

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung von Homologen der RNA-Bindeproteine bei der
Campylobacter jejuni-induzierten Enteritis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johanna Ida Meier

aus Berlin

Datum der Promotion: 10.03.2017

Meiner Oma
Olga Köpke

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abstrakt	2
Abstract	4
1. Einleitung	5
1.1 <i>Campylobacter</i>	5
1.1.1 Die Gattung <i>Campylobacter</i>	5
1.1.2 <i>Campylobacter</i> -Infektion beim Menschen	5
1.1.3 <i>C. jejuni</i> -Gastroenteritis	8
1.1.4 Folgekrankheiten der <i>C. jejuni</i> -Infektion	8
1.1.5 Virulenzfaktoren von <i>C. jejuni</i>	9
1.1.6 Stoffwechsel von <i>C. jejuni</i>	13
1.2 Das Immunsystem des Menschen	15
1.3 Bakterielle RNA-Chaperone.....	15
1.3.1 Arten der Ribonukleinsäure (RNA).....	15
1.3.2 RNA-Chaperone.....	16
1.3.3 RNA-Chaperone in verschiedenen Bakterien.....	16
1.3.4 Detaillierte Funktionen von Hfq	17
2. Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Molekularbiologie	20
3.1.1 Material.....	20
3.1.2 Generierung des Mutationsplasmides	21
3.1.3 Generierung des Komplementationsplasmides	23

3.1.4 Herstellung der <i>C. jejuni</i> -Stämme (Transfomation der Plasmide).....	24
3.1.5 Wachstumsanalysen	27
3.1.6 Analysen in Selektivmedien.....	28
3.1.7 Autoagglutination.....	28
3.1.8 Schwärmpheänomen	29
3.1.9 Biofilmformation.....	29
3.1.10 Taxisanalysen	30
3.1.11 Wasserstoffperoxidstress	30
3.2 Material und Methoden für die Analyse der Pathogenität im Tiermodells	31
3.2.1 Material.....	31
3.2.2 Versuchstiere	32
3.2.3 Generierung und Haltung gnotobiotischer Mäuse	33
3.2.4 Aufbereitung humaner Faecesproben	33
3.2.5 Infektion mit <i>Campylobacter jejuni</i>	34
3.2.6 Mausmodell 1: humanisierte Gnotobioten	35
3.2.7 Mausmodell 2: IL-10 defiziente Gnotobioten	35
3.2.8 „Klinischer Score“	36
3.2.9 Sektion: Tötung und Probenentnahme.....	37
3.2.10 Kinetik, Kolonisation und Translokation.....	38
3.2.11 Analysen der Organkulturüberstände.....	39
3.2.12 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) zur mRNA Analyse	40
3.2.13 Genotypisierung der IL10 ^{-/-} Mäuse	42
3.2.14 Histologie.....	43
3.3 Statistik und Darstellungen	45
4. Ergebnisse	47

4.1 Ergebnisse der phänotypischen Analysen.....	47
4.1.1 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> , <i>cj0138</i> auf <i>C. jejuni</i> bei optimalen Umgebungsbedingungen	47
4.1.2 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> , <i>cj0138</i> auf den <i>C. jejuni</i> -Metabolismus ...	50
4.1.3 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf das <i>C. jejuni</i> -Überleben unter pessimalen Umgebungsbedingungen mittels Autoagglutinationsanalysen...	51
4.1.4 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf das Schwärmen.....	54
4.1.5 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die temperaturabhängige <i>C. jejuni</i> -Biofilmbildung.....	56
4.1.6 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die <i>C. jejuni</i> -Taxis.....	57
4.1.7 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf <i>C. jejuni</i> bei Wasserstoffperoxidstress	60
4.2 Auswahl der <i>C. jejuni</i> -Mutanten für die weitere Analyse in Mausmodellen	61
4.3 Analyse der <i>C. jejuni</i> -Mutanten und -Komplementante im humanisierten gnotobiotischen Mausmodell (HGM).....	63
4.3.1 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die intestinale Kolonisation von <i>C. jejuni</i> im HGM	63
4.3.2 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf luminale pH-Werte im Darm von infizierten Tieren im HGM	67
4.3.3 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die Darmlängen von infizierten Tieren im HGM.....	70
4.3.4 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf intestinale Mediatoren und Zytokine der angeborenen Immunität von infizierten Tieren im HGM.....	72

4.3.5 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf intestinale Zytokine der erworbenen Immunität von infizierten Tieren im HGM	76
4.4 Analyse der <i>C. jejuni</i> -Mutanten und -Komplementante im IL-10 ^{-/-} Gnotobioten Mausmodell (IL10 ^{-/-} GM)	78
4.4.1 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die Pathogenität von <i>C. jejuni</i> im IL10 ^{-/-} GM	78
4.4.2 Einfluss der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf das Kolonisationsverhalten von <i>C. jejuni</i> im IL10 ^{-/-} GM	82
4.4.3 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf luminale pH-Werte im Darm von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	84
4.4.4 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die Darmlängen von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	86
4.4.5 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die Histopathologie des Colons von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	87
4.4.6 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die Apoptose und Proliferation von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	88
4.4.7 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf intestinale Zellen des angeborenen Immunsystems von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	90
4.4.8 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf intestinale Zellen des erworbenen Immunsystems von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	91
4.4.9 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf intestinale Mediatoren und Zytokine der angeborenen Immunität von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	92
4.4.10 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf intestinale Zytokine der erworbenen Immunität von infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM	99

4.4.11 Einfluss der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> auf die bakterielle Translokation in infizierten Tieren im IL10 ^{-/-} GM.....	103
5. Diskussion	104
5.1 Die <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i>	104
5.2 Die Bedeutung der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für den Phänotyp von NCTC11168 <i>C. jejuni</i>	106
5.2.1 Die Bedeutung der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für die Lebensfähigkeit, das Wachstum und die Beweglichkeit von <i>C. jejuni</i> unter optimalen Bedingungen	106
5.2.2 Die Bedeutung der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für den <i>C. jejuni</i> -Metabolismus.....	109
5.2.3 Die Bedeutung der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für <i>C. jejuni</i> NCTC11168 unter der pessimalen, aeroben Umgebungsbedingungen mit Hilfe von Autoagglutination und Taxis.....	110
5.2.4 Die Bedeutung der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für das Schwärmen von <i>C. jejuni</i> NCTC11168	113
5.2.5 Die Bedeutung der Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für den Umgang mit oxidativem Stress.....	115
5.2.6 Die Bedeutung der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> , <i>cj0138</i> und der Temperatur für die Biofilmformation von <i>C. jejuni</i>	116
5.3 Diskussion des humanisierten Gnotobioten-Modell (HGM)	118
5.3.1 Erster Experimentaltteil	119
5.3.2 Zweiter Experimentaltteil	121
5.4 Diskussion des IL-10 ^{-/-} -Gnotobioten Mausmodells.....	122

5.4.1 Die Bedeutung der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für die Pathogenese von NCTC11168 <i>C. jejuni</i> im IL10 ⁻ GM.....	123
5.4.2 Die Bedeutung der <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> für die Aktivierung des Wirtsimmunsystems im IL10 ⁻ GM	126
5.5 Kodieren die <i>C. jejuni</i> -Gene <i>cj1103</i> , <i>cj0667</i> und <i>cj0138</i> RNA-Chaperone?	131
6. Literaturverzeichnis.....	134
Eidesstaatliche Versicherung	143
Lebenslauf.....	144
Danksagungen	145

