

**SCHLUSSBERICHT für das Vorhaben:
HELDIVNET - Parasite and host genetic diversity in *Helicobacter* infections
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sebastian Suerbaum (MHH)
WP2 – *H. pylori* genome evolution during chronic infection (WP-Leitung)
Beteiligung an WP1 und WP3**

Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2007 - 31.12.2010

I. Wissenschaftlicher Stand zu Projektbeginn.

Helicobacter pylori ist ein pathogenes Bakterium, das die Magenschleimhaut von mehr als der Hälfte der Weltbevölkerung kolonisiert und bei ~ 15% der Infizierten Folgeerkrankungen wie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre und bösartige Tumore des Magens (Magenadenokarzinom, malignes MALT-Lymphom des Magens) auslöst (Review: Suerbaum & Michetti, N. Engl. J. Med. 2001). Die Populationsstruktur von *H. pylori* wurde mit Hilfe der Multilocus-Sequenz-Haplotypanalyse analysiert und ergab, dass *H. pylori* genetisch vielfältiger ist als viele andere Bakterien, da Stämme mit identischen Sequenzen aus unverwandten Patienten nur selten zu finden sind (Review: Suerbaum & Josenhans, Nat. Rev. Microbiol. 2007). Die Infektion des Menschen mit *H. pylori* ist sehr alt, unsere Vorfahren waren bereits mit diesen Bakterien infiziert, als sie vor etwa 60.000 Jahren von Afrika aus die Welt besiedelten. Die darauf folgende geographische Trennung der unterschiedlichen menschlichen Gruppen resultierte auch in Trennung der Bakterien, und wie auch die Menschen, sammelten die Bakterien Mutationen an, von denen manche erhalten blieben und andere nicht. Das resultierte in mehreren Populationen des Bakteriums, die sich genetisch voneinander unterscheiden lassen. So sind die Menschen in Afrika mit Bakterien der Populationen hpNEAfrica, hpAfrica1 und hpAfrica2 infiziert, Europäer mit hpEurope und Asiaten mit hpAsia2 und hpEastAsia. HpEastAsia besteht aus drei Teilpopulationen, die für Ostasiaten (hspEAsia), für Amerikanische Ureinwohner (hspAmerind) und für Bewohner der pazifischen Inselwelt (hspMaori) charakteristisch sind. Darüber hinaus scheinen Isolate von Australischen Aboriginals eine weitere Population zu bilden. Die geographische Verteilung der *H. pylori* Populationen spiegelt verschiedene prähistorische humane Migrationen wider, z. B. die Besiedlung von Amerika über die Beringstrasse vor etwa 19.000 Jahren, die Polynesische Expansion und die Wanderungen der Bantuvölker in Afrika. Beispiele für Migrationen in jüngerer Vergangenheit sind die koloniale Expansion, durch die Europäische Bakterien in alle Welt verbreitet wurden und der Sklavenhandel, der sich im häufigen Nachweis von hpAfrica1 Bakterien in Nord- und Südamerika widerspiegelt.

Neben dem Nachweis der genetischen Diversität von *H. pylori* auf Populationsebene (d. h. durch Analysen an *H. pylori*-Stämmen von verschiedenen Individuen) haben wir uns ebenfalls intensiv mit den genetischen Veränderungen von *H. pylori* während der chronischen Infektion beschäftigt, die im Zentrum des WP2 stehen. Wir hatten in früheren Arbeiten – ebenfalls auf der Basis von auf wenige Genfragmente limitierten Multilocussequenzanalysen zeigen können, dass sich *H. pylori* während der chronischen Infektion durch Mutation und Rekombination verändert. WP2 verfolgte das Ziel, die zu Beginn des Projekts neu verfügbare Next-Generation-Sequencing Technologie der massiv parallelen Pyrosequenzierung (454-Sequenzierung) einzusetzen, um diese Vorgänge auf Gesamtgenomebene zu untersuchen. Weiterhin bestand eine intensive Einbindung in die WPs 1 und 3, die beide ebenfalls zu wichtigen Ergebnissen und hochrangigen Publikationen geführt haben.

