

# 1. ABSTRACT

## „Morphologic, genetic and biochemical characterisation of novel *Helicobacter* isolates from laboratory mice and tigers"

Since the first description of the *Helicobacter* genus, the human-specific pathogen *Helicobacter pylori*, a highly adapted and long co-evolved gastric bacterium, multiple disciplinary fields have been opened for researchers around the world. Most of the *Helicobacter* species encompassed within this genus diversified significantly during evolution to be classified in different taxa, and not only as inhabitants of the human stomach mucosa but also from lower intestines and hepatobiliary pathways including non human primates, domestic and wild animals. Currently these bacteria are classified in gastric *Helicobacter* species (GHS) and enterohepatic *Helicobacter* species (EHS), in accordance to the particular colonizing niche and the evolutionary process resulting from longtime selection. EHS presence is worldwide reported in mouse colonies kept at Specific Pathogen Free (SPF) facilities, where these infections often remain unrecognized but can cause severe health complications or more subtle host immune perturbations and therefore can confound the results of animal experiments.

In the first part of the present doctoral thesis a new EHS, *Helicobacter magdeburgensis*, has been characterized from SPF mice. Biochemical analysis of enzyme activities (API campy), morphologic investigation (Gram-staining and electron microscopy) and genetic analyses (16SrRNA and 23SrRNA analyses, DNA fingerprinting, restriction fragment polymorphisms, and pulsed-field gel electrophoresis) revealed a spiral-shaped bacterium with lengths of 2.5–6 µm and containing a single monopolar or single bipolar sheathed flagella. The bacteria were growing under anaerobic conditions, preferably on agar plates supplemented with serum or blood. 16S rRNA sequence analysis placed this yet unknown bacterium in the *Helicobacter* genera, and based on the pattern produced by two restriction enzymes, *Bam*III and *Ksp*I, the genome size was determined to be about 1.7–1.8 Mbp. Finally a PCR assay was developed and can be used to detect and discriminate *H. magdeburgensis* from other *Helicobacter* species.

In the second part of the thesis, I characterized some novel *Helicobacter* isolates from a Bengal tiger. The closest relative of *H. pylori* is *H. acinonychis*, a little characterized species which can be specifically isolated from big felines including cheetahs, lions, and tigers. A species jump from humans to big predator cats has been proposed a few hundred thousand years ago. In concordance, *H. acinonychis* strain Sheeba strain possesses an unusual large number of highly fragmented genes many of them coding outer membrane proteins (OMPs) which may have been inactivated upon host adaptation in order to circumvent deleterious responses from the feline host immune system. Here, I isolated *Helicobacter* spp of a tiger from a zoo in Thailand. Morphological investigation (Gram-staining and electron microscopy) and genetic studies (16SrRNA and 23SrRNA analyses, DNA fingerprinting and restriction fragment polymorphisms) as well as Western blotting were used to characterize the isolated *Helicobacter* spp. Scanning and transmission electron microscopy revealed the presence of spiral-shaped bacteria, varying in length from 2.5 to 6µm and contained up to four monopolar sheathed flagella. The *Helicobacter* spp. were grown under microaerophilic conditions, with best results obtained on Columbia or GC agar plates containing serum or blood. The 16SrRNA, 23SrRNA, genetic and protein expression analyses indicated the identification of a novel *H. acinonychis* isolate closely related to *H. pylori*. I also demonstrated by immunoblotting that the tiger isolates express UreaseA/B, flagellin A, adhesin BabA, neutrophil-activating protein NapA, protease HtrA,  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase GGT, lytic transglycosylase Slt and two DNA transfer relaxase orthologs as known from *H. pylori*, but are negative for the expression of *cag*PAI, CagA, VacA, SabA, DupA and OipA proteins. These results give fresh insights into *H. acinonychis* genetics and the expression of potential pathogenicity-associated factors and their possible pathophysiological relevance in related gastric infections.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG

### „Morphologische, genetische und biochemische Charakterisierung von neuen *Helicobacter* Isolaten aus Labormäusen und Tigern“