Abkürzungsverzeichnis

°C	- Grad Celsius
Abb.	- Abbildung
bzw.	- beziehungsweise
C.	- <i>Campylobacter</i>
ca.	- circa
Cm ^R	- Chloramphenicolresistenz
CDT	- cytolethale distending toxin (<i>engl.</i>)
cm	- Zentimeter
Cia	- <i>Campylobacter</i> invasion antigens (<i>engl.</i>)
<i>C. jejuni</i> , <i>C. j.</i>	- <i>Campylobacter jejuni</i>
d	- Tag(e)
dest.	- destilliert
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
EHEC	- Enterohämorrhagischer <i>Escherichia coli</i>
Fed	- flagellar co-expression determinants (<i>engl.</i>)
g	- Gramm
GBS	- Guillain-Barré-Syndrom
h	- Stunde, Stunden
HUS	- Hämolytisches-Urämisches-Syndrom
HtrA	- High temperature requirement A (<i>engl.</i>)
Km ^R	- Kanamycinresistenz
l	- Liter
LOS	- Lipooligosaccharide
m	- Meter
min	- Minuten
μ	- Mikro
μl	- Mikroliter
mg	- Milligramm
ml	- Milliliter
mRNA	- Messenger-RNA (<i>engl.</i>)
nm	- Nanometer
PBS	- phosphate buffered saline (<i>engl.</i>), phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	- Polymerase Chain Reaction (<i>engl.</i>), Polymerase-Kettenreaktion
RBS	- Ribosomale Bindungsstelle
RNA	- Ribonukleinsäure
rRNA	- Ribosomale-RNA
SDS	- sodium dodecyl sulfate (<i>engl.</i>), Natriumdodecylsulfat
s	- Sekunden
sRNA	- Small-RNA (<i>engl.</i>), kleine RNA
TBE	- Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	- Tris-EDTA-Puffer
tRNA	- Transfer-RNA
z.B.	- zum Beispiel

Abstrakt

Campylobacter jejuni ist einer der häufigen Erreger der Gastroenteritis. Die Campylobacteriose ist meist selbstlimitierend. Schwere Verlaufsformen können jedoch ein Guillain-Barré-Syndrom auslösen. Obwohl es in den letzten zehn Jahren stetig zu einer steigenden Inzidenz und Prävalenz der Campylobacteriose-Fälle kam, ist das Wissen über die Pathogenese limitiert.

RNA-Chaperone katalysieren die Regulation der Proteinbiosynthese durch Stabilisierung von sRNAs und mRNAs. Die Existenz von sRNAs in *C. jejuni* ist gesichert, jedoch konnten bis heute keine RNA-Chaperone in *C. jejuni* identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde das Genom des *C. jejuni* Referenzstamms NCTC11168 nach RNA-Chaperon-Genen durchsucht. Die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* wurden identifiziert und durch Mutationsanalysen, Komplementationsanalysen und Überexpressionsanalysen weiter untersucht.

Die Überexpression des Gens *cj1103* führte zu einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit. Die Gene *cj1103* und *cj0138* waren in der Autoagglutination, in der Taxis und bei dem Überleben unter ungünstigen Umgebungsbedingungen involviert.

Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Pathogenität von *C. jejuni* wurde in Mausmodellen für akute und chronische Infektionen untersucht.

Im chronischen Kolitismodell wurden gnotobiotische Mäuse mit einer Darmflora des Menschen rekolonisiert und mit *C. jejuni* infiziert (HGM). Zwei Experimentalteile zeigten variable Ergebnisse. Im ersten Experimentalteil spielten die Gene *cj1103* und *cj0138* eine Rolle für die Kolonisationskapazität. Die *C. jejuni*-Infektion führte hier zu einer Kolitis. Die Induktion von MCP-1, IL-6, TNF- α , IL-10, IL-18 und INF- γ war unabhängig von den Genen. Lediglich *cj0667* war hier für die IL-18-Expression essentiell.

Im IL-10^{-/-}-Mausmodell für akute Kolitis wurde die normale bakterielle Flora durch Antibiotikabehandlungen eradiziert. Die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* spielten hier eine entscheidende Rolle. Die Gene *cj0667* und *cj0138* waren essentiell für die Ausbildung histologischer Darmpathologien, besonders für die Apoptoseinduktion. Dem Gen *cj0667* kam zusätzlich eine Bedeutung bei der Zellproliferation zu. Für die Aktivierung von Granulozyten, der IL-6-Expression und der Muzinexpression spielten

die Gene *cj0667* und *cj0138* eine Rolle. Das Gen *cj0138* war für die TNF- α Aktivierung und das Gen *cj0667* für die NO-Ausschüttung von Bedeutung.

Im Colon war das Gen *cj0667* für die Zerstörung der Schleimschicht essentiell. Bei der Vermehrung der B-Zellen waren *cj0667* und *cj0138* von Bedeutung. Für die Vermehrung von T-Zellen und regulatorischer T-Zellen war das Gen *cj0667* essentiell.

Bei der IL-18-Produktion waren die Gene *cj0667* und *cj0138* essentiell. *Cj0138* spielte für die IL-23-Expression eine entscheidende Rolle.

Die analysierten Gene kodieren Virulenzfaktoren von *C. jejuni*. Ob die kodierten vermeintlichen RNA-Bindeproteine tatsächlich als RNA-Chaperone fungieren, ist nicht sicher.

Abstract

Campylobacter jejuni is a common cause for gastroenteritis. Ordinarily campylobacteriosis is self-limiting, but severe cases can lead to the sequel Guillain-Barré syndrome. Even though there was a steady increase in incidence and prevalence of campylobacteriosis during the last ten years, our knowledge of the pathogenesis is still limited.

RNA chaperones regulate protein biosynthesis by stabilising sRNAs and mRNAs. *C. jejuni* contains sRNAs. Contrarily RNA chaperones are yet to be found in *C. jejuni*.

We searched the genome of *C. jejuni* NCTC11168 for potential RNA chaperone genes and identified *cj1103*, *cj0667* and *cj0138*. Further analysis of these genes was conducted on constructed mutants, complements and overexpressors.

The overexpression of *cj1103* led to an accelerated growth. Genes *cj1103* and *cj0138* are involved in autoagglutination, taxis and survival in unfavourable conditions.

The relevance of *cj1103*, *cj0667* and *cj0138* in *C. jejuni*'s pathogenicity was investigated in mouse models for acute and chronic infections.

Gnotobiotic mice were recolonised with a human gut flora and infected with *C. jejuni* in the chronic colitis model (HMG). The two experimental-parts showed variable results. Genes *cj1103* and *cj0138* were important for colonisation and the colitis that was caused by infection with *C. jejuni* in the first experimental part. The induction of MCP-1, IL-6, TNF- α , IL-10, IL-18 and INF- γ was irrespective of the three genes. Merely *cj0667* was essential for IL-18 expression.

In the acute colitis model the common bacterial flora of IL-10^{-/-} mice was eradicated by antibiotic treatment. The genes *cj1103*, *cj0667* and *cj0138* played a crucial role in this acute model. *Cj0667* and *cj0138* were crucial in causing gut pathology, especially apoptosis. Further gene *cj0667* had a role in cell proliferation. *Cj0667* and *cj0138* promoted the activation of granulocytes, the expression of IL-6 and mucin. Only gene *cj0138* caused the activation of TNF- α and gene *cj0667* higher levels of NO.