II. Aufgabenstellung.

Zentrale Aufgabe von WP2 war es, zu untersuchen, wie sich das *H. pylori*-Genom während der chronischen Infektion verändert und wie diese Veränderungen zu der Fähigkeit von *H. pylori* beitragen, lebenslange chronische Infektionen hervorzurufen. Diese Hauptaufgabe war in drei Teilaufgaben unterteilt. Die erste Teilaufgabe (Task 1) umfasste die Genomsequenzierung und -analyse von ausgewählten sequenziellen *H. pylori*-Isolaten aus verschiedenen Stammkollektiven (chronisch infizierte Patienten in Kolumbien, Isolate von Familienmitgliedern nach natürlicher Transmission, Isolate von Freiwilligen, die im Rahmen einer Impfstoffstudie mit *H. pylori* infiziert worden waren). Die zweite Teilaufgabe (Task 2) beinhaltete die Analyse der Variation von ausgewählten Kandidatengenomen in einer großen Sammlung von sequenziellen Isolaten und Stämmen von Familienmitgliedern mit dem Ziel, robuste Berechnungen für die Mutations- und Rekombinationsrate *in vivo* durchzuführen. Die dritte Teilaufgabe (Task 3) umfasste funktionelle Untersuchungen zu variablen Genen außerhalb der *cag*-Pathogenitätsinsel mit einer möglichen Rolle in der Wirtsanpassung.

III. Planung und Ablauf des Vorhabens.

Kurz vor Beginn des Vorhabens erhielten wir im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Roche sechs 454-Genomsequenzen von drei Paaren sequenzieller Isolate von chronisch infizierten Patienten in Kolumbien. Mit Hilfe dieser Daten wurde die Auswertestrategie etabliert und erste Befunde erhoben. Es war ursprünglich geplant, alle weiteren 454-Sequenzierungen im Projekt als Auftrag an das MPI für Molekulare Genetik (AG Dr. R. Reinhardt zu vergeben). So wurden u. a. zwei Paare sequenzieller Isolate mit besonders langem Follow-up (12 Jahre) am MPI sequenziert. Die 454-Technologie war allerdings in dieser Zeit noch störanfällig, so dass beispielsweise Kreuzkontaminationen zwischen verschiedenen Spuren ein erhebliches Problem darstellten, das umfangreiche Optimierungen erforderlich machte und zu Verzögerungen im Projektablauf führte. Im September 2008 wurde am Institut für Med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der MHH ein Roche-454-Genomsequenziergerät (FLX) installiert und danach alle weiteren Sequenzierungen auf diesem Gerät durchgeführt, was die Sequenzkapazität erheblich erhöhte. Weitere Verzögerungen im Projektablauf wurden durch Schwierigkeiten bei der Rekrutierung geeigneten Personals sowie durch Personalwechsel ausgelöst. Keine dieser Verzögerungen hat jedoch den Fortschritt anderer WPs im HELDIVNET verzögert. Durch vom PTJ in sehr konstruktiver Weise bewilligte Mittelübertragungen und durch eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung um 11 Monate konnten alle geplanten Ziele des Projekts erreicht und hochsichtbare Publikationen erzielt werden.

IV. Erzielte Ergebnisse

Genomevolution während der chronischen Kolonisation mit *H. pylori*

Task 1: Genomsequenzierung sequenzieller Isolate von *H. pylori*.