Seit der Erstbeschreibung von hoch-adaptiven, human-spezifischen *Helicobacter pylori* entwickelten sich eine Reihe von Forschungsgebieten zur Untersuchung dieses bedeutenden Pathogens. Die meisten *Helicobacter* ssp. (Subspezies) in diesem Genus haben sich während der Evolution signifikant in verschiedenen Taxa spezialisiert und kolonisieren nicht nur den humanen Magen sondern auch andere Organe in nicht-humanen Primaten, sowie Nutz- und Wildtieren. Heute sind diese Gram-negativen Bakterien klassifiziert nach ihrem Vorkommen in zwei grosse Gruppen, gastrische *Helicobacter* Spezies (GHS) und enterohepatische *Helicobacter* Spezies (EHS). Die Präsenz von EHS in Mauskolonien wird sehr häufig in der Literatur berichtet, sogar in Versuchstierkolonien der Kategorie „*specific pathogen free animals* (SPF)“, so wie in unserem Fall, wo diese Infektionen oft unentdeckt bleiben. Allerdings können derartige Infektionen auch mit erheblichen gesundheitlichen Problemen einhergehen und die Ergebnisse von Tierversuchen erheblich beeinflussen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine bisher unbekannte Spezies, *Helicobacter magdeburgensis*, aus infizierten SPF-Labormäusen in einem Tierlabor am Uniklinikum Magdeburg isoliert. Biochemische Analysen von bestimmten Enzymaktivitäten (API-Campy), morphologische Untersuchungen (Gram-Färbung und Elektronenmikroskopie) und genetische Analysen (16SrRNA und 23SrRNA Sequenzierung, DNS-Fingerprinting, RFLP und Pulsfeldgelelektrophorese) zeigten das Vorhandensein von spiral-förmigen Bakterien von etwa 2.5–6 µm Länge mit einzelnen monopolaren oder bipolaren Flagellen. Die Bakterien konnten unter anaerobischen Bedingungen angezogen werden. Die 16S rRNA-Analyse gruppierte das unbekannte Bakterium in den Genus *Helicobacter*. Die Genomgröße wurde in der Pulsfeldgelelektrophorese mittels der Restriktionsenzyme *Bam*III und *Ksp*I bestimmt und beträgt 1.7–1.8 Mbp. Ein spezifischer PCR-Assay wurde ebenfalls entwickelt, der zwischen *H. magdeburgensis* und anderen *Helicobacter* ssp. unterscheiden kann. Dieser Assay ist somit anwendbar, um schnell und zuverlässig Infektionen von SPF-Labormäusen nachzuweisen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit habe ich einige neue *Helicobacter* Stämme aus einem Bengalischen Tiger isoliert und charakterisiert. Der nächste bakterielle Verwandte von *H. pylori* ist *Helicobacter acinonychis*, eine wenig untersuchte Spezies, die man vornehmlich in Grosskatzen wie Löwen und Tigern antrifft. Aufgrund von genetischen Analysen wurde postuliert, dass sich *H. acinonychis* ursprünglich aus *H. pylori* weiterentwickelten, die den Wirt vor einigen hunderttausend Jahren wechselten. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese besitzt *H. acinonychis* viele hochfragmentierte Gene von äusseren Membranproteinen (OMPs), die offenbar während der Anpassung an seinen neuen Wirt inaktiviert wurden, z.B. um das Immunsystem der Grosskatzen zu umgehen. Ich habe in dieser Arbeit mehrere neue *H. acinonychis* Stämme aus einem Tiger in einem Zoo in Thailand isoliert. Morphologische Untersuchungen (Gram-Färbung und Elektronenmikroskopie), genetische Analysen (16SrRNA und 23SrRNA Sequenzierung, DNS-Fingerprinting, RFLP und Pulsfeldgelelektrophorese) und Westernblotuntersuchungen wurden angewandt, um diese Bakterien zu charakterisieren. Hochauflösende Laserelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie zeigten das Vorhandensein von spiral-förmigen Bakterien von etwa 2.5–6 µm Länge, häufig mit vier monopolaren Flagellen. Die neuen Isolate wurden unter mikroaerophilen Bedingungen angezogen, bevorzugt auf Columbia- oder GC-Agar-Platten, die Blut oder Serum enthalten. Die 16SrRNA, 23SrRNA, genetische und Proteinexpressionsanalysen zeigten, dass unsere *H. acinonychis* Isolate eng mit *H. pylori* verwandt sind. Untersuchungen zur Expression von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren mittels Westernblot zeigten, dass bestimmte Proteine wie UreaseA/B, Flagellin A, Adhesin BabA, Neutrophil-aktivierendes Protein NapA, Protease HtrA,  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase GGT, lytische Transglycosylase Slt und zwei DNA-Transfer Relaxasen in *H. acinonychis* exprimiert sind. Dagegen scheinen andere bekannte Virulenzfaktoren wie die *cag* Pathogenitätsinsel, CagA, VacA, SabA, DupA und OipA Proteine zu fehlen. Diese Ergebnisse geben somit ebenfalls wichtige neue Hinweise für das Pathogenitätspotential dieser *Helicobacter* ssp. mit hoher Relevanz für gastrische Infektionen.

MSc. Rivas Traverso, Francisco