

**Identifikation neuer Mechanismen
der Metallhomöostase des Magenbakteriums
*Helicobacter pylori***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte
DISSERTATION

von
Diplom-Biologin
Barbara Waidner

aus
Malsch

2003

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.03

Referent: Prof. Dr. W. Zumft
Koreferent: PD Dr. S. Bereswill

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1. Mikrobiologie von <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.2. Pathologie und Epidemiologie.....	4
1.3. Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren.....	4
1.3.1 Die Urease.....	5
1.3.2. Motilität und Adhärenz	8
1.3.3 Das Vakuolisierendes Zytotoxin	9
1.3.4 Die <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel	10
1.4. Die Therapie der <i>H. pylori</i> -Infektion.....	11
1.5. Der Metallstoffwechsel von Bakterien	13
1.5.1. Der Eisenstoffwechsel	16
1.5.2. Der Kupferstoffwechsel.....	20
1.5.3. Der Metallstoffwechsel in <i>H. pylori</i>	21
1.6. Zielsetzung der Arbeit	24
2. Material	25
2.1. Chemikalien.....	25
2.2. Kits.....	26
2.3. Geräte und Verbrauchsmaterial	26
2.4. Software.....	27
2.5. Enzyme	27
2.6. Puffer und Nährmedien	27
2.6.1. Lösungen und Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien	27
2.6.1.1. Antibiotika-Stammlösungen.....	27
2.6.1.2. Nährmedien	27
2.6.1.3. Stammlösungen der Metal- und anderer Ionen	28
2.6.2. Lösungen und Puffer für die DNA-Analyse	28
2.6.2.1. Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....	28
2.6.2.2. Lösungen zur Hybridisierung von Makroarrays	29
2.6.2.3. Puffer für PCR, DNA-Ligation und DNA-Restriktion	29
2.6.2.4. Puffer für die Plasmidpräparation	29
2.6.3. Lösungen und Puffer für die RNA-Analyse	30

2.6.3.1. Puffer für den Northern Blot	30
2.6.3.2. Puffer für RNA-Präparationen und RNA-Gelelektrophorese	30
2.6.4. Lösungen und Puffer für die Protein-Analyse	30
2.6.4.1. Lösungen zur Aufreinigung rekombinanter Proteine	30
2.6.4.2. Lösungen für den CAT-ELISA	31
2.6.4.3. Lösungen für die Durchführung der Westernblot-Analysen	31
2.6.4.4. Lösungen für die isoelektrische Fokussierung	31
2.6.4.5. Lösungen für die Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.6.4.6. Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.6.4.7. Lösungen für die Proteinfärbungen	32
2.6.4.8. Lösungen für die Ureasebestimmung	33
2.6.5. Lösungen und Puffer für die DNA-Protein-Interaktion (EMSA)	33
2.7. Verzeichnis der Antiseren	33
2.8. Verzeichnis der Bakterienstämme und Plasmide	34
2.9. Verzeichnis der Oligonukleotide	38
3. Methoden	40
3.1. Kultivierung von Bakterien	40
3.1.1. Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	40
3.1.2. Kultivierung und Lagerung von <i>Helicobacter pylori</i>	40
3.2. Methoden zur DNA-Analyse	41
3.2.1. PCR-Technik	41
3.2.1.1. Allgemeine Reaktionsparameter für die PCR	42
3.2.1.2. Crossover-PCR	42
3.2.1.3. Aufreinigung von PCR-Produkten und Elution von DNA aus Agarose	44
3.2.2. DNA-Sequenzierung nach Sanger	45
3.2.3. Arbeiten mit rekombinanter Plasmid-DNA	46
3.2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	46
3.2.3.2. Restriktion von Plasmid-DNA	46
3.2.3.3. Agarose Gelelektrophorese	46
3.2.3.4. Ligation von Plasmid-DNA	47
3.2.3.5. Herstellung Calcium-kompetenter Zellen	47
3.2.3.6. Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	47

3.2.3.7. Minipräparation von Plasmid-DNA durch Anionenaustauscher-Chromatographie.....	47
3.2.4. Herstellung isogener Mutanten in <i>H. pylori</i>	48
3.2.4.1. Natürliche Transformation von <i>H. pylori</i>	48
3.2.4.2. Elektroporation von <i>H. pylori</i>	48
3.2.5. DNA-Makroarray-Technik	49
3.2.5.1. cDNA-Synthese.....	49
3.2.5.2. Bestimmung der radioaktiven Einbaurate	50
3.2.5.3. Hybridisierung des DNA-Makroarrays.....	50
3.2.5.4. Entfernen der Target-cDNA vom DNA-Makroarray (Stripping) ..	51
3.3. Methoden zur RNA-Analyse	51
3.3.1. Isolierung von RNA aus <i>H. pylori</i>	51
3.3.1.1. Präparation von RNA	51
3.3.1.2. Bestimmung der RNA-Menge durch Absorption	52
3.3.1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA.....	52
3.3.2. RNA-Nachweis.....	52
3.3.2.1. Herstellung von RNA-Sonden.....	52
3.3.2.2. Northern Blot-Analysen	53
3.4. Methoden zur Protein-Analyse.....	54
3.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration	54
3.4.2. Proteinanalyse mit der 2D-Gelelektrophorese.....	54
3.4.2.1. Die Isoelektrische Fokussierung von Proteinen (IEF)	55
3.4.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von isoelektrisch fokussierten Proteinen.....	55
3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen.....	55
3.4.4. Proteinfärbung	56
3.4.4.1. Coomassiefärbung von Proteinen.....	56
3.4.4.2. Silberfärbung von Proteinen.....	56
3.4.5. Western Blot-Analyse von Proteinen	57
3.4.6. Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine	57
3.4.6.1. Klonierung der kodierenden Genregion in Expressionsvektoren ..	57
3.4.6.2. Reinigung von rekombinanten Proteinen	58
3.4.6.3. Proteinexpression in <i>E. coli</i>	58
3.4.6.4. Lyse und Aufbereitung des Zellextraktes.....	59

3.4.6.5. Reinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie mit Streptavidin.....	59
3.4.6.6. Reinigung und Aufschluss von Einschlusskörperchens.....	59
3.4.8. Bestimmung der Urease-Aktivität	60
3.4.9. Cat-ELISA-Technik.....	61
3.5. Protein-DNA Interaktionen	62
3.5.1. „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA)	62
3.5.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	62
4. Ergebnisse	64
4.1. Untersuchungen zur Bedeutung der bakteriellen Eisenspeicherung für die Adaptation an das Habitat Magen	64
4.1.1. Einfluss der Ferritin-Mutation auf das Kolonisierungsverhalten im Tiermodell	64
4.1.2. Die Ferritin-vermittelte Eisenspeicherung schützt <i>H. pylori</i> vor Säurevermittelter Eisentoxizität.....	65
4.1.3. Einfluss von Eisen auf die Fur-Bindung am Pfr-Promotor.....	66
4.2. Genomweite Analyse der Eisenregulation in <i>H. pylori</i> - das Fur-Regulon.....	68
4.3. Einfluss von Säure auf die Regulation der Ferritinbiosynthese	71
4.4. Einfluss von Eisen auf die Transkriptionelle Organisation und Regulation des Urease-Operons in <i>H. pylori</i>	73
4.4.1. Transkriptionsanalyse des Urease-Operons.....	73
4.4.2. Einfluss von Eisen auf die Transkription der Ureasegene.....	74
4.4.3. Einfluss des Regulatorproteins Fur auf die Induktion der Urease-Transkription durch Eisenmangel.....	75
4.4.4. Auswirkung von Eisenmangel auf die Produktion der Urease-Untereinheiten	75
4.4.5. Einfluss von Eisenmangel auf die Ureaseaktivität	76
4.4.6. Einfluss anderer Metalle auf die Ureasetranskription	78
4.4.7. Einfluss des Regulatorproteins Fur auf die Nickelinduktion der Urease ...	78
4.4.8. Einfluss von Nickel auf die Proteinexpression der Urease.....	79
4.4.9. Einfluss von Nickel auf die Ureaseaktivität	80
4.5. Identifikation neuer Mechanismen der Kupfer-Homöostase in <i>H. pylori</i>	81
4.5.1 Identifikation der durch Kupfer regulierten Gene von <i>H. pylori</i>	81
4.5.2. Vergleichende Datenbank-Analyse des HP1326-HP1329-Operons	83

4.5.3. Transkriptionelle Analyse der HP1326-Genregion	83
4.5.4. Mutationsanalyse der Gene HP1326 bis HP1329.....	87
4.5.5. Funktionen der Gene HP1326, -27 und 28 in der Kupfer-Homöostase.....	88
4.5.6. Einfluss der HP1326, -27 und -28-Mutation auf die zytoplasmatische Kupfer-Konzentration	89
4.5.7. Einfluss der Gene HP1326, -27 und 28 auf den Stoffwechsel anderer Metalle	92
4.5.7.1. Einfluss auf den Eisenstoffwechsel.....	92
4.5.7.2. Einfluss der HP1326, -27 und -28 Mutationen auf den Nickel- stoffwechsel.....	93
4.5.7.3. Expression der Gene HP1326-28 in <i>E. coli</i>	95
4.5.7.4. Einfluss der Gene HP1326, -27 und 28 auf den Zink-, Cadmium- und Kobaltstoffwechsel.....	97
4.5.8. Einfluss der HP1326-28 Mutationen auf den Säurehaushalt.....	98
4.5.9. Einfluss der HP1326-28 Mutationen auf den Harnstoff und Ammonium- Stoffwechsel	99
4.5.10. Identifikation des Kupferregulators CopR (HP1365).....	101
4.5.11. Analyse der HP1365-Bindung an den Promotor des HP1326-Gens	104
4.5.12. Einfluss der HP1326-28 Exportes und der Regulatorproteine auf die Wismuth-Resistenz	106
4.5.13. Transkriptionelle Analyse von HP1428.....	107
5. Diskussion	107
5.1. Die Analyse des Eisenstoffwechsels	108
5.2. Die Analyse des Kupferstoffwechsels.....	114
6. Zusammenfassung	119
7. Literatur	121
7.1. Publikationen aus dieser Arbeit.....	138
7.2. Posterpräsentationen aus dieser Arbeit.....	138
8. Anhang	140
8.1. Transposon-Shuttle-Vektor pTnMax5	140
8.2. Klonierungsvektor pZErO™-2	141
8.2.1. Vektor pHP1326CAT	142
8.2.2. Vektor pHP1327PCAT	143
8.2.3. Vektor pHP1328PCAT	144

8.2.4. Vektor pHP1329PCAT	145
8.2.5. Vektor pHspRPCAT	146
8.2.6. Vektor pHP1364PCAT	147
8.2.7. Vektor pHP1365PCAT	148
8.3. Expressionsvektor pASKIBA-7 TM	149
8.3.1. Vektor pASK7-FUR	150
8.4. Expressionsvektor pASKIBA-3 TM	151
8.4.1. Vektor pASK-1326	152
8.4.2. Vektor pASK-1327	153
8.4.3. Vektor pASK-1328	154
8.4.4. Vektor pASK-1365	155

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Aufgrund des sauren pH-Werts galt der Magen lange Zeit als steriles Organ und schien als Habitat für Mikroorganismen auszuseiden. Der Beschreibung von Bakterien im menschlichen Magen schon vor ca. 100 Jahren wurde daher keine Bedeutung beigemessen [45]. Eine Änderung der gängigen Lehrmeinung fand erst 1982 mit erfolgreicher Anzucht von *Helicobacter pylori* aus Magenbiopsien durch Marshall & Warren [282] statt. Die zunächst noch als *Campylobacter pyloridis* bezeichneten Bakterien lieferten die Grundlage für eine enorme Forschungstätigkeit und wurden aufgrund ihrer charakteristischen Fettsäurezusammensetzung schließlich im Jahre 1989 der neuen Gattung *Helicobacter* zugeordnet [104]. Mit der Entdeckung des Zusammenhangs der *H. pylori*-Infektion mit der chronischen Typ B-Gastritis [44] und der peptischen Ulkuskrankheit [42] richtete sich weltweites Interesse auf das Bakterium und im Laufe der Zeit wurde dadurch das Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen revolutioniert. Nachdem weitere Erkrankungen wie Magenkarzinom [92, 204] und MALT-Lymphom [24] als mit der *H. pylori*-Infektion assoziiert erkannt wurden, gehört *H. pylori* heute zu den meist untersuchten Krankheitserregern weltweit.

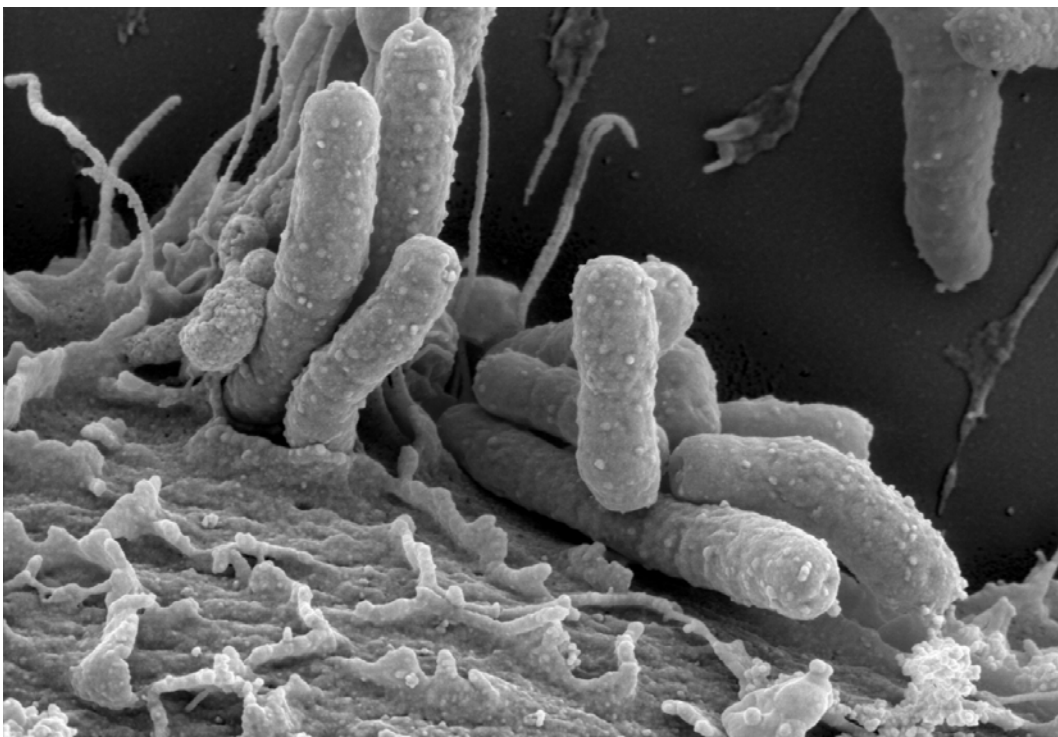


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung von *H. pylori*. Anheftung von *H. pylori* auf der Oberfläche einer Wirtszelle. Die typische Spiralform ist bei einigen Zellen gut zu erkennen. Das Bild wurde freundlicherweise von Prof. Rainer Haas (Max-von-Pettenkofer-Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, München) zur Verfügung gestellt.

1.1 Mikrobiologie von *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, gebogenes oder spiraliges stäbchenförmiges Bakterium (Abb. 1). Die Zellen sind 2.5 bis 5 µm lang und bis zu 1 µm breit [282]. Morphologisch charakteristisch ist ein unipolares Bündel von 4 bis 6 Flagellen, die von einer säurefesten Phospholipiddoppelschicht umgeben sind und sich am Ende bläschenförmig erweitern [248]. Der Magen des Menschen stellt den natürlichen Lebensraum der Bakterien dar. Die Bakterien kolonisieren die Magenschleimhaut und leben in engem Kontakt mit den Epithelzellen. Die Besiedelung ist wirtsspezifisch. Für die Identifizierung von *H. pylori* werden biochemische Schlüsselmerkmale wie die Produktion von Katalase, Cytochromoxidase, γ -Glutamyl-Aminopeptidase und Urease sowie die strikt mikroaerophile Lebensweise herangezogen. Hippurat-Hydrolyse und Nitratreduktion fehlen. Das Bakterium zeigt eine natürliche Resistenz gegen Nalidixinsäure [80] und stellt hohe Ansprüche an die Bedingungen der kulturellen Anzucht. Optimales Wachstum bei 37 °C *in vitro* erfordert komplexe Vollmedien mit Blut oder Serum und eine mikroaerobe Atmosphäre mit einer maximalen Sauerstoffkonzentration von sechs Prozent [105, 106]. Unter ungünstigen Wachstumsbedingungen kommt es zur Ausbildung rundlicher kokkoider Formen, deren biologische Funktion noch ungeklärt ist [43, 143]. *H. pylori* unterscheidet sich in seinen Eigenschaften markant von allen bekannten Bakteriengattungen und wurde unter Berücksichtigung der Ultrastruktur, der zellulären Fettsäurezusammensetzung, der biochemischen Merkmale, sowie der 16S rRNS Sequenzanalysen [220] im Jahre 1989 der neu begründeten Gattung *Helicobacter* zugeordnet [104]. Neben *H. pylori* umfasst das Genus *Helicobacter* weitere Bakterienarten mit wesentlichen biochemischen und morphologischen Unterschieden, die Magen und Darm (Tab. 1) verschiedener Wirbeltiere kolonisieren und sich alle durch eine hohe Wirtsspezifität auszeichnen. Für den Menschen ist neben *H. pylori* auch das Vorkommen von *H. heilmannii* im Magen beschrieben worden. Wie *H. pylori* verursacht *H. heilmannii* eine Gastritis jedoch in milderem Ausmaß und scheint ebenfalls mit MALT-Lymphomen assoziiert zu sein. Dieser Keim ist jedoch mit einer Prävalenz von nur 0.5 % eher selten [250]. Die Entschlüsselung der Gesamtgenomsequenz des *H. pylori*-Stammes 26695 durch das amerikanische "Technical Institute of Genomic Research" (TIGR, Maryland) bestätigte den geringen GC-Gehalt (37 %) der bakteriellen DNA. Die Größe des zirkulären Chromosoms beträgt im Falle des Stammes 26695 im Gesamten 1667876 Basenpaare und kodiert für ungefähr 1500 Proteine. Die DNA der *H. pylori*-Population ist sehr heterogen [163]. Sowohl Sequenz als auch Anordnung der Gene [130] weisen stammabhängige Polymorphismen [253, 254] auf. Dies wurde durch die Sequenzierung des Genoms eines

weiteren Stammes (J99) bestätigt [4]. Zudem können viele *H. pylori*-Stämme Kopien der Insertionselemente IS605 und IS606 und bis zu fünf so genannte Plastizitätszonen mit zum restlichen Chromosom unterschiedlichem GC-Gehalt (33-42 %) enthalten [256, 125], welche zur hohen genetischen Variabilität des Bakteriums beitragen. Es wird spekuliert, ob diese Zonen durch horizontalen Gentransfer zustande gekommen sind. Etwa die Hälfte aller *H. pylori*-Stämme besitzt kryptische Plasmide mit einer Größe von 2 bis ca. 100 kb [209, 124, 138, 170]. Einige dieser Plasmide scheinen die Fähigkeit zu besitzen sich selbst in das Chromosom zu integrieren oder ganze funktionelle Bereiche daraus zu entfernen [125] und stellen daher einen Mechanismus zur genetischen Rekombination dar.

Tab. 1: Die Bakterienarten der Gattung *Helicobacter*

Lebensraum	<i>Helicobacter</i> -Art	Wirtsspektrum
Magen	<i>Acinonychis</i>	Gepard
	<i>Aurati</i>	Hamster
	<i>Bizzozeroni</i>	Hund
	<i>Felis</i>	Katze, Hund, Maus
	<i>Heilmanii</i>	Mensch, versch. Säugetiere
	<i>Mustelae</i>	Frettchen
	<i>Nemestrinae</i>	Macacus-Affen
	<i>pylori</i>	Mensch
Darm	<i>bilis</i>	Maus
	<i>canadensis</i>	Mensch
	<i>canis</i>	Hund
	<i>cholecystus</i>	Hamster
	<i>cinaedi</i>	Mensch, Hamster
	<i>fennelliae</i>	Mensch
	<i>ganmani</i>	Maus
	<i>hepaticus</i>	Maus
	<i>muridarum</i>	Maus, Ratte
	<i>pametensis</i>	Seemöwe
	<i>pullorum</i>	Mensch, Geflügel
	<i>rappini</i>	Mensch, Hund
	<i>rodentium</i>	Maus
	<i>salmonis</i>	Maus
	<i>suncus</i>	Spitzmaus
	<i>trogotum</i>	Ratte
<i>westmaedi</i>	Maus	
<i>winghamesis</i>	Mensch	

aktualisiert nach [34, 35, 160]

1.2. Pathologie und Epidemiologie

Die Besiedelung der Magenschleimhaut mit *H. pylori* verursacht die chronisch aktive Gastritis vom Typ B (bakteriell-infektiös) [17, 162, 178]. Durch Infiltration der Magenschleimhaut mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen bzw. neutrophilen Granulozyten ist die Entzündung sowohl chronisch als auch aktiv [120]. Sie ist an der Entstehung von Folgekrankheiten wie Duodenal- oder Magengeschwüren [179, 239], MALT-Lymphom [73] und Magenkarzinom [180] ursächlich beteiligt. So findet man zum Beispiel beim Duodenalgeschwür eine 90 %ige Korrelation zur *H. pylori*-Infektion, beim Magengeschwür tritt sie in 63 % der Fälle auf, eine TypB-Gastritis ist in 78 % der *H. pylori*-Infektionen zu finden und das Magenkarzinom ist zu 52 % mit der Erkrankung assoziiert [53]. Das Ausmaß der entzündlichen Reaktion ist von den Virulenzfaktoren des jeweiligen *H. pylori*-Stammes und von den Immunreaktionen des Wirts abhängig. Die *H. pylori*-Infektion kommt weltweit vor und zählt zu den häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Nach der Infektion, die meist im Kindesalter erworben wird, persistieren die Bakterien lebenslang im Magen. Etwa 60 % der Weltbevölkerung sind infiziert [54]. Die Durchseuchung liegt in Industrieländern bei ca. 30 %. In Entwicklungsländern sind fast 90 % der Bevölkerung betroffen und die Durchseuchung setzt dort im Lebensalter deutlich früher ein [203, 211]. In Industrieländern steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter an, was mit dem sog. Kohorteneffekt erklärt wird [18]. Der Durchseuchungsgrad regional begrenzter geographischer Populationen wird von den Lebensbedingungen entscheidend beeinflusst. Als gesicherte Risikofaktoren gelten niedriger sozioökonomischer Status, mangelhafte hygienische Bedingungen, enge Wohnverhältnisse und Kinderreichtum [47, 284]. Wichtigstes Erregerreservoir ist der Mensch. Da Infektionen in Familien gehäuft auftreten, ist eine ausschließliche Übertragung von Mensch zu Mensch wahrscheinlich [157]. Neueren Untersuchungen zufolge handelt es sich um einen oralen Übertragungsmodus [89, 221].

1.3 Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren

Krankheitserreger besitzen die Eigenschaft sich trotz der Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus zu vermehren. Biologische Systeme, die dieses Verhalten ermöglichen bzw. erleichtern, bezeichnet man als Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren. Die Magenschleimhaut des Menschen verfügt über sehr effiziente Mechanismen zur Verhinderung einer bakteriellen Besiedelung und nur *H. pylori* und *H. heilmannii* besitzen die Fähigkeit, diese äußerst lebensfeindliche ökologische Nische zu besiedeln. Die wichtigsten Pathogenitäts- und

Virulenzfaktoren von *H. pylori* sind in Tabelle 2 im Überblick dargestellt, die bedeutsamsten werden im Folgenden kurz erläutert.

Tabelle 2: Übersicht über Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*

Virulenzfaktor	Beteiligte Gene	Funktion der kodierten Proteine
Urease [80, 78, 172]	<i>ureA, ureB</i> <i>ureI</i> <i>ureE, ureF</i> <i>ureH, hspA</i>	Harnstoffspaltung, Pufferung der Magensäure Harnstoff-Transport-Protein Akzessorische Funktionen bei der Synthese des nativen Urease-Enzyms und dem Einbau des Nickel-Kofaktors ins aktive Zentrum.
	<i>nixA</i>	Nickel-Transport in die Zelle
Motilität [112, 248]	<i>flaA, flaB</i> <i>flgE</i> <i>flbA</i> <i>fliI</i>	Strukturproteine des Flagellenfilaments Flagellen-Hakenprotein Koordination der Flagellensynthese Transport der Strukturproteine
Zytotoxin [63, 64, 202, 210, 216, 229, 257]	<i>vacA</i>	Vakuolisierung und Destruktion von Wirtszellen
Immunstimulation [55, 65, 66]	Gene der Pathogenitätsinsel	TypIV Sekretionssystem Induktion der Cytokinsynthese in Magenepithelzellen;
Superoxid-Dismutase [240] Katalase [193]	<i>sodB</i> <i>katA</i>	Inaktivierung von Sauerstoff-Radikalen
Mimikry [10]	<i>galE</i> Fucosyltransferasen	Synthese von Lewis x- und y-identischen Oligosaccharidseitenketten im <i>H. pylori</i> -LPS
Adhäsion [148, 152] [85, 155]	<i>alpA/B, babA-2,</i> <i>hpaA, sabA</i>	Bindung an Oberflächenstrukturen von Wirtszellen

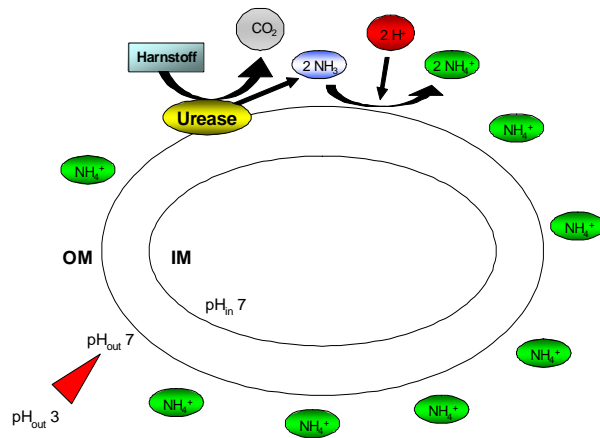
(modifiziert nach [33, 34, 35])

1.3.1. Die Urease

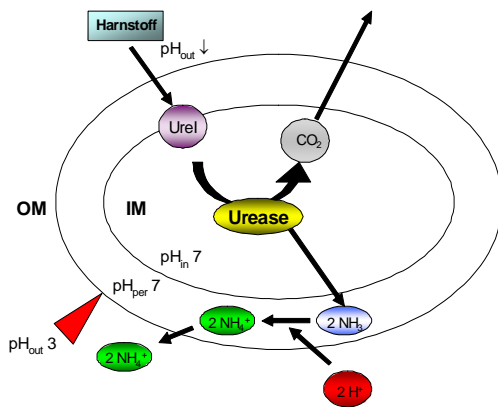
Eine der charakteristischsten Eigenschaften von *H. pylori* ist die Produktion des Enzyms Urease, das für das Überleben des Bakteriums im Magen und die Pathogenese essentiell ist. Die Urease (Urea-Amidohydrolase) katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak

und Kohlendioxid und macht ca. 6-10 % des *H. pylori* Gesamtzellproteins aus. Die Protonierung des Ammoniaks zu Ammoniumionen verleiht dem Bakterium durch der damit verbundenen Neutralisierung der Mikroumgebung Säureresistenz. Das native Urease-Protein ist ein 550 Kilodalton (kDa) großes Multimer, bestehend aus jeweils sechs Dimeren einer schweren (60-62 kDa) Untereinheit UreB und einer leichten (27-30 kDa) Untereinheit UreA, die in einem molaren Verhältnis von 1:1 vorliegen [76]. Mit einem K_m -Wert für Harnstoff von 0.2-0.5 mM [127] ist die *H. pylori*-Urease an die normalerweise vorherrschenden geringen Harnstoff-Konzentrationen im Magen (weniger als 10 mM) optimal angepasst. Eine Analyse der Kristallstruktur der *H. pylori*-Urease ergab, dass die zwölf katalytischen Untereinheiten ein Gewicht von 1.1 MDa besitzen. Der äußere Durchmesser der Urease beträgt ungefähr 160 Å [111]. Das komplette Molekül enthält 12 Nickelatome, welche für die Aktivität des Enzyms essentiell sind. Jeweils zwei Nickelionen, die durch das hochaffine Nickel-Aufnahmesystem NixA in die Zelle transportiert werden, sind im aktiven Zentrum der UreB-Untereinheiten gebunden. Das erste Nickelion ist an zwei Histidinreste, das zweite ebenfalls an zwei Histidinliganden und an einen Aspartatsäurerest gebunden. Beide Nickelzentren sind über Carbamate miteinander verbunden [161]. Die Anwesenheit von NixA, das den Ni^{2+} -Transport auch bei niedrigen Nickelkonzentrationen sicherstellt, ist für die volle Ureaseaktivität notwendig [20]. Die Urease ist aufgrund der Bildung des alkalisierenden Ammoniaks für die Kolonisierung der Magenschleimhaut unbedingt erforderlich. Da Urease-negative Mutanten aber auch im Tiermodell bei medikamentös neutralisiertem Magen-pH-Wert nicht zur Kolonisierung der Schleimhaut fähig waren [77], werden weitere pathogenetisch relevante Funktionen der Urease angenommen [136, 289, 82]. Dabei werden sowohl zytotoxische Wirkungen als auch immunmodulatorische Funktionen diskutiert [249]. Im Hinblick auf die pH-Wert-Regulation in der sauren Umgebung des Bakteriums ging man ursprünglich davon aus, dass die Urease ausschließlich an der Zelloberfläche gebunden vorkommt (Abb. 2a) und Harnstoff außerhalb der Zelle spaltet. *H. pylori* wäre somit in der Lage sich durch die Freisetzung des Ammoniaks, der zu Ammoniumionen protoniert wird, eine neutralisierende Mikroumgebung zu schaffen [233, 238, 176]. Im Jahr 1998 wurde festgestellt, dass die Urease auch im Zytoplasma vorkommt und Harnstoff im Innenraum des Bakteriums gespalten wird. Der Harnstoff erreicht den Innenraum über das UreI-Transportsystem [230], das durch Säure geöffnet wird. Der dabei im Zytoplasma entstehende Ammoniak diffundiert in den periplasmatischen Raum und hält dort den pH-Wert neutral (Abb. 2b).

A



B



C

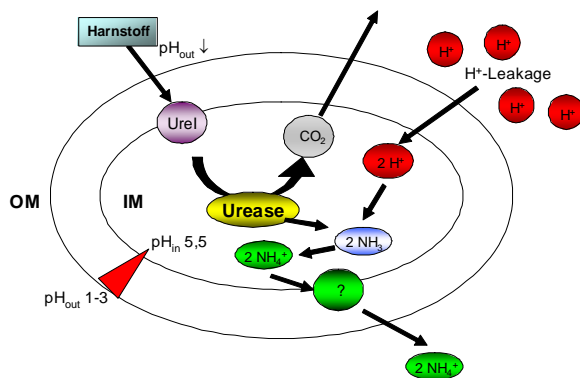


Abb 2. Modelle für die Säure-Regulation durch die Urease. Schematische Darstellungen der Zelle von *H. pylori*. Weitere Erläuterungen finden sich im Text. Das Enzym Urease ist gelb markiert. Katalysierte Reaktionen und Bewegungsrichtungen sind durch schwarze Pfeile dargestellt. Ammoniumionen sind grün, Protonen rot und neutrale Elemente blau unterlegt. OM, äußere Membran; IM, Zytoplasmamembran [243].

In einem neueren Modell fängt der durch die zytoplasmatische Ureaseaktivität entstehende Ammoniak Protonen ab, welche bei extrem niedrigen externen pH-Werten durch die Zellmembranen ins Zytoplasma diffundieren können (sog. Protonen-„Leakage“). Die dort gebildeten Ammoniumionen werden dann durch einen hypothetischen, noch nicht identifizierten Transporter aus der Zelle geschleust und erzeugen dadurch pH-Neutralität im Zytoplasma, auch wenn der extreme pH-Wert niedriger als 3 ist (Abb. 2c) [28, 243].

Die Gene für die beiden Urease-Untereinheiten Ure A und UreB bilden zusammen mit den Genen für die akzessorischen Urease-Proteine ein Gencluster, das aus insgesamt sieben Genen besteht. Die Gene *ureA* und *ureB* kodieren für die Strukturproteine, die Gene *ureE*, *ureF*, *ureG* und *ureH* für akzessorische Proteine der Ureasesynthese. Das *ureI* Gen kodiert für den durch Säure aktivierten Harnstofftransporter [235, 285]. Die akzessorischen Ure E-, F-, G- und H-Proteine katalysieren die Reifung der nativen Urease und den Einbau der Nickelionen in die UreB-Untereinheit. Auch das Hitzeschockprotein HspA ist möglicherweise an der Ausbildung der nativen Urease beteiligt [135].

1.3.2. Motilität und Adhärenz

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *H. pylori* ist die ausgeprägte Beweglichkeit. Das lophotriche Bündel von 4 bis 6 Flagellen verleiht dem Keim durch Rotation eine außerordentlich hohe Motilität [100]. Dadurch können sich die Bakterien auch im viskösen Magenschleim fortbewegen, die Epithelschicht erreichen und kolonisieren [120]. Durch Inaktivierung der Gene für die Flagellenstrukturproteine FlaA und FlaB entstehen unbewegliche Mutanten, die zwar kurzfristig im Magen überleben, jedoch im Magenepithel nicht persistieren können [81, 8]. Daher ist die Motilität nicht nur für die Durchwanderung des Magenschleims erforderlich, sondern gibt den Keimen auch die Möglichkeit, sich in der kontinuierlich fluktuierenden Mukusschicht, die vor der Säure im Magenlumen schützt, aufzuhalten [248]. Ebenso wie viele andere Krankheitserreger ist auch *H. pylori* in der Lage, sogenannte Adhäsine zu bilden, die mit Rezeptoren auf den Wirtszellen eine feste und spezifische Bindung eingehen. Die *H. pylori*-Adhäsine wurden bereits biochemisch charakterisiert, unter anderem HpaA [86], AlpA und AlpB [91] sowie BabA [101, 171] und SabA [154]. Für die Bindung von *H. pylori* scheint das Blutgruppenantigen Lewis B auf der Wirtszelloberfläche von wesentlicher Bedeutung zu sein, das bei Menschen der Blutgruppe 0 gebildet wird und an welches das *H. pylori*-BabA2-Adhäsine bindet [46]. Dieser Zusammenhang könnte auch die lange bekannte Assoziation zwischen Blutgruppe 0 und der Ulkuskrankheit erklären [249]. In neuesten Untersuchungen wurde das SabA-Adhäsine („sialic

acid binding adhesin”) identifiziert. Im Gegensatz zu den Adhäsinen AlpAB und BabA bindet das SabA-Adhäsine an Zuckerstrukturen, LewisX-Glycosphingolipide, die erst im Laufe der chronischen Entzündungsreaktion auf den Zellen der Magenschleimhaut ausgebildet werden. Dabei könnte SabA zur außerordentlichen Chronizität der *H. pylori*-Infektion wesentlich beitragen. In diesem Zusammenhang kann auch das Lipopolysaccharid (LPS) von *H. pylori*, das jedoch im Vergleich mit anderen intestinalen Bakterien eine verminderte Toxizität und eine erniedrigte immunologische Aktivität besitzt, erwähnt werden. Eine Besonderheit stellt der für die toxische Wirkung des LPS verantwortliche Teil, das Lipid A dar, das aus ungewöhnlichen Fettsäuren aufgebaut ist [100, 41]. Des Weiteren bestehen die O-Seitenketten des LPS aus Oligosacchariden, die exakt den Blutgruppenantigenen Lewis X und Lewis Y des Menschen entsprechen [11]. Dieses als Antigenmimikry bezeichnete Phänomen [10] könnte das Ergebnis eines komplexen koevolutionären Anpassungsprozesses darstellen, durch den die Langzeitpersistenz von *H. pylori* im Habitat Magen erst ermöglicht wurde [10].

1.3.3. Das Vakuolisierendes Zytotoxin

Im Rahmen der Gewebeschädigung durch die *H. pylori* Infektion lässt sich eine Vakuolisierung des Zytoplasmas und eine Destruktion der betroffenen Zellen beobachten. Das für diesen Effekt verantwortliche Protein, das vakuolisierende Zytotoxin VacA [63], ist ein aus 87 kDa großen Untereinheiten aufgebautes Hexa- oder Heptamer [229, 255], das von den Bakterien in die Umgebung abgegeben wird. Erst nach Kontakt mit Magensäure kommt es zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Aktivierung der toxischen Aktivität [64, 69]. Das *vacA*-Gen ist zwar in allen *H. pylori*-Stämmen nachweisbar, dennoch wird das Zytotoxin nur in ca. 50 % der Fälle auch wirklich hergestellt [65]. Das *vacA*-Gen zeigt eine hohe genetische Variabilität, die als Mosaikstruktur beschrieben wird und sowohl konservierte als auch hoch divergente Regionen aufweist. Die Signalsequenz am N-Terminus kann in drei (s1a, s1b, s2), die Mittelregion in mindestens zwei (m1, m2) Subtypen unterteilt werden [13]. Der *vacA*-Genotyp gibt Hinweise auf Virulenz des entsprechenden *H. pylori*-Stammes. So ist beispielsweise der Genotyp s1a im Gegensatz zu den s2-Genotypen in hohem Maße mit der Anwesenheit von *cagA* assoziiert und wird in über 90 % bei Patienten mit peptischen Ulzera gefunden [13, 247, 266]. Die Vakuolisierung des Zytoplasmas, die die Bildung von großen Vakuolen (2-5 µm) beinhaltet, scheint durch Störung des intrazellulären ”Traffickings” und der daraus resultierenden Fusion von späten Endosomen und Lysosomen zustande zu kommen [36]. *In vitro* konnte auch eine durch VacA vermittelte Ausbildung von Anionen-selektiven Kanälen in Lipiddoppelmembranen beobachtet werden [128, 257, 252].

Weitehin induziert VacA Apoptose [141] und beeinträchtigt physiologische Reparaturmechanismen der Magenschleimhaut sowie modifiziert das Zytoskeletts [200]. Neuere Veröffentlichungen definieren VacA auch als eine Art "Harnstoff-Permease", welche den Transport von Harnstoff über das Magenepithel in Richtung Magenlumen erhöht [258,167]. Auch Funktionen als eine Art Autotransporter werden diskutiert [215]. Obwohl das VacA-Zytotoxin wahrscheinlich an der Ulkuserkrankung beteiligt ist, kann es für diese nicht als essentiell eingestuft werden [79, 255]. Trotz großer Fortschritte in der Untersuchung von VacA ist die genaue Rolle des Toxins in der Pathogenese der *H. pylori*-Gastritis, der Ulkuserkrankung und anderer Folgeerkrankungen weiterhin unklar [249].

1.3.4. Die *cag*-Pathogenitätsinsel

Der wichtigste Entzündungsmediator von *H. pylori* ist das Typ IV Proteinsekretionssystem durch den das CagA-Protein (cytotoxin-associated gene product A; Abb 3) in die Wirtszellen transportiert wird. Das System ist in der ungefähr 40 kb umfassenden Pathogenitätsinsel kodiert [55]. Das 128 bis 140 kDa große Protein ist stark immunogen und wird von ca. 70 % aller *H. pylori*-Isolate produziert. Im Gegensatz zum VacA-Protein geht das Fehlen von CagA jedoch immer mit dem Fehlen des zugehörigen *cagA*-Gens einher [264]. Die Pathogenitätsinsel (PAI) besteht aus einem Cluster von 31 Genen, das durch horizontalen Transfer von einem bisher nicht bekannten Donor erworben und vor ungefähr 1 Million Jahren in das *H. pylori* Genom eingebaut wurde [55, 62]. Neuere Untersuchungen ergaben, dass der Kontakt des Typ IV-Sekretionssystems mit der Wirtszelle für die Verstärkung der Entzündungsreaktion verantwortlich ist während das CagA-Protein in die Strukturierung der Wirtszelle eingreift [62, 241]. So führte das Vorhandensein eines funktionsfähigen Typ IV-Sekretionssystems auch ohne CagA zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8 [66, 110]. Im Gegensatz dazu war das translozierte Cag A-Protein für die drastische Strukturänderung der Wirtszelle, die mit einer zellulären Verlängerung einhergeht, verantwortlich [232, 110]. Sechs Gene der Pathogenitätsinsel sind zu den gut charakterisierten Virulenzgenen *virB4*, *virB7*, *virB9*, *virB10*, *virB11* und *virD4* von *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis* und *Legionella pneumoniae* homolog [60, 62]. Entsprechende Sekretionssysteme wurden auch in *Escherichia coli*, *Legionella pneumoniae*, *Brucella suis* und *Rickettsia prowazekii* gefunden [62, 276] und sind dort unter anderem für den Transfer von DNA und Toxinen verantwortlich. Nach der Einschleusung von *H. pylori*-CagA in die Wirtszelle, wird das Protein von einer membran-assoziierten Tyrosinkinase phosphoryliert [331, 190, 16, 55].

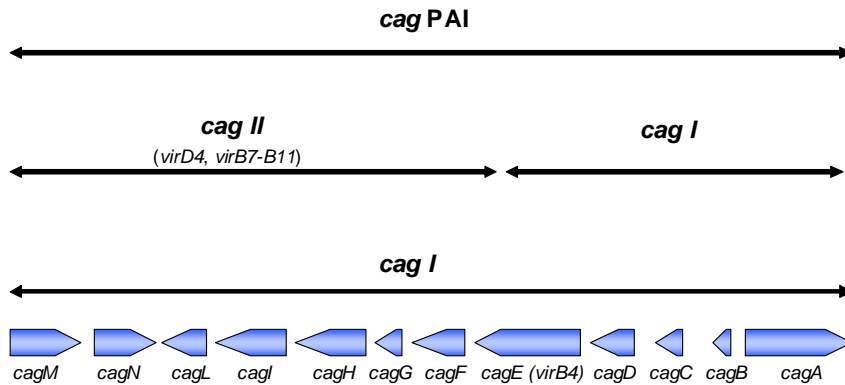


Abb. 3: Schematische Darstellung der Cag-Pathogenitätsinsel (PAI) von *H. pylori*. Die PAI wird in zwei Abschnitte unterteilt, die durch Insertionselemente unterbrochen sein kann. Die Gene des Abschnittes *cagI* der PAI wurden als blaue Pfeile entsprechend ihrer Größe und Ausrichtung dargestellt.

Anschließend kommt es durch Polymerisation von Aktinfilamenten zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und es entstehen Ausstülpungen der Zellmembran der Wirtszelle, sogenannte Pedestals [232, 62]. Die Phosphorylierung von Tyrosin oder Serin und Threonin ist einer der grundlegenden Mechanismen im Rahmen der Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen. Die Phosphorylierung von Bakterien-Proteinen ist äußerst selten und wurde bisher nur bei *E. coli* und *Chlamydia trachomatis* beobachtet, wo es zu Phosphorylierungen an Serin- und Threoninresten kommt [287]. Bedingt durch die genetische Variabilität von *H. pylori* kommt die PAI nicht in allen Stämmen vor. Das Vorhandensein und Fehlen der PAI wird entsprechend als *cag*-positiv bzw. *cag*-negativ bezeichnet. Im Falle einzelner Isolate können auch einzelne Gene der PAI fehlen. Inzwischen ist gesichert, dass die wesentlich stärkere Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch *cag*-positive *H. pylori*-Stämme ursächlich an der Induktion einer stärkeren Gastritis beteiligt ist und damit zur Entstehung von Ulkuskrankheiten, Karzinomen und MALT-Lymphomen beiträgt [103, 249].

1.4. Die Therapie der *H. pylori*-Infektion

Durch Eradikation der Bakterien kommt es zur vollständigen Heilung der chronischen Gastritis, des Ulkusleidens und in 70 % der Fälle auch zur Regression der MALT-Lymphome [126]. Die Therapie der *H. pylori*-Infektion basiert auf der oralen Gabe antimikrobiell wirksamer Substanzen, die mit Protonenpumpen-Inhibitoren (PPI) oder mit Wismutsalzen kombiniert werden können [145]. Um Resistenzbildungen vorzubeugen erfolgt die Erstbehandlung meist mit der Kombination zweier Antibiotika und einem PPI. Dabei liegen die Eradikationsraten zwischen 72 und 96 %, wobei gerade die Kombination mit einem Protonenpumpenhemmer die Wirksamkeit des Antibiotikums erhöht [145, 158]. Als

Antibiotika werden je nach Resistenzsituation entweder Clarithromycin und Amoxicillin oder Clarithromycin und Metronidazol eingesetzt [26]. Aufgrund einer zunehmenden Resistenzentwicklung bei *H. pylori* (Tab. 3) können Einschränkungen der Möglichkeiten in der kurativen Behandlung der Ulkuskrankheit zukünftig nicht ausgeschlossen werden. Die bereits bestehenden Antibiotikaresistenzen variieren mit der geographischen Lage und dem Entwicklungsstatus der einzelnen Länder. Doppelresistenzen und die Resistenz gegenüber Clarithromycin werden durch Antibiotikavorbehandlungen begünstigt. Die weltweite Situation ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Unter Berücksichtigung der hohen Prävalenzraten ist auch die Prävention der Infektion, z.B. durch Impfung, von Interesse. Die Entwicklung eines Impfstoffes ist daher Gegenstand aktueller Forschung [67]. Da aufgrund der Erregereigenschaften und der Physiologie des Magens nur einige wenige Antibiotika für die *H. pylori*-Therapie *in vivo* in Frage kommen, ist die Resistenzsituation gegenüber klassischen Antibiotika von besonderem Interesse. Unter anderem bedingt durch die große genetische Variabilität von *H. pylori* beobachtet man heute eine immer stärkere Zunahme der Resistenz vor allem gegen das Antibiotikum Metronidazol. Daher kommt der Suche nach neuen Therapiezielen in den Bakterien und der Entwicklung neuer alternativer Wirkstoffe eine besondere Bedeutung zu. Hierbei könnte der Metallionenstoffwechsel von *H. pylori* mögliche Ansatzpunkte bieten, da die Aufrechterhaltung der Metallionen-Homöostase für alle Organismen lebensnotwendig und auch für die gastrische Adaptation von *H. pylori* essentiell ist [269].

Tabelle 3: Weltweite Antibiotika-Resistenzen in der *H. pylori*-Population

Antibiotika	Resistenz in %
Amoxicillin	0-3
Makrolide	3-30
Metronidazol	20-80
Fluorchinolone	3-15
Tetracyclin	< 1
Rifampicin (Rifabutin)	1-10

(modifiziert nach [52])

1.5. Der Metallstoffwechsel von Bakterien

Metallionen sind für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels aller Organismen von grundlegender Bedeutung, was sich in der Bandbreite chemischer Reaktionen, an denen sie beteiligt sind, widerspiegelt. Neben der Kofaktor-Funktion bei Enzymreaktionen tragen Metallionen auch zur Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks in der Zelle bei. Von den 90 natürlich vorkommenden Elementen der Erde sind 21 Elemente Nichtmetalle, 16 Elemente Halbmetalle und 53 Elemente gehören zu den Schwermetallen. Als Schwermetalle werden alle Elemente definiert, deren Dichte höher als 5 g/cm^3 ist [186]. Viele dieser Schwermetalle gehören zu den Übergangsmetallen und besitzen unbesetzte d-Orbitale, welche durch ihre Redox-Aktivität zu einer hohen Reaktivität führen und damit befähigt sind in biologischen Systemen Funktionen zu übernehmen. Biologische Funktionen sind jedoch auch von der Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen und der Toxizität abhängig. Die toxische Wirkung der Schwermetalle beruht auf dem Vermögen von Metallionen mit Thiol-, Sulfhydryl-, Carboyl-, Imidazol- und anderen funktionellen Gruppen von Proteinen zu interagieren, Komplexe zu bilden und durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff oxidativen Stress zu erzeugen [186]. Zweiwertige Kationen der Metalle Quecksilber, Silber und Cadmium sind aus diesem Grund zu toxisch, drei bzw. vierwertige Kationen der Metalle Zinn, Cer, Gallium, Zirkonium und Thorium zu schlecht lösbar um biochemische Funktionen zu übernehmen. Insgesamt übernehmen 17 Schwermetalle biologische Funktionen. Von den 17 Biometallen weisen Eisen, Molybdän und Mangan als wichtige Spurenelemente die geringste Toxizität auf, während Zink, Nickel, Kupfer, Vanadium, Kobalt, Wolfram und Chrom toxischer sind, aber ebenfalls wichtige Funktionen übernehmen. Arsen, Silber, Antimon, Cadmium, Quecksilber, Blei und Uran können aufgrund ihres eingeschränkten Nutzens für die Zelle als Toxine betrachtet werden. Dies stellt die Organismen vor die Aufgabe die intrazelluläre Metall-Homöostase exakt zu regulieren [186], da sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss der Ionen eine Wachstumseinschränkung und auch den Zelltod zur Folge haben können. In Bakterien sind zur Metallaufnahme zwei Prinzipien realisiert: Ein konstitutiv produziertes, schnelles Aufnahmesystem transportiert unspezifisch eine Vielzahl von Kationen über einen chemiosmotischen Gradient in die Zelle. Dies ist dadurch möglich, dass sich viele zweiwertige Metallionen strukturell sehr ähnlich sind. So besitzen die Kationen von Mangan, Eisen, Kobalt, Nickel, Zink und Kupfer neben der gleichen Ladungszahl einen ähnlichen Durchmesser von 138 pm bis 160 pm [283]. Negativ geladene Ionen können in der Gestalt auch Ähnlichkeiten zu Sulfat oder Phosphat aufweisen. Das zweite Prinzip der Metallaufnahme wird insbesondere bei Metallmangel oder in besonderen Stoffwechsel-Situationen realisiert und durch kritische Situationen

induziert. Diese im Vergleich eher langsamen Systeme transportieren Substrate spezifisch und meist mittels ATP-Hydrolyse oder in Kombination mit dem chemiosmotischen Gradienten in die Zelle [188]. Aufgrund des ersten Prinzips, das wegen der fehlenden Spezifität und Regulation ein sogenanntes "open gate" darstellt, können Metalle eine toxische Konzentration im Zytoplasma erreichen. Da Metall-Ionen jedoch nicht wie organische Substanzen abgebaut oder modifiziert werden können, gibt es für die Entgiftung theoretisch drei Möglichkeiten: Den Export, die Komplexierung oder die Reduktion. Die Reduktion führt in den meisten Fällen zu Produkten, die entweder unlöslich oder ebenfalls toxisch sind und findet nur in der Reduktion von zweiwertigem zu elementarem Quecksilber Verwendung. [186]. Eine Komplexierung z.B. durch Thiol-enthaltende Moleküle besitzt den Nachteil, dass sie sehr energieaufwendig ist. Pro- und Eukaryoten verwenden unterschiedliche Mechanismen zur Entgiftung der Metalle. Während die überschüssigen Metalle in Eukaryoten vorwiegend komplexiert und in der Vakuole sequestriert werden [154] besitzen Prokaryoten hauptsächlich Efflux-Systeme, die das toxische Metall aus dem Zytoplasma in die Umgebung transportieren [186]. Die wichtigsten Transport-Systeme sind in Tabelle 4 zusammengefasst, von denen einige im Folgenden erläutert werden. Für einige Metalle ist zudem die Existenz zytoplasmatischer Speicherproteine bekannt. Diese ermöglichen der Zelle überschüssige Ionen aus dem Zytoplasma zu entfernen und sie gleichzeitig in einem nicht toxischen Zustand für Zeiten des Mangels aufzubewahren [151, 269]. Sowohl Efflux- wie auch Importsysteme können als Ein- oder Multi-Komponentensysteme auftreten. Ein in beide Richtungen funktionierendes Ein-Komponenten-System stellen die P-Typ ATPasen dar. Der Namensgebung der P-Typ-ATPasen liegt ein charakteristisches Phosphat-Intermediat, das durch Übertragung eines γ -Phosphatrestes auf Aspartat zustande kommt, zu Grunde. Strukturell gesehen sind P-Typ-ATPasen polytopische integrale Membranproteine, die meist aus einer Untereinheit aufgebaut sind und ein hochkonserviertes Aminosäuremotiv (DKTGL/T) besitzen, das die Phosphorylierungsregion enthält. Die P-Typ-ATPasen sind weit verbreitet und kommen neben Bakterien auch in Pflanzen und Tieren vor [83, 234]. Im Gegensatz zu anderen ATPasen können sie durch Vanadat, einem Phosphatanalogon, gehemmt werden. Je nach Substratspezifität werden P-Typ-ATPasen in fünf Gruppen unterteilt [201]. Schwermetall-Ionen transportierende P-Typ-ATPasen, sogenannte CPx-Typ-ATPasen, katalysieren mittels einer Metallbindedomäne den Transport von Kationen über die Zytoplasmamembran. Gut untersuchte CPx-ATPasen stellen die Cu(I) transportierenden Systeme CopA und CopB von *Enterococcus hirae* [194], CopA von *E. coli* [213] und CopA von *H. pylori* [99, 25, 166] dar. Die Proteine ZntA von *E. coli* [40] und CadA von *Staphylococcus aureus* [214] vermitteln durch

Austransport Resistenz gegenüber Cd(II)-, Pb(II)- und Zn(II)-Ionen. Im Gegensatz zu den P-Typ-ATPasen, die den Transport über die Zytoplasmamembran vermitteln, katalysieren RND-Systeme (resistance nodulation cell division) einen "transenvelop transport" über beide Membranen [189, 206, 224]. Strukturell gesehen bestehen RND-Systeme aus einer Transportkomponente der Zytoplasmamembran, die entweder ein RND-Protein, ein ABC-(ATP binding casette)-Transporter oder ein Protein aus der MFS-Familie sein (major faciliator superfamily) kann, einem Membranfusionsprotein und einem äußeren Membranfaktor. Das zuerst entdeckte RND-System war das Czc-System von *Ralstonia* CH34 [185], das die Resistenz gegenüber Kadmium, Zink und Kobalt über einen Kationen-Protonen-Antiport vermittelt. Als Energiequelle des Exports fungiert der Protonengradienten über der Membran [185]. Im Czc-System stellt CzcA den integralen RND-Transporter der Zytoplasmamembran dar. Das Membranfusionsprotein CzcB besitzt einen zytoplasmatischen Anker und ist in doppelter Anzahl im periplasmatischen Raum lokalisiert. Die dritte Untereinheit CzcC ist an der Innenseite der äußeren Membran ebenfalls periplasmatisch lokalisiert ist und könnte selbst ein äußeres Membranprotein sein oder mit einem Protein der äußeren Membran (OmpY) in Kontakt stehen. Des Weiteren gehören zum System mindestens sechs weitere Struktur- und Regulatorproteine, deren Gene in zwei Regionen stromaufwärts (*czcN* und *czcI*) bzw. stromabwärts (*czcD*, *czcR*, *czcS* und *czcE*) in der gleichen Orientierung wie die Strukturgene *czcCBA* transkribiert werden [107]. Den Proteinen CzcN, CzcI und CzcE konnte noch keine Funktion zugeordnet werden. Das stromabwärts kodierte CzcD-Protein gehört zu der Familie der CDF (cation diffusion faciliators) und kann eigenständig ohne CzcA und CzcB Metalle exportieren [9]. CzcR und CzcS bilden ein Zwei Komoponten-Regulationssystem, das die Kupferinduktion des Czc-Systems vermittelt [265].

Tabelle 4: Übersicht der wichtigsten Proteinfamilien von Schwermetalltransportern

Protein-familie	Transport-richtung	Energie	Metall-Innen	Zusammensetzung der Transportsysteme
ABC	Aufnahme	ATP	Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ²⁺	ABC-Kern, periplasmatisches Bindeprotein
	Export	ATP	-	ABC-Kern, Membranfusionsprotein, äußere Membranfaktor
P-Typ	Beide Richtungen	ATP	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Ag ⁺	Ein membrangebundenes Protein als Kern
A-Typ	Export	ATP	Arsenite	Integrales Membranprotein, dimerische ATPase Untereinheit
RND	Export	Protonen- gradient	Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ ?, Ag ⁺	CPM Proton/Kation-Antiporter, Membranfusionsprotein (Dimer?), äußere Membranfaktor: CBA-Transport-Systeme
HoxN	Aufnahme	Chemi- osmotisch	Co ²⁺ , Ni ²⁺	Integrales Membranprotein
CHR	Antiport?	Chemi- osmotisch	Chromat	Integrales Membranprotein (ChrA)
MIT	Aufnahme	Chemi- osmotisch	Die meisten Kationen	Integrales Membranprotein (CorA)
CDF	Export	Chemi- osmotisch	Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ²⁺	Integrales Membranprotein (CzcD, ZRC1p, ZnT1)

(modifiziert nach [186])

CPM, Zytoplasmamembran; ABC, "ATP binding cassette" [88]; RND, "resistance, nodulation, cell division" [224]; CHR, Chromat-Transport [187], MIT, "metal inorganic transport"[207], CDF, "cation diffusion facilitators" [185, 205]

1.5.1. Der Eisenstoffwechsel

Eisen ist unter den Schwermetallen als einziges Makro-Bioelement [186] für lebende Organismen von grundlegender Bedeutung [5]. Dies resultiert einerseits aus dem häufigen Vorkommen des Elementes in der Umwelt - Eisen ist das vierthäufigste Element der Erdkruste [290] - andererseits aus seinen chemischen Eigenschaften. So besitzt Eisen zwei stabile Valenzen (+II/+III), die ineinander umwandelbar sind. Diese sind für die Teilnahme an Redoxprozessen gut geeignet. Das Redoxpotential des Fe(II)/Fe(III)-Paares ist von den umgebenden Liganden abhängig und variiert von + 330 mV (*Chromatium*, HiPiP) bis - 490 mV (*Chromatium*, Ferredoxin). Diese Flexibilität zusammen mit der Fähigkeit d-Orbital-

Elektronen in verschiedenen Spinzuständen ausbilden zu können, ermöglicht es dem Eisen als biologischer Redox-Mediator zu fungieren [286]. Eisen kann in Proteinen in sehr unterschiedlichen Strukturen vorkommen: als Häm (A, B, C, D, E und Sirohäm), als Eisen-Schwefel-Cluster ([Cys₄-Fe], [2Fe-2S], [3Fe-4S], [8Fe-7/8S], [7Fe-9S-Mo-Homocitrat]), als Eisen-Nickel (Ni-Fe-CO-[CN]₂), als Di-Eisen (Fe-O-Fe) und als mononukleares Eisen. Als Kofaktor von Schlüsselenzymen ist Eisen an wichtigen Stoffwechselprozessen prokaryoter und eukaryoter Zellen beteiligt. Einige biochemische Prozesse, an denen Eisen-Proteine beteiligt sind, zeigt die Tabelle 5.