Gene *cj0667* caused the destruction of the mucus layer in the colon. *Cj0667* and *cj0138* were important for B cell proliferation and only *cj0667* for T cell and regulatory T cell proliferation. IL-18 expression was caused by genes *cj0667* and *cj0138* and IL-23 expression only by *cj0138*.

The analysed genes encode *C. jejuni* virulence factors. If these encoded putative RNA-binding proteins actually function as RNA chaperones remains to be determined.

1. Einleitung

1.1 *Campylobacter*

1.1.1 Die Gattung *Campylobacter*

Die Bakterien der Gattung *Campylobacter* (*C.*) gehören zusammen mit den Gattungen *Helicobacter* und *Wolinella* zur ϵ -Subdivision der Klasse der *Proteobakterien*. *Campylobacter* sind Gram-negative, bewegliche und spiralförmige Stäbchenbakterien. Bei den S-förmigen Spiralen handelt es sich um junge und aktiv wachsende Kulturen. Alte, eher unbewegliche, degenerative *Campylobacter* Zellen erscheinen in einer kokkoiden Form. Ferner gibt es auch ringförmige bzw. „Donut-förmige“ *Campylobacter* Zellen, welche als Zwischenstadium im Übergang zwischen jungen spiralförmigen zu alten kokkoiden Zellen identifiziert wurden. [1] Zur Fortbewegung besitzen die Bakterien an einem oder beiden Zellpolen ein einzelnes Flagellum. *Campylobacter* sind mikroaerophil und zusätzlich capnophil. Sie benötigen 3-15% Sauerstoff und mindestens 3% Kohlenstoffdioxid für das Wachstum. *C. jejuni* (*C. j.*), *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* gehören zu den so genannten thermophilen *Campylobacter* Arten, die im Gegensatz zu *C. fetus*, der eine Temperatur von 25°C benötigt, eine 42°C warme Umgebung für die optimale Vermehrung benötigen. Die thermophilen Arten sind mit einer Größe von etwa 0,5 μm x 3 μm im Vergleich eher klein. Zusätzlich sind sie Katalase und Oxidase positiv, sowie Urease negativ. [2-4]

Im Jahr 2000 wurde die Genomsequenz von *C. jejuni* NCTC11168 mit einer Größe von 1641 kbp und einem G+C Gehalt von 30,6% veröffentlicht. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von hypervariablen Regionen, die sogenannte homopolimerische Tracts enthalten, im Genom beschrieben. Die meisten hypervariablen Regionen wurden in Genbereichen, die für Proteine der Biosynthese, der Kapsel, der Lipooligosaccharide [5] und des Flagellums kodieren, gefunden. [6] Bis heute wurden 93 weitere *C. jejuni* Komplettssequenzen veröffentlicht. [2-4, 7]

1.1.2 *Campylobacter*-Infektion beim Menschen

Die *Campylobacteriose* ist eine Zoonose, die im Wesentlichen durch den Verzehr von Geflügel, Schweinefleisch und seltener Rindfleisch auf den Menschen übertragen wird. Die Bakterien kolonisieren den Darm der Reserviertiere und verursachen dort meist keine Symptomatik. [8] Zu den häufigsten humanpathogenen Arten gehören *C. jejuni* und *C. coli*. *C. jejuni* ist für etwa 90% der humanen *Campylobacteriosen* verantwortlich.

[9, 10] Eine Infektionsdosis von lediglich 500-800 Bakterien ist als bereits krankheitsauslösend beschrieben worden. [11, 12] *C. jejuni* und *C. coli* kommen in der Natur ubiquitär vor. Als enteraler Kommensale kolonisieren sie frei lebende Vögel und Säugetiere, aber auch Nutztiere, vor allem Geflügel, seltener Milchrinder und Schweine. Haustiere wie Katzen und Hunde können ebenfalls betroffen sein. Neben der berufsbedingten Exposition als Milchbauer oder Arbeiter in der Geflügelzucht oder auf Schlachthöfen, stellen, wie Abbildung 1 (Abb. 1) zeigt, kontaminierte Lebensmittel, vor allem Rohmilch, ungenügend erhitztes Geflügelfleisch oder verschmutztes Oberflächenwasser die Infektionsquellen beim Menschen dar. Auch der Kontakt zu befallenen Haustieren kann zu einer Campylobacteriose führen. [8, 13]

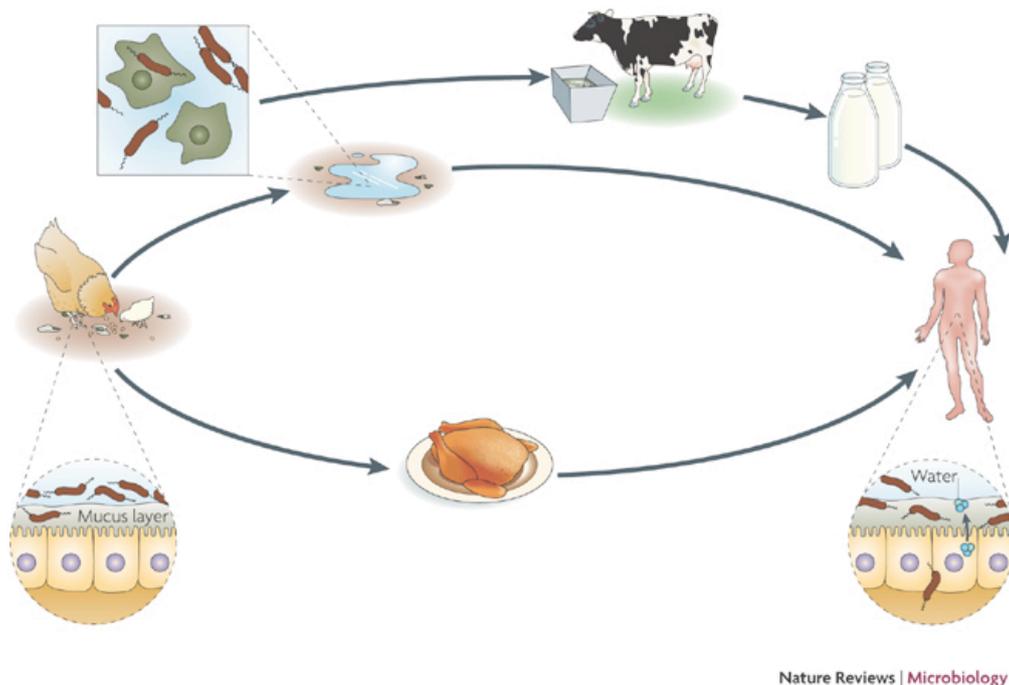


Abb. 1: *Campylobacter jejuni* Infektionsquellen. Eine Infektion erfolgt durch direkten Tierkontakt oder den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln. [13]

2014 wurden dem Robert-Koch-Institut circa (ca.) 71000 *Campylobacter*-Infektionen für Deutschland gemeldet. Seit 2007 ist die Campylobacteriose vor der Salmonellose die häufigste Form der bakteriellen Gastroenteritis in Deutschland. Die gemeldeten *Salmonellen*-Infektion sind seit 2001 kontinuierlich rückläufig (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu stiegen die gemeldeten *Campylobacter*-Infektion, bis auf die Jahre 2012, 2006 und 2003, stetig an. Das Robert-Koch-Institut erklärt den Rückgang der gemeldeten *Campylobacter*-Infektionen von 2011 zu 2012 mit geringeren Arztkonsultationen bzw. Stuhluntersuchungen bei Durchfallerkrankungen. 2011 wurden im Rahmen des