Es wurden die Genomsequenzen von 12 *H. pylori*-Isolaten von Patienten mit chronischer *H. pylori*-Infektion analysiert. Diese Isolate stammen von fünf Individuen, vier davon aus Kolumbien, und einem Freiwilligen aus Deutschland. Die Erstisolate der vier Individuen aus Kolumbien sowie die Reisolat nach 3 Jahren waren bereits Bestandteil unserer früheren, auf Multilocussequenzierung basierten Analyse (Falush

et al., PNAS 2001). Unser Kooperationspartner Pelayo Correa konnte von zwei der Individuen noch einmal Stämme isolieren, 16 Jahre nach der Erstisolation. Diese Isolate wurden ebenfalls in die Studie eingeschlossen. Das Stammpaar von Freiwilligen stammt aus einer klinischen Studie, die unsere Kooperationspartner Prof. Thomas F. Meyer und Dr. Toni Aebischer im Rahmen der Prüfung eines Lebendimpfstoffs gegen *H. pylori* durchgeführt haben. Zur Überprüfung der Wirksamkeit des Impfstoffs wurden Freiwillige mit einem *cag*-Pathogenitätsinsel-defizienten *H. pylori*-Stamm infiziert und nach drei Monaten erneut Biopsien entnommen und kultiviert. Das von uns untersuchte Stammpaar bestand aus dem Challengestamm BCM100-H1 sowie dem Reisolat 8A3, das von einem Freiwilligen stammt, der keinen Impfstoff erhalten hat. Mit Hilfe der 454-Technologie wurden Draft-Genomsequenzen generiert, die paarweise und unter Verwendung einer publizierten Gesamtgenomsequenz (*H. pylori* Stamm J99) als Gerüst (Scaffold) zu „virtuellen Genomen“ angeordnet wurden. Diese virtuellen Genome wurden dann paarweise analysiert. Es wurden einzeln liegende Sequenzpolymorphismen (SNPs, mind. 200 Bp identische Sequenz auf beiden Seiten) sowie in Clustern vorliegende Sequenzunterschiede (CNPs, Abstand zwischen Unterschieden <200 Bp, Ergebnis von Rekombination) analysiert und aufwändig manuell annotiert. Die Genompaare aus Kolumbien unterschieden sich in 27-232 isolierten SNPs und in 16-441 CNPs (Importe). Die Raten von Mutation und Rekombination waren im Rahmen der Modellvorhersagen aus unserer früheren Analyse (Falush *et al.*, PNAS 2001), und das obwohl die frühere Analyse nur auf 0,4 % der Genomsequenz basierte. Die genomweite Analyse eröffnete uns die Möglichkeit, die Verteilung genetischer Veränderungen auf dem Chromosom des Bakteriums zu untersuchen. Ein weiterer wichtiger Vorteil dieses Ansatzes war es, dass die Häufigkeit von Veränderungen für einzelne Gene bzw. Gruppen von Genen analysiert werden konnte. Das erste unerwartete Ergebnis war, dass die Importe (CNPs) nicht zufällig über das Chromosom verteilt waren, sondern dass sie hochsignifikant in Gruppen auftreten („Cluster von Clustern“). Die molekularen Ursachen für dieses Phänomen sind noch nicht aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung ist, dass zunächst ein großes Stück DNA in die Bakterienzelle aufgenommen wird, das dann partiell in mehreren kleinen Stücken ins Chromosom integriert wird. Alternativ könnten zunächst größere Stücke integriert und dann durch Rekombination mit „eigener“ DNA repariert werden. Die zweite Beobachtung, die nur durch die Gesamtgenomanalyse möglich war, ist dass Importe mit signifikant erhöhter Frequenz in Genen aus der großen Familie der Helicobacter Outer Membrane-Proteine auftreten. Dies spricht für starke diversifizierende Selektion *in vivo*, durch die Rekombinanten mittels Import von „neuen“ Teilen von Hop-Genen einen Selektionsvorteil erlangen.