Tab. 5: Prozesse, an denen Eisen-enthaltende Proteine beteiligt sind.

Prozeß	Beispiele
Atmung	Cytochrome, Ferredoxine, Eisen-Schwefel-Proteine
Aktivierung von Sauerstoff	Cytochrom-Oxidase
Abbau von H ₂ O ₂ und O ²⁻	Häm-Katalase, Eisen-Superoxid-Dismutase, Peroxidase
Aminosäuren- und Pyrimidin-Biosynthese	Glutamat-Synthase, Dihydroorotat-Oxidoreduktase
Citrat-Cyclus	Fumarase, Aconitase, Succinat-Dehydrogenase
DNA-Synthese	Ribonukleotid-Reduktase
Stickstoff-Fixierung	Nitrogenase
Photosynthese	LHC, Reaktionszentren, Ferredoxin
Gen-Regulation	FNR, SoxR, CoxA

Weiterhin ist in Vertebraten die Funktion vieler Zellen des Immunsystems ebenfalls eisenabhängig (Neutrophile Granulocyten, B- und T-Zellen, natürliche Killerzellen). Einige Eigenschaften des Elements erschweren die Aufnahme in die Zelle. So sind zum Beispiel die Löslichkeitsprodukte von Fe(II) und Fe(III) bei einem pH-Wert von 7 etwa 10^{-15} und 10^{-18} M [38]. Zudem neigt Fe(III) dazu, in wässriger Umgebung zu hydrolysieren und zu polymerisieren. Dies bedeutet, dass Fe(III) unter physiologischen Bedingungen Eisenhydroxid-Komplexe bildet und ausfällt. Ein weiteres Problem ist die Eigenschaft des Eisens, mit Sauerstoff und Sauerstoff-Reduktions-Produkten zu reagieren und dabei die Entstehung sehr reaktiver freier Radikale zu katalysieren. In der sogenannten Haber-Weiss-Fenton-Reaktion reagieren H₂O₂ und O²⁻, welche als Stoffwechselprodukte des aeroben Stoffwechsels anfallen, mit Eisen zu OH⁻, O₂ und toxischen OH[•]-Radikalen [114]. Eisen stellt somit ein doppeltes Paradoxon für aerobe Organismen dar. Es ist ebenso nützlich wie gefährlich, allgegenwärtig, aber schwer erreichbar. Bakterien und andere Organismen haben daher Mechanismen

entwickelt, um die mit der Eisenaufnahme verbundenen Probleme zu lösen. Durch die Produktion von niedermolekularen, hochaffinen, extrazellulären Eisen(III)chelatoren (Siderophoren) [48, 109] und sehr effizientem Eisentransport wird das Problem des niedrigen Löslichkeitsproduktes umgangen. Nach der Eisenkomplexierung können Bakterien das Element als Ion über selbst produzierte, Fremd-Siderophore und/oder über spezifische Transportsysteme in die Zelle aufnehmen. Eine weitere Strategie ist der direkte Eisen(II)-Transport bzw. der Transport von Eisen(II) nach Reduktion von Eisen(III), wie er bei Pflanzen und Pilzen vorkommt [109]. Die Repression dieser Eisenaufnahmesysteme erfolgt bei einer hohen Eisenkonzentration in der Umgebung durch Regulatorproteine. Die Toxizität des Eisens wird durch Antioxidantien (z.B. Glutathion) oder Enzyme, die die reaktiven Sauerstoffmoleküle unschädlich machen (z.B. Superoxid-Dismutase, Katalase, Peroxidase), vermindert. Der Mechanismus der intrazellulären Eisenkontrolle beinhaltet die Produktion von Eisenspeicherproteinen. Diese als Ferritine bezeichneten Proteine kommen in Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten vor und lassen sich bezüglich des Vorhandenseins von Häm-Gruppen in zwei Klassen einteilen: Bakterioferritine, die Häm-Gruppen enthalten, und Häm-freie Ferritine (Non-Häm-Ferritine). Beide sind strukturell und funktionell verwandt [7, 108, 118]. Die Ferritine der Eukaryoten sind bisher am besten charakterisiert. Sie bestehen aus 24 Untereinheiten (je etwa 19 kDa), die einen sphärischen Proteinkörper bilden (etwa 500 kDa, 120 Å im Durchmesser), welcher im Inneren für bis zu 4500 Eisenatome Platz bietet. Das erste Eisenspeicherprotein, das bakterielle Ferritin, wurde in dem Stickstoff-fixierenden Bakterium *Azotobacter vinelandii* gefunden [242]. Dieses Bakterioferritin ist hitzestabil und besteht ebenso wie das eukaryotische Ferritin aus 24 Untereinheiten. Der Proteinkörper aus 17 kDa-Untereinheiten kann *in vitro* 1100-1800 Eisenatome speichern. Der größte Unterschied zu den Ferritinen war das Vorhandensein von 12 Häm-Gruppen (Protoporphyrin IX, [49]) pro Molekül, deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist. Es wird jedoch diskutiert, ob sie bei der Eisensfreisetzung eine Rolle spielen [6]. Bakterioferritin kommt auch in anderen Bakterien wie unter anderem in *E. coli* [21, 22, 23], *Azotobacter chroococcum* [57], *Nitrobacter winogradskyi* [56, 142] und *Pseudomonas aeruginosa* [176] vor und scheint unter den Bakterien weit verbreitet zu sein. Bakterielle Ferritine ohne Häm-Kofaktor wurden zuerst in *E. coli* entdeckt, dessen FtnA-Protein die charakteristische Ferritin-Morphologie aufweist und unter Eisenmangelbedingungen auch als intrazellulärer Eisenspeicher fungieren kann [1]. Auch die Non-Häm-Ferritine sind weit verbreitet und wurden unter anderem in *Bacteroides fragilis* [217], *H. pylori* [74, 96], *Campylobacter jejuni* [278, 279] und *Haemophilus influenzae* [90] gefunden. Einige Bakterienarten besitzen Non-Häm-Ferritine und

Bakterioferritine (z.B. *E.coli*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis* [5]). Im Unterschied zu den Bakterioferritinen werden Non-Häm-Ferritine auch in Archaeobakterien gefunden. Aufgrund der bereits beschriebenen Toxizität von Eisen im Zusammenhang mit oxidativem Stress und der essentiellen Bedeutung für den Grundstoffwechsel ist die präzise Regulation der intrazellulären Eisenkonzentration von großer Bedeutung. In gram-negativen und gram-positiven Bakterien wird die eisenabhängige Regulation durch globale Regulatoren wie Fur (Ferric uptake regulator) und DtxR (Diphtheria toxin Regulator) vermittelt. Das Fur-Protein von *E. coli*, das bisher am intensivsten untersucht wurde, ist ein etwa 17 kDa großes Protein, das in seiner nativen Form Homodimere bildet. Durch Bindung von zweiwertigem Eisen als Kofaktor im C-Terminus des Proteins entsteht die aktive DNA-bindende Form. Die DNA-bindende Domäne (C L H C G) befindet sich im N-Terminus des Proteins [244]. Neben der Bindestelle für Eisen besitzt das Fur-Protein von *E. coli* eine Metallbindestelle im C-Terminus, die mit Zink besetzt ist. Das Fur-Protein kann als direkter Sensor der intrazellulären Eisenkonzentration wirken, indem es die Transkription der hochaffinen Eisenaufnahmesysteme dann reprimiert wenn genügend Eisen vorhanden ist. Die Repression kommt durch Bindung des aktiven Fur-Eisen(II)-Komplexes an eine konservierte DNA-Sequenz (Fur-Box, [244, 245]) im Promotor-Bereich der durch Fur-Protein regulierten Gene zustande. In einigen Fällen kommt es auch zur indirekten Regulation der Eisenaufnahmesysteme durch Fur über Zwei-Komponenten-Regulationssysteme, AraC-ähnlichen Regulatoren und Sigma-Faktoren extrazytoplasmatischer Funktion (ECF) [117]. Die durch Fur regulierten Gene werden in ihrer Gesamtheit als Fur-Regulon bezeichnet. In unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen wurden mehr als 90 Gene als durch Fur und Eisen reguliert erkannt. Unter anderem die Gene für Biosynthese und Transport von Siderophoren, für Eisen- und Grundstoffwechselproteine (z.B. Aconitase A und Bakterioferritine) und für Proteine, die eine Schutzfunktion bei oxidativem Stress ausüben (z.B. Superoxid-Dismutase SodB). Außerdem wird in *E. coli* die Synthese von Virulenzfaktoren wie α -Hämolyisin, Shiga-like Toxin I, und Colchizine durch Fur reguliert [116]. Neben seiner Funktion als eisenabhängiger Repressor ist Fur auch als Regulator in die ATR (acid-tolerance-response) involviert, wobei Eisen(II) nicht immer als Kofaktor benötigt wird [93, 113, 115]. Das Fur-Protein selbst ist durch Fur und Eisen(II) autoreguliert und besitzt eine Bindestelle für den cAMP-Katabolit-Repressor, welche die Verbindung von Fur zum Grundstoffwechsel erklärt [84]. In gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt wie Streptomyzeten, Corynebakterien und Mykobakterien regulieren DtxR und DtxR-ähnliche Proteine ein ganz ähnliches Spektrum an Genen wie Fur in gram-

negativen Bakterien. Obwohl keine Sequenzhomologie besteht, besitzen DtxR und Fur strukturell sehr ähnliche Eigenschaften.

1.5.2. Der Kupferstoffwechsel

Im Stoffwechsel der Organismen ist Kupfer nach Eisen das vorherrschende Schwermetall. Die biologischen Funktionen von Kupfer sind direkt mit seinen chemischen Eigenschaften als Übergangsmetall verbunden. So besitzt Kupfer nur teilweise gefüllte d-Orbitale, drei ineinander umwandelbare stabile Valenzen (+I, +II, +III) und liegt mit einem elektrochemischen Potential von -286 mV für Cu(II)/Cu(I) im physiologischen Bereich [186]. Diese Eigenschaften befähigen Kupfer durch "Valenz-Shuttle"-Mechanismen Elektronentransfer zu vermitteln. Eine weitere Funktion beruht auf der Fähigkeit von Kupfer in einer niedrigen Valenzstufe mit molekularem Sauerstoff eine reversible Bindung einzugehen [159]. Diese einzigartigen Redox-Fähigkeiten führen dazu, dass Kupfer eine zentrale Bedeutung in zahlreichen Atmungsketten- und Stoffwechsel-Enzymen besitzt. Insbesondere Enzyme, die molekularen Sauerstoff oder reaktive Sauerstoff-Reduktions-Produkte als Substrate verwenden, besitzen Kupfer als Kofaktor. So findet sich Kupfer unter anderem in Oxygenasen, Cytochromen, Superoxid-Dismutasen und Peroxidasen. Der reaktive Charakter von Kupfer führt jedoch schon in geringer Konzentration zu einer toxischen Wirkung auf die Zelle. Die Toxizität beruht einerseits auf der Bildung von Hydroxylradikalen analog zur Eisenkatalysierten Haber-Weiss-Fenton-Reaktion [218] andererseits auf der Interaktion mit der Zytoplasmamembran [251]. Interessanterweise wurde ein Anstieg der Kupfer-Toxizität unter anaeroben Bedingungen beobachtet, was auf einen Übergang von Cu^{2+} zur toxischeren Form Cu^+ zurückgeführt wurde [37]. Das wohl am besten untersuchte Kupferenzym ist die Cytochrom c Oxidase, die terminale Oxidase der Atmungskette vieler Organismen. Das Enzym besitzt zwei Kupferzentren mit unterschiedlichen Funktionen in der Katalyse [129]. Das Cu_A -Zentrum nimmt die Elektronen des löslichen Cytochrom c auf und gibt sie weiter an den Häm aa^3/Cu_B -Komplex, der die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser katalysiert [198]. Die Energie aus dem Elektronentransport wird dazu verwendet Protonen durch die Zytoplasmamembran ins Periplasma zu transportieren und in einem kontinuierlichen Protonengradienten zu speichern [198]. Die Akkumulation von Kupfer in der Zelle basiert wahrscheinlich auf dem unspezifischen Eintransport durch MIT-Systeme ("metal inorganic transport") [186]. Daneben scheint es in *Pseudomonas* und *Enterococcus hirae* [195, 196, 196] Systeme zu geben, die Kupfer-Eintransport bei niedrigen Kupferkonzentrationen gewährleisten. Die Resistenz gegenüber toxischen Kupferkonzentrationen wird sowohl durch Plasmid kodierte

als auch durch chromosomale Autransport-Systeme vermittelt [91, 219]. Ein in vielen Organismen realisiertes Prinzip ist der Kupfer-Export über P-Typ-ATPasen. So wurden Kupfer transportierende P-Typ-ATPasen in Bakterien wie *E. coli* [213], verschiedenen *Pseudomonas*-Arten [272], *Xanthomonas campestris* [147], *Listeria monocytogenes* [95], *H. pylori* [99] *Enterococcus hirae* [237] und in Cyanobakterien [133] gefunden. Auch in Eukaryoten transportieren P-Typ-ATPasen bei hohen Kupferkonzentrationen Kupfer aus der Zelle und wurden für den Menschen [72, 94, 144, 277], für Mäuse, Ratten und *Caenorhabditis elegans* [140, 228, 288] beschrieben. In *E. coli* existieren abhängig von den umgebenden Bedingungen zwei chromosomale Kupfer-Efflux-Systeme. Das sogenannte *cue*-System (*cu* *efflux*) besteht neben der P-Typ-ATPase CopA aus der periplasmatischen Multi-kupfer-Oxidase CueO und wird durch das zur MerR-Familie (*mercury resistance regulator*) [51, 121] gehörende Regulatorprotein CueR (*cu efflux regulator*) induziert [246]. Das *cus*-System (*cu sensing*) gehört zur RND-System-Familie und besteht aus der Transportkomponente CusA, dem Membranfusionsprotein CusB und dem äußeren Membranfaktor CusC. Unter aeroben Bedingungen wird das *cue*-System auf einem moderaten, das *cus*-System auf einem extrem schwachen Basal-Level exprimiert. Ein schwacher Anstieg der Kupferkonzentration führt zu einer Induktion des *cue*-Systems. Die durch CopA autransportierten Kupfer-Ionen werden durch CuO im Periplasma in ihrer zweiwertigen und damit weniger toxischen Form gehalten. Ein Anstieg an Cu⁺-Ionen entweder verursacht durch extreme Kupferkonzentrationen in der Umgebung oder durch Fehlen der von CuO katalysierten Oxidase-Reaktion unter anaeroben Bedingungen führt über das zwei Komponenten System CusR/CusS zu einer starken Induktion des *cus*-Systems [199].

1.5.3. Der Metallstoffwechsel in *H. pylori*

H. pylori findet in der Schleimhaut des menschlichen Magens ein ausgesprochen anspruchsvolles Milieu mit ständig wechselnden Umgebungsbedingungen vor. Durch die wechselnden Nährstoffkonzentrationen und den sauren pH-Wert unterscheidet sich diese ökologische Nische von der Umwelt der meisten anderen Bakterien [269]. In Abhängigkeit von der Ernährung des Menschen ist das Bakterium auch stark variierenden Metallkonzentrationen ausgesetzt. Die Konfrontation des Bakteriums sowohl mit Eisenmangel- als auch mit Eisenüberschuss-Bedingungen ist sehr wahrscheinlich. So besitzen *H. pylori*-Infizierte Antikörper gegen Hämin-Bindungsproteine des Bakteriums, deren Produktion *in vitro* durch Eisen reprimiert werden [256]. Dies weist auf einen zumindest vorübergehenden Eisenmangel *in vivo* hin. Eisenmangel könnte durch Lactoferrin

hervorgerufen werden, das in der Magenschleimhaut vorkommt und im Rahmen einer *H. pylori*-Gastritis vermehrt sezerniert wird [164, 165]. Andererseits wird Eisen in für das Bakterienwachstum ausreichenden Mengen aus der Nahrung freigesetzt, und es ist anzunehmen, dass der zweiwertige Oxidationszustand des freigesetzten Eisens durch die hohe Protonenkonzentration des Magenumens gut stabilisiert wird. Vielleicht kann auch Laktoferrin zumindest von einigen *H. pylori*-Stämmen als Eisenquelle verwendet werden [76, 117, 244]. Häm-Verbindungen werden während der Infektion aus geschädigten Zellen der Magenschleimhaut freigesetzt und könnten somit ebenfalls der Eisenversorgung dienen. Die Charakterisierung der Eisenaufnahme von *H. pylori* hat gezeigt, dass das Bakterium Laktoferrin- und Transferrin-Eisen, Eisencitrat-Komplexe, Eisen(II)-und Eisen(III)-Salze, Hämin sowie Hämoglobin als Eisenquelle verwerten kann, wohingegen Siderophore, wie Enterochelin oder Pyochelin, weder produziert noch aufgenommen werden [30, 119]. Der FeoB-Transporter von *H. pylori* ist funktionell bisher am besten charakterisiert. Die Funktion des FeoB-Proteins, das in *E. coli* die Aufnahme von zweiwertigem Eisen katalysiert, konnte auch in *H. pylori* bestätigt werden. Die Charakterisierung einer isogenen FeoB-negativen Mutante hat gezeigt, dass über das FeoB-Protein *in vitro* etwa 70 % des Eisens assimiliert werden und die Bildung dieses Transporters für die Etablierung der *H. pylori*-Infektion essentiell ist [273, 274]. In *H. pylori* wird sowohl die Eisenaufnahme wie auch die Speicherung durch das Regulatorprotein Fur kontrolliert [29, 31, 32, 86, 227, 270]. Das prokaryotische Ferritin Pfr von *H. pylori* bildet den Haupteisenspeicher, indem es Eisen als parakristalline Einschlüsse im Zytoplasma speichert, und somit die Bakterien vor hohen toxischen Eisenkonzentrationen schützt [30, 74, 95]. Unter Eisenmangelbedingungen kann das in Ferritin gespeicherte Eisen wieder für die Zelle verfügbar gemacht werden [280]. Eisenbindende Eigenschaften wurden auch für das NapA Protein [260] einem DtxR-Homolog von *H. pylori* beschrieben, bisher konnten jedoch keine Funktionen des Proteins in der Eisenspeicherung gezeigt werden [75]. Als Folge einer erhöhten Eisenkonzentration reprimiert Fur die Transkription der Eisenaufnahme-Gene *fecA2* und *frpB1* [70, 71, 87, 270], während es die Transkription des Ferritin-Gens induziert [29, 71, 227, 269, 280]. Im Gegensatz dazu wird die Transkription der Eisenaufnahme-Gene unter Eisenmangelbedingungen verstärkt während die Pfr-vermittelte Eisenspeicherung durch Fur reprimiert wird. Fur unterdrückt die Biosynthese von Pfr auch unter erhöhten Konzentrationen der Metalle Nickel, Kupfer, Zink und Mangan [29], was darauf schließen lässt, dass Pfr in der Metallhomöostase von *H. pylori* eine übergeordnete Rolle spielt. In Bezug auf oxidativen Stress scheint das *H. pylori*-Ferritin eine andere Rolle als andere bakterielle Ferritine zu

besitzen, da es keine Schutzfunktion gegen durch Paraquat verursachten Superoxidstress vermitteln konnte und sich eine Pfr-negative Mutante als deutlich resistenter gegenüber Paraquat-Zusatz erwies [31, 280].

Auch für *H. pylori* ist Kupfer als Kofaktor in Elektronentransfer-Reaktionen von Bedeutung wie durch das Vorhandensein von Kupfer in der cb-Typ Cytochromoxidase, der terminalen Oxidase der Atmungskette, belegt wird [182, 263]. Kupfer wird unspezifisch in die Zelle über den zur HoxN-Familie gehörenden Nickel-Eintransporter NixA aufgenommen [97]. Die Kontrolle der zytoplasmatischen Kupferkonzentration erfolgt in *H. pylori* über die P-Typ-ATPase CopA, mit der das Bakterium kontinuierlich Kupfer aus dem Zytoplasma pumpt [25, 98, 99]. Als Folge erhöhter Kupferkonzentrationen wurde zudem die Repression der *pfr*-Transkription durch das Regulatorprotein Fur beobachtet [29]. Weitere in den Kupferstoffwechsel involvierte Proteine sind bisher noch nicht im Detail untersucht worden. Die P-Typ-ATPase CadA exportiert Kobalt, Kadmium und Zink [123] und das Nickelspeicherprotein Hpn zeigt keinen Einfluss auf die Kupfer-Resistenz [173]. Die Analyse der Gesamtgenomsequenz von *H. pylori* [256] entschlüsselte die Existenz eines weiteren P-Typ ATPase Homologs (HP1503) und zweier CzcA Homologe (HP0969 und HP1329), welche möglicherweise im Metallexport eine Rolle spielen, da dies bei anderen Bakterien so beobachtet wurde.

Als essentieller Kofaktor des Pathogenitätsfaktors Urease (siehe 1.2.1) [119] und der NiFe-Hydrogenase [155] spielt Nickel eine besondere Rolle im Metallstoffwechsel von *H. pylori*. Da die Konzentration an Nickel in der Umgebung von *H. pylori* recht gering ist, benötigt das Bakterium spezielle Aufnahmesysteme um seinen Bedarf an Nickel zu decken. So beträgt die Konzentration an Nickel im menschlichen Serum nur 2 bis 11 nM und schwankt im Magenumen je nach Nahrungsaufnahme extrem. Lebensmittel wie Nüsse, Kaffee, Schokolade und Tee könnten einen drastischen Anstieg der Nickelkonzentration im Magen bewirken [59, 239]. Das erste in *H. pylori* identifizierte Nickeltransport-System war das NixA-Protein (HP1077), das zur HoxN-Familie von Transportern gehört. Das 37 kDa große Protein ist in der Zytoplasmamembran lokalisiert und besitzt einen Eintransportmechanismus mit hoher Affinität zu Nickel ($K_T = 11.3$ nM) [175]. Des Weiteren transportiert es unspezifisch Zink, Kobalt und Kupfer in die Zelle. Das Transportsystem AbcCD besitzt Homologien zu dem Nik-ABC-Transporter-System von *E. coli* und transportiert ebenfalls Nickel in die Zelle. Eine mögliche Speicherung von Nickel erfolgt in Hpn (HP1427) einem 7 kDa großen Protein mit einem ungewöhnlich hohen Gehalt an Histidin und Cystein (28 Histidin und 4 Cystein von 60 Gesamt-Aminosäuren). *In vitro* wurde die Bindung von Zink und Nickel an das

Protein nachgewiesen [102]. Da isogene Hpn-Mutanten nur eine erhöhte Sensibilität gegenüber hohen Nickelkonzentrationen aufwiesen, scheint Hpn eine ausschließliche Schutzfunktion gegenüber Nickel auszuüben. Diese Mutation hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ureaseaktivität, was darauf hinweist, dass Hpn keine Funktion im Nickeltransport oder in der Urease-Apoprotein-Aktivierung ausübt [173]. *H. pylori* enthält zudem ein Homolog zu NikR, dem "nickel responsive regulator" von *E. coli*, der in *E. coli* vergleichsweise wie Fur bei Eisen die Transkription von Nickelaufnahmesystemen in Gegenwart hoher Nickelkonzentrationen reprimiert. Überraschenderweise hatte NikR von *H. pylori* jedoch keinen Einfluss auf die Expression der Urease oder der GroELS Chaperone, welche ebenfalls in den Nickelstoffwechsel involviert sind [61, 135].

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der zunehmenden Antibiotika-Resistenzentwicklung bei *H. pylori*, kann die Kenntnis von Mechanismen der Metallionen-Homöostase die Entwicklung von neuen Strategien zur Heilung oder Prävention einer *H. pylori*-Infektion fördern. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit Funktionen des Metallstoffwechsels in der Adaption an das Habitat Magen untersucht werden. Da inzwischen Makro- und Mikro-DNA-Arrays für *Helicobacter pylori* kommerziell erhältlich sind und die Beantwortungen von Fragestellungen in Diagnostik und Forschung erleichtern, sollte durch genomweite Analysen die Eisenregulation analysiert und neue Proteine der Kupfer-Homöostase identifiziert werden. Weiterhin sollte die Rolle der Eisenspeicherung in der Adaptation an das Habitat Magen ermittelt werden. So sollte der Einfluss des Ferritins Pfr auf das Kolonisierungsverhalten von *H. pylori* im Tiermodell und auf die Säure-Vermittelte Eisentoxizität *in vitro* analysiert werden. In Bezug auf die Regulation der Ferritinbiosynthese wurden auch die Analyse der Bindung des Metallabhängigen Regulators Fur an den Pfr-Promotor und die Erstellung einer genomweiten Analyse des Fur-Regulons als Ziele definiert. Zudem sollte der globale Einfluss von Eisen auf den Stoffwechsel des Bakteriums anhand des Pathogenitätsfaktors Urease näher erörtert werden. Dabei standen mögliche Verknüpfungen des Eisen- und des Nickelstoffwechsels im Vordergrund. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der globalen Analyse des Kupferstoffwechsels von *H. pylori*. Da über Aufrechterhaltung der Kupfer-Homöostase bisher sehr wenig bekannt war, war es ein Ziel mittels DNA-Array-Hybridisierung neue Proteine des Kupferstoffwechsels zu identifizieren und anschließend funktionell zu charakterisieren.

2. Material

2.1 Chemikalien

[α - ³³ P]dCTP	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Agarose	peq Lab, Erlangen
Alkalines Hypochlorid	Sigma, Steinheim
Amoniumperoxosulfat (AMPS)	Sigma, Steinheim
ATP	Pharmacia, Freiburg
Bacto Agar	Difco, Augsburg
Bacto Trypton	Difco, Augsburg
Brucella Broth Medium, Fertigmischung	Difco, Augsburg
BSA	Roche, Mannheim
CDP-Star TM	Roche, Mannheim
Chloramphenicol	Sigma, Steinheim
DENT-Supplement	Oxoid, Basingstoke (UK)
Desoxyribonukleotide	BIG Biotech, Freiburg
Dithiothreitol	Sigma, Steinheim
DryStrip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Riedel-deHaën, Seelze
Ethanol	J.T. Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
First Strand Buffer	Gibco BRL; Wiesbaden
FKS	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Lysozym	Sigma, Steinheim
Methanol	Merk, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker (1 Kb-Marker)	Gibco BRL, Karlsruhe
Natrium-Chlorid	Merk, Darmstadt
Nickel-Chlorid	Sigma, Steinheim
Oligonukleotide	BIG Biotech, Freiburg
PCR-Puffer 10x (konzentriert)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenol-Nitroprussid	Sigma, Steinheim
Polyvinylpyrrolidone (Mr = 90 kDa)	Serva, Heidelberg
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Primer-Mix für die cDNA-Synthese	Eurogentech, Belgien
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer (NL)
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
TEMED	Merk, Darmstadt
Tris	Sigma, Steinheim
TTC	Sigma, Steinheim

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2 Kits

Cat-Elisa-Kit	Roche, Mannheim
PRISM Ready Reaction Dye Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
„DIG RNA-labeling Kit“	Roche, Mannheim
„QIAamp DNA Mini Kit“	Quiagen, Hilden
„QIAprep Spin Mini Preparation Kit“	Quiagen, Hilden
„QIAfilter Plasmid Midi Preparation Kit“	Quiagen, Hilden
„QIAquick PCR Purification Kit“	Quiagen, Hilden
„QIAquick Gel Extraction Kit“	Quiagen, Hilden

2.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Bakterien-Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Cat- Elisa- Reader TECAN Sunrise	TECAN Deutschland, Crailsheim
Cellstar 50 ml Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Cryotubes Microbank™	Pro-Lab Diagnostics, Ontario (Canada)
Dampf-Autoklav Typ 23	Melag, Berlin
Elektrophorese-Hoefer-Kammer SE600	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammer DNA Sub Cell	BioRad, München
Elektrophoresekammer Mini Protean II™	BioRad, München
Elektrophoresis Power Supply EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Falcon-Tubes (25 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Feinwaage 1608 MP	Sartorius, Göttingen
Fireboy eco Typ 1193	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Gel-Dokumentationsgerät EASY Image Plus	Hero Lab, Wiesloch
Geltrockner Easy Breeze Gel Dryer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPGphor-Kammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech, Stuttgart
Küvetten (halb-mikro, 10x10x45)	Greiner, Frickenhausen
Lichtmikroskop 60449	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Labortechnik, Staufen
Metallblock-Thermostat TCS	Labortechnik Barkey, Bielefeld
pH-Meter Modell pH537	WTW, Weilheim
Phosphor-Imager MD Storm860	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phosphorscreen	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten Finnpipette	Thermo Labsystems, Helsinki (Finnland)
Power Supply Model 200/2.0	BioRad, München
Reaktionsgefäße (0.65 ml)	Peqlab, Erlangen
Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sequenzierer ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Sicherheitswerkbank Herasafe (Klasse II)	Heraeus Instruments, Stuttgart
Sorvall RC-5B Refrigerated Centrifuge	Kendro, Newtown (USA)
SpeedVac HetoVac VR-1/120/240	Heto Lab, Wiesloch
Thermocycler Techne Progene / Genius	Labtech International, Burkhardtsdorf
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Universalschüttler KS 10	Edmund Bühler, Tübingen
UV/Visible Spectrophotometer Ultraspec 4000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
UV-Transilluminatoren	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	AEG, Nürnberg

Vortex Heidolph REAX 1R
Waage PC 2000

Bender & Hobein GmbH, Freiburg
Mettler, Greifensee (Schweiz)

2.4 Software

ArrayVision™ 6.0
BioChipExplorer
Clone Manager Version 4.0
Chromas Version 1.51
Easy Image Plus
Expressionist
GeneSpring 4.14
PhyloSopher
Primer Designer Version 1.02
Terminator-Programm

Imaging Research Inc, USA
GPC-Biotech, München
Scientific & Educational Software
Technelysium Pty Ltd., Australien
Herolab, Wiesloch
Gene-Data, Basel, Schweiz
Silicon Genetics, USA
Gene-Data, Basel, Schweiz
Scientific & Educational Software
GCG-Software

2.5 Enzyme

Restriktionsemzyme
Reverse Transkriptase (Superscript II)
Pwo-DNA-Polymerase
Taq-DNA-Polymerase
T4-DNA-Ligase

Roche, Mannheim
Invitrogen, Karlsruhe
Peqlab, Erlangen
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Roche, Mannheim

2.6 Puffer und Nährmedien

Es wurde mit sterilen Medien und Materialien gearbeitet: Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0.2 µm), hitzestabile Lösungen wurden autoklaviert (121 °C, 1 atü, 20 min).

2.6.1. Lösungen und Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien

2.6.1.1 Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin (10 mg/ml):	200 mg gelöst in 20 ml bidest. Wasser, sterilfiltriert
Chloramphenicol (2 mg/ml):	40 mg gelöst in 20 ml abs. Ethanol
Kanamycin (2 mg/ml):	40 mg gelöst in 20 ml bidest. Wasser, sterilfiltriert
Tetracyclin (2 mg/ml):	40 mg gelöst in 20 ml bidest. Wasser, sterilfiltriert

2.6.1.2 Nährmedien

Dent-Agar:	500 ml Agar, 50 ml lysiertes Pferdeblut, DENT-Supplement (5.0 mg Vancomycin, 2.5 mg Trimethoprim, 2.5 mg Cefsulodin, 2.5 mg Amphotericin B) gelöst in 2 ml bidest. Wasser, 2 ml TTC-Lösung 1 % [31, 33]
------------	---

Brucella-Flüssigmedium:	28 g Brucella Broth, 1 Liter bidest. Wasser
LB-Flüssigmedium:	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g Natriumchlorid, 1 Liter bidest. Wasser
LB-Agar:	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g Natriumchlorid, 16 g Agar, 1 Liter bidest. Wasser

Zusatz von 20 µg/ml (Chloramphenicol, Kanamycin, Tetracyclin) und 100 µg/ml (Ampicillin) zu den Nährmedien.

2.6.1.3. Stammlösungen der Metal- und anderer Ionen

Ammoniumchlorid 5 M in H₂O dest

Eisenchelator-Stammlösung(≡ Eisen-Chelator Dessferrioxamin B): 10 mM und 100 mM in H₂O bidest.

Eisen(II)chlorid 100 mM in 10 mM HCl

Harnstoffstammlösung 5 M in H₂O dest

Kupferchlorid 100 mM in H₂O dest.

Kobaltchlorid 100 mM in H₂O dest.

Kadmiumchlorid 10 mM in H₂O dest

Natriumchlorid: 100 mM NaCl in H₂O dest.

Nickelchlorid: 100 mM in H₂O dest.

Manganchlorid: 10 mM in H₂O dest

Wismutcitrat : 10 mM in 1 M HCl

Zinkchlorid: 100 mM in H₂O dest

2.6.2. Lösungen und Puffer für die DNA-Analyse

2.6.2.1. Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TBE („Tris Borsäure EDTA“): 10.8 g Tris, 5.5 g Borsäure, 4.0 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), auf 1 l mit ddH₂O auffüllen

Proben-Puffer (10x.): 200 mM Tris-Acetat (pH 8), 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 0.1 % Bromphenolblau, 0.1 % Xylen-Zyanol, 0.1 % Orange G

Ethidiumbromidstammlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid in bidest. Wasser

Ethidiumbromidfärbebad: 1 mg/l Ethidiumbromid in bidest. Wasser

2.6.2.2. Lösungen zur Hybridisierung von Makroarrays

SSPE-Puffer:	0.18 M NaCl, 10 mM Natriumphosphat (pH 7,7), 1 mM EDTA
Prähybridisierungslösung:	5x Denhardts-Lösung, 5x SSC, 0.5 % (w/v) SDS, 30 Minuten vor Gebrauch auf 37 °C erwärmen und 100 µg/ml zugeben
Hybridisierungspuffer (10x):	100 mM Tris/HCl (pH 7,9), 10 mM EDTA, 2,5 M KCl
50x Denhardts-Lösung:	5 g Ficoll Typ 400, 5 g Polyvinylpyrrolidon (Mr = 90), 5 g BSA (Mr = 67 kDa), ad 500 ml H ₂ O bidest. steril filtriert und bei -20 °C gelagert.
Stripping-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 % SDS, ad 1 l H ₂ O dest.
Waschlösung I	2x SSC, 0.1 % (w/v) SDS
Waschlösung II	0.1x SSC, 0.1 % (w/v) SDS, über Nacht bei 68 °C vorgewärmt

2.6.2.3. Puffer für PCR, DNA-Ligation und DNA-Restriktion

PCR-Puffer (10x.):	500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris-HCl (pH 9.0); Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
T4-DNA-Ligase 10x Puffer:	300 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP
Puffer für Restriktionsanalysen:	Roche, Mannheim

2.6.2.4. Puffer für die Plasmidpräparation

Die Präparationen der Plasmid-DNA und bakterieller Gesamt-DNA, sowie die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgten mit Hilfe mehrerer Kits (s.o.) von Qiagen (Hilden) unter Verwendung folgender Puffer:

P1:	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A Vor dem ersten Gebrauch wurde RNase hinzugefügt und anschließend bei 4 °C gelagert.
P2:	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3:	3.0 M KAc, pH 5.5
QBT:	750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15 % Isopropanol, 0.15 % Triton X-100
QC:	1.0 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15 % Isopropanol
QF:	1.25 M NaCl, 50 mM Tris, Tris-HCl (pH 8.5), 15 % Isopropanol
TE:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Die Lagerung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.6.3. Lösungen und Puffer für die RNA-Analyse

2.6.3.1. Puffer für den Northern Blot

Blocking-Stammlösung:	10 % (w/v) Blocking-Pulver (Roche) in Maleinsäurepuffer; autoklaviert; Lagerung bei 4 °C
Blocking-Lösung:	1 % Blocking-Stammlösung in Maleinsäurepuffer (vor der Verwendung hergestellt)
Chemolumineszenz-Substrat:	CDP-Star™, ready-to-use (Roche, Mannheim)
Detektionspuffer:	0.1 M Tris (pH 9.5), 0.1M NaCl, 0.01 M MgCl
Maleinsäurepuffer:	0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl, mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt; autoklaviert
Methylenblau-Lösung:	0.5 M Na-Acetat (pH 5.2), 0.04 % Methylenblau
Prähybridisierungslösung:	25 ml SSC (20x.), 50 ml Formamid, 200 µl SDS (10 %), 20 ml Blocking-Stammlösung (10 %), ad 100 ml H ₂ O bidest
SSC-Puffer (20x):	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA

2.6.3.2. Puffer für RNA-Präparationen und RNA-Gelelektrophorese

DEPC-Wasser:	0.1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) in H ₂ O bidest; autoklaviert
Lysepuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM NaCl, 1 mM Natriumcitrat, 1.5 % (w/v) SDS, autoklaviert
Lysozymlösung:	50 mg/ml Lysozym in Protoplastenpuffer
Natriumchloridlösung:	40 g NaCl in 100 ml DEPC-Wasser (gesättigt), autoklaviert
MOPS-Laufpuffer:	100 ml MOPS-Puffer, ad 1 l H ₂ O
MOPS-Puffer (10x.):	200 mM MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure), 50 mM Na-Acetat, 100 mM EDTA, mit NaOH auf pH 7 eingestellt
Protoplastenpuffer:	15 mM Tris-HCl (pH 8), 0.45 M Sucrose, 8 mM EDTA,
Probenpuffer:	20 µl MOPS-Laufpuffer (10x), 35 µl Formaldehyd (37 %), 100 µl Formamid, 845 µl DEPC-Wasser

2.6.4. Lösungen und Puffer für die Protein-Analyse

2.6.4.1. Lösungen zur Aufreinigung rekombinanter Proteine

Puffer W:	100 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
-----------	--

Puffer E:	100 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 2.5 mM Desthiobiotin
WaschpufferI (pH 8)	0.5 % Triton-X 100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Na-Azid, 1 mM DTT frisch zugesetzt
WaschpufferII	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Na-Azid, 1 mM DTT frisch zugesetzt
Harnstofflösung	25 mM MES (2-Morpholinoethansulfonsäure) 8 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 1 mM DTT frisch zugesetzt

2.6.4.2. Lösungen für den CAT-ELISA:

Die Erstellung des CAT-ELISAs erfolgte mit Hilfe des CAT-ELISA-Kits (Roche, Mannheim) unter Verwendung folgender Puffer:

CAT-Enzym Stocklsg.:	100 ng/ml in bidest. H ₂ O
Anti-CAT-DIG Stocklsg.:	0.2 mg/ml in bidest. H ₂ O
Anti-DIG-POD Stocklsg.:	20 U/ml in bidest. H ₂ O

2.6.4.3. Lösungen für die Durchführung der Westernblot-Analysen

Blocking-Puffer:	3 g BSA, auf 100 ml mit bidest. Wasser auffüllen
Blotting-Puffer:	3 g Tris, 11.25 g Glycin, 900 ml bidest. Wasser, 100 ml Methanol
Detektionslösung:	Sigma Fast TM BCIP/NBT gepufferte Substrattabletten (Sigma): 100 mM Tris-HCl (pH 9.6), 0.15 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Dinatriumsalz), 0.3 mg/ml NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), 5 mM MgCl ₂
TBS-Puffer:	150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen
Waschpuffer:	5 ml Tween 20, auf 1 l mit bidest. Wasser auffüllen

2.6.4.4. Lösungen für die isoelektrische Fokussierung

Lysis-Puffer:	8 M Harnstoff (19.2 g), 4 % CHAPS (3-Cholamidopropyl-3-dimethylammoniol-1-propansulfonat, 1.6 g), 40 mM Tris base (0.194 g) ad 40ml H ₂ O dest, 500 µl Aliquots wurden bei -20 °C gelagert
Rehydratisierungs-Lösung:	8M Harnstoff (12 g), 2 % CHAPS (0.5 g), 0.5 % IPG-Puffer TM (125 µl), einige Körnchen Bromphenolblau, ad 25ml H ₂ O dest, 500µl Aliquots wurden bei - 20 °C °C gelagert, vor Gebrauch

wurden 9.334µl einer 1 M DTT (Dithiothreitol)-Lösung zugegeben.

SDS-Äquilibrierungspuffer: 50mM Tris-HCl (6.7 ml einer 1.5M Tris-HCl-Lsg., pH 8.8), 6 M Harnstoff (72.07 g), 30 % Glycerin (99 %, 60 ml), 2 % SDS (Sodiumdodecyl-sulfat, 4 g), einige Körnchen Bromphenolblau, 40ml Aliquots wurden bei – 20 °C gelagert, vor Gebrauch wurden 400mg DTT (1 M) zugegeben

2.6.4.5.Lösungen für die Proteinbestimmung nach Bradford [15]

PBS-Puffer: 40 g NaCl, 1 g KH₂PO₄, 14.5 g Na₂HPO₄, 1 g KCl, (1 g NaN₃), auf 5 l mit bidest. Wasser auffüllen

Bradford-Stammlösung: 100 ml Ethanol (95 %), 200 ml Phosphorsäure (88 %), 350 mg Serva Blue G

Bradford Arbeits-Lösung: 15 ml Ethanol (95%), 30 ml Phosphorsäure (88%), 30 ml Bradford-Stammlösung, 425 ml bidest. Wasser

2.6.4.6.Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bottom Gel Stammlösung: 36.3 g Tris, 8 ml SDS (10 %) pH 8.8, auf 200 ml mit bidest. Wasser auffüllen

Upper Gel Stammlösung: 6 g Tris, 4 ml SDS (10 %) pH 6.8, auf 100 ml mit bidest. Wasser auffüllen

Elektrophoresepuffer: 15 g Tris, 72 g Glycin, 50 ml SDS (10 %), auf 5 l mit bidest. Wasser auffüllen

Probenpuffer nach Lämmli [146]: 0.755 g Tris, 20 ml SDS (10 %) pH 6.8, 9 ml Glycerin, 4.5 ml Mercaptoethanol, 1 mg Bromphenolblau, auf 100 ml mit bidest. Wasser auffüllen

2.6.4.7. Lösungen für die Proteinfärbungen

Coomassie-Färbelösung: 2 g Serva Blau G, 250 ml Isopropanol, 100 ml Essigsäure, 600 ml H₂O dest

Coomassie-Entfärber: 100 ml Isopropanol, 100 ml Essigsäure, 800 ml H₂O dest

Fixierlösung: 30 % (v/v) Ethanol (95 %), 10 % (v/v) Essigsäure (100 %), ad 11 H₂O dest.

Reducer:	30 % (v/v) Ethanol (95 %), 10 mM Natriumacetat (2.5 ml einer 4 M Natriumacetatlsg.) ad 100 ml H ₂ O dest.; auf pH 6 mit Essigsäure einstellen und anschließend 100 mg Natriumthiosulfat zugeben; immer frisch angesetzt
Silbernitratlösung:	0.1 % AgNO ₃ (w/v), 25 µl Formaldehyd (37 %) ad 100 ml H ₂ O dest.
Entwickler:	2.5 % Na ₂ CO ₃ (w/v), 50 µl Formaldehyd (37 %) ad 100 ml H ₂ O dest

2.6.4.8. Lösungen für die Ureasebestimmung

PEB-Urea-Puffer:	100 mM Di-Natrium-Phosphat (pH 7.5), 10 mM EDTA, 50 mM Harnstoff
Phenol-Nitroprussid (Sigma)	50 g/L Phenol, Natrium-Nitroprussid, Stabilisatoren
Alkalines Hypochlorid (Sigma):	0.2 % Natrium-Hypochlorid in alkal. Lösung

2.6.5. Lösungen und Puffer für die DNA-Protein-Interaktion (EMSA)

Acetylphosphat:	50 mM in Bindepuffer
Bindepuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM DTT, 5% Glycerin
7% Polyacrylamid-Gel (50 ml):	12.5 ml 10x TBE, 11.65 ml Polyacrylamid, 28.85 ml bidest. Wasser, 500 µl AMPS, 50 µl Temed

2.7 Verzeichnis der Antiseren

- UreA-Antikörper Antiserum HPM-5021-5 (IgG) ;Firma IBT (Reutlingen)
- Ure-B-Antiserum SE744 von Altanapharma, Konstanz
- Ferritin-spezifisches Antiserum hergestellt im Kaninchen gegen Pfr (Ferritin)-Protein von *H. pylori* AK 198 [30]
- Antikörper gegen den Strep-tag des IBA-Systems: Strep-Tactin Alkalische Phosphatase-Konjugat
- Protein-A Alkalische Phosphatase-Konjugat von Sigma

2.8 Verzeichnis der Bakterienstämme und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 6,7 und 8 gelistet:

Tabelle 6: Stämme des Bakteriums *H. pylori*

Stamm	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
1061	wt, <i>cagA</i> ⁻ , Referenzstamm	[39]
1061-FUR	wie 1061 aber <i>fur::cat</i> ; Cm ^R	
106-nikR/fur	wie 1061 aber <i>fur::cat</i> und <i>nikR::km</i> ; Cm ^R , Km ^R	
26695	wt, <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> ⁺ (s 1 b/m 1), Referenzstamm	J. F. Tomb [256]
26695-1326	wie 26695 aber <i>1326::cat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
26695-1327	wie 26695 aber <i>1327::pcat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
26695-1328	wie 26695 aber <i>1328::pcat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
26695-HspR	wie 26695 aber <i>HspR::pcat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
26695-1364	wie 26695 aber <i>1364::pcat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
26695-1365	wie 26695 aber <i>1365::pcat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
NCTC 11638	wt, <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> ⁺ (s1a/m1)	NCTC
NCTC11638-FUR	NTCT 11638, aber <i>fur::cat</i> , Cm ^R	F. Faßbinder
G27	wt, <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> ⁺ , (s1a/m1)	A. Covacci
G27-PFR1	wie G27 aber <i>pfr::cat</i> , Cm ^R	U. Waidner, [30]
G 1.1	wt, Gerbil-adaptierter Referenzstamm	H.P. Wirth
G 1.1-PFR	wie G 1.1 aber <i>pfr::cat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
G 1.1-CagA	wie G 1.1 aber <i>cagA::cat</i> ; Cm ^R	diese Arbeit
P1 (69a)	wt, <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> ⁺ (s 1 a/m 1)	R. Haas (München)
N6	wt, <i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> ⁺ , Referenzstamm	

Antibiotika-Resistenzen: Cm^R, Chloramphenicol; Km^R, Kanamycin;

Tabelle 7: Stämme des Bakteriums *E. coli*

Stamm	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
XL1-Blue	<i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk⁻</i> , <i>mk⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac[F'</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>ZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene, Amsterdam
MC4100	F ⁻ , <i>araD139Δ</i> (<i>argF-lac</i>)U169, <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flhD5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>fruA25</i> , <i>rbsR22</i>	Casadaban, M.J. [48]
MC4100-pASK3	wie MC4100 aber mit pASK3 ohne Insert, Tet ^R ,	diese Arbeit
MC4100-pASK-1326	wie MC4100 aber mit pASK3-1326; Tet ^R , Amp ^R	diese Arbeit
BL-21	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i> ; an <i>E.coli</i> B strain) <i>gal</i>	Stratagene, Amsterdam
Top10	F ⁻ , <i>mcrA Δ</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZΔM15 Δ</i> (<i>lacX74</i>), <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139 Δ</i> (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen BV, Groningen

Antibiotika-Resistenzen: Cm^R, Chloramphenicol; Km^R, Kanamycin; Amp^R, Ampicillin, Tet^R,
Tetracyclin-Resistenz;

Tabelle 8: Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pTnMax5	<i>lacI^q</i> , <i>tnpR</i> , <i>tnpA</i> , <i>res</i> , <i>ori_{td}</i> , <i>cat_{GC}</i> , Cm ^R	R. Haas (München), [132]
pZErO TM -2	<i>lacZα-ccdB</i> Fusionsgen, <i>ori_{f1}</i> , <i>ori_{pMB1}</i> , MCS, Km ^R	Invitrogen BV, Groningen
p1326CAT	pZErO TM -2 mit einem 2315 Bp großen DNA-Fragment, das das <i>cat</i> - Gen von pTnMax5 ohne Promotor inseriert in das HP1326-Gen des <i>H.</i> <i>pylori</i> Stammes 26695 enthält	diese Arbeit
p1327PCAT	pZErO TM -2 mit einem 1955 Bp großen DNA-Fragment, das das <i>cat</i> - Gen von pTnMax5 mit Promotor inseriert in das HP1327-Gen des <i>H.</i> <i>pylori</i> Stammes 26695 enthält	diese Arbeit
p1328PCAT	pZErO TM -2 mit einem 1966 Bp großen DNA-Fragment, das das <i>cat</i> - Gen von pTnMax5 mit Promotor inseriert in das HP1328-Gen des <i>H.</i> <i>pylori</i> Stammes 26695 enthält	diese Arbeit
p1329PCAT	pZErO TM -2 mit einem 1998 Bp großen DNA-Fragment, das das <i>cat</i> - Gen von pTnMax5 mit Promotor inseriert in das HP1329-Gen des <i>H.</i> <i>pylori</i> Stammes 26695 enthält	diese Arbeit
pHspRCAT	pZErO TM -2 mit einem 1878 Bp großen DNA-Fragment, das das <i>cat</i> - Gen von pTnMax5 mit Promotor inseriert in das <i>hspR</i> -Gen des <i>H.</i> <i>pylori</i> Stammes 26695 enthält	diese Arbeit

Plasmid	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
p1364PCAT	pZErO™-2 mit einem 2057 Bp großen DNA-Fragment, das das <i>cat</i> -Gen von pTnMax5 mit Promotor inseriert in das HP1364-Gen des <i>H. pylori</i> Stammes 26695 enthält	diese Arbeit
p1365PCAT	pZErO™-2 mit einem 2155 Bp großen DNA-Fragment, das das <i>cat</i> -Gen von pTnMax5 mit Promotor inseriert in das HP1365-Gen des <i>H. pylori</i> Stammes 26695 enthält	diese Arbeit
pASKIBA-7™	Expressionsvektor, MCS, Tet ^R , P _{tet} , Amp ^R	IBA, Göttingen
pASKIBA-7™-FUR	pASKIBA-7™ mit einem 483 Bp großen DNA-Fragment des <i>fur</i> -Gens des <i>H. pylori</i> Stammes NCTC11638	diese Arbeit
pASKIBA-3™	Expressionsvektor, MCS, Tet ^R , P _{tet} , Amp ^R	IBA, Göttingen
pASK-1326	pASKIBA-3™ mit einem 377 Bp großen DNA-Fragment des HP1326-Gens des <i>H. pylori</i> Stammes 26695	diese Arbeit
pASK-1327	pASKIBA-3™ mit einem 1238 Bp großen DNA-Fragment des HP1327-Gens des <i>H. pylori</i> Stammes 26695	diese Arbeit
pASK-1328	pASKIBA-3™ mit einem 1016 Bp großen DNA-Fragment des HP1328-Gens des <i>H. pylori</i> Stammes 26695	diese Arbeit
pASK-1365	pASKIBA-3™ mit einem 641 Bp großen DNA-Fragment des HP1365-Gens des <i>H. pylori</i> Stammes 26695	diese Arbeit

Antibiotika-Resistenzen: Tet^R: Tetracyclin; Km^R, Kanamycin; Amp^R, Ampicillin; Cm^R, Chloramphenicol

2.9 Verzeichnis der Oligonukleotide

Für die DNA-Amplifikation, die DNA-Sequenzierung, die RNA-Sonden-Herstellung und die PCR-Analysen wurden Oligonukleotide verwendet, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und von der Firma BIG Biotech (Freiburg) hergestellt wurden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
UREA-L1	ATGAAACTCACCCCAAAGA
UREA-R1T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAAGTGTGAGCCGATTGA
UREI-L1	ATGCTAGGACTTGTATTGTT
UREI-R1T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGATAAAGAGCAACCAAGCA
FUMC-L1	CCCGCCTATGGCTAATTCTC
CAT1326-R1	<u>CTCCTGAAAATCTCGG</u> ATTACATTAAGATAACAAGAA
CAT1326-L1	<u>TGGCAGGGCGGGGCGTA</u> AGGATTTATAAGAGCATGCTA
FUMC-L2	GTTAACTACCGCCAGACTCC
1326-R2	TTCACTTCCAAGTCATTAGC
1327-R1	TTTCTTCATCAAGCCTGGCG
1326-R1T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGA TTATAAATCCAGGCTTGTTT
1327-L1	TTATAAGCGCGTTTGATAAA
PCAT1327-R1	<u>GGCGGATTAACAAAAACCGG</u> AGCGCTTCTTCTAAATTGTTT
CAT1327-L1	<u>TGGCAGGGCGGGGCGTA</u> ATCTATGGGTGAATTGGCTTT
1327-R2	TTGTAAAGACAAATAAGTGC
1327-R1T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGA GCGCTTCTTCTAAATTGTTT
1328-L1	TACAACGCTTATTACAACGC
PCAT1328-R1	<u>GGCGGATTAACAAAAACCGG</u> AAATAATGCCGTTGAAGTGAG
CAT1328-L1	<u>TGGCAGGGCGGGGCGTA</u> ATCAAATCATAGATTTAAGCC
1328-R1	CTTAAATCCGGCAAAGCGTC
1328-R1T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGA AATAATGCCGTTGAAGTGAG

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
1329L1	ACCAGCGTGTATGACAGGAG
PCAT1329R1	<u>GGCGGATTAACAAAAACCGGACAAGCTCACGCCATAAATTT</u>
CAT1329L1	TGGCAGGGCGGGGCGTAA TTAATAGCAAGCGTCCTGGG
1329-R1T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGA CAAGCTCACGCCATAAATTT
1364-L1	GGCAATTAGCGCTACAATAC
PCAT1364-R1	<u>GGCGGATTAACAAAAACCGGACTAATCACTAGCATCAACAC</u>
CAT1364-L1	<u>TGGCAGGGCGGGGCGTAAACAAGATCACAGAATTAAGC</u>
1364-R1	CCTATCACGCAGTCTATTAA
1365-L1	AGAGAGATTATCATAATTGG
PCAT1365-R1	<u>GGCGGATTAACAAAAACCGGACTCCTTAACGCTCTCGCTTA</u>
CAT1365-L1	<u>TGGCAGGGCGGGGCGTAAATCCACCTTGCGCACTTATA</u>
1365-R1	GGCGGTGTTGTTGGTTGTCT
CATS1	TCCGGTTTTTGTTAATCC GCC
CATS2	TCCGAG ATTTTCAGGAG
CATAS1	TTACGCCCCGCCCTGCCA
1428-L1	GCGCAGTCTAGGCTATCGTT
1428-R1T7	CTAATACGACTCACTATAGGGAGA CCGTATGCGTGTCTTGTCAA
1326ASK3-L1	ATGGTAGGTCTCAAATGAAAAAGTTAGCCGCTTTATTTTTAGTA
1326ASK3-R1	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTAAATCCAGGCTTGTTTTAGCGCG
1327ASK3-L1	ATGGTAGGTCTCAAATGCTATCTTTTATAAGCGCGTTTGATAA
1327ASK3-R1	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTTCTAATCCTTTAAGGTTTTGTAAAGA
1328ASK3-L1	ATGGTAGGTCTCAAATGAAACGGATTTTATGGTTAGCCTTGA
1328ASK3-R1	ATGGTAGGTCTCAGCGCTATAATCCCATTTGTTTTGAGCGTC
1365ASK3-R1	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTAGTGGGTTAAAGCGATAGCCAAC
FURSK7-L1	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGAAAAGATTAGAACTTTAGAATCTA
FURSK7-R1	ATGGTAGGTCTCATATCAACATTCCTCTCTTGGCATTCTTTA

Zur *cat*- bzw. *Pcat*-Kassette komplementäre Anteil der Oligonukleotide sind unterstrichen.

3. Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien

3.1.1. Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden über Nacht auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden 100 ml LB-Medium [165] mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Anzucht in Flüssigmedium erfolgte in Erlenmeyerkolben bei 140 U/min, wobei das Kulturvolumen 1/5 des Kolbenvolumens betrug. Für Wachstumsexperimente mit *E. coli*, bei denen das Verhalten der Bakterien unter verschiedenen Metallkonzentrationen in Gegenwart verschiedener Plasmide untersucht werden sollte, wurden zunächst 10 ml Vorkulturen, die das entsprechende Antibiotika enthielten, über Nacht hergestellt und Optische Dichte (OD) bei 550 nm gegen einen Leerwert mit Kulturmedium bestimmt. Diese Vorkulturen wurden im Kühlraum bei 4 °C gelagert und regelmäßig erneuert. Die Kultivierung zum Vergleich des Wachstums erfolgte in 50 ml Falcon-Röhrchen, wobei 10 ml LB-Flüssigmedium mit einem Aliquot der Vorkultur beimpft wurde, das 100 µl einer OD von 1 entsprach. Die OD der einzelnen Kulturen wurden nach 24 Stunden gegen einen Leerwert mit Kulturmedium gleicher Metallkonzentration gemessen. Für die Lagerung wurden 0.8 ml der Bakteriensuspension aus einer bewachsenen Flüssigkultur entnommen, mit 0.2 ml 86 %igem Glycerin gemischt und bei –80 °C zur Lagerung eingefroren. Zur Reaktivierung genügte ein Verdünnungsausstrich auf Agarplatten gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 37 °C.