EHEC/HUS-Ausbruchs (Enterohämorrhagischer *Escherichia coli* und der Folgeerkrankung Hämolytisches-Urämisches-Syndrom) vermehrt Stuhluntersuchungen durchgeführt, was gleichzeitig zu einer erhöhten Detektion von *Campylobacter*-Fällen führte. [10]

Tabelle 1: Häufigkeit der dem Robert-Koch-Institut nach Referenzdefinition übermittelten *Campylobacter* (Camp)- und *Salmonellen* (Salm)-Fälle für Deutschland in den Jahren 2001 bis 2014 [10]

Jahr	Camp	Salm									
2014	70972	16222	2010	65714	25307	2006	52035	52575	2002	56350	72377
2013	63636	18986	2009	62789	31397	2005	62114	52245	2001	54410	77186
2012	62880	20849	2008	64731	42909	2004	55745	56947			
2011	71307	24512	2007	66107	55400	2003	47876	63044			

Campylobacter-Infektionen sind nicht nur in Deutschland, sondern auch weltweit die häufigste Ursache für die humane bakterielle Gastroenteritis. Im Gegensatz zu den Industrieländern spielen in den Entwicklungsländern besonders schlechte hygienische Verhältnisse, kontaminiertes Trinkwasser und die körperliche Nähe zu Tieren eine übergeordnete Rolle für die Infektion. In den Industrieländern führt vor allem nicht ausreichend gegartes Geflügelfleisch zu einer Infektion. In Entwicklungsländern sind bevorzugt Kleinkinder im Alter von unter fünf Jahren betroffen. Bei Erwachsenen scheint die Erkrankung dort keine große Rolle zu spielen. In den industrialisierten Regionen sind sowohl Erwachsene als auch Kinder von den *C. jejuni*-Infektionen betroffen. Der Nachweis von *C. jejuni* bei asymptomatischen Trägern ist in Entwicklungsländern verbreitet, in den industrialisierten Ländern eher Seltenheit. Man erklärt sich diese Beobachtung durch die vermehrte Exposition mit dem Erreger im frühen Kindesalter, wodurch eine gewisse Immunität ausgebildet wird, die im Alter vor einer Infektion bzw. deren Symptomatisierung schützen kann. In den industrialisierten Regionen kommt es zu einer saisonalen Häufung der *Campylobacter*-Infektionen in den Sommer- und Herbstmonaten. In den Entwicklungsländern scheint es keine saisonalen Häufungen zu geben, was durch das Fehlen extremer Temperaturschwankungen erklärt werden kann. [9, 10, 13-17]

1.1.3 *C. jejuni*-Gastroenteritis

Im Normalfall ist die *C. jejuni*-Gastroenteritis innerhalb einer Woche selbstlimitierend. Deshalb geht man davon aus, dass die gemeldeten und somit registrierten Inzidenzen wesentlich niedriger als die tatsächlichen sind. Je nach Land handelt es sich um einen Unterschied mit dem Faktor 8 bis 30. [18-20] Das klinische Bild einer humanen akuten *C. jejuni*-Gastroenteritis tritt nach einer Inkubationszeit von etwa 24 bis 72 h (Stunden) auf. Die Symptome reichen von, eher im Anfangsstadium auftretenden, milden wässrigen bis hin zu schweren Verlaufsformen mit blutigen Durchfällen, welche meist mit kolikartigen abdominellen Krämpfen einhergehen. Oft geht der Enteritis ein Prodromalstadium mit Fieber, Kopfschmerzen und Myalgie voraus. Erbrechen ist jedoch nicht typisch für die Erkrankung. Septische Verläufe durch einen Übertritt des Erregers in die Blutbahn sind möglich, besonders bei immunsupprimierten Patienten. Im Anfangsstadium der Infektion wird vornehmlich der Dünndarm, bei einer fortgeschrittenen Infektion vermehrt der Dickdarm mit *C. jejuni* besiedelt. Der Infektionsverlauf hängt jedoch von dem individuellen Immunsystem des Patienten und der Virulenz des infizierenden Stammes ab. [2, 3, 8, 11, 14, 21]

1.1.4 Folgekrankheiten der *C. jejuni*-Infektion

Aus etwa 0,1% der *C. jejuni*-Infektionen entwickelt sich nach der akuten Phase der Gastroenteritis ein Guillain-Barré-Syndrom (GBS). Das GBS ist ein neurologisches Krankheitsbild, was zu einer anfänglichen Muskelschwäche bis hin zu einer aufsteigenden symmetrischen Lähmung führt. Aufgrund der Gefahr einer Atemlähmung wird ein GBS intensivmedizinisch, mit hochdosierten Immunglobulinen und Plasmapherese behandelt. Die Entstehung eines GBS wird mit dem Mechanismus der molekularen Mimikry erklärt. Vom Körper gebildete, gegen *Campylobacter*-Lipooligosaccharide gerichtete Antikörper zeigen dabei eine Kreuzreaktion mit den Nervenganglienzellen des Menschen. Es kommt zu einer Autoimmunreaktion, die eine Demyelinisierung der Nervenganglienzellen und eine Degeneration der Axone bewirkt. [8, 22-24]

Im Rahmen einer *Campylobacteriose* kann es auch zum Miller-Fisher-Syndrom, einer Sonderform des GBS, bei dem vor allem die Hirnnerven beteiligt sind, kommen. Typischerweise zeigt sich eine Symptomtrias aus Lähmungen der Augenmuskeln (Ophthalmoplegie), Störungen der Bewegungskoordination (Ataxie) und dem Erlöschen von Reflexen (Areflexie). [23, 25]

Ein bis vier Wochen nach einer *C. jejuni*-Infektion, zum Teil mit einem beschwerdefreien Intervall, kann auch eine reaktive Arthritis auftreten. Über molekulare Mimikry generierte Autoantikörper befinden sich in der Synovialflüssigkeit. Es handelt sich um eine „sterile“ Arthritis, da in der Synovialflüssigkeit kein Erreger serologisch oder mikrobiologisch nachweisbar ist. Bei Involvierung der Gelenke sind die gastrointestinalen Symptome meist stärker ausgeprägt und halten länger an. Eine Therapie mit Antibiotika scheint für den Krankheitsverlauf keine wesentliche Rolle zu spielen. Die reaktive Arthritis kann sich auch in Form der Reiter-Krankheit äußern. Die dabei auftretende Symptomtrias besteht neben der Arthritis aus Konjunktivitis und Urethritis oder Zervizitis. [26, 27]

Ferner wird das Auftreten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sowie das Reizdarmsyndrom mit einer *Campylobacter*-Infektion in Verbindung gebracht und kontrovers diskutiert. [28, 29]

Im Rahmen von Einzelfallberichten soll es auch eine Assoziation zwischen dem Hämolytisch-Urämischen-Syndrom und einer *C. jejuni*-Infektion geben. [9]

1.1.5 Virulenzfaktoren von *C. jejuni*

Damit es zu einer Infektion beim Menschen oder Tier kommen kann, muss *C. jejuni* ungünstige Umweltbedingungen überleben. So wird das Bakterium von kontaminierten Nahrungsmitteln durch den Verzehr über das saure Magenmilieu in basische pH-Verhältnisse in den Dünndarm transportiert. Nach dem Durchdringen der Mukusschicht und der Adhäsion kommt es zu einer Invasion des intestinalen Gewebes, wo die Bakterien dem Angriff durch das Wirtsimmunsystem ausgesetzt sind. Auch wenn die Pathogenese der *C. jejuni*-Infektion im Detail bis heute nicht gut verstanden ist, trägt das Wissen über bekannte Virulenzfaktoren dazu bei, einzelne Aspekte der Pathogenität des Erregers nachvollziehen zu können.