Der Genomvergleich für das Stammpaar aus der Impfstoffstudie zeigte zunächst – im krassen Gegensatz zu den Ergebnissen der Analysen kolumbianischer Isolate – kein einziges Importereignis. Alle beobachteten Unterschiede waren entweder Punktmutationen oder Längenveränderungen in repetitiven Sequenzen. Dies zeigt, dass die enorme Variabilität des *H. pylori*-Genoms ganz wesentlich auf dem Vorkommen von Mischinfektionen basiert, wie sie in Kolumbien und anderen Ländern mit hoher *H. pylori*-Prävalenzrate die Regel sind. Allerdings ist auch in Abwesenheit von Rekombination die *in vivo*-Mutationsrate von *H. pylori* im Vergleich zu anderen Bakterien sehr hoch ($2,5 \times 10^{-5}$ pro Jahr und Nukleotid). Interessanterweise ergab die Untersuchung des Stammpaars aus der Impfstoffstudie trotz des Fehlens von Rekombination einen weiteren Hinweis auf Selektion für eines der *hop*-Gene. Das aufgrund einer repetitiven Sequenz phasenvariable Gen *hopZ*, das für das putative Adhäsion HopZ kodiert, lag im Challenge Stamm BCM100-H1 im ausgeschalteten Zustand vor. Im

Stamm 8A3 sowie zahlreichen anderen Reisolaten von Freiwilligen war es eingeschaltet, was für starken Selektionsdruck für den eingeschalteten Zustand während der frühen Infektionsphase spricht.

Diese Ergebnisse dieses zentralen Projekts des WP2 im HELDIVNET konnten im März 2011 in der renommierten Zeitschrift *Proceedings of the National Academy of Sciences der USA* (PNAS) publiziert werden (L. Kennemann *et al.*, 2011).

Task 2: Variationsraten für Kandidatengene in einer großen Sammlung von sequenziellen Isolaten und Isolaten von Familienmitgliedern.

Wir beteiligten uns parallel an einer komplementären Untersuchung an 34 Paaren sequenzieller Isolate sowie von Gruppen MLST-identischer Isolate von 29 Individuen aus Familien mit einer erweiterten Multilocus-Analyse, bei der 78 Genfragmente sequenziert wurden. Diese Untersuchung führte zur Berechnung von robusten Mutations- und Rekombinationsfrequenzen für Housekeeping-Gene für Infizierte aus sehr unterschiedlichen geographischen Regionen. Die berechneten Mutationsraten lagen bei $1,4 \times 10^{-6}$ pro Nukleotid und Jahr für die sequenziellen Isolate und $4,3 \times 10^{-6}$ für die Familienmitglieder. Rekombination war trotz einer im Vergleich zu Mutationsergebnissen geringeren Frequenz für dreimal so viele Polymorphismen in der Population verantwortlich wie Mutation, weil bei jedem Rekombinationsereignis eine Vielzahl von Polymorphismen in den rekombinanten Stamm eingeführt werden. Diese Untersuchung wurde im Jahr 2010 in der renommierten Zeitschrift *PLoS Genetics* publiziert (G. Morelli *et al.*, 2010).

Task 3: Charakterisierung der funktionellen Bedeutung hochvariabler Gene außerhalb der *cag*-Pathogenitätsinsel bei der Wirtsanpassung.

Unsere funktionellen Arbeiten haben sich auf zwei Adhäsine aus der Familie der Hop-Proteine konzentriert, das Lewis B-bindende Adhäsine BabA und das weniger gut dokumentierte mögliche Adhäsine HopZ. Auf die besonders hohe Importfrequenz in dieser Genfamilie wurde bereits unter Task 1 hingewiesen. Für BabA wurde systematisch untersucht, wie sich im Verlauf der chronischen Infektion durch Rekombination eingeführte Sequenzveränderungen auf die Bindung der Stämme an den Liganden Lewis B auswirken. Wir konnten durch diese Experimente klar zeigen, dass es *in vivo* zu gravierenden Veränderungen der Lewis B-Bindung kommen kann, die bis zum vollständigen Verlust der Bindung reichen. Für HopZ sind die oben dargestellten Befunde an den Reisolaten aus der Vakzinestudie sehr klare Hinweise auf eine Selektion für den Zustand hopZ-ON während der initialen Kolonisation des Menschen. Die funktionelle Forschung an HopZ wird allerdings momentan dadurch behindert, dass in unseren Händen der von einer Gruppe Ende der 1990er Jahre publizierte Phänotyp von hopZ-Mutanten (Verlust der Bindung an AGS-Zellen) von uns nicht reproduziert werden kann, so dass ein robuster Phänotyp für molekulare Analysen nicht zur Verfügung steht. Diese Arbeiten werden daher in zukünftigen Arbeiten fortgesetzt werden müssen.