3.1.2. Kultivierung und Lagerung von *Helicobacter pylori*

Die Routinekultivierung von *H. pylori* wurde auf DENT-Blutagar [31, 33] unter microaeroben Bedingungen (6 % O₂, 10 % CO₂, in N₂, Messer Griesheim) bei 37 °C durchgeführt. Für die Experimente, in denen das Verhalten von *H. pylori* unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden sollte, wurden 15 ml-Vorkulturen aus Kolonien, die für zwei Tage auf DENT-Blutagarplatten gewachsen waren, hergestellt. Die weitere Kultivierung erfolgte in Brucella-broth-Flüssigmedium angereichert mit 5 % fetalem Kälberserum (BBF) [31] unter microaeroben Bedingungen. Dazu wurde die Atmosphäre in Anaerobier-Töpfen zu 0.6 bar mit einem definierten Gasgemischen aus 90 % Stickstoff und 10 % Kohlendioxid ersetzt. Nach 24 Stunden wurde die optische Dichte (OD, 600 nm) der Vorkultur bestimmt und unter dem Mikroskop auf Kontamination und Vitalität kontrolliert. Für weitere 15 ml-Kulturen mit

verschiedenen Metallkonzentrationen und erniedrigten pH-Werten wurde ein Aliquot der Vorkultur eingesetzt, das 100 µl einer OD von 1 entsprach. Metall-Überschuß wurde durch Zusatz von Metallchloridlösungen erreicht, Eisenmangelbedingungen wurden durch Zusatz des Eisen-Chelators Desferrioxamin B (Desferal) erzeugt. Der pH-Wert wurde durch Titration des BBF-Mediums mit 1 N Salzsäure erniedrigt. Um osmotische Einflüsse ausschließen zu können, wurde eine Kultur mit einer der höchsten Metallmolarität entsprechenden Natriumchloridkonzentration als Kontrolle mitgeführt. Die OD der einzelnen Kulturen wurden nach 24 und 48 Stunden gemessen. Anschließend erfolgte wieder eine Kontaminations- und Vitalitätskontrolle unter dem Mikroskop. Zur dauerhaften Lagerung von *H. pylori*-Stämmen wurden 48 Stunden alte Kulturen der Routinekultivierung mikroskopisch auf Kontamination und Vitalität überprüft und zusätzlich durch positive Katalase-, Oxidase- und Urease-Reaktion als *Helicobacter* bestätigt. Mit einem sterilen Wattetupfer wurden Microbank™ Cryotubes beimpft, überschüssige Flüssigkeit mit einer sterilen Pipettenspitze abgezogen und die Bakterien bei -80 °C eingefroren. Zur Reaktivierung wurden Microbank™ Cryotubes-Kügelchen mit Bakterien auf DENT-Blutagarplatten aufgebracht oder in Flüssigmedium gelegt und anschließend für 2 bis 4 Tage kultiviert.

3.2. Methoden zur DNA-Analyse

3.2.1. PCR-Technik

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *engl.* Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die spezifische Vermehrung (Amplifikation) definierter DNA-Fragmente durch wiederholte Synthese mit einer thermostabilen DNA-Polymerase [181]. In einem Reaktionsgemisch aus Magnesiumchlorid, Desoxy-Nukleotiden und DNA-Polymerase hybridisieren zwei kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) an die beiden Enden des zu vermehrenden DNA-Fragments und starten den Einbau der Nukleotide durch die DNA-Polymerase. Die Reaktion verläuft zyklisch wobei die Temperatur in jedem Zyklus dreimal verändert wird. Bei 93 °C trennen sich die beiden Einzelstränge der Ausgangs-DNA. Nach Absenkung der Temperatur auf 40 bis 60 °C binden die Primer an die Einzelstränge (Annealing) und bilden kurze Doppelstrang-Bereiche, deren freie 3'-Enden von der DNA-Polymerase erkannt werden. Anschließend wird die Temperatur auf 72 °C, das Temperatur-Optimum der DNA-Polymerase, erhöht, und es kommt, ausgehend vom 3'-Ende der Primer-Hybride, an beiden Einzelsträngen zur Synthese des Komplementärstrangs. In einem Zyklus entstehen aus einem Ausgangs-Doppelstrang zwei neue, die je zur Hälfte *de novo* synthetisiert wurden. Bei

vielfacher Wiederholung der Reaktion wird das DNA-Fragment zwischen beiden Primern exponentiell vermehrt. Theoretisch entstehen während 30 Zyklen 2^{30} DNA-Moleküle, die anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, dargestellt und analysiert werden.

3.2.1.1. Allgemeine Reaktionsparameter für die PCR

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Eine Standardreaktion enthielt 10 bis 100 ng Proben-DNA zusammen mit je 25 pmol (140 ng) der beiden Primer. Die Komponenten wurden am Boden eines Reaktionsgefäßes wie folgt gemischt: 21 μ l bidest. Wasser (ad 50 μ l), 5 μ l 10 fach konz. (10x) PCR-Puffer, 1 μ l Primer A (25 pmol), 1 μ l Primer B (25 pmol), 1 μ l chromosomale oder Plasmid DNA (10 bis 100 ng) oder Bakterien (10^3 bis 10^4 Zellen), 1 μ l *Taq* bzw. *Pwo* DNA-Polymerase (1 Einheit). Die Volumina der DNA-Lösungen oder Zellsuspensionen wurden durch entsprechende Reduktion des Volumens an bidest. Wasser von 1 bis 10 μ l variiert. Das Zeit/Temperatur-Profil der Reaktion wurde computer-gesteuert. Für die Amplifikation wurde ein Standard-Programm verwendet: Nach zwei-minütigem Erhitzen der Ansätze auf 96 °C (Denaturierung) folgte die Vermehrung des DNA-Abschnitts in 30 sich wiederholenden Zyklen, bestehend aus einer Minute Denaturierung bei 93 °C, zwei Minuten Annealing bei 50 °C und drei Minuten Extension bei 72 °C. Nach einem letzten zehnmütigen 72 °C-Schritt wurden die Proben auf 4 °C gekühlt. Vor allem bei großen PCR-Produkten musste die Annealing-Temperatur teilweise bis auf 40 °C gesenkt und die Annealing-Zeit verlängert werden. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die PCR-Produkte durch Färbung mit Ethidiumbromid und Bestrahlung mit UV-Licht bei 203 nm sichtbar gemacht (siehe 3.2.3.3.).

3.2.1.2 Crossover-PCR

Bei einer Crossover-PCR handelt es sich um eine Variante der Megaprimer-PCR, die die Fusion von DNA-Fragmenten ohne DNA-Ligase ermöglicht (Abb.4) An ihrem Ende entsteht ein rekombinantes DNA-Molekül, das zur Ligation in einen Vektor oder direkt zur Transformation in einen gewünschten Bakterienstamm und damit zur Mutagenese genutzt werden kann (Abb.4).

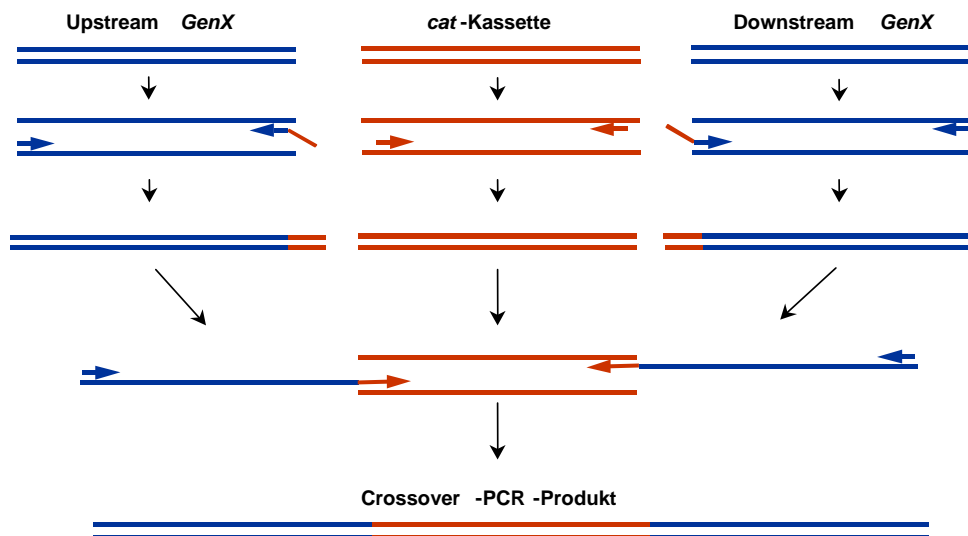


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Crossover-PCR. DNA-Einzelstränge des zu inaktivierenden Gens (blau) und des Antibiotika-Resistenzgens (*cat*-Gen, rot) sind als farbige Linien dargestellt. Primerbindung und Leserichtung sind als Pfeile gekennzeichnet. Genaue Erläuterungen finden sich Text.

Im ersten Schritt erfolgt die Amplifikation der Antibiotikaresistenzkassette, die in das zu inaktivierende Gen eingeführt werden soll. In diesem Fall handelt es sich um die Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*-Kassette) mit oder ohne Promoter (Abb.4). Die Amplifikation der *cat*-Kassette erfolgte mit dem *sense*-Primer CATS1 bzw. CATS2 und dem *antisense*-Primer CATAS1 in einer gewöhnlichen PCR-Reaktion. In zwei weiteren PCR-Reaktionen wurden nun sowohl der Upstream-Bereich als auch der Downstream-Bereich des Gens amplifiziert. Dabei wurden Primer verwendet, die am 5'-bzw. 3'-Ende zum *cat*-Gen komplementäre Anteile trugen. Nach gelelektrophoretischer Überprüfung und Aufreinigung der drei PCR-Produkte meist über ein Agarosegel, folgte als letzter Schritt eine vierte PCR-Reaktion. In ihr wurden jeweils 0.1 bis 2µl der drei gereinigten PCR-Produkte zusammen mit den beiden äußeren Primern des zu inaktivierenden Gens eingesetzt. Die Amplifikate des Gens fungierten bei dieser Reaktion als "Megaprimer", da sie durch ihre zur *cat*-Kassette komplementären Bereiche an diese binden konnten. Somit erhielt man als Ergebnis dieser letzten PCR-Reaktion die Amplifikation des Konstrukts, das aus dem inaktiven Gen besteht, in das eine *cat*-Kassette inseriert worden ist (Abb.4). Nach Beendigung der vierten PCR wurde das Reaktionsgemisch im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Dabei erhielt man ein Bandenmuster, das sich durch unspezifische Reaktionen der Primer mit anderen DNA-Abschnitten erklären lässt. Nach Ausschneiden der gewünschten Bande aus dem Gel konnte das PCR-Produkt gereinigt und als Ausgangs-DNA für eine weitere PCR-

Reaktion mit den beiden äußersten Primern eingesetzt werden, um das rekombinante DNA-Molekül in höherer Konzentration zu erhalten. Dieses konnte nach erneuter Aufreinigung entweder mit einem Vektor (pZErO™-2) ligiert oder direkt für eine Transformation zur Herstellung einer *H. pylori*-Knockout-Mutante verwendet werden.

3.2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Elution von DNA aus Agarose

Um die PCR-Produkte für Ligation, Sequenzierung oder Transformation vorzubereiten, mussten sie von Salzen, Enzymen, nicht verbrauchten Nucleotiden und Primern gereinigt werden. Die Rückgewinnung der PCR-Produkte aus dem Reaktionsansatz erfolgte durch Anionen-Austauschchromatographie unter Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kits* der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden zunächst 5 Volumen Bindepuffer mit einem Volumen des PCR-Reaktionsansatzes gemischt und auf eine Chromatographie-Säule aufgetragen. Die hohe Salzkonzentration und der optimale pH-Wert des Bindepuffers gewährleisteten hierbei die spezifische Bindung der DNA an die Glasfiebermatrix der Säule. Durch anschließende Zentrifugation für 30 bis 60 Sekunden bei 10000 g und einem zweiten Zentrifugationsschritt mit 750 µl Waschpuffer wurden alle nicht gebundenen Bestandteile des Reaktionsansatzes entfernt. Um die gebundene DNA aus der Säule zu eluieren, wurden 50 µl bidest. Wasser auf den Filter pipettiert und die DNA durch erneute einminütige Zentrifugation in diesem Wasser aufgefangen. Um Fehler bei der Reinigung auszuschließen, wurden 15 µl des Eluats gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf das gesuchte PCR-Produkt überprüft. Die so gewonnenen PCR-Produkte waren für die Klonierung und Transformation geeignet. Sobald während einer Reaktion mehrere PCR-Produkte auftraten, wurde das interessierende Produkt gelelektrophoretisch separiert und aus dem Gel eluiert. Für die Rückgewinnung der DNA aus dem Agarosegel fand das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) Verwendung. Die Elution erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die interessierende DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gelegt. Nach Auflösen der Agarose-Matrix mit der 3fachen Menge Perchlorat-Lösung bei 50 °C für 10 Minuten wurde die Lösung mit Isopropanol gemischt und die DNA durch Zentrifugation an eine Kieselgel-Membran gebunden. Nach wiederholtem Waschen mit Salz-Puffern und Ethanol wurden die DNA von der Membran durch Zugabe von 50 µl bidest. Wasser und Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g eluiert.

3.2.2. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit der Kettenabbruch-Methode [226] unter Verwendung des *PRISM Ready Reaction Dye Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Reaktion beruht auf dem spezifischen Abbruch der DNA-Synthese durch fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide, die keine Phosphodiester-Bindung ausbilden können. Ausgehend vom freien 3'-Ende eines an einzelsträngige Plasmid-DNA hybridisierten Oligonukleotid-Primers synthetisiert eine DNA-Polymerase komplementäre Einzelstränge. In einer Abbruchreaktion mit allen vier Desoxy-Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und einem definierten Anteil an fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden (ddNTP) wird die Synthese der Einzelstränge statistisch immer dann unterbrochen, wenn das entsprechende Didesoxy-Nukleotid eingebaut wird. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die jeweils am Ende ein ddA, ddC, ddG oder ddT-Molekül tragen. Die Nukleotidabfolge der so analysierten DNA lässt sich aus der Länge der Einzelfragmente ermitteln, wenn diese elektrophoretisch aufgetrennt und die steigende Fragmentgröße den jeweiligen Abbruchreaktionen zugeordnet wird. Zur Überprüfung rekombinanter Plasmide wurden 4 Reaktionsansätze mit jeweils einem anderen Primer eingesetzt. Für die Durchführung der Reaktion wurden 3 µl des gereinigten Plasmids mit 4 µl Terminator Ready Reaction Mix, 0.1 µl Oligonukleotid-Primer und 12.9 µl bidest. Wasser versetzt. Anschließend lief die Reaktion wie bei einer üblichen PCR-Reaktion im Thermocycler ab. Die Sequenzierungsreaktion bestand aus folgendem Programm: Nach einem einminütigen Denaturierungsschritt bei 96 °C folgten 25 Zyklen: 30 Sekunden bei 96 °C, 15 Sekunden bei 40 °C (entsprechend der Annealing-Temperatur des Primers) und 4 min bei 60 °C. Danach erfolgte die Aufreinigung des Sequenzierungs-Ansatzes durch Ethanol-Fällung. Hierzu wurden dem Sequenzierungsansatz 80 µl bidest. Wasser, 10 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 4.6) und 250 µl 70 %iges Ethanol zugegeben und das Gemisch bei 13000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Waschen des Pellets mit 250 µl 70 %igem Ethanol und Zentrifugation bei 13000 U/min für 5 Minuten wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in der SpeedVac getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl Template Suppression Reagent aufgenommen. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen Sequenziergerät aufgrund der Detektion von fluoreszenzmarkierten ddNTPs direkt im Gel nach Aktivierung mit einem Laser. Die detektierten Signale wurden computergestützt direkt in die Sequenz umgewandelt.

3.2.3. Arbeiten mit rekombinanter Plasmid-DNA

3.2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Antibiotika enthaltendes LB-Medium (100 ml) wurde mit Einzelkolonien beimpft und die Bakterien über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Nach Zentrifugation (15 min, 5000 rpm) wurden die Bakterien in 4 ml Puffer P1 aufgenommen und nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Der Zellextrakt wurde mit 4 ml gekühltem Puffer P3 versetzt, vorsichtig gemischt und in den Spritzenzylinder der *Qiafilter Midi Cartridge* überführt. Während der nächsten 15 Minuten wurden Proteine und chromosomale DNA bei Raumtemperatur ausgefällt. Diese wurde durch Filtration entfernt und das klare plasmidhaltige Lysat auf eine Anionenaustauscher-Säule *tip100*, die zuvor mit 2 ml Puffer QBT äquilibriert worden war, transferiert. Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und mit 3 ml Puffer QF eluiert. Die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA wurde mit 0.7 Volumen Isopropanol ausgefällt (30 Minuten, 14000 rpm, 4 °C), mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100-300 µl bidest. Wasser resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

3.2.3.2. Restriktion von Plasmid-DNA

Die Fragmentierung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) durchgeführt. Eine 20 µl-Reaktionsmischung enthielt: 12 µl bidest. Wasser; 5 µl isolierte Plasmid-DNA (1 bis 5 µg); 2 µl 10x Reaktionspuffer (\cong 1/10 Volumen); 1 µl Restriktionsenzym (1 bis 10 Einheiten). Nach Inkubation für 60 Minuten bei geeigneter Temperatur wurde der Restriktionsansatz entweder mit 1/10 Volumen Proben-Puffer versetzt und gelelektrophoretisch analysiert und/oder nach Inaktivierung des Enzyms und Ethanolfällung der DNA für weitere Reaktionen verwendet.

3.2.3.3. Agarose Gelelektrophorese

Die Agarosegele zur Auftrennung der Plasmid-DNA enthielten 0.6 bis 1 % Agarose in TBE-Puffer. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen an Proben-Puffer gemischt und anschließend unter Verwendung von TBE als Laufpuffer für eine Stunde bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Einlegen des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (1 ng/ml) wurde die DNA gefärbt und unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 203nm sichtbar gemacht.

3.2.3.4. Ligation von Plasmid-DNA

Die Klonierung von Cross-over-PCR-Produkten erfolgte durch Ligation in eine *EcoRV*-Schnittstelle des Plasmids pZErO™ -2 (Invitrogen; Plasmidkarte siehe Anhang). PCR-Produkte zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden in die Vektoren pASKIBA-7™ oder pASKIBA-3™ (IBA; Plasmidkarten siehe Anhang) über *BsaI*-Schnittstellen ligiert. Der Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen: 2 µl Ligasepuffer (10x), 5 µl Plasmid-DNA, 5 µl PCR-Produkt, 1 µl T4 DNA Ligase, 7 µl bidest. Wasser (ad 25 µl). Nach ca. 12 Stunden bei 4 °C wurde der Ansatz in Calcium-kompetente Zellen von *E. coli* transformiert.

3.2.3.5. Herstellung Calcium-kompetenter Zellen

Zur Herstellung Calcium-kompetenter Zellen wurde eine *E. coli*-Einzelkolonie in 100 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C unter Belüftung (140 U/min) vermehrt, bis die logarithmische Wachstumsphase erreicht war ($OD_{600\text{ nm}} = 0.5$). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 rpm geerntet, in 30 ml 100 mM Calciumchlorid resuspendiert und für eine Stunde im Kühlraum bei 4 °C belassen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml 100 mM Calciumchlorid mit 10 % Glycerin aufgenommen, ad 50 µl aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

3.2.3.6. Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Für die Transformation mit Plasmid-DNA wurden 50 µl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µg isolierter Plasmid-DNA gemischt und für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock von 60 Sekunden bei 42 °C und eine Kältebehandlung für zwei weitere Minuten. Nach Zugabe von 300 µl LB-Flüssigmedium wurden die Zellen für eine Stunde auf dem Thermomixer bei 37 °C regeneriert und anschließend auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

3.2.3.7. Minipräparation von Plasmid-DNA durch Anionenaustauscher-Chromatographie

Zum Auffinden rekombinanter Plasmide wurden Kolonien der Transformanten in 5 ml LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert. Zusätzlich wurden diese Kolonien auf LB-Agarplatten "gepickt". Die Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden die Bakterienkulturen abzentrifugiert (15 min, 5000 rpm) und in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer P2. Durch 350 µl Puffer N3

wurde chromosomale DNA und Proteine ausgefällt, welche durch eine anschließende Zentrifugation (10 min, 14000 rpm) zusammen mit den Zelltrümmern sedimentiert wurden. Der Plasmid-haltige Überstand wurde auf eine Anionenaustauschersäule *QIAprep spin column* pipettiert. Die Plasmid-DNA wurde durch eine anschließende Zentrifugation (30-60 sec, 14000 rpm) an die Säulenmatrix gebunden, das Eluat wurde verworfen. Durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und zwei weiteren Zentrifugationsschritten wurde die Plasmid-DNA gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte durch Inkubation der Anionenaustauschersäule mit 50 µl bidest. Wasser für eine Minute und anschließender Zentrifugation. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.4. Herstellung isogener Mutanten in *H. pylori*

3.2.4.1. Natürliche Transformation von *H. pylori*

Für den Transfer von Plasmid-DNA wurden *H. pylori*-Kolonien von DENT-Blutagarplatten aus der Routinekultivierung auf etwa 2.25 cm² einer DENT-Blutagarplatten verteilt und für vier bis fünf Stunden unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 10 bis 15 µl (0.5-2 µg) Plasmid-DNA auf die Kulturen pipettiert und für weitere 16 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Kulturen mit sterilem Wasser verwendet. Die so behandelten Bakterien wurden in 250 µl Brucella-Flüssigmedium mit 5 % FKS resuspendiert und Transformanten auf DENT-Blutagarplatten mit entsprechenden Antibiotika selektiert.

3.2.4.2. Elektroporation von *H. pylori*

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen für die Elektroporation wurden 15 ml Flüssigkulturen (s. 3.1.2.) für 24 Stunden unter microaeroben Bedingungen kultiviert und anschließend bei 4000 rpm für 10 Minuten bei 4° C abzentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden mit 15 ml gekühlten sterilen Wasser (bidest.) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen in 10 ml 10 %igem Glycerin wurden die Zellen in 2 ml eisgekühlten 10 %igen Glycerin resuspendiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Diese frisch zubereitete aliquotierte elektrokompetente Zellen (200 µl) wurden mit 5 µl (5 µg) Plasmid-DNA gemischt, 30 Minuten auf Eis gestellt und in einer eiskalten Elektroporationsküvette (d= 0.2 mm) bei 2.5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 600 Ω in einem Elektroporationsgerät elektroporiert (Gene Pulser, Biorad). Die Negativkontrolle erfolgte durch Elektroporation mit 5 µl sterilen Wasser. Anschließend wurden die Zellen zur

Regeneration auf DENT-Blutagarplatten aufgetropft und für 12 Stunden bei 37 °C unter microaeroben Bedingungen inkubiert. Die entstandenen Kulturen wurden in 250 µl Brucella-Flüssigmedium mit 5 % FKS resuspendiert und auf Selektivplatten mit Antibiotika ausgeplattiert.

3.2.5. DNA-Makroarray-Technik

3.2.5.1. cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der genomweiten Regulation von *H. pylori* mit Hilfe von DNA-Makroarrays (Eurogentech, Belgien) wurde die mRNA zuerst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dabei mit radioaktivem [α -³³P]-dCTP markiert. Dazu wurden die isolierte Gesamt-RNA (RNA-Matrize, 1 µg) und der Primer-Mix bestehend aus 4 µl cDNA labeling Primer Mix (0.05 pmol/µl), 3 µl Hybridisierungspuffer (10x) und bidest. Wasser (ad 30 µl) in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Der verwendete Primer-Mix (Eurogentech, Belgien) besteht aus Oligonukleotiden, die 1578 Gene des *H. pylori*-Genoms des Stammes 26695 repräsentieren. Die Anlagerung (Annealing) der Primer an die RNA-Matrize erfolgte anschließend für 1 Stunde bei 42 °C. Während des Annealing wurde der Premix aus 12 µl First Strand Buffer (5x, Gibco BRL, Wiesbaden), 6 µl DTT (0.1 mM), und jeweils 2 µl dATP, dGTP und dTTP (10 mM) vorbereitet. Nach Ablauf der Annealing-Zeit wurden Annealing-Ansatz und Premix gemischt und anschließend 4.5 µl [α -³³P]-dCTP (10 µCi/µl), 1.5 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, 200 U/µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 1.5 Stunden bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA (0.5 M) gestoppt und die RNA-Matrize mit 6 µl NaOH (3 M) bei 65 °C für 30 min durch alkalische Hydrolyse zerstört. Nach Abkühlung des Reaktionsansatzes für 15 Minuten auf Raumtemperatur wurde dieser mit 20 µl Tris/HCl (1 M, pH 8.0) und 6 µl HCl (2 N) neutralisiert. Zur Fällung der cDNA wurde diese mit 10 µl Na-Acetat (3 M, pH 5.2) und 400 µl eiskaltem 96 %igem Ethanol behandelt und über Nacht bei -20 °C belassen. Die präzipitierte cDNA wurde am nächsten Tag 15 Minuten mit 15493 g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Anschließend wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Dieser zweite Überstand wurde verworfen und das Pellet für 20 Minuten bei 42 °C vollständig getrocknet. Die cDNA wurde abschließend in 100 µl sterilem, bidest. Wasser für 30 Minuten bei 65 °C gelöst.

3.2.5.2. Bestimmung der radioaktiven Einbaurate

Um die Effizienz der cDNA-Synthese zu bestimmen, wurde die Einbaurate des [α - ^{33}P]-dCTP gemessen. Dazu wurden 2 μl des ersten Überstandes und der gelösten cDNA im Verhältnis 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 1 μl der Verdünnungen und der unverdünnten Lösungen auf kleine Stücke einer Nylonmembran aufgetropft und luftgetrocknet. Die Nylonmembranstückchen wurden in Szintillatormessfläschchen überführt und mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Ein Szintillationsmessgerät nahm anschließend die Anzahl der Zerfälle pro Sekunde auf. Daraus lies sich die Einbaurate als Quotient der Radioaktivität der cDNA-Lösung und der Gesamtaktivität ermitteln.

$$\text{Einbaurate [\%]} = \frac{\text{cpm}/\mu\text{l (cDNA)} * \text{Volumen cDNA-Lösung}}{[\text{cpm}/\mu\text{l (Überstand)} * \text{Volumen Überstand} + \text{cpm}/\mu\text{l (cDNA)} * \text{Volumen cDNA-Lösung}] \times 100}$$

Die Einbaurate lag typischerweise zwischen 70 % und 85 %, was einer Zählrate von 3–9 $\times 10^6$ cpm/ μl entsprach.

3.2.5.3. Hybridisierung des DNA-Makroarrays

Der Makroarray wurde in eine sterile Hybridisierungsröhre überführt und für 10 Minuten in 50 ml 1 x SSPE bei Raumtemperatur im Hybridisierungssofen durchfeuchtet. Die eigentliche Prähybridisierung erfolgte für 2 Stunden bei 65 °C in 10 ml Prähybridisierungslösung. Kurz vor Ende der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung (cDNA-Sonde in 5 ml Prähybridisierungslösung) für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung für mindestens 20 Stunden mit der Target-cDNA bei 65 °C. Nach Ablauf der Hybridisierung wurde die Sonde verworfen und der Array 5 Minuten mit Waschlösung I bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde erneut mit Waschlösung I für 20 Minuten und für 60 Minuten mit Waschlösung II bei 65 °C im Hybridisierungssofen gewaschen. Der Array wurde aus der Hybridisierungsröhre genommen und 2 Minuten luftgetrocknet, anschließend in einem aufgeschnittenen Plastikbeutel blasenfrei eingeschweißt. Die Radioaktivität des Arrays wurde mit einem Oberflächen-Geigerzählrohr gemessen, um so die Expositionsdauer abzuschätzen. Zur Messung der Signale wurde der Array auf einem Phosphorscreen (Applied Biosystems, USA) in einer strahlungsabschirmenden Box exponiert und dort 2 bis 5 Tage belassen. Phosphorscreens decken einen höheren linearen Bereich ab als Röntgenfilme, bevor die vollständige Schwärzung, also Sättigung, eintritt. Nach Ablauf der Expositionsdauer erfolgte die Detektion der Signale mit Hilfe des PhosphoImagers (MD STORM860, Amersham

Pharmacia Biotech, Schweden). Der Screen wurde mit einer Auflösung von 50 µm/Pixel gescannt und als Bilddatei gespeichert.

3.2.5.4. Entfernen der Target-cDNA vom DNA-Makroarray (Stripping)

DNA-Makroarrays können etwa 5- bis 8-mal wieder verwendet werden. Dazu muss jedoch vorher die bereits gebundene cDNA von dem Array entfernt werden. In einer Flasche wurde 1 l Stripping-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Der Array wurde in eine Schale auf einem Schüttler gelegt und nacheinander für 2, 5 und 60 Minuten mit 300 ml kochendem Stripping-Puffer geschüttelt. Mit einem Oberflächen-Geigerzählrohr wurde die auf dem Array verbliebene Radioaktivität kontrolliert. Dabei konnte nach Herstellerangaben bis zu 5 % Radioaktivität verbleiben. Der Array wurde 1 Stunde luftgetrocknet, in einem Plastikbeutel eingeschweißt und bei -20 °C aufbewahrt.

3.3. Methoden zur RNA-Analyse

3.3.1 Isolierung von RNA aus *H. pylori*

3.3.1.1. Präparation von RNA [15]

15 ml Flüssigkulturen (s. 3.1.2.) wurden für 48 Stunden unter microaeroben Bedingungen kultiviert und anschließend bei 3900 rpm für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden in 1 ml Protoplastenpuffer resuspendiert und in 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Durch Inkubation der Zellen mit 80 µl Lysozymlösung auf Eis (15 min) wurden Protoplasten hergestellt, welche durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert wurden. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Bakterien in dem verbliebenen Protoplastenpuffer resuspendiert und durch Zugabe von 0.5 ml Lysispuffer lysiert (37 °C, 5min). Anschließend wurden 250 µl gesättigte Natriumchloridlösung zugegeben, vorsichtig gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Phenol-Chloroform versetzt und durch vortexen gemischt. Zur Entmischung von phenolhaltiger und wässriger Phase wurde der Ansatz für 5 Minuten zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C). Etwa 80 % der wässrigen Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNA wurde mit 2.5 Volumen Ethanol (abs.) präzipitiert, mit 1 Volumen 70 %igem Ethanol gewaschen und im Heizblock bei 60 °C getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.3.1.2 Bestimmung der RNA-Menge durch Absorption

Die Absorptionsmessung zur Konzentrationsbestimmung von RNA in wässrigen Lösungen erfolgte in einem Spektralfotometer mittels Quarzglasküvette (500 µl) bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration berechnet sich als Quotienten des Verdünnungsfaktors, des gemessenen Extinktionswertes ($A_{260\text{nm}}$) und des A_{260} -Faktor [225] mit dem Messvolumen der Küvette (500 µl). Der A_{260} -Faktor entspricht für RNA einem Wert von 40 µg/ml. Aus dem Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ lässt sich der Reinheitsgrad der Nukleinsäure bestimmen, da bei 280 nm auch aromatische Aminosäuren, die aus Proteinen stammen können, absorbieren. Für RNA sollte der Quotient optimalerweise zwischen 1.5 und 2.0 liegen.

3.3.1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten RNA, wurden 5-10 µg RNA mit 15 µl RNA-Probenpuffer gemischt, 15 Minuten bei 65 °C erhitzt und anschließend für zwei Minuten auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die RNA mit einem Tropfen Ladepuffer versetzt und kurz anzenrifugiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 1.2 %igem MOPS/ Formaldehyd-Agarosegel mit Ethidiumbromid bei 3-4 mA, wobei 1-fach konz. MOPS-Puffer als Laufpuffer diente. Die RNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht.

3.3.2 RNA-Nachweis

3.3.2.1. Herstellung von RNA-Sonden

Für die Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden wurde das DIG RNA-labeling Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die für die Sondenherstellung bestimmte DNA mittels T7- bzw. SP6-RNA-Polymerase in RNA revers transkribiert wird. Durch den Einsatz von DIG-markiertem UTP erhält man ein spezifisch markiertes Transkript, das zur mRNA des Ziel-Gens die komplementäre Sequenz aufweist. Um die DNA einer T7-RNA-Polymerase zugänglich zu machen, wurden PCR-Fragmente verwendet, an deren 3'-Ende durch die Primersequenz eines T7-Promoter angehängt wurde. Die *in-vitro*-Transkription erfolgte in einem RNase-freien Eppendorf-Gefäß auf Eis und wurde wie folgt pipettiert: 10 µl *Template*-DNA ($\cong 2.5$ µg); 2 µl NTP-labeling-Mix (10x); 2 µl Transkriptionspuffer (10x); 1 µl RNase-Inhibitor; 3 µl bidest. Wasser; 2 µl RNA-Polymerase (T7, 20U/µl). Als Kontrolle diente der gleiche Transkriptionsansatz mit einer speziellen Kontroll-DNA des Herstellers. Der Transkriptionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl DNase I (RNase-frei) zugegeben und

für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl einer 200 mM EDTA-Lösung (pH 8) abgestoppt. In einer Standard-Reaktion mit 1 µg aufgereinigtem PCR-Produkt als Template-DNA wurden etwa 10 µg DIG-markierte Sonden-RNA erhalten. Die Überprüfung der Einbauqualität des DIG-markierten UTP und der Konzentrationsbestimmung der Sonde erfolgte mittels Detektion ("Tüpfeltest"). Dazu wurden jeweils 4 Verdünnungsstufen (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) der Sonden, sowie einer ebenfalls DIG-markierten Kontroll-RNA aus dem DIG RNA Labeling Kit hergestellt. Jeweils 1 µl der einzelnen Verdünnungsstufen wurde auf eine Nylonmembran aufgetropft und durch UV-Licht-Bestrahlung (203 nm) fixiert. Die Detektion begann mit einem 5-minütigen Waschschrift in Waschpuffer und wurde dann wie unter 3.12.2 beschrieben fortgeführt.

3.3.2.2. Northern Blot-Analysen

10-15 µg der isolierten RNA wurden in einem 1 %igem RNA-Agarosegel aufgetrennt (s. 3.3.1.3.). Das Agarosegel wurde ca. 30 Minuten in SSC-Puffer (20x) gewaschen, auf einen Sockel mit in SSC-Puffer (20x) getränkten Whatman-Papieren gelegt, mit einer Nylonmembran (Nylon membranes positively charged, Roche Mannheim) und einigen trockenen Whatman-Papieren bedeckt und beschwert. Die Übertragung der RNA auf die Nylonmembran erfolgte bei Raumtemperatur via Kapillarkraft über Nacht. Danach wurde die Membran kurz in sechsfach konzentriertem SSC-Puffer gewaschen und luftgetrocknet. Die RNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (203 nm) kovalent an die Membran gebunden und der Transfer durch eine Methylenblaufärbung der RNA überprüft. Anschließend wurde die Membran entweder gelagert oder für die Prähybridisierung mit 20 ml Prähybridisierungspuffer versetzt und bei 68 °C für eine Stunde im Hybridisierungsofen inkubiert. Vor der Verwendung der Sonden wurden diese 10 Minuten bei 100 °C gekocht, auf Eis gestellt und mit Prähybridisierungslösung verdünnt. Die Hybridisierung erfolgte für 16-18 Stunden bei 68-72 °C im Hybridisierungsofen. Die Membran wurde dreimal mit TE-Puffer, dem 1 % SDS und 0.1 % Sarkosyl zugesetzt war, unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Danach wurde die Membran für 5 Minuten in TE-Puffer mit 0.1 % Sarkosyl gewaschen, eine Minute in Waschpuffer geschwenkt und für 30-60 Minuten in Blocking-Puffer inkubiert. Die gebundenen Sonden wurden mittels eines Anti-DIG-Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase fusioniert war, detektiert. Die enzymatische Dephosphorylierung des Chemolumineszenz-Substrat CDP-StarTM (Roche, Mannheim) durch die alkalische Phosphatase führt zur Bildung eines metastabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert. Die Inkubation mit dem

Antikörper erfolgte in einer 1:20000 fachen Verdünnung in Blocking-Puffer. Anschließend wurde die Membran zweimal in Waschpuffer gewaschen, in Detektionslösung geschwenkt und für die Reaktion mit dem Chemolumineszenz-Substrat in Plastikfolie eingeschweißt. Die Membranen wurden bei Raumtemperatur gegen einen Röntgenfilm für mindestens 5 Sekunden exponiert. Es wurden Hyperfilme (Amersham LIFE SCIENCE) verwendet, die automatisch entwickelt wurden.

3.4. Methoden zur Protein-Analyse

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurden die Bakterien aus Flüssigkulturen für 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml bidest. Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte nach Bradford [15]. Dazu verdünnte man 10 µl der Proben zwei Mal 1:10 mit bidest. Wasser. Zur zweiten Verdünnung wurden 900 µl Bradford-Lösung gegeben. Nach mindestens zwei Minuten Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert mit 100 µl bidest. Wasser und 900 µl Bradford-Lösung gemessen. Die exakte Proteinkonzentration wurde durch Standardkurven ermittelt, die mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt wurden.

3.4.2. Proteinanalyse mit der 2D-Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen (2D)-Gelelektrophorese werden Proteine nach zwei unterschiedlichen Eigenschaften aufgetrennt [139]. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), wandern die Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Dabei bilden im elektrischen Feld niedermolekulare, synthetische hergestellte, aliphatische Polyaminocarbonsäuren (sog. Trägerampholyte), die die höchste Pufferkapazität bei ihrem pI besitzen, einen pH-Gradienten aus. Der Gradient hat seinen höchsten pH-Wert an der Kathode und seinen niedrigsten an der Anode. Um Aggregationen und intermolekulare Interaktionen auszuschließen, wird die IEF unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von DTT (Dithiothreitol) durchgeführt. Die Proteine werden dadurch in eine definierte Konfiguration überführt. Die zweite Dimension stellt eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dar, welche die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. In dieser Arbeit wurde das IPGphor-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Der Vorteil dieser Technik besteht darin, dass die Proteinprobe zusammen mit den Trägerampholyten aufgetragen werden kann und somit die Vorfokussierung und die eigentliche Auftrennung in

einem Schritt ablaufen können. Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension) wurde in einer Hoefer-Kammer (SE600, Pharmacia) durchgeführt, in der gleichzeitig vier Gele Platz finden.

3.4.2.1. Die Isoelektrische Fokussierung von Proteinen (IEF)

Für die IEF wurden aliquotierte Bakteriensuspensionen (entsprechend 200 µg Gesamtprotein) bei 14000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellsedimente in 10 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Um eventuell vorhandene Zelltrümmer abzutrennen wurde er-neut bei 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde mit 240 µl Rehydratisierungslösung versetzt, zusammen mit einem Gel für die IEF (IEF-strip, pH 4-7) in ein IEF-Schiffchen (13 cm, Pharmacia) plaziert und mit DryStrip Cover Fluid (Mineralöl, Pharmacia) überschichtet. Anschließend wurde das IEF-Schiffchen mit einem Deckel versehen und zur Rehydratisierung in die IPGphor-Kammer gestellt. Die Rehydratisierungszeiten variierten zwischen 10 und 15 Stunden. Die Rehydratisierung erfolgte zur besseren Vorfokussierung großer Proteine bei 30 V. Für die eigentliche isoelektrische Fokussierung erwies sich folgender Spannungsverlauf als besonders geeignet: 2 Stunden bei 500V; 2 Stunden bei 1000V; 4 Stunden bei 8000V. Die Stromstärke blieb mit 50 µA pro IEF-Schiffchen konstant. Anschließend wurden die IEF-strips entweder sofort weiterverarbeitet oder bei – 70 °C gelagert.

3.4.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von isoelektrisch fokussierten Proteinen

Vor der Auftrennung nach dem Molekulargewicht wurde der IEF-Gelstreifen 15 Minuten lang mit SDS-Äquilibriumspuffer behandelt. Anschließend wurde der Streifen auf ein 10 - 18 % iges SDS-Polyacrylamidgel [146] gesetzt und mit 0.5 %iger Agaroselösung überschichtet. Von der Marker-Proteinlösung (Low-Molecular-Weight-Marker, Pharmacia) wurden 5 - 10 µl auf Whatman-Papier aufgetropft und vor dem Überschichten neben das der Anode entsprechende Ende des IEF-Gelstreifens plaziert. Die SDS-PAGE lief in einer Hoefer-Kammer (Modell SE600) mit einer anfänglichen Spannung von 90V (15 Minuten) und anschließend mit 230-275V für 5-8 Stunden.

3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Für die Analyse von Proteinen wurden Zweikomponenten-SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem 10-15 %igen Trenngelen und einem 4.5 %igen Sammelgel

bestanden. Zwei Glasplatten wurden mit Spacern versehen, mit Vaseline abgedichtet und in einer Elektrophoresekammer Mini Protean II™ (BioRad) eingebaut. Zur Herstellung von 10 ml Trenngel wurden Bottom Gel Stammlösung, Acrylamid und bidest. Wasser in variablen Anteilen entsprechend der gewünschten Endkonzentration gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 100 µl AMPS und 10 µl TEMED gestartet und die Gel-Lösung zwischen die Glasplatten gegossen und mit bidest. Wasser abgedeckt. Nach einer halben Stunde Polymerisationszeit wurde das Wasser vollständig entfernt und das Sammelgel bestehend aus 1.25 ml Upper Gel Stammlösung, 0.75 ml Acrylamid-Lösung, 3 ml bidest. Wasser, 50 µl AMPS und 5 µl TEMED auf das Trenngel gegossen. Während der Polymerisationszeit von 15 Minuten wurden die Bakteriensuspensionen (20 µg) mit 5 µl 4 fach konzentriertem Lämmli-Puffer gemischt und für 5 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen eingefüllt und die Elektrophorese zuerst für eine halbe Stunde bei 75 V und anschließend 1.5 Stunden bei 120 V in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

3.4.4. Proteinfärbung

3.4.4.1. Coomassiefärbung von Proteinen

SDS-Polyacrylamidgele wurden 60 Minuten in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Kurz mit kochendem destilliertem Wasser übergossen und anschließend zweimal 30 Minuten in Entfärbelösung entfärbt.

3.4.4.2. Silberfärbung von Proteinen

Die in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mit Silber gefärbt. Dazu legte man die Gele für mindestens 30 Minuten (meist über Nacht) in die Fixierlösung. Anschließend wurden sie weitere 30 Minuten mit Reduzier-Lösung inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 10 Minuten mit bidest. Wasser, eine Inkubation mit Silbernitrat für 30 Minuten, ein kurzer Waschschrte mit bidest. Wasser und zwei kurze Waschschrte mit Entwickler. Die Anfärbung der Proteine erfolgte durch erneute Zugabe des Entwicklers und wurde durch Essigsäure abgestoppt. Anschließend konnten die Gele bis zur Auswertung bei 4 °C in destilliertem Wasser gelagert werden. Vor der Auswertung der Gele wurden diese photographiert und anschließend durch Scanning digitalisiert. Die Bearbeitung und der Vergleich der aufgetrennten Proteine wurde mit der Microsoft Power Point 7.0 Software durchgeführt.

3.4.5. Western Blot-Analyse von Proteinen

Die in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.4.3.) aufgetrennten Proteine wurden 1 Stunde bei 400 mA und 100 W in einer Elektrobloßapparatur aus dem Gel auf eine Polyvinyliden Fluorid Membran (PVDF-Membran Immobilon™-P, Millipore) transferiert. Dazu wurde die Transfer-Membran zuerst für 15 Sekunden in 100 % Methanol geschwenkt und anschließend in etwast. Wasser gewaschen. Danach wurde die Membran in Blotting-Puffer äquilibriert. Der Aufbau des semi-dry Elektrobloßs erfolgte wie in Abbildung 5.

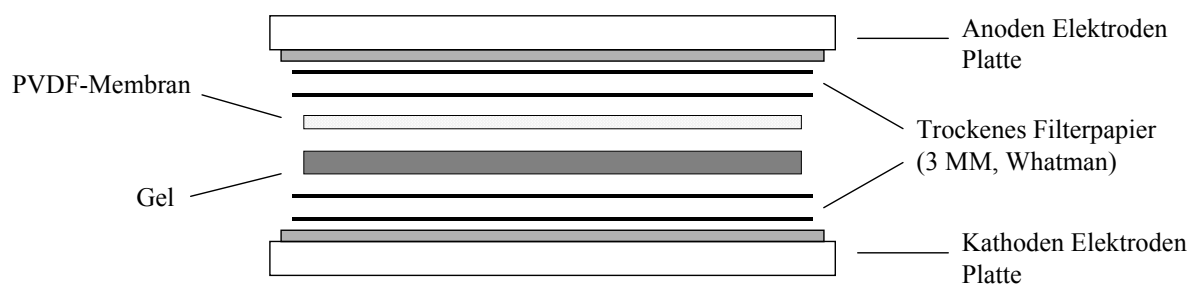


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines semi-dry Elektrobloßs.

Zuerst wurden zwei Blatt Whatman 3 MM Filterpapier mit Blotting-Puffer befeuchtet und auf die untere Kathoden Elektroden Platte gelegt. Das Proteingel wurde nun “bäuchlings” ohne das Sammelgel auf das Filterpapier gelegt. Anschließend folgte die PVDF-Membran und erneut zwei Blatt Filterpapier. Nach dem Proteintansfer wurden die Membran über Nacht in ca. 20 ml Blocking-Puffer abgesättigt. Zur Bindung des Primär-Antikörpers wurden die spezifischen Anti-Seren in Blocking-Puffer verdünnt und mit der Membran für zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit ca. 20 ml Waschpuffer wurden die Membran mit einem Konjugat aus Protein A und alkalischer Phosphatase (Sigma Diagnostics, Steinheim) in Blocking-Puffer für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in Waschpuffer wurden die Membranen durch Schwenken in 10 ml Detektionslösung entwickelt. Die Farbreaktion wurde mit bidest. Wasser abgestoppt.

3.4.6. Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine

3.4.6.1 Klonierung der kodierenden Genregion in Expressionsvektoren

Die Produktion von Proteinen in *E. coli* wurde mit dem Expressionssystem der Firma IBA (Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde die kodierende Region des entsprechenden Gens mittels PCR amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer waren mit einer Restriktionsstelle am 5'-Ende versehen. Dadurch war es möglich das Gen exakt in die pASKIBA™-Plasmide

die ebenfalls eine entsprechende Restriktionsstelle besitzen, zu klonieren. Durch diese Restriktionsstelle war es möglich, das Gen mit den auf dem Vektor kodierenden funktionellen Elementen (Strep-tag II und, abhängig vom Vektor, eine OmpA-Signalsequenz, ein Start- oder ein Stopcodon) zu fusionieren. Die kodierende Sequenz des Gens wurde mit den entsprechenden Primern amplifiziert und durch die Restriktionsstelle *BsaI*, welche an die 5'-Enden der Primer angefügt wurde, in das Plasmid pASKIBA-3™ bzw. pASKIBA-7™ kloniert. Die resultierende Plasmide wurden anschließend in unterschiedliche *E. coli*-Stämme wie XL1-Blue, BL21 oder MC4100 transformiert.

3.4.6.2 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Für die Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurde das Strep-tag II (-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-) System von IBA (Göttingen) verwendet. Das Strep-tag II System bietet die Möglichkeit, rekombinante Proteine in *E. coli* zu exprimieren und anschließend aufzureinigen. Das Expressionssystem basiert auf Vektoren, die durch einen Tetracyclin-Promoter/ Operator (*tet*) reguliert werden. Die Expression des *tet* Repressors, welches auch auf dem Expressionsplasmid kodiert wird, garantierte die Inaktivierung des Promoters in Abwesenheit von Anhydrotetracyclins. Der Promoter wurde mittels Anhydrotetracyclin induziert, wobei Mengen eingesetzt wurden, die nicht antibiotisch wirkten. Zur Aufreinigung wurden Säulen verwendet, die mit Streptavidin beladen sind. Durch die Strep-tag II/ Streptavidin Interaktion konnte das gewünschte Protein in der Säule gebunden und anschließend eluiert werden.

3.4.6.3 Proteinexpression in *E.coli*

Nach erfolgter Klonierung des PCR-Produktes in den Expressionsvektor pASKIBA-3™ bzw. pASKIBA-7™ und anschließender Transformation in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue, BL21 oder MC4100, erfolgte die Kultivierung über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin. Am nächsten Morgen wurden 2 ml dieser Kultur in 100 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und weiter bei 37 °C kultiviert. Nach 3 Stunden wurden 10 µl Anhydrotetrazyklin (2 mg/ml in DMF gelöst) zur Kultur gegeben. Nach einer weiteren Wachstumsphase von 4 Stunden bei 37 °C wurde die Kultur bei 5000 U/min und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert und konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

3.4.6.4 Lyse und Aufbereitung des Zellextraktes

Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Lyse-Puffer (Puffer W mit 1 mM MgCl₂) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 10 µg/ml DNaseI und 10 mg Lysozym für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin für viermal 15 Sekunden mittels Ultraschall lysiert (Stufe 4, 40 Pulse). Das Lysat wurde anschließend bei 15000 U/min und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Das Zellmaterial im Sediment wurde verworfen oder zur Aufreinigung von Inclusion Bodies verwendet.

3.4.6.5 Reinigung rekombinanter Proteine durch Affinitätschromatographie mit Streptavidin

Nach Äquilibrierung der Säule mit Puffer W wurde das Bakterienlysate auf eine Streptavidin-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule fünfmal mit 1 ml Puffer W gewaschen und die Fraktionen in getrennten Reaktionsgefäßen gesammelt. Das Protein wurde in 6 Fraktionen á 0.5 ml Puffer E eluiert. Die Fraktionen wurden getrennt gesammelt. Daraufhin wurde die Säule mit 3x 5 ml Puffer R und 2 ml Puffer W regeneriert. Aliquots á 20 µl wurden auf ein SDS-Mini-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Nach erfolgreicher Aufreinigung konnte das Protein bei -20 °C gelagert werden.

3.4.6.6. Reinigung und Aufschluss von Einschlusskörperchens

Bei Überexpression von Fremd-Proteinen in *E. coli* kommt es häufig zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, die sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen oder intermolekularen Disulfidbrücken ausbilden. Diese Einschlusskörper sogenannte „Inclusion Bodies“ (IB), können aufgrund ihrer relativ hohen Dichte durch Zentrifugation im Zell-Lysates isoliert und durch verschiedene Waschschrte aufgereinigt werden.

Dazu wurde das Zellsediment (siehe 3.4.7.4) in 5 ml WaschpufferI aufgenommen und in einem Potter auf Eis zermösert. Anschliessend erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm bei 4°C (Sorvall SS34). Der Überstand wurde verworfen und die Prozedur mit dem neuen Zellpellet wiederholt. Das Ganze wurde noch zweimal wiederholt. Der letzte Waschschrte erfolgte in 5 ml WaschpufferII. Anschließend zermösert, zentrifugiert (15000 rpm, 4°C, Sorvall SS34) und zum Aufschluss in 2ml Urea-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei RT inkubiert. Die auf diese Weise solubilisierten Inclusion-Bodies konnten durch Zentrifugation (s.o.) von den restlichen Zelltrümmern abgetrennt werden. Zur Renaturierung konnte das in den Inclusion Bodies enthaltende Protein entweder in Puffer W

verdünnt oder gegen Puffer W dialysiert werden. Das Zell-Lysat wurde mittels SDS-PAGE überprüft und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Verwendung eingefroren.

3.4.8. Bestimmung der Urease-Aktivität

Das Prinzip der Messung der Urease-Aktivität beruht auf der Hydrolyse von Harnstoff in NH_3 und CO_2 durch das Enzym. NH_3 (Ammoniak) reagiert anschließend mit alkalischem Hypochlorid und Phenol in Gegenwart des Katalysators Nitroprussid zu Indophenol, welches eine blaue Farbe besitzt. Die Konzentration an NH_3 ist direkt proportional zur Absorption von Indophenol, die photometrisch bei 570 nm gemessen werden kann. Für die Messung der Urease-Aktivität wurden gewachsenen Bakterienkulturen für 10 Minuten bei 5000 U/min abzentrifugiert. Die gewonnenen Zellpellets wurden anschließend zweimal mit gekühltem PBS gewaschen und in 1ml PBS resuspendiert. 300 μl davon wurden mit 3 μl 10% igem SDS lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.4.1). Danach wurde dieses Lysat auf eine Proteinkonzentration von 0.06 bis 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt bzw. bei Nickel-induzierter Ureaseaktivität höher, bei *H. pylori* Stamm 26695 gar nicht verdünnt. Für jedes Lysat wurden ab diesem Schritt Doppelbestimmungen durchgeführt. Dazu wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 990 μl harnstoffhaltigem PEB-urea-Puffer vorbereitet, 10 μl des auf die richtige Proteinkonzentration eingestellten Lysats hinzugegeben und das Gemisch nach vortexen für exakt 10 Minuten inkubiert. Als Leerwert wurden 10 μl bidest. Wasser anstelle des Lysates eingesetzt. Anschließend wurden 90 μl der PEB-urea-Lysat-Mischung in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, das mit 150 μl Phenol-Nitroprussid vorbereitet war. Nach Zugabe von 150 μl alkalischem Hypochlorid und 750 μl bidest. Wasser wurde wieder gemischt und die Mischung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 bis 15 Minuten im Wärmeblock inkubiert. Die Optische Dichte des eingetretenen Farbumschlag wurde bei 570 nm gemessen und die entstandene Ammoniumkonzentration konnte anhand einer Standardkurve bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration, des Verdünnungsfaktors und der Inkubationszeiten wurde die Urease-Aktivität berechnet. Die Daten werden als spezifische Urease-Aktivität (μmol Harnstoff/min/mg Protein) präsentiert. Eine Unit Enzymaktivität wurde definiert als diejenige Menge, die ein μmol Harnstoff pro Minute hydrolysieren kann. $1\ \mu\text{mol}$ Harnstoff $\Rightarrow 2\ \mu\text{mol}$ Ammoniak. Ureaseaktivität = (Ammoniak[$\mu\text{mol}/\text{ml}$]) / (20 * Verdünnung des Proteinextraktes * Verdünnung im Reaktionsvolumen ($\equiv 0.01$) * Verdünnung in der Farbreaktion * Proteinkonzentration). Die spezifische Urease-Aktivität wurde dreifach bestimmt und der Mittelwert berechnet.

3.4.9. Cat-ELISA-Technik

Zur Untersuchung der Genregulation in *H. pylori* wurde das promoterlose Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen (*cat*) als Reporter verwendet. Dazu wurde die Menge an Cat-Protein bestimmt, die von HP1326-CAT-Mutanten gebildet wird. Dabei wird die Expression des Cat-Proteins durch den Promoter des HP1326-Gens reguliert. Die Menge an synthetisiertem Cat-Protein unter verschiedenen Bedingungen erlaubt Rückschlüsse auf die Aktivität des Promoters. Zur Vorbereitung der Bestimmung der Cat-Produktion mittels ELISA wurden *H. pylori* Flüssigkulturen, die für 48 Stunden gewachsen waren, für 10 Minuten bei 4500 U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets konnten bei -80 °C gelagert werden. Die Durchführung des ELISAs erfolgte mit dem CAT-ELISA-Kit von Roche Molecular Biochemicals nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden die Zellpellets zunächst dreimal mit 5 ml gekühltem PBS gewaschen, das Pellet nach dem letzten Waschschritt in 1 ml 1-fach konz. Lysepuffer resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit den Zelltrümmern verworfen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt (s. 3.4.1) und ausgehend von dieser wurde anschließend die Proteinkonzentration aller Proben auf 100 µg/ml eingestellt. Von dieser Lösung wurden 1:10, 1:100 und 1:1000er Verdünnungen hergestellt. Die Aliquots konnten bei -80 °C gelagert werden. Zur Durchführung des ELISAs erfolgte zunächst die Herstellung der Standardproben nach den Angaben des Herstellers wie in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Standardproben für Cat-ELISA

Standard	Cat Enzym Arbeitslösung	Zugabe Probenpuffer	Cat Protein Konzentration
S0	0 µl	1000 µl	0 ng/ml
S1	1000 µl	0 µl	1.0 ng/ml
S2	500 µl von S1	500 µl	0.5 ng/ml
S3	500 µl von S2	500 µl	0.25 ng/ml
S4	500 µl von S3	500 µl	0.125 ng/ml

Anschließend wurde das Pipettierschema für die Mikrotiterplatte festgelegt und danach jeweils 50 µl Kulturen-Aliquot mit 450 µl Probenpuffer gemischt. Alle Proben wurden durch Doppelbestimmungen analysiert. Je 200 µl Standard- und Kulturproben wurden in die vorher festgelegten Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert (wobei zwei Vertiefungen als Referenz-Werte freigelassen wurden), die Mikrotiterplatte mit selbstklebender Folie

abgedeckt und für 60 Minuten im Brutraum bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Arbeitslösungen für die folgenden Schritte nach den Angaben des Herstellers hergestellt werden. Nach der Inkubation, während der das Cat-Protein an den Anti-Cat-Antikörper auf der Mikrotiterplatte binden konnte, wurden die Vertiefungen fünfmal mit 250 µl Waschwasser gewaschen. Anschließend wurden jeweils 200 µl Anti-Cat-DIG Arbeitslösung in die Vertiefungen mit Proben und Standards pipettiert und erneut für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Dabei bindet ein nächster Antikörper, welcher mit Digoxigenin markiert ist, an das gebundene Cat-Protein. Nach 5 weiteren Waschschrritten erfolgte die Zugabe von Anti-DIG-POD-Lösung in die Vertiefungen, wobei während erneuter einstündiger Inkubation ein mit Peroxidase-Enzym markierter Antikörper gegen Digoxigenin an dieses gebunden wurde. Anschließend wurde erneut fünfmal gewaschen und als letzter Schritt 200 µl POD-Substrat in alle Vertiefungen pipettiert. Dieses Substrat wird bei Raumtemperatur durch das Peroxidase-Enzym in ein farbiges Produkt umgewandelt, das nach 10 bis 40 Minuten mit dem ELISA-Reader bei 405 nm detektiert werden konnte. Dabei war die Menge an farbigem Produkt proportional zur Menge an Cat-Protein in den Proben. Die quantitative Bestimmung der Cat-Protein-Konzentration erfolgte durch Vergleich mit einer Eichgeraden, die aus den mitgelaufenen Standardproben erstellt wurde.

3.5. Protein-DNA Interaktionen

3.5.1. „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA)

Die Interaktion eines Proteins mit einem definierten DNA-Abschnitt lässt sich durch verzögerte Wanderung des Protein-DNA-Aggregates in einem nativen Polyacrylamidgel untersuchen. Um eine mögliche Interaktion eines Proteins mit einem bestimmten DNA-Abschnitt im EMSA festzustellen, wurden 20 µg des zuvor gereinigten, rekombinanten Proteins zunächst für 20 Minuten in 20 µl 5fach konzentrierten Bindepuffer äquilibriert. Anschließend wurde ebenfalls gereinigtes PCR-Produkt (*MiniElute PCR-Purification Kit, Qiagen Hilden*), 30 µl 50 %iges Glycerin und bidest Wasser zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten inkubiert.