So produziert *C. jejuni* das „cytolethale distending toxin“ (CDT), das aus drei Untereinheiten besteht, die als CdtA, CdtB und CdtC bezeichnet werden. Die CdtA und CdtC Untereinheiten katalysieren den Transfer des Toxins in die Wirtszelle, wo die DNase-Aktivität von CdtB über DNA-Strangbrüche eine Blockade des Zellzyklusses bewirkt. [3, 30-32]

Gegen den Angriff von Granulozyten und Makrophagen ist *C. jejuni* durch eine Kapsel geschützt, welche auch die Bindung von Antikörpern unmöglich macht. Die Molekülstruktur der Kapsel variiert von Stamm zu Stamm und kann deshalb für die Serotypisierung im Labor herangezogen werden. [33] Kapsel-defiziente *C. jejuni*-Mutanten zeigten im Tierexperiment eine reduzierte Virulenz, was auf eine Beteiligung an der Interaktion mit der Wirtszelle hinweist. [3, 34-36]

Die Lipooligosaccharide (LOS) in der äußeren Membran von *C. jejuni* sind in ihrer Struktur ebenfalls sehr variabel und haben eine Vielzahl von Funktionen. Zum Beispiel werden die LOS für das Wachstum, die natürliche Transformation, Antibiotikaresistenz und die Zellinvasion benötigt. [37] Die LOS einiger *C. jejuni*-Stämme weisen die gleiche Antigenspezifität wie GM1-Ganglioside menschlicher Nervenzellen auf, was die bereits beschriebenen Autoimmunreaktionen hervorruft. [3, 38]

Manche *C. jejuni*-Stämme bilden Hämolysine, die Wirtszellen direkt zerstören. Werden Erythrozyten lysiert, dient das freigesetzte Hämoglobin der Eisenakquisition des Bakteriums. [39]

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, braucht *C. jejuni* für das Überleben spezifische Umweltbedingungen. Es werden besonders eine Temperatur von 34°C bis 44°C mit einem Optimum bei 42°C und eine mikroaerophile Gaszusammensetzung mit mindestens 3% CO₂ und lediglich 5-15% O₂ benötigt. [4] In der Nahrungskette und in der Nahrungsmittelproduktion ist *C. jejuni* verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Dazu zählt neben hohen Temperaturen, unterschiedlichen pH-Milieus, auch osmotischer und oxidativer Stress. Mit den hohen Anforderungen an die Umgebungsbedingungen sollte es theoretisch für *C. jejuni* schwer sein in der Umwelt zu überleben und sich zu vermehren. In der Praxis ist *C. jejuni* jedoch weit verbreitet und kann relativ einfach aus Nahrungsmitteln, Wasser und anderen Quellen isoliert werden. Als Erklärung für dieses Paradoxon, geht man davon aus, dass sich *C. jejuni* durch die Bildung von Biofilmen gegen ungünstige Umweltbedingungen schützen kann. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass manche *C. jejuni*-Stämme in der Lage sind Biofilme an bestimmten Oberflächen und unter bestimmten Wachstumsbedingungen zu bilden. Jedoch konnte die Fähigkeit Biofilme zu bilden nicht für alle Stämme nachgewiesen werden. Bisher ist nicht wirklich geklärt wie und unter welchen Bedingungen alle, bzw. die Biofilm-bildenden

C. jejuni-Stämme tatsächlich Biofilme ausbilden. [40] In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass möglicherweise extrazelluläre DNAsen die Ausbildung eines *C. jejuni*-Biofilms verhindern. [41]

C. jejuni ist oxidativem Stress, wie Superoxidradikalen, Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxid, ausgesetzt. Diese entstehen im Rahmen normaler metabolischer Prozesse, wie der Atmungskette und dem Eisenstoffwechsel in *C. jejuni*. Zusätzlich widerfährt *C. jejuni* oxidativer Stress durch das Wirtsimmunsystem während einer Infektion und durch die Mikrobiota des Wirtes. Oxidativer Stress kann zu Schäden an der DNA, an Proteinen und Lipiden führen. Zum Schutz verfügt *C. jejuni* über verschiedene Enzyme (siehe Abb. 3 in Kap. 1.1.6). Das Enzym Katalase (KatA) verwandelt in zwei Schritten Wasserstoffperoxid zu den unschädlichen Molekülen Sauerstoff und Wasser ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). Das Enzym Superoxid-Dismutase (SodB) katalysiert die Reaktion von Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). Zusätzlich verfügt *C. jejuni* über die Enzyme Alkyl-Hydroxid-Reduktase (AhpC) und zwei Thiol-Peroxidasen (Tpx und Bcp) zur Umwandlung von oxidativen Radikalen bzw. Wasserstoffperoxid in harmlose Moleküle. [42-44]

Die extreme Beweglichkeit von *C. jejuni* wird durch große einzeln liegende Flagellen vermittelt, die an einem oder beiden Zellpolen lokalisiert sein können. Der Aufbau und die Biologie der Flagellen sind für *C. jejuni* sehr gut untersucht und verstanden. Flagellen bestehen aus extrazellulären „Fäden“, sogenannte Filamente, welche über einen ebenfalls extrazellulären Haken mit dem sogenannten Motorkomplex verbunden sind. Der Motorkomplex ist fest in der Zellwand und Zellmembran verankert. Flagellen sind innen hohl. Durch den Hohlkanal des Flagellums kann Flagellin von der Zelle bis an die Spitze des Flagellums transportiert werden, dort angebaut werden und somit das Filament bilden. Flagellen spielen nicht nur für die Fortbewegung und Chemotaxis von *C. jejuni* eine entscheidende Rolle, sondern auch für die Sekretion, die Pathogenität, die Wirtszellkolonisation und die Wirtszellinvasion. So sind Mutanten, denen die Flagellensynthese fehlt, nicht in der Lage den Darm zu kolonisieren. Die Tatsache, dass Mutanten ohne Flagellen keinerlei Krankheitssymptomatik auslösen können, macht die Beweglichkeit zu einem der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums. [11, 13, 45, 46]

Sigma Faktoren (σ) sind als Teil der RNA-Polymerase dafür verantwortlich Promotoren zu erkennen und zu binden. Sie regulieren somit die Transkription von verschiedenen Genen bzw. Genklassen. [47] *C. jejuni* besitzt drei Sigma Faktoren. Der Faktor σ^{70} ist der „Housekeeping“ Sigma Faktor, welcher für die Regulation fast aller Promotoren in *C. jejuni* verantwortlich ist. Die Faktoren σ^{28} und σ^{54} regulieren die Biosynthese und Modifikation der Flagellen und sind deshalb auch für die Pathogenität essentiell. [4, 48] Im Rahmen der posttranslationalen Modifikation kann *C. jejuni* Glykosylierungen durchführen. Die O-Glykosylierung ist essentiell für die Flagellenfunktion und damit auch für die Pathogenität. Ein Enzym, das die N-Glykosylierung durchführt, wird durch das *pgl*-Gen kodiert und ist für die posttranslationale Veränderung von mindestens 45 Proteinen verantwortlich. Die Bedeutung der N-Glykosylierung und deren eventuellen Auswirkungen auf die Virulenz von *C. jejuni* sind bisher nicht vollständig geklärt. [13, 49]

