ergebnisse 7.5, Abbildung 28). Omeprazol ist ein Inhibitor der gastrischen H⁺/K⁺-ATPase (Fellenius *et al.*, 1981) und es konnte zudem bereits eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *H. pylori* gezeigt werden (Iwahi *et al.*, 1991; Suerbaum *et al.*, 1991). Es konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass keine Inhibition der bakteriellen F₁F₀-ATPase durch Omeprazol in einer Konzentration von ca. 200 µM (minimale inhibitorische Konzentration) vorliegt. Erst bei einer 150fach erhöhten Konzentrationen zeigen sich leichte inhibitorische Effekte auf die F₁F₀-ATPase (Belli und Fryklund, 1995). Da in dieser Arbeit Konzentrationen zwischen 200 µM und 350 µM verwendet wurden, hängt der beobachtete Effekt vermutlich nicht mit einer Inhibition der F₁F₀-ATPase zusammen. Bisherige Daten sprechen dafür, dass Omeprazol womöglich einen Effekt auf die Typ-P-ATPase von *H. pylori* hat (Mauch *et al.*, 1993; Bode *et al.*, 1993; Midolo *et al.*, 1996). Für die Typ-P-ATPase in *H. pylori* wurde bereits der Transport von Cd²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ und Ni²⁺ gezeigt (Herrmann *et al.*, 1999; Melchers *et al.*, 1998). Eine andere mögliche Erklärung für die inhibitorische Wirkung von Omeprazol auf *H. pylori* und dessen Effekt auf das Verhalten der Bakterien ist womöglich eine inhibitorische Wirkung von Omeprazol auf das NADPH-Quinon-Oxidoreduktase-System. Nagata *et al.* diskutieren in Rahmen einer Studie des Omeprazol-verwandten Wirkstoffes Lansoprazol die mögliche inhibitorische Wirkung auf das NADPH-Quinon-Oxidoreduktase-System, da die Verstoffwechslung von

Pyruvat und α -Ketoglutarat, nicht jedoch die von TMPD/Ascorbat, durch Lansoprazol inhibiert werden kann (Nagata *et al.*, 2001). TMPD/Ascorbat überträgt die Elektronen direkt auf das Cytochrom *c*, was für einen Angriffspunkt des Lansoprazol oberhalb des Cytochrom *c* spricht. Allerdings muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Existenz eines dem Komplex I entsprechenden NADPH-Quinon-Oxidoreductase-Systems in *H. pylori* umstritten ist, da Chen *et al.* beschrieben, dass die NADPH-Dehydrogenase-Aktivität in *H. pylori* nicht sensitiv gegenüber Rotenon ist (Chen *et al.*, 1999), wie es für einen Komplex I zu erwarten wäre.

Auch bedarf es weiterer intensiver Untersuchungen der Wirkung von Nitozoxid, NAD, NADP, FAD, ATP und anderer metabolisch aktiver Substanzen, um deren Einfluss auf die Chemotaxis zuverlässig ausschließen zu können. Zu diesen Substanzen wurden bislang nur qualitative Beobachtungen gemacht, und kleinere Effekte der Substanzen auf das Verhalten blieben somit bisher möglicherweise unentdeckt. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auch auf der Untersuchung von Redox taxis mit Hilfe verschiedener Quinone gelegt werden. Für *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass Redox taxis vorliegt und dass diese mit der Aktivität der PMF korreliert (Bespalov *et al.*, 1996). Auch die Orientierung entlang eines Redoxgradienten erfolgt über die Wahrnehmung der energetischen Verhältnisse (Edwards *et al.*, 2006).

8.7 Potenzielle Interaktionspartner von TlpD - Beteiligung an Lokalisierung und Funktion

Um womöglich weitere Hinweise auf den genauen Mechanismus der Energiewahrnehmung zu erhalten, wurde auch die Lokalisierung von TlpD und die Rolle möglicher Interaktionspartner näher untersucht. Da TlpD keine Transmembrandomänen besitzt und auch kein Signalpeptid identifiziert werden konnte (siehe Ergebnisse 7.1), war die Lokalisierung von besonderem Interesse. Während alle bekannten Chemosensoren mit Transmembrandomänen in der Membran lokalisiert sind, wurden für verschiedene bakterielle Sensoren ohne Transmembrandomänen unterschiedliche Lokalisierungen beobachtet: Beispielsweise konnte TlpC aus *R. sphaeroides* im Zytosol nachgewiesen werden (Wadhams *et al.*, 2002), während McpS aus *P. aeruginosa* membranassoziiert beobachtet wurde (Bardy und Maddock, 2005) (siehe Einleitung 4.2.4).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TlpD sowohl im Zytosol als auch assoziiert mit der Membran vorhanden ist (Abbildung 29). Bisher konnte zwar zum Teil eine leichte Akkumulation an den Zellpolen festgestellt werden, jedoch war das Protein stets nahe der gesamten Membran zu finden (Abbildung 30). Eine genaue Interpretation dieser Ergebnisse ist zum jetzigen Zeitpunkt schwierig, da das Protein überexprimiert wurde. Für

das Experiment wurde ein pHel2-basierter Vektor verwendet. Dieser liegt in etwa in zwei bis fünf Kopien pro Zelle vor und sorgt somit für eine Überexpression des Proteins (Heuermann und Haas, 1998). Eine ungeclusterte und nicht-polare Form der Lokalisierung von Chemosensoren wurde bisher in keiner Spezies beschrieben (Maddock und Shapiro, 1993; Lybarger *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 1999; Wadhams *et al.*, 2002; Bardy und Maddock, 2005). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass alle Sensoren polar vorliegen, wobei Tsr und Tar in Clustern, Tap und Trg dagegen ungeclustert vorliegen (Maddock und Shapiro, 1993; Lybarger *et al.*, 2005). Inwieweit die Lokalisierung von TlpD für dessen Funktion eine Rolle spielt, ist bislang unklar.

Neben der Lokalisierung konnte auch eine Dimerbildung des Sensors TlpD im Rahmen der Proteinreinigung nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 7.8.2, Abbildung 37). Die Bildung eines Sensordimers korrespondiert mit den bisherigen Erkenntnissen zur supramolekularen Organisation anderer Sensoren (Milligan und Koshland, Jr., 1988; siehe Einleitung 4.2.3). Der Befund, dass das TlpD-His₆-Dimer lediglich in den Fraktionen des 80-mM-Imidazolwaschschrittes, nicht jedoch in den Elutionsfraktionen (siehe Ergebnisse 7.8.2 und Abbildung 39) zu finden war, lässt sich womöglich damit erklären, dass die Bindung des Sensordimers an Matrix-gebundenen Ni²⁺-Ionen möglicherweise schwächer ist als die Bindung des Sensormonomers. Die Bildung des Sensordimers wird in Zukunft noch weiter zu untersuchen sein. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass insbesondere die Fraktionen der Waschschritte zahlreiche Bestandteile mit höheren Molekularmassen enthalten, in denen TlpD detektiert werden konnte. Dabei handelt es sich möglicherweise um stabilere supramolekulare Komplexe, welche aus TlpD-His₆ und mehreren Interaktionspartnern bestehen. Auch hierzu werden in Zukunft noch weitere Untersuchungen folgen müssen.

In dieser Arbeit wurde einer Reihe von unterschiedlichen Hypothesen zum Mechanismus der Membranlokalisierung und der Energiewahrnehmung nachgegangen. Diese werden in den folgenden Abschnitten diskutiert. Im Zusammenhang mit der Lokalisierung gilt es, den Energiesensor Aer aus *E. coli* zu erwähnen, der ebenfalls keine Transmembrandomänen besitzt (Bibikov *et al.*, 2000). Die Verankerung von Aer in der Membran geschieht durch eine Folge 38 hydrophober Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Proteins (Amin *et al.*, 2006). Jedoch konnten keine entsprechenden Homologien zu TlpD gefunden werden (Abbildung 10).

Ein anderer bakterieller löslicher Sensor, welcher membranassoziiert vorkommt, ist McpS aus *P. aeruginosa*. Die Autoren postulieren eine Verbindung zur Membran durch den supramolekularen Chemotaxiskomplex, also durch Interaktionen mit den anderen Sensoren und der Histidinkinase CheA (Bardy und Maddock, 2005). In dieser Arbeit wurde daher die Lokalisierung von TlpD in den Mutanten *tIpABC* und *cheAY2* näher untersucht. In der

tlpABC-Dreifachmutante konnte TlpD membranassoziiert nachgewiesen werden. In der *cheAY2*-Mutante war dies nur im Falle einer Überexpression und der Verwendung eines α -V5-Antikörpers möglich (Abbildung 32, Abbildung 33). Ob der membranassoziierte Nachweis von TlpD-V5 in der *cheAY2*-Mutante aufgrund einer höheren Sensitivität des α -V5-Antikörpers oder aufgrund einer veränderten Proteinverteilung aufgrund der Überexpression zustande kam, lässt sich bisher nicht sagen. Allerdings fiel die Detektion von TlpD in der Membran in der *cheAY2*- und in der *tlpABC*-Mutante im Vergleich zum Wildstamm deutlich geringer aus (Abbildung 33). Die Histidinkinase CheAY2, und die Sensoren TlpA, TlpB und TlpC scheinen also an der Membranassoziiierung von TlpD beteiligt zu sein. Der Einfluss anderer Sensoren und der Histidinkinase auf die Lokalisierung und die Stabilisierung polnaher Cluster wurden auch bereits in einer Reihe anderer Spezies (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *R. sphaeroides*) gezeigt bzw. postuliert (Maddock und Shapiro, 1993; Harrison *et al.*, 1999; Bardy und Maddock, 2005; Shiomi *et al.*, 2005). Im Weiteren wurden noch andere mögliche Interaktionspartner von TlpD in Bezug auf ihren Einfluss auf die Lokalisierung und Funktion von TlpD untersucht. Aus zwei wesentlichen Gründen vermuteten wir die Existenz weiterer Interaktionspartner von TlpD außerhalb des Chemotaxisapparates. (I) Zum einen ist der Mechanismus der Membranlokalisierung noch nicht abschließend geklärt, da auch in Abwesenheit von CheAY2 bzw. in Abwesenheit der anderen Sensoren TlpD noch an der Membran zu finden war. (II) Zum anderen ist der Mechanismus der Energiewahrnehmung ebenfalls nicht geklärt. TlpD ist im Vergleich zu anderen Sensoren stark verkürzt und besitzt daher möglicherweise selbst keine eigene Domäne zur Signalwahrnehmung (siehe Ergebnisse 7.1, Abbildung 10).

Zwei mögliche Interaktionspartner konnten in der Interaktionsdatenbank von Pimrider identifiziert werden: HP0697 und HP1033. Allerdings konnte bisher für keines der beiden ein deutlicher Einfluss auf das Bewegungsmuster gefunden werden (siehe Ergebnisse 7.7.2). Das Gen HP1033 ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht annotiert (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). HP0697 hat eine geringe Homologie zu NAD-Synthasen und interagiert mit HypF, einer Untereinheit des Hydrogenase-Komplexes (Olson *et al.*, 2001) und ist im Stamm *H. pylori* HPAG1 als Gamma-Untereinheit der Acetocarboxylase annotiert (Oh *et al.*, 2006). Dies stellt möglicherweise eine Verbindung zu Energiestoffwechsel da, die in Zukunft weiter untersucht werden muss. Sowohl in der HP1033- als auch in der HP0697-Mutante konnte TlpD-V5 in der unlöslichen Fraktion detektiert werden. Interessant in diesem Zusammenhang war allerdings, dass in der HP0697-Mutante TlpD nicht in der löslichen Fraktion detektiert werden konnte. Eine Erklärung dafür ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Ein weiterer möglicher Interaktionspartner wäre das Genprodukt HP0600, da es zu TlpD unmittelbar benachbart liegt und wahrscheinlich im gleichen Operon organisiert ist (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Für den Stamm *H. pylori* N6 konnte gezeigt werden,

dass das Gen HP0600 nur unvollständig vorliegt (siehe Ergebnisse 7.7.3, Abbildung 35). Daher kann eine Beteiligung von HP0600 an der Lokalisierung und Funktion von TlpD zumindest im Stamm N6 ausgeschlossen werden. Auch zeigten sich in den Stämmen B128 und L7 keine auffälligen phänotypischen Veränderungen nach Mutagenese des Gens (siehe Ergebnisse 7.7.3). Jedoch sind auch an dieser Stelle weitere Analysen bezüglich des Effektes des Gens HP0600 notwendig.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Ko-Präzipitation (siehe Ergebnisse 7.9) wurden noch eine Reihe weiterer möglicher Interaktionspartner von TlpD identifiziert. Unter anderem konnte erwartungsgemäß eine Interaktion mit CheAY2 identifiziert werden, was das Experiment positiv validierte. Interessante Funde der Ko-Präzipitation waren die Katalase, welche möglicherweise ein Verbindungsglied zum Sauerstoffmetabolismus darstellt, und die Aconitat-Hydratase, welche eine mögliche Verbindung zum Zitronensäurezyklus darstellt. Diese Interaktionen müssen jedoch in weiteren Experimenten verifiziert werden und gegebenenfalls ihr Einfluss auf das Verhalten von *H. pylori* durch Mutagenese oder die Verwendung spezifischer Inhibitoren untersucht werden.

Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hängt unter anderem auch von der Atmung der Bakterien ab. So generiert die unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff eine Mischung aus Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Wang *et al.*, 2006; Imlay, 2003). Katalase ist für *H. pylori in vitro* nicht essenziell (Odenbreit *et al.*, 1996). Ebenfalls wird spekuliert, dass die Katalase im Wirt möglicherweise gegenüber endogenproduzierten ROS von untergeordneter Bedeutung ist (Wang *et al.*, 2006). Katalase spielt jedoch im Zellkulturmodell gegenüber von Phagozyten-produzierten ROS eine wesentliche Rolle (Ramarao *et al.*, 2000). Eine Wahrnehmung endogener ROS und damit der Aktivität der bakteriellen Sauerstoffatmung durch TlpD mit Hilfe der Katalase ist nach dem jetzigen Kenntnisstand durchaus möglich, so dass eine Fluchtreaktion gegenüber ROS prinzipiell nicht auszuschließen ist.

Eine Wahrnehmung der Energie durch die Aconitat-Hydratase ist eher unwahrscheinlich, da die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren unterhalb des Zitronensäurezyklus angreifen und diese das Verhalten trotz keiner direkten Verbindung zur Aconitat-Hydratase beeinflussen. Theoretisch möglich aber zum jetzigen Zeitpunkt noch völlig spekulativ wäre ein regulatorischer Effekt von TlpD auf die Aconitat-Hydratase. Ein regulatorischer Effekt von Komponenten des Chemotaxissystems auf andere Proteine (z.B. Cholera toxin) konnte zum Beispiel bereits unter anderem in *V. cholerae* gezeigt werden (Lee *et al.*, 2001). Ein anderes publiziertes Beispiel ist die Regulation von Genen der anaeroben Atmung und des Entner-Doudoroff-Wegs durch den Sensor Aer in *E. coli* (Pruss *et al.*, 2003). Die Aconitat-Hydratase katalysiert reversibel die Umwandlung von Citrat in Isocitrat über Aconitat. Citrat wiederum kann in manchen Bakterien (z. B. *E. coli*) über den Glyoxylatweg

abgebaut werden und so Wachstum auf z.B. Acetat ermöglichen (Cronan und LaPorte, 1996). Die Aconitat-Hydratase B in *E. coli* wird unter anaeroben Bedingungen hochreguliert (Bradbury *et al.*, 1996) und besitzt eine hohe Homologie zu Aconitat-Hydratase aus *H. pylori* (Pitson *et al.*, 1999; Gruer *et al.*, 1997). Eine Regulation der Aconitat-Hydratase in Abhängigkeit von den atmosphärischen/metabolischen Bedingungen wäre also theoretisch auch in *H. pylori* vorstellbar. Allerdings ist die Existenz eines funktionellen Glyoxylatweges in *H. pylori* umstritten (Hoffman *et al.*, 1996; Pitson *et al.*, 1999).