3.5.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse von Protein-DNA-Bindungen wurde ein 7% nicht denaturierendes Polyacrylamidgel verwendet. Hierfür wurden zwei Glasplatten mit Spacer versehen, mit Vaseline abgedichtet und in eine Elektrophoresekammer gegeben. Zur Herstellung von 50 ml Gel

wurden 12.5 ml 10x TBE, 11.65 ml Polyacrylamid und 28.85 ml bidest. Wasser gemischt. Die Polymerisation wurde durch 500 μ l AMPS und 50 μ l TEMED gestartet und die Gel-Lösung zwischen die zwei Platten gegossen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für die Auswertung mit Ethidiumbromid (1 ng/ml) gefärbt und die DNA mit UV-Licht (203 nm) sichtbar gemacht.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Bedeutung der bakteriellen Eisenspeicherung für die Adaptation an das Habitat Magen

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass das Ferritin Pfr in *H. pylori* die Funktionen eines intrazellulären Eisenspeichers unter Eisenmangelbedingungen übernimmt [29], und die Bakterien vor hohen toxischen Eisenkonzentrationen schützt [30]. Da das Ferritin deshalb auch für die Anpassung an unterschiedliche Eisenkonzentrationen in der Magenmucosa von Bedeutung sein könnte, sollte der Einfluss des Eisenspeicherproteins auf das Kolonisierungsvermögen im Tiermodell untersucht werden. Zudem sollte das Zusammenspiel von Eisen und Säure, das insbesondere im Magen von Bedeutung sein könnte, *in vitro* analysiert werden.

4.1.1 Einfluss der Ferritin-Mutation auf das Kolonisierungsverhalten im Tiermodell

Der Einfluss der durch Ferritin vermittelten Eisenspeicherung auf die Kolonisierung der Magenmucosa wurde im gut etablierten *H. pylori*-Tiermodell Mongolischer Gerbil untersucht. Die Analysen wurden in Kooperation mit PD Dr. Stefan Odenbreit am Max von Pettenkofer-Institut in München durchgeführt. Um die Rolle von Ferritin in der Wirtsadaptation untersuchen zu können wurde das *pfr*-Gen in dem Gerbil-adaptierten *H. pylori*-Stammes Q1 durch Insertion einer *cat*-Kassette inaktiviert. Um unspezifische Effekte während der Mutation, die eine Kolonisierung verhindern könnten, auszuschliessen wurde in den Experimenten eine parallel hergestellte *cagA*-Mutante mitgeführt. Diese Mutation hatte keinen Einfluss auf das Kolonisierungsvermögen von *H. pylori*. Jeweils sechs Gerbile wurden oral mit dem Elternstamm Q1, der isogenen *pfr*-negativen Mutante oder der *cagA*-defizienten Mutante infiziert. Die bakterielle Kolonisierung wurde durch Reisolierung der Bakterien nach drei (drei Tiere) und sechs Wochen (drei Tiere) bewertet. Da sich zeitabhängig kein signifikanter Unterschied in der Besiedlungsdichte ergab, konnten die Werte gemittelt werden. Die Analyse der reisolierten Bakterien zeigte, dass in den Tieren, die mit dem Elternstamm und der *cagA*-Mutante infiziert worden waren, eine vergleichbare Anzahl an Bakterien pro Gramm Magenmucosa vorhanden war. Aus den Tieren, die mit der *pfr*-negativen Mutante infiziert worden waren, ließen sich keine Bakterien anzüchten (Abb. 6).

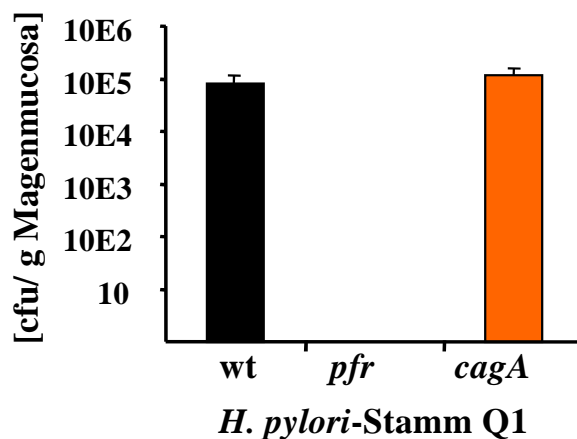


Abb. 6: Kolonisierungsvermögen einer *H. pylori* Pfr-Mutante im Gerbil-Tiermodell

Die Tiere wurden mit *H. pylori*-Stamm Q1 (wt), der *pfr*-Mutante (*pfr*) oder der *cagA*-Mutante (*cagA*) infiziert. Die bakterielle Kolonisierung wurde durch Reisolierung aus dem Magen nach drei und sechs Wochen ermittelt. Die gezeigten Werte stammen aus zwei separaten Experimenten, die Standardabweichungen sind angegeben.

4.1.2 Die Ferritin-vermittelte Eisenspeicherung schützt *H. pylori* vor Säure-vermittelter

Eisentoxizität

Da auch in *H. pylori* wie in Salmonella ein Zusammenhang zwischen der Eisen und der pH-Wert abhängigen Regulation über das globale Regulatorprotein Fur bestand [39, 280], wurde bereits in Vorarbeiten der Einfluss des Eisenspeicherproteins unter Säurebedingungen untersucht. Die Beobachtung, dass Säurezusatz zum Flüssigmedium keinen Einfluss auf das Wachstum einer Pfr-negativen Mutante im Vergleich zum Elternstamm hatte, wies auf eine fehlende Schutzfunktion unter diesen Bedingungen hin. Im Gegensatz dazu zeigten die für Eisen(II)chlorid bestimmten minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs), die 4 mM für den Elternstamm G27 und 2.5 mM für die isogene *pfr*-negative Mutante G27-PFR betragen, dass Pfr die Bakterien vor hohen toxischen Eisenkonzentrationen schützt. Da Eisen(II) jedoch vor allem im sauren Milieu stabil ist, sollte der gleichzeitige Einfluss von Säure und Eisen untersucht werden. Dazu wurden der *H. pylori*-Elternstamm G27 und die isogene *pfr*-negative Mutante G27-PFR unter Zusatz von Eisen(II)chlorid in mit Säure auf einen pH-Wert 6 titrierten Flüssigmedium kultiviert. Als Kontrollen wurden Kulturen mit Säurezugabe (pH 6) und Eisenüberschuss (1000 µM Eisen(II)chlorid) alleine und eine Kultur ohne Zusätze (BBF) mitgeführt. Das Wachstum beider Stämme unter allen drei Kontrollbedingungen war identisch (Abb. 7). Zusatz von 1000 µM Eisen(II)chlorid in Anwesenheit von Säure reduzierte Wachstum in beiden Stämmen deutlich, was auf eine Verstärkung der Eisen-Toxizität durch Säure hinweist. In Gegenwart von Eisen und Säure war das Wachstum der Pfr-Mutante im Vergleich zum Elternstamm nochmals ausgeprägt reduziert (Abb.7). Dies lässt auf eine Schutzfunktion des Ferritins in der Säurevermittelten Eisentoxizität schließen.

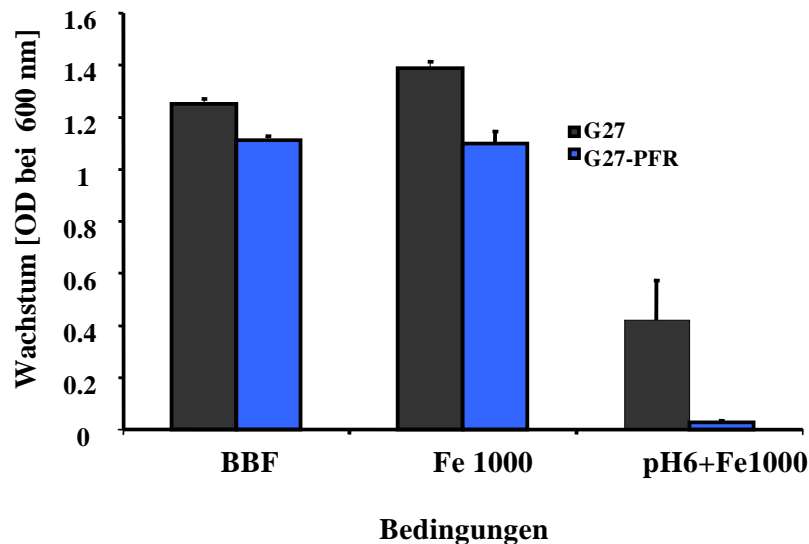


Abb. 7: Einfluss von Ferritin auf die Säurevermittelte Eisentoxizität. Wachstum des Elternstammes G27 (dunkle Balken) und der Pfr-negativen Mutante G27-PFR1 (blaue Balken) nach 48 Stunden. unter Normalbedingungen (BBF); Eisenüberschuss (1000 μM), erniedrigtem pH-Wert (pH 6) und in Kombination (pH 6 + Fe 1000 μM) beider Bedingungen. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.1.3 Einfluss von Eisen auf die Fur-Bindung am Pfr-Promotor

Da das Regulatorprotein Fur an der metallabhängigen Regulation des Ferritins beteiligt ist [29], sollte eine mögliche Bindung des Regulatorproteins Fur an den Promotorbereich des *pfr*-Gens untersucht werden. Fur vermittelt die Repression von Ferritin unter Eisenmangelbedingungen, Nickel-, Kupfer-, Zink- und Mangan-Überschuss [29]. Die Untersuchung der Fur-Bindung an den *pfr*-Promotor wurde in Zusammenarbeit mit Johannes Guhl im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit durchgeführt. Dazu wurde das *fur*-Gen aus dem *H. pylori*-Stamm NCTC 11638 mittels PCR mit den spezifischen Primern FURASK7-L1 und FURASK7-R1 (s. Tab.9), die an ihrem jeweiligen 5'-Ende um eine *BsaI*-Restriktionsstelle verlängert waren, amplifiziert. Diese Restriktionsstelle wurde verwendet, um die DNA des *fur*-Gens exakt mit den auf dem Vektor pASKIBA-7TM (Plasmidkarte siehe Anhang) kodierenden funktionellen Elementen, wie dem Strep-tag, zu fusionieren. Nach Klonierung wurden das Plasmid in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Die Transkription des Plasmides pASKIBA-7TM (pASK7) wurde durch einen *tetA*-Promoters/ Operator gesteuert. Die Expression des *tet*-Repressorgens, welches auch auf dem Expressionsplasmid kodiert wird, garantierte die Inaktivierung des Promoters in Abwesenheit von Anhydrotetracyclin. Die Transkription wurde mit Anhydrotetracyclin induziert, wobei Mengen eingesetzt wurden, die nicht antibiotisch wirkten. Die Überprüfung der Induktion erfolgte durch Nachweis des

Strep-tags, einer für acht Aminosäuren kodierenden Sequenz, im Westernblot. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde durch Affinitätschromatographie durchgeführt [281]. Anschließend wurde mit dem rekombinant hergestellten und gereinigten Fur-Protein und dem durch PCR amplifizierten Promotorbereich (Abb. 8) des *pfr*-Gens „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) in An- und Abwesenheit von Eisen durchgeführt.

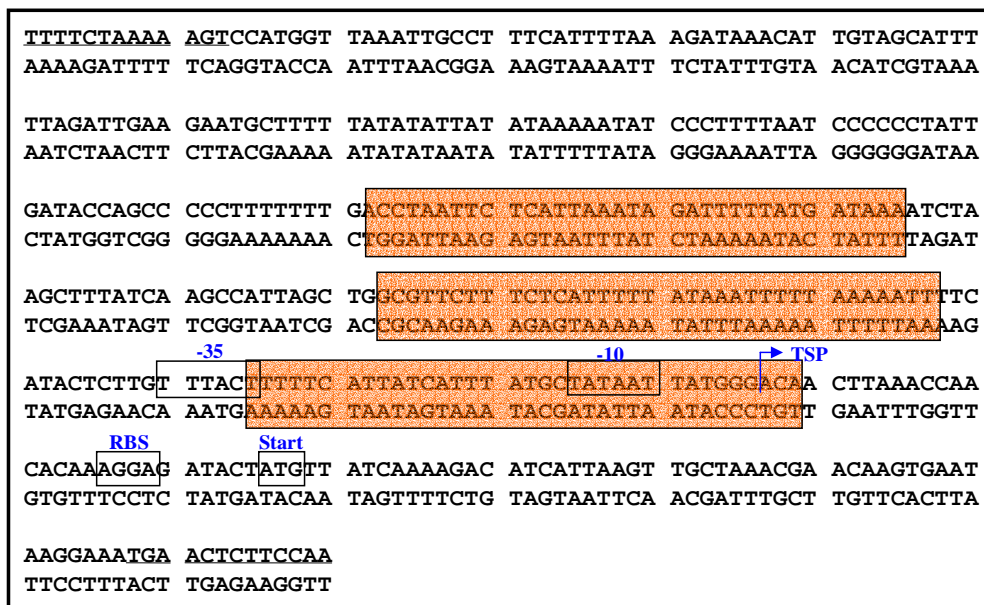


Abb. 8: Promoterregion des *pfr*-Gens des *H. pylori*-Stammes 69A. Die Graphik zeigt den DNA-Bereich vor dem Pfr-Gen, in dem die Bindestelle für das Fur-Protein vermutet wurde. Die Primerbindestellen sind unterstrichen. Die Transkriptionsstartstelle (TSP), die Ribosomenbindestelle (RBS) und das Start-Kodon des *pfr*-Gens (Start) sind markiert. „-35“- und „-10“-Region sowie RBS und Start durch grüne Rechtecke hervorgehoben. Die von Delany *et al.* [71] durch DNase-Footprinting parallel ermittelten Bindestellen des Fur-Proteins sind orange unterlegt.

Nach der Bindungsreaktion wurden die Ansätze in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die gebildeten Protein-DNA-Komplexe durch Ethidiumbromidfärbung der DNA im UV-Licht sichtbar gemacht. Die deutlich verzögerte Wanderung des Fur-DNA-Komplexes im Polyacrylamidgel bestätigte, dass Fur an die Zwischengenregion vor dem *pfr*-Gen bindet (Abb. 9). Zusatz von 200 μ M Eisen zur Bindungsreaktion verminderte die Bindung, während ein Zusatz von Natriumchlorid keinen Effekt zeigte (Abb. 9). Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten von Delany *et al.* [71] bestätigt, in denen auch die exakten Fur-Bindungsstellen ermittelt wurden.

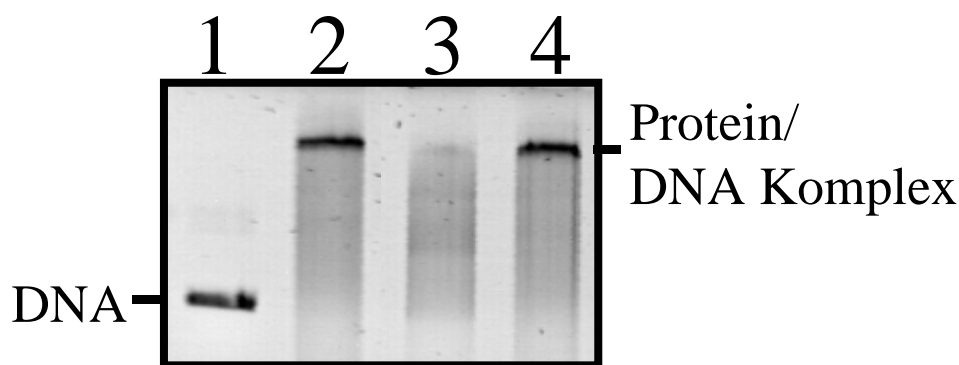


Abb. 9: Einfluss von Eisen auf die Bindung von Fur an den Pfr-Promotor In den Spuren 1-4 wurde die durch PCR amplifizierte Zwischengenregion vor dem *pfr*-Gen (DNA) ohne Fur-Protein (1) und mit Fur-Protein (2-4) analysiert. In Spur 3 wurden 200 μ M Eisenchlorid zugegeben. Spur 4 zeigt eine Kontrolle mit Natriumchlorid. Die Bindungsansätze des EMSA wurden in einem 7 %igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Positionen der DNA und der Fur-Protein-DNA-Komplexe sind markiert.

4.2 Genomweite Analyse der Eisenregulation in *H. pylori*- das Fur-Regulon

Um die Gesamtheit der durch Eisen und Fur regulierten *H. pylori*-Gene zu ermitteln, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Georg Homuth und Florian Ernst am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie in Greifswald Genomweite Analysen Eisenregulierter Gene in *H. pylori* durchgeführt. Für die DNA-Array-Hybridisierung wurde zunächst die mRNA-Isolierung optimiert um RNA-Präparationen zu erhalten, die für die DNA-Array-Hybridisierung geeignet sind. Dabei erwies sich die Methode von Ausubel *et al* (siehe Methoden) als besonders geeignet. Die mRNA von unter Eisenmangel und unter Eisenüberschuss gewachsenen Bakterien des *H. pylori*-Stammes 26696 wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben, radioaktiv markiert und mit einem kommerziell erhältlichen DNA-Makroarray für *H. pylori* hybridisiert. Unabhängig hergestellte RNA-Präparationen wurden miteinander verglichen und ausgewertet. Zur Auswertung wurde die Software ArrayVision™ 6.0 (Imaging Research Inc, USA) und GeneSpring 4.14 (Silicon Genetics, USA) verwendet. Die wichtigsten Fur-regulierten Gene zeigt Tab. 11. Alle als reguliert gefundenen Gene wurden in zwei Gruppen unterteilt. Gene die durch Eisenüberschuss oder Eisenmangel (Desferal) induziert oder reprimiert wurden, wurden als Eisen- bzw. Desferal-Stimulon definiert. Gene die zusätzlich durch Fur reguliert wurden, wurden als Fur-Regulon bezeichnet. Insgesamt konnten 101 Gene dem Desferal-Stimulon zugeordnet werden. Von diesen waren 89 Gene Fur-unabhängig reguliert (nicht gezeigt). Dazu gehörten Gene aus dem Funktionskreis der Flagellenbiosynthese und der Zellwandbiosynthese. Für 12 Gene des Desferal-Stimulons

ORF	Gen Name	DF / Fe wt		DF / Fe Δfur		Δfur / wt Fe		transkriptionelle Organisation	Genbeschreibung
HP0294	<i>amiE</i>	2.1	2.3	0.9	0.9	2.0	2.3	<i>amiE</i>	Aliphatische Amidase
HP0685	<i>fliP</i>	2.4	2.5	0.8	0.7	4.6	3.9	<i>fliP</i>	Flagellen Biosynthes Protein;
HP0686	<i>fecA1</i>	4.1	12.9	0.9	1.4	3.1	5.2	<i>fecA1</i>	Eisen(III)dicitrat Transport Protein;
HP0807	<i>fecA2</i>	14.0	46.4	1.6	1.9	3.5	13.0	<i>fecA2</i>	Eisen(III)dicitrat Transport Protein
HP0876	<i>frpB1</i>	4.6	6.5	0.6	0.7	5.9	7.8	<i>frpB1</i>	Eisenregliertes Äussere Membranprotein
Hp1406	<i>bioB</i>	2.0	3.2	0.9	0.4	4.0	9.4	<i>bioB</i>	Biotinsynthetase
HP1418	<i>murB</i>	2.0	3.6	0.9	0.3	4.7	10.9	<i>murB</i>	UDP-N- acetylenolpyruvoylglucosaminoreductase
HP1431	<i>ksgA</i>	2.8	4.2	1.3	1.5	2.7	4.8	<i>ksgA</i>	16SrRNA-Dimethyltransferase
HP1432	unbekannt	2.1	5.9	1.0	0.4	5.6	13.4	Hp1432	Histidine und Glutamine-reiches Protein
HP1443	unbekannt	2.4	5.0	0.9	0.4	5.2	13.1	Hp1443	Konserviertes hypothetisches Protein
HP1582	<i>pdxJ</i>	1.8	1.0	1.0	1.7	1.5	1.5	<i>pdxJ-pdxA</i>	Pyridoxalphosphate Biosyntheseprotein J
HP1583	<i>pdxA</i>	7.0	12.0	1.5	3.0	3.9	4.2	<i>pdxJ-pdxA</i>	Pyridoxalphosphate Biosyntheseprotein A

Tabelle 11-1.: Desferal-abhängiges Fur-Regulon. Computergestützte Auswertung der DNA-Makroarray-Analyse. Es wurden nur Gene berücksichtigt, die einen Induktionsfaktor von mind. 2 aufwiesen. Die Genbeschreibungen beziehen sich auf die komplette Genomsequenz des *H. pylori* Stammes [256]. Die Daten präsentieren Mittelwerte aus zwei Hybridisierungen. In der Tabelle angegebenen Gene werden durch Fur in seiner Eisengebundenen Form reprimiert.

ORF	Gen Name	Fe / DF wt	Fe / DF Δfur	Δfur / wt DF	transkriptionelle Organisation	Genbeschreibung			
HP0241	unbekannt	4.8	2.5	1.3	0.8	3.1	2.0	Hp0241	predicted coding region;
HP0389	<i>sodB, sodF</i>	11.7	3.3	1.7	1.4	13.1	4.3	<i>sodB, sodF</i> - Hp0388	Superoxidedismutase
HP0388	unbekannt	3.9	3.3	1.1	1.0	5.4	4.4	<i>sodB, sodF</i> - Hp0388	Konserviertes hypothetisches Protein
HP0616	<i>cheV, cheV2</i>	3.7	5.0	0.5	0.7	13.5	14.6	<i>cheV, cheV2</i>	Chemotaxis Protein
HP0631	<i>hydA</i>	2.3	2.5	1.0	0.8	3.2	3.5	<i>hydA-hydB-hydC-hydD</i>	Ni/Fe Hydrogenase. Kleine Untereinheit
HP0632	<i>hydB</i>	2.2	5.0	1.3	1.1	2.5	4.0	<i>hydA-hydB-hydC-hydD</i>	Ni/Fe Hydrogenase. Große Untereinheit
HP0633	<i>hydC</i>	4.2	3.3	1.0	1.0	4.3	4.2	<i>hydA-hydB-hydC-hydD</i>	Ni/Fe Hydrogenase. Cytochrome b Untereinheit
HP0634	<i>hydD</i>	–	–	–	–	–	–	<i>hydA-hydB-hydC-hydD</i>	Ni/Fe Hydrogenase.
HP0653	<i>pfr</i>	18.3	2.5	0.4	0.4	87.9	18.3	<i>pfr-serB</i>	Ferritin
HP0652	<i>serB</i>	1.4	1.7	0.6	0.3	8.7	8.4	<i>pfr-serB</i>	Phosphoserine Phosphatase
HP1027	<i>fur</i>	2.8	2.5	1.1	1.7	6.3	3.0	<i>fur</i>	„ferric uptake regulation“ Protein
HP1227	unbekannt	3.3	2.0	0.9	1.0	5.5	3.2	Hp1227	Cytochrome c553;
HP1253	<i>trpS</i>	3.2	2.0	1.0	0.7	3.0	3.1	<i>trpS</i>	Tryptophanyl-tRNA Synthetase
HP1524	unbekannt	4.1	2.0	1.4	0.8	2.4	2.2	Hp1524	predicted coding region

Tab. 11-2: Eisen-abhängiges Fur-Regulon. Computergestützte Auswertung der DNA-Makroarray-Analyse. Es wurden nur Gene berücksichtigt, die einen Induktionsfaktor von mind. 2 aufwiesen. Die Genbeschreibungen beziehen sich auf die komplette Genomsequenz des *H. pylori* Stammes [276]. Die Daten präsentieren Mittelwerte aus zwei Hybridisierungen. In der Tabelle angegebenen Gene werden durch Fur in seiner Eisenungebundenen Form reprimiert.

konnte gleichzeitig eine Fur-Regulation nachgewiesen werden. Diese waren neben den schon bekannten Eisenaufnahme-Genen *fecA1*, *fecA2* und *frpB1* [71, 268] das Gen für die aliphatische Amidase *amiE* [267] und das stark regulierte Gen HP1432, welches für ein Histidin- und Glutaminreiches Protein kodiert. Diese Gene wurden unter Eisenüberschuss durch das Fur-Protein in seiner Eisengebundenen Form (Fur+Fe²⁺) reprimiert. Dem Eisen-Stimulon konnten 59 Gene zugeordnet werden. Von diesen waren 45 Gene, wie die Katalase *katA* oder Gene, die für Proteine der Pathogenität und Virulenz kodieren, Fur-unabhängig reguliert (nicht gezeigt). Insgesamt 14 der Eisenregulierten Gene zeigten auch eine Fur-abhängige Regulation. So wurde z.B. das Gen der Superoxiddismutase (*sodB*) wie auch *serB*, das Gen der Phosphoserinphosphatase - ein Enzym, das den letzten Schritt in der Serinbiosynthese von 3-Phosphoserin zu Serin katalysiert – unter Eisenmangelbedingungen durch Fur in seiner Eisenungebundenen (Fur-Fe²⁺) Form reprimiert. Die Ergebnisse der DNA-Array-Hybridisierung wurden durch die bekannte Repression des *pfr*-Gens und des *fur*-Gens unter Eisenmangel bestätigt [32, 268].

4.3. Einfluss von Säure auf die Regulation der Ferritinbiosynthese

Nach Analyse der Eisenregulierten Gene, sollte eine Fur-abhängige Regulation der Ferritinproduktion durch Säure untersucht werden. Dazu wurden die unter Säurezugabe produzierten Proteine des Elternstammes NCTC 11638 und der isogenen *fur*-defizienten Mutante NCTC 11638-FUR durch 2D-Gelelektrophorese analysiert. Nach Kultivierung unter Normalbedingungen und unter Säurezusatz (pH 6) wurden die Gesamtproteine isoelektrisch fokussiert und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Der Vergleich der Proteinmuster ergab eine säureabhängige Repression der Ferritinproduktion, die in der *fur*-defizienten Mutante fehlte (Abb. 10). Durch Analyse der *pfr*-mRNA konnten dieses Regulationsphänomen bestätigt werden, was bestätigte dass die Regulation auf Transkriptionsbene stattfindet (Abb.11).

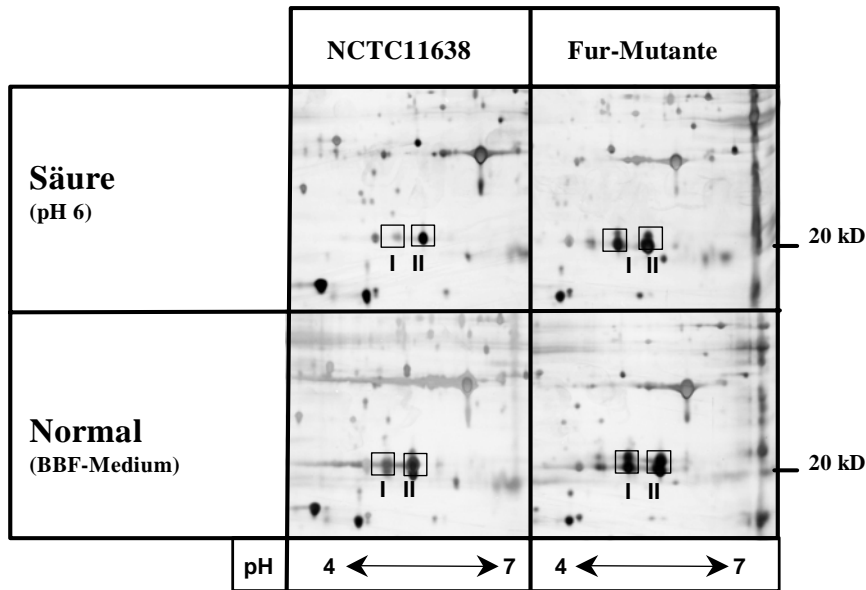


Abb. 10: Analyse der säureabhängigen Ferritin-Regulation auf Proteinebene
Gesamtproteine des Elternstammes NCTC 11638 und der *fur*-negativen Mutante NCTC 11638-FUR wurden nach Kultivierung für 48 Stunden mit Säurezugabe (pH 6) und unter Normalbedingungen (BBF-Flüssigmedium) isoelektrisch fokussiert (pH 4-7) und auf einem 17 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Ferritin-Isoformen sind durch Quadrate markiert. Die Ferritin-Isoformen, die sich entsprechend ihres pI bei pH 5-6 bewegten, wurden durch Reaktion mit einem Antiserum und durch Ansequenzierung identifiziert [280]

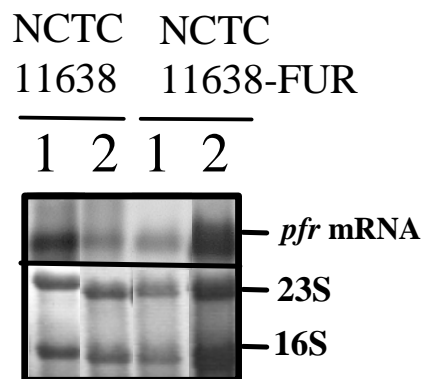


Abb. 11: Analyse der säureabhängigen Ferritin-Regulation auf Transkriptionsebene
Gesamt-RNA des *H. pylori* Stammes NCTC 11638 und der Fur-negativen Mutante NCTC 11638-FUR wurden nach Kultivierung isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Northern-Hybrisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten *pfr*-spezifischen Sonde. Spur 1, RNA unter Normalbedingungen; Spur 2, RNA nach Wachstum unter pH 6; Die *pfr*-mRNAs ist rechts markiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt die mit Methylenblau sichtbar gemachte 16S und 23S rRNAs nach Transfer auf die Membran.

4.4. Einfluss von Eisen auf die Transkriptionelle Organisation und Regulation des Urease-Operons in *Helicobacter pylori*

Man ging bisher davon aus, dass die Urease in *H. pylori* wegen der großen Bedeutung als Kolonisierungsfaktor konstitutiv produziert wird. Erst in jüngerer Zeit wurde erkannt, dass *H. pylori* die Urease-Expression reguliert [2]. So kommt es in Gegenwart von Säure zu vermindertem mRNA-Abbau bzw. zu einer Erhöhung der mRNA Stabilität, die eine Akkumulation der Urease-Transkripte bewirkt [2]. Basierend auf diesen Erkenntnissen war es Ziel der vorliegenden Arbeit weitere Umweltbedingungen zu suchen durch die die Urease auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Da die Urease Nickel als Kofaktor nutzt, sollten insbesondere Metalle als Umweltfaktoren untersucht werden und zudem mögliche Einflüsse von Eisen auf den Nickelstoffwechsel analysiert werden.

4.4.1 Transkriptionsanalyse des Urease-Operons

Die Transkriptionsanalyse des Urease-Operons in verschiedenen *H. pylori*-Stämmen bestätigte frühere Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass im Urease-Operon zwei Promotoren existieren, von denen aus mehrere Transkripte unterschiedlicher Länge gebildet werden (Abb. 12).

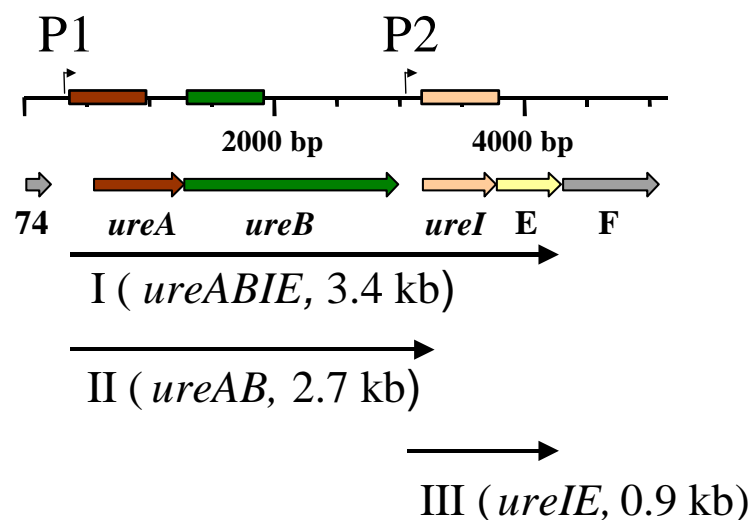


Abb. 12: Transkriptionelle Organisation des Ureaseoperons. Die Urease-Gene und ihre Transkriptionsrichtung sind durch farbige Pfeile markiert. Mit den grün und beige markierten Sonden wurden die Transkripte (mRNAs I, II, III) des Urease-Operons nachgewiesen. Die Größen (in kb) sind durch schwarze Pfeile markiert. P1, *ureA*-Promotor, P2 *ureI*-Promotor.

Der Nachweis der Urease-Transkripte erfolgte mittels Hybridisierung der mRNA mit Digoxigenin-markierten spezifischen antisense mRNAs für *ureA*, -B und *ureI* (Abb. 12). Northernblot-Analysen mit *ureA* oder *ureB*-Sonde ergaben identische Ergebnisse (nicht

gezeigt). Mit der *ureB*-spezifischen Sonde (Abb. 12) konnten zwei mRNAs *ureAB* und *ureABIE*, die am Promoter vor *ureA* (P_{ure} 1, Abb. 12) beginnen und hinter den Genen *ureB* bzw. *ureE* enden, detektiert werden. Ein weiteres Transkript, das vor dem stromabwärts gelegenen *ureI*-Gen beginnt (P_{ure} 2) endet hinter den Genen *ureIE* und wurde mit der *ureI*-spezifischen Sonde sichtbar gemacht.

4.4.2. Einfluss von Eisen auf die Transkription der Ureasegene

Um zu untersuchen, ob Änderungen in der Eisenkonzentration die Transkription der Urease-Gene beeinflusst, wurde die mRNA der *H. pylori* Stämme NCTC 11638, 1061, G27 und 26695 mittels Northern Blot-Analysen analysiert. Die Verwendung verschiedener Stämme begründete sich darin eine durch genetische Variabilität bedingte stammspezifische Variabilität der Regulation auszuschließen. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Stämme nach Wachstum unter Normalbedingungen, Eisenüberschuss (100-1000 μM FeCl_2) und Eisenmangel (10-20 μM Desferal) isoliert und die mRNA durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten antisense RNAs sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass Eisenüberschuss keinen signifikanten Unterschied auf die Konzentrationen der *ureABIE/ureAB* und *ureIE*-Transkripte hatte (Abb. 13). Eisenmangel hingegen führte in allen vier Stämmen zu einer Akkumulation der *ureABIE/ureAB* Transkripte (Abb. 13) und des *ureIE*-Transkriptes (nicht gezeigt), welche entweder auf eine Induktion der Transkription oder eine Reduktion des mRNA-Abbaus hinweist (Abb. 13). Im Folgenden wird diese Eisenmangel-Regulation der Ureasegene vereinfachend als Induktion bezeichnet.

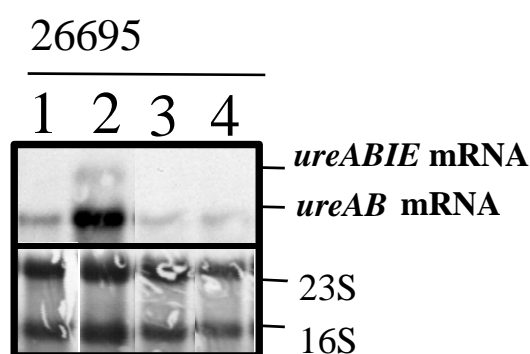


Abb. 13: Einfluss von Eisen auf die Ureasetranskription. Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 26695 wurde nach Kultivierung unter Eisenmangel und Eisenüberschuss isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Northern-Hybridisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten *ureB*-spezifischen Sonde. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methylblau sichtbar gemachte 16S und 23S rRNAs. Spur 1, RNA unter Normalbedingungen; Spur 2, RNA unter Eisenmangel (20 μM Desferal); Spur 3, RNA unter Zusatz von 100 μM Eisenchlorid; Spur 4, RNA unter Zusatz von 1000 μM Eisenchlorid. Die Urease-Transkripte sind markiert.

4.4.3 Einfluss des Regulatorproteins Fur auf die Induktion der Urease-Transkription durch Eisenmangel

Da bereits bekannt war, dass der eisenabhängige Regulator Fur an einigen Regulationsprozessen unter Eisenmangel beteiligt ist [29, 268, 269] sollte untersucht werden, ob Fur an der Induktion der Ureaseexpression unter Eisenmangel beteiligt ist. Dazu wurde die mRNA des *H. pylori*-Stammes NCTC 11638 und der entsprechenden isogenen *fur*-negativen Mutante NCTC 11638-FUR nach Kultivierung unter Normalbedingungen und unter Eisenmangel mittels Northernblot-Analysen untersucht. Es zeigte sich, dass Fur keinen Einfluss auf die Induktion der Ureasetranskripte unter Eisenmangel ausübte (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden durch Analyse der Urease-Gen-mRNAs in dem *H. pylori*-Stamm 1061 und der isogenen Fur-Mutante 1061-Fur bestätigt.

4.4.4 Auswirkung von Eisenmangel auf die Produktion der Urease-Untereinheiten

Um feststellen zu können, ob die Eisenregulation der Urease-Gene sich auf die Proteinebene auswirkt, wurde die Produktion der Urease-Untereinheiten UreA und UreB im *H. pylori*-Stamm NCTC 11638 analysiert, um parallel einen möglichen Einfluss des Regulatorproteins Fur zu untersuchen. Dazu wurden Gesamtzellextrakte der unter Normalbedingungen (BBF) und unter Eisenmangel gewachsenen Bakterien elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde eine Kultur, der die gleiche Menge an Eisenchlorid wie an Eisenchelator zugesetzt war, mit aufgetrennt. Die UreB-Bande wurde anhand eines Molekulargewichtsmarkers und dem Fehlen in einer UreB-Mutante identifiziert. Die Proteinmuster zeigten eine deutliche Zunahme der UreB-Proteinmenge unter Eisenmangelbedingungen (Abb. 14). Zudem wurde die Induktion nicht durch einen unspezifischen Effekt des Eisenchelators Desferal ausgelöst, da durch Zugabe der gleichen Menge an Eisenchlorid die Proteinmenge wieder auf das ursprüngliche Niveau zurückging. Der Regulator Fur wirkte sich nicht auf diese Induktion aus (nicht gezeigt).

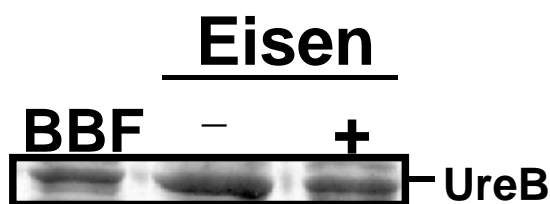


Abb. 14: SDS-PAGE zur Analyse der Proteinexpression unter Eisenmangel Jeweils 20 μg Gesamtprotein des *H. pylori*-Stammes NCTC 11638 wurden nach Kultivierung unter Normalbedingungen (BBF-Flüssigmedium), Eisenmangel (20 μM Deferal) und unter Zusatz der gleichen Menge an Eisen(II)chlorid wie Eisenchelator (20 μM Desferal+ 20 μM Eisen(II)-chlorid) auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die UreB-Bande wurde anhand eines Molekulargewichtsmarkers identifiziert. BBF, Normalbedingung; -, Eisenmangel; +, aufgehobener Eisenmangel.

4.4.5 Einfluss von Eisenmangel auf die Ureaseaktivität

Nachdem sich die Eisenmangelinduzierten Regulation der Urease auf Protein- und Transkriptionsebene nachweisen ließ, sollte untersucht werden, ob auch die Ureaseaktivität unter Eisenmangelbedingungen ansteigt. Dazu wurden Bakterien des *H. pylori*-Stammes 1061 unter Normalbedingung und unter Eisenmangel in steigenden Konzentrationen kultiviert und die Ureaseaktivität bestimmt. Durch Zugabe des Eisenchelators Deferal wurde eine Zunahme der Ureaseaktivität beobachtet (Abb. 15). Da die Zugabe des Eisenchelators Desferal zu einer Reduktion des Wachstums und damit zu einer veränderten Wachstumsphase führt, wurde die Ureaseaktivität in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase parallel analysiert. Da diese zeigte, dass die Ureaseaktivität in den verschiedenen Wachstumsphasen identisch war (nicht gezeigt), konnte die durch Eisenmangelinduzierte Erhöhung der Ureaseaktivität als Folge der gesteigerten Protein- und Transkriptionsmenge gesehen werden. Des Weiteren zeigte eine vergleichende Analyse der Stämme NCTC 11638 und NCTC 11638-FUR, dass die Erhöhung der Ureaseaktivität durch Eisenmangel in der *fur*-defizienten Mutante stärker ausgeprägt war (Abb. 16).

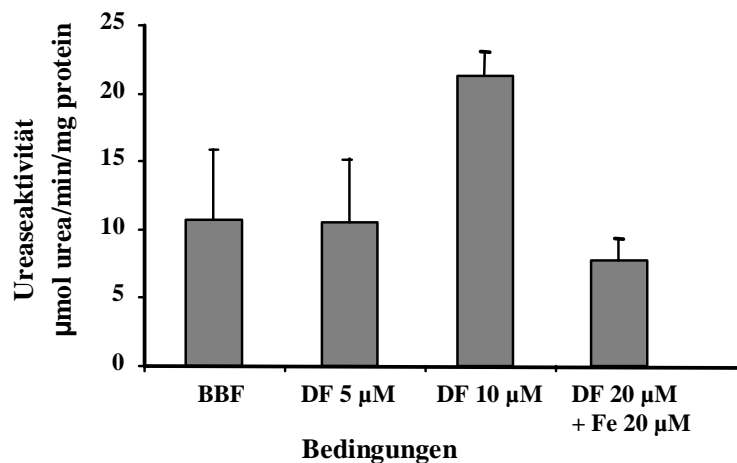


Abb. 15 : Einfluss von Eisenmangel auf die Urease-Aktivität des *H. pylori* Stammes 1061
 Urease-Aktivität von unter steigender Desferalkonzentration kultivierten Bakterien des *H. pylori*-Stammes 1061 (Balken). Die minimale Hemmkonzentration (MHK) für Desferal lag im Falle dieses Stammes bei 20 µM. Die Daten werden als spezifische Urease-Aktivität (µmol Harnstoff/min/mg Protein) präsentiert. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

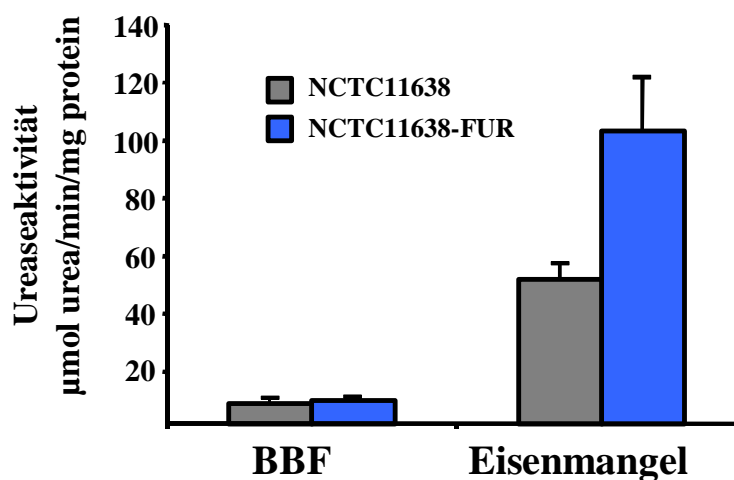


Abb. 16: Einfluss des Regulatorproteins Fur auf die Urease-Aktivität unter Eisenmangelbedingungen. Urease-Aktivität von unter Normalbedingungen (BBF) und unter Eisenmangelbedingungen kultivierten Bakterien des *H. pylori*-Stammes NCTC 11638 (graue Balken) und der isogenen Fur-negativen Mutante NCTC 11638-FUR (blaue Balken). Die Daten werden als spezifische Urease-Aktivität (µmol Harnstoff/min/mg Protein) präsentiert. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.4.6. Einfluss anderer Metalle auf die Ureasetranskription

Um den Einfluss anderer Metalle auf die Ureasetranskription zu studieren wurden die Urease-Gen-mRNAs unter Metallüberschuss kultivierter Bakterien des Stammes NCTC 11638 mittels Northernblot-Analysen untersucht. Da Nickel als Kofaktor der Urease fungiert [76, 174], wurde zunächst dieses Metall untersucht. Dazu wurde die mRNA des Stammes nach Wachstum unter Normalbedingungen und Nickelzugabe (100-1000 μM) isoliert und durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten antisense RNA sichtbar gemacht. Es zeigte sich, dass Nickel in steigenden Konzentrationen die Menge an *ureABIE* und *ureAB*-Transkripten drastisch erhöhte (Abb. 17).

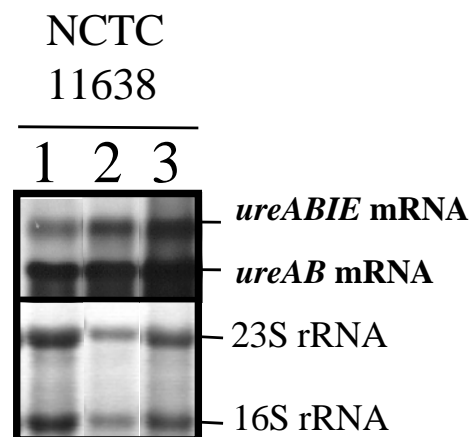


Abb. 17: Einfluss von Nickel auf die Ureasetranskription. Gesamt-mRNA des *H. pylori* Stammes NCTC 11638 wurde nach Kultivierung unter Normalbedingungen und unter Nickelüberschuss isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Northern-Hybridisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten *ureB*-spezifischen Sonde. Spur 1, RNA unter Normalbedingungen; Spur 2, RNA unter Zusatz von 100 μM Nickelchlorid; Spur 3, RNA unter Zusatz von 1000 μM Nickelchlorid; Die Urease-Gen-Transkripte sind rechts markiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt die mit Methylenblau sichtbar gemachte 16S und 23S rRNAs.

4.4.7. Einfluss des Regulatorproteins Fur auf die Nickelinduktion der Urease

Um zu untersuchen, ob die Nickelinduktion der Urease durch das Regulatorprotein Fur beeinflusst wird, wurden die mRNA der *H. pylori*-Stämme NCTC 11638 und der *fur*-defizienten Mutante NCTC 11638-FUR analysiert. Dazu wurden beide Stämme unter Normalbedingungen und unter Nickelzugabe kultiviert und die mRNA mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten Sonde sichtbar gemacht. Ein Anstieg in der Nickelkonzentration hatte in der *fur*-negativen Mutante eine etwas schwächere Induktion der Ureasetranskription zur Folge (Abb. 18). Dieses Ergebnis wurde für die *H. pylori*-Stämme 1061 und 1061-FUR bestätigt (nicht gezeigt). Weitere Analysen zur Identifikation des Regulators der Nickelinduktion der Urease von *H. pylori* wurden von der Arbeitsgruppe von Arnaud van

Vliet, mit der eine Kooperation besteht, in Rotterdam durchgeführt. [270] Als Regulator der Nickelinduktion der Urease auf transkriptioneller Ebene wurde das Regulatorprotein NikR identifiziert, das durch Bindung an den *ureA*-Promotor eine Verstärkung der Transkription in Gegenwart von Nickel bewirkte. Auf die Transkription, die Proteinmenge und die Aktivität der Urease unter Normalbedingen hatte die NikR-Mutation keinen Einfluss [271].

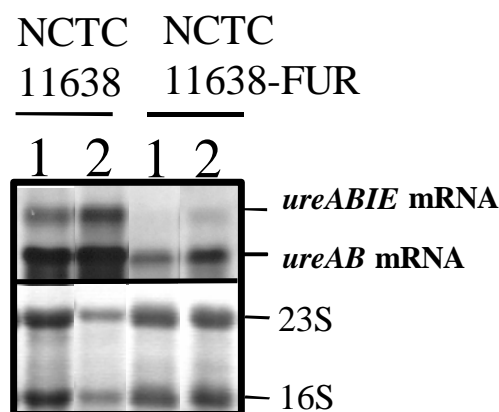


Abb. 18: Northernblot-Analyse zur Untersuchung der Rolle von Fur auf die Nickelinduktion der Ureasetranskription. Gesamt-RNA des *H. pylori* Stammes NCTC 11638 und der Fur-negativen Mutante NCTC 1168FUR wurden nach Kultivierung isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Northern-Hybrisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten *ureB*-spezifischen Sonde. Spur 1, RNA unter Normalbedingungen; Spur 2, RNA unter Zusatz von 100 μM Nickelchlorid; Die ure-mRNAs sind rechts markiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt die mit Methylenblau sichtbar gemachte 16S und 23S rRNAs

4.4.8. Einfluss von Nickel auf die Proteinexpression der Urease

Um die Transkriptionelle Nickel-Regulation der Urease auf Proteinebene zu überprüfen wurde die Produktion der beiden Urease-Untereinheiten UreA und UreB mit dem Western-Immunoblot-Verfahren analysiert. Dazu wurden die Bakterien unter Normalbedingungen in BBF-Flüssigmedium und unter Zusatz von Nickel kultiviert und die UreA- als auch die UreB-Untereinheit der Urease mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Die Akkumulation der UreA und UreB-Proteine in den unter Nickelüberschuss gewachsenen Bakterien zeigten, dass sich die Induktion der Urease durch Nickel bestätigte und auch auf die Proteinebene auswirkt (Abb. 19).

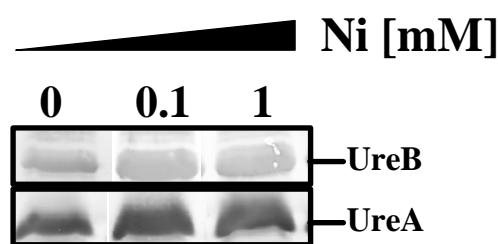


Abb. 19: Einfluss von Nickel auf die *H. pylori*-Urease-Produktion. Detektion der Urease-Produktion des *H. pylori*-Elternstammes 26695 nach Wachstum unter Normalbedingungen (Spur 0) und unter Zusatz von ansteigenden Nickelchloridkonzentrationen (Spuren mit 0.1 und 1 markiert). Die Urease-Untereinheiten UreA und UreB wurde durch spezifische Antiseren detektiert Die UreA- und UreB-Banden sind rechts markiert.

4.4.9. Einfluss von Nickel auf die Ureaseaktivität.

Um den Einfluss von Nickel auf die Ureaseaktivität zu untersuchen, wurden Bakterien des *H. pylori*-Stammes 26695 unter Normalbedingung und unter Nickel in steigenden Konzentrationen kultiviert und anschließend in Urease-Enzym-Assays analysiert. Zugabe von Nickel führte zu einer dramatischen Erhöhung der Ureaseaktivität (Abb. 20). Diese Nickelregulation wurde auch in den *H. pylori*-Stämmen NCTC 11638, 1061, G27 und N6 gefunden, wobei das Basalniveau der Urease-Aktivität Stammspezifische Unterschiede aufwies.

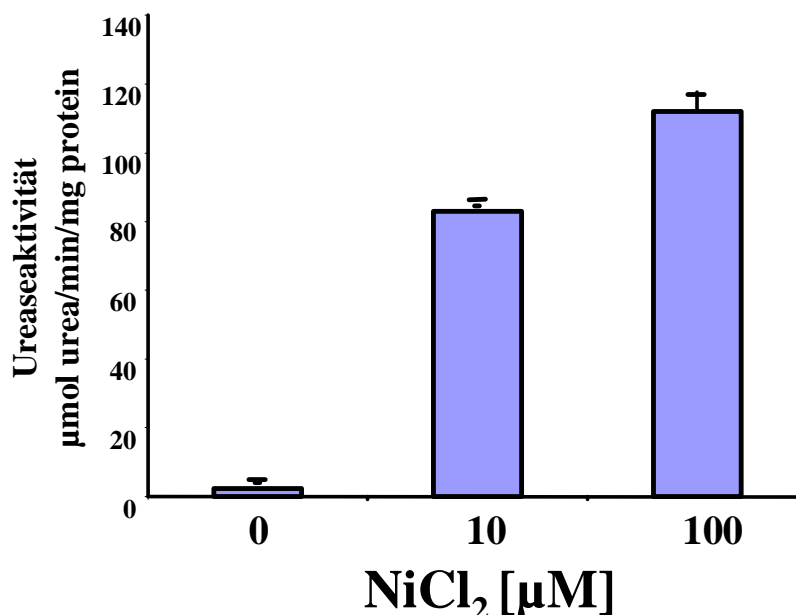


Abb. 20: Einfluss von Nickel auf die Urease-Aktivität des *H. pylori* Stammes 26695 Urease-Aktivität von unter steigender Nickelkonzentration kultivierten Bakterien des *H. pylori*-Stammes 26695 (Balken) Die Daten werden als spezifische Urease-Aktivität (µmol Harnstoff/min/mg Protein) präsentiert. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.5. Identifikation neuer Mechanismen der Kupfer-Homöostase in *H. pylori*

Neben Eisen und Nickel spielt auch Kupfer eine zentrale Rolle im Zellmetabolismus. Kupfer ist als Kofaktor für die katalytische Aktivität von Hydroxylasen, Oxidasen und Elektronentransportproteinen essentiell. Die Bedeutung von Kupfer für die Energiegewinnung von *H. pylori* zeigt sich durch das Vorhandensein von Kupfer in der bc-Typ Cytochromoxidase, dem terminalen Enzym der Atmungskette.

4.5.1 Identifikation der durch Kupfer regulierten Gene von *H. pylori*

Um neue Gene zu identifizieren, die in der Kupfer-Resistenz oder Homöostase von *H. pylori* involviert sind, wurde eine Genomweite globale Transkriptomanalyse des *H. pylori*-Stammes P1 mit und ohne Kupferbehandlung durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation durch die GPC Biotech AG in München. Dazu wurden 24 Stunden alte Vorkulturen des *H. pylori*-Stammes P1 auf eine Optische Dichte (600 nm) von 0.1 in Flüssigmedium verdünnt und für drei Stunden mit 500 μ M Kupferchlorid inkubiert. Kontrollkulturen wurden ohne Zusatz von Kupferchlorid identisch behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, radioaktiv markiert und mit einem *H. pylori*-DNA-Array von GPC hybridisiert. Die Genexpressionsanalyse wurde mit der BioChipExplorer- (GPC-Biotech, München) und Expressionist-Software (Gene-Data, Basel, Schweiz) durchgeführt. Die Auswertung bei der nur Daten als signifikant definiert wurden, die einen Induktions- bzw. Repressionsfaktor von mindestens 4 aufwiesen, zeigte, dass 20 *H. pylori* Gene durch die Kupferbehandlung differenziell reguliert werden (Tabelle 12). Während die Transkription von 19 Genen durch Kupfer induziert wurde, war nur das Ferritin-Gen *pfr* reprimiert. Die 7-fache Repression des Ferritin-Gens, die bereits aus Vorarbeiten bekannt war, bestätigte auch die Qualität der RNA-Profiling-Analyse [29]. Die stärkste Induktion mit einem Faktor von etwa 57 konnte für die Gene HP1326 und HP1428 beobachtet werden (Tabelle 12). HP1326 kodiert für ein *H. pylori* spezifisches Protein, HP1428 für ein konserviertes hypothetisches Protein. Die Funktionen beider Gene waren nicht bekannt. Der ORF HP1329, der Homologien zu CzcA Metallaustransportern besitzt, wurde durch Kupfer um den Faktor 14 induziert (Tabelle 12). Die starke Kupferinduktion der benachbarten Gene HP1326 und HP1329 und ihre Lokalisation neben einem CzcB Metallaustransport-Homolog (HP1328) wies auf eine mögliche Rolle beider Gene im Kupferstoffwechsel hin.

ORF	Genbeschreibung	Expression Werte		
		- Cu	+ Cu	Faktor
HP1326	<i>H. pylori</i> predicted coding region HP1326	529	30250	57.2
HP1428	Konserviertes hypothetisches Protein	90	5044	55.9
HP1329	Kationen Efflux System Protein (<i>czcA</i>)	38	531	14.0
HP1355	Nicotinat-Nucleotid Pyrophosphorylase (<i>nadC</i>)	187	1812	9.7
HP1446	Biopolymer Transportprotein (<i>exbD</i>)	308	2346	7.6
HP1340	Biopolymer Transportprotein (<i>exbD</i>)	61	379	6.3
HP1158	Pyroline-5-carboxylate Reductase (<i>proC</i>)	72	447	6.2
HP0994	<i>H. pylori</i> predicted coding region HP0994	157	917	5.9
HP0886	CysteinyI-tRNA Synthetase (<i>cysS</i>)	586	3193	5.5
HP0768	Molybdän Kofaktor Biosynthesis Protein A (<i>moaA</i>)	13	69	5.2
HP1516	<i>H. pylori</i> predicted coding region HP1516	36	174	4.8
HP1208	ulcer assoziierte Adenin spezifische DNA Methyltransferase (<i>hpyIM</i>)	55	263	4.8
HP1533	Konserviertes hypothetisches Protein	165	765	4.6
HP1349	<i>H. pylori</i> predicted coding region HP1349	309	1390	4.5
HP0753	Flagellen Protein (<i>fliS</i>)	11	48	4.5
HP0733	<i>H. pylori</i> predicted coding region HP0733	10	46	4.4
HP1225	Konserviertes hypothetisches integralesMembranprotein	34	146	4.3
HP1534	IS605 Transposase (<i>tnpB</i>)	114	486	4.3
HP1277	Tryptophan Synthase, alpha Untereinheit (<i>trpA</i>)	53	221	4.2
HP0653	Ferritin (<i>pfr</i>)	664	93	-7.1

Tabelle 12: Expressionswerte Kupferregulierter *H. pylori* Gene im RNA-Profiling. Gene mit einem Induktions- oder Repressionsfaktor von mindestens 4 wurden aufgelistet. Die Genbeschreibungen beziehen sich auf die komplette Genomsequenz des *H. pylori* Stammes 26695 [256]. Die Daten präsentieren Mittelwerte aus drei Hybridisierungen. Standardabweichungen lagen unter 10%.

4.5.2. Vergleichende Datenbank-Analyse des HP1326-HP1329-Operons

Weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion der Gene HP1326-29 im Kupfer-Stoffwechsel ergaben sich durch Homologien mit bereits bekannten Systemen des Kupferstoffwechsels in anderen Bakterien (Abb. 21). Eine Genomweite Datenbankanalyse, die mit der BLAST-Software (www.ncbi.nlm.gov/BLAST/) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) und dem PhyloSpher-Programm (Gene-Data, Basel, Schweiz) durchgeführt wurde, zeigte, dass der C-terminale Teil des HP1326-Proteins (Aminosäure 125 bis 444) 30 % Identität und 47 % Ähnlichkeit zu dem N-terminalen Ende des *Aquifex aeolicus* Proteins aq_1132 (TIGR locus name, NT01AA0901) aufweist (Abb. 21). Dieses Protein ist zudem ortholog zu CzcB-Homologen (Abb. 21) und damit zu HP1328. Der ORF aq_1132 ist Teil einer operon-ähnlichen Struktur, welche stromaufwärts den ORF aq_1133 beinhaltet, der homologe Bereiche zu HP1327 aufweist. Weiter stromaufwärts von aq_1132 befinden sich Gene mit Homologien zu CopA (aq_1125), einem putativen Kupferaustransporter [166], und zu einem CzcA (aq_1127) (Abb. 21). Des Weiteren besitzt das HP1327-Protein einige homologe Regionen zu CusC von *Escherichia coli*, das für den äußeren Membranfaktor des *cus*-Systems, einem RND-Transportsystem, kodiert. Das für CusC kodierende Gen liegt stromaufwärts des HP1328/ CzcB-Homologs CusB und von CusA, welches in *E. coli* Silber-Resistenz vermittelt (Abb. 21).