Als fakultativ intrazelluläres Bakterium kann *C. jejuni* durch Adhäsion und Invasion in Epithelzellen des menschlichen Darms eindringen und somit eine humane Campylobacteriose auslösen. [13] Wie bereits erwähnt, ist die Beweglichkeit durch Flagellen essentiell für das Überwinden der Mukusschicht und für die Adhäsion und die Invasion von intestinalen Epithelzellen. Ferner dient der „Hohlkanal“ des Flagellums als sogenanntes Typ-III-Sekretionssystem, durch das Proteine nach extrazellulär gebracht werden können, die bei der Bakterium-Wirtszellinteraktion eine Rolle spielen können. [50-52] Zum Beispiel werden die „*Campylobacter* invasion antigens (Cia) A-H“ und die „flagellar co-expression determinants (Feds) A-D“ durch das Typ-III-Sekretionssystem des Flagellums nach außen transportiert und unterstützen dort die Wirtszellinvasion. [52-55] PEB1, JlpA, CapA, CadF und FlpA sind zum Beispiel Proteine, die für die Wirtszelladhäsion essentiell sind. [56-58]

Kürzlich durchgeführte Studien befassen sich mit dem neuen Virulenzfaktor „High temperature requirement A (HtrA)“. Das HtrA-Protein unterstützt als Chaperon in *C. jejuni* die Zelladhäsion und –invasion, wahrscheinlich durch die Hilfe bei der Proteinfaltung von einem oder mehreren der oben genannten Adhäsine. [59] HtrA-Proteine gehören zu den durch Hitzeschock induzierten Serin-Proteasen. [60] Es konnte gezeigt werden, dass HtrA essentiell für die Resistenz gegen oxidativen Stress und hohe Temperaturen, sowie essentiell für die Adhäsion, die Invasion und die Transmigration von intestinalen Epithelzellen in *C. jejuni* ist. [54] Ferner konnte in zwei

Mausmodellen gezeigt werden, dass HtrA im Rahmen einer ausgelösten Campylobacteriose zu Apoptosen und Immunopathologien in Wirtszellen führen. [61, 62]

1.1.6 Stoffwechsel von *C. jejuni*

Die Energiegewinnung beim Menschen erfolgt über den Abbau und die Verwertung der drei Stoffgruppen Kohlenhydrate, Proteine und Fette. In *C. jejuni* erfolgt die Energiegewinnung vor allem durch die Verwertung von Aminosäuren und organischen Säuren, für die eine Vielzahl von Transportern und Enzymen zur Verfügung stehen. [4, 63, 64]

Im *C. jejuni*-Genom sind alle Enzyme der Glykolyse, bis auf ein Schlüsselenzym, die Phosphofruktokinase, kodiert. Im Rahmen der Glykolyse erfolgt der enzymatische Abbau von Kohlenhydraten zu Pyruvat. Viele Reaktionen der Glykolyse können in beide Richtungen ablaufen. Ausnahmen bilden die Reaktion der Phosphofruktokinase und der Pyruvatkinase, welche als Schlüsselenzyme der Glykolyse ausschließlich die Reaktionen in die Richtung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat und Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat katalysieren. Das fehlende Enzym Phosphofruktokinase erklärt, weshalb *C. jejuni* nicht in der Lage ist, exogene Kohlenhydrate im Stoffwechsel zu verarbeiten oder zur Energiegewinnung zu nutzen. Pyruvat kann von *C. jejuni* direkt aus der Umgebung aufgenommen werden und stellt neben den Aminosäuren einen alternativen Energielieferanten dar. Für die Biosynthese von Lipopolysacchariden und der Kapsel, sowie der N- und O-Glykosylierungen verschiedener Proteine benötigt *C. jejuni* jedoch Glukose. Da *C. jejuni* Glukose aus der Umgebung nicht aufnehmen kann, muss Glukose endogen im Rahmen der Glukoneogenese hergestellt werden. Das *C. jejuni*-Genom verfügt über alle nötigen Enzyme der Glukoneogenese zur Herstellung von Glukose aus Phosphoenolpyruvat. [4, 6, 44, 49, 63, 64]

Die Energiegewinnung aus Proteinen erfolgt in *C. jejuni* durch den Abbau der Aminosäuren Aspartat, Asparagin, Glutamat, Glutamin, Serin und Prolin. [63]

Acetyl-CoA, das Produkt des Fettstoffwechsels, entsteht beim Menschen durch die β -Oxidation von Fettsäuren. In *C. jejuni* wird Acetyl-CoA entweder durch das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase aus Acetat oder durch die Ferredoxin-abhängige Pyruvat-Synthase aus Pyruvat hergestellt. *C. jejuni* kann Acetat selber herstellen, es an die Umgebung abgeben und wieder aufnehmen, wenn es benötigt wird. [44, 64, 65]

In Abbildung 2 sind die Stoffwechselwege in *C. jejuni* schematisch dargestellt. Die Produkte des Kohlenhydrat- und Fettabbaus, Pyruvat und Acetyl-CoA, obwohl anders generiert als beim Menschen oder aufgenommen, werden anschließend im Citratzyklus weiter verarbeitet. Auch die von *C. jejuni* metabolisierten Aminosäuren werden im Citratzyklus an unterschiedlichen Stellen weiter verarbeitet. *C. jejuni* verfügt über einen kompletten Citratzyklus. Mehrere Enzyme des Citratzyklus entsprechen denen, die obligate Anaerobier aufweisen. [4, 63]

Die Atmungskette von *C. jejuni* ist relativ komplex und könnte eine Erklärung für das Überleben von atmosphärischen 21% O₂ bis hin zu anaeroben Umgebungsbedingungen sein. Im Rahmen der Atmungskette finden mehrere Redoxreaktionen mit dem ultimativen Ziel der Energiegewinnung statt. Neben den organischen Säuren wie Fumarat, Methansäure und Laktat fungieren auch Sulfite dabei als Elektronendonator. Sauerstoff und Wasserstoffperoxid bilden die Gruppe der Elektronenakzeptoren in *C. jejuni*. [4, 63, 64]