Weitere mögliche, noch nicht näher untersuchte Interaktionspartner finden sich im Interaktom des nahe verwandten *C. jejuni* (Parrish *et al.*, 2007). Das zu TlpD homologe Protein Cj0488c in *C. jejuni* zeigt Interaktionen zu den Proteinen CheV, TrpF (N-(5-phosphoribosyl)-Anthranilat-Isomerase), PyrH (Uridylat-Kinase), Cj0854c und Cj1680c. Zu den Genen *cheV*, *trpF* und *pyrH* finden sich die entsprechenden Homologen in *H. pylori*, lassen jedoch zur Zeit keine Hypothese zum Mechanismus der Energiewahrnehmung zu. Zu Cj1680c findet sich in *H. pylori* kein homologes Protein. Das zu Cj0854c homologe Protein ist das hypothetische nicht annotierte Protein HP0236 (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999). Interessant ist zum einen, dass Cj0854c in *C. jejuni* als hypothetisches periplasmatisches Protein annotiert ist und, zum anderen dass es neben der hohen Homologie (59%) zu HP0236 noch geringere Homologie zur Cytochrom_{c551}-Peroxidase und zur Ubiquinone/Menaquinone-Biosynthese-Methyltransferase aus *H. pylori* J99 zeigt und damit ein direktes Verbindungsglied von TlpD zur Atmungskette sein könnte. Die Homologien beschränken sich jedoch auf sehr kurze Abschnitte der Aminosäuresequenz und sind daher möglicherweise zufällig (p-Wert = 0,074 bzw. 1,6).

Schließlich besteht theoretisch auch die Möglichkeit, dass TlpD durch einen kovalent gebundenen Membrananker mit der Membran verbunden ist. Gestützt wurde die Theorie anfangs durch einen Unterschied in der Laufhöhe in SDS-Gelen zwischen zytosolischen und membranären TlpD (Abbildung 32). Dieser Unterschied konnte jedoch nicht in allen Experimenten reproduziert werden. Insbesondere in der Reinigung von TlpD, schienen beide Fraktionen von TlpD stets die gleiche Größe zu haben (Abbildung 39). Jedoch ist es notwendig, die einzelnen Fraktionen im Massenspektrometer genauer zu analysieren, um möglichen, auch kleineren kovalenten Modifikationen, welche in Gelen nicht sichtbar sind, auf die Spur zu kommen. Bisher ist zwar noch kein Chemosensor bekannt, der durch einen kovalent gebundenen Membrananker in der Membran sitzt, jedoch wurde beispielsweise für den Sensor Tar aus *E. coli* gezeigt, dass sich kovalente Modifikationen wie Methylierungen und Amidierungen (z.B. von Glutamin und Glutamat) in einer Stabilisierung der polaren Lokalisierung auswirken (Shiomi *et al.*, 2005). In TlpD konnten bisher keine eindeutigen Methylierungsmotive (Glx-Glx^{*}-X-X-Ala-Ser/Thr) identifiziert werden (siehe Ergebnisse 7.1.2, Diskussion 8.1), aber eine Methylierung bzw. Amidierung der zahlreich vorkommenden

Glutamin- und Glutamatseitengruppen (Abbildung 10) ist durchaus vorstellbar. Eine andere mögliche Erklärung für den Unterschied in der Laufhöhe der verschiedenen TlpD-Formen wäre die reversible Bindung eines Kofaktors. Die Hypothese würde auch das Verschwinden des Unterschieds im Laufe der Reinigung erklären, da der Kofaktor durch die denaturierenden Bedingungen der Reinigung (8 M Harnstoff, siehe Methoden 6.17.2) vom Protein dissoziieren könnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bisher keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich des Einflusses möglicher Interaktionspartner auf die Funktion von TlpD gefunden werden konnten. Da man jedoch davon ausgehen kann, dass die experimentell ermittelten Interaktionen, insbesondere die des Yeast-Two-Hybrid, tatsächlich vorhanden sind, sollten mögliche Kandidaten, wie z.B. die Proteine aus der Ko-Präzipitation (Katalase, Aconitat-Hydratase), das zu Cj0854c homologe Protein HP0236 und die mutmaßlichen Interaktionspartner aus dem Yeast-Two-Hybrid (HP0697, HP1033) in der Folge noch näher untersucht werden.

8.8 Modelle der Energiewahrnehmung in *H. pylori* durch TlpD

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen war es uns möglich, mehrere Modelle für Mechanismen der Energiewahrnehmung durch TlpD aufzustellen.

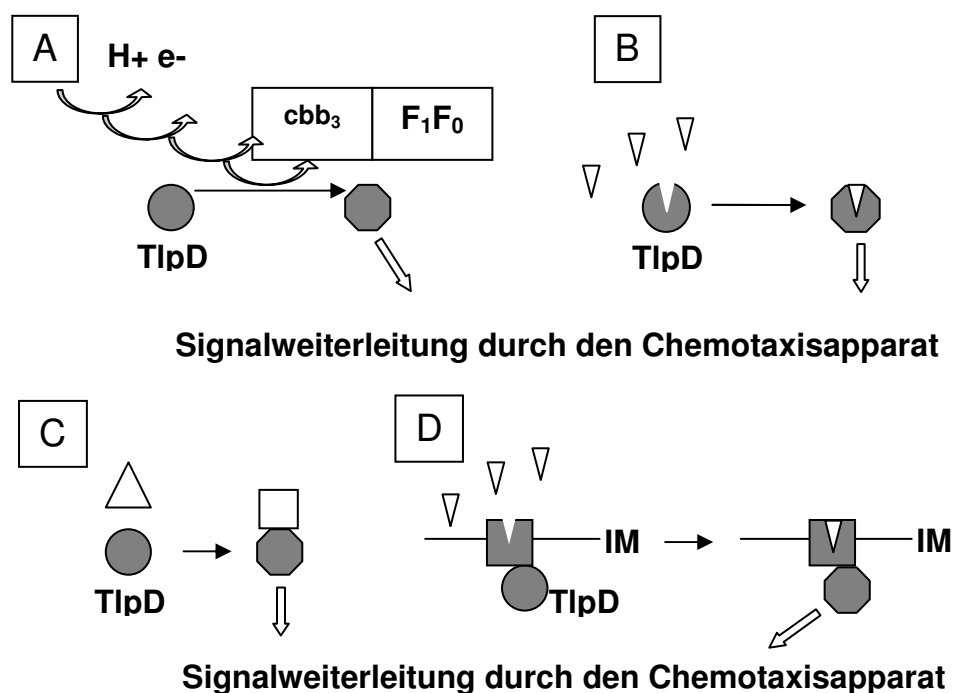


Abbildung 53: Modelle der Energiewahrnehmung durch TlpD

Laut Modell A könnte TlpD selbst eine Änderung in der Elektronentransportkette wahrnehmen und überträgt dieses Signal durch eine Konformationsänderung weiter auf den

Chemotaxisapparat. In Modell B wird von TlpD direkt ein möglicher Ligand wahrgenommen. Dieses Modell entspricht dem klassischen Modell der Chemotaxis. Mögliche Liganden wären Redox- oder Energieäquivalente oder intermediäre Produkte des Energiestoffwechsels. In Modell C nimmt TlpD eine Konformationsänderung und/oder eine Änderung in der enzymatischen Aktivität eines Interaktionspartners wahr, der seinerseits am Energiestoffwechsel selbst beteiligt ist oder diesen wahrnehmen kann. Ein mögliches Beispiel hierfür wäre die Energiewahrnehmung durch Aer in *E. coli*, welche von der Aktivität der NADH-Dehydrogenase I beeinflusst wird. In Modell D erfolgt die Energiewahrnehmung wie in Modell B durch die direkte Bindung eines Liganden. Dies könnte im Unterschied zu Modell B auch von einem Interaktionspartner von TlpD bewerkstelligt werden. Modell A überlappt möglicherweise mit einem der anderen, so ist beispielsweise eine Wahrnehmung der Elektronentransportkette durch einen Interaktionspartner möglich. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen lässt sich kein Modell eindeutig favorisieren. Da TlpD jedoch (I) im Vergleich zu anderen bekannten Sensoren stark verkürzt vorliegt und (II) die Existenz einer sensorischen Domäne in TlpD selbst somit fraglich bleibt, ist die Existenz eines Interaktionspartners, wie er in Modell C und D beschrieben wurde, wahrscheinlich. Ein vergleichbares Modell wurde in *C. jejuni* mit dem Energiesensor CetA/CetB beschrieben (Hendrixson *et al.*, 2001; Elliott *et al.*, 2008). Dieser Energiesensor besteht aus zwei Proteinen: CetA stellt die Signalweiterleitungsdomäne da, CetB die sensorische Domäne. Im Unterschied zu TlpD handelt es sich bei dem CetAB-System jedoch um einen PAS-Domänen-Sensor, der wahrscheinlich ähnlich funktioniert wie Aer aus *E. coli* (Hendrixson *et al.*, 2001). Im Falle von CetAB findet sich in CetB (periplasmatischer Partner) eine PAS-Domäne. Bisher konnten in verschiedenen Mikroorganismen insgesamt 55 dieser Paare eines zweigeteilten Sensors identifiziert werden (Elliott und DiRita, 2008) - einige davon auch in der Gruppe der ϵ -Proteobakterien. In *H. pylori* konnte jedoch bisher weder Homologe zu CetA und CetB noch ein sonstiges PAS-Domänen-Protein identifiziert werden. Generell ist in *H. pylori* eine Aufteilung der Signalwahrnehmung und Weiterleitung auf zwei einzelne Proteine vorstellbar. Zudem gilt es hier darauf hinzuweisen, dass die bisher identifizierten PAS-Domänen sehr divers sind. So konnte bisher 14900 PAS-Domänen in sensorischen Proteinen identifiziert werden (Taylor, 2007). Die verschiedenen PAS-Domänen können dabei unterschiedlichste Kofaktoren tragen: 4-Hydroxymethylsäure (Pellequer *et al.*, 1998), eine Häm-Gruppe (Gong *et al.*, 1998; Ayers und Moffat, 2008), FAD (Bibikov *et al.*, 1997; Repik *et al.*, 2000; Crosson und Moffat, 2001) oder ein Flavinmononukleotid (FMN) (Christie *et al.*, 1999). Daher kann die Existenz solch einer Domäne zum jetzigen Zeitpunkt in *H. pylori* nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Neben der Möglichkeit einer bisher nicht identifizierten PAS-Domäne in TlpD als funktionelle Einheit besteht auch die Möglichkeit, dass TlpD dem Sensor Tsr aus *E. coli*

mechanistisch ähnlich ist. Tsr nimmt die *proton motive force* wahrscheinlich mit Hilfe geladener Aminosäuren wahr (Edwards *et al.*, 2006). Zwar konnte noch für keine spezifischen Seitengruppen eine Beteiligung in der Wahrnehmung der *proton motive force* durch Tsr nachgewiesen werden, jedoch finden sich auch in TlpD eine Reihe von Histidinen, welche womöglich eine reversible Interaktion mit Protonen bewerkstelligen können (siehe Ergebnisse 7.1.3, Abbildung 11). Die Fähigkeit zur pH-Wahrnehmung durch Tsr und Tar in *E. coli* konnte den cytoplasmatischen Aminosäuren der HAMP-Domäne Arg²⁵⁹-Ser²⁶⁰, Asp²⁶³ und His²⁶⁷ in Tar und den Aminosäuren Gly²⁶¹-Glu²⁶², Arg²⁶⁵ und Asp²⁶⁹ in Tsr zugeordnet werden (Umemura *et al.*, 2002). Da pH-Wert und *proton motive force*, wie schon öfter diskutiert, eng zusammenhängen und die Wahrnehmung beider Reize eine Wahrnehmung von Protonen bedeutet, wurde nach ähnlichen Motiven in TlpD gesucht. Zwar finden sich die Aminosäurefolgen so exakt nicht wieder in TlpD, jedoch sind zum Teil ähnliche Bereiche zu finden: z.B. Gly²¹⁹-Glu²²⁰, Arg²²³ und Asp²³⁰. Es ist also durchaus vorstellbar, dass TlpD mechanistisch dem Tsr aus *E. coli* ähnlich die Energiewahrnehmung vollzieht, jedoch fehlen hierfür bislang experimentelle Hinweise.

In Zukunft werden noch weitere Experimente zu möglichen Interaktionspartnern, Kofaktoren und funktionell essenzieller Aminosäuren folgen müssen, um den genauen Mechanismus der Wahrnehmung charakterisieren zu können. Dies war auch ein Beweggrund für die durchgeführte Reinigung des Proteins TlpD (siehe Ergebnisse 7.8). Die Reinigung von TlpD wird es ermöglichen, in weiteren Experimenten mutmaßliche Interaktionen zu bestätigen oder auch mögliche Kofaktoren zu identifizieren. Die reversible Bindung eines Kofaktors ist möglicherweise auch für den zum Teil beobachteten Größenunterschied zwischen verschiedenen TlpD-Zustandsformen verantwortlich.

8.9 TlpA und TlpB zeigen Energietaxis im heterologen Modell gegenüber metabolisierbaren Substraten

Um weitere Hinweise auf mögliche Substratspezifitäten der einzelnen Sensoren aus *H. pylori* zu gewinnen und um die Rolle der Sensoren in der Energietaxis zu untersuchen, wurde ein heterologes System verwendet. *Escherichia coli* bietet sich als heterologes Modell an, da sowohl der Energiestoffwechsel (Gennis und Stewart, 1996) als auch der Chemotaxisapparat (Alexandre und Zhulin, 2001) gut untersucht sind. Darüber hinaus existiert eine Reihe von Mutanten in den Chemosensoren (Parkinson und Houts, 1982; Repik *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002) und es sind Minimalmedien verfügbar (Wolfe und Berg, 1989), welche eine Identifikation eines einzelnen Stimulus sowohl in der Energie- als auch in der Chemotaxis ermöglichen. Insbesondere für die Untersuchung der Energietaxis sind für *E. coli* eine Reihe von Medien (Succinat, Trypton) gut etabliert (Wolfe und Berg, 1989; Greer-

Phillips *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu sind Medien, welche Motilität in *H. pylori* ermöglichen, sehr komplex und erschweren daher die Identifikation eines einzelnen Reizes. Testermann *et al.* geben die minimalen Bestandteile eines wachstumsfördernden Mediums für *H. pylori* mit neun Aminosäuren, Natrium- und Kaliumchlorid, Eisen, Zink, Magnesium, Hypoxanthin, Thiamin und Pyruvat an (Testerman *et al.*, 2006). Jedoch konnte in diesem Medium nur ein sehr geringes Wachstum erreicht werden. Die Motilität der Bakterien wurde in dieser publizierten Studie nicht untersucht. Dieses Medium wurde in der vorliegenden Arbeit ausprobiert und wir konnten in diesem Medium nur ein sehr geringes Wachstum und eine stark eingeschränkte Motilität beobachten, welche sich nicht zur Durchführung von *temporal assays* oder *spatial assays* eignete. Für *E. coli*, dessen Taxis gut charakterisiert ist, sind Schwärmtests in Minimalplatten bestehend aus einer geringen Anzahl von Salzen (PO_4^{3-} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl; FeCl_2) und wenigen Aminosäuren (Threonin, Leucin, Histidin, Methionin) sowie Thiamin etabliert (Wolfe und Berg, 1989) (siehe Methoden 6.24).