4.5.3. Transkriptionelle Analyse der HP1326-Genregion

Um die im RNA-Profiling entdeckte Kupferinduktion der Transkription der Gene HP1326 und -29 auf Genebene zu bestätigen, wurden die Transkripte genauer untersucht. Die im RNA-Profiling gemessenen Expressionswerte wiesen auf eine separate Transkription des HP1326-Gens von den stromabwärts gelegenen Genen HP1327, -1328 und -1329 hin. Sowohl die Basalexpression als auch die unter Kupferzusatz gemessene Expressionswerte von HP1326 und HP1329 unterschieden sich deutlich (Tab12).

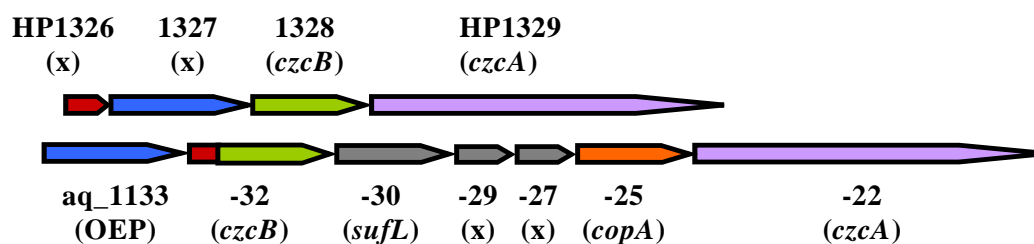
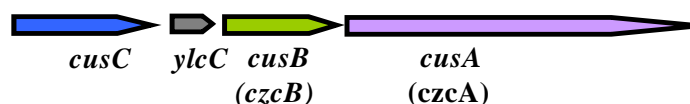
Helicobacter pylori*Aquifex aeolicus**Escherichia coli*

Abb. 21: Homologien von HP1326 bis HP1329 in *H. pylori*, *A. aeolicus* und *E. coli* Die Gene und ihre Transkriptionsrichtung sind entsprechend ihrer Grösse und Homologie durch farbige Pfeile markiert. Namen homologer Gene sind in Klammern angegeben. Der zu HP1326 homologe Bereich des aq_1132-Proteins ist als rotes Rechteck markiert. Mit grauen Pfeilen markierte Gene von *A. aeolicus* und *E. coli* besitzen keine Homologien zu *H. pylori*-Genen. Die Homologie des *A. aeolicus*-Gens aq_1125 zu CopA von *H. pylori* ist orange gekennzeichnet.

Während die Expression von HP1326 von 529 auf ein Niveau von 30250 anstieg, wurde die HP1329-Transkription von 38 auf 531 angehoben. Die Basalexpression der Gene HP1327 und HP1328 war sehr schwach und wurde auch unter Kupferzusatz nur um den Faktor zwei bzw. drei erhöht (nicht gezeigt). Für die transkriptionelle Analyse des HP1326-Gens wurde die Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 26695 nach Wachstum unter Normalbedingungen und Kupferzugabe (100-1000 μM) isoliert und die mRNA durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen antisense RNA sichtbar gemacht. Diese Northernblot-Analysen bestätigten, dass HP1326 als monocistronische Einheit abgelesen wird, da das entstandene Transkript mit etwa 400 Nukleotiden (nt) nicht groß genug war um weitere Gene zu enthalten (Abb. 22). Unter Normalbedingungen lag die Expression des HP1326-Gens Nahe der Nachweisgrenze. Zusatz von Kupfer führte ab einer Konzentration von 100 μM zu einer schwachen und ab 500 μM zu deutlicher Akkumulation des 400 nt-Transkriptes und zum Erscheinen eines zweiten Transkriptes von ungefähr 500 nt (Abb. 22). Niedrigere Kupferkonzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Transkriptmenge (Abb. 22). Für eine Analyse der Zeitkinetik der HP1326 Kupferinduktion wurden 24 Stunden alte Flüssigkulturen des *H. pylori*-Stammes 26695 für unterschiedliche Zeitabstände mit 1000 μM Kupferchlorid behandelt und die mRNA analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass ein Anstieg der Transkriptmenge bereits nach 10 Minuten zu beobachten war (Abb. 23). Die

Transkriptmenge, die nach Kultivierung von 48 Stunden unter Kupferzusatz zu sehen war, wurde bereits nach 60 Minuten erreicht (Abb. 23). Als Kontrolle diente eine Kultur, die ohne Kupferzusatz für 60 Minuten identisch behandelt wurde (Abb. 23).

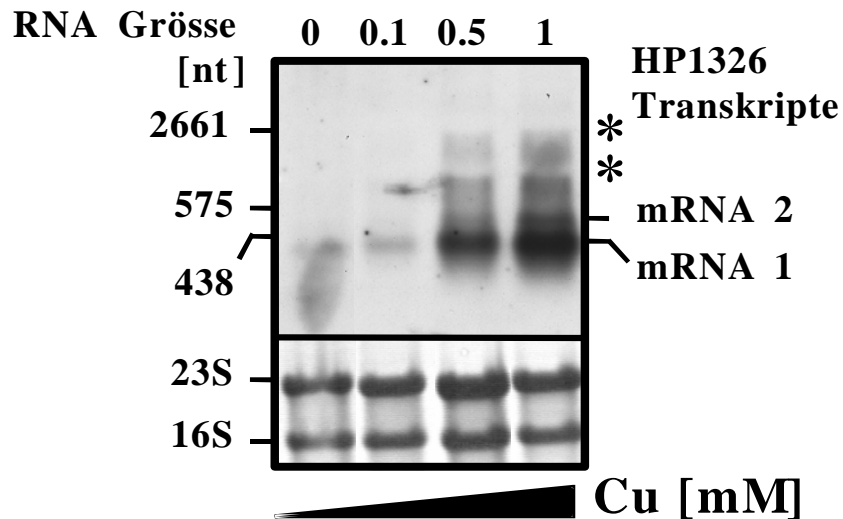


Abb. 22: Einfluss von Kupfer auf die Transkription des HP1326-Gens. Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 26695 wurde nach Kultivierung unter Normalbedingungen (Spur 0) und unter Kupferüberschuss (Spuren mit 0.1-1 mM markiert) isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen Sonde. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methylenblau gefärbten 16S und 23S rRNAs nach dem Transfer auf die Membran. Die HP1326-Transkripte sind auf der rechten Seite markiert. Transkripte, die in den 16S und 23S-Banden akkumulierten, sind mit Sternen gekennzeichnet. Die Größe eines RNA-Markers ist links angegeben.

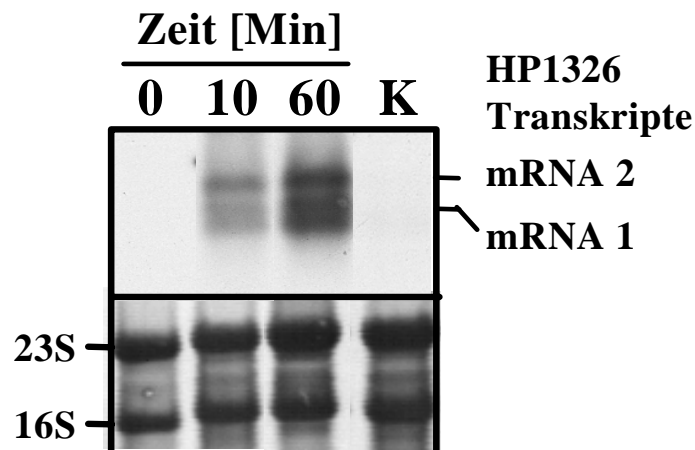


Abb. 23: Zeitkinetik der durch Kupfervermittelten HP1326 mRNA-Akkumulation. Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 26695 wurde nach Kultivierung für 24 Stunden unter Normalbedingungen (Spur 0) und Behandlung mit 1000 μ M Kupferchlorid für 10 und 60 Minuten (mit 10 und 60 markierte Spuren) isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine Kultur, die ohne Behandlung für 60 Minuten inkubiert wurde (Spur K). Die Northern-Hybridisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen Sonde. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methylenblau gefärbte 16S und 23S rRNA nach dem Transfer auf die Membran.

Um festzustellen, ob neben den zwei kleinen mRNAs des HP1326-Gens auch längere Transkripte vorkommen, wurde die stromabwärts gelegene Transkription durch Hybridisierung der Gesamt-RNA mit spezifischen antisense RNAs für HP 1327, -1328 und 1329 untersucht. Das Transkriptionsmuster, das mit einer am Anfang des Gens gelegenen HP1327-spezifischen antisense RNA erhalten wurde, war identisch zu dem durch die HP1326-spezifische RNA-Sonde erhaltene Muster (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass beide durch Kupfer induzierten mRNAs den N-terminalen Teil des HP1327 Gens enthalten. Die Transkripte der Gene HP1328 und HP1329 konnten auch nach Wachstum unter Kupferüberschuss (bis zu 1000 μM) nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass Kupfer keine längeren Transkripte als die zwei kleinen HP1326-Transkripte induziert und dass sich die Expression der Gene HP1328 und HP1329 unter der Nachweisgrenze der Northernblot-Analyse befinden. Dies steht in Einklang mit den Expressionswerten, die im RNA-Profilung gemessen wurden (Tab. 12), schließt die Existenz längerer Transkripte jedoch nicht aus. So könnte die beobachtete Akkumulation von Transkripten in den 16S und 23S-Banden der RNA auf längere Transkripte hinweisen, die nur aufgrund von Instabilität nicht als einzelne Banden nachweisbar sind. Die geringe Länge der durch Kupfer induzierten HP1326-Transkripte wies auf eine effektive Termination der Transkription hinter dem HP1326-Gen hin. Zur Identifikation möglicher Transkriptionsstops wurde eine Software-Analyse mit einem Terminator-Programm durchgeführt. Die Suche ergab, dass sich kurz hinter dem Start-Kodon von HP1327 zwei „inverted repeat“-Strukturen (IVR) befinden (Abb. 24), die Terminatoren darstellen könnten. Ausgehend von diesen Strukturen konnte entsprechend der in den Northernblot-Analysen ermittelten Transkriptgrößen stromaufwärts eine passende -10 und -35 Region gefunden werden. Somit kann vermutet werden, dass die Transkription nach Bindung der RNA-Polymerase an den zwischengenetischen Bereich vor dem HP1326-Gen (-35 und -10 Region) initiiert wurde und das HP1326-Gens bis zu den Terminationssequenzen IVR1 bzw. IVR2 abgelesen wird. Dies stimmt gut mit den berechneten Transkriptgrößen der zwei HP1326 mRNAs von 411 und 492 nt (Abb. 24) überein. Der Befund, dass beide Terminator-Strukturen bereits im kodierenden Bereich des HP1327-Gens liegen, wurde durch das identische Transkriptionsmuster der Northernblot-Analysen sowohl mit der HP1326 als auch mit der HP1327-Sonde bestätigt (nicht gezeigt).

```

-35          -10          RBS          Start HP1326 Stop
TTTACA CAAAAGAGGGT TATTAT CCGTTCGCAACAAGAATTTCTTGTTATCTTAATGTA AAGG TCAAAACC - ATG 372 Bp - TAA

Start HP1327   IVR1           IVR1   Stop mRNA 1 (411 nt)
GAGCATGCTATCTTTTATAAGCGCGTTTGATAAAAGGGGCGTTTCAATACGCCTTTAACAGCCTTGTTACTGCTTTTTAGTTGGGT
  M L S F I S A F D K R G V S I R L L T A L L L L F S L G
      IVR2           IVR2   Stop mRNA 2 (492 nt)
TTGGCTAAAGATTAGAGATCCAATCTTTTGTGGCTAAATACCTTTCTAAAAAT
  L A K D L E I Q S F V A K Y L S K N...

```

Abb. 24: Analyse der DNA-Sequenz-Motive im HP1326-Gen. Die Bindestelle des Primers 1327-L1, welcher zur Herstellung der HP1327-spezifischen antisense mRNA verwendet wurde, ist durch einen horizontalen Pfeil gekennzeichnet. Sequenzmotive mit signifikanten Homologien zu -35 und -10 Promotorregionen, mögliche Bindestellen für die RNA-Polymerase und die Ribosomenbindestelle (RBS) sind unterstrichen. Zwei „inverted repeat“-Strukturen (IVR 1 und IVR 2) sind markiert.

Die Analyse der HP1326-Transkription in den *H. pylori*-Stämmen 1061 und NCTC 11638 ergaben vergleichbare Ergebnisse, sodass nicht von einer stammspezifischen Regulation ausgegangen werden kann. Die Kupferinduktion der HP1326-Transkription erfolgte im *H. pylori*-Stamm 1061 jedoch bereits durch Zusatz von 100 µM Kupferchlorid. Diese Unterschiede im Beginn der Transkriptionsinduktion begründen sich auf die unterschiedliche minimale Hemmkonzentration (MHK) beider Stämme gegenüber Kupfer. Während der Stamm 1061 eine MHK von 1 mM Kupfer besitzt, wächst der *H. pylori*-Stamm 26695 bis zu einer Konzentration von 3 mM Kupfer.

4.5.4. Mutationsanalyse der Gene HP1326 bis HP1329

Um Funktionen der Proteine HP1326, -27, -28 und -29 im Kupferstoffwechsel zu untersuchen, wurden die entsprechenden Gene im Chromosom des *H. pylori*-Stammes 26695 inaktiviert. Das HP1326-Gen wurde durch Insertion einer *cat*-Kassette (Gen der Chloramphenikol-Acetyl-Transferase) mit Ribosomenbindestelle aber ohne Promotor- und Terminatorsequenzen inaktiviert, um mögliche polare Effekte auf die Nachbargene auszuschließen. Um die Expression der Gene stromabwärts gelegenen Gene zu gewährleisten, wurden die Gene HP1327, -28 und -29 durch Insertion von *cat*-Kassetten mit Promotor inaktiviert (Abb. 25). Dazu wurde das *cat*-Gen aus dem Plasmid pTnMax5 (siehe Anhang) mit den Primern CATS1 für den Bereich mit Promotor und CATS2 in Kombination mit CATAS1 amplifiziert. Die *cat* bzw. *Pcat*-Gene wurden mit stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Bereichen der HP1326-29 Gene mittels modifizierter Megaprimer-PCR fusioniert (Abb. 25) und anschließend in den Vektor pZERO2 (Invitrogen; siehe Anhang.) kloniert. Die wiederholte Transformation des *H. pylori*-Elternstammes 26695 mit den resultierenden Plasmiden pHP1326CAT, pHP1327PCAT, pHP1328PCAT und pHP1329PCAT (Tabelle 8,

Plasmidkarten (siehe Anhang), welche die Insertion in den korrespondierenden Gene beinhalteten, zeigte, dass die Gene HP1326, -27 und -28, aber nicht HP1329 inaktiviert werden konnten. Die Tatsache, dass auch nach mehr als zehn Wiederholungen der Transformation keine Mutanten im HP1329-Gen isoliert werden konnten, weist darauf hin, dass das Gen für das Wachstum essentiell ist.

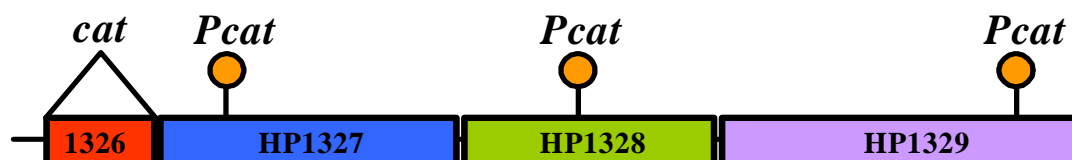


Abb. 25: Schematische Darstellung der Mutationsanalyse der Gene HP1326-29. Die Gene sind als farbige Rechtecke entsprechend ihrer Größe dargestellt. Die Insertionsstellen der *cat* (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen ohne Promotor) bzw. *Pcat*-Kassetten (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen mit Promotor) sind markiert.

4.5.5. Funktionen der Gene HP1326, -27 und 28 in der Kupfer-Homöostase

Untersuchungen zur Vitalität von isogenen Mutanten unter unterschiedlichen Umweltbedingungen dienen als Marker für fehlenden Aus- oder Eintransport. Fehlender oder verminderter Eintransport sollte durch eine Erhöhung der Resistenz, fehlender Austransport durch gesteigerte Sensitivität gegenüber der gewählten Umweltbedingung angezeigt werden. Um den Einfluss von HP1326, -27 und -28 auf die Kupferresistenz von *H. pylori* zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente mit den entsprechenden Mutanten durchgeführt. Dazu wurde der *H. pylori*-Elternstamm 26695 und die Mutanten 26695-1326, -27 und -28 in Flüssigmedium unter Normalbedingungen (BBF) und unter Kupferzusatz in steigender Konzentration kultiviert (Abb. 26). Das Wachstum aller Stämme unter Normalbedingungen war identisch, was darauf hinweist, dass sich die Mutationen nicht nachteilig auf den Grundstoffwechsel der Bakterien auswirken. Zusatz von 100 μ M Kupferchlorid zum Medium führte in den HP1327- und HP1328-Mutanten zu einer drastischen Wachstumsbeeinträchtigung. Nach Zugabe von 500 μ M Kupferchlorid wuchs auch die HP1326-Mutante nicht mehr, während der Elternstamm weiterhin unbeeinflusst wachsen konnte (Abb. 26). Der kupfersensible Phänotyp aller drei Mutanten im Vergleich zum Elternstamm zeigt, dass alle drei Gene für die Kupferresistenz benötigt werden. Die deutlich erniedrigten MHKs von Kupfer der HP1327- und 28 Mutanten von 0.1 mM und der HP1326-Mutante von 0.5 mM im Gegensatz zu einer MHK des Elternstammes 26695 von 3 mM (nicht gezeigt) weist auf eine Funktion der entsprechenden Proteine als Kupfer-Austransporter hin, was schon durch die

Homologie zum Czc-System nahe gelegt wurde. Um osmotische Einflüsse ausschließen zu können wurde Natriumchlorid entsprechend der höchsten Konzentration an Kupferchlorid dem Medium zugesetzt. Dies hatte keinen Effekt (nicht gezeigt).

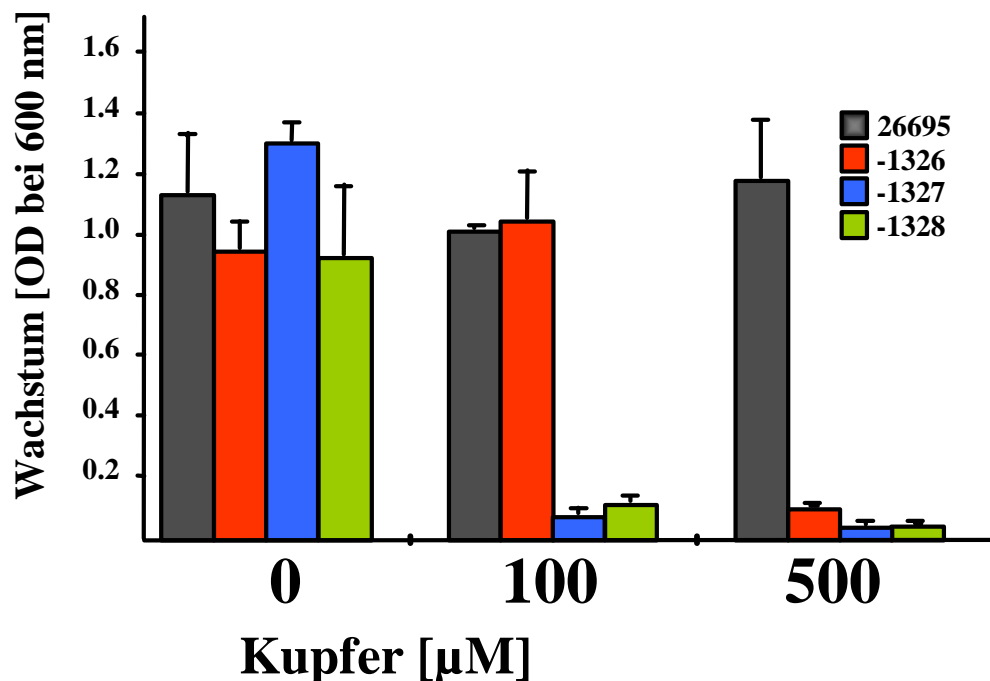


Abb. 26: Einfluss der HP1326-28 -Mutationen auf die Kupferresistenz von *H. pylori*. Wachstum des Elternstammes 26695 (dunkle Balken) und der HP1326 (rot), -27 (blau) und -28 (grün) -Mutanten nach 48 Stunden unter Normalbedingungen (0) und mit steigenden Kupferkonzentrationen (100-500 µM). Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.5.6. Einfluss der HP1326, -27 und -28-Mutation auf die zytoplasmatische Kupfer-Konzentration

Der kupfersensible Phänotyp der HP1326, -27 und -28 Mutanten wies darauf hin, dass Kupfer bedingt durch fehlenden Austransport im Zytoplasma akkumuliert und somit eine toxische Konzentration erreicht. Da der Austransport von Metallen experimentell nur schwer bestimmbar ist, wurde die zytoplasmatische Kupferkonzentration indirekt durch Analyse der Kupferinduzierten HP1326-Transkription in der HP1326-Mutante untersucht. Um den Einfluss der HP1326-Mutation auf die Kupferinduktion des HP1326-Gens analysieren zu können, wurde die *HP1326::cat*-Fusion in der 26695-1326-Mutante als Reporter verwendet. Dazu wurden die *H. pylori*-Stämme 26695 und 26695-1326 unter Normalbedingungen und mit Zusatz von 100 µM Kupferchlorid kultiviert. Nickelchlorid diente als Kontrolle. Die

Proteinkonzentration des Cat-Proteins wurde mittels eines kommerziell hergestellten ELISA anhand einer Standardkurve gemessen. Der Anstieg der Cat-Konzentration von 1.89 ± 0.87 ng Cat-Protein/ mg Gesamtprotein auf 51.7 ± 14 ng Cat-Protein/ mg Gesamtprotein, ließ auf eine erhöhte intrazelluläre Kupferkonzentration schließen, da die HP1326-Transkription unter gleicher zugesetzter Kupfermenge im Elternstamm nicht oder nur schwach verstärkt wurde (siehe Abb. 22). Nickelzugabe zeigte keinen Einfluss auf die Cat-Produktion (Abb. 23).

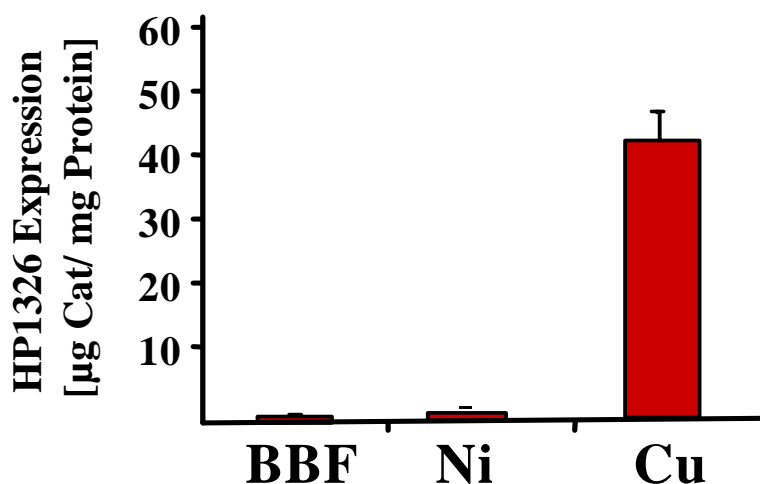


Abb. 23: Einfluss von Kupfer auf die Cat-Produktion der HP1326-Mutante. Der *H. pylori*-Stamm 26695-1326, der eine *hp1326::cat* Fusion besitzt, wurde unter Normalbedingungen und unter Zusatz von 100 µM Kupfer- und Nickelchlorid für 48 Stunden bei 37° C unter microaeroben Bedingungen kultiviert. Die Menge an Cat-Protein wurde mittels eines kommerziellen ELISAs anhand von Standardkurven bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Standardabweichungen sind angegeben.

Um eine mögliche Erhöhung der intrazellulären Kupferkonzentration in den HP1327 und- 28 Mutanten feststellen zu können, wurde die durch Kupfer induzierte HP1326-Transkription untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA von unter Normalbedingung und unter Kupferzusatz gewachsenen Kulturen isoliert und die HP1326-Transkripte mittels HP1326-spezifischer antisense RNA sichtbar gemacht. Die Akkumulation der HP1326-Transkripte in der HP1327 Mutante unter Zusatz von 50 µM Kupferchlorid und in der HP1328 Mutante ohne Zusatz von Kupfer (Abb. 24), bestätigten die Annahme, dass es durch die Mutationen zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Kupferkonzentration kommt.

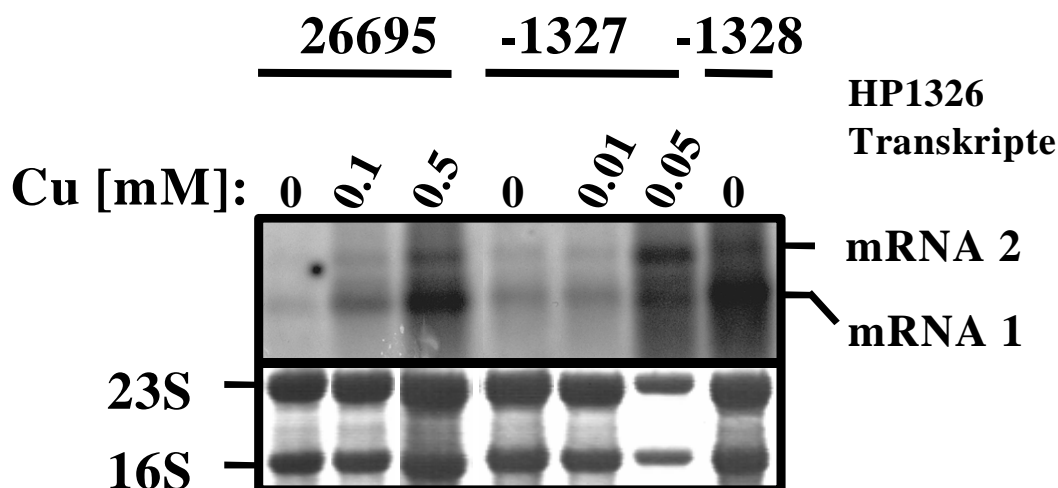


Abb. 24: Einfluss der HP1327 und -28-Mutation auf die Kupfer-Homöostase. Gesamt-RNA der *H. pylori*-Stämme 26695, -1327 und -1328 wurden nach Kultivierung für 48 Stunden unter Normalbedingungen (0) und nach Behandlung mit Kupferchlorid (wie angegeben) isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Northern-Hybridisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen Sonde. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methylenblau gefärbten gemachten 16S und 23S rRNAs nach dem Transfer auf die Membran.

Um die Erhöhung der zytoplasmatischen Kupferkonzentration als Folge der HP1326-Mutation unabhängig zu bestätigen, wurde die kürzlich beschriebene Kupfer- und Fur-abhängige Repression der Ferritin-Biosynthese [29] als Biosensor verwendet. Da Fur die Synthese von Ferritin bei erhöhter Kupferkonzentration im Zytoplasma senkt, sollte ein Anstieg der intrazellulären Kupfermenge an einer Hyperrepression der Ferritin-Produktion durch Kupfer zu erkennen sein. Zur Untersuchung der Ferritin-Produktion wurden die Gesamtproteine des *H. pylori*-Elternstammes 26695 und der HP1326-Mutante nach Wachstum unter Normalbedingungen und unter Zusatz von 100 μ M Kupferchlorid in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit dem Ferritin-spezifischen Antiserum AK198 analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass die Kupfer-Repression der Ferritin-Biosynthese in der HP1326-Mutante im Vergleich zum Elternstamm deutlicher ausgeprägt war (Abb. 25). Dies belegt, dass HP1326 für die Erhaltung der Kupfer-Homöostase im Zytoplasma essentiell ist und dass die zytoplasmatische Kupferkonzentration infolge der HP1326-Mutation erhöht ist.

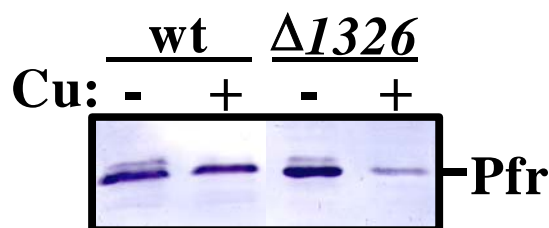


Abb. 25: Einfluss der HP1326-Mutation auf die Kupfer-Repression der Ferritin-Biosynthese Analyse der Ferritin Produktion des *H. pylori*-Elternstammes 26695 (wt) und der HP1326-Mutante 26695-1326 ($\Delta 1326$) nach Wachstum unter Normalbedingungen (-) und unter Zusatz von 100 μM Kupferchlorid (+). Ferritin wurde durch das Ferritin-spezifische Antiserum AK198 detektiert Die Ferritin-Bande ist rechts markiert (Pfr).

4.5.7. Einfluss der Gene HP1326, -27 und 28 auf den Stoffwechsel anderer Metalle

Um festzustellen, ob die Proteine HP1326, -27 und -28 neben Kupfer auch andere Metalle transportieren können, wurden Studien zur Wachstumshemmung mit den entsprechenden Mutanten unter Zusatz verschiedener Metalle durchgeführt.

4.5.7.1. Einfluss auf den Eisenstoffwechsel

Um den Einfluss der HP1326, -27 und -28 Mutationen auf die Eisen-Resistenz zu untersuchen, wurden die *H. pylori*-Stämme 26695, 26695-1326, -27 und -28 unter Normalbedingungen, Eisenmangelbedingungen und unter Zusatz von Eisen(II)chlorid in steigenden Konzentrationen kultiviert. Es zeigte sich, dass das Wachstum aller Stämme sowohl unter Eisenüberschuss als auch unter Eisenmangel identisch war (nicht gezeigt). Zur weiteren Analyse sollte der mögliche Einfluss von Eisen auf die HP1326-Transkription untersucht werden. Dazu wurde die Gesamt-RNA nach Kultivierung des *H. pylori*-Elternstammes 26695 unter Normalbedingungen, Eisenmangel (20 μM Desferal) und Eisenüberschuss isoliert und die HP1326-Transkripte mittels HP1326-spezifischer antisense RNA sichtbar gemacht. Die Northernblot-Analyse zeigte, dass unter Zusatz von Eisenchlorid kein Einfluss auf die HP1326-Transkription sichtbar war (Abb. 26). Eisenmangel führte zu einer schwachen Induktion des 500 nt-Transkriptes (Abb. 26). Andere Metalle wie Zink, Kobalt und Mangan hatten keinen Einfluss auf die HP1326-Transkription (nicht gezeigt).

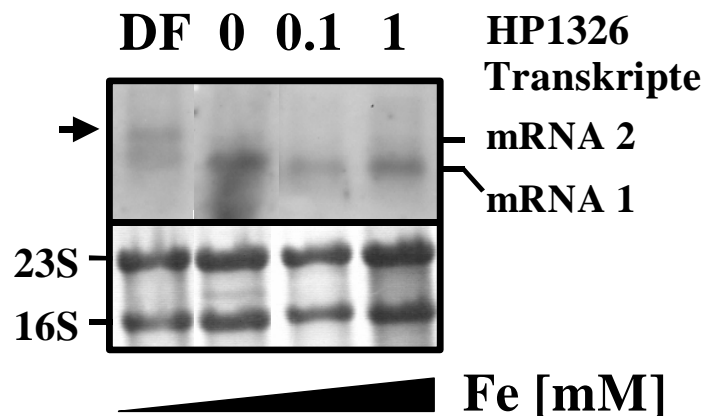
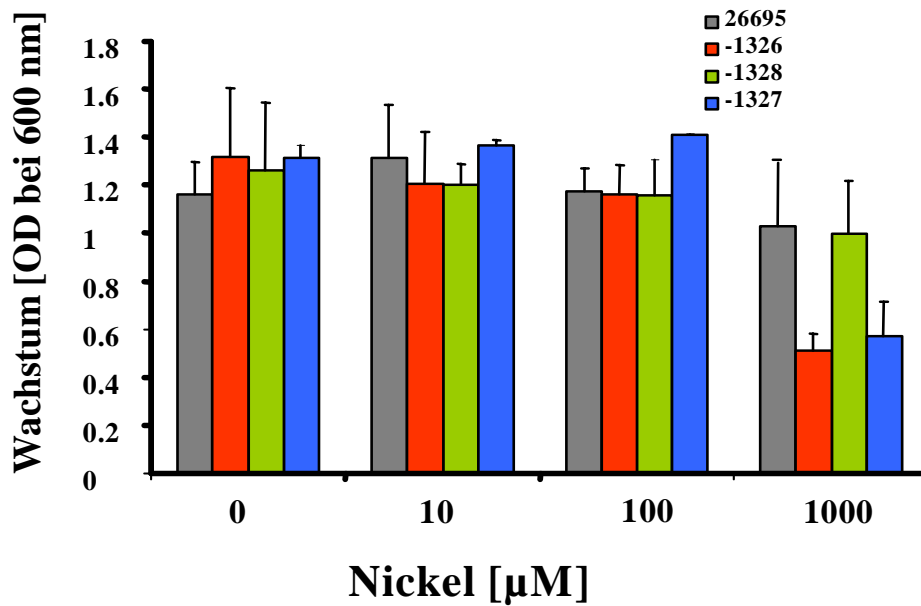


Abb. 26: Einfluss von Eisen auf die Transkription des HP 1326-Gens. Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 26695 wurde nach Kultivierung unter Normalbedingungen (Spur 0), unter Eisenmangel (Spur DF) und unter Eisenüberschuss (Spuren mit 0.1 und 1 mM markiert) isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Der Nachweis der HP1326 mRNA erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen Sonde. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methylenblau sichtbar gemachte 16S und 23S rRNAs. Die HP1326-Transkripte sind auf der rechten Seite markiert. Die schwache Akkumulation des 500 nt-Transkriptes (mRNA 2) ist auf der linken Seite durch einen Pfeil markiert.

4.5.7.2. Einfluss der HP1326, -27 und -28 Mutationen auf den Nickstoffwechsel

Das Metall Nickel spielt in *H. pylori* eine wichtige Rolle, da es den Kofaktor des Pathogenitätsfaktors Urease darstellt. Da Nickel jedoch ebenso wie Kupfer und Eisen in hohen Konzentrationen toxisch wirkt, sollte untersucht werden, ob die HP1326, -27 und -28 Proteine Nickel transportieren können. Die Kultivierung des *H. pylori*-Elternstamm 26695 und der Mutanten 26695-1326, -27 und -28 in Flüssigmedium unter Normalbedingungen (BBF) und unter Nickelzusatz in steigender Konzentration ergab, dass die Zugabe von 1000 μM Nickelchlorid zum Medium das Wachstum der HP1326 und HP1327-Mutanten deutlich reduzierte (Abb. 27). Ab einer Konzentration von 2000 μM Nickelchlorid konnte auch die HP 1328-Mutante nicht mehr wachsen (Abb. 27), während die MHK des Elternstammes bei 2500 μM lag (nicht gezeigt). Die verringerte Nickel-Sensitivität der HP1328-Mutante gegenüber den beiden anderen Mutanten zeigt, dass die HP1326-Mutation keinen polaren Effekt auf die Transkription von HP1328 ausübt. Des Weiteren zeigen die reduzierten MHKs der HP1326-28 Mutanten, dass die Proteine neben Kupfer auch Nickel aus der Zelle transportieren können. Vermutlich jedoch mit schwächerer Affinität.

A



B

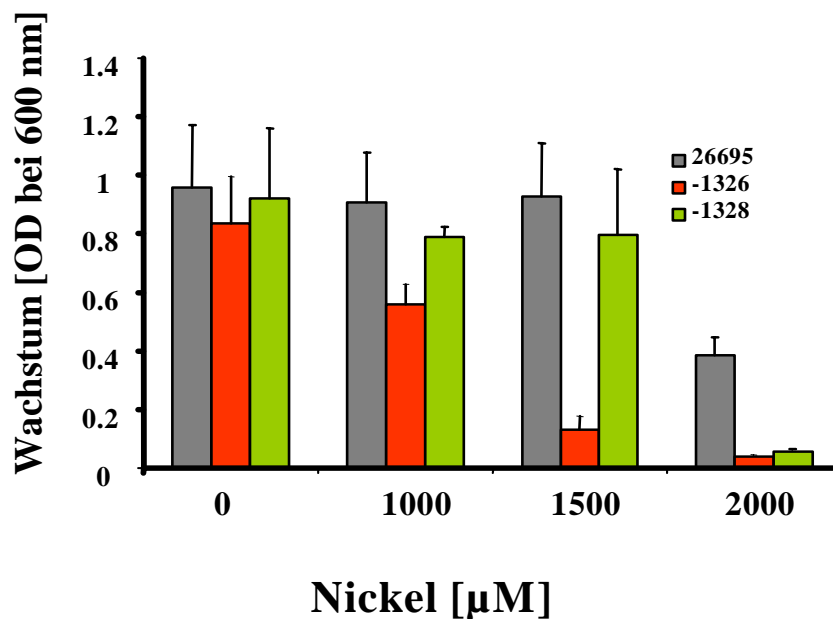


Abb. 27: Einfluss von HP1326-28 auf die Nickelresistenz. Wachstum des Elternstammes 26695 (graue Balken) und der HP1326 (rot), -27 (blau) und -28 (grün) -Mutanten nach 48 Stunden unter Normalbedingungen (0) und mit steigenden Nickelkonzentrationen (A: 10-1000 µM; B: 1000- 2000 µM). Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Das Ergebnis der Reporter-gen-Analyse der HP1326-Mutation (s. 4.5.6), welches zeigt, dass Nickel keinen Einfluss auf die HP 1326-Transkription ausübt, wurde durch Analyse der

Gesamt-RNA des *H. pylori*-Elternstammes 26695 nach Kultivierung unter Normalbedingungen und Nickelüberschuss bestätigt (nicht gezeigt). Um den Einfluss der HP1326-28 Mutationen auf den Nickelstoffwechsel näher zu untersuchen, wurde das Nickelenzym Urease, dessen Transkription, Produktion und Aktivität stark von der intrazellulären Nickelkonzentration abhängig ist, in allen Mutanten untersucht. Die Analyse der Gesamt-RNA (nicht gezeigt), der Proteinmenge (Abb. 28) und der Aktivität (nicht gezeigt) der Urease nach Kultivierung unter Normalbedingungen und unter Nickelzusatz zeigte keinen Einfluss der Mutationen auf die kurz zuvor entdeckte Nickelinduktion der Urease.

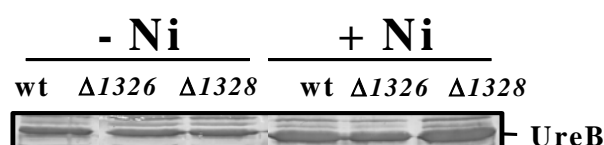


Abb. 28: Einfluss der HP1326 und -28 Mutation auf die Nickelregulation der *H. pylori*-Urease-Produktion. Detektion der Urease-Produktion des *H. pylori*-Elternstammes 26695 (wt), der HP1326- und -28-Mutante 26695-1326 ($\Delta 1326$) und 26695-1328 ($\Delta 1328$) nach Wachstum unter Normalbedingungen (-) und unter Zusatz von 1000 μM Nickelchlorid (+). Die Urease-Untereinheit UreB wurde durch ein UreB-spezifisches Antiserum detektiert. Die UreB-Bande ist markiert.

4.5.7.3. Expression der Gene HP1326-28 in *E. coli*

Um die Schutzfunktion der HP1326-28 Proteine gegenüber Nickel und Kupfer näher zu untersuchen, wurde die Produktion der rekombinanten Proteine in *E. coli* untersucht. Dazu wurden die Gene HP1326, -27 und -28 mittels PCR mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 9), die an ihrem jeweiligen 5'-Ende um eine *BsaI*-Restriktionsstelle verlängert waren, amplifiziert. Die Restriktionsstellen wurden dann verwendet, um die DNA der Gene exakt mit den auf dem Vektor pASKIBA-3TM (Plasmidkarte siehe Anhang) kodierenden funktionellen Elementen, wie das Strep-tag, zu fusionieren. Nach Klonierung wurden die Plasmide in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert. Die Transkription im Plasmid pASKIBA-3TM (pASK3) wird durch einen *tetA*-Promoters/ Operator gesteuert. Die Expression des *tet*-Repressorgens, welches auch auf dem Expressionsplasmid kodiert wird, garantierte die Inaktivierung des Promoters in Abwesenheit von Anhydrotetracyclin. Die Transkription wurde mit Anhydrotetracyclin induziert, wobei Mengen eingesetzt wurden, die nicht antibiotisch wirkten. Zur Produktion der rekombinanten HP1326-28-Proteine wurden die Plasmide in den speziellen *E. coli*-Expressionstamm BL21 transformiert. Die Überprüfung der Induktion und die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgten durch die Fusion der Proteine mit dem Strep-tag, einer für acht Aminosäuren kodierenden Sequenz. Die Westernblot-Analyse mit einem gegen das Strep-tag gerichteten Antikörper zeigte, dass nur

das 13.83 kDa große HP1326-Protein nicht aber die Proteine HP1327 und -28 in *E. coli* produziert werden konnten (Abb. 29). Weder die Änderung der Kulturbedingungen noch die Verwendung anderer *E. coli*-Stämme führten für HP1327 und -28 zu einem Ergebnis.

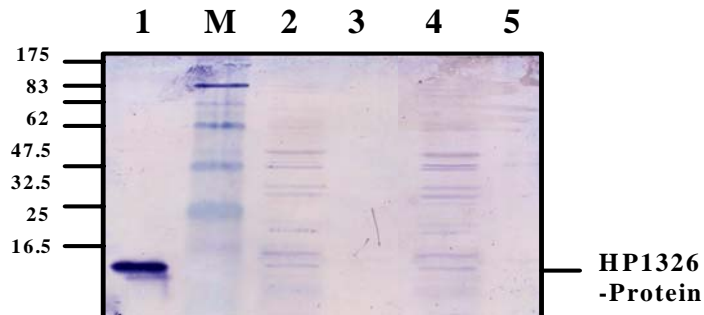


Abb. 29: Überprüfung der rekombinanten Expression der HP1326-28 Gene in *E. coli* BL21. Analyse der Protein-Produktion der rekombinanten *H. pylori*-Proteine HP1326 (Spur 1), -27 (Spuren 2 und 3) und -28 (Spuren 4 und 5). Gesamtproteine des *E. coli*-Stammes BL21 wurden ohne (Spuren 3 und 5) und nach Induktion mit Anhydrotetracyclin (Spuren 1, 2 und 4) auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit einem gegen den Strep-tag gerichteten Antikörper analysiert. Auf der linken Seite sind die Größen des Prestained-Marker angegeben. Die HP1326-Bande ist rechts markiert.

Um festzustellen, ob das HP1326-Protein in den Kupfer- und Nickelstoffwechsel eingreifen kann wurden Wachstumsexperimente zur Resistenz der beiden Metalle mit den HP1326 produzierenden *E. coli*-Stamm MC4100 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die MHK des *E. coli*-Stammes MC4100 für Kupfer und Nickel durch Anwesenheit des Plasmids pASK3-1326 in Gegenwart von Tetracyclin deutlich erhöhte (Abb. 30). Als Kontrolle diente das Plasmid pASK3 ohne inseriertes HP1326-Gen. Dies weist auf Bindung des HP1326-Proteins von Kupfer und Nickel *in vitro* hin, die *in vivo* eine Sequestrierung oder Speicherung der Metalle ermöglichen könnte.

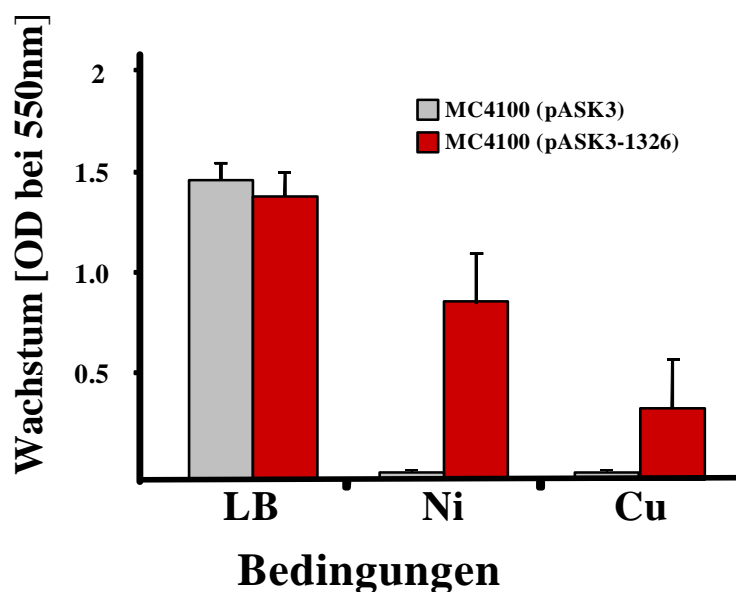


Abb. 30: Einfluss des rekombinaten HP1326-Proteins von *H. pylori* auf die Metallresistenz in *E. coli*. Wachstum des *E. coli*-Stammes MC4100 mit Plasmid pASK3 ohne inseriertes HP1326-Gen (graue Balken) und mit Plasmid pASK3-1326 (rote Balken), welches das HP1326-Gen enthält, unter Normalbedingungen (LB) und nach Zusatz von 3 mM Nickel (Ni) oder 4.5 mM Kupfer (Cu). Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (550 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben

4.5.7.4. Einfluss der Gene HP1326, -27 und 28 auf den Zink-, Cadmium- und Kobaltstoffwechsel

Cadmium, Zink und Kobalt stellen die typischen durch Czc-Systeme transportierten Metalle dar. Aufgrund der vorhandenen Homologien sollte der Einfluss der HP1326-28 Mutation auf den Stoffwechsel dieser Metalle zu untersuchen werden. Dazu wurden der *H. pylori*-Elternstamm 26695 und die Mutanten 26695-1326, -27 und -28 unter Normalbedingungen (BBF) und unter Metallzugabe in steigender Konzentration kultiviert. Zink und Cadmium zeigten keinen Einfluss auf das Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Elternstamm (nicht gezeigt). Zusatz von 2 μ M Kobaltchlorid reduzierte das Wachstum der HP1326- und -27-Mutante deutlich (Abb. 31). Die verminderte Resistenz gegen Kobalt war in der HP1328-Mutante schwächer ausgeprägt (Abb. 31).

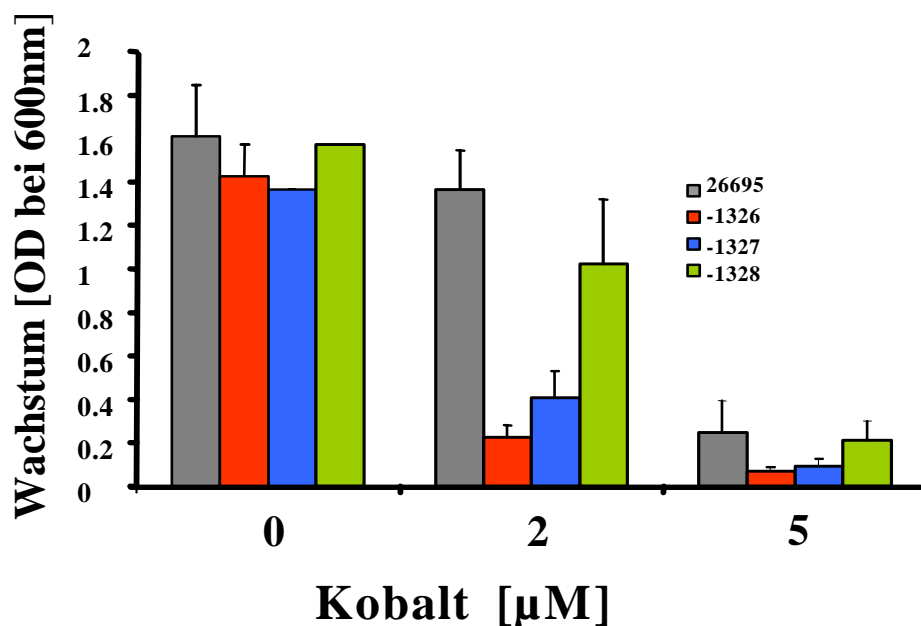


Abb. 31: Einfluss von HP1326-28 auf die Kobaltresistenz. Wachstum des Elternstammes 26695 (graue Balken) und der HP1326 (rot), -27 (blau) und -28 (grün) -Mutanten nach 48 Stunden unter Normalbedingungen (0) und mit steigenden Kobaltkonzentrationen (2-5 μM). Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.5.8. Einfluss der HP1326-28 Mutationen auf den Säurehaushalt

Das gut untersuchte Czc-System in *Ralstonia* CH34 stellt einen Protonen-Metall-Antiporter dar, der Kobalt, Zink und Cadmium im Antiport mit Protonen transportiert. Um eine mögliche Antiportfunktion der HP1326-28 Proteine zu untersuchen, wurde der Einfluss der HP1326-28 Mutationen auf den Säurehaushalt analysiert. Dazu wurden der *H. pylori*-Elternstamm 26695 und die HP-1326,-27 und -28 Mutanten unter Normalbedingungen (pH 7) und in einem mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 6 und 5 titriertem Medium kultiviert. Der pH-Wert wurde kontrolliert und blieb über die Dauer des Wachstums (48 Stunden) konstant. Unter allen Bedingungen zeigten die Mutanten und der Elternstamm identisches Wachstum (Abb. 32). Dies deutet darauf hin, dass die transportierten Kationen möglicherweise nicht über einen Protonen-Antiport transloziert werden oder dass sich der Verlust des Transportes in den Mutanten nicht auf die Säureresistenz auswirkt.

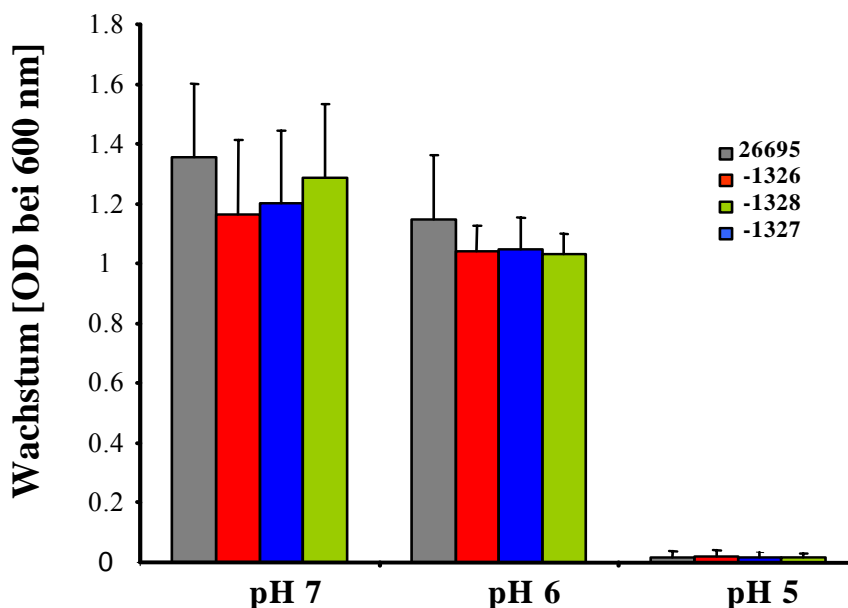
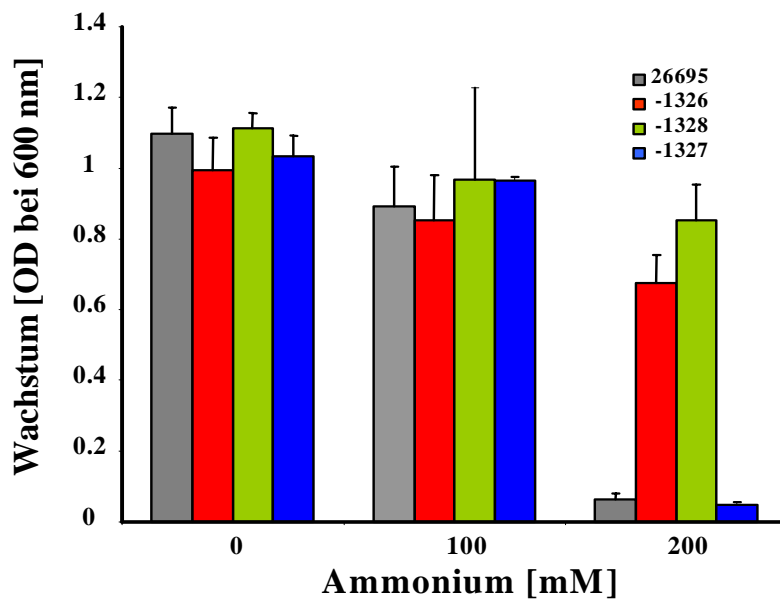


Abb. 32: Einfluss von HP1326-28 auf die Säureresistenz. Wachstum des Elternstammes 26695 (graue Balken) und der HP1326 (rot), -27 (blau) und -28 (grün) -Mutanten nach 48 Stunden, unter Normalbedingungen (pH 7) und in mit Salzsäure auf pH 6 (pH 6) und pH 5 titriertes Medium. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.5.9. Einfluss der HP1326-28 Mutationen auf den Harnstoff und Ammonium-Stoffwechsel

Harnstoff- und Ammoniumionen stellen in *H. pylori* durch das Vorhandensein der Urease relevante Elemente des Stoffwechsels dar. Da das Enzym Urease, dessen Funktion eng mit dem Metallstoffwechsel verbunden ist, die Hydrolyse von Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak bzw. Ammonium katalysiert, sollte eine mögliche Funktion der Gene HP1326-28 im Harnstoff- bzw. Ammoniumionen-Stoffwechsel untersucht werden. Dazu wurden die Stämme 26695, -1326, -27 und 28 unter Normalbedingungen und mit steigendem Harnstoff bzw. Ammoniumchlorid-Konzentration kultiviert. Die MHK des Elternstammes 26695 lag für Ammoniumchlorid bei unter 200 mM. Die HP1326 und -28 Mutante zeigten unter diesen Bedingungen noch deutliches Wachstum während sich die HP1327-Mutante ähnlich dem Elternstamm verhielt (Abb. 33). Für Harnstoff lag die MHK des Elternstammes bei 50 mM. Die HP1326- und 27-Mutanten zeigten ein zum Elternstamm identisches Verhalten, während das Wachstum der HP1328-Mutante noch bei 100 mM wenig reduziert war (Abb. 33). Damit nimmt die HP1328-Mutation eine Sonderstellung im HP1326-Operon ein und führt zu der Vermutung, dass das HP1328-Protein *in vivo* mit weiteren Proteinen interagiert.

A



B

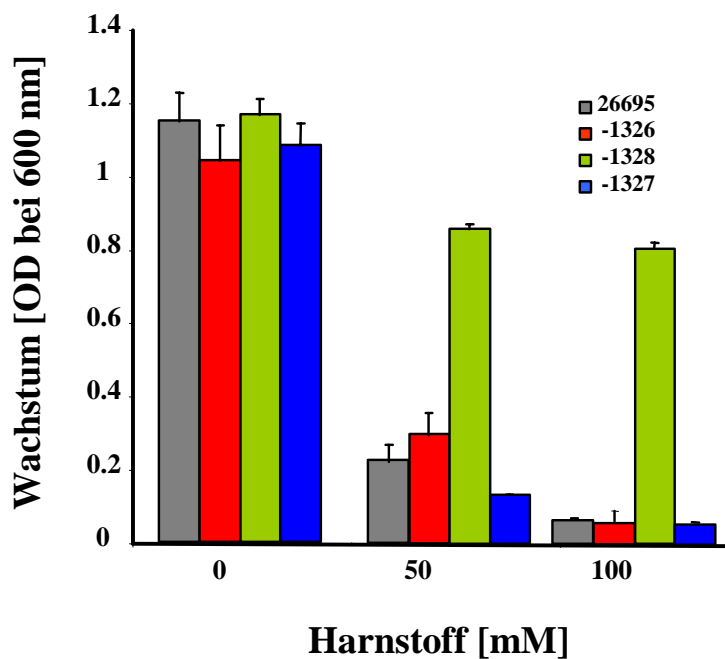


Abb. 33: Einfluss von HP1326-28 auf den Harnstoff- und Ammoniumionen-Stoffwechsel. Wachstum des Elternstammes 26695 (graue Balken) und der HP1326 (rot), -27 (blau) und -28 (grün) -Mutanten nach 48 Stunden, unter Normalbedingungen (0) und mit steigender Ammonium (A) und Harnstoffkonzentrationen (B). Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.5.10. Identifikation des Kupferregulators CopR (HP1365)

Um den Regulator der Kupferregulation der HP1326-Transkription zu identifizieren, wurde zunächst die HP1326-Transkription in *H. pylori*-Mutanten untersucht, in denen die bekannten Metallregulationsproteine Fur (Ferric uptake regulator) und NikR fehlen. Dazu wurde die Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 1061 und der isogenen *nikR/fur*-Doppelmutante 1061-NikR/Fur nach Wachstum unter Normalbedingungen und Kupferüberschuss (100 μ M) isoliert und die HP1326-Transkripte mittels HP1326-spezifischer antisense RNA sichtbar gemacht. Die Analyse des Northernblots zeigte, dass sich die Doppelmutation nicht auf die Kupferinduzierte Akkumulation der HP1326 Transkripte auswirkte (Abb. 34). Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse des *H. pylori*-Stammes NCTC 11638 und der Fur-negativen Mutante NCTC 11638-FUR bestätigt (nicht gezeigt).