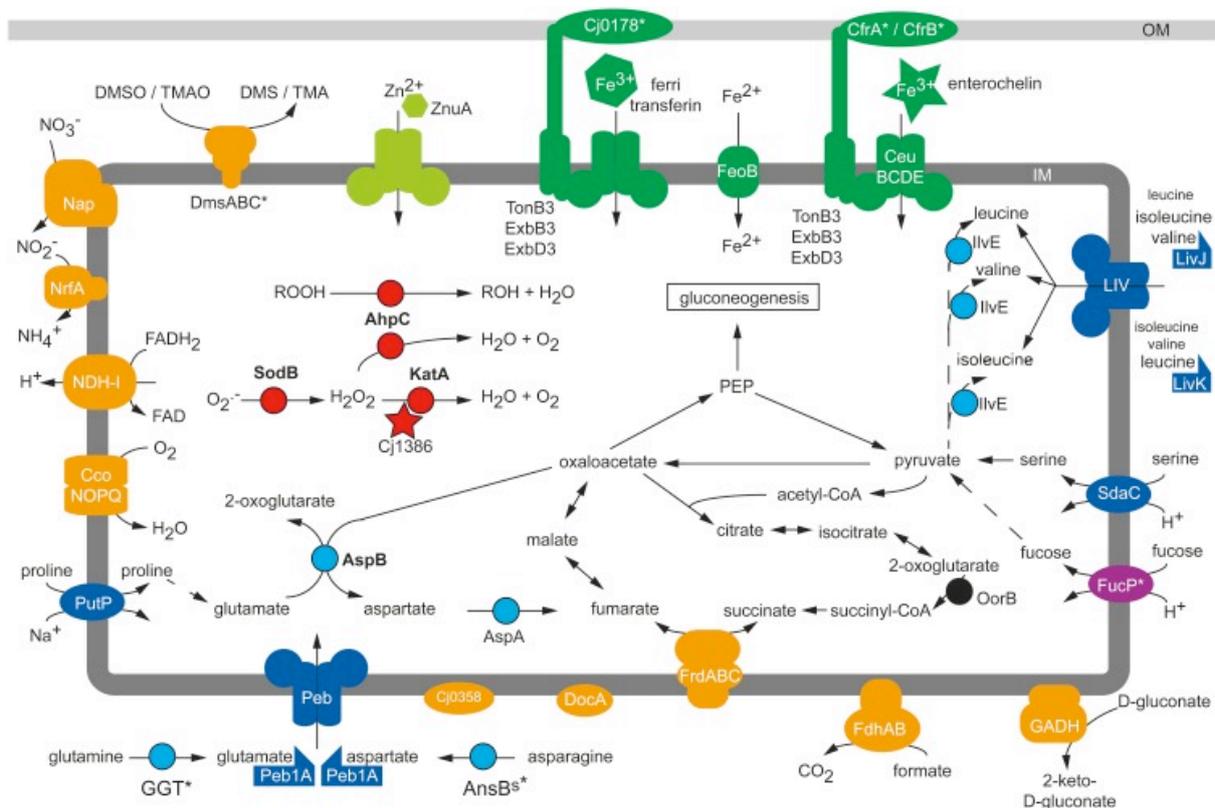


Abb. 2: Schematische Darstellung des *Campylobacter jejuni* Stoffwechsels. Der Aminosäurenmetabolismus ist blau, die reaktive Sauerstoffabwehr ist rot, die Atmungskette ist orange und die Mineralienverwertung ist grün dargestellt. Es werden Komponenten der inneren Membran (IM) und der äußeren Membran (OM) gezeigt. [44]

1.2 Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen wird in ein angeborenes, unspezifisches und ein erworbenes, spezifisches Abwehrsystem unterteilt. Das angeborene Immunsystem hat die Aufgabe, das Eindringen von Erregern in den Körper zu verhindern, bzw. falls sie diese erste Schutzbarriere, wie zum Beispiel Haut, Schleimhaut und Magensäure, überwinden, diese zu zerstören oder die Ausbreitung zu verhindern. Bestandteile des unspezifischen Immunsystems sind die der myeloischen Stammzelle entstammenden Makrophagen und Granulozyten, Natürliche Killerzellen, Zytokine, Akut-Phase-Proteine und das Komplementsystem. [66]

Das erworbene Immunsystem wird weiter unterteilt in eine humorale und eine zelluläre Immunität. Die humorale Immunität wird durch die B-Lymphozyten gebildet und kann als Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen vorliegen. B-Gedächtniszellen werden nach einem ersten Kontakt mit einem Erreger gebildet und differenzieren sich bei erneutem Kontakt zu Plasmazellen. Plasmazellen bilden erregerspezifische Antikörper. Das zelluläre System wird durch die T-Lymphozyten gebildet. Zu den verschiedenen T-Zellpopulationen gehören unter anderem die T-Helferzellen (TH-2), die inflammatorischen T-Zellen (TH-1), die zytotoxischen T-Zellen und die regulatorischen T-Zellen (Treg). Sowohl B- als auch T-Zellen entstammen der lymphatischen Stammzelle und reifen im Knochenmark (B-Zellen) oder im Thymus (T-Zellen) zu immunkompetenten Zellen heran. [66]

1.3 Bakterielle RNA-Chaperone

1.3.1 Arten der Ribonukleinsäure (RNA)

Die Messenger-RNA (mRNA) stellt mit ihrer Basenabfolge die Vorlage für ein Protein dar. An Ribosomen wird die Basenabfolge in eine Aminosäureabfolge translatiert.

Die Transfer-RNA (tRNA) dient bei der Translation als Bindeglied zwischen der mRNA und den Aminosäuren. Am sogenannten Startcodon, welches aus drei Basen besteht, wird eine mit einer spezifischen Aminosäure beladene tRNA über ihr Anticodon, welches der Basenpaarung folgend die passende Basenabfolge hat, gebunden. An den nachfolgenden drei Basen der mRNA, ein Codon, bindet eine weitere spezifische tRNA. Zwischen den von tRNAs gebundenen nebeneinanderliegenden Aminosäuren wird eine Peptidbindung ausgebildet, die Bindung zwischen der ersten tRNA und Aminosäure löst sich, die t-RNA löst sich von der mRNA ab und eine mit einer neuen Aminosäure

beladene t-RNA bindet an das dritte Codon. Die fertige Aminosäuresequenz entsteht über Wiederholungen dieses Vorgangs.

Die Ribosomale-RNA (rRNA) ist ein katalytisch aktiver Bestandteil des Ribosoms. Bei Prokaryonten ist die 16S-rRNA ein Teil der kleinen 30S-Untereinheit des Ribosoms, die 23S-rRNA und die 5S-rRNA sind Teile der großen 50S-Untereinheit des Ribosoms.

Die Small-RNA (sRNA) ist relativ klein, nicht kodierend und übernimmt vor allem regulatorische Aufgaben im Rahmen der Proteinbiosynthese. [66]

1.3.2 RNA-Chaperone

Das Wort Chaperone wird aus dem Englischen mit „Anstandsdame, Aufpasser oder Begleiter“ übersetzt. Im biologischen Sinne ist diese „Aufpasserfunktion“ der RNA-Chaperone im Rahmen der Interaktion zwischen mRNA und sRNA gemeint. Small-RNAs bestehen, wie die Übersetzung bereits andeutet, aus einer relativ kurzen Basenabfolge mit einer Länge von etwa 20-30 Basen. Bei der Interaktion von sRNA und mRNA binden die Nukleinsäuren beider Stränge der komplementären Basenpaarung folgend aneinander. Wenn nicht alle Basen der zwei Stränge komplementär sind, entstehen Lücken in der Bindung zwischen sRNA und mRNA. Durch eine langstreckige komplementäre Basenpaarung können Lücken in der Bindung kompensiert werden. Da sRNAs aufgrund ihrer Länge nur kurze Basenpaarungen eingehen können, können Lücken in der Bindung nicht kompensiert werden und die Bindung zwischen sRNA und mRNA wird instabil. Die Aufgabe von RNA-Chaperonen ist gezielt die Bindung zwischen sRNAs und mRNAs zu stabilisieren und somit je nach Zustand der Zelle eine regulatorische Funktion im Rahmen der Proteinbiosynthese zu übernehmen.