8.9.1 TlpA und TlpB zeigen Energietaxis im heterologen Modell gegenüber metabolisierbaren Zuckern

Nachdem die heterologe Expression der vier Sensoren aus *H. pylori* in *E. coli* BT3388 bestätigt werden konnte (Abbildung 49), wurden verschiedene Kohlenstoffquellen und ihr Einfluss auf das Verhalten der Bakterien getestet. Der *E. coli*-Stamm BT3388 trägt keine eigenen Sensoren mehr (Yu *et al.*, 2002), daher waren alle beobachteten Reaktionen den heterolog synthetisierten Sensoren aus *H. pylori* zuzuschreiben. Für alle Zucker außer Saccharose konnte eine Reaktion des Sensors TlpA beobachtet werden. Unter anaeroben Bedingungen konnte nur eine Reaktion auf Glukose beobachtet werden. Unter mikroaeroben Bedingungen war die Reaktion deutlich größer als unter aeroben. Die Tatsache, dass eine Reihe verschiedener von *E. coli* metabolisierbarer Zucker (Fraenkel, 1996; Cronan und LaPorte, 1996) in hoher Konzentration (5 mM) für den Sensor als TlpA als Lockstoff wirkten, spricht dafür, dass es sich um Energietaxis handelt (Greer-Phillips *et al.*, 2003; Alexandre *et al.*, 2000). Cerda *et al.* konnte zudem zeigen, dass der *H. pylori*-Sensor TlpA in *E. coli* unter anderem eine positive Antwort auf Serin und Arginin in hohen Konzentrationen (10 mM) vermittelt (Cerda *et al.*, 2003). Für Serin und Arginin wurde bereits gezeigt, dass diese ebenfalls als Substrat der Atmung in *H. pylori* dienen können (Nagata *et al.*, 2003). Dies spricht dafür, dass es sich bei der beobachteten Antwort ebenfalls um Energietaxis handeln könnte. Auffallend dabei ist, dass die Größe des Schwärmhofes mit der Eignung des Zuckers als Kohlenstoffquelle korrespondiert. Es wurde zuvor berichtet, dass Glucose für *E. coli* ein besseres Wachstumssubstrat (höhere Wachstumsrate) ist als Ribose und Succinat (Greer-

Phillips *et al.*, 2003). Eine höhere Wachstumsrate ist eine Folge eines erhöhten Elektronentransports und damit einer erhöhten *proton motive force* (Signal für Tsr). Bei Glucose war der Schwärmhof entsprechend am größten, gefolgt von Ribose und Succinat. Für den Sensor Tsr aus *E. coli* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Stärke der Antwort, welche von Tsr vermittelt wird, mit der Eignung der Kohlenstoffquelle als Wachstumssubstrat korreliert (Greer-Phillips *et al.*, 2003). Dies spricht dafür, dass der Mechanismus der Energiewahrnehmung von TlpA möglicherweise dem von Tsr ähnelt. Für Tsr konnte jedoch bisher nur gezeigt werden, dass die Wahrnehmung der energetischen Verhältnisse mit der *proton motive force* zusammenhängt (Shioi und Taylor, 1984; Taylor und Zhulin, 1998; Edwards *et al.*, 2006), jedoch ist der genaue Mechanismus noch unklar. Vermutlich geschieht dies durch eine Konformationsänderung, welche durch eine Protonierung hervorgerufen wird (Shioi und Taylor, 1984; Umemura *et al.*, 2002).

Der Sensor TlpB zeigte ebenfalls eine, wenn auch schwächere, Reaktion auf einige der Zucker (Glukose, Fumarat) (Tabelle 25). Auch dieses Verhalten deutet auf eine Wahrnehmung der energetischen Verhältnisse hin. Da für TlpB aber bislang nur für zwei Zucker (Glukose, Fumarat) eine Reaktion beobachtet werden konnte, war es bisher nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen der Stärke der Reaktion und der der Eignung der wahrgenommenen Kohlenstoffquelle als Wachstumssubstrat herzustellen. Die möglicherweise vorliegende Energiewahrnehmung durch TlpB korrespondiert mit den Untersuchungen von Croxen *et al.* (Croxen *et al.*, 2006), der für TlpB eine Fluchtreaktion auf sehr niedrige pH-Werte beschrieben hat. Die Wahrnehmung des pH-Wertes erfolgt dabei wahrscheinlich indirekt. So wäre beispielsweise eine Interaktion mit der *proton motive force* denkbar. Die *proton motive force* ist sowohl pH-abhängig als auch ein Indiz für die energetischen Verhältnisse. Croxen *et al.* beschreibt, dass *in vitro* nur eine Reaktion zu pH-Werten unter 3 zu beobachten war und die *tlpB*-Mutante einen Kolonisierungsdefekt in Mäusen hat (Croxen *et al.*, 2006). Der pH-Wert des Mäusemagens liegt jedoch stets zwischen 3 und 4 (McConnell *et al.*, 2008). Der Kolonisierungsdefekt kann also nicht alleine durch den Verlust der postulierten pH-Wahrnehmung begründet werden, da die *in vitro* von TlpB wahrgenommenen pH-Werte (< 3) im Magen der Maus nicht existieren. Dies spricht dafür, dass TlpB möglicherweise den pH-Wert eher indirekt, beispielsweise durch die Wahrnehmung der energetischen Verhältnisse wahrnimmt. Die energetischen Verhältnisse sind durch die *proton motive force*, welche sich aus elektrischem Membranpotential ($\Delta\psi$) und pH-Differenz (ΔpH) zwischen Periplasma und Cytosol zusammensetzt, unmittelbar an den pH-Wert gekoppelt.

Für TlpC und TlpD konnten in diesem Experiment keine Reaktionen auf die getesteten Zucker beobachtet werden. Mögliche Gründe hierfür werden ausführlicher in Abschnitt 8.9.3 rückblickend auf alle durchgeführten Experimente diskutiert.

Zum bisherigen Zeitpunkt ist es nicht möglich eindeutig zu begründen, weshalb die Reaktionen der Sensoren TlpA und TlpB unter mikroaeroben Bedingungen am stärksten ausfielen (Tabelle 25). Naheliegende Gründe wären ein womöglich effizienterer Metabolismus von *E. coli* unter den spezifischen experimentellen mikroaeroben Bedingungen oder auch eine veränderte Expression durch den *lac*-Promotor. Zum jetzigen Zeitpunkt noch sehr spekulativ, aber erwähnenswert scheint jedoch die Vermutung, dass die Atmungskette von *E. coli* der von *H. pylori* unter mikroaeroben Bedingungen ähnlicher ist als unter aeroben. Durch Regulation wird die Atmungskette von *E. coli* der Sauerstoffkonzentration der Umgebung angepasst. Mit fallender Sauerstoffkonzentration nimmt der Anteil an Menaquinon gegenüber Ubiquinon im Quinon-Pool bei *E. coli* zu (Anraku, 1988). In der Atmungskette von *H. pylori* wiederum ist Menaquinon ebenfalls das meist verwendete Quinon (Alm *et al.*, 1999; Marcelli *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999). Außerdem wird in *E. coli* unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen bevorzugt das Cytochrom *bd* und die NADH-Dehydrogenase I produziert (Calhoun *et al.*, 1993; Puustinen *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1990). *H. pylori* wiederum besitzt ebenfalls eine NADH-Dehydrogenase vom Typ I (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000), und ein starker Einfluss der NADH-Dehydrogenase I auf die Energiewahrnehmung durch den Sensor Aer wurde bereits für *E. coli* gezeigt (Edwards *et al.*, 2006). Ob sich aber daraus tatsächlich eine Interaktion der *H. pylori*-Sensoren mit Komponenten des Energiestoffwechsels (Quinonpool, NADH-Dehydrogenase I) von *E. coli* ableiten lässt, bleibt fraglich, da es sich bei TlpA und TlpB um Transmembransensoren handelt und der Mechanismus der Wahrnehmung, wie in Abschnitt 8.9 beschrieben, eher Tsr-ähnlich zu sein scheint.

Es sollte hier angemerkt werden, dass sich die NADH-Dehydrogenase I aus *H. pylori* von anderen gut charakterisierten NADH-Dehydrogenasen unterscheidet. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die NADH-Dehydrogenase I in *H. pylori* nicht sensitiv gegenüber Rotenon ist (Chen *et al.*, 1999), zum anderen konnten zwei der essenziellen Gene des Proteinkomplexes bisher nicht identifiziert werden (Smith *et al.*, 2000). In dem, insgesamt 14 Gene umfassenden Operon, welches in der gleichen Reihenfolge wie in anderen Bakterien angeordnet ist, fehlen die Gene *nuoE* und *nuoF*. Stattdessen finden sich zwei nicht annotierte, deutliche kürzere Gene (HP1264, HP1265), welche nur eine geringe Homologie zu *nuoE* und *nuoF* aufweisen. Die Untereinheiten NuoE und NuoF haben in der NADH-Dehydrogenase I die Funktion der NADH-Bindung. Das Fehlen dieser Untereinheiten in *H. pylori* korrespondiert mit der Erkenntnis, dass in *H. pylori* NADPH eine wichtigere Rolle als Elektronendonator spielt als NADH. Ob die Bindung des NADPH durch die uncharakterisierten Genprodukte HP1264 und HP1265 geschieht oder ob die Oxidation des NADPH durch einen möglichen Interaktionspartner der NADH-Dehydrogenase I geschieht, wird derzeit noch diskutiert (Smith *et al.*, 2000).

8.9.2 Die Sensoren TlpA, TlpB und TlpD ermöglichen eine Orientierung unter mikroaeroben Bedingungen in Succinat- und Tryptonmedium

Im Folgenden wurden auch die Stämme RP437 und BT3312 für die Untersuchung der Sensoren aus *H. pylori* verwendet. Der Stamm *E. coli* RP437 ist ein Chemotaxis-Referenzwildstamm (siehe Methoden 6.24, Ergebnisse 7.11.3 und 7.11.4). Der Stamm BT3312 trägt keine Energiesensoren mehr (Aer, Tsr), sondern lediglich die Sensoren Trg, Tap und Tar. Die Stämme RP437 und BT3312 wurden verwendet, da bekannt war, dass sich die einzelnen Sensoren in *E. coli* sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrer Lokalisierung gegenseitig beeinflussen (Ames *et al.*, 2002) und somit eine Untersuchung der Sensoren von *H. pylori* in Gegenwart verschiedener Sensoren von *E. coli* vielversprechender ist. Die Funktion eines einzelnen Sensors im Stamm *E. coli* BT3388 wäre dagegen möglicherweise durch die Abwesenheit der anderen Sensoren abgeschwächt. So konnte beispielsweise auch für TlpD im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Funktion von TlpD von den anderen Sensoren beeinflusst wird. Zudem ermöglichen die Stämme RP437 und BT3312, welche im Gegensatz zu BT3388 zur Chemotaxis fähig sind, die Beobachtung von negativer Taxis, welche möglicherweise gegenüber atmosphärischen Bedingungen (z.B. hohe Sauerstoffkonzentration) auftritt.

Für die Experimente wurden Trypton- und Succinatplatten verwendet. Das Vollmedium Trypton (1% Trypton, 0,5% NaCl) wurde verwendet, um die Auswirkung unterschiedlicher atmosphärischer Bedingungen auf die Funktion und Wirkung der Sensoren näher zu analysieren. In diesem Experiment ist die Antwort unabhängig von der Art eines supplementierten Zuckers, da Nährstoffe im Überfluss vorhanden sind. Eine Änderung des Schwärmverhaltens resultiert also aus Veränderungen in den atmosphärischen Bedingungen (z.B. durch Sauerstoffatmung) oder der Entstehung toxischer Stoffwechselprodukte. Ähnlich wie bei den Succinatplatten wird in den Tryptonplatten durch die metabolische Aktivität Sauerstoff verbraucht (Adler, 1966a; Wolfe und Berg, 1989). Den entstehenden Sauerstoffkonzentrationsgradienten können die Bakterien nutzen, um sich in Richtung steigender Sauerstoffkonzentrationen zu orientieren.

In Tryptonplatten konnte durch die Expression von TlpA im Stamm *E. coli* RP437 eine Reduktion des Schwärmhofes beobachtet werden. Dies korrespondiert mit der Beobachtung, dass in *E. coli* die Chemotaxis inhibiert wird, wenn Aer stärker als im Wildstamm exprimiert wird (Bibikov *et al.*, 1997). Im vorliegenden Fall würde dies bedeuten, dass durch die Expression eines weiteren Energiesensors (TlpA) womöglich ebenfalls die Anzahl an *tumblings* zunimmt und damit die Fähigkeit auszuschwärmen reduziert ist. Die Autoren der *E. coli*-Studie diskutieren als mögliche Erklärung eine kompetitive Hemmung anderer Sensoren bezüglich der Interaktionspartner aus dem Chemotaxisapparat (CheW, CheA)

durch den zusätzlichen Energiesensor. Rein stöchiometrische Gründe scheinen aber unwahrscheinlich, da im vorliegenden Experiment dieser Effekt (Reduktion des Schwärmhofes) nur bei Expression von TlpA beobachtet werden konnte.

Da für *E. coli* gezeigt wurde, dass die Aer-vermittelten Reaktionen in Motilitätsplatten zu Succinat am stärksten ausfielen (Greer-Phillips *et al.*, 2003), wurden die Sensoren aus *H. pylori* im Folgenden in den Stämmen *E. coli* RP437 und *E. coli* BT3312 auch in Succinatplatten untersucht, um Energietaxis zu identifizieren, welche mechanistisch der von Aer ähnlich ist. Der Sensor Aer aus *E. coli* reagiert auf Substrate, welche schnell oxidierbar sind (z.B. Succinat) (Greer-Phillips *et al.*, 2003). Es konnte bereits ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität der NADH-Dehydrogenase und Aer nachgewiesen werden (Edwards *et al.*, 2006). Die Succinat-Dehydrogenase ist ebenfalls direkt in die Elektronentransportkette eingebunden und führt somit direkt zu einer Änderung der Redox-Verhältnisse der Bakterienzelle, welche durch Aer (mit FAD) wahrgenommen werden kann. Diese Wahrnehmung ist unabhängig davon, ob das Substrat als Wachstumssubstrat geeignet ist oder nicht (Greer-Phillips *et al.*, 2003). Succinat ermöglicht nur eine geringere PMF als beispielsweise Glukose oder Ribose, wird jedoch schneller oxidiert. Daher ist auf Succinat eine Aer-vermittelte Reaktion zu erwarten, während Tsr auf Änderungen in der PMF reagiert. Zudem ist im verwendeten Succinatmedium kein Substrat enthalten, für welches bereits Chemotaxis in *E. coli* beschrieben wurde. Alle im Stamm BT3312 beobachteten Reaktionen in Succinatplatten basieren also auf den Antworten der heterolog exprimierten Sensoren, da *E. coli* BT3312 keinen entsprechenden Energiesensor (Aer) mehr trägt. Die beobachteten Reaktionen in *E. coli* RP437 beruhen in Succinatplatten damit auf der Aktivität der Energiesensoren (Aer, Tsr) und dem heterolog exprimierten Sensor aus *H. pylori*. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Aer-negative Mutanten in Succinatplatten ein stark reduziertes Schwärmverhalten haben (Bibikov *et al.*, 1997). Dies wurde damit begründet, dass in der Agarplatte ausgehend von der Bakterienkolonie durch Atmung ein Sauerstoffgradient entsteht (Adler, 1966a; Adler, 1966b), wobei durch die Atmung der Bakterien die Sauerstoffkonzentration in der Mitte der Kolonie die Konzentration am geringsten ist und nach außen hin zunimmt. Energietaxispositive Bakterien sind im Stande sich den optimalen Sauerstoffbedingungen anzunähern und so weiter auszuschwärmen (Bibikov *et al.*, 1997). Da Aer-negative Mutanten dieses Verhalten nicht mehr zeigten, wurde geschlossen, dieses Verhalten werde durch den Sensor Aer vermittelt.

Wird in dem *E. coli*-Wildstamm RP437 oder in dem Stamm BT3312 einer der Sensoren TlpA, TlpB oder TlpD exprimiert, reduziert sich der Motilitätshof in den Succinatplatten. Auch in den Succinatplatten lässt sich dieser Phänotyp mit der zusätzlichen Expression eines Energiesensors erklären, welche in *E. coli* zu einer Inhibierung der Chemotaxis führt (Bibikov *et al.*, 1997).