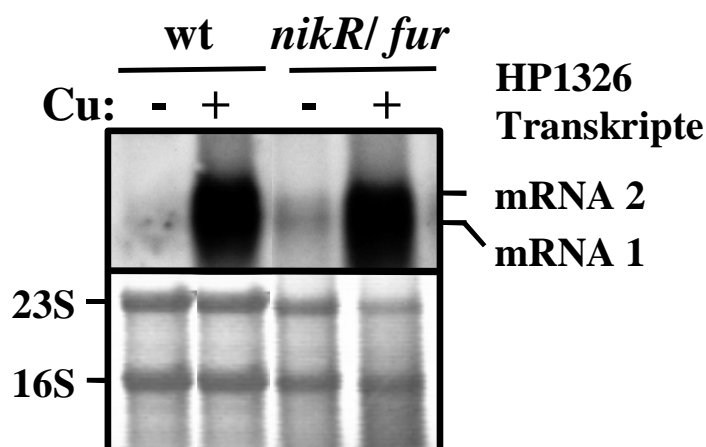


Abb. 34: Einfluss der *H. pylori* Metallregulatoren Fur und Nik R auf die Transkription des HP 1326-Gens. Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 1061(wt) und der isogenen Fur- und NikR-negativen Mutante 1061- NikR/Fur (*nikR/fur*) wurden nach Kultivierung unter Normalbedingungen (-), unter Zusatz von 100 μ M Kupferchlorid (+) isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen Sonde. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methyleneblau sichtbar gemachte 16S und 23S rRNAs. Die HP1326-Transkripte sind auf der rechten Seite markiert.

Das Gen für den Hitzeschockregulator (HspR) besitzt als einziges Gen von *H. pylori* Homologien zu dem Kupferregulator CueR von *E.coli*. Um die Rolle von HspR in der Kupferinduktion der HP1326-Transkription untersuchen zu können wurde das *hspR*-Gen in dem *H. pylori*-Stamm 26695 durch Insertion einer *cat*-Kassette mit Promotor inaktiviert. Dazu wurde das *cat*-Gen mit Promotor aus dem Plasmid pTnMax5 (siehe Anhang) mit den Primern CATS1 und CATAS1 amplifiziert, mit stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Bereichen der *hspR*-Gens mittels modifizierter Megaprimer-PCR fusioniert (nicht gezeigt) und anschließend in den Vektor pZERO2 (Invitrogen, siehe Anhang) kloniert. Die Transformation des Elternstammes 26695 mit dem resultierenden Plasmid pHspRPCAT

(Plasmidkarte siehe Anhang), welches die *cat*-Insertion im *hspR*-Gen beinhaltete, führte zur isogenen Mutante 26695-HspR. Nach Überprüfung der Mutation durch PCR-Analyse wurde die Gesamt-RNA der Stämme 26695 und 26695-HspR nach Wachstum unter Normalbedingungen und Kupferüberschuss isoliert und die HP1326 Transkripte mittels HP1326-spezifischer antisense RNA sichtbar gemacht. Die Northernblot-Analyse zeigte keinen Einfluss der HspR-Mutation auf die Kupferregulation der HP1326-Transkription. (Abb. 35).

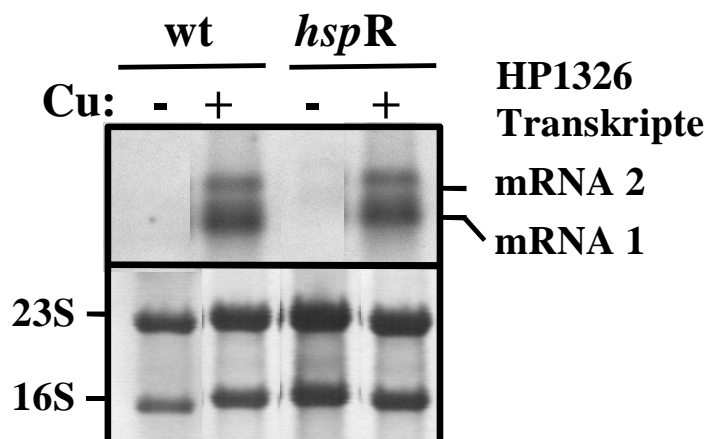


Abb. 35: Einfluss der *H. pylori* Regulators HspR auf die Transkription des HP 1326-Gens. Gesamt-RNAs des *H. pylori*-Stammes 26695(wt) und der isogenen HspR-negativen Mutante 26695-HspR (*hspR*) wurden nach Kultivierung unter Normalbedingungen (-), unter Zusatz von 500 μ M Kupferchlorid (+) isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen Sonde. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methylenblau sichtbar gemachte 16S und 23S rRNAs. Die HP1326-Transkripte sind auf der rechten Seite markiert

Neben den Metallregulatoren sind in *H. pylori* auch drei Zwei-Komponenten-Regulatoren bekannt [27]. Diese in Prokaryoten weit verbreiteten Systeme regulieren zelluläre Funktionen in Bezug auf wechselnde Umweltbedingungen. Im Allgemeinen bestehen zwei Komponenten-Systeme aus einem in der Zytoplasmamembran lokalisiertem Sensor-Protein, einer Histidin-Kinase, und einem zytoplasmatischen Regulator-Protein, das meist als Transkriptions-Aktivator fungiert. Durch einen geeigneten Umwelt-Stimulus kommt zur Autophosphorylation der Sensor-Kinase, die daraufhin das Regulator-Protein phosphoryliert. Diese führt zu einer Konformationsänderung des Regulators, die diesen zur Bindung an DNA und zur Aktivierung spezifischer Gene befähigt. Die Gene von Regulatoren in Bakterien liegen oft nicht weit von den regulierten Zielgenen entfernt. Da das Sensor-Regulator-Paar HP1364/ 1365 am nächsten der HP1326-28-Gene lag, sollte der Einfluss beider Gene auf die Kupferregulation untersucht werden. Dazu wurden die Gene HP1364 und HP1365 in dem *H. pylori*-Stamm 26695 durch Insertion einer *cat*-Kassette mit Promotor inaktiviert. Das *cat*-Gen

mit Promotor wurde aus dem Plasmid pTnMax5 (siehe Anhang) mit den Primern CATS1 und CATAS1 amplifiziert, mit stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Bereichen der Gene HP1364 und HP1365 mittels modifizierter Megaprimer-PCR fusioniert (nicht gezeigt) und anschließend in den Vektor pZERO2 (Invitrogen) kloniert (Plasmidkarte siehe Anhang). Nach Transformation des Elternstammes 26695 mit den resultierenden Plasmiden p1364PCAT und p1365PCAT (Plasmidkarten siehe Anhang), welche die *Pcat*-Insertionen der entsprechenden Gene beinhaltete, konnten die isogene Mutanten 26695-1364 (*HP1364::Pcat*) und -1365 (*HP1365::Pcat*) isoliert werden. Nach Überprüfung der Mutation durch PCR-Analyse wurden die Mutanten zunächst bezüglich ihres Wachstums unter Kupferüberschuss phänotypisch charakterisiert. Unter Normalbedingungen war das Wachstum der HP1364- und -65-Mutanten mit dem des Elternstammes 26695 identisch. Beide Gene wurden jedoch für die Kupferresistenz benötigt, da Zusatz von 100 μM das Wachstum der HP1365-Mutante und Zusatz von 500 μM das Wachstum der HP1364-Mutante stark reduzierte (Abb. 36). Die Wachstumsbeeinträchtigung unter Kupferüberschuss wies also auf eine mögliche Regulatorfunktion der Gene HP1364 und -65 im Kupferstoffwechsel hin.

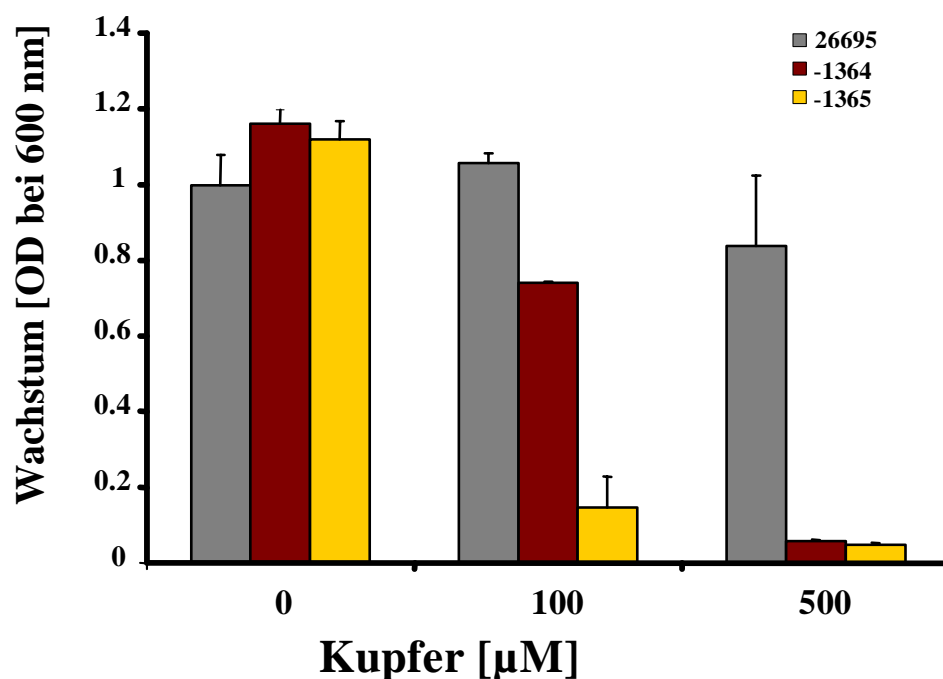


Abb. 36: Einfluss von HP1364 und -65 auf den Kupferstoffwechsel. Wachstum des Elternstammes 26695 (graue Balken) und der HP1364 (braun) und -65 (gelb) -Mutanten nach 48 Stunden, unter Normalbedingungen (0) und mit steigender Kupferkonzentration. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Um den Einfluss der HP1364- und -65-Mutation auf die Kupferinduzierte Transkription des HP1326-Gens zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA der Stämme 26695 und 26695-1364 und -65 nach Wachstum unter Normalbedingungen und Kupferüberschuss isoliert und die HP1326 Transkripte mittels HP1326-spezifischer antisense RNA sichtbar gemacht. Die Northernblotanalyse zeigte, dass die Kupferinduzierte Regulation der HP1326-Transkription in der HP1364- (nicht gezeigt) und der HP1365-Mutante vollständig fehlte (Abb. 37). Das Fehlen der Regulation zeigte, dass es sich bei dem Sensor-Regulator-Paar HP1364/ HP1365 um die Regulatoren des HP1326-Operons handelt.

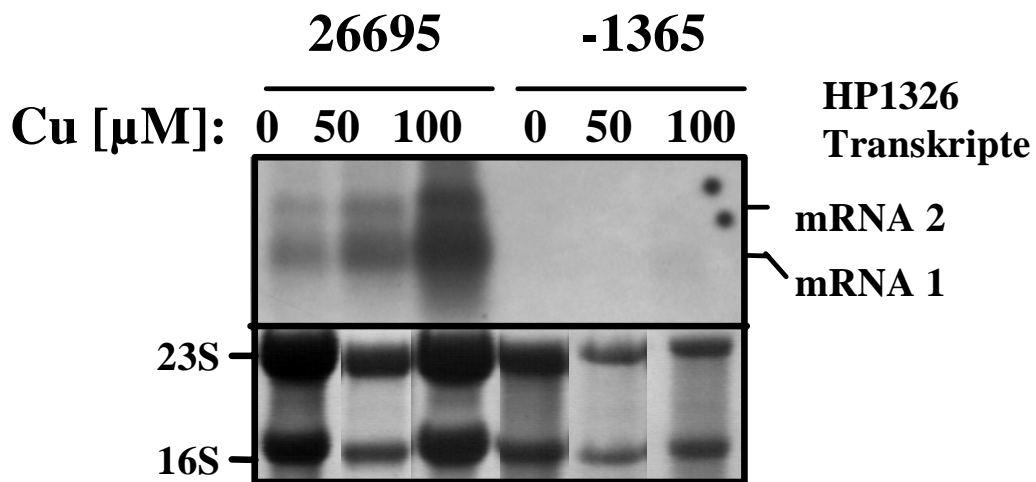


Abb. 37: Einfluss der HP1365-Mutation auf die Kupferinduzierte Regulation der HP1326-Transkription. Gesamt-RNA der *H. pylori*-Stämme 26695 und -1365 wurden nach Kultivierung für 48 Stunden unter Normalbedingungen (0) und nach Behandlung mit Kupferchlorid (wie angegeben) isoliert und in einem 1.2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Northern-Hybridisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten HP1326-spezifischen Sonde. Die Detektion erfolgte aufgrund der schwachen Signale durch Exposition des Röntgenfilmes über Nacht. Der untere Abbildungsteil zeigt die mit Methyleneblau sichtbar gemachten 16S und 23S rRNAs

4.5.11. Analyse der HP1365-Bindung an den Promotor des HP1326-Gens

Um die Regulation der HP1326-Transkription durch den Regulator HP1365 zu bestätigen, sollte eine mögliche Bindung des Regulatorproteins an den Promotorbereich des HP1326-Gens untersucht werden. Im Zwei-Komponenten-System HP1364/HP1365 stellt HP1364 die in der Zytoplasmamembran lokalisierte Sensorkinase und HP1365 den DNA-bindenden Regulator dar [27]. Dazu wurde mit dem rekombinant hergestellten und aus Inclusion Bodies gereinigten HP1365-Protein und dem amplifizierten Promotorbereich des HP1326-Gens (Abb. 38) „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) durchgeführt. Nach der Bindungsreaktion wurden die Ansätze in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt

und die gebildeten Komplexe anschließend durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

GTTAACTACC	GCCAGACTCC	TTTTGAGTTT	GGCAAACGCG	CCAATGAGTT	CTTTAGGCAT
CAATTGATGG	CGGTCTGAGG	AAAACCTCAA	CCGTTTGCGC	GGTACTCAA	GAAATCCGTA
FumC-L2					
TTTTTCAGTG	CCGATCTTAA	AGTTTTCAAG	ACTGCGTTGC	GTTTGAGCCC	CCCAATATTG
AAAAAGTCAC	GGCTAGAATT	TCAAAAGTTC	TGACGCAACG	CAAACCTCGG	GGGTTATAAC
GCTATCATTT	ACTTTGATTT	CGCCCATCGT	GTCATGTTCA	ATTCTAAATT	GCATGCTAAT
CGATAGTAAA	TGAAACTAAA	GCGGGTAGCA	CAGTACAAGT	<u>TAA</u> GATTTAA	CGTACGATTA
Stop FumC					
CCTTTGAAAT	TTGATTTTAA	AACCTTAAAA	AAATAGCATA	AACTCTTATA	CCTTCTACTT
GGAAACTTTA	AACTAAAATT	TTGGAATTTT	TTTATCGTAT	TTGAGAATAT	GGAAGATGAA
-35					
AAAAACCCTA	ATTTTTTAAA	CACCATTTCC	ACAATTTTTA	CACAAAAGAG	GGTTATTATC
TTTTTGGGAT	TAAAAAATTT	GTGGTAAAGG	TGTTAAAAAT	GTGTTTTCTC	CCAATAATAG
RBS					
CGTTCGCAAC	AAGAATTTTC	TTGTTATCTT	AATGTA <u>AAGG</u>	TCAAAACGAT	GAAAAAGTTA
GCAAGCGTTG	TTCTTAAAAG	AACAATAGAA	TTACATTTCC	AGTTTTGCTA	CTTTTTCAAT
Start HP1326					
GCCGCTTTAT	TTTTAGTAAG	CGTGTGGGG	GTTATGGGTT	TAAACGCATG	GGAGCAAACC
CGGCGAAATA	AAAATCATT	GCACAACCC	CAATACCCAA	ATTTGCGTAC	CCTCGTTTGG
CTAAAAGCTA	ATGACTTGGA	AGTGAAAATC			
GATTTTCGAT	TACTGAACCT	TCACTTTTAG			
1326-R2					

Abb. 38: Promoterregion des HP1326-Gens des *H. pylori* -Stamms 26695. Dargestellt ist der durch PCR amplifizierte DNA-Bereich, der die Zwischengenregion vor dem HP1326-Gen beinhaltet und für den EMSA verwendet wurde. Die Primerbindestellen sind als Pfeile dargestellt. Das Stop-Kodon des FumC-Gens (Stop FumC), der das Start-Kodon des HP1326-Gens (Start HP1326) und die Ribosomenbindestelle (RBS) sind durch Rahmen markiert. „-35“- und „-10“-Region sind unterstrichen

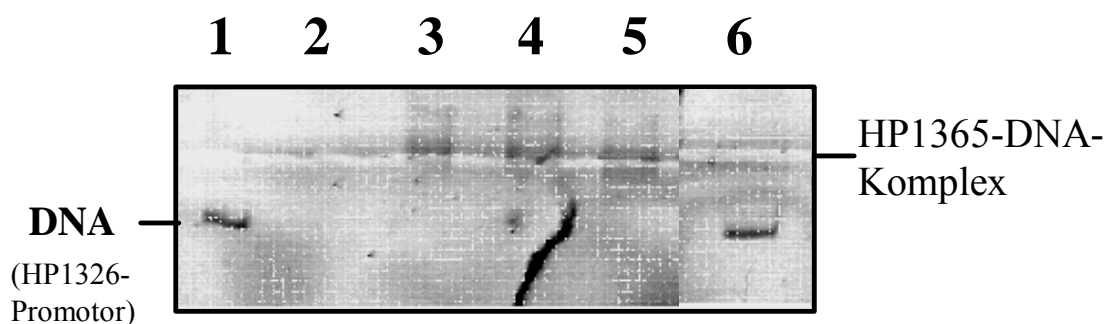


Abb. 39: Bindungsanalyse des HP1365-Proteins an den HP1326-Promotor In den Spuren 1 bzw. 3-6 wurde die Zwischengenregion vor dem HP1326-Gen ohne HP1365-Protein (1) und mit HP1365-Protein (2-5) analysiert. In Spur 2 wurde das HP1365-Protein alleine aufgetragen. Spur 3 enthält 20 µg HP1365-Protein, Spur 4 enthält 40 µg. In Spur 5 wurde die Reaktion in Bindepuffer ohne Acetylphosphat durchgeführt. Spur 6 enthält als Kontrolle das *H. pylori*-Protein RibA. Die Bindungsansätze des EMSA wurden in einem 7 %igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Position der DNA und der HP1365-Protein-DNA-Komplexe sind markiert

Die deutlich verzögerte Wanderung des HP1365-DNA-Komplexes im Polyacrylamidgel bestätigte, dass HP1365 an die Zwischengenregion vor dem HP1326-Gen binden kann (Abb. 39). Der Zusatz von 50 mM Acetylphosphat im Bindepuffer sollte die Phosphorylierung des HP1365-Proteins gewährleisten. Die Bindung erfolgte aber sowohl in An- und Abwesenheit von Acetylphosphat. Als Kontrolle wurde das rekombinant hergestellte und gereinigte *H. pylori*-Protein RibA (GTP-Zyklohydrolase II) mitgeführt, das keine Bindung an die DNA-Region zeigte (Abb. 39).

4.5.12. Einfluss der HP1326-28 Exportes und der Regulatorproteine auf die Wismuth-Resistenz

Das Schwermetallpräparat Wismuth wird in der *H. pylori*-Therapie eingesetzt. Um festzustellen ob die Gene HP1326-28 einen Einfluss auf die Wismuth-Resistenz haben, wurden die Stämme 26695, -1326, -27, -28, -1365 und 1364 unter Normalbedingungen und in Anwesenheit von Wismuthcitrat in steigenden Konzentrationen kultiviert. Eine Wismuthcitratkonzentration von 15 μM reduzierte das Wachstum in der HP1328 und der HP1365 Mutante drastisch, während die anderen Mutanten vergleichbar zum Elternstamm wuchsen (Abb. 40). Damit scheinen HP1328 und HP1365 bezüglich der Wismuth-Resistenz eine Sonderstellung einzunehmen.

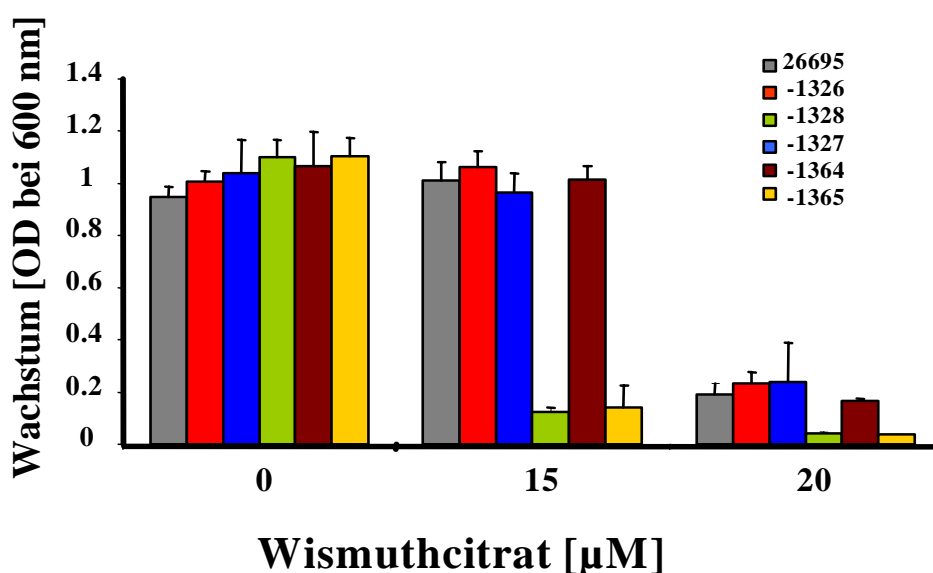


Abb. 40: Einfluss von HP1326-28 und HP1364-65 auf die Wismuth-Resistenz. Wachstum des Elternstammes 26695 (graue Balken) und der HP1326 (rot), -27 (blau), -28 (grün), 1364 (braun) und -65 (gelb)-Mutanten nach 48 Stunden unter Normalbedingungen (0) und mit steigender Wismuthcitratkonzentration. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Optischen Dichte (600 nm) gemessen. Die Kultivierung erfolgte unter microaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.5.13. Transkriptionelle Analyse von HP1428

Im RNA-Profilung wurde neben der Kupferinduktion des HP1326-Gens auch eine 56fache Induktion der Transkription des HP1428-Gens durch Kupfer gefunden. Die Expression des Gens war unter Normalbedingungen mit einem Expressionslevel von 90 schwach und wurde durch Kupferzusatz auf einen Expressionswert von 5044 angehoben (Tabelle 12). Um die Transkription eines weiteren im RNA-Profilung entdeckten Kupferinduzierten Gens näher zu charakterisieren, wurde die Transkription von HP1428 genauer analysiert. Dazu wurde die Gesamt-RNA des *H. pylori*-Stammes 26695 nach Wachstum unter Normalbedingungen und Kupferzugabe isoliert und die mRNA durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten HP1428-spezifischen antisense RNA untersucht. Es konnte jedoch auch nach Wachstum unter Kupferüberschuss (bis zu 1500 μM) und nach langer Expositionsdauer keine Transkripte detektiert werden (nicht gezeigt). Dies könnte ursächlich mit der Transkriptgröße von 1071 Nukleotiden zusammenhängen, da sich die Detektion eines so langen Transkriptes aufgrund der erhöhten RNA-Instabilität sich als schwierig erweist. Des Weiteren wäre eine polycistronische Transkription möglich, da zwischengenetische Bereiche zwischen HP1428 und den folgenden Genen HP1429 und -30 fehlen (Abb. 41)



Abb. 41: Schematische Darstellung der Umgebung des HP1428-Gens. Die Gene sind als farbige Pfeile entsprechend ihrer Größe dargestellt. Freiräume zwischen den Pfeilen symbolisieren Zwischengenetische Bereiche. Das HP1428-Gen ist rot hervorgehoben.

5. Diskussion

Da Metalle im Stoffwechsel eine entscheidende Rolle spielen, muss die Metallhomöostase im Zytoplasma sehr genau reguliert werden [269]. Für *H. pylori* ist der Metallstoffwechsel von besonderer Bedeutung, da das Bakterium in der Magenschleimhaut ein ausgesprochen anspruchsvolles Milieu mit drastischen Änderungen der Umweltbedingungen vorfindet. Durch die wechselnden Nährstoffkonzentrationen und die lebensfeindliche Umgebung unterscheidet sich diese ökologische Nische von der der meisten anderen Bakterienarten [269]. In Abhängigkeit von der Ernährung ist *H. pylori* auch mit starken Variationen der Metallionenkonzentration konfrontiert. Die Tatsache, dass der wichtigste Pathogenitätsfaktor die Urease, ein Nickel-abhängiges Enzym [249, 269, 270] ist, unterstreicht die Bedeutung der Metallhomöostase für die Adaptation an das wechselhafte Habitat. *H. pylori* ist daher in besonderer Weise auf effiziente Mechanismen angewiesen, die eine exakte Regulation der Metallionenkonzentrationen im Zytoplasma ermöglichen. Deshalb könnten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten biologischen Systeme zur Aufrechterhaltung, Regulation und Transport des Metallstoffwechsels auch als Ziele für die Entwicklung neuer alternativer Therapeutika geeignet sein.

5.1 Die Analyse des Eisenstoffwechsels

In Abhängigkeit von der Ernährung liegen Eisenionen im Magen in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor. Eisen wird durch Pepsin und Säure aus Nahrungsbestandteilen freigesetzt. Dadurch entstehen kurzzeitig Eisenüberschussbedingungen. In Abwesenheit von Nahrung kommt es zu Eisenmangelsituationen, die durch die Bindung von Eisen an Lactoferrin noch verstärkt werden [183]. Die aus diesen Zusammenhängen resultierende Konfrontation des Bakteriums mit schnellen Variationen der Eisenkonzentrationen erfordert spezielle Adaptationsmechanismen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch den kompletten Kolonisierungs-Defekt der isogenen Ferritin-negativen Mutante des *H. pylori* Stammes Q1 im Gerbil-Magen für die Eisenspeicherung erstmals experimentell belegt. Dieser für Krankheitserreger bisher einzigartige Befund zeigt, dass die Eisenspeicherung für die Anpassung an das Wirtshabitat Magen essentiell ist. Zusammen mit dem Kolonisierungsdefekt Eisenaufnahme-defizienter Mutanten [274] zeigt dieses Ergebnis auch, dass die Aufrechterhaltung des Eisenstoffwechsels eine Voraussetzung für die Etablierung der *H. pylori*-Infektion darstellt und möglicherweise auch auf die Entwicklung *H. pylori* assoziierter Krankheiten Einfluss nehmen könnte. Eine kürzlich veröffentlichte Studie ergab allerdings

keine signifikanten Korrelationen zwischen Mutationen im Ferritingen und der Entwicklung von Anämien [58]. Die Charakterisierung einer isogenen Ferritin-negativen *H. pylori*-Mutante hatte bereits in Vorarbeiten ergeben, dass die Eisenspeicherfunktion des Ferritins sowohl unter Eisenmangel- als auch unter Eisenüberschussbedingungen für das Wachstum essentiell ist [280] und dass das in Ferritin gespeicherte Eisen in Eisenmangelsituationen wieder mobilisiert und verwertet werden kann [280]. Deshalb muss die Ferritinsynthese strikt reguliert und an die Verfügbarkeit von Eisen angepasst werden. Ähnlich wie die Bakterioferritine von *Rhodobacter capsulatus* [208] und von *Pseudomonas*-Arten [153, 168] akkumuliert auch das Ferritin von *H. pylori* unter Eisenüberschuss. Dieser regulatorische Mechanismus schützt die Bakterien vor hohen toxischen Eisenkonzentrationen (Abb. 42). Auch die Repression der Ferritinbiosynthese unter Eisenmangelbedingungen, die auf Transkriptionsebene stattfindet und durch das globale eisenabhängige Regulatorprotein Fur vermittelt wird, macht biologisch Sinn (Abb. 42). So wird die Eisenhomöostase im Zytoplasma auch unter extremen Variationen der Eisenkonzentration in der Umgebung sichergestellt (Abb. 42).

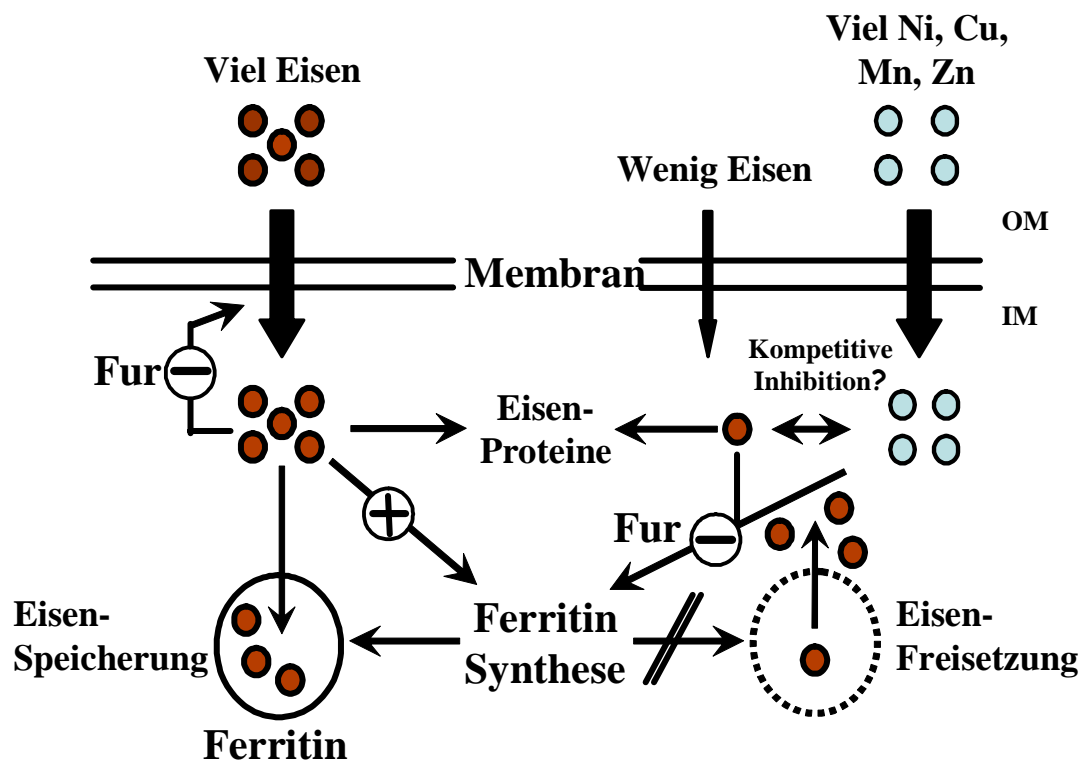


Abb. 42: Schematische Übersicht der Regulation der Eisenhomöostase in *H. pylori*. Der Einstrom von Metallionen ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Verstärkende (+) und hemmende (-) Wirkungen von Eisen sind durch Pfeile markiert. Der Einfluss des Regulatorproteins Fur ist angegeben. Die Regulation der Ferritinbiosynthese durch Fur unter Eisenüberschuss, wie auch die Freisetzung von Eisen unter Eisenmangelbedingungen sind dargestellt. Der mögliche Einfluss anderer Metallionen ist dargestellt. OM, äußere Membran; IM Zytoplasmamembran.

Basierend auf dem Erkenntnis, dass Fur in *Salmonella* Funktionen in der Eisen- und Säureregulation übernimmt, wurde bereits in Vorarbeiten [39, 280] der Einfluss des *H. pylori*-Ferritins auf die Säureresistenz untersucht. Die Beobachtung, dass durch Säurezusatz zum Flüssigmedium das Wachstum einer Pfr-negativen Mutante im Vergleich zum Elternstamm nicht verändert wurde, zeigt dass die Ferritin-vermittelte Eisenspeicherung die Bakterien nicht vor Säure schützt. Da aber Eisen in der löslicheren zweiwertigen Form durch Säure stabilisiert wird, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Säure die Eisensensibilität von *H. pylori* verstärkt. So wuchs *H. pylori* unter Eisenüberschussbedingungen bei einem pH-Wert von 6 deutlich schwächer, während Eisenzusatz zum Medium oder erniedrigte pH-Werte alleine das Wachstum nicht beeinträchtigten. Dieses Verhalten war in der Ferritin-Mutante stärker ausgeprägt, was belegt, dass die durch Ferritin vermittelte Eisenspeicherung unter Bedingungen, wie sie im Magen vorliegen, die Bakterien vor Säure-Vermittelter Eisentoxizität schützen kann. Obwohl diese Befunde *in vitro* erhoben wurden, weisen die Ergebnisse daraufhin, dass sowohl wechselnde Eisenkonzentrationen als auch niedrige pH-Werte Stress-Situationen darstellen, denen *H. pylori* in der Magenmucosa ständig ausgesetzt ist und vor denen die Eisenspeicherung in Ferritin schützt.

Da zu Beginn der Arbeit die molekularen Mechanismen der Ferritin-Regulation durch das Fur-Protein auf molekularer Ebene noch nicht bekannt waren, wurde in Protein-DNA-Bindungsstudien untersucht, ob das Fur-Protein *in vitro* an den Promotor des *pfr*-Gens bindet und somit direkt auf die Ferritinregulation Einfluss nimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass Fur an den Promotor des Ferritins bindet und dass diese Interaktion durch Eisen deutlich verringert, aber nicht komplett aufgehoben wurde. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der parallel durchgeführten Analyse zur Identifikation der Fur-Bindestellen im *Pfr*-Promotor [71], welche die Vermutung unterstützten, dass Fur in Gegenwart von Eisen seine Bindungsaktivität nicht verliert, sondern wahrscheinlich eine Konformationsänderung erfährt, die die Interaktion mit dem Promotor verändert. Im Rahmen von Untersuchungen zur Fur-Bindestelle in den durch Eisen konträr regulierten Genen *pfr* und *frpB* [70, 71] wurde postuliert, dass Fur mit und ohne Eisen in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegt und an zwei unterschiedlichen Ziel-Sequenzen binden kann. Dieser für Mikroorganismen bisher einzigartige Mechanismus legt nahe, dass Fur in *H. pylori* Funktionen übernimmt, die in anderen Organismen von mehreren Regulatorproteinen vermittelt werden. Dies wäre in Anbetracht der geringen Anzahl von Regulatorproteinen im *H. pylori*-Genom durchaus sinnvoll.

Die Genomweite Analyse der Eisenregulation in *H. pylori* ergab, dass 12 Gene durch Eisenüberschuss und 14 Gene durch Eisenmangelbedingungen Fur-abhängig reprimiert werden. Durch Eisenüberschuss wurden neben den schon bekannten Genen der Eisenaufnahme wie *fecA1*, *fecA2* und *frpB1* [70, 267], auch acht Gene identifiziert, von denen bisher weder eine Eisen noch eine Fur-abhängige Regulation bekannt war. Zu diesen zählen Gene die Motilität (*flhP*), Zellwandsynthese (*murB*), Metallstoffwechsel (HP1432) und Kofaktor-Synthese (*pdxAJ*, *bioB*) vermitteln sowie auch Gene, die für hypothetische Proteine kodieren. Von den 14 Eisenmangel- und Fur-reprimierten Genen, waren alle bis auf das *pfr*-Gen bisher noch nicht beschrieben und kodieren unter anderem für Gene der RNA-Synthese (*trpS*), Chemotaxis (*cheV*) und der oxidativen Stressantwort (*sodB*). Daneben wurde auch das Fur-Gen selbst als durch Fur und Eisenmangel reprimiert gefunden, was für eine Autoregulation spricht wie sie bereits von anderen Bakterienarten bekannt ist [84]. Diese Befunde zeigen, dass die ungewöhnliche regulatorische Funktion von Fur unter Eisenmangelbedingungen auch für andere Gene realisiert ist. Besonders interessant war die Bestätigung der Fur- und Eisen abhängigen Regulation des Gens für die aliphatische Amidase AmiE. Die bakteriellen Amidasen wurden bisher meist in Umweltkeimen analysiert, in denen sie den Abbau von toxischen Amiden zu Ammoniak und Carbonsäuren katalysieren, wobei beide Endprodukte für Neusynthesen im Grundstoffwechsel zur Verfügung stehen. Während die natürlichen Substrate der beiden *H. pylori*-Amidasen AmiE und AmiF noch nicht bekannt sind, katalysieren sie *in vitro* die Umsetzung von Acrylamid und Formamid. Anders als in *Pseudomonas aeruginosa* und *Mycobacterium smegmatis* werden Amidaseaktivitäten in *H. pylori* nicht durch Substratverfügbarkeit sondern durch Fur und Eisen reguliert. Diese ungewöhnliche Regulation findet für die Amidase AmiE auf transkriptioneller Ebene statt, wobei Fur die Transkription unter Eisenmangel induziert und unter Eisenüberschuss reprimiert. In Abwesenheit der Urease-Reaktion wurde ebenfalls eine erhöhte Amidaseaktivität gemessen [236], was zu der Frage führt inwieweit eine Verbindung zwischen Harnstoff und Eisenstoffwechsel bzw. Amid- und Eisenverfügbarkeit besteht. Zur Beantwortung werden derzeit zwei unterschiedliche Hypothesen herangezogen. Beide gehen davon aus, dass der aktuelle pH-Wert des Magens durch Fur und die Konzentration an Eisen(II) indirekt detektiert werden kann und Eisen von *H. pylori* somit als „second messenger“ für Säure verwendet wird: In der ersten Hypothese wird postuliert, dass bei niedrigem pH-Wert mehr lösliches Eisen(II) vorliegt. Da sowohl die Urease- als auch die Amidase-Reaktion in der Produktion von Ammoniak resultieren, die Amidase aber im Gegensatz zur Ureasereaktion ein neutrales pH-Optimum besitzt, könnte die Amidase zur Feinregulation des pH-Wertes herangezogen werden. Diese Hypothese wird

durch Untersuchungen des vakuolisierenden Zytotoxins VacA unterstützt, das eine Funktion als Harnstoffpermease unter Eisenüberschussbedingungen besitzen soll. Insofern würde es zu einer vermehrten Harnstoff-Freisetzung in Anwesenheit hoher Eisenkonzentrationen kommen [137, 258], die die Ureasereaktion unterstützt und infolgedessen könnte die Amidase-reaktion als zusätzlichen Ammoniaklieferant abgeschaltet werden. Unabhängig von beiden Hypothesen kann die durch das Zytotoxin VacA vermittelte Harnstofffreisetzung aus dem Magenepithel auch in Zusammenhang mit der durch die Entzündungsreaktion freigesetzten Eisenmenge gebracht werden. Da es im Laufe der *H. pylori*-Infektion zu Zerstörung von Magenepithelzellen und damit verbunden zur Freisetzung von Häm-Eisen-Verbindungen kommt, könnte ein Anstieg der Eisenkonzentration auch als Zeiger für die Dichte der *H. pylori*-Population fungieren. Die zweite Hypothese geht von der Überlegung aus, dass Eisen aus der Nahrung durch peptische Spaltung freigesetzt wird. In Gegenwart hoher Eisenkonzentrationen sind also Nährstoffe in hohen Konzentrationen verfügbar. In dieser Situation puffern Nahrungsbestandteile den sauren pH-Wert des Magens ab. In Abwesenheit von Nahrung kommt es dagegen zu einem Mangel an Eisen und einer Erhöhung der Säurekonzentration im Magenlumen. In diesem Zusammenhang betrachtet wäre Eisen auch ein Signal für die Verfügbarkeit von Nährstoffen. Die Eisen-Regulation der Amidasen würde daher mit dem Vorhandensein von exogenem Stickstoff koppeln, der in Anwesenheit von Nahrung im Magenlumen reichlich in der Umgebung von *H. pylori* vorhanden ist und in dieser Situation eine Bereitstellung von Ammoniumionen durch Amidasen überflüssig macht. Somit liegt der Schwerpunkt der zweiten Hypothese auf möglichen Funktionen der Amidasen im Stickstoffstoffwechsel, die momentan experimentell analysiert werden. Für einige andere Krankheitserreger wie *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* und Shiga-ToxinI produzierende *Escherichia coli* wurde bereits gezeigt, dass Eisen als Signalüberträger für Umweltbedingungen fungieren kann. Die Toxine dieser Bakterien werden nur in Gegenwart von Eisenmangelbedingungen produziert. In diesen Fällen dient Eisen als Signal für die Anwesenheit und Destruktion von Wirtszellen [150]. In diesem Zusammenhang könnte auch die bei *H. pylori* realisierte Repression der Ferritin-Biosynthese durch Säure erklärt werden. Da der niedrige pH-Wert ein Signal für Eisenmangelbedingungen darstellt und Fur diese Regulation vermittelt, kann spekuliert werden, dass auch die Ferritin-Regulation die Säureresistenz begünstigt. So wurde gezeigt dass Fur in *H. pylori* ebenso wie in *Salmonella typhimurium* in der auch als ATR (acid-tolerance-response) bezeichneten Säureresistenz eine Rolle spielt. Isogene Fur-defiziente Mutanten sind unabhängig von der Eisenvorbelastung der Bakterien säuresensibel und auch die Transkription des Fur-Gens wird

durch Säure reprimiert [39]. In der vorliegenden Arbeit konnte die durch Säure induzierte Fur-abhängige Repression des *pfr*-Gens auf Transkriptionsebene bestätigt werden. Da der Zusammenhang von Säure und Eisenmangel jedoch vor allem *in vivo* relevant zu sein scheint, könnte die Repression der Ferritinbiosynthese durch Säure auch als Folge einer insgesamt höheren Verfügbarkeit an Metallen entsprechend der bereits beschriebenen Repression der Ferritin-Biosynthese durch erhöhte nicht letale Konzentrationen an Nickel, Kupfer, Zink und Mangan [29] im Medium bedingt sein. Eine Verstärkung des Nickeleintransports unter sauren Umgebungsbedingungen würde Sinn machen, da durch eine vermehrte Verfügbarkeit des Kofaktors Nickel die Ureaseaktivität steigt und so das Überleben des Bakteriums durch Freisetzung des neutralisierenden Ammoniaks in saurer Umgebung verbessert wird. Ein durch Säure induzierter Nickel-Eintransport wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben. Für mögliche Zusammenhänge zwischen Eisenverfügbarkeit und Säureresistenz spricht auch, dass die Transkription der Ureasegene durch Eisenmangel induziert wird. Dieses Phänomen, das sich auf Protein- und Aktivitätsebene bestätigte, war auf Transkriptions- und Proteinebene unabhängig von dem Regulatorprotein Fur. Es unterstützt die Annahme, dass Eisenmangel für *H. pylori* als Signal für eine erhöhte Säurekonzentration dienen könnte, da eine verstärkte Ureaseproduktion und -aktivität unter aziden Bedingungen für das Überleben des Bakteriums essentiell ist. Da keiner der für andere bakteriellen Urease-Enzyme beschriebenen Regulationsmechanismen in *H. pylori* realisiert zu sein schien, wurde lange Zeit angenommen, dass das Enzym konstitutiv gebildet wird [20, 50, 174]. Die Entdeckung, dass Nickel die Transkription der Ureasegene induziert, stellte neben der durch Eisenmangel induzierten Regulation der Urease einen neuen Typ der transkriptionellen Regulation bakterieller Ureasen dar. Supplementation des Flüssigmediums mit Nickel führte sowohl zu einer Akkumulation der Proteinmenge der Urease-Untereinheiten UreA und UreB als auch zu einer drastischen Erhöhung der Ureaseaktivität. Stammspezifisch ergaben sich einige Unterschiede in Bezug auf Basalaktivität und Nickelinduktion, welche sich aufgrund unterschiedlicher Nickelresistenzen verschiedener *H. pylori*-Stämme und der damit verbundenen Variationen der Nickelkonzentration im Zytoplasma erklären lassen. In einer parallel durchgeführten Arbeit [197] wurde jedoch keine Induktion der Ureaseaktivität durch Nickelzusatz gefunden. Dies scheint durch Unterschiede in den verwendeten Kulturmedien bedingt zu sein, da in nickelreichen Medien die Urease-Produktion bereits maximal induziert sein kann. Der in diesen Analysen verwendete *H. pylori*-Stamm ATCC43504 zeigte eine vergleichbare Nickelinduktion der Ureaseaktivität. Der Befund, dass der Anstieg der Ureaseaktivität durch Nickelzusatz höher ist die beobachtete Akkumulation der Proteinuntereinheiten UreA und

UreB, weist daraufhin, dass nicht nur die Menge an Urease-Apoprotein sondern auch der Kofaktor Nickel für die Ureaseaktivität limitierend ist. Wenn man davon ausgeht, dass die Bioverfügbarkeit von Nickel im natürlichen Habitat von *H. pylori* sehr gering ist und durch Säure positiv beeinflusst würde, könnte die bessere Verfügbarkeit von Nickel bei niedrigen pH-Werten einen physiologischen Mechanismus für einen schnellen Anstieg der Ureaseaktivität darstellen. Die Analysen zur Eisenmangel und Nickelinduzierten Urease-induktion ergaben, dass mehrere Systeme an dieser Regulation beteiligt sind. So zeigte sich der Einfluss des Regulatorproteins Fur in der Eisenmangelabhängigen Regulation nur in einer erhöhten Ureaseaktivität der isogenen *fur*-defizienten Mutante NCTC 11638-FUR, während Nickelzusatz in der *fur*-negativen Mutante 1061-FUR zu einer schwächeren Induktion der Ureasetranskription führte. Weitere Untersuchungen zur Nickelinduktion der Urease wurden in Kooperation durchgeführt. Dabei konnte das Regulatorprotein NikR als transkriptionellen Regulator der Urease-Gene unter Nickelzusatz identifiziert werden. In Gegenwart von Nickel bindet NikR an den *ureA*-Promotor und verstärkt die Transkription der Ureasegene. Die Transkription, die Proteinmenge und die Aktivität der Urease unter Normalbedingungen werden allerdings weder durch Fur noch NikR beeinflusst [270].

5.2 Die Analyse des Kupferstoffwechsels

Im Magen ist auch die Kupferkonzentration großen Schwankungen unterworfen. Die tägliche Kupferaufnahme des Menschen von ungefähr einem Milligramm, der Kupfergehalt des Trinkwassers (10 bis 50 μM) und kupferreiche Nahrungsmittel wie Leber (bis zu 200 mg/kg Fleisch) zeigen, dass *H. pylori* Kupferkonzentrationen im Millimolaren Bereich ausgesetzt sein kann. Kupfermangel kann durch Komplexbildung mit Chelat-bildenden Komponenten der Magenschleimhaut zustande kommen [212]. In Zusammenhang mit der Tatsache, dass Kupfer wichtige Funktionen in der Erhaltung des Grundstoffwechsels ausübt, weist die wechselnde Verfügbarkeit an Kupfer daraufhin, dass *H. pylori* Mechanismen für die Kupferhomöostase besitzt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte genomweite Analyse zur Identifikation neuer Kupferregulierter Gene ermöglichte es den *H. pylori*-Gene HP1326-29 Funktionen im Kupferstoffwechsel zuzuordnen. Durch die 7-fache Repression des Ferritin-Gens *pfr*, die mit der bereits beobachteten Fur-abhängigen Kupferregulation auf Proteinebene übereinstimmt [29], wurde die Qualität der RNA-Profiling-Analyse bestätigt. Diese Regulation könnte auch zur Verfügbarkeit von anderen Biometall-Kofaktoren im Zytoplasma in Gegenwart hoher Kupferkonzentrationen beitragen (Abb. 44). Auch die Kupferinduktion der *H. pylori* Gene *exbD* und *moaA*, welche wahrscheinlich in die

Eisenaufnahme [279] und die Molybdän-Kofaktorsynthese [256] involviert sind, kann in diesem Zusammenhang gesehen werden. Des Weiteren wurden in der RNA-Profilings-Analyse die *H. pylori*-Gene *nadC*, *proC*, *cysS* und *trpA* als durch Kupfer induziert gefunden (Tab.). Diese für Homologe von Enzymen des NAD- und Aminosäure-Stoffwechsels könnten vor Kupfer-Vermittelter Enzymhemmung [122, 262] und Protein-Autooxidation [131, 262] schützen. Die Kupferinduktion des *H. pylori*-Gens *fliS*, welches zur Ausbildung funktionsfähiger Flagellen benötigt wird [2], könnte zu einer Steigerung der Motilität und auf chemotaktischem Wege *H. pylori* aus toxischen Kupferkonzentrationen führen. Die Kupferinduktion der Transkription von insgesamt 19 *H. pylori*-Genen weist daraufhin, dass das Magenbakterium in der Lage ist in Gegenwart toxischer Kupferkonzentrationen eine Art SOS-Stress-Antwort auszubilden. Gene für andere Metallexporter wie die P-Typ-ATPasen CadA (HP0791), CopA (HP1072) und CopA2 (HP1503) sowie das CzcA-Homolog HP0969 zeigten keine Veränderung der Transkription in Gegenwart von Kupfer (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass diese an der Kupferinduzierten Stressantwort nicht teilnehmen. Da das *H. pylori* spezifische Gen HP1326 und das benachbarte CzcA-Homolog HP1329 durch Kupfer stark induziert wurden und zusammen mit einem CzcB-Homolog in einem Operon organisiert schienen, lag die Vermutung nahe, dass diese Gene in den Kupferstoffwechsel involviert sein könnten. Die Analyse der HP1326-Transkription ergab, dass zwei kleine monocistronischen HP1326 mRNAs durch Kupfer innerhalb von Minuten induziert wurden und es somit *H. pylori* ermöglichen umgehend auf einen Anstieg der Kupferkonzentration zu reagieren. Außerdem zeigten die isogenen HP1326, -27 und -28 Mutanten einen stark ausgeprägten kupfersensiblen Phänotyp, was auf eine Export-Funktion der korrespondierenden Proteine hinweist. Eine mögliche Funktion des CzcA-Homologs HP1329 im Kupfer-Efflux konnte experimentell nicht bestätigt werden, da das korrespondierende Gen in *H. pylori* nicht inaktiviert werden konnte. Dieser Befund weist daraufhin, dass das HP1329-Gen für *H. pylori* essentiell ist. Die Tatsache, dass die Kupferinduktion der HP1326-Transkription in den HP1327 und -28 Mutanten früher einsetzte und dass die Ferritinbiosynthese in der HP1326-Mutante zu einer stärkeren Repression unter Kupferzusatz im Vergleich zum Elternstamm führte, bewies indirekt, dass das Fehlen der Kupferexport-Funktion zu einer Akkumulation von Kupfer im Zytoplasma führt. In Anbetracht der für *Ralstonia* CH34 beschriebenen Anordnung des CzcABC-Systems, der Homologien und der molekularen Eigenschaften der *H. pylori*-Proteine kann ein Modell postuliert werden, in dem HP1329 und HP1327 Metallionen über die innere und die äußere Membran transportieren und

HP1326 und HP1328 periplasmatische Proteine mit möglicher Binde- oder Speicherfunktion darstellen (Abb. 43).

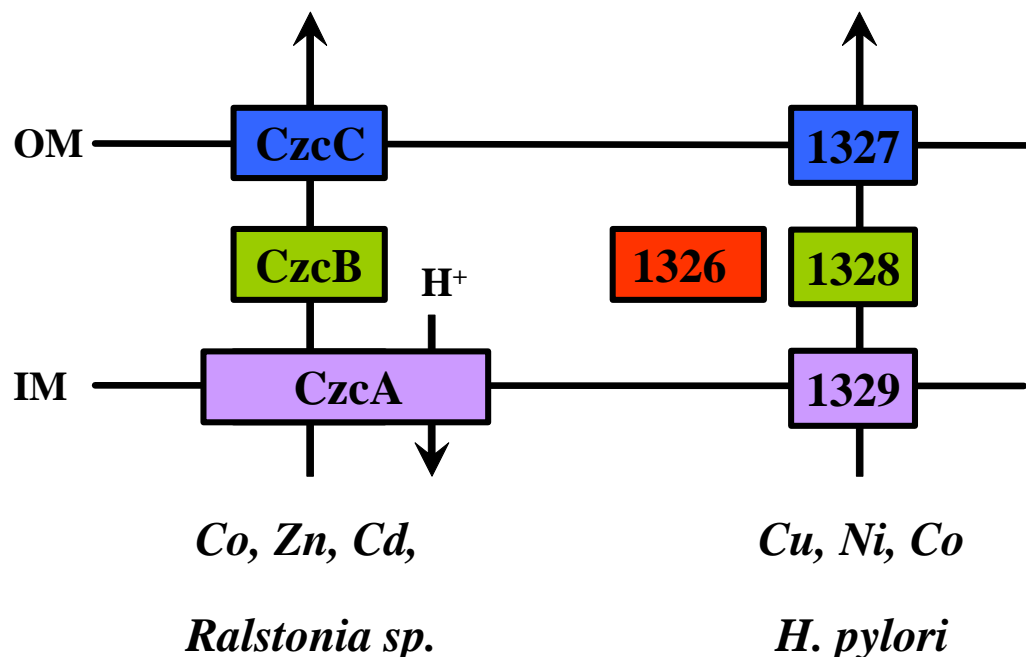


Abb. 43: Schematisches Modell des Kupfertransportsystems HP1326-29 in *H. pylori*. Schematische Darstellungen der Zellmembranen von *H. pylori* und *Ralstonia sp.* Die Proteine sind entsprechend ihrer Homologien durch farbige Rechtecke dargestellt. Die Transportrichtungen sind durch schwarze Pfeile markiert. Die transportierten Ionen sind als Elemente angegeben. OM, äußere Membran; IM, Zytoplasmamembran

Hinsichtlich der ständig wechselnden Umgebungsbedingungen im Magen würde eine periplasmatische Kupfer-Sequestrierung durch HP1326 es *H. pylori* ermöglichen die lebenswichtigen Kupferionen für Mangelzeiten zu speichern (Abb. 44). Computergestützte Analysen bestätigten weiterhin das Vorhandensein von Signalsequenzen in den HP1326, -27, -28 und -29 Genen. Die Sekretion des HP1326-Proteins konnte bereits in einer früheren Arbeit durch Transposon TnBla-Mutagenese [191] experimentell nachgewiesen werden. Zudem zeigten Wachstumsexperimente in dem *E. coli*-Stamm MC4100, der das HP1326-Gen unter Kontrolle des Tetracyclinrepressors auf einem Plasmid enthielt, dass das nach Induktion gebildete HP1326-Protein den *E. coli*-Stamm vor toxischen Kupfer- und Nickelkonzentrationen schützt. Dies weist auf eine mögliche Metallbindung durch HP1326 hin.

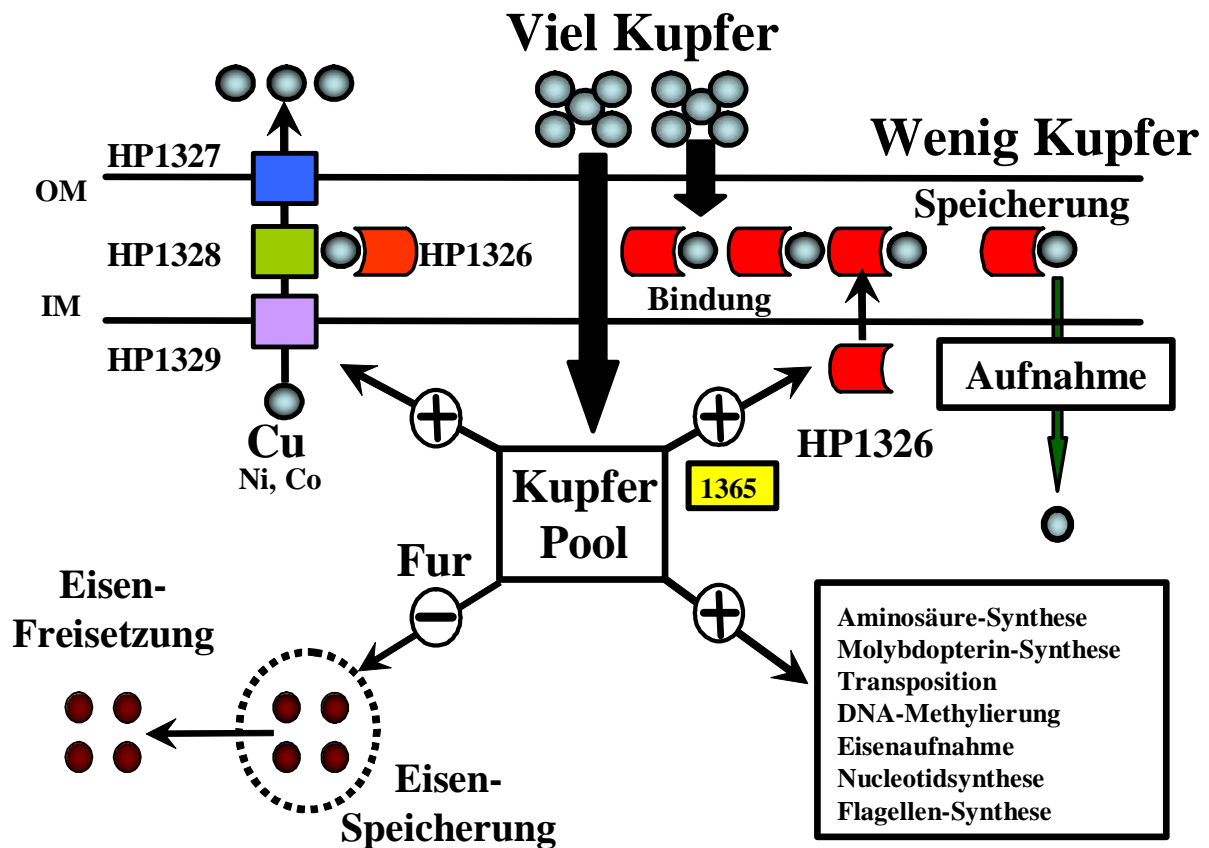


Abb. 44: Schematische Übersicht der *H. pylori* Stressantwort auf steigende Kupferkonzentrationen. Der Kupfereinstrom ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Die zytoplasmatischen Kupferionen werden über das Czc-System HP1327-29 und durch periplasmatische Sequestrierung durch HP1326 entgiftet. Die Rolle von HP1326 als Hilfsprotein des Czc-Systems ist ebenfalls dargestellt. Durch Kupfer verursachte Induktionen (+) und Repressionen (-) von Genen sind durch Pfeile markiert. Die verschiedenen Stoffwechselwege, deren Transkription durch Kupfer beeinflusst wird, sind in einem Quadrat hervorgehoben. Die Regulation der Ferritinbiosynthese durch Fur unter Kupferüberschuss wie auch die Freisetzung von Eisen sind dargestellt. OM, äußere Membran; IM Zytoplasmamembran

Weiterhin ergab die phänotypische Charakterisierung der HP1326, -27 und -28 Mutante, dass diese neben Kupfer auch Nickel und Kobalt transportieren können. Der fehlende Nickefflux scheint allerdings *in vivo* von geringerer Auswirkung, da keine Beeinträchtigung des Nickelstoffwechsels anhand der Ureaseproduktion bzw. -aktivität festgestellt werden konnte. Auch konnte keine transkriptionelle Regulation des HP1326-Gen durch andere Metalle beobachtet werden. Die unveränderte Säureresistenz der HP1326, -27 und -28 Mutanten im Vergleich zum Elternstamm deutet darauf hin, dass die transportierten Metallionen möglicherweise nicht wie in *Ralstonia* über einen Protonen-Antiport transloziert werden. Eine besondere Stellung im HP1326-28-System nimmt das periplasmatische Protein HP1328 ein, das auch mit anderen Transportsystemen interagieren könnte. Die Analyse der entsprechenden Mutante ergab

mögliche Funktionen von HP1328 sowohl im Ammonium- und Harnstoffstoffwechsel als auch in der Wismuthresistenz. Durch die fehlende Regulation der HP1326-Transkription und den Kupfersensiblen Phänotyp der korrespondierenden Mutanten konnte das Zwei-Komponenten-System HP1364/ 1365 als Regulator der Kupferregulation identifiziert werden. Diese Funktion wurde zudem durch die Bindung des „Response“-Regulators HP1365 *in vitro* an den HP1326-Promotor bestätigt. Die Tatsache, dass diese Bindung auch in Abwesenheit eines Autophosphorylierungsreagenz erfolgte, weist daraufhin, dass die Phosphorylierung für die DNA-Bindung nicht essentiell ist.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse, dass mit Hilfe von RNA-Profiling-Daten neue Gene des Kupferstoffwechsels von *H. pylori* identifiziert werden konnten. Die Kupfer-Export-Funktion der HP1326-28 Proteine unterstützt so in Gegenwart hoher Kupferkonzentrationen sinnvoll den kontinuierlichen Kupferaustransport von CopA [166]. Eine mögliche Interaktion der Proteine HP1326 und -28 mit anderen CzcB/ A-Homologen könnte zu einem neuen Modell von Metallaustransportern führen, welche möglicherweise eine Verbindung zwischen Kupfer-Export und -Sequestrierung ähnlich dem Cop-System von *Pseudomonas* [146] herstellen könnten. Diese Vermutung bedarf jedoch weiterer klärender Experimente.

6. Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* besiedelt die Magenschleimhaut des Menschen und verursacht schwere Erkrankungen des oberen Gastrointestinaltraktes. Die bakterielle Metallionen-Homöostase ist für die Adaptation an das ungewöhnliche Habitat Magen von grundlegender Bedeutung. So steht das Bakterium vor dem Problem einerseits den Bedarf an Metallionen zu decken und sich andererseits vor deren toxischen Nebenwirkungen zu schützen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Eisenspeicherung durch das *H. pylori* Ferritin Pfr weiter charakterisiert und der globale Einfluss von Eisen auf den Stoffwechsel analysiert. Außerdem wurden durch RNA-Profilierung in die Kupfer-Homöostase involvierte Proteine identifiziert und ein neues Kupferaustransportsystem funktionell charakterisiert. Die weitere Untersuchung der Eisenspeicherung ergab, dass das Ferritin Pfr für die Kolonisierung und Etablierung der Infektion von *H. pylori* im Tiermodell essentiell ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ferritin das Bakterium vor Säurevermittelter Eisentoxizität schützt und die Ferritin-Biosynthese durch Säurezusatz Fur-abhängig reprimiert wird. Die Fur-vermittelte Repression der Ferritin-Biosynthese unter Eisenmangelbedingungen erfolgt durch Bindung des Regulatorproteins an den Pfr-Promotor, die in Anwesenheit von Eisen aufgehoben wird. Durch eine genomweite Analyse der Eisenregulierter Gene konnten insgesamt 26 Gene dem Fur-Regulon zugeordnet werden. Die Analyse des Einflusses von Eisen auf den zentralen Pathogenitätsfaktor Urease zeigte, dass die Ureaseaktivität durch Eisenmangel verstärkt wird. Diese Regulation war unabhängig von dem metallabhängigen Regulator Fur auf transkriptioneller und auf Proteinebene nachweisbar. Der Zusatz von Nickel, dem Kofaktor der Urease, verursachte ebenfalls eine Erhöhung der Transkript- und Proteinmenge sowie der Ureaseaktivität. Die Nickelregulation der Urease war auf Transkriptionsebene von Fur abhängig und in einer isogenen Fur-Mutante schwächer ausgeprägt. Genomweite Analysen ergaben, dass die Transkription der Gene HP1326 und -29 durch Kupfer induziert wird. Die Homologien dieser Gene zu RND-Metallexportsystemen und die erhöhte Kupfersensibilität der isogenen Mutanten HP1326,-27 und -28 weisen darauf hin, dass die entsprechenden Proteine als Kupferaustransporter agieren. Weitere Studien zur Wachstumshemmung ergaben, dass auch Nickel und Kobalt durch das HP1326-28-System transportiert werden. Das HP1328-Protein besitzt zudem Funktionen in der Harnstoff und Ammoniumionen-Resistenz und schützt *H. pylori* vor Wismuth, das in der Therapie Verwendung findet. Als Kupferregulator der HP1326-Transkription wurde das Zwei-Komponenten-Regulationssystem HP1364/1365 identifiziert. So fehlte in den entsprechenden

isogenen Mutanten die Kupfer-Regulation und das HP1365-Protein konnte *in vitro* an den Promotor des HP1326-Gens binden. Zusammenfassend betrachtet bestätigen die Ergebnisse, dass dem Metallstoffwechsel von *H. pylori* bei der Adaptation an das Habitat Magen eine grundlegende Bedeutung zukommt und dass die Regulation der Metallhomöostase für das Überleben des Bakteriums essentiell ist.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y. S., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R. and Andrews, S. C.** (1999). Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* 181(5):1415-28.
2. **Akada J. K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tseuda, M. and Nakazawa, T.** (2000) Identifikation of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol* 36 (5):1071-1084
3. **Allan, E., Dorrell, N., Foynes, S., Anyim, M. and Wren, B. W.** (2000) Mutational analysis of genes encoding the early flagellar components of *Helicobacter pylori*: evidence for transcriptional regulation of flagellin A biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182:5274-5277.
4. **Alm, R. A., Ling, L. S., 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* (published erratum appears in *Nature* 1999 Feb 25;397(6721):719). *Nature* 397 (6715): 176-180
5. **Andrews, S. C.** (1998). Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 40: 281-351.
6. **Andrews, S. C., Le Brun N. E., Barynin V., Thomson A. J., Moore G. R., Guest J. R. and Harrison P. M.** (1995). Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generated heme-free variants. *J. Biol. Chem.* 270: 23286-23274.
7. **Andrews, S. C., Smith J. M. A., Yewdall S. J., Guest J. R. and Harrison P. M.** (1991). Bacterioferritins and ferritins are distantly related in evolution: conservation of ferroxidase-centre residues. *FEBS Lett.* 293: 164-168.
8. **Andruttis, K.A., Fox, J.G., Schauer, D.B., Marini, R.P., Li, X., Yan, L., Josenhans, C., and Suerbaum, S.** (1997) Infection of the ferret stomach by isogenic flagellar mutant strains of *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun* 65 (5), 1962-1966.
9. **Anton, A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T., and Nies, D. H.** (1999) CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia sp.* strain CH34. *J. Bacteriol.* 181 (22): 6876-6881
10. **Appelmek, B. J., Negrini, R., Moran, A. P., and Kuipers, E. J.** (1997) Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol* 5 (2): 70-73
11. **Aspinall, G.O., Monteiro, M.A., Moran, A.P., Pang, H., Penner, J.L., and Shaver, R.T.** (1995) Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori*. *Prog Clin Biol Res* 392:93-101.
12. **Atherton, J. C., Peek, R. M. J., Tham, K. T., Cover, T. L., and Blaser, M. J.** (1997) Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *H. pylori*. *Gastroenterology* 112: 92-99
13. **Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M. J., Tummuru, M. K., Blaser, M. J. and Cover, T. L.** (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270 (30): 17771-17777.

14. **Audia, J. P., Webb, C. C. and Foster, J. W.** (2001) Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol.* 291 (2):97-106
15. **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.** (1992) Short protocols in molecular biology. Harvard Medical School: Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons
16. **Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P. R., Naumann, M., and Meyer, T. F.** (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol.* (2):155-164.
17. **Bagg, A. and Neilands, J. B.** (1987). Ferric uptake regulation protein acts as arepressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26:5471-5477.
18. **Banatvala, N., Mayo, K., Megraud, F., Jennings, R., Deeks, J. J., and Feldman, R. A.** (1993) The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 168 (1): 219-221
19. **Bassam, B. J., Caetano-Anolles G. and Gresshoff P. M.** (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Anal.Biochem.* 196 (1): 80-83
20. **Bauerfeind, P., Garner, R. M., and Mobley, L. T.** (1996) Allelic exchange mutagenesis of *nixA* in *H. pylori* results in reduced nickel transport and urease activity. *Infect. Immun.* 64 :2877-2880
21. **Bauminger, E. R., Cohen, S. G., Dickerson, D. P. E., Levy, A., Ofer, S. and Yariv, J.** (1979). Observation of iron-storage protein in *E. coli* by Mössbauer spectroscopy. *J. Phys.* 2:523-525.
22. **Bauminger, E. R., Cohen, S.G., Dickerson, D. P. E., Levy, A., Ofer, S. and Yariv J.** (1980). Mössbauer spectroscopy of *Escherichia coli* and in iron-storage protein. *Biochem. Biophys. Acta.* 163:237-242
23. **Bauminger, E. R., Cohen, S. G., Giberman, E., Nowik, I., Ofer, S., Yariv, J., Werber, M. M. and Mervarech, M.** (1976). Iron in the whole bacteria cell. Exploratory investigations. *J. Phys. C6:* 227-233
24. **Bayerdorffer, E., Miehke, S., Neubauer, A., and Stolte, M.** (1997) Gastric MALT-lymphoma and *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 1, 89-94
25. **Bayle, D., Wangler, S., Weitzenegger T., Steinhilber, W., Volz, J., Przybylski, M., Schäfer, K. P., Sachs, G. and Melchers, K.** (1998) Properties of the P-type ATPases encoded by the *copAP* operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *J. Bacteriol.* 180:317-329.
26. **Bazzoli, F.** (2001) Key points from the revised Maastricht Consensus Report: the impact on general practice. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2:3-7
27. **Beier D. and Frank R.** (2000). Molecular Charakterization of Two-Component Systems of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 182 (8): 2068-2076.
28. **Bereswill, S. and Kist, M.** (2002) Molecular microbiology and pathogenesis of *Helicobacter* and *Campylobacter* updated: a meeting report of the 11th conference on *Campylobacter, Helicobacter* and related organisms. *Mol. Microbiol* 45 (1):255-262.
29. **Bereswill, S., Greiner, S., van Vliet, A. H., Waidner, B., Fassbinder, F., Schiltz, E., Kusters, J. G., and Kist, M.** (2000) Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 182 (21): 5948-5953

30. **Bereswill, S., Waidner, U., Odenbreit, S., Lichte, F., Fassbinder, F., Bode, G. and Kist, M.** (1998) Structural, functional and mutational analysis of the *pfr* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. *Microbiol.* 144:2505-2516
31. **Bereswill, S., Lichte, F., Greiner, S., Waidner, B., Fassbinder, F., and Kist, M.** (1999) The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 188 (1): 31-40
32. **Bereswill, S., Lichte, F., Vey, T., Fassbinder, F., and Kist, M.** (1998) Cloning and characterization of the *fur* gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 159 (2): 193-200
33. **Bereswill, S. and Kist M.** (1997) *Helicobacter pylori* - Mikrobiologie, Diagnostik, Epidemiologie. *MTA Magazin* 12 (8): 554-555
34. **Bereswill, S. and Kist M.** (1997) *Helicobacter pylori*: Mikrobiologie, Diagnostik und Epidemiologie. *MTA Magazin* 12 (8): 548-553
35. **Bereswill, S. and Kist M.** (1997) Mikrobiologie und Diagnostik der *Helicobacter pylori* Infektion. *Der Mikrobiologe* 7:131-134
36. **Bernard, M.M., Moschioni, M., Habermann, A., Griffiths, G., and Montecucco, C.** (2002) Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin does not depend on late endosomal SNAREs. *Cell Microbiol.* 4 (1):11-18
37. **Beswick, P. H., Hall, G. H., Hook, A. J., Little, K., McBrien, D. C. and Lott, K. A.** (1976) Copper toxicity: evidence for the conversion of cupric to cuprous copper in vivo under anaerobic conditions. *Chem Biol Interact.* 14 (3-4):347-356.
38. **Biedermann, G. and Schindler, P.** (1957). On the solubility product of precipitated iron(III) hydroxid. *Acta. Chem. Scand.* 11: 731.
39. **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 (2):606-611
40. **Binet, M.R. and Poole, R.K.** (2000) Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 473(1):67-70
41. **Birkholz, S., Knipp, U., Nietzki, C., Adamek, R. J., and Opferkuch, W.** (1993) Immunological activity of lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* on human peripheral mononuclear blood cells in comparison to lipopolysaccharides of other intestinal bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 6 (4):317-324
42. **Blum, A. L.** (1996) *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 214: 24-27
43. **Bode, G., Mauch, F., and Malfertheiner, P.** (1993) The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 111 (3): 483-490
44. **Bodger, K. and Crabtree, J. E.** (1998) *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull* 54 (1):139-150
45. **Boltcher.** (1874) *Dorpauer Medizinische Wochenzeitschrift*, 148
46. **Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., and Normark, S.** (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens (see comments). *Science* 262 (5141): 1892-1895
47. **Breuer, T., Sudhop, T., Hoch, J., Sauerbruch, T., and Malfertheiner, P.** (1996) Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8 (1):47-52

48. **Briat J.-F.** (1992). Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2475-2483.
49. **Bulen, W. A., LeComte, J. R. and Lough, S.** (1973). A hemoprotein from *Azotobacter vinelandii* containing non-heme iron: isolation and characterisation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 1274-1281.
50. **Burne, R.A. and Chen, Y.Y.** (2000) Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect* 2 (5):533-542.
51. **Caldwell, C. R., Turano, F. J. and McMahon, M. B.** (1998) Identification of two cytosolic ascorbate peroxidase cDNAs from soybean leaves and characterization of their products by functional expression in *E. coli*. *Planta.* 204 (1):120-6.
52. **Cantón, R., Martín de Argila, L. and Banquero F.** (2001) Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Reviews in Med. Microbiol.* 12 (1): 47-61
53. **Caspary, W. F., Arnold, R., Bayerdorffer, E., Behrens, R., Birkner, B., Braden, B., Domschke, W., Labenz, J., Koletzko, S., Malfertheiner, P., Menge, H., Rosch, W., Schepp, W., Strauch, M., and Stolte, M.** (1996) Diagnosis and therapy of *H. pylori* infection. Guidelines of the German Society of Digestive and Metabolic Diseases. *Z. Gastroenterol.* 34 (6):392-401
54. **Cave, D. R.** (1997) How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* 113 (6):9-14
55. **Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., and Covacci, A.** (1996) Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (25):14648-14653
56. **Chaudhry G. R., Lees H. and Suzuki I.** (1980). Presence of cytochrome *b* in *Nitrobacter agilis*. *Can. J. Mikrobiol.* 26:850-851.
57. **Chen, M. and Crichton, R. R.** (1982). Purification and characterisation of a bacterioferritin from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. Biophys. Acta.* 707:1-6.
58. **Choe, Y. H., Hwang, T. S., Kim, H. J., Shin, S. H., Song, S. U. and Choi, M. S.** (2001) A possible relation of the *Helicobacter pylori pfr* gene to iron deficiency anemia? *Helicobacter* 6:55-59.
59. **Christensen, J. M., Kristiansen, J., Nielsen, N. H., Menne, T. and Byrialsen, K.** (1999) Nickel concentrations in serum and urine of patients with nickel eczema. *Toxicol Lett.* 108 (2-3):185-9.
60. **Christie, P.J.** (1997) The *cag* pathogenicity island: mechanistic insights [letter; comment]. *Trends Microbiol* 5 (7):264-265.
61. **Contreras, M., Mandrand-Berthelot, M. A. and Labigne, A.** (1999) Identification and characterization in *H. pylori* of NikR, an homolog of a nickel-responsive regulator in *E. coli*. Abstr. HG18. In Abstr. 10th Int. Workshop *Campylobacter, Helicobacter* and related Organisms.
62. **Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R.** (1999) *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284 (5418):1328-1333.
63. **Cover, T. L. and Blaser, M. J.** (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 267 (15):10570-10575
64. **Cover, T. L., Hanson, P. I., and Heuser, J. E.** (1997) Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol* 138 (4):759-769
65. **Cover, T. L., Tummuru, M. K., Cao, P., Thompson, S. A., and Blaser, M. J.** (1994) Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 269 (14):10566-10573

66. **Crabtree, J. E.** (1996) Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol Suppl 215:3-10
67. **Czinn, S. J.** (1997) What is the role for vaccination in *Helicobacter pylori*? Gastroenterology 113 (6):149-153
68. **David, C. N. and Easterbrook, K.** (1971). Ferritin in the fungus *Phycomyces*. J. Cell. Biol. 48:15-28.
69. **de Bernard, M., Papini, E., de, F., V, Gottardi, E., Telford, J., Manetti, R., Fontana, A., Rappuoli, R., and Montecucco, C.** (1995) Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. J Biol Chem 270 (41):23937-23940
70. **Delany, I.; Pacheco, A. B.; Spohn, G.; Rappuoli, R.; and Scarlato, V.** (2001a) Iron-dependent transcription of the *frpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur Repressor protein. J. Bacteriol. 183 (16):4932-4937.
71. **Delany, I.; Spohn, G.; Rappuoli, R.; and Scarlato, V.** (2001b) The Fur Repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 42 (5):1297-1309.
72. **Dierick, H. A., Adam, A. N., Escara-Wilke, J. F. and Glover, T. W.** (1997) Immunocytochemical localization of the Menkes copper transport protein (ATP7A) to the trans-Golgi network. Hum Mol Genet. 6 (3):409-16.
73. **Dogliani, C., Wotherspoon, A. C., Moschini, A., de Boni, M. and Isaacson, P. G.** (1992). High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy. Lancet. 339:834-835.
74. **Doig, P.J., Austin, W. and Trust, T.J.** (1993) The *Helicobacter pylori* 19.6-kilodalton protein is an iron-containing protein resembling ferritin. J. Bacteriol. 175:557-560.
75. **Dundon, W. G., Polenghi, A., Del Guidice, G., Rappuoli, R. and Montecucco C.** (2001) Neutrophil-activating protein (HP-NAP) versus ferritin (Pfr): comparison of synthesis in *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol. Lett. 199:143-149
76. **Dunn, B. E., Campbell, G. P., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J.** (1990) Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 265 (16):9464-9469
77. **Eaton, K. A. and Krakowka, S.** (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. Infect Immun 62 (9):3604-3607
78. **Eaton, K. A. C., Brooks, C. L., Morgan, D. R. and Krakowa, S.** (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect. Immun. 59:2470-2475.
79. **Eaton, K. A., Cover, T. L., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., and Krakowka, S.** (1997) Role of vacuolating cytotoxin in gastritis due to *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun 65 (8):3462-3464
80. **Eaton, K. A., Morgan, D. R., and Krakowka, S.** (1989) *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. Infect Immun 57 (4):1119-1125
81. **Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C., and Krakowka, S.** (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *H. pylori* deficient in two flagellin genes. Infect. Immun. 64 (7):2445-2448
82. **Eaton, K.A., Gilbert, J.V., Joyce, E.A., Wanken, A.E., Thevenot, T., Baker, P., Plaut, A., and Wright, A.** (2002) In vivo complementation of ureB restores the ability of *Helicobacter pylori* to colonize. Infect. Immun. 2002. 70. (2):771-778.

83. **Epstein, W., Walderhaug, M.O., Polarek, J.W., Hesse, J.E., Dorus, E. and Daniel, J. M.** (1990) The bacterial Kdp K(+)-ATPase and its relation to other transport ATPases, such as the Na⁺/K⁺- and Ca²⁺(+)-ATPases in higher organisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 326(1236):479-86; discussion 486-7
84. **Escolar, L., Perez-Martin, J., and de, L., V.** (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181 (20):6223-6229.
85. **Evans, D. J., Evans, D. G., Lampert, H. C. and Nakano, H.** (1995) Identification of four new prokaryotic bacterioferritins, from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum*, by analysis of gene sequences. *Gene* 153:123-127.
86. **Evans, D.G. and Evans, D.J.J.** (1995) Adhesion properties of *Helicobacter pylori*. *Methods Enzymol* 253:336-360.
87. **Fassbinder, F., van Vliet, A. H., Gimmel, V., Kusters, J. G., Kist, M., and Bereswill, S.** (2000) Identification of iron-regulated genes of *Helicobacter pylori* by a modified fur titration assay (FURTA-Hp). *FEMS Microbiol Lett* 184 (2):225-229
88. **Fath, M. J. and Kolter, R.** (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev.* 57 (4):995-1017
89. **Feldman, R. A.** (2001) Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. In: Achtman, M. and Suerbaum, S. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham, U.K.: Horiz. Scient. Press. 29-51
90. **Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J. M., Weidman, J. F., Philipps, C. A., Spriggs, T. and Heldblom, E.** (1995). Whole-genom random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Rd. Science* 269:496-512
91. **Fong, S. T., Camakaris, J. and Lee, B. T.** (1995) Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 15 (6):1127-37
92. **Forman, D., Webb, P., and Parsonnet, J.** (1994) H pylori and gastric cancer (letter). *Lancet* 343 (8891):243-244
93. **Foster, J. W. and Hall, H. K.** (1992) Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* 174:4317-23
94. **Francis, M. J., Jones, E. E., Levy, E. R., Ponnambalam, S., Chelly, J. and Monaco, A. P.** (1998) A Golgi localization signal identified in the Menkes recombinant protein. *Hum Mol Genet.* 7 (8):1245-1252
95. **Francis, M. S. and Thomas, C. J.** (1997) The *Listeria monocytogenes* gene *ctpA* encodes a putative P-type ATPase involved in copper transport. *Mol Gen Genet.* 253 (4):484-91
96. **Frazier, B. A., Peifer, J. D., Russell, D. G., Falk, P., Olsen, A. N., Hammar, M., Westblom, T. U. and Normark, S. J.** (1993). Paracrystalline inclusions of a novel ferritin containing nonheme iron, produced by the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: evidence for a third class of ferritins. *J. Bacteriol.* 175:966-972.

97. **Fulkerson, J.F.J., Garner, R.M., and Mobley, H.L.** (1998) Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions. *J Biol Chem* 273 (1):235-241
98. **Ge, Z. and Taylor, D. E.** (1996) *Helicobacter pylori* genes *hpcopA* and *hpcopP* constitute a *cop* operon involved in copper export. *FEMS Microbiol. Lett.* 145:181-188.
99. **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
100. **Geis, G., Leying, H., Suerbaum, S., Mai, U., and Opferkuch, W.** (1989) Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J Clin Microbiol* 27 (3):436-441
101. **Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M., and Prinz, C.** (1999) Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (22):12778-12783
102. **Gilbert, J. V., Ramakrishna, J., Sundermann, F. W. Jr., Wright, A. and Plaut, A. G.** (1995). Protein Hpn: Cloning and Characterization of Histidine-Rich Metal-Binding Polypeptide in *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae*. *Infect. Immun.* 63:2682-2688
103. **Glocker, E., Lange, C., Covacci, A., Bereswill, S., Kist, M., and Pahl, H. L.** (1998) Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappaB activation. *Infect Immun* 66 (5):2346-2348
104. **Goodwin, C. S.** (1989) *Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. *Lancet* 2(8670):1019-1020
105. **Goodwin, C. S. and Armstrong, J. A.** (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9 (1):1-13
106. **Goodwin, C. S. and Worsley, B. W.** (1993) Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 22 (1):5-19
107. **Grosse, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Santos, A. N., Lawley, B., Brown, N. L., and Nies, D. H.** (1999) Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 181 (8):2385-2393
108. **Grossmann, M. J., Hinton, S. M., Minak-Bernero, V., Slaughter, C. and Stiefel, E. I.** (1992). Unification of the ferritin family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2419-2423.
109. **Guerinot, M. L.** (1994) Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* (48):743-772
110. **Guillemin, K., Salama, N.R., Tompkins, L.S., and Falkow, S.** (2002) *Cag* pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (23):15136-15141
111. **Ha, N.C. and Oh, B.H.** (2001) The importance of the surface urease of *Helicobacter pylori*: a reconciling picture. Response from Ha and Oh. *Trends Microbiol.* 9 (11):534
112. **Haas, R., Meyer, T. F. and van Putten J. P. M.** (1993). Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 8:753-760.

113. **Hall, H. K and Foster, J. W.** (1996). The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* 178:5683-5691
114. **Halliwell, B.** (1978). Superoxid-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. *FEBS Lett.* 92:321-326.
115. **Hantke, K.** (1987). Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 210:135-139.
116. **Hantke, K.** (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 4 (2):172-7
117. **Hantke, K. and Braun, V.** (1998). Control of bacterial iron transport by regulatory proteins, p. 11-44. In S. Silver and W. Walden (eds.), *Metal ions in gene regulation*. Chapman & Hall, New York, London.
118. **Harrison, P. M., Hempstead, P. D., Artymiuk, P. J. and Andrews, S. C.** 1998. Structure function relationships in the ferritins. In: Sigel A., and H. Sigel (eds). *Metal Ions in biological systems*, (Vol. 35): 435-478. Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals. Marcel Dekker, Inc., New York Basel, Hong Kong.
119. **Hawtin, P. R., Delves, H. T. and Newell, D. G.** (1991) The demonstration of nickel in the urease of *Helicobacter pylori* by atomic absorption spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett.* 61 (1):51-54.
120. **Hazell, S. L., Andrews, R. H., Mitchell, H. M., and Daskalopoulos, G.** (1997) Genetic relationship among isolates of *Helicobacter pylori*: evidence for the existence of a *Helicobacter pylori* species-complex. *FEMS Microbiol Lett* 150 (1):27-32
121. **Heltzel, A., Lee, I. W., Totis, P. A. and Summers, A. O.** (1990) Activator-dependent preinduction binding of sigma-70 RNA polymerase at the metal-regulated mer promoter. *Biochemistry.* 29 (41):9572-84.
122. **Heron, P., Cousins, K., Boyd, C. and Daya, S.** (2001) Paradoxical effects of copper and manganese on brain mitochondrial function. *Life Sci.* 68:1575-1583
123. **Herrmann, L., Schwan, D., Garner, R., Mobley, H. L. T., Haas, R., Schäfer, 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(3):524-536.
124. **Heuermann, D. and Haas, R.** (1995) Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene* 165 (1):17-24.
125. **Hofreuter, D. and Haas, R.** (2002) Characterization of two cryptic *Helicobacter pylori* plasmids: a putative source for horizontal gene transfer and gene shuffling. *J. Bacteriol.* 184 (10):2755-2766
126. **Hopkins, R. J., Girardi, L. S., and Turney, E. A.** (1996) Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. *Gastroenterology* 110 (4):1244-1252
127. **Hu, L.-T. and Mobley, H. L. T.** (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 58:992-998.
128. **Iwamoto, H., Czajkowsky, D.M., Cover, T.L., Szabo, G., and Shao, Z.** (1999) VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett* 450 (1-2):101-104.
129. **Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. and Michel, H.** (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature.* 376 (6542):660-9.

130. **Jiang, Q., Hiratsuka, K. and Taylor, D. E.** (1996). Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol. Microbiol.* 20:833-842.
131. **Kachur, A. V., Koch, C. J. and Biaglow, J. E.** (1999) Mechanism of copper-catalyzed autoxidation of cysteine. *Free Radic. Res.* 31:23-34.
132. **Kahrs, A. F., Odenbreit, S., Schmitt, W., Heuermann, D. Meyer, T. F. and Haa, R.** (1995) An improved TnMax mini-transposon system suitable for sequencing, shuttle mutagenesis and gene fusions. *Gene* 167 (1-2):53-57
133. **Kanamaru, K., Kashiwagi, S. and Mizuno, T.** (1994) A copper-transporting P-type ATPase found in the thylakoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *Mol Microbiol.* 13 (2):369-77.
134. **Kannt, A., Lancaster, C. R. and Michel, H.** (1998) The role of electrostatic interactions for cytochrome c oxidase function. *J Bioenerg Biomembr.* 30 (1):81-87
135. **Kansau, I., Guillain, F., Thiberge, J. M., and Labigne, A.** (1996) Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Mol Microbiol* 22 (5): 1013-1023
136. **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-S163.
137. **Keenan, J.I. and Allardyce, R.A.** (2000) Iron influences the expression of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle-associated virulence factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12 (12):1267-1273
138. **Kleanthous, H., Clayton, C.L., and Tabaqchali, S.** (1991) Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 5 (10):2377-2389.
139. **Klose, J.** (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 26(3):231-43.
140. **Koizumi, S. and Inoue, K.** (1998) Functional coupling of secretion and capacitative calcium entry in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 247 (2):293-8.
141. **Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P. H., Stremmel, W. and Rudi, J.** (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 8:5080-5087
142. **Kurokawa, T., Fukumori, Y. and Yamanaka, T.** (1989). *Nitrobacter winogradskyi* cytochrome *b-559* a nonhaem iron-containing cytochrome related to bacterioferritin. *Biochim. Biophys. Acta.* 976:135-139.
143. **Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Van Strijp, J. A., and Vandenbroucke-Grauls, C. M.** (1997) Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* 65 (9):3672-3679
144. **La Fontaine, S. L., Firth, S. D., Camakaris, J., Englezou, A., Theophilos, M. B., Petris, M. J., Howie, M., Lockhart, P. J., Greenough, M., Brooks, H., Reddel, R. R. and Mercer, J. F.** (1998) Correction of the copper transport defect of Menkes patient fibroblasts by expression of the Menkes and Wilson ATPases. *J Biol Chem.* 273 (47):31375-80.
145. **Labenz, J. and Boersch, G.** (2000) Therapie der *Helicobacter pylori* Infektion. In: Malferteiner, P. (Hg.) *Helicobacter pylori-Von der Grundlage zur Therapie.* Thieme, Stuttgart, pp.
146. **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

147. **Lee, Y. A., Hendson, M., Panopoulos, N. J. and Schroth, M. N.** (1994) Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. Juglandis; homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *J Bacteriol.* 176 (1):173-88.
148. **Lelwala-Guruge, J., Ascencio, F., Ljungh, A., and Wadstrom, T.** (1993) Rapid detection and characterization of sialic acid-specific lectins of *Helicobacter pylori*. *APMIS* 101 (9):695-702
149. **Lim, C. K. and Cooksey, D. A.** (1993) Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 175 (14):4492-8
150. **Litwin, C. M. and Calderwood, S. B.** (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (2):137-149.
151. **Löffler, G. and Petrides, E.** (1997) *Biochemie und Pathobiochemie.* 5
152. **Logan, R. P.** (1996) Adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 10 (1):3-15
153. **Ma, J. F., Ochsner, U. A., Klotz, M. G., Nanayakkara, V. K., Howell, M. L., Johnson, Z., Posey, J. E., Vasil, M. L., Monaco, J. J. and Hassett, D. J.** (1999) Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181:3730-3742.
154. **MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A. and Eide, D.** (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19 (12):2845-55.
155. **Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K. E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B. B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L., and Boren, T.** (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297 (5581):573-578
156. **Maier, R. J., Fu, C., Gilbert, J., Moshiri, F., Olson, J., and Plaut, A. G.** (1996) Hydrogen uptake hydrogenase in *H. pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141 (1): 71-76
157. **Malaty, H. M., Graham, D. Y., Klein, P. D., Evans, D. G., Adam, E., and Evans, D. J.** (1991) Transmission of *Helicobacter pylori* infection. Studies in families of healthy individuals. *Scand J Gastroenterol* 26 (9): 927-932
158. **Malferteiner, P., Bayerdoerffer, E., Labenz, J., and Roesch, W.** (1997) Therapie bei peptische Ulcera. *Deutsches Ärzteblatt* , S.665-671
159. **Malmstrom, B. G. and Leckner, J.** (1998) The chemical biology of copper. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:286-292.
160. **Marais, A., Monteiro, L., and Megraud, F.** (1999) Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol* 241: 103-122
161. **Maroney, M. J.** (1999) Structure/function relationships in nickel metallochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (2):188-199
162. **Marshall, B.J. Armstrong, J. A., McGeachie, D. B. and Glancy, R. J.** (1985). Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. *Med. J. Aust.* 142 (8):439-44.
163. **Marshall, D. G., Dundon, W. G., Beesley, S. M. and Smyth, C. J.** (1998). *Helicobacter pylori* - a conundrum of genetic diversity. *Microbiology* 144:2925-2939.
164. **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 (1):19-31

165. **McKenna, W. R., Mickelsen, P. A., Sparling, P. F., and Dyer, D. W.** (1988) Iron uptake from lactoferrin and transferrin by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 56 (4):785-791
166. **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*. *Acta Physiol Scand Suppl* 643:123-135.
167. **Merchant, J.L.** (2001) VacA pores as portable portals for urea. *J. Clin. Invest* 108 (6):803-804
168. **Miller, R. A. and Britigan B. E.** (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:1-18
169. **Mills, S. D., Jasalavich, C. A. and Cooksey, D. A.** (1993) A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol.* 175 (6):1656-64
170. **Minnis, J. A., Taylor, T. E., Knesek, J. E., Peterson, W. L., and McIntire, S. A.** (1995) Characterization of a 3.5-kbp plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid* 34 (1), 22-36
171. **Mizushima, T., Sugiyama, T., Komatsu, Y., Ishizuka, J., Kato, M., and Asaka, M.** (2001) Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2001. Jul;39(7):2463. -5. 39 (7), 2463-2465
172. **Mobley, H. L.** (1996) The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther* 10 (1): 57-64
173. **Mobley, H. L., Garner, R. M., Chippendale, G. R., Gilbert, J. V., Kane, A. V. and. Plaut, A. G.** (1999). Role of Hpn and NixA of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to bismuth and other metal ions. *Helicobacter* 4:162-169.
174. **Mobley, H. L., Island, M. D., and Hausinger, R. P.** (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59 (3): 451-480
175. **Mobley, H.L., Garner, R.M., and Bauerfeind, P.** (1995) *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixA: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol Microbiol* 16 (1):97-109.
176. **Montecucco, C. and Rappuoli, R.** (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell.* 2 (6): 457-466
177. **Moore G. R., Mann S. and Bannister J. V.** (1986). Isolation and properties of the complex nonheme-iron-containing cytochrome *b₅₅₇* (bacterioferritin) from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Inorg. Biochem.* 28: 329-336
178. **Morris A. J., Ali M. R., Nicholson G. I., Perez-Perez G. I. and Blaser M. J.** (1991). Long-term follow-up of voluntary ingestion of *Helicobacter pylori*. *Ann. Intern. Med.* 114 (8):662-3
179. **Moss, S. F., Legon, S., Bishop, A. E., Polak, J. M., and Calam, J.** (1992) Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease. *Lancet* 340 (8825):930-932
180. **Mukhopadhyay, P.** (1999). Gastric cancer and lymphoma. In: Westblom, T. U., Czinn, S.J. & Nedrud, J. G. (eds.). *Gastrointestinal disease and Helicobacter pylori*:57-69.
181. **Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350
182. **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.

183. **Nakao, K., Imoto, I., Ikemura, N., Shibata, T., Takaji, S., Taguchi, Y., Misaki, M., Yamauchi, K. and Yamazaki, N.** (1997). Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection and with the degree of gastric inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* 92:1005-1011.
184. **Nakao, K., Imoto, I., Ikemura, N., Shibata, T., Takaji, S., Taguchi, Y., Misaki, M., Yamauchi, K. and Yamazaki, N.** (1997) Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection and with the degree of gastric inflammation. *Am. J. Gastroenterol.* 92:1005-1011
185. **Nies, D. H.** (1995) The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177 (10):2707-2712
186. **Nies, D. H.** (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730-750
187. **Nies, D. H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. and Saier, M. H. Jr.** (1998) CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J Bacteriol.* 180 (21):5799-802.
188. **Nies, D.H. and Silver, S.** (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* 14 (2):186-199
189. **Nikaido, H.** (1996) Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol. Review* 178 (20):5853-5859.
190. **Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R.** (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287 (5457): 1497-1500
191. **Odenbreit, S., Till, M. and Haas, R.** (1996). Optimized BlaM-transposon shuttle mutagenesis of *Helicobacter pylori* allows the identification of novel genetic loci involved in bacterial virulence. *Mol. Microbiol.* 20:361-373.
192. **Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., and Haas, R.** (1999) Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 31 (5):1537-1548.
193. **Odenbreit, S., Wieland, B. and Haas, R.** (1996b). Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J. Bacteriol.* 178:6960-6967.
194. **Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. and Solioz, M.** (1993) Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem.* 268(17):12775-9
195. **Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. and Solioz, M.** (1992) An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. *Ann N Y Acad Sci.* 671:484-486
196. **Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R. and Solioz, M.** (1993) Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem.* 268 (17):12775-12779
197. **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 (1):176-182
198. **Ostermeier, C. and Michel, H.** (1997) Crystallization of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 7 (5):697-701
199. **Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A. and O'Halloran, T. V.** (2001) The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 276 (33):30670-7.
200. **Pai, R., Sasaki, E., and Tarnawski, A.S.** (2000) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) alters cytoskeleton-associated proteins and interferes with re-

- epithelialization of wounded gastric epithelial monolayers. *Cell Biol Int* 24 (5):291-301
201. **Palmgren, M.G. and Axelsen, K. B.** (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*.1365(1-2):37-45
 202. **Papini, E., Satin, B., Bucci, C., de Bernard, M., Telford, J. L., Manetti, R., Rappuoli, R., Zerial, M., and Montecucco, C.** (1997) The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J* 16 (1): 15-24
 203. **Parsonnet, J.** (1995) The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 9 (2): 45-51
 204. **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 (see comments). *N Engl J Med* 325 (16):1127-1131
 205. **Paulsen, I. T. and Saier, M. H. Jr.** (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol. Review*.156 (2):99-103.
 206. **Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A.** (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* 60 (4):575-608
 207. **Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Nelissen, B. and Saier, M. H. Jr.** (1998) Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genom of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 430: 116-125.
 208. **Penfold, C. N., Ringeling, P. L., Davy, S. L., Moore, G. R., McEwan, A. G and Spiro, S.** (1996) Isolation, characterisation and expression of the bacterioferritin gene of *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 139:143-148.
 209. **Penfold, S.S., Lastovica, A.J., and Elisha, B.G.** (1988) Demonstration of plasmids in *Campylobacter pylori* [letter]. *J Infect Dis* 157 (4):850-851.
 210. **Phadnis, S. H., Ilver, D., Janzon, L., Normark, S. and Westblom, T. U.** (1994). Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62: 557-565.
 211. **Pounder, R. E. and Ng, D.** (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 9 (2):33-39
 212. **Powell, J. J., Jugdaohsingh, R. and Thompson, R. P.** (1999) The regulation of mineral absorption in the gastrointestinal tract. *Proc. Nutr. Soc.* 58:147-153.
 213. **Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. and Rosen B.P.** (2000) CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *J Biol Chem* 275 (2): 652-656
 214. **Rensing, C., Ghosh, M. and Rosen, B.P.** (1999) Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases *Journal of Bacteriology.* 181 (19): 5891-5897
 215. **Reyrat, J.M., Pelicic, V., Papini, E., Montecucco, C., Rappuoli, R., and Telford, J.L.** (1999) Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol Microbiol* 34 (2):197-204.
 216. **Ricci, V., Sommi, P., Fiocca, R., Romano, M., Solcia, E. and Ventura, U.** (1998). *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J. Pathol.* 183:453-459.
 217. **Rocha, E. R., Andrews, S. C., Keen, J. N. and Brock, J. H.** (1992). Isolation of a ferritin from *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 95: 207-212.
 218. **Rodriguez-Montelongo, L., Farias, R. N., Massa, E. M.** (1995) Sites of electron transfer to membrane-bound copper and hydroperoxide-induced damage in the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys.* 323 (1):19-26
 219. **Rogers, S. D., Bhave, M. R., Mercer, J. F., Camakaris, J. and Lee, B. T.** (1991) Cloning and characterization of *cutE*, a gene involved in copper transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 173 (21):6742-8.

220. **Romaniuk, P. J., Zoltowska, B., Trust, T. J., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R., and Stahl, D. A.** (1987) *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. J Bacteriol 169 (5): 2137-2141
221. **Rowland, M., Imrie, C., Bourke, B., and Drumm, B.** (1999) How should *Helicobacter pylori* infected children be managed? Gut 45 (1) I36-I39.
222. **Rowland, M., Kumar, D., Daly, L., O'Connor, P., Vaughan, D., and Drumm, B.** (1999) Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. Gastroenterology 117 (2):336-341.
223. **Rowland, M., Vaughan, D., and Drumm, B.** (1997) *Helicobacter pylori* infection in children [letter]. Lancet 349 (9046):209.
224. **Saier, M. H. Jr, Tam, R., Reizer, A and Reizer, J.** (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Mol Microbiol. 11 (5):841-7.
225. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
226. **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology 24: 104-108
227. **Scarlato, V., Delany, I., Spohn, G., and Beier, D.** (2001) Regulation of transcription in *Helicobacter pylori*: simple systems or complex circuits? Int J Med Microbiol. 291 (2):107-117
228. **Schilsky, M. L., Quintana, N., Volenberg, I., Kabishcher, V. and Sternlieb, I.** (1998) Spontaneous cholangiofibrosis in Long-Evans Cinnamon rats: a rodent model for Wilson's disease. Lab Anim Sci. 48 (2):156-61.
229. **Schmitt, W. and Haas, R.** (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. Mol Microbiol 12 (2): 307-319
230. **Scott, D.R., Weeks, D., Hong, C., Postius, S., Melchers, K., and Sachs, G.** (1998) The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 114 (1):58-70.
231. **Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L.S.** (1999) Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 96 (25)14559-14564.
232. **Segal, E.D., Falkow, S., and Tompkins, L. S.** (1996) *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 93 (3):1259-1264.
233. **Segal, E.D., Shon, J., and Tompkins, L. S.** (1992) Characterization of *Helicobacter pylori* urease mutants. Infect Immun 60 (5):1883-1889.
234. **Serrano, R.** (1989) Knowledge about ATPases ignored. Trends Biochem Sci. 14 (9):361-362
235. **Skouloubris, S., Thiberge, J.M., Labigne, A., and De Reuse, H.** (1998) The *Helicobacter pylori* UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. Infect Immun 66 (9):4517-4521.
236. **Skouloubris, S.; Labigne, A.; and De Reuse, H.** (1997) Identification and characterization of an Aliphatic Amidase in *Helicobacter pylori*.Mol. Microbiol. 25(5):989-998.
237. **Solioz, M. and Odermatt, A.** (1995) Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. Biol Chem. 270 (16):9217-21

238. **Solnick, J.V., Josenhans, C., Suerbaum, S., Tompkins, L.S., and Labigne, A.** (1995) Construction and characterization of an isogenic urease-negative mutant of *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun* 63 (9):3718-3721.
239. **Solomons, N. W., Viteri, F., Shuler, T. R. and Nielsen, F. H.** (1982) Bioavailability of nickel in man: effects of foods and chemically-defined dietary constituents on the absorption of inorganic nickel. *J Nutr.* 112 (1):39-50.
240. **Spiegelhalder, 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 (12):5315-5325
241. **Stein, M., Rappuoli, R., and Covacci, A.** (2000) Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (3):1263-1268.
242. **Stiefel, E. and Watt, G. D.** (1979). *Azotobacter vinelandii* cytochrom *b*_{557.5} is a bacterioferritin. *Nature.* 279:81-83.
243. **Stingl, K., Altendorf, K., and Bakker, E.P.** (2002) Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol.* 10 (2):70-74.
244. **Stojiljkovic, I. and Hantke, K.** (1995). Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein. *Mol. Gen. Genet.* 247:199-205.
245. **Stojiljkovic, I., Bäumlner, A. J. and Hantke, K.** (1994). Fur regulon in gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a *fur* titration assay. *J. Mol. Biol.* 236:531-545.
246. **Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. and Brown, N. L.** (2001) CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol.* 39 (2):502-11.
247. **Strobel, S., Bereswill, S., Balig, P., Allgaier, P., Sonntag, H.G., and Kist, M.** (1998) Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 36 (5):1285-1289.
248. **Suerbaum, S.** (1995) The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol* 3 (5):168-170
249. **Suerbaum, S.** (2000) Bakterielle Physiologie und Virulenzfaktoren. In: Malferttheiner, P. (Hg.) *Helicobacter pylori*-Von der Grundlage zur Therapie. Thieme, Stuttgart
250. **Suerbaum, S. and Michetti, P.** (2002) *H. pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* 347 (15):1175-1186
251. **Sulwalsky, M., Ungerer, B., Quevedo, L., Aguilar, F. and Sotomayor C. P.** (1998) Cu²⁺ ions interact with cell membranes. *J. Inorg Biochem.* 70:233-238
252. **Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J. L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E. and Zoratti, M.** (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* 18 (20):5517-27.
253. **Taylor, D. E.** (1996) Diversity among *Helicobacter pylori* isolates (letter). *J Clin Microbiol* 34 (4):1041
254. **Taylor, D. E., Eaton, M., Chang, N., and Salama, S. M.** (1992) Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J Bacteriol* 174 (21):6800-6806
255. **Telford, J. L., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A., and Xiang, Z.** (1994) Gene

- structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 179 (5):1653-1658
256. **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., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., and Venter, J. C.** (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* *Nature*. 388 (6642): 539-547
 257. **Tombola, F., Carlesso, C., Szabo, I., de Bernard, M., Reytrat, J.M., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and Zoratti, M.** (1999) *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys J* 76 (3):1401-1409
 258. **Tombola, F., Morbiato, L., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Zoratti, M., and Papini, E.** (2001) The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest* 108 (6):929-937
 259. **Tombola, F., Oregna, F., Brutsche, S., Szabo, I., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., and Zoratti, M.** (1999) Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 460 (2), 221-225
 260. **Tonello, F., Dundon, W. G., Satin, B., Molinari, M., Tognon, G., Grandi, G., Del Giudice, G., Rappuoli, R. and Montecucco, C.** (1999). The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol. Microbiol.* 34:238-246.
 261. **Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145-149
 262. **Tsekova, K., Dentchev, D. and Todorova, D.** (2000). Effect of cadmium and copper on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 45:331-334.
 263. **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.* 125:194-201.
 264. **Tummuru, M. K., Cover, T. L., and Blaser, M. J.** (1993) Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun.* 61 (5):1799-1809
 265. **van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M. and Nies D. H.** (1997). Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* 23:493-503.
 266. **van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Sanna, R., Plaisier, A., Schneeberger, P., de Boer, W. and Quint, W.** (1998) Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 115 (1):58-66.
 267. **van Vliet A.H.M.; Stoof, J.; Poppelaars, S. W.; Bereswill, S.; Homuth, G.; Kist, M.; Kuipers, E. J.; and Kusters, J. G.** (2002) Amidase- and Urease-mediated ammonia production in *Helicobacter pylori* is regulated by the iron-responsive repressor Fur. *J. Biol Chem* Dez.23
 268. **van Vliet A.H.M.; Stoof, J.; Vlasbloom, R.; Wainwright, S. A.; Hughes, N. J.; Kelly, D. J.; Bereswill, S.; Bijlsma, J. J. E.; Hoogenboezem, T.; Vandenbrouke-Grauls, C. M. J. E.; Kist, M.; Kuipers, E. J.; and Kusters, J.**

- G. (2002) The role of the Ferric Uptake Regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *Helicobacter*
269. **van Vliet, A. H., Bereswill, S., and Kusters, J. G.** (2001) Ion Metabolism and Transport. In: Mobley, H. L., Mendz, G. L., and Hazell, S. L. (Hg.) *Helicobacter pylori*-Physiology and Genetics. American Society for Microbiology, Washington, pp. 193-206
270. **van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Waidner, B., Davies, B. J., de Vries, N., Penn, C. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Kist, M., Bereswill, S., and Kusters, J. G.** (2001) Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect Immun*; 69 (8):4891-4897
271. **van Vliet, A. H., Poppelaars, S. W., Davies, B. J., Stoof, J., Bereswill, S., Kist, M., Penn, C. W., Kuipers, E. J., and Kusters, J. G.** (2002) NikR mediates nickel-responsive transcriptional induction of urease expression in *H. pylori*. *Infect. Immun.* 70 (6):2846-2852
272. **Vargas, E., Gutierrez, S., Ambriz, M. E. and Cervantes, C.** (1995) Chromosome-encoded inducible copper resistance in *Pseudomonas* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 68 (3):225-229.
273. **Velayudhan, J., Hughes, N. J., Andrews, S. C., Clayton, C. L. and Kelly, D.J.** (1997). Iron acquisition in *Helicobacter pylori*: characterization of *tbpA*, *fecA*, and *exbB* homologues. *Gut* 41(1): A109.
274. **Velayudhan, J., Hughes, N. J., McColm, A. A., Bagshaw, J., Clayton, C. L., Andrews, S. C and Kelly, D. J.** (2000) Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* 37:274-286.
275. **Veldhuyzen van Zanten, S. J. O. and Lee, A.** (1999). The role of *Helicobacter pylori* infection in duodenal and gastric cancer. In: Compans *et al.*, (ed.) *Curr. Topics in Microbiology and Immun.*: 103-122 Springer, Berlin.
276. **Vogel, J. P. and Isberg, R. R.** (1999) Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr Opin Microbiol. Review* 2 (1):30-4.
277. **Vulpe, C. D. and Pachman, S.** (1995) Cellular copper transport. *Annu. Rev. Nutr.* 15:293-322
278. **Wai, S. N., Nakayama, K., Umene, K., Moriya, T. and Amako, K.** (1996). Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol. Microbiol.* 20: 1127-1134.
279. **Wai, S. N., Takata, T., Takade, A., Hamasaki, N. and Amako, K.** (1995). Purification and characterization of ferritin from *Campylobacter jejuni*. *Arch. Microbiol.* 164:1-6.
280. **Waidner, B.** (1999) Funktionelle Charakterisierung des Regulatorproteins Fur von *Helicobacter pylori*. Diplomarbeit
281. **Waidner, B., Greiner, S., Odenbreit, S., Kavermann H., Velayudhan, J., Stähler, F., Guhl, J., Bisse, E., van Vliet, A. H., Andrews, S. C., Kusters, J. G., Kelly, D.J., Haas, R., Kist, M., Bereswill, S.** (2002) Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun* 70:3923-3929
282. **Warren, J. R. and Marshall, B.** (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1:1273-1275
283. **Weast, R. C.** (1984) CRC handbook of chemistry and physics, 64 edn. CRC, Boca Raton. Fla
284. **Webb, P. M., Knight, T., Greaves, S., Wilson, A., Newell, D. G., Elder, J., and Forman, D.** (1994) Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living

- conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. *BMJ* 308 (6931):750-753
285. **Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., and Sachs, G.** (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*;287(5452):482-485
286. **Wrigglesworth, J. M. and Baum, H.** (1980) The biochemical functions of iron. In: Jacobs A. and Worwood, M. (Hg.) *Iron in Biochemistry and Medicine*. Academic Press, London, New York, pp. 29-86
287. **Wylie, J. L., Hatch, G. M and McClarty, G.** (1997) Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *J. Bacteriol.*
288. **Yoshimizu, T., Omote, H., Wakabayashi, T., Sambongi, Y. and Futai, M.** (1998) Essential Cys-Pro-Cys motif of *Caenorhabditis elegans* copper transport ATPase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62 (6):1258-60.
289. **Yoshiyama, H., Nakamura, H., Kimoto, M., Okita, K., and Nakazawa, T.** (1999) Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *J Gastroenterol* 34 (11):18-23.
290. **Zajic, J. E.** (1969). *Microbial Biogeochemistry*. Academic Press, New York.

7.1. Publikationen dieser Arbeit

7.1.1. Originalarbeiten

- **van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Waidner, B., Davies, B. J., de Vries, N., Penn, C. W., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Kist, M., Bereswill, S., and Kusters, J. G.** (2001) Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect Immun* 69 (8):4891-4897
- **Waidner, B., Greiner, S., Odenbreit, S., Kavermann H., Velayudhan, J., Stähler, F., Guhl, J., Bisse, E., van Vliet, A. H., Andrews, S. C., Kusters, J. G., Kelly, D.J., Haas, R., Kist, M., Bereswill, S.** (2002) Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun* 70:3923-3929
- **Waidner, B., Melchers, K., Ivanov, I., Loferer, H., Bensch, K. W., Kist, M. and Bereswill, S.** (2002) Identification by RNA Profiling and Mutational Analysis of the Copper Resistance Determinants CrdA (HP1326), CrdB (HP1327) and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 184 (23):6700-6708.
- **Ernst, F. Waidner, B., van Vliet, A. H., Kusters, J. G, Kist, M, Bereswill, S.,and G. Homuth.** Characterization of the *Helicobacter pylori* Fur regulon by whole genome analysis (in Vorbereitung)

7.1.2. Posterpräsentationen aus dieser Arbeit:

- **van Vliet, A. H. M., Bereswill, S., Waidner, B., Kuipers, E. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E and Kusters, J. G.** (2000) Fur-mediated nickel-responsive regulation of urease expression in *Helicobacter pylori*. 13th International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter pylori* der EHPSG, 1. - 5. Oktober in Rom, Italien, 47 (1):A17.

- **Waidner, B., van Vliet, A. H. M., Kusters J. G., Kist, M. and Bereswill, S.** (2001) *Helicobacter pylori* urease expression is induced by iron starvation. 11th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms, September 1-5, Freiburg, Germany, Int. J. Med. Microbiol. 291 (31):21.
- **Waidner, B., van Vliet, A. H. M., Kusters J. G., Kist, M. and Bereswill, S.** (2001) The *Helicobacter pylori* ferritin Pfr contributes to virulence, protects against acid-amplified iron toxicity, and is acid-regulated by the Fur protein. Int. J. Med. Microbiol. 11th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms, September 1- 5, Freiburg, Germany, Int. J. Med. Microbiol. 291 (Suppl. 31): 21.
- **Homuth, G., Waidner, B., Ernst, F., van Vliet, A. H. M., Kusters, J. G., Kist, M., Bereswill, S.** (2001) Characterization of the *Helicobacter pylori* Fur regulon by whole genome analysis. 11th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms, September 1-5, Freiburg, Germany, Int. J. Med. Microbiol. 291 (31): 117.

8. Anhang

8.1. Transposon-Shuttle-Vektor pTnMax5

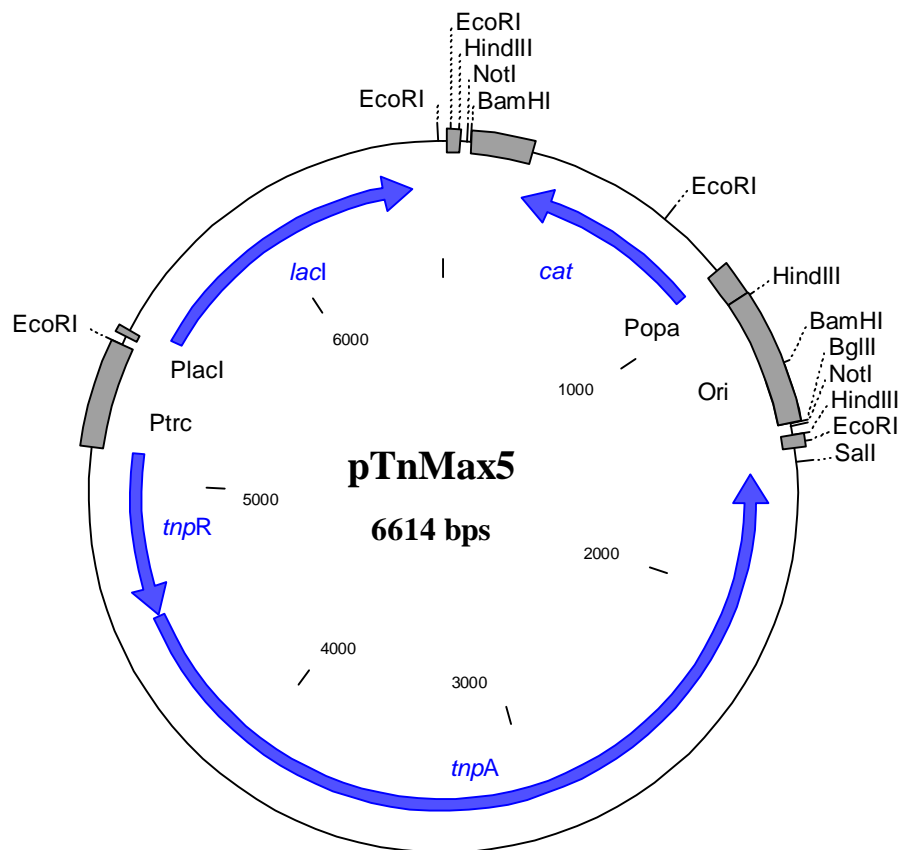


Abb 45.: Schematische Darstellung des Plasmids pTnMax5. Gene sind mit blauen Pfeilen markiert. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind als graue Rechtecke dargestellt. *tnpR*, Gen für die Resolvase; *tnpA*, Gen für die Transposase; *Ptrc*, Promotor für *tnpR* und *tnpA*; *lacI*, *lacI*-Gen; *PlacI*, Promotor für *lacI*; *cat*; gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; Ori, „suicide replication origin“ orifd.