Beteiligung an den WPs 1 und 3:

WP1: Teil des geplanten WP1 war die Durchführung einer epidemiologischen Untersuchung in Kamerun, die ursprünglich von Prof. Achtman und Dr. Linz organisiert werden sollte. Da sich die ethische Genehmigung zu dieser Studie stark verzögerte,

konnte sie bis zum Ende der Förderung des Projekts von Prof. Achtman nicht realisiert werden. Als dann im Sommer 2009 doch eine Genehmigung erteilt wurde, wurde die Expedition unter meiner Leitung und unter Beteiligung meines Mitarbeiters Dr. Daniel Eibach durchgeführt. Da die Gruppe von Prof. Achtman im Jahr 2009 keine Förderung durch HELDIVNET mehr erhielt, wurden die Kosten dieser Expedition komplett aus dem Epidemiologie-Teil meines HELDIVNET-Antrags übernommen. Zwischen dem 03.12. und dem 23.12.2009 führten Dr. Daniel Eibach, ein medizinischer Mikrobiologe und Spezialist für Tropenmedizin aus meiner Gruppe in Hannover, Dr. Ayas Maady, ein Gastroenterologe aus Sibirien, mit dem wir eine langjährige Kooperation haben und Dr. Armand Nkwesheu vom Gesundheitsministerium in Kamerun, die Expedition durch. Sie trafen sich in Yaounde, der Hauptstadt Kameruns, und reisten von dort nach Yokadaouma und Abong Mbang in Ostkamerun. Magenbiopsien wurden von 77 Pygmäen (Baka) und 100 Kontrollpersonen (vorwiegend Bantu) gewonnen. Mit Hilfe von sog. Dry Shippers wurden diese Proben zurück nach Hannover transportiert. Insgesamt konnte von 97 Personen *H. pylori* isoliert werden (54,5 %). Da von vielen *H. pylori*-positiven Individuen je ein Stamm aus dem Corpus und einer aus dem Antrum isoliert wurde, konnten insgesamt 191 Isolate gewonnen werden.

WP3: Der Anteil an WP3, das von Prof. Christine Josenhans geleitet wurde, bestand im Wesentlichen in der Beteiligung von S. Suerbaum an den statistischen Analysen und der Abfassung des Manuskripts, das ebenfalls im Jahr 2010 in der renommierten Zeitschrift *PLoS Genetics* publiziert wurde (P. Olbermann *et al.*, 2010).

Publikationen:

Bereits erschienen:

Schwarz, S., G. Morelli, B. Kusecek, A. Manica, F. Balloux, R. J. Owen, D. Y. Graham, S. van der Merwe, M. Achtman* und S. Suerbaum*. 2008. Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathogens* 4:e1000180. * Korr. Autoren

Morelli, G., X. Didelot, B. Kusecek, S. Schwarz, C. Bahlawane, D. Falush, S. Suerbaum und M. Achtman. 2010. Microevolution of *Helicobacter pylori* during prolonged infection of single hosts and within families. *PLoS Genet.* 6:e1001036.

Olbermann, P.^o, C. Josenhans", Y. Moodley, M. Uhr, C. Stamer, M. Vauterin, S. Suerbaum*, M. Achtman* und B. Linz. 2010. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *PLoS Genet.* 6:e1001069. ^o Gleichberechtigte Autoren * Korr. Autoren.

Kennemann, L., X. Didelot, T. Aebischer, S. Kuhn, B. Drescher, M. Droege, R. Reinhardt, P. Correa, T. F. Meyer, C. Josenhans, D. Falush und S. Suerbaum. 2011. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:5033-5038.