In Succinatplatten ist der Einfluss der *H. pylori*-Sensoren insgesamt stärker als in Tryptonplatten: Zum einen war die durch TlpA verursachte Reduktion in Succinatplatten stärker als in Tryptonplatten, zum anderen war in Succinatplatten der Effekt auch bei einer Expression von TlpB und TlpD zu beobachten, was in Tryptonplatten nicht der Fall war. Dies lässt sich womöglich damit erklären, dass in Succinatplatten Energietaxis dominanter ist als in Tryptonplatten. In Succinatplatten ist für *E. coli* ausschließlich Energietaxis möglich, da alle anderen bisher beschriebenen Substrate der Taxis von *E. coli* (Aspartat, Ribose, Maltose, Galaktose) nicht im Medium enthalten sind. Im Vollmedium Trypton dagegen ist eine Überlagerung der Energietaxis durch chemotaktische Effekte (positive Taxis zu Aspartat, Ribose, Maltose, Galaktose) möglich.

Die Beobachtung dass, die Sensoren TlpA, TlpB und TlpD in *E. coli* BT3388 keine Reaktion zeigten, spricht ebenfalls wie die Ergebnisse aus 7.11.1 (Schwärmhofgröße korrespondiert mit Eignung als Wachstumssubstrat) für die Hypothese von einem Tsr-ähnlichen Wahrnehmungsmechanismus, da Tsr selbst keine deutliche Reaktion in Succinatplatten zeigte (Greer-Phillips *et al.*, 2003). In den Stämmen RP437 und BT3312 dagegen kann es durch die Expression eines zusätzlichen Energiesensors zu einer Inhibierung der Taxis kommen (Bibikov *et al.*, 1997). Die Ursachen für diesen Effekt sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

8.9.3 Die Sensoren aus *H. pylori* zeigen keine Reaktion zu Säuren unter den getesteten Bedingungen

Auffallend war, dass sich bei Exposition zu Säuren (Acetat, H₂CO₃) und der Aminosäure Arginin in Stamm *E. coli* BT3388 durch die Sensoren von *H. pylori* keine Antwort ergab, wenn zusätzlich Fumarat als Energiequelle vorlag (siehe Ergebnisse 7.11.2). Alle verwendeten Säuren eignen sich nicht als Wachstumssubstrat für *E. coli*. Arginin wird von *E. coli* nicht als Energiequelle genutzt (Cunin *et al.*, 1986; McFall und Newman, 1996) und Acetat in Gegenwart anderer Zucker nur im sehr reduzierten Maße (Clark und Cronan, 1996).

Die Tatsache, dass für den Sensor TlpC in keinem der Experimente eine Antwort beobachtet werden konnte liegt möglicherweise auch einer Inkompatibilität zwischen Sensor und Histidinkinase oder Sensor und Komponenten des Energiestoffwechsels, die sich auf die Signalwahrnehmung auswirken. Um dieses Problem zu umgehen, besteht die Möglichkeit, Hybridsensoren zu konstruieren, bestehend aus der Signalwahrnehmungsdomäne der untersuchten Spezies (*H. pylori*) und der Signalweiterleitungsdomäne des heterologen Wirtes (*E. coli*). In dieser Arbeit wurde ein Hybridsensor bestehend aus TlpA und Aer konstruiert, um möglicherweise eine stärkere und eine adaptionsunabhängige (Bibikov *et*

al., 2004) Antwort von TlpA auf verschiedene Reize zu erhalten. Bakterien, welche den Sensor TlpA-Aer synthetisierten, zeigten in allen Experimenten einen Schwärmhof, welcher noch kleiner war als der der Negativkontrolle (*E. coli* BT3388) (Abbildung 50, Abbildung 51, Tabelle 26, Tabelle 27). Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass der Sensor TlpA-Aer eine dauerhafte Flagellenrotation im Uhrzeigersinn („*clockwise bias*“) verursacht und damit ein gerichtetes Schwimmen unmöglich macht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im heterologen Modell Energietaxis für TlpA und wahrscheinlich auch für TlpB und TlpD gezeigt werden konnte. Für TlpA konnte sowohl eine positive Reaktion auf verschiedene metabolisierbare Zucker als auch eine negative Reaktion in Trypton- und Succinatplatten gezeigt werden. Der Mechanismus der Energiewahrnehmung scheint zumindest für TlpA Tsr-ähnlich zu sein, da die Stärke der vermittelten Reaktion mit der Eignung der Zucker als Wachstumssubstrat korreliert (siehe Diskussion 8.9.1; Greer-Phillips *et al.*, 2003). Die hier im heterologen Modell gewonnenen Erkenntnisse gilt es, in Zukunft in *H. pylori* zu bestätigen. So kann basierend auf den Daten aus *E. coli* gezielt nach TlpA- und TlpB-vermittelter Energietaxis gesucht werden.

8.10 Relevanz der Taxis von *H. pylori* und des Sensors TlpD *in vivo* im Tiermodell der Mongolischen Rennmaus

Zur Untersuchung der Rolle von TlpD für die Infektion und Persistenz *in vivo* wurde in dieser Arbeit das Modell der Mongolischen Rennmaus gewählt. Es tritt zwar keine natürliche Infektion der Tiere mit *H. pylori* auf (Bartizal *et al.*, 1984; Worthington und Fulghum, 1988), jedoch ist dieses Modell aus mehreren Gründen für Untersuchung von *H. pylori* besonders geeignet. Zum einen entwickeln die Tiere nur sehr selten eine natürlich erworbene Gastritis (Bingel, 1995). Darüber hinaus entwickeln Mongolische Rennmäuse als Folge einer Infektion mit *H. pylori* ebenfalls ein Karzinom (Tokieda *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999). Eine dauerhafte Entfernung des Bakteriums nach der Infektion lässt sich mit den gleichen Strategien wie für den Menschen erreichen (Keto *et al.*, 1999). Das für diese Arbeit wichtigste Argument war jedoch, dass das pH-Profil des Magens der Tiere dem des menschlichen Magens mit einem durchschnittlichen luminalen pH-Wert von 1,4 sehr ähnlich ist (Schreiber *et al.*, 2005).

8.10.1 Eignung des *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Tests zur Überprüfung der Infektion während des Infektionszeitraumes

Zu Beginn der Tierversuche galt es, ein zuverlässiges System zur Kontrolle des Infektionsstatus der Tiere während des Infektionszeitraums zu etablieren. Der Nachweis von *H. pylori* im Stuhl der Tiere durch PCR gelang nicht zuverlässig (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch in der Literatur ist nur in einer geringen Anzahl an Studien ein Nachweis aus dem Stuhl von Mongolischen Rennmäusen mittels einer PCR beschrieben (z.B. Lee und Kim, 2006). Ein möglicher Grund für das häufige Auftreten falsch-negativer Ergebnisse sind inhibitorische Substanzen im Stuhl der Nagetiere (Zenner, 1999), wobei dies bisher nicht speziell für die Mongolische Rennmaus beschrieben wurde. Aufgrund der beschriebenen Fehleranfälligkeit der PCR und der unzureichenden Etablierung dieser Methode zum Nachweis von *H. pylori* im Stuhl von Mongolischen Rennmäusen entschieden wir uns als Alternative, den Bakteriennachweis durch einen Stuhl-Antigen-Test von R-Biopharm anzugehen. Kuo et al. (2008) untersuchten in parallelen Versuchen ebenfalls Sensitivität und Spezifität eines *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Tests (Premium platinum HpSA, Meridian Diagnostic, Cincinnati, U.S.A.) in Mongolischen Rennmäusen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Infektion (Kuo et al., 2008) und diskutierten die Eignung dieses Tests zur Detektion einer Infektion in den Tieren. Sie konnten zeigen, dass eine zuverlässige Detektion der Infektion mit einem Schwellenwert von 0,16 erst nach ca. vier Wochen möglich ist. Das Maximum an Sensivität und Spezifität von 88,6% bzw. 100% wurde sogar erst nach sechs Wochen erreicht. Im Gegensatz dazu konnte in früher publizierten Experimenten eine Infektion mit *H. pylori* in Mäusen mit Hilfe des gleichen Stuhl-Antigen-Tests trotz eines höheren Schwellenwertes (0,20) schon zuverlässig nach sieben Tagen nachgewiesen werden (Wang et al., 2001). Die Autoren diskutieren als Gründe für diesen Unterschied sowohl die unterschiedliche intestinale Flora in Maus und Mongolischer Rennmaus als auch die Möglichkeit, dass *H. pylori* womöglich längere Zeiträume benötigt, um die Mongolische Rennmaus stabil zu kolonisieren als die Maus und somit die ausgeschiedene Bakterienmenge in den ersten Wochen während der frühen Phase der Infektion geringer als in der Maus ist. Die Studie von Kuo et al. korrespondiert gut mit unseren Daten: In unserer Untersuchung kam es im Stuhl-Antigen-Test bei infizierten Tieren auch erst nach drei bis vier Wochen zu einem eindeutigen reproduzierbaren Überschreiten des Schwellenwertes für einen positiven Befund (siehe Ergebnisse 7.10.1; Abbildung 42). Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten von falsch negativen Stuhl-Antigen-Test-Ergebnissen ist zudem die vom Hersteller geforderte Mindestmenge an Stuhl von 0,2 g für eine verlässliche Aussage des von uns gewählten Tests. Bei einem vergleichsweise kleinen Versuchstier wie der Mongolischen Rennmaus erhielten wir jedoch durchschnittlich nur eine Stuhlmenge von ca. 0,1 g. Die verwendeten

Schwellenwerte (< 0,19 für negativen Befund; > 0,21 für positiven Befund) beziehen sich auf menschliches Untersuchungsmaterial. Speziell mit diesem Stuhl-Antigen-Test (R-Biopharm, Darmstadt) bestand zu Beginn keine Erfahrung mit Untersuchungsmaterial aus der Mongolischen Rennmaus, so dass vorerst mit den Schwellenwerten des Herstellers gearbeitet wurde. Aufgrund des Mangels an Alternativen und der akzeptablen Sensitivität wurde der Stuhltest auch für die weiteren Experimente angewandt. Zwar sind eine Reihe weiterer nichtinvasiver Tests für den Menschen beschrieben: der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest (Mitchell und Megraud, 2002), ein ELISA-gestützter Urin-Test (Wu *et al.*, 2004) und verschiedene serologische Tests (Kuo *et al.*, 2002). Diese sind jedoch für die Mongolische Rennmaus nicht weiter untersucht worden und daher nicht etabliert (Kuo *et al.*, 2008).

8.10.2 Relevanz von TlpD aus *H. pylori* in der Infektion von Mongolischen Rennmäusen

Im Folgenden sollte die Relevanz des Sensors TlpD für die Infektion untersucht werden. Dazu wurden Gruppen von vier bis fünf Tieren mit verschiedenen *H. pylori*-Mutanten (Wildstamm, *cheAY2*, *tlpD*) infiziert, der Infektionsstatus über sechs Wochen mit dem *H. pylori*-Stuhl-Antigen-Test überprüft und am Ende des Infektionszeitraumes die bakterielle Last pro Milligramm Magengewebe bestimmt. Die mit der *cheAY2*-Mutante infizierten Tiere dienten als negative Kontrollgruppe, die mit dem Wildstamm infizierten Tiere als positive Kontrollgruppe. In allen Tieren der Wildstamm-Gruppe konnte nach sechs Wochen eine Infektion nachgewiesen werden. Die *cheAY2*-Mutante war in allen Tieren nicht infektiös. Dies korrespondiert mit bisherigen Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass CheAY2 für eine Kolonisierung im Mausmodell (Terry *et al.*, 2005; Foynes *et al.*, 2000) bzw. im Modell der Mongolischen Rennmaus essenziell ist (Kavermann *et al.*, 2003). Außerdem konnte auch für die Aspartatkinase CheY1 eine essenzielle Rolle in der Kolonisierung der Mongolischen Rennmaus gezeigt werden (McGee *et al.*, 2005). Des Weiteren konnten wir in unseren Ergebnissen zeigen, dass TlpD einen Einfluss auf die Kolonisierungsrate, also die Zahl der infizierten Tiere pro Gruppe hat. So waren in allen Experimenten zu allen Zeitpunkten weniger Tiere mit der *tlpD*-Mutante infiziert als mit dem Wildstamm (Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23). Auffallend ist dabei, dass dieser Effekt im Korpus des Magens noch stärker war als im Antrum (siehe unten). So waren im Korpus nur jeweils ein bzw. zwei von sechs Tieren infiziert, während im Antrum in drei bzw. vier von sechs Tieren eine Infektion vorlag (Tabelle 22, Tabelle 23). Eine Rolle von TlpD in der Infektion widerspricht scheinbar zum Teil den Ergebnissen von Croxen *et al.* (2006). In dessen Studie konnte kein Effekt von TlpD im Stamm *H. pylori* SS1 auf die Kolonisierung im Mausmodell beobachtet werden. Der pH-Wert im Magen einer Maus liegt jedoch je nach

Ernährungslage zwischen 3 und 4 (McConnell *et al.*, 2008) und unterscheidet sich damit deutlich von dem des Menschen (pH \sim 1,4) (Teyssen *et al.*, 1995) oder dem der Mongolischen Rennmaus (Schreiber *et al.*, 2005). Da der pH-Wert eine wichtige Funktion in der Orientierung der Bakterien innerhalb des Mukus hat (Schreiber *et al.*, 2004) und wir eine Rolle von TlpD im Zusammenhang mit der Energiewahrnehmung gezeigt haben (Schweinitzer *et al.*, 2008), ist in diesem Fall das Modell der Mongolischen Rennmaus wahrscheinlich sehr viel besser geeignet und die daraus gezogenen Schlüsse daher verlässlicher. Die *proton motive force* setzt sich aus dem elektrischen Membranpotential ($\Delta\psi$) und der pH-Differenz (ΔpH) zwischen Periplasma und Cytosol zusammen. Die *proton motive force* wiederum ist entscheidend für die Energiegewinnung durch die F_1F_0 -ATPase. Ein Abfallen des pH-Wertes im Cytosol bewirkt ein Abnehmen des Membranpotentials und der pH-Differenz und damit der Möglichkeit, ATP zu produzieren. Daher ist eine indirekte Wahrnehmung des pH-Wertes durch die Wahrnehmung der energetischen Verhältnisse sehr wahrscheinlich.

Neben der Zahl der Tiere, welche pro Gruppe infiziert wurden, untersuchten wir auch die bakterielle Last pro Milligramm Magengewebe (Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23). Wir konnten dabei feststellen, dass es sechs Wochen nach Infektion im Antrum des Magens einen reproduzierbaren, signifikanten Unterschied in der mittleren bakteriellen Last pro Milligramm Magengewebe zwischen der Wildstamm-Gruppe (375 cfu/mg) und der *tlpD*-Gruppe (20 cfu/mg) gab ($p = 0,01$; Rangsummentest). Zwei Wochen nach Infektion war der Unterschied in der mittleren bakteriellen Last im Antrum nicht signifikant (3708 cfu/mg bzw. 20 cfu/mg, $p = 0,352$; Rangsummentest). Jedoch gab es auch zwei Wochen nach Infektion bereits einen statistisch signifikanten Unterschied in der mittleren bakteriellen Last im Korpus (869 cfu/mg bzw. 2 cfu/mg $p = 0,038$; Rangsummentest).