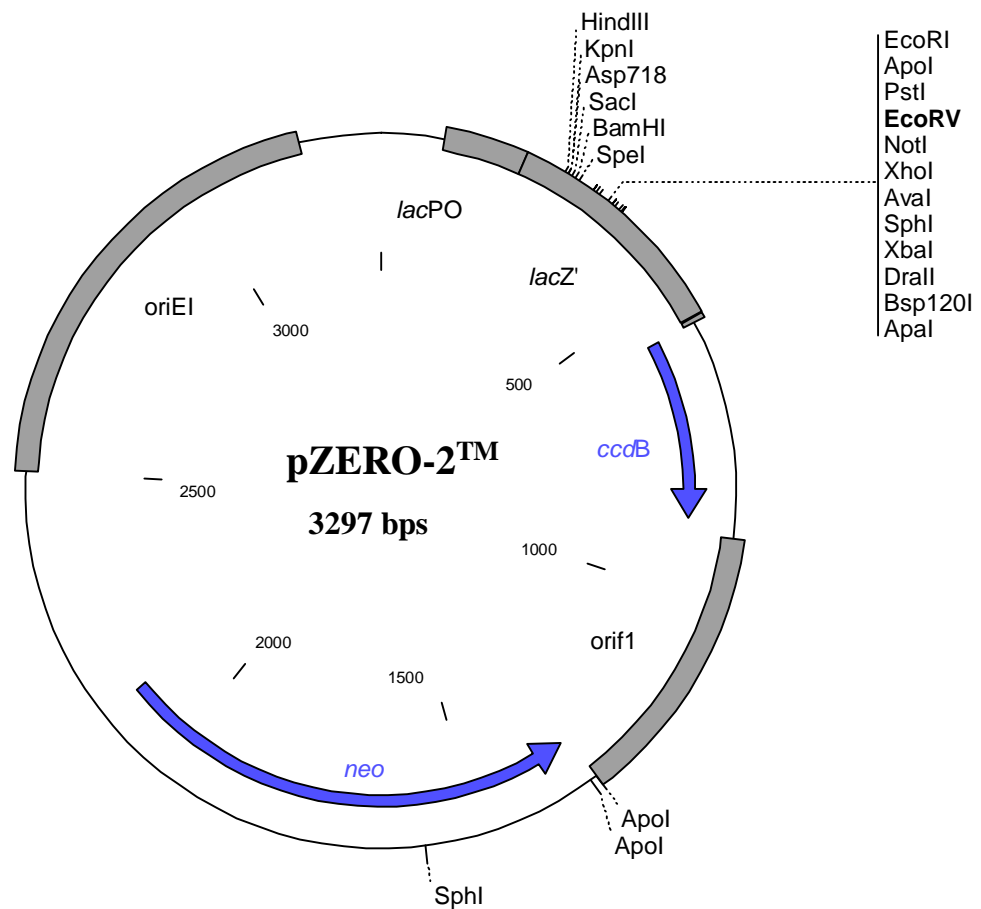
8.2. Klonierungsvektor pZErOTM-2

Abb.46: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pZErOTM-2. Die Restriktionsschnittstelle für das Enzym *EcoRV*, über die die Crossover-PCR-Konstrukte in den Vektor kloniert wurden, ist durch Fettdruck hervorgehoben. Gene sind mit blauen Pfeilen markiert. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind als graue Rechtecke dargestellt. *neo*: Gen für die Neomycin-Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ'*: Teil des *lacZ*-Gens; *oriColE I/oriF1*: Replikationsursprung. Der Vektor stammt aus dem Zero BackgroundTM/Kan Cloning Kit der Firma Invitrogen BV (Groningen, Niederlande).

8.2.1. Vektor pHP1326CAT

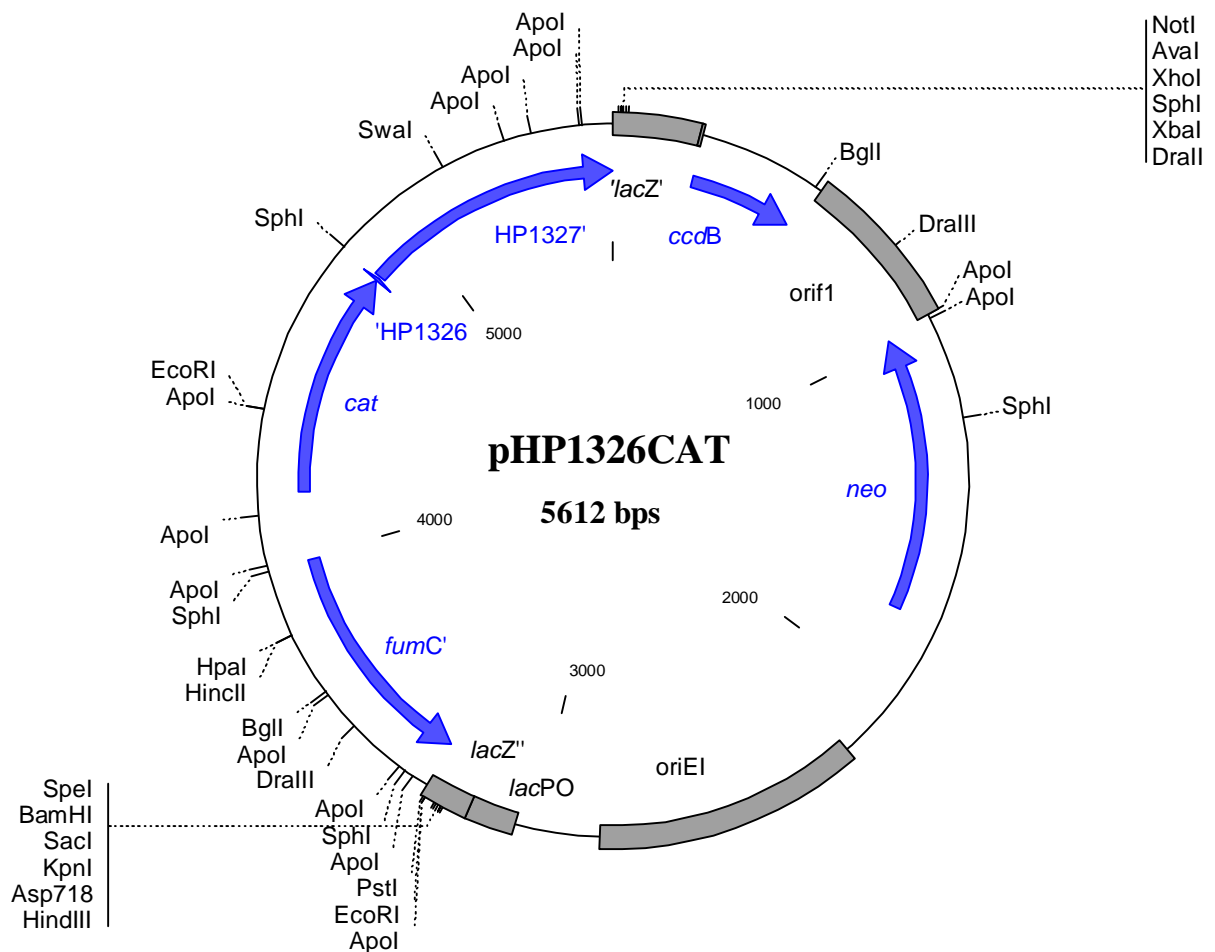


Abb. 47: Schematische Darstellung des Plasmids pHP1326CAT. Der Vektor basiert auf dem Plasmid pZErO™-2, in welchen das 2315 Bp große DNA-Fragment, das das *cat*-Gen von pTnMax5 ohne Promotor inseriert in das HP1326-Gen des *H. pylori* Stammes 26695 enthält, kloniert wurde. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind durch graue Rechtecke gekennzeichnet. *fumC'*, Upstream-Bereich vor dem HP1326-Gens; 'HP1326, Downstream-Bereich des HP1326-Gens; HP1327', Upstream-Bereich des HP1327-Gens; *cat*, Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; *neo*: Gen für die Neomycin-Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ*: Teil des *lacZ*-Gen; *oriColE I*/*orif1*: Replikationsursprung

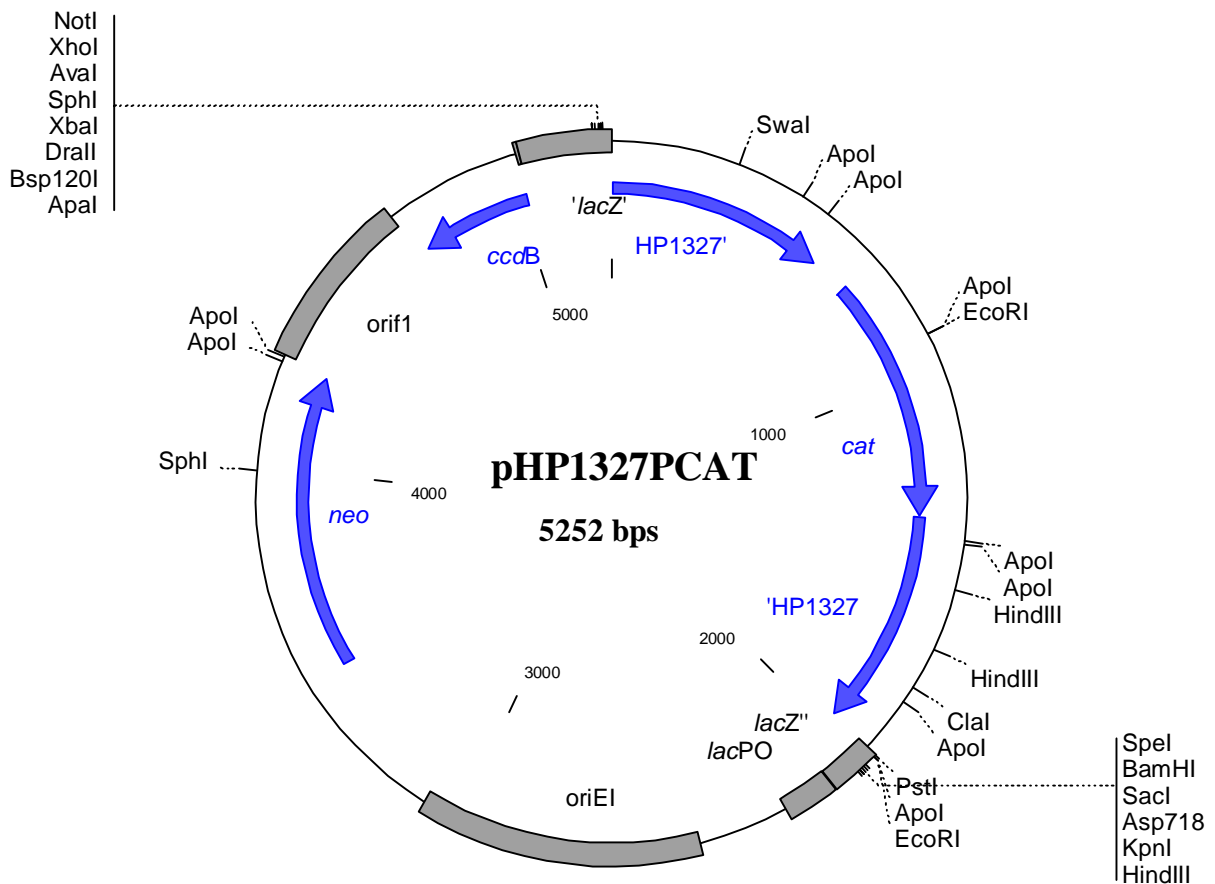
8.2.2. Vektor *pHP1327PCAT*

Abb. 48: Schematische Darstellung des Plasmids *pHP1327PCAT*. Der Vektor basiert auf dem Plasmid *pZerOTM-2*, in welchen das 1955 Bp große DNA-Fragment, das das *cat*-Gen von *pTnMax5* mit Promotor inseriert in das HP1327-Gen des *H. pylori* Stammes 26695 enthält, kloniert wurde. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind durch graue Rechtecken gekennzeichnet. HP1327', Upstream-Bereich des HP1327-Gens; 'HP1327, Downstream-Bereich des HP1327-Gens; *cat*, Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; *neo*: Gen für die Neomycin-Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ*: Teil des *lacZ*-Gen; *oriColE I/oriF1*: Replikationsursprung

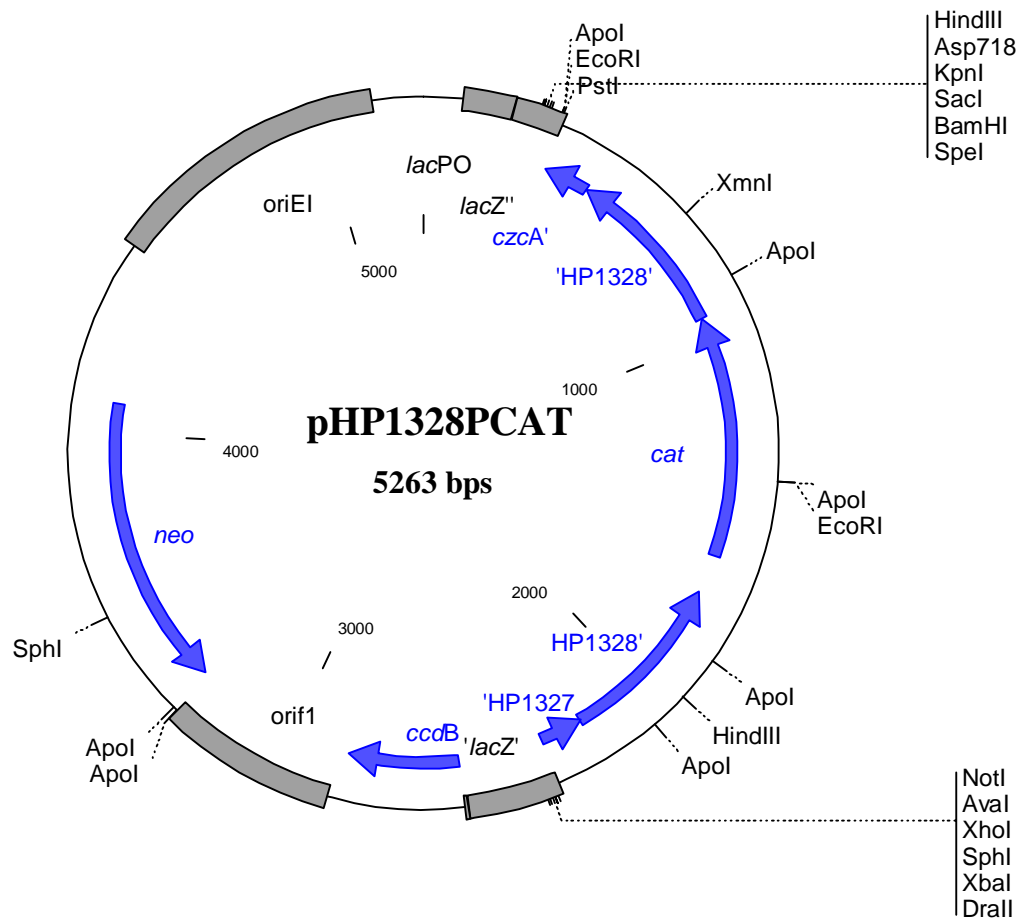
8.2.3. Vektor *pHP1328PCAT*

Abb. 49: Schematische Darstellung des Plasmids *pHP1328PCAT*. Der Vektor basiert auf dem Plasmid *pZerO™-2*, in welchen das 1966 Bp große DNA-Fragment, das das *cat*-Gen von *pTnMax5* mit Promotor inseriert in das *HP1328*-Gen des *H. pylori* Stammes 26695 enthält, kloniert wurde. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind durch graue Rechtecke gekennzeichnet. *'HP1327*, Downstream-Bereich des *HP1327*-Gens; *HP1328'*, Upstream-Bereich des *HP1328*-Gens; *'HP1328*, Downstream-Bereich des *HP1328*-Gens; *czaA'*, Upstream-Bereich des *CzcA*-Homologs *HP1329*; *cat*, Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; *neo*: Gen für die Neomycin-Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ*: Teil des *lacZ*-Gen; *oriColE I/orif1*: Replikationsursprung

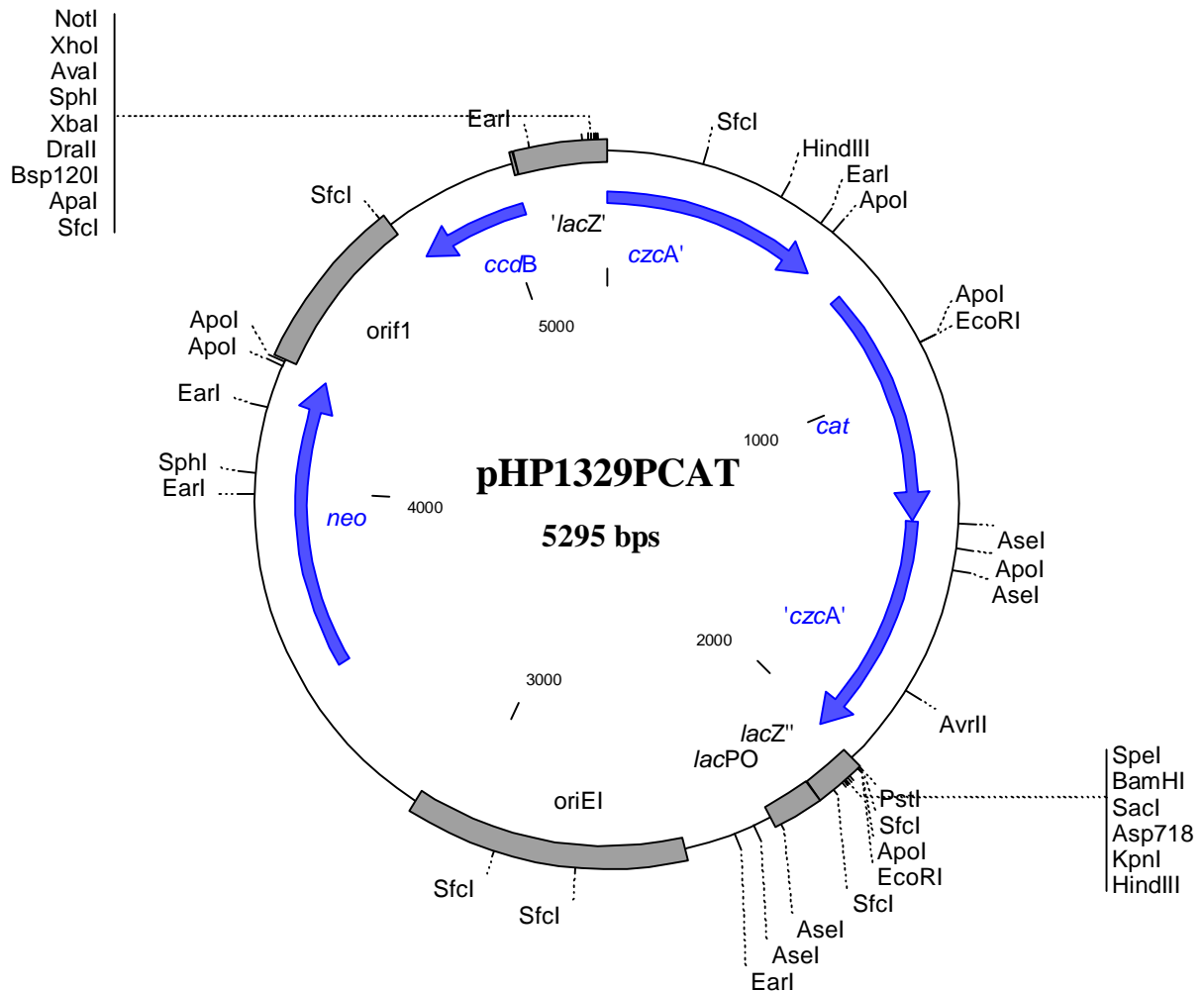
8.2.4. Vektor *pHP1329PCAT*

Abb. 50: Schematische Darstellung des Plasmids *pHP1329PCAT*. Der Vektor basiert auf dem Plasmid *pZErO™-2*, in welchem das 1998 Bp große DNA-Fragment, das das *cat*-Gen von *pTnMax5* mit Promotor inseriert in das HP1329-Gen des *H. pylori* Stammes 26695 enthält, kloniert wurde. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind durch graue Rechtecke gekennzeichnet. *czcA'* Upstream-Bereich des CzcA-Homologs HP1329; *'czcA'* Downstream-Anteil des HP1329-Gen; *cat*, Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; *neo*: Gen für die Neomycin- Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ''*: Teil des *lacZ*-Gen; *oriColE I/orif1*: Replikationsursprung

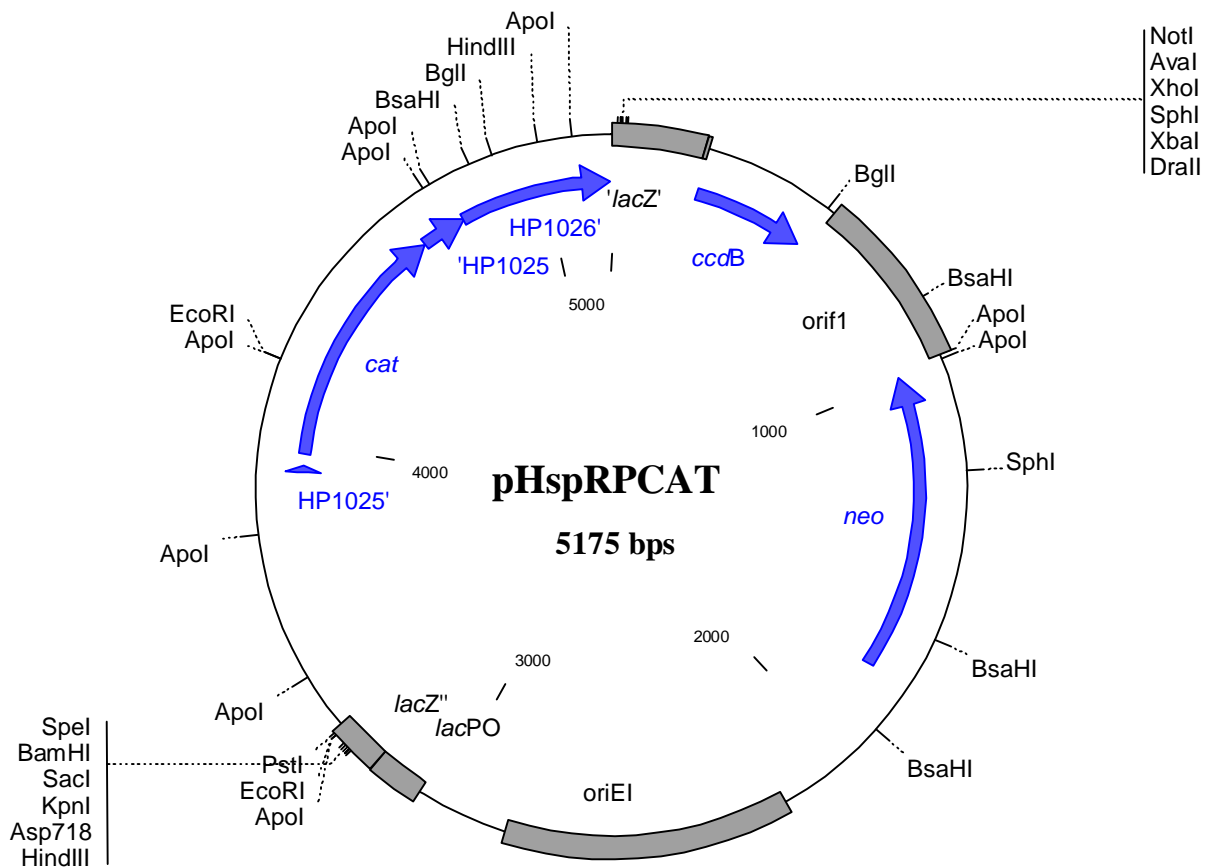
8.2.5. Vektor *pHspRPCAT*

Abb. 51: Schematische Darstellung des Plasmids *pHspRPCAT*. Der Vektor basiert auf dem Plasmid *pZErOTM-2*, in welchem das 1878 Bp große DNA-Fragment, das das *cat*-Gen von *pTnMax5* mit Promotor inseriert in das *hspR*-Gen des *H. pylori* Stammes 26695 enthält, kloniert wurde. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind durch graue Rechtecke gekennzeichnet. HP1025' Upstream-Bereich des *hspR*-Gens; 'HP1025 Downstream-Bereich des *hspR*-Gens; HP1026', Upstream-Bereich des folgenden HP1026-Gens; *cat*, Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; *neo*: Gen für die Neomycin- Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ*: Teil des *lacZ*-Gen; *oriColE I*/*orif1*: Replikationsursprung

8.2.6. Vektor pHP1364PCAT

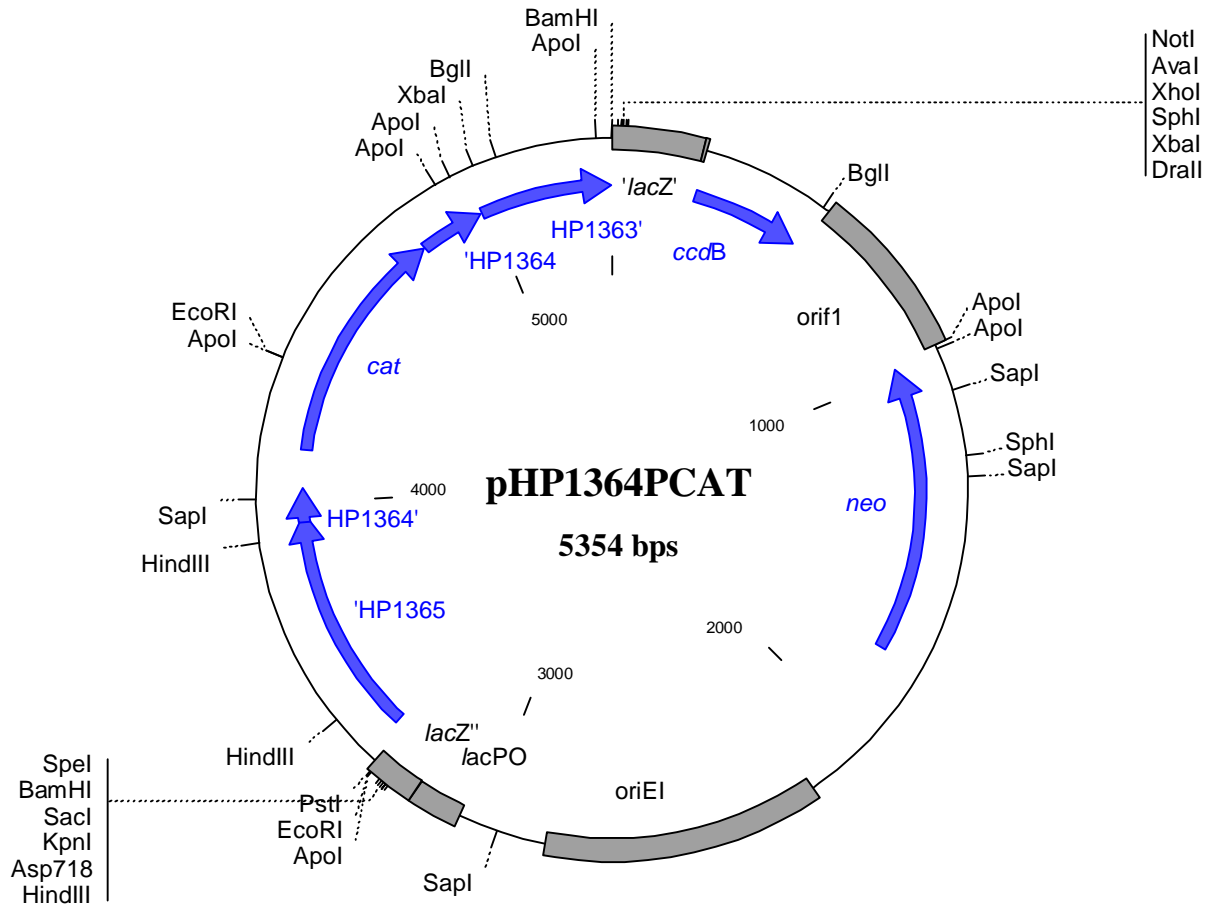


Abb. 52: Schematische Darstellung des Plasmids pHP1364PCAT. Der Vektor basiert auf dem Plasmid pZerO™-2, in welchen das 2057 Bp große DNA-Fragment, das das *cat*-Gen von pTnMax5 mit Promotor inseriert in das HP1364-Gen des *H. pylori* Stammes 26695 enthält, kloniert wurde. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind durch graue Rechtecke gekennzeichnet. 'HP1365, Downstream-Bereich des HP1365-Gens; HP1364' Upstream-Bereich des HP1364-Gens; 'HP1364 Downstream-Bereich des HP1364-Gens; HP1363', Upstream-Bereich des folgenden HP1363-Gens; *cat*, Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; *neo*: Gen für die Neomycin-Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ*: Teil des *lacZ*-Gen; *oriE1*/orif1: Replikationsursprung

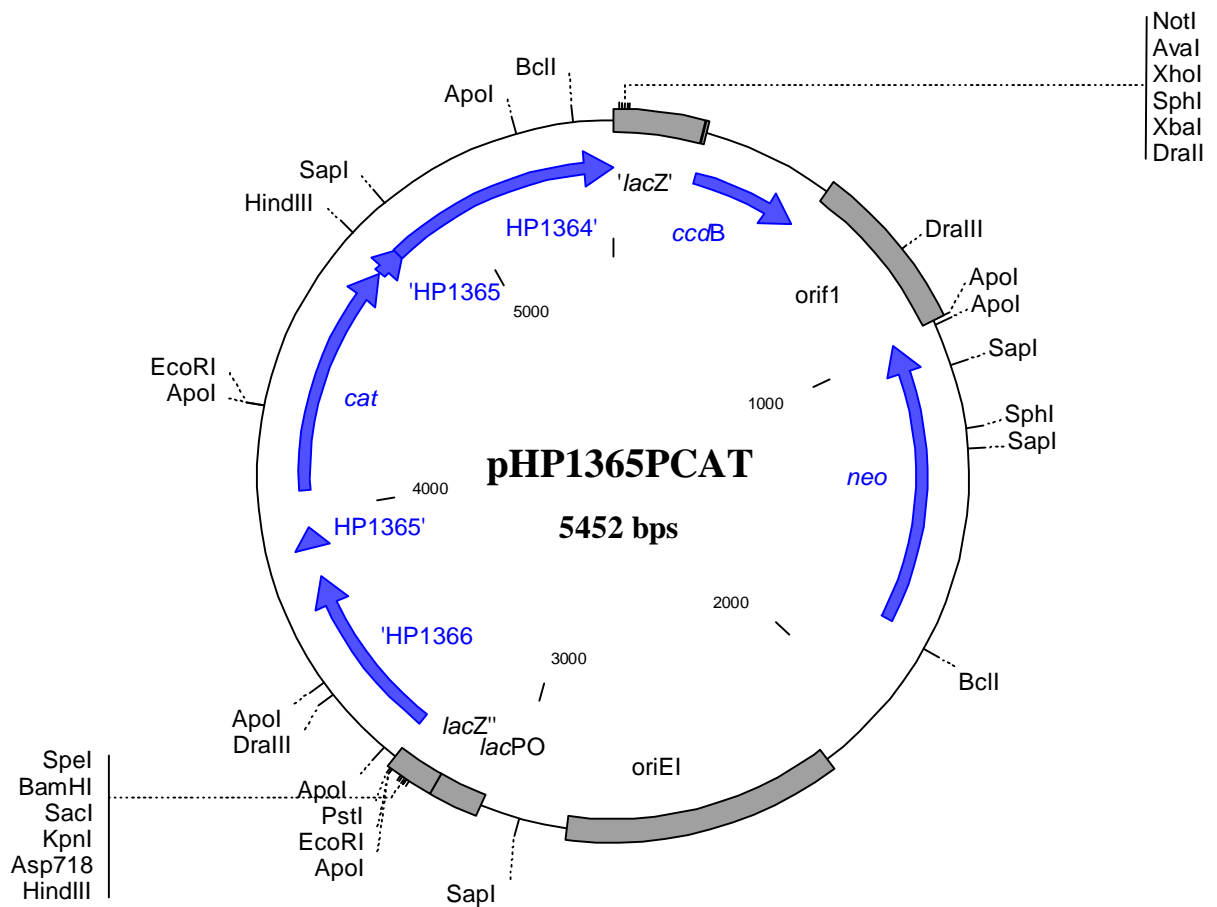
8.2.7. Vektor *pHP1365PCAT*

Abb. 53: Schematische Darstellung des Plasmids *pHP1365PCAT*. Der Vektor basiert auf dem Plasmid *pZErO*TM-2, in welchen das 2155 Bp große DNA-Fragment, das das *cat*-Gen von *pTnMax5* mit Promotor inseriert in das HP1365-Gen des *H. pylori* Stammes 26695 enthält, kloniert wurde. Gene sind als blaue Pfeile dargestellt. Genfragmente oder der Replikationsursprung sind durch graue Rechtecken gekennzeichnet. 'HP1366, Downstream-Bereich des HP1366-Gens; HP1365' Upstream-Bereich des HP1365-Gens; 'HP1365' Downstream-Bereich des HP1365-Gens; HP1364', Upstream-Bereich des folgenden HP1364-Gens; *cat*, Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase; *neo*: Gen für die Neomycin-Phosphotransferase; *ccdB*: Lethales Gen; *lacPO*: Promotor/Operator-Region des *lacZ*-Gens; *lacZ*: Teil des *lacZ*-Gen; *oriE1*/*ori1*: Replikationsursprung

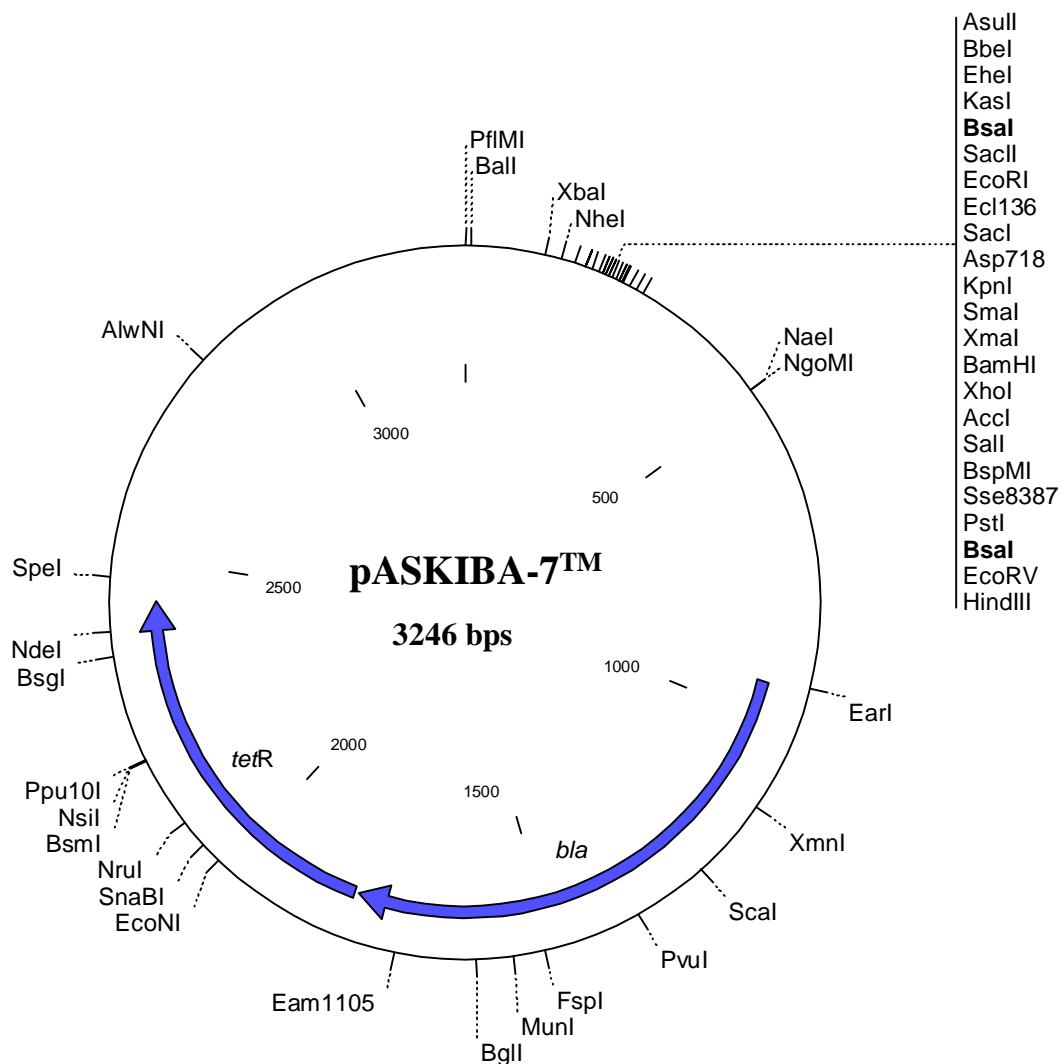
8.3. Expressionsvektor pASKIBA-7TM

Abb. 54: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASKIBA-7TM. Die Restriktionsschnittstellen für das Enzym *BsaI*, über die die PCR-Amplifikate in den Vektor kloniert wurden, sind durch Fettdruck hervorgehoben. Gene sind mit blauen Pfeilen markiert. Die Transkription wurde bei diesem Vektor mittels eines *tetA*-Promoters /Operators gesteuert. *tetR*, Gen für den Tetrazyklin-Repressor; *bla*, Gen für die Beta-Lactamase, welche Ampicillin-Resistenz vermittelt.

8.3.1. Vektor pASK7-FUR

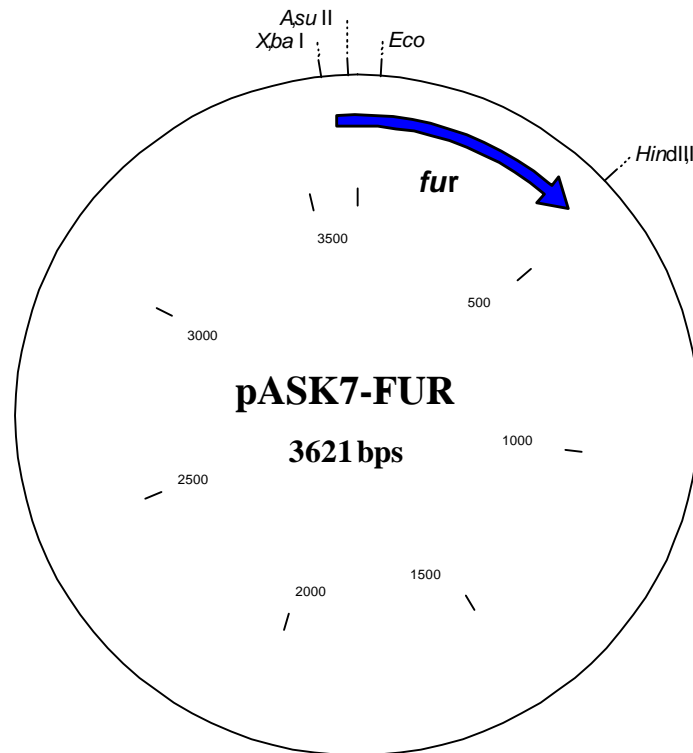


Abb. 55: Schematische Darstellung des Plasmids pASK7-Fur. In den Vektor pASKIBA-7TM wurde ein 375 Bp großes DNA-Fragment kloniert, das das *fur*-Gen des *H. pylori*-Stammes NCTC 11638 beinhaltet (als blauer Pfeil markiert). Die Transkription wurde bei diesem Vektor mittels eines *tetA*-Promoters /Operators gesteuert. Zur Lage des Tetrazyklinrepressors und des Gens für die Beta-Lactamase, welches die Ampicillin-Resistenz vermittelt, siehe 8.3.

8.4. Expressionsvektor pASKIBA-3TM

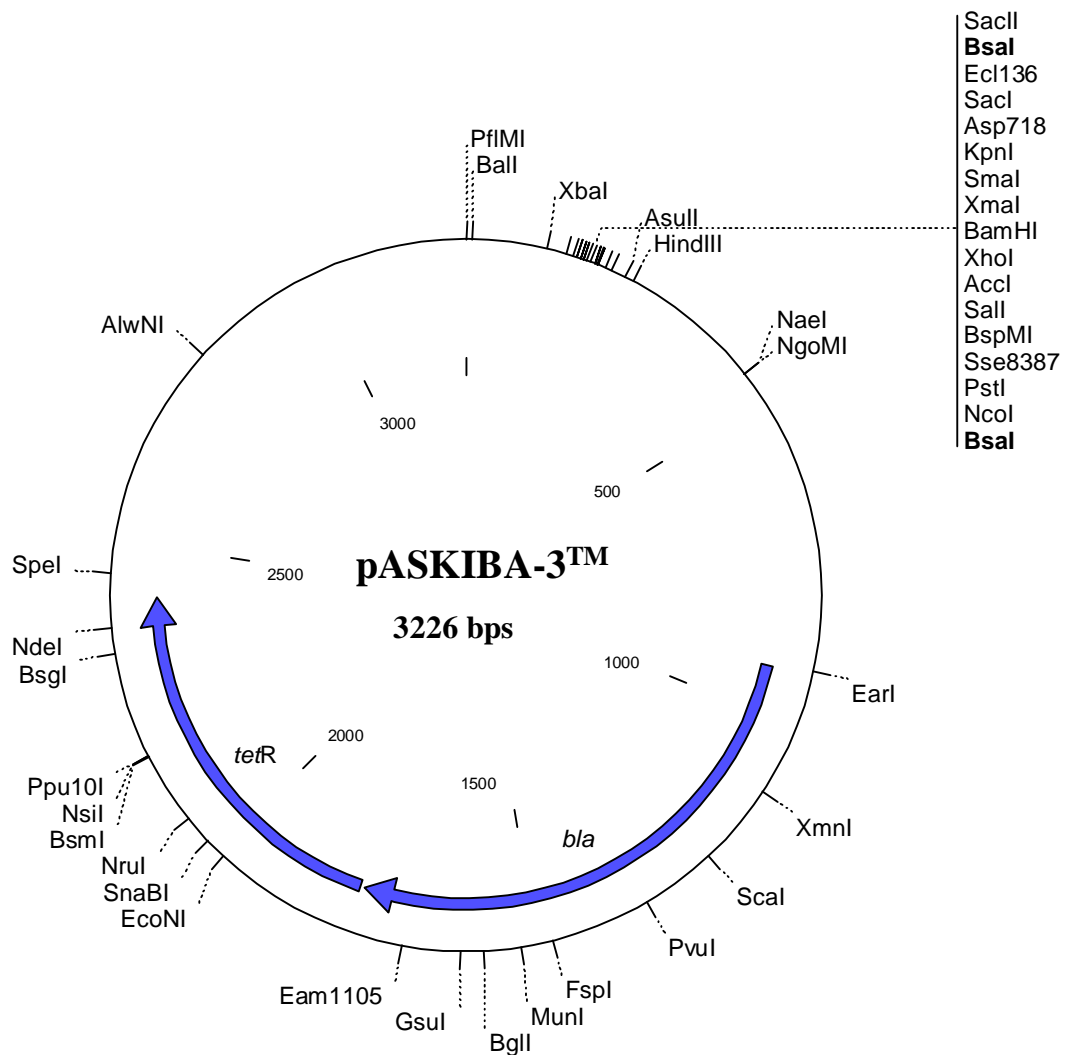


Abb. 56: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASKIBA-3TM. Die Restriktionsschnittstellen für das Enzym *BsaI*, über die die PCR-Amplifikate in den Vektor kloniert wurden, sind durch Fettdruck hervorgehoben. Gene sind mit blauen Pfeilen markiert. Die Transkription wurde bei diesem Vektor mittels eines *tetA*-Promoters /Operators gesteuert. *tetR*, Gen für den Tetrazyklin-Repressor; *bla*, Gen für die Beta-Lactamase, welche Ampicillin-Resistenz vermittelt.

8.4.1. Vektor pASK3-1326

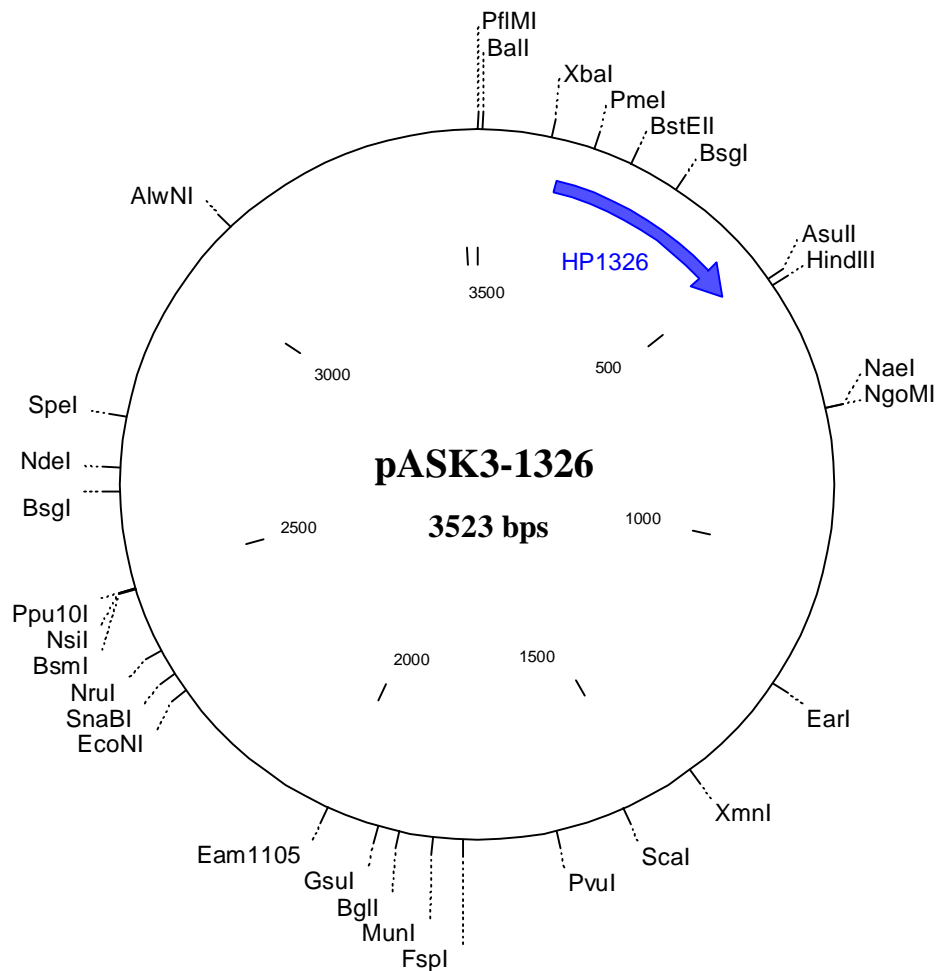


Abb. 57: Schematische Darstellung des Plasmids pASK3-1326. In den Vektor pASKIBA-3™ wurde ein 377 Bp großes DNA-Fragment kloniert, das das HP1326-Gen des *H. pylori*-Stammes 26695 beinhaltet (als blauer Pfeil markiert). Die Transkription wurde bei diesem Vektor mittels eines *tetA*-Promoters /Operators gesteuert. Zur Lage des Tetrazyklinrepressors und des Gens für die Beta-Lactamase, welches die Ampicillin-Resistenz vermittelt, siehe 8.4.

8.4.2. Vektor pASK3-1327

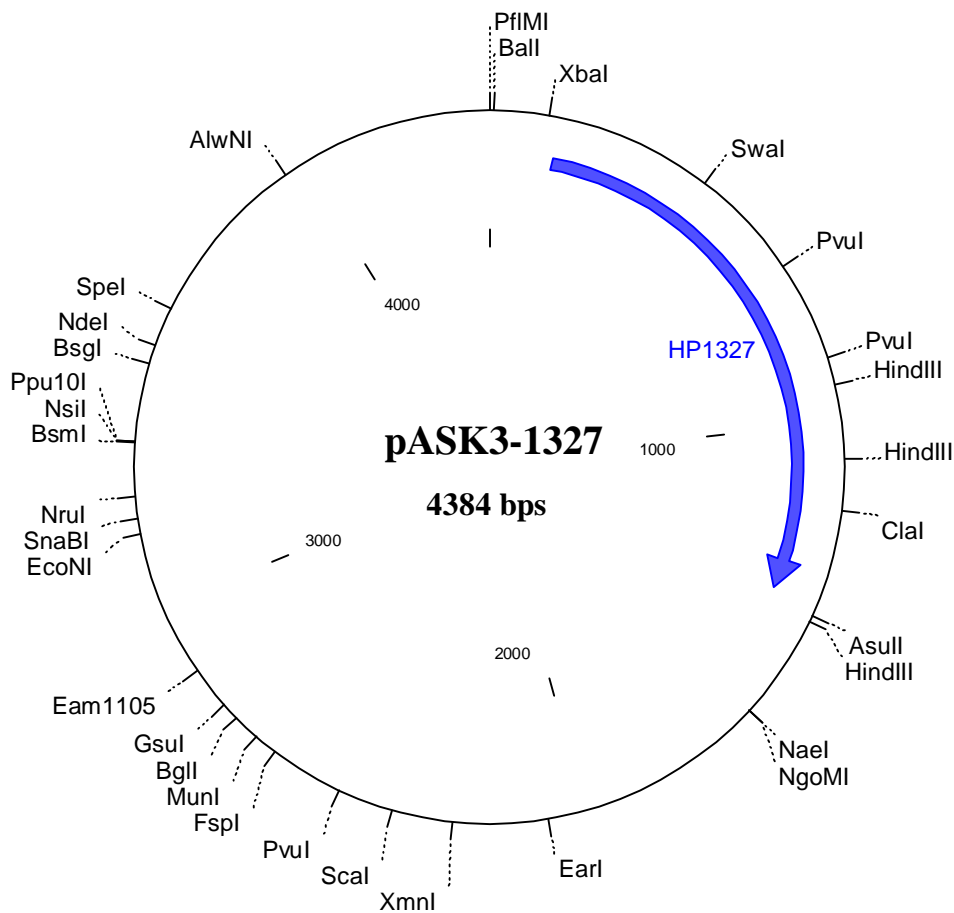


Abb. 58: Schematische Darstellung des Plasmids pASK3-1327. In den Vektor pASKIBA-3™ wurde ein 1238 Bp großes DNA-Fragment kloniert, das das HP1327-Gen des *H. pylori*-Stammes 26695 beinhaltet (als blauer Pfeil markiert). Die Transkription wurde bei diesem Vektor mittels eines *tetA*-Promoters /Operators gesteuert. Zur Lage des Tetrazyklinrepressors und des Gens für die Beta-Lactamase, welches die Ampicillin-Resistenz vermittelt, siehe 8.4.

8.4.3. Vektor pASK3-1328

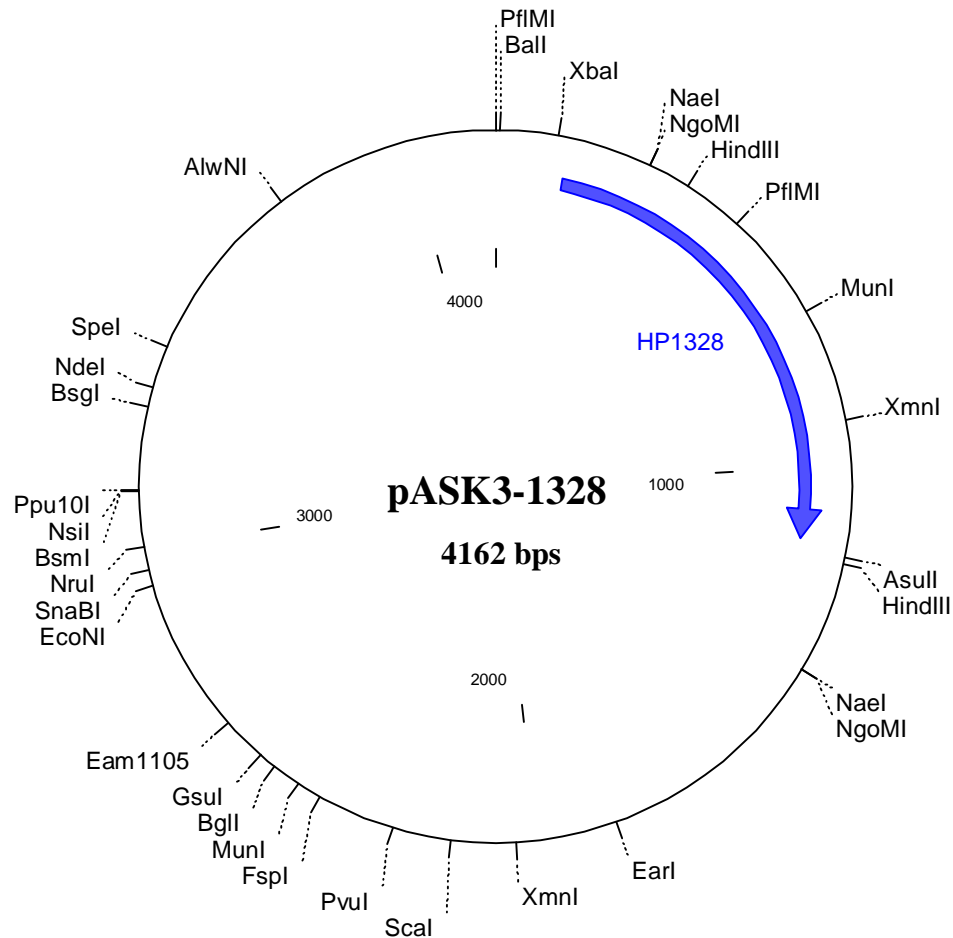


Abb. 59: Schematische Darstellung des Plasmids pASK3-1328. In den Vektor pASKIBA-3™ wurde ein 1016 Bp großes DNA-Fragment kloniert, das das HP1328-Gen des *H. pylori*-Stammes 26695 beinhaltet (als blauer Pfeil markiert). Die Transkription wurde bei diesem Vektor mittels eines *tetA*-Promoters /Operators gesteuert. Zur Lage des Tetrazyklinrepressors und des Gens für die Beta-Lactamase, welches die Ampicillin-Resistenz vermittelt, siehe 8.4.

8.4.4. Vektor pASK3-1365

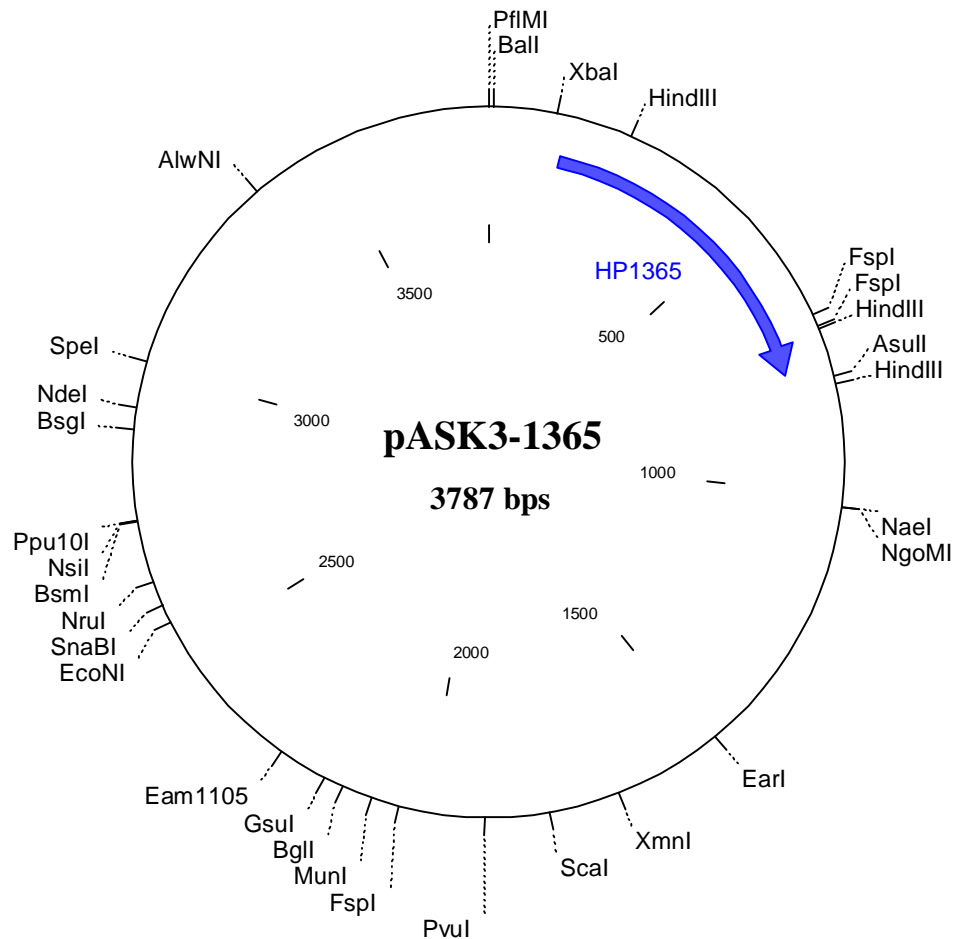


Abb. 60: Schematische Darstellung des Plasmids pASK3-1365. In den Vektor pASKIBA-3™ wurde ein 641 Bp großes DNA-Fragment kloniert, das das HP1365-Gen des *H. pylori*-Stammes 26695 beinhaltet (als blauer Pfeil markiert). Die Transkription wurde bei diesem Vektor mittels eines *tetA*-Promoters /Operators gesteuert. Zur Lage des Tetrazyklinrepressors und des Gens für die Beta-Lactamase, welches die Ampicillin-Resistenz vermittelt, siehe 8.4.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde ab März 2000 in der Abteilung Bakteriologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg i. Br. durchgeführt. Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich hiermit herzlich danken möchte.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. G. Zumft für die Ermöglichung dieser externen Dissertation und die wissenschaftliche Betreuung in Karlsruhe.

Ein besonderer Dank gebührt auch Herrn PD. Dr. rer. nat. S. Bereswill für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas. Ich danke ihm für die sehr gute Betreuung während der gesamten Arbeit, für die stetige Motivation durch zahlreiche Anregungen, nächtelanger Gespräche und die Ermöglichung die Ergebnisse meiner Arbeit auf einigen wissenschaftlichen Kongressen und Tagungen vorzustellen.

Herrn Prof. Dr. med. M. Kist danke ich für die Förderung dieser Dissertation. Er zeigte stets reges Interesse an meiner Arbeit. Über die Arbeit hinaus brachten die Wanderungen, Feste und Unterhaltungen mit ihm immer neue Motivation und Anregungen. Die zahlreichen von ihm eingeladenen ausländischen Gäste ließen den Laboralltag zudem nie langweilig werden. Was wäre die Arbeit ohne Spaß, und Spaß hat es meistens gemacht: Ganz besonderer Dank gilt daher meinen Mitstreitern im täglichen Labor-Chaos Dipl.-Biol Frank Stähler, Tanja Tanbouze und Karin Oberle. Allen von mir betreuten med. Doktoranden möchte ich für die vielen Fragen danken, mit denen sie mich genervt haben und die mich über viele Dinge haben neu nachdenken lassen. Nicht zuletzt allen Labormitgliedern für die gute Stimmung im Labor.

Des Weiteren danke ich allen Kooperationspartnern in Rotterdam, Greifswald, München und Konstanz für die gute Zusammenarbeit, die diese Arbeit deutlich unterstützt hat. Insbesondere Arnoud van Vliet möchte ich für die anstrengenden Diskussionen während zahlreicher Besuche und auf Kongressen danken. Florian Ernst und Dr. rer. nat. Georg Homuth ließen mich zudem in Greifswald während meines Forschungsaufenthaltes heimisch fühlen.

Arne Dieck danke ich für die liebevolle Unterstützung, insbesondere in der letzten Zeit. Und abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die nie in so einer Danksagung stehen wollten.