Der Unterschied in der räumlichen Verteilung der Bakterien im Magen unterstützt die Hypothese zur Rolle von TlpD in der *in-vivo*-Orientierung. Im Korpus waren die Infektionseffizienz und die mittlere bakterielle Last der *tlpD*-Mutante niedriger als im Antrum. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche Anatomie der beiden Magenregionen. Im Korpus sitzen deutlich mehr säure- und proteaseproduzierende Zellen, als im Antrum (Schubert und Peura, 2008). Es ist bekannt, dass sowohl Säure als auch die Präsenz von Proteasen zum Beweglichkeitsverlust und letztlich zum Absterben von *H. pylori* führen (Schreiber *et al.*, 2005, Einleitung 4.1.5.1). Aufgrund der größeren räumlichen Nähe zu den säure- und proteaseproduzierenden Zellen im Korpus liegt der Schluss nahe, dass sowohl die Kolonisierung als auch die Persistenz dort nur mit einem vollständig funktionierenden Chemotaxisapparat und damit einer sehr präzisen und ständig adaptiven Orientierung möglich ist. Die Wichtigkeit eines vollständigen funktionellen Chemotaxisapparates und der daraus resultierenden präzisen Orientierung wurde auch von McGee *et al.* am Beispiel von

TlpB im Modell der Mongolischen Rennmaus gezeigt (McGee *et al.*, 2005). So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine Mutante im Gen *tlpB* zwar zu einer Kolonisierung ähnlich dem Wildstamm im Stande ist, jedoch eine deutlich geringere Entzündungsreaktion hervorruft. Als möglichen Grund dafür diskutieren die Autoren auch hier, dass sich die Lokalisierung der *tlpB*-Mutanten im Vergleich zum Wildstamm womöglich unterscheidet. Eine andere mögliche Erklärung für den von uns beobachteten Unterschied zwischen Antrum und Korpus mag sein, dass eine Kolonisierung des Korpus möglicherweise nur unter der Voraussetzung einer stabilen, fortgeschrittenen Infektion des Antrums möglich ist. Treten also bereits zu Beginn kleine Unterschiede in der Infektionsstärke des Antrums auf, welche sich mit zunehmender Zeit noch ausweiten, so erscheint es logisch, dass ein Übergreifen der Infektion auf den Korpus nur im sehr geringen Maße von statten geht und die Unterschiede in der Infektionsstärke dort noch größer sind.

Wir konnten also zeigen, dass TlpD im Modell der Mongolischen Rennmaus eine Rolle in der Kolonisierung spielt, da (I) zu allen Zeitpunkten signifikant weniger Tiere der *tlpD*-Gruppe infiziert waren als in der Wildstamm-Gruppe und weil (II) die mittlere bakterielle Last pro Milligramm Magengewebe sechs Wochen der Inokulation in der *tlpD*-Gruppe signifikant niedriger war als in der Wildstamm-Gruppe. Außerdem haben wir erste Hinweise darauf dass TlpD nicht nur eine Rolle in der initialen Infektion sondern auch in Persistenz spielt, da (I) der Unterschied im Antrum zwischen *tlpD*-Mutanten und Wildstamm mit der Zeit zunimmt (siehe Ergebnisse 7.10.3) und (II) die Signalwerte des Stuhlantigentests in der *tlpD*-Gruppe im Laufe der Zeit abnehmen (Abbildung 44). Schließlich haben wir ebenfalls Hinweise darauf, dass TlpD im Korpus des Magens von größerer Bedeutung zu sein scheint als im Antrum, da die Infektionsrate im Korpus stets niedriger war als im Antrum.

In Zukunft wird die Relevanz von TlpD *in vivo* noch über einen längeren Zeitraum zu beobachten sein, um der Hypothese von der Rolle von TlpD in der Persistenz weiter nach gehen zu können. Auch wird in weiteren Experimenten der Effekt des Geschlechts der Tiere auf die Kolonisierbarkeit durch die *tlpD*-Mutante weiter zu untersuchen sein, da es in den bisherigen Experimenten zu dieser Frage bisher widersprüchliche Ergebnisse gab (siehe Ergebnisse 7.10.3) und außerdem die geschlechtshomogenen Gruppen zu klein waren (zwei bis drei Tiere), um eine statistische abgesicherte Aussage machen zu können. Schließlich wird auch eine komplementierte *tlpD*-Mutante im Infektionsmodell der Mongolischen Rennmaus zu untersuchen sein, um die Rolle von TlpD in der Infektion abzusichern.

8.11 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in *H. pylori* Metabolismus-abhängiges Verhalten existiert und andere Verhaltensäußerungen dominiert. Der Sensor TlpD trägt dabei einen großen Anteil an diesem Verhalten. Daneben konnte in einem heterologen Modell beobachtet werden, dass auch die Sensoren TlpA und TlpB Energietaxis vermitteln können. TlpA und TlpB zeigen vermutlich einen Wahrnehmungsmechanismus, der dem von *E. coli*-Tsr (Edwards *et al.*, 2006) ähnlich ist. Der Wahrnehmungsmechanismus von TlpD und die Existenz dafür möglicherweise notwendiger Kofaktoren konnte bisher nicht geklärt werden. In der weiteren Folge gilt es nun, diesen Wahrnehmungsmechanismus weiter aufzuklären. In diesem Zusammenhang sollten sowohl detaillierte biochemische Analysen des Sensors selbst (strukturelle Untersuchungen, gerichtete Mutagenese interessanter Aminosäuren, Identifikation möglicher Kofaktoren) durchgeführt als auch die Art der Interaktionen und die Funktionen der bisher ermittelten Interaktionspartner (HP0697, HP1033, Katalase) genauer untersucht werden. Auch die Beteiligung der Sensoren TlpA und TlpB in der Energietaxis sollte in Zukunft das Ziel weiterer Analysen sein. Schließlich gilt es, die Rolle der Energietaxis und im Speziellen von TlpD im Modell der Mongolischen Rennmaus weiter zu untersuchen. Dabei ist vor allem auch die Frage nach der Bedeutung von Energietaxis und TlpD für den Übergang von einer akuten zu einer chronischen Infektion von Interesse.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A. dest.	Aqua bidestilliert
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktenzeichen
BCA	Bicinchonininsäure
BHI	<i>Brain hart infusion medium</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CAT	Chloramphenicol
cfu	<i>colony forming unit</i>
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
Cm	Chloramphenicol
cm	Centimeter
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5´-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere (<i>et alter</i>)
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
h	Stunde
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ₂ O	deionisiertes Wasser
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
HPLC H ₂ O	<i>high pressure liquid chromatography</i> gereinigtes Wasser
HQNO	2- <i>n</i> -heptyl-4-hydroxyquinoline <i>N</i> -oxide
HS	<i>Horse serum</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MCP	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFOR	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreductase
pH	<i>potentia Hydrogenium</i>
pI	Isolektrischer Punkt
POX	Meerrettichperoxidase
RLU	<i>relative luminescence unit</i>
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
<i>spec.</i>	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Saline)
TBST	<i>Tris buffered saline</i> + Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tlp	Transducer like protein
TMAO	Trimethylaminoxid
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	Versus
w/o	ohne (without)
x	-fach
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel
ZTL	Zentrales Tierlabor

10 Literatur

- Adler, J. (1965) Chemotaxis in *Escherichia coli* *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **30**: 289-292.
- Adler, J. (1966a) Chemotaxis in bacteria *Science* **153**: 708-716.
- Adler, J. (1966b) Effect of amino acids and oxygen on chemotaxis in *Escherichia coli* *J. Bacteriol.* **92**: 121-129.
- Adler, J. (1975) Chemotaxis in bacteria *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 341-356.
- Akada, J.K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuda, M., and Nakazawa, T. (2000) Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH *Mol. Microbiol.* **36**: 1071-1084.
- Alderson, J., Clayton, C.L., and Kelly, D.J. (1997) Investigations into the aerobic respiratory chain of *Helicobacter pylori*. *Gut* **41**: A7.
- Alexandre, G., Greer, S.E., and Zhulin, I.B. (2000) Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense* *J. Bacteriol.* **182**: 6042-6048.
- Alexandre, G., Greer-Phillips, S., and Zhulin, I.B. (2004) Ecological role of energy taxis in microorganisms *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 113-126.
- Alexandre, G., Zhulin, I.B. (2001) More than one way to sense chemicals *J. Bacteriol.* **183**: 4681-4686.
- Alm, R.A., Ling, L.-S.L., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F., and Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* *Nature* **397**: 176-180.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Ames, P., Studdert, C.A., Reiser, R.H., and Parkinson, J.S. (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**: 7060-7065.
- Amin, D.N., Taylor, B.L., and Johnson, M.S. (2006) Topology and boundaries of the aerotaxis receptor Aer in the membrane of *Escherichia coli* *J. Bacteriol.* **188**: 894-901.
- Andermann, T.M., Chen, Y.T., and Ottemann, K.M. (2002) Two Predicted Chemoreceptors of *Helicobacter pylori* Promote Stomach Infection *Infect. Immun.* **70**: 5877-5881.
- Anraku, Y. (1988) Bacterial electron transport chains *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 101-132.
- Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J.X., Kikuchi, T., Satake, M., and Shimizu, T. (2004) ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability *Nucleic Acids Res.* **32**: W390-W393.
- Ayers, R.A., Moffat, K. (2008) Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains *Biochemistry* **47**: 12078-12086.
- Bardy, S.L., Maddock, J.R. (2005) Polar localization of a soluble methyl-accepting protein of *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **187**: 7840-7844.
- Bartizal, K.F., Wostmann, B.S., and Wagner, M. (1984) Distribution and effects of a defined six-member murine-derived microflora in gnotobiotic gerbils *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 746-751.
- Beier, D., Frank, R. (2000) Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori* *J. Bacteriol.* **182**: 2068-2076.
- Beier, D., Spohn, G., Rappuoli, R., and Scarlato, V. (1997) Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation *J. Bacteriol.* **179**: 4676-4683.
- Belli, W.A., Fryklund, J. (1995) Partial characterization and effect of omeprazole on ATPase activity in *Helicobacter pylori* by using permeabilized cells *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1717-1720.
- Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J., and Kelley, L.A. (2008) Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre *Proteins* **70**: 611-625.
- Benoit, S.L., Maier, R.J. (2008) Hydrogen and nickel metabolism in helicobacter species *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 242-251.
- Berg, H.C., Brown, D.A. (1972) Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking *Nature* **239**: 500-504.

- Bespalov, V.A., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (1996) Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 10084-10089.
- Besschetnova, T.Y., Montefusco, D.J., Asinas, A.E., Shrout, A.L., Antommattei, F.M., and Weis, R.M. (2008) Receptor density balances signal stimulation and attenuation in membrane-assembled complexes of bacterial chemotaxis signaling proteins *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**: 12289-12294.
- Bibikov, S.I., Barnes, L.A., Gitin, Y., and Parkinson, J.S. (2000) Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli* *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 5830-5835.
- Bibikov, S.I., Biran, R., Rudd, K.E., and Parkinson, J.S. (1997) A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli* *J.Bacteriol.* **179**: 4075-4079.
- Bibikov, S.I., Miller, A.C., Gosink, K.K., and Parkinson, J.S. (2004) Methylation-independent aerotaxis mediated by the *Escherichia coli* Aer protein *J.Bacteriol.* **186**: 3730-3737.
- Bijlsma, J.J., Waidner, B., Vliet, A.H., Hughes, N.J., Hag, S., Bereswill, S., Kelly, D.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Kist, M., and Kusters, J.G. (2002) The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance *Infect.Immun.* **70**: 606-611.
- Bingel, S.A. (1995) Pathologic findings in an aging Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) colony *Lab Anim Sci.* **45**: 597-600.
- Bleich, A., Kohn, I., Glage, S., Beil, W., Wagner, S., and Mahler, M. (2005) Multiple *in vivo* passages enhance the ability of a clinical *Helicobacter pylori* isolate to colonize the stomach of Mongolian gerbils and to induce gastritis *Lab Anim* **39**: 221-229.
- Bode, G., Mauch, F., and Malfertheiner, P. (1993) The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability *Epidemiol.Infect* **111**: 483-490.
- Boin, M.A., Austin, M.J., and Hase, C.C. (2004) Chemotaxis in *Vibrio cholerae* *FEMS Microbiol.Lett.* **239**: 1-8.
- Borgstahl, G.E., Williams, D.R., and Getzoff, E.D. (1995) 1.4 A structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore *Biochemistry* **34**: 6278-6287.
- Bottcher, G. (1874) *Dorpater MNed.Z.* **5**: 184.
- Bradbury, A.J., Gruer, M.J., Rudd, K.E., and Guest, J.R. (1996) The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli* *Microbiology* **142 (Pt 2)**: 389-400.
- Bren, A., Eisenbach, M. (1998) The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY *J.Mol.Biol.* **278**: 507-514.
- Bren, A., Eisenbach, M. (2000) How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation *J.Bacteriol.* **182**: 6865-6873.
- Bury-Mone, S., Kaakoush, N.O., Asencio, C., Megraud, F., Thibonnier, M., de Reuse, H., and Mendz, G.L. (2006) Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? *Helicobacter* **11**: 296-303.
- Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., de Mattos, M.J., and Neijssel, O.M. (1993) Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain *J.Bacteriol.* **175**: 3020-3025.
- Cantwell, B.J., Draheim, R.R., Weart, R.B., Nguyen, C., Stewart, R.C., and Manson, M.D. (2003) CheZ phosphatase localizes to chemoreceptor patches via CheA-short *J.Bacteriol.* **185**: 2354-2361.
- Cappelletti, D., Chiarelli, L.R., Paschetto, M.V., Stivala, S., Valentini, G., and Scotti, C. (2008) *Helicobacter pylori* l-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **377**: 1222-1226.
- Casadaban, M., Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *E. coli* *J.Mol.Biol.* **138**: 179-207.
- Cerda, O., Rivas, A., and Toledo, H. (2003) *Helicobacter pylori* strain ATCC700392 encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein (MCP) for arginine and sodium bicarbonate *FEMS Microbiol.Lett.* **224**: 175-181.
- Chen, M., Andersen, L.P., Zhai, L., and Kharazmi, A. (1999) Characterization of the respiratory chain of *Helicobacter pylori* *FEMS Immunol Med Microbiol* **24**: 169-174.
- Chien, A., Edgar, D.B., and Trela, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* *J.Bacteriol.* **127**: 1550-1557.
- Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., and Briggs, W.R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 8779-8783.
- Clark, D.P., Cronan, J.E. (1996) C2 Compounds and Fatty Acids As Carbon Sources. In *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Edmund, C.C.L., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds). Washington, D.C.: ASM Press.

- Cohen-Ben-Lulu, G.N., Francis, N.R., Shimoni, E., Noy, D., Davidov, Y., Prasad, K., Sagi, Y., Cecchini, G., Johnstone, R.M., and Eisenbach, M. (2008) The bacterial flagellar switch complex is getting more complex *EMBO J.* **27**: 1134-1144.
- Copass, M., Grandi, G., and Rappuoli, R. (1997) Introduction of unmarked mutations in the *Helicobacter pylori vacA* gene with a sucrose sensitivity marker *Infect Immun.* **65**: 1949-1952.
- Cosseau, C., Batut, J. (2004) Genomics of the *ccoNOQP*-encoded *cbb3* oxidase complex in bacteria *Arch. Microbiol.* **181**: 89-96.
- Cronan, J.E., LaPorte, D. (1996) Tricarboxylic Acid Cycle and Glyoxylate Bypass. In *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Edmund, C.C.L., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 206-216.
- Cronin, J.E., LaPorte, D. (1996) Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds). Washington: ASM Press, pp. 206-216.
- Crosson, S., Moffat, K. (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**: 2995-3000.
- Croxen, M.A., Sisson, G., Melano, R., and Hoffman, P.S. (2006) The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa *J. Bacteriol.* **188**: 2656-2665.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A., and Stalon, V. (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria *Microbiol. Rev.* **50**: 314-352.
- Dial, E.J., Hall, L.R., Serna, H., Romero, J.J., Fox, J.G., and Lichtenberger, L.M. (1998) Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori* *Dig. Dis. Sci.* **43**: 2750-2756.
- Dietz, P., Gerlach, G., and Beier, D. (2002) Identification of target genes regulated by the two-component system HP166-HP165 of *Helicobacter pylori* *J. Bacteriol.* **184**: 350-362.
- Doig, P., de Jonge, B.L., Alm, R.A., Brown, E.D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S.D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B.C., Moir, D.T., Vovis, G.F., and Trust, T.J. (1999) *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 675-707.
- Donelli, G., Matarrese, P., Fiorentini, C., Dainelli, B., Taraborelli, T., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., and Cellini, L. (1998) The effect of oxygen on the growth and cell morphology of *Helicobacter pylori* *FEMS Microbiol. Lett.* **168**: 9-15.
- Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C., and Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes *Infect. Immun.* **64**: 2445-2448.
- Edwards, J.C., Johnson, M.S., and Taylor, B.L. (2006) Differentiation between electron transport sensing and proton motive force sensing by the Aer and Tsr receptors for aerotaxis *Mol. Microbiol.* **62**: 823-837.
- Elliott, K.T., DiRita, V.J. (2008) Characterization of CetA and CetB, a bipartite energy taxis system in *Campylobacter jejuni* *Mol. Microbiol.* **69**: 1091-1103.
- Elliott, K.T., Zhulin, I.B., Stuckey, J.A., and DiRita, V.J. (2008) Conserved residues in the HAMP domain define a new family of proposed bipartite energy taxis receptors *J. Bacteriol.*
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools *Nat. Protoc.* **2**: 953-971.
- Endres, R.G., Oleksiuk, O., Hansen, C.H., Meir, Y., Sourjik, V., and Wingreen, N.S. (2008) Variable sizes of *Escherichia coli* chemoreceptor signaling teams *Mol. Syst. Biol.* **4**: 211.
- Engelmann, T.W. (1881) Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und thierischer Organismen *Pfluegers Arch. Gesamt Physiol. Menschen Tiere* **26**: 285-295.
- Engelmann, T.W. (1882) *Bot. Ztg.* **40**: 419-426.
- Fellenius, E., Berglinde, T., Sachs, G., Olbe, L., Elander, B., Sjöstrand, S.E., and Wallmark, B. (1981) Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H⁺/K⁺)ATPase *Nature.* **290**: 159-161.
- Fischer, H.M. (1996) Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes *Trends Microbiol.* **4**: 317-320.
- Forman, D., Newell, D.G., Fullerton, F., Yarnell, J.W., Stacey, A.R., Wald, N., and Sitas, F. (1991) Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation *BMJ.* **302**: 1302-1305.
- Forsyth, M.H., Cao, P., Garcia, P.P., Hall, J.D., and Cover, T.L. (2002) Genome-wide transcriptional profiling in a histidine kinase mutant of *Helicobacter pylori* identifies members of a regulon *J. Bacteriol.* **184**: 4630-4635.

- Foster, J.W. (1991) *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response *J.Bacteriol.* **173**: 6896-6902.
- Foynes, S., Dorrell, N., Ward, S.J., Stabler, R.A., McColm, A.A., Rycroft, A.N., and Wren, B.W. (2000) *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa *Infect.Immun.* **68**: 2016-2023.
- Fraenkel, D.G. (1996) Glycolysis. In *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Edmund, C.C.L., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 189-198.
- Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D., and DeRosier, D.J. (1994) Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex *J.Mol.Biol.* **235**: 1261-1270.
- Francis, N.R., Wolanin, P.M., Stock, J.B., DeRosier, D.J., and Thomas, D.R. (2004) Three-dimensional structure and organization of a receptor/signaling complex *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 17480-17485.
- Fu, R., Wall, J.D., and Voordouw, G. (1994) DcrA, a c-type heme-containing methyl-accepting protein from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, senses the oxygen concentration or redox potential of the environment *J.Bacteriol.* **176**: 344-350.
- Gauden, D.E., Armitage, J.P. (1995) Electron transport-dependent taxis in *Rhodobacter sphaeroides* *J.Bacteriol.* **177**: 5853-5859.
- Ge, Z., Feng, Y., Dangler, C.A., Xu, S., Taylor, N.S., and Fox, J.G. (2000) Fumarate reductase is essential for *Helicobacter pylori* colonization of the mouse stomach *Microb.Pathog.* **29**: 279-287.
- Ge, Z., Hiratsuka, K., and Taylor, D.E. (1995) Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport *Mol.Microbiol.* **15**: 97-106.
- Ge, Z., Jiang, Q., Kalisiak, M.S., and Taylor, D.E. (1997) Cloning and functional characterization of *Helicobacter pylori* fumarate reductase operon comprising three structural genes coding for subunits C, A and B *Gene* **204**: 227-234.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoef, B., Leying, H., and Opferkuch, W. (1993) Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori* *J.Med.Microbiol.* **38**: 371-377.
- Gennis, R.B., Stewart, V. (1996) Respiration. In *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Edmund, C.C.L., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 217-261.
- Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A., and Chan, M.K. (1998) Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 15177-15182.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **9**: 1-13.
- Goodwin, C.S., McConnell, W., McCulloch, R.K., McCullough, C., Hill, R., Bronsdon, M.A., and Kasper, G. (1989) Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters *J.Clin.Microbiol.* **27**: 938-943.
- Greer-Phillips, S.E., Alexandre, G., Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (2003) Aer and Tsr guide *Escherichia coli* in spatial gradients of oxidizable substrates *Microbiology* **149**: 2661-2667.
- Gruer, M.J., Artymiuk, P.J., and Guest, J.R. (1997) The aconitase family: three structural variations on a common theme *Trends Biochem.Sci.* **22**: 3-6.
- Guvener, Z.T., Tifrea, D.F., and Harwood, C.S. (2006) Two different *Pseudomonas aeruginosa* chemosensory signal transduction complexes localize to cell poles and form and remold in stationary phase *Mol.Microbiol.* **61**: 106-118.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J.Mol.Biol.* **166**: 557-580.
- Harkey, C.W., Everiss, K.D., and Peterson, K.M. (1994) The *Vibrio cholerae* toxin-coregulated-pilus gene *tcpI* encodes a homolog of methyl-accepting chemotaxis proteins *Infect.Immun.* **62**: 2669-2678.
- Harrison, D.M., Skidmore, J., Armitage, J.P., and Maddock, J.R. (1999) Localization and environmental regulation of MCP-like proteins in *Rhodobacter sphaeroides* *Mol.Microbiol.* **31**: 885-892.
- Hazell, S.L., Evans, D.J.J., and Graham, D.Y. (1991) *Helicobacter pylori* catalase *J.Gen.Microbiol.* **137**: 57-61.
- Hazell, S.L., Harris, A.G., and Trend, M.A. (2001) Evasion of the toxic effects of oxygen. In *Helicobacter pylori physiology and genetics*. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., and Hazell, S.L. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 167-175.

- Hendrixson, D.R., Akerley, B.J., and DiRita, V.J. (2001) Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility *Mol. Microbiol.* **40**: 214-224.
- Herrmann, L., Schwan, D., Garner, R., Mobley, H.L., Haas, R., Schafer, K.P., and Melchers, K. (1999) *Helicobacter pylori* cadA encodes an essential Cd(II)-Zn(II)-Co(II) resistance factor influencing urease activity *Mol. Microbiol.* **33**: 524-536.
- Heuermann, D., Haas, R. (1998) A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 519-528.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R.K. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions *Nucleic Acids Res.* **16**: 7351-7367.
- Hill, S., Viollet, S., Smith, A.T., and Anthony, C. (1990) Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N₂ fixation and microaerobiosis *J. Bacteriol.* **172**: 2071-2078.
- Hoffman, P.S., Goodwin, A., Johnsen, J., Magee, K., and Veldhuyzen van Zanten, S.J. (1996) Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance *J. Bacteriol.* **178**: 4822-4829.
- Hou, S., Larsen, R.W., Boudko, D., Riley, C.W., Karatan, E., Zimmer, M., Ordal, G.W., and Alam, M. (2000) Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria *Nature* **403**: 540-544.
- Hughes, N.J., Chalk, P.A., Clayton, C.L., and Kelly, D.J. (1995) Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate:flavodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori* *J. Bacteriol.* **177**: 3953-3959.
- Hughes, N.J., Clayton, C.L., Chalk, P.A., and Kelly, D.J. (1998) *Helicobacter pylori* porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP *J. Bacteriol.* **180**: 1119-1128.
- Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 395-418.
- Iwahi, T., Satoh, H., Nakao, M., Iwasaki, T., Yamazaki, T., Kubo, K., Tamura, T., and Imada, A. (1991) Lansoprazole, a novel benzimidazole proton pump inhibitor, and its related compounds have selective activity against *Helicobacter pylori* *Antimicrob. Agents. Chemother.* **35**: 490-496.
- Jaworski, W. (1889) Podrecznik Chorob zoladka. *Wydawnictwa Dziel Lakarskich Polskich.* **32**.
- Josenhans, C., Eaton, K.A., Thevenot, T., and Suerbaum, S. (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**: 4598-4603.
- Josenhans, C., Ferrero, R.L., Labigne, A., and Suerbaum, S. (1999) Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes from *Helicobacter felis* *Mol. Microbiol.* **33**: 350-362.
- Josenhans, C., Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 605-614.
- Karatan, E., Saulmon, M.M., Bunn, M.W., and Ordal, G.W. (2001) Phosphorylation of the response regulator CheV is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* chemotaxis *J. Biol. Chem.* **276**: 43618-43626.
- Karita, M., Tsuda, M., and Nakazawa, T. (1995) Essential role of urease *in vitro* and *in vivo* *Helicobacter pylori* colonization study using a wild-type and isogenic urease mutant strain *J. Clin. Gastroenterol.* **21 Suppl 1**: S160-3.
- Kather, B., Stingl, K., van der Rest, M.E., Altendorf, K., and Molenaar, D. (2000) Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate:quinone oxidoreductase *J. Bacteriol.* **182**: 3204-3209.
- Kato, J., Nakamura, T., Kuroda, A., and Ohtake, H. (1999) Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 155-161.
- Kavermann, H., Burns, B.P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K., and Haas, R. (2003) Identification and Characterization of *Helicobacter pylori* Genes Essential for Gastric Colonization *J. Exp. Med.* **197**: 813-822.
- Kehry, M.R., Bond, M.W., Hunkapiller, M.W., and Dahlquist, F.W. (1983) Enzymatic deamidation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli* catalyzed by the *cheB* gene product *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 3599-3603.
- Kehry, M.R., Dahlquist, F.W. (1982) The methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli*. Identification of the multiple methylation sites on methyl-accepting chemotaxis protein I *J. Biol. Chem.* **257**: 10378-10386.
- Kehry, M.R., Doak, T.G., and Dahlquist, F.W. (1985) Sensory adaptation in bacterial chemotaxis: regulation of demethylation *J. Bacteriol.* **163**: 983-990.
- Kelly, D.J., Hughes, N.J., and Poole, R.K. (2001) Microaerobic Physiology: Aerobic Respiration, Anaerobic Respiration, and Carbon Dioxid Metabolism. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L., and Hazell, S.L. (eds). Washington: ASM Press.

- Kentner,D., Sourjik,V. (2006) Spatial organization of the bacterial chemotaxis system *Curr.Opin.Microbiol.* **9**: 619-624.
- Keto,Y., Takahashi,S., and Okabe,S. (1999) Healing of *Helicobacter pylori*-induced gastric ulcers in Mongolian gerbils: combined treatment with omeprazole and clarithromycin *Dig Dis Sci* **44**: 257-265.
- Kim,H., Park,C., Jang,W.I., Lee,K.H., Kwon,S.O., Robey-Cafferty,S.S., Ro,J.Y., and Lee,Y.B. (1990) The gastric juice urea and ammonia levels in patients with *Campylobacter pylori* *Am.J.Clin.Pathol.* **94**: 187-191.
- Kim,K.K., Yokota,H., and Kim,S.H. (1999) Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor *Nature* **400**: 787-792.
- Kim,S.H., Wang,W., and Kim,K.K. (2002) Dynamic and clustering model of bacterial chemotaxis receptors: structural basis for signaling and high sensitivity *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **99**: 11611-11615.
- Kirby,J.R., Kristich,C.J., Feinberg,S.L., and Ordal,G.W. (1997) Methanol production during chemotaxis to amino acids in *Bacillus subtilis* *Mol.Microbiol.* **24**: 869-878.
- Kirby,J.R., Zusman,D.R. (2003) Chemosensory regulation of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus* *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **100**: 2008-2013.
- Krieg,N.R., Hoffman,P.S. (1986) Microaerophily and oxygen toxicity *Annu.Rev.Microbiol.* **40**: 107-130.
- Kuipers,E.J., Israel,D.A., Kusters,J.G., Gerrits,M.M., Weel,J., van der Ende,A., van der Hulst,R.W., Wirth,H.P., Nikanne,J., Thompson,S.A., and Blaser,M.J. (2000) Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host *J.Infect.Dis.* **181**: 273-282.
- Kuo,C.H., Hu,H.M., Tsai,P.Y., Yang,S.F., Chang,L.L., Wang,J.Y., Chen,A., Jan,C.M., Wang,W.M., and Wu,D.C. (2008) A better method for confirming *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils *J.Gastroenterol.* **43**: 32-37.
- Kuo,C.H., Wu,D.C., Lu,C.Y., Su,Y.C., Yu,F.J., Lee,Y.C., Wu,I.C., Lin,S.R., Liu,C.S., Jan,C.M., and Wang,W.M. (2002) The media of rapid urease test influence the diagnosis of *Helicobacter pylori* *Hepatogastroenterology* **49**: 1191-1194.
- Kwon,D.H., el Zaatari,F.A., Kato,M., Osato,M.S., Reddy,R., Yamaoka,Y., and Graham,D.Y. (2000) Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**: 2133-2142.
- Labigne,A., Cussac,V., and Courcoux,P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity *J.Bacteriol.* **173**: 1920-1931.
- Labigne-Roussel,A., Courcoux,P., and Tompkins,L. (1988) Gene disruption and replacement as a feasible approach for mutagenesis of *Campylobacter jejuni* *J.Bacteriol.* **170**: 1704-1708.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**: 680-685.
- Larkin,M.A., Blackshields,G., Brown,N.P., Chenna,R., McGettigan,P.A., McWilliam,H., Valentin,F., Wallace,I.M., Wilm,A., Lopez,R., Thompson,J.D., Gibson,T.J., and Higgins,D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0 *Bioinformatics.* **23**: 2947-2948.
- Le Moual,H., Koshland,D.E., Jr. (1996) Molecular evolution of the C-terminal cytoplasmic domain of a superfamily of bacterial receptors involved in taxis *J.Mol.Biol.* **261**: 568-585.
- Lee,J.U., Kim,O. (2006) Natural maternal transmission of *H. pylori* in Mongolian gerbils *World J.Gastroenterol.* **12**: 5663-5667.
- Lee,S.H., Butler,S.M., and Camilli,A. (2001) Selection for *in vivo* regulators of bacterial virulence *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **98**: 6889-6894.
- Lengeler,J.W., Postma,P.W. (1999) Global Regulatory Networks and Signal Transduction Pathways. In *Biology of the Prokaryotes*. Lengeler,J.W., Drews,G., and Schlegel,H.G. (eds). Stuttgart: Thieme, pp. 491-523.
- Li,M., Hazelbauer,G.L. (2004) Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex *J.Bacteriol.* **186**: 3687-3694.
- Lopez,O., Morera,C., Miranda-Rios,J., Girard,L., Romero,D., and Soberon,M. (2001) Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation *J.Bacteriol.* **183**: 6999-7006.
- Lybarger,S.R., Nair,U., Lilly,A.A., Hazelbauer,G.L., and Maddock,J.R. (2005) Clustering requires modified methyl-accepting sites in low-abundance but not high-abundance chemoreceptors of *Escherichia coli* *Mol.Microbiol.* **56**: 1078-1086.
- Macnab,R.M., Koshland,D.E., Jr. (1972) The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **69**: 2509-2512.

- Maddock, J.R., Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell *Science* **259**: 1717-1723.
- Manson, M.D., Armitage, J.P., Hoch, J.A., and Macnab, R.M. (1998) Bacterial locomotion and signal transduction *J. Bacteriol.* **180**: 1009-1022.
- Marais, A., Mendz, G.L., Hazell, S.L., and Megraud, F. (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 642-674.
- Marcelli, S.W., Chang, H.T., Chapman, T., Chalk, P.A., Miles, R.J., and Poole, R.K. (1996) The respiratory chain of *Helicobacter pylori*: identification of cytochromes and the effects of oxygen on cytochrome and menaquinone levels *FEMS Microbiol. Lett.* **138**: 59-64.
- Marchant, J., Wren, B., and Ketley, J. (2002) Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter chemotaxis* *Trends Microbiol.* **10**: 155-159.
- Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B., and Glancy, R.J. (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter* *Med. J. Aust.* **142**: 436-439.
- Marshall, B.J., Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration *Lancet* **1**: 1311-1315.
- Marshall, J.R., Goodwin, C.S. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 68.
- Martin, A.C., Gould, M., Byles, E., Roberts, M.A., and Armitage, J.P. (2006) Two chemosensory operons of *Rhodobacter sphaeroides* are regulated independently by sigma 28 and sigma 54 *J. Bacteriol.* **188**: 7932-7940.
- Masduki, A., Nakamura, J., Ohga, T., Umezaki, R., Kato, J., and Ohtake, H. (1995) Isolation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **177**: 948-952.
- Mauch, F., Bode, G., and Malfertheiner, P. (1993) Identification and characterization of an ATPase system of *Helicobacter pylori* and the effect of proton pump inhibitors *Am. J. Gastroenterol.* **88**: 1801-1802.
- McConnell, E.L., Basit, A.W., and Murdan, S. (2008) Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for *in-vivo* experiments *J. Pharm. Pharmacol.* **60**: 63-70.
- McFall, E., Newman, E.B. (1996) Amino Acids as Carbon Sources. In *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Edmund, C.C.L., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 358-379.
- McGee, D.J., Langford, M.L., Watson, E.L., Carter, J.E., Chen, Y.T., and Ottemann, K.M. (2005) Colonization and inflammation deficiencies in Mongolian gerbils infected by *Helicobacter pylori* chemotaxis mutants *Infect. Immun.* **73**: 1820-1827.
- McGee, D.J., Radcliff, F.J., Mendz, G.L., Ferrero, R.L., and Mobley, H.L. (1999) *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity *J. Bacteriol.* **181**: 7314-7322.
- McGowan, C.C., Necheva, A., Thompson, S.A., Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1998) Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori* *Mol. Microbiol.* **30**: 19-31.
- Melchers, K., Herrmann, L., Mauch, F., Bayle, D., Heuermann, D., Weitzenegger, T., Schuhmacher, A., Sachs, G., Haas, R., Bode, G., Bensch, K., and Schafer, K.P. (1998) Properties and function of the P type ion pumps cloned from *Helicobacter pylori* [In Process Citation] *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **643:123-35**: 123-135.
- Menz, G.L., Hazell, S.L., and van Gorkom, L. (1994) Pyruvate metabolism in *Helicobacter pylori* *Arch. Microbiol.* **162**: 187-192.
- Midolo, P.D., Turnidge, J.D., Lambert, J.R., and Bell, J.M. (1996) Oxygen concentration influences proton pump inhibitor activity against *Helicobacter pylori* in vitro *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1531-1533.
- Milburn, M.V., Prive, G.G., Milligan, D.L., Scott, W.G., Yeh, J., Jancarik, J., Koshland, D.E., Jr., and Kim, S.H. (1991) Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand *Science* **254**: 1342-1347.
- Milligan, D.L., Koshland, D.E., Jr. (1988) Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis *J. Biol. Chem.* **263**: 6268-6275.
- Mitchell, H., Megraud, F. (2002) Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection *Helicobacter.* **7 Suppl 1**: 8-16.
- Mizoguchi, H., Fujioka, T., and Nasu, M. (1999) Evidence for viability of coccoid forms of *Helicobacter pylori* [In Process Citation] *J. Gastroenterol* **34 Suppl 11:32-6**: 32-36.
- Mizote, T., Yoshiyama, H., and Nakazawa, T. (1997) Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate *Infect Immun.* **65**: 1519-1521.
- Montrone, M., Eisenbach, M., Oesterheld, D., and Marwan, W. (1998) Regulation of switching frequency and bias of the bacterial flagellar motor by CheY and fumarate *J. Bacteriol.* **180**: 3375-3380.

- Morris, A., Nicholson, G. (1987) Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH *Am.J.Gastroenterol.* **82**: 192-199.
- Mouncey, N.J., Kaplan, S. (1998) Oxygen regulation of the *ccoN* gene encoding a component of the *ccb3* oxidase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: involvement of the FnrL protein *J.Bacteriol.* **180**: 2228-2231.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- Myllykallio, H., Liebl, U. (2000) Dual role for cytochrome *ccb3* oxidase in clinically relevant proteobacteria? *Trends Microbiol.* **8**: 542-543.
- Nagata, K., Nagata, Y., Sato, T., Fujino, M.A., Nakajima, K., and Tamura, T. (2003) L-Serine, D- and L-proline and alanine as respiratory substrates of *Helicobacter pylori*: correlation between in vitro and in vivo amino acid levels *Microbiology* **149**: 2023-2030.
- Nagata, K., Sone, N., and Tamura, T. (2001) Inhibitory activities of lansoprazole against respiration in *Helicobacter pylori* *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**: 1522-1527.
- Nagata, K., Tsukita, S., Tamura, T., and Sone, N. (1996) A cb-type cytochrome-c oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori* *Microbiology* **142**: 1757-1763.
- Nedenskov-Sorensen, P., Bukholm, G., and Bovre, K. (1990) Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori* [letter] *J.Infect.Dis.* **161**: 365-366.
- Needleman, S.B., Wunsch, C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins *J.Mol.Biol.* **48**: 443-453.
- Nichols, N.N., Harwood, C.S. (2000) An aerotaxis transducer gene from *Pseudomonas putida* *FEMS Microbiol.Lett.* **182**: 177-183.
- Niehus, E., Gressmann, H., Ye, F., Schlapbach, R., Dehio, M., Dehio, C., Stack, A., Meyer, T.F., Suerbaum, S., and Josenhans, C. (2004) Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori* *Mol.Microbiol.* **52**: 947-961.
- Nomura, A., Stemmermann, G.N., Chyou, P.H., Kato, I., Perez Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1991) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii *N.Engl.J.Med.* **325**: 1132-1136.
- Nowlin, D.M., Bollinger, J., and Hazelbauer, G.L. (1987) Sites of covalent modification in Trg, a sensory transducer of *Escherichia coli* *J.Biol.Chem.* **262**: 6039-6045.
- Odenbreit, S., Wieland, B., and Haas, R. (1996) Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain *J.Bacteriol.* **178**: 6960-6967.
- Oh, J.D., Kling-Backhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Cordum, H.S., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., Mardis, E.R., Engstrand, L.G., and Gordon, J.I. (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.
- Oh, J.I., Kaplan, S. (1999) The *ccb3* terminal oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: structural and functional implications for the regulation of spectral complex formation *Biochemistry* **38**: 2688-2696.
- Olson, J.W., Maier, R.J. (2002) Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori* *Science* **298**: 1788-1790.
- Olson, J.W., Mehta, N.S., and Maier, R.J. (2001) Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori* *Mol.Microbiol.* **39**: 176-182.
- Ottmann, K.M., Lowenthal, A.C. (2002) *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection *Infect.Immun.* **70**: 1984-1990.
- Otten, M.F., Stork, D.M., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V., and Van Spanning, R.J. (2001) Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans* *Eur.J.Biochem.* **268**: 2486-2497.
- Padan, E., Zilberstein, D., and Schuldiner, S. (1981) pH homeostasis in bacteria *Biochim.Biophys.Acta* **650**: 151-166.
- Pakula, A., Simon, M. (1992) Transmembrane signalling. Pivots or pistons? *Nature* **355**: 496-497.
- Park, S.Y., Borbat, P.P., Gonzalez-Bonet, G., Bhatnagar, J., Pollard, A.M., Freed, J.H., Bilwes, A.M., and Crane, B.R. (2006) Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly *Nat.Struct.Mol.Biol.* **13**: 400-407.
- Parkinson, J.S. (1976) *cheA*, *cheB*, and *cheC* genes of *Escherichia coli* and their role in chemotaxis *J.Bacteriol.* **126**: 758-770.
- Parkinson, J.S., Ames, P., and Studdert, C.A. (2005) Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors *Curr.Opin.Microbiol.* **8**: 116-121.

- Parkinson, J.S., Houts, S.E. (1982) Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions *J.Bacteriol.* **151**: 106-113.
- Parrish, J.R., Yu, J., Liu, G., Hines, J.A., Chan, J.E., Mangiola, B.A., Zhang, H., Pacifico, S., Fotouhi, F., DiRita, V.J., Ideker, T., Andrews, P., and Finley, R.L., Jr. (2007) A proteome-wide protein interaction map for *Campylobacter jejuni* *Genome Biol.* **8**: R130.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., and Sibley, R.K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma *N.Engl.J.Med.* **325**: 1127-1131.
- Pellequer, J.L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A., and Getzoff, E.D. (1998) Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 5884-5890.
- Perez, E., Stock, A.M. (2007) Characterization of the *Thermotoga maritima* chemotaxis methylation system that lacks pentapeptide-dependent methyltransferase CheR: MCP tethering *Mol.Microbiol.* **63**: 363-378.
- Pfeffer, W. (1884) Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize., pp. 363-462.
- Pflock, M., Dietz, P., Schar, J., and Beier, D. (2004) Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori* *FEMS Microbiol.Lett.* **234**: 51-61.
- Pflock, M., Finsterer, N., Joseph, B., Mollenkopf, H., Meyer, T.F., and Beier, D. (2006) Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation *J.Bacteriol.* **188**: 3449-3462.
- Pitcher, R.S., Brittain, T., and Watmough, N.J. (2002) Cytochrome *cbb(3)* oxidase and bacterial microaerobic metabolism *Biochem.Soc.Trans.* **30**: 653-658.
- Pitson, S.M., Mendz, G.L., Srinivasan, S., and Hazell, S.L. (1999) The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori* *Eur J Biochem* **260**: 258-267.
- Pittman, M.S., Goodwin, M., and Kelly, D.J. (2001) Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation *Microbiology* **147**: 2493-2504.
- Ponting, C.P., Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light *Curr.Biol.* **7**: R674-R677.
- Prasad, K., Caplan, S.R., and Eisenbach, M. (1998) Fumarate modulates bacterial flagellar rotation by lowering the free energy difference between the clockwise and counterclockwise states of the motor *J.Mol.Biol.* **280**: 821-828.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C.A., and Hennecke, H. (1996) A high-affinity *cbb3*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum* *J.Bacteriol.* **178**: 1532-1538.
- Pruss, B.M., Campbell, J.W., Van Dyk, T.K., Zhu, C., Kogan, Y., and Matsumura, P. (2003) FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer *J.Bacteriol.* **185**: 534-543.
- Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R.B., and Wikstrom, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli* *Biochemistry* **30**: 3936-3942.
- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Backert, S., and Meyer, T.F. (2000) *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components *Mol.Microbiol.* **37**: 1389-1404.
- Rao, C.V., Glekas, G.D., and Ordal, G.W. (2008) The three adaptation systems of *Bacillus subtilis* chemotaxis *Trends Microbiol.*
- Ray, A., Williams, H.D. (1997) The effects of mutation of the *anr* gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiol.Lett.* **156**: 227-232.
- Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., Fletcher, H.M., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (1997) The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 10541-10546.
- Rees, W.D., Botham, D., and Turnberg, L.A. (1982) A demonstration of bicarbonate production by the normal human stomach *in vivo* *Dig.Dis.Sci.* **27**: 961-966.
- Repaske, D.R., Adler, J. (1981) Change in intracellular pH of *Escherichia coli* mediates the chemotactic response to certain attractants and repellents *J.Bacteriol.* **145**: 1196-1208.
- Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Haznedar, J.O., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (2000) PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli* *Mol.Microbiol.* **36**: 806-816.
- Rollins, C., Dahlquist, F.W. (1981) The methyl-accepting chemotaxis proteins of *E. coli*: a repellent-stimulated, covalent modification, distinct from methylation *Cell* **25**: 333-340.
- Rosario, M.M., Fredrick, K.L., Ordal, G.W., and Helmann, J.D. (1994) Chemotaxis in *Bacillus subtilis* requires either of two functionally redundant CheW homologs *J.Bacteriol.* **176**: 2736-2739.

- Rust, M., Schweinitzer, T., and Josenhans, C. (2008) *Helicobacter* Flagella, Motility and Chemotaxis. In *Helicobacter pylori*. Yamaoka, Y. (ed). Norfolk: Caister Academic Press, pp. 61-86.
- Sachs, G., Wen, Y., and Scott, D.R. (2008) Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori*. Norfolk: Caister Academic Press, pp. 137-163.
- Salama, N.R., Shepherd, B., and Falkow, S. (2004) Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori* *J.Bacteriol.* **186**: 7926-7935.
- Sambrook, J., Russell, D.G. (2004) *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**: 5463-5467.
- Saunders, N.J., Peden, J.F., Hood, D.W., and Moxon, E.R. (1998) Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome *Mol.Microbiol.* **27**: 1091-1098.
- Schluter, A., Patschkowski, T., Quandt, J., Selinger, L.B., Weidner, S., Kramer, M., Zhou, L., Hynes, M.F., and Priefer, U.B. (1997) Functional and regulatory analysis of the two copies of the fixNOQP operon of Rhizobium leguminosarum strain VF39 *Mol.Plant Microbe.Interact.* **10**: 605-616.
- Schmitz, A., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (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**: 987-997.
- Schreiber, S., Bucker, R., Groll, C., Azevedo-Vethacke, M., Garten, D., Scheid, P., Friedrich, S., Gatermann, S., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2005) Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo *Infect.Immun.* **73**: 1584-1589.
- Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H.O., Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**: 5024-5029.
- Schreiber, S., Scheid, P. (1997) Gastric mucus of the guinea pig: proton carrier and diffusion barrier *Am.J.Physiol.* **272**: G63-G70.
- Schreiber, S., Stüben, M., Josenhans, C., Scheid, P., and Suerbaum, S. (1999) *In vivo* distribution of *Helicobacter felis* in the gastric mucus of the mouse: Experimental method and results *Infect.Immun.* **67**: 5151-5156.
- Schubert, M.L., Peura, D.A. (2008) Control of gastric acid secretion in health and disease *Gastroenterology* **134**: 1842-1860.
- Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., and Greenberg, E.P. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing *Mol.Microbiol.* **51**: 973-985.
- Schweinitzer, T., Mizote, T., Ishikawa, N., Dudnik, A., Inatsu, S., Schreiber, S., Suerbaum, S., Aizawa, S., and Josenhans, C. (2008) Functional characterization and mutagenesis of the proposed behavioral sensor TlpD of *Helicobacter pylori* *J.Bacteriol.* **190**: 3244-3255.
- Scott, D.R., Marcus, E.A., Weeks, D.L., and Sachs, G. (2002) Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori* *Gastroenterology* **123**: 187-195.
- Shimizu, N., Inada, K., Nakanishi, H., Tsukamoto, T., Ikehara, Y., Kaminishi, M., Kuramoto, S., Sugiyama, A., Katsuyama, T., and Tatematsu, M. (1999) *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens *Carcinogenesis* **20**: 669-676.
- Shioi, J., Taylor, B.L. (1984) Oxygen taxis and proton motive force in *Salmonella typhimurium* *J.Biol.Chem.* **259**: 10983-10988.
- Shiomi, D., Banno, S., Homma, M., and Kawagishi, I. (2005) Stabilization of polar localization of a chemoreceptor via its covalent modifications and its communication with a different chemoreceptor *J.Bacteriol.* **187**: 7647-7654.
- Smith, M.A., Finel, M., Korolik, V., and Mendz, G.L. (2000) Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* *Arch.Microbiol.* **174**: 1-10.
- Sourjik, V., Berg, H.C. (2000) Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions *Mol.Microbiol.* **37**: 740-751.
- Spiegelhalter, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E., and Kist, M. (1993) Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene *Infect Immun.* **61**: 5315-5325.
- Spohn, G., Scarlato, V. (1999) Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog *J Bacteriol.* **181**: 593-599.
- Springer, M.S., Goy, M.F., and Adler, J. (1979) Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction *Nature* **280**: 279-284.
- Springer, W.R., Koshland, D.E., Jr. (1977) Identification of a protein methyltransferase as the *cheR* gene product in the bacterial sensing system *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **74**: 533-537.

- St Maurice, M., Cremades, N., Croxen, M.A., Sisson, G., Sancho, J., and Hoffman, P.S. (2007) Flavodoxin:quinone reductase (FqrB): a redox partner of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase that reversibly couples pyruvate oxidation to NADPH production in *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* *J. Bacteriol.* **189**: 4764-4773.
- Stark, R.M., Suleiman, M.S., Hassan, I.J., Greenman, J., and Millar, M.R. (1997) Amino acid utilisation and deamination of glutamine and asparagine by *Helicobacter pylori* *J. Med. Microbiol.* **46**: 793-800.
- Stock, J.B., Koshland, D.E., Jr. (1978) A protein methyltransferase involved in bacterial sensing *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 3659-3663.
- Studdert, C.A., Parkinson, J.S. (2004) Crosslinking snapshots of bacterial chemoreceptor squads *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 2117-2122.
- Studdert, C.A., Parkinson, J.S. (2005) Insights into the organization and dynamics of bacterial chemoreceptor clusters through *in vivo* crosslinking studies *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 15623-15628.
- Suerbaum, S., Josenhans, C., Sterzenbach, T., Drescher, B., Brandt, P., Bell, M., Droege, M., Fartmann, B., Fischer, H.-P., Ge, Z., Hörster, A., Holland, R., Klein, K., König, J., Macko, L., Mendz, G.L., Nyakatura, G., Schauer, D.B., Shen, Z., Weber, J., Frosch, M., and Fox, J.G. (2003) The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 7901-7906.
- Suerbaum, S., Leying, H., Klemm, K., and Opferkuch, W. (1991) Antibacterial activity of pantoprazole and omeprazole against *Helicobacter pylori* *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 92-93.
- Suerbaum, S., Maynard Smith, J., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E., Dyrek, I., and Achtman, M. (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12619-12624.
- Szurmant, H., Ordal, G.W. (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 301-319.
- Talley, N.J., Ormand, J.E., Frie, C.A., and Zinsmeister, A.R. (1992) Stability of pH gradients *in vivo* across the stomach in *Helicobacter pylori* gastritis, dyspepsia, and health *Am. J. Gastroenterol.* **87**: 590-594.
- Talley, N.J., Zinsmeister, A.R., Weaver, A., DiMagno, E.P., Carpenter, H.A., Perez Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1991) Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 1734-1739.
- Tannaes, T., Dekker, N., Bukholm, G., Bijlsma, J.J., and Appelmek, B.J. (2001) Phase variation in the *Helicobacter pylori* phospholipase A gene and its role in acid adaptation *Infect. Immun.* **69**: 7334-7340.
- Taylor, B.L. (2007) Aer on the inside looking out: paradigm for a PAS-HAMP role in sensing oxygen, redox and energy *Mol. Microbiol.* **65**: 1415-1424.
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1998) In search of higher energy: metabolism-dependent behaviour in bacteria *Mol. Microbiol.* **28**: 683-690.
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 479-506.
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B., and Johnson, M.S. (1999) Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 103-128.
- Terry, K., Go, A.C., and Ottemann, K.M. (2006) Proteomic mapping of a suppressor of non-chemotactic *cheW* mutants reveals that *Helicobacter pylori* contains a new chemotaxis protein *Mol. Microbiol.* **61**: 871-882.
- Terry, K., Williams, S.M., Connolly, L., and Ottemann, K.M. (2005) Chemotaxis plays multiple roles during *Helicobacter pylori* animal infection *Infect. Immun.* **73**: 803-811.
- Terwilliger, T.C., Koshland, D.E., Jr. (1984) Sites of methyl esterification and deamination on the aspartate receptor involved in chemotaxis *J. Biol. Chem.* **259**: 7719-7725.
- Testerman, T.L., Conn, P.B., Mobley, H.L., and McGee, D.J. (2006) Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1650-1658.
- Teysse, S., Chari, S.T., Scheid, J., and Singer, M.V. (1995) Effect of repeated boluses of intravenous omeprazole and primed infusions of ranitidine on 24-hour intragastric pH in healthy human subjects *Dig. Dis. Sci.* **40**: 247-255.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobes *Bact. Rev.* **41**: 100-180.
- Thompson, S.A., Blaser, M.J. (1995) Isolation of the *Helicobacter pylori* recA gene and involvement of the recA region in resistance to low pH *Infect Immun.* **63**: 2185-2193.
- Toews, M.L., Goy, M.F., Springer, M.S., and Adler, J. (1979) Attractants and repellents control demethylation of methylated chemotaxis proteins in *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 5544-5548.
- Tokieda, M., Honda, S., Fujioka, T., and Nasu, M. (1999) Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in mongolian gerbils *Carcinogenesis* **20**: 1261-1266.

- Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M., and Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* *Nature* **388**: 539-547.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**: 4350-4354.
- Trumpower, B.L. (1990) Cytochrome *bc1* complexes of microorganisms *Microbiol.Rev.* **54**: 101-129.
- Tsang, N., Macnab, R., and Koshland, D.E., Jr. (1973) Common mechanism for repellents and attractants in bacterial chemotaxis *Science* **181**: 60-63.
- Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K., and Nakazawa, T. (1994) A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach *Infect.Immun.* **62**: 3586-3589.
- Tsukita, S., Koyanagi, S., Nagata, K., Koizuka, H., Akashi, H., Shimoyama, T., Tamura, T., and Sone, N. (1999) Characterization of a *cb*-type cytochrome *c* oxidase from *Helicobacter pylori* *J Biochem (Tokyo.)* **125**: 194-201.
- Umemura, T., Matsumoto, Y., Ohnishi, K., Homma, M., and Kawagishi, I. (2002) Sensing of cytoplasmic pH by bacterial chemoreceptors involves the linker region that connects the membrane-spanning and the signal-modulating helices *J.Biol.Chem.* **277**: 1593-1598.
- van Vliet, A.H., Stoof, J., Poppelaars, S.W., Bereswill, S., Homuth, G., Kist, M., Kuipers, E.J., and Kusters, J.G. (2003) Differential regulation of amidase- and formamidase-mediated ammonia production by the *Helicobacter pylori* fur repressor *J.Biol.Chem.* **278**: 9052-9057.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., and De Ley, J. (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.
- Vieira, J., Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers *Gene.* **19**: 259-268.
- Wadhams, G.H., Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**: 1024-1037.
- Wadhams, G.H., Martin, A.C., and Armitage, J.P. (2000) Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides* *Mol.Microbiol.* **36**: 1222-1233.
- Wadhams, G.H., Martin, A.C., Porter, S.L., Maddock, J.R., Mantotta, J.C., King, H.M., and Armitage, J.P. (2002) TlpC, a novel chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*, localizes to a discrete region in the cytoplasm *Mol.Microbiol.* **46**: 1211-1221.
- Wadhams, G.H., Warren, A.V., Martin, A.C., and Armitage, J.P. (2003) Targeting of two signal transduction pathways to different regions of the bacterial cell *Mol.Microbiol.* **50**: 763-770.
- Wagner, S., Beil, W., Westermann, J., Logan, R.P., Bock, C.T., Trautwein, C., Bleck, J.S., and Manns, M.P. (1997) Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis *Gastroenterology* **113**: 1836-1847.
- Wang, G., Alamuri, P., and Maier, R.J. (2006) The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori* *Mol.Microbiol.* **61**: 847-860.
- Wang, G., Maier, R.J. (2004) An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization *Infect.Immun.* **72**: 1391-1396.
- Wang, Y.L., Sheu, B.S., Yang, H.B., and Huang, A.H. (2001) A noninvasive *H. pylori* stool antigen assay to detect *H. pylori* infection of *in vivo* BALB/c mice models *Hepatogastroenterology* **48**: 724-726.
- Warren, J.R., Marshall, B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis *Lancet* **1**: 1273-1275.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., and Nakao, M. (1998) *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils *Gastroenterology* **115**: 642-648.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S., and Eisenbach, M. (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**: 8787-8791.
- Wen, Y., Feng, J., Scott, D.R., Marcus, E.A., and Sachs, G. (2008) The pH Responsive Regulon of HP0244 (FlgS), the Cytoplasmic Histidine Kinase of *Helicobacter pylori* *J.Bacteriol.*

- Wikstrom,M., Bogachev,A., Finel,M., Morgan,J.E., Puustinen,A., Raitio,M., Verkhovskaya,M., and Verkhovsky,M.I. (1994) Mechanism of proton translocation by the respiratory oxidases. The histidine cycle *Biochim.Biophys.Acta* **1187**: 106-111.
- Williams,S.M., Chen,Y.T., Andermann,T.M., Carter,J.E., McGee,D.J., and Ottemann,K.M. (2007) *Helicobacter pylori* chemotaxis modulates inflammation and bacterium-gastric epithelium interactions in infected mice *Infect.Immun.* **75**: 3747-3757.
- Wolfe,A.J., Berg,H.C. (1989) Migration of bacteria in semisolid agar *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **86**: 6973-6977.
- Worku,M.L., Karim,Q.N., Spencer,J., and Sidebotham,R.L. (2004) Chemotactic response of *Helicobacter pylori* to human plasma and bile *J.Med.Microbiol.* **53**: 807-811.
- Worku,M.L., Sidebotham,R.L., Baron,J.H., Misiewicz,J.J., Logan,R.P., Keshavarz,T., and Karim,Q.N. (1999) Motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment *Eur J Gastroenterol Hepatol* **11**: 1143-1150.
- Worthington,J.M., Fulghum,R.S. (1988) Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolian gerbil and the chinchilla *Appl.Environ.Microbiol.* **54**: 1210-1215.
- Wu,I.C., Wu,D.C., Lu,C.Y., Kuo,C.H., Su,Y.C., Yu,F.J., Lee,Y.C., Lin,S.R., Liu,C.S., Jan,C.M., and Wang,W.M. (2004) Comparison of serum and urine ELISA methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*-a prospective pilot study *Hepatogastroenterology* **51**: 1736-1741.
- Wu,J., Li,J., Li,G., Long,D.G., and Weis,R.M. (1996) The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation *Biochemistry* **35**: 4984-4993.
- Xiong,J., Kurtz,D.M., Jr., Ai,J., and Sanders-Loehr,J. (2000) A hemerythrin-like domain in a bacterial chemotaxis protein *Biochemistry* **39**: 5117-5125.
- Ye,F., Brauer,T., Niehus,E., Drlaca,K., Josenhans,C., and Suerbaum,S. (2007) Flagellar and global gene regulation in *Helicobacter pylori* modulated by changes in DNA supercoiling *Int.J.Med.Microbiol.* **1**: 1.
- Yu,H.S., Saw,J.H., Hou,S., Larsen,R.W., Watts,K.J., Johnson,M.S., Zimmer,M.A., Ordal,G.W., Taylor,B.L., and Alam,M. (2002) Aerotactic responses in bacteria to photoreleased oxygen *FEMS Microbiol.Lett.* **217**: 237-242.
- Zenner,L. (1999) Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection *Comp.Immunol Microbiol Infect Dis* **22**: 41-61.
- Zhulin,I.B., Taylor,B.L., and Dixon,R. (1997) PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox *Trends.Biochem.Sci.* **22**: 331-333.
- Zufferey,R., Preisig,O., Hennecke,H., and Thony-Meyer,L. (1996) Assembly and function of the cytochrome *cbb3* oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum* *J.Biol.Chem.* **271**: 9114-9119.

11 Anhang

11.1 Publikationen

Peer-reviewed

Schweinitzer, T., Mizote T, Ishikawa N, Inatsu S, Schreiber S, Aizawa S, Suerbaum S, Josenhans C. Functional characterization and mutagenesis of the proposed behavioral sensor TlpD of *Helicobacter pylori*. J. Bacteriol. 190(9):3244-55

Buchkapitel

Melanie Rust, Tobias Schweinitzer, Christine Josenhans. *Helicobacter pylori* Motility and Flagella. in *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Editor: Yoshio Yamaoka, Horizon Books (book chapter).

Präsentationen auf Tagungen

Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Inatsu S, Schreiber S, Aizawa S, Suerbaum S, Josenhans C. Functional characterization and mutagenesis of the behavioral sensor TlpD of *Helicobacter pylori*. BLAST IX, Laughlin, NV, USA, January 14-19, 2007 (poster presentation)

Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Aizawa S, Josenhans C. Characterization of a behavioral sensor, TlpD, in *Helicobacter pylori*. Jahrestagung der VAAM, April 1-4, 2007 (oral presentation)

Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Aizawa S, Josenhans C. Characterization of a behavioral sensor, TlpD, in *Helicobacter pylori*. 2nd Student's Meeting of the "EuroPathoGenomics Graduate Academy", Celakovice, CZ, June 16-19, 2007 (oral presentation)

Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Aizawa S, Josenhans C. Characterization of a behavioral sensor, TlpD, in *Helicobacter pylori*. EHSW Workshop Istanbul, Sept 20-23, 2007, (poster presentation)

Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Aizawa S, Josenhans C. Characterization of a behavioral sensor, TlpD, in *Helicobacter pylori*. 6. *Helicobacter pylori* Workshop, Hersching, October 26-28, 2007 (oral presentation)

11.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Peter Hans Schweinitzer
Anschrift: De-Haën-Platz 9
 30163 Hannover

Geboren: 03. April 1979 in München
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

Grundschule Olching
 Gymnasium Olching

Schulabschluss: Abitur

Hochschulstudium

1998-2000	Grundstudium der Biologie (TU München) Notendurchschnitt: Gut
2000-2003	Hauptstudium Hauptfach: Technische Biologie (TU München) Nebenfächer: Mikrobiologie (TU München) Neurobiologie (LMU München) Biophysik (TU München)
2003 -2004	Diplomarbeit (Universität Wien) „Untersuchungen eines putativen Hämolytins eines chlamydienähnlichen Endosymbionten freilebender Amöben“ Notendurchschnitt: Gut

Promotion

Seit 2004	Promotion im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, AG Josenhans „Beschreibung der Energietaxis in <i>Helicobacter pylori</i> und die Rolle der Chemosensoren“
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

11.3 Erklärung

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Beschreibung der Energetaxis in *Helicobacter pylori* und die Rolle der Chemosensoren“ 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

Tobias Schweinitzer

11.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christine Josenhans für die Überlassung des interessanten Themas, die anregenden Diskussionen, das stete Interesse an meiner Arbeit und die tatkräftige Unterstützung. Auch möchte ich mich herzlich bedanken für die Möglichkeiten, im Laufe der Arbeit auf internationalen Kongressen meine Arbeit präsentieren zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Sebastian Suerbaum bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und den hilfreichen Diskussionen.

Bei Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Prof. Dr. G.-F. Gerlach und Dr. Falk Büttner aus der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Dr. Andre Bleich und Anna Smoczek aus dem ZTL der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die Hilfe bei der Etablierung der Tierversuche.

Bei unseren Kooperationspartnern P.D. Dr. Sören Schreiber aus Bochum, Prof. Dr. Tomoko Mizote aus Yamaguchi (Japan) und Prof. Dr. Barry Taylor sowie Prof. Dr. Mark Johnson aus Loma Linda (USA) möchte ich mich für die steten hilfreichen Diskussionen, welche diese Arbeit begleiteten, bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Birgit Brenneke, Friederike Kops, Daniela Göppel, Alexey Dudnik und Claudia Nauznikov für praktische Mitarbeit an meiner Arbeit.

Als assoziiertes Mitglied danke ich auch dem DFG-Graduiertenkolleg 745 „Mukosale Erreger-Wirt-Interaktionen“ der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Sprecher: Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand), an dessen Programm ich während der Durchführung meiner Arbeit teilnehmen durfte.

Großer Dank gilt auch meinen Korrekturlesern Sophie Borchert und Melanie Rust.

Allen anderen Mitgliedern der *Helicobacter*-Gruppen danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Stellvertretend für die Freunde seien hier Oliver Demant, Daniel Klug, Dominique Gütle und Nicole Krüger genannt, die jeweils auf ihre eigene Weise eine persönliche Stütze für die Durchführung dieser Arbeit bildeten.

Schließlich danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die immer an mich und an diese Arbeit geglaubt haben.