1.3.3 RNA-Chaperone in verschiedenen Bakterien

Im Jahr 1968 wurde das Hfq-Protein in nicht pathogenen *Escherichia coli* (*E. coli*) entdeckt, der für die Vermehrung des Bakteriophagen Q β verantwortlich ist (Host factor for bacteriophage Q = Hfq). [67] Auf die Funktionsvielfalt von Hfq wurde man später aufmerksam, als Hfq-Mutanten in *E. coli* K12 [68] und *Brucella abortus* [69] eine Vielzahl von Phänotypen zeigten, wobei sowohl die Physiologie als auch die Virulenz beeinträchtigt waren. Erst in jüngerer Zeit wurde Hfq die Schlüsselrolle in der Regulation von sRNAs zugesprochen. [70, 71] Bis heute konnte das Hfq-Protein in zahlreichen Organismen identifiziert werden und auch dort seine wichtige regulatorische Aufgabe in der bakteriellen Physiologie nachgewiesen werden. [70, 72]

In *E. coli* und *Salmonellen* zum Beispiel werden bis zu 20% der Gene über Hfq reguliert. [73-75] Hfq ist ein RNA-Chaperon und wirkt meist über die Interaktion mit regulatorischen sRNAs und der entsprechenden Ziel-mRNA auf die posttranskriptionale Regulation.

1.3.4 Detaillierte Funktionen von Hfq

Es gibt mehrere allgemein akzeptierte Mechanismen der Hfq-Regulation. Diese sind in Abbildung 3 dargestellt und werden im Folgenden näher erklärt.

Hfq kann zusammen mit der sRNA die ribosomale Bindungsstelle (RBS) der Ziel-mRNA blockieren, so dass die 30S- und 50S-Untereinheiten des Ribosoms nicht mehr binden können. Der Start der Translation wird hierdurch verhindert. (siehe Abb. 3a) Hfq kann aber auch genau im Gegenteil die Translation aktivieren. Manche mRNAs können über sekundäre Strukturen am 5'-Ende die RBS verbergen [76, 77] und somit die Translation unterdrücken. Ein Komplex aus Hfq und spezifischer sRNA kann die Translation aktivieren, indem sie die RBS aufdecken und eine Bindung der ribosomalen Untereinheiten ermöglichen. [75, 78] (siehe Abb. 3b) Hfq kann eine regulatorische sRNA vor ihrer Spaltung und damit Inaktivierung bewahren. Diese Spaltung erfolgt meistens durch das Enzym Ribonuklease E (RNase E) (siehe Abb. 3c). Im Gegenteil kann Hfq auch die Spaltung einer sRNA und ihrer spezifischen mRNA fördern (siehe Abb. 3d). Ferner kann Hfq auch ohne sRNA eine Spaltung von mRNAs bewirken. Hfq zusammen mit der Poly-A-Polymerase (PAP) sorgt für eine Polyadenylierung am 3'-Ende der mRNA. Ein langer Poly-A-Schwanz ist das Signal für die Exoribonuklease (EXO), die eine Spaltung der mRNA in 3'-5' Richtung bewirkt. [79-82]

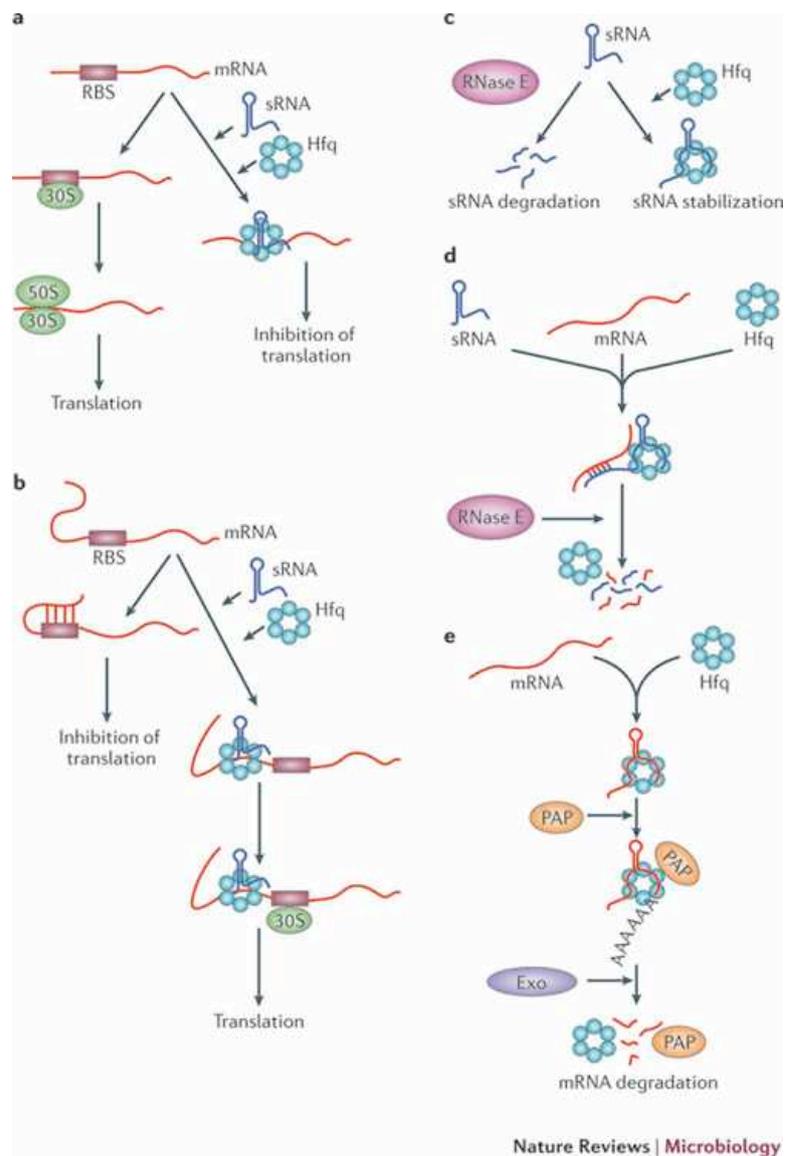


Abb. 3: Detaillierte Darstellung der Hfq-Funktionen. Hfq kann durch Blockierung (a) oder Freilegung (b) der RBS die Translation aktivieren oder blockieren. Hfq kann über sRNA Stabilisierung (c) oder Degeneration (d) regulieren. Zuletzt kann Hfq auch alleine, ohne die Anwesenheit einer sRNA, zur mRNA Spaltung (e) aktivieren. [82]

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Obwohl das Vorhandensein von sRNAs für *C. jejuni* gesichert ist [83], konnten bis heute keine RNA-Chaperone bzw. Hfq-Homologe im Genom des Bakteriums identifiziert werden. [4, 70] Bei der Betrachtung von Genexpression im Vergleich zu tatsächlich entstandenen Proteinen gibt es bei *C. jejuni* Diskrepanzen. So wurden z.B. in einer Untersuchung von Eisenstress auf *C. jejuni* lediglich 10% Übereinstimmung von exprimierten Genen und gemessenen Proteinen gefunden. [84] Diese Unterschiede weisen auf eine intensive posttranskriptionale Regulation hin, die durch RNA-Chaperone bzw. Hfq-Homologen zusammen mit sRNAs katalysiert werden könnten. [4, 85, 86]

In den Vorbereitungen für diese Arbeit wurde das Genom des *C. jejuni*-Stammes NCTC11168 mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes nach potentiellen RNA-Chaperon-Genen unter den folgenden Bedingungen durchsucht: Das Gen sollte häufig transkribiert werden und das kodierte Protein musste eine RNA-Bindungsstelle aufweisen. Das Gen musste auch in der *Helicobacter* Spezies vorhanden sein und die kodierte Aminosäuresequenz sollte zu RNA-Chaperonen anderer Bakterienarten signifikante Homologien aufweisen. Durch die Suche konnten die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* identifiziert werden, die potentielle RNA-Chaperone kodieren könnten.

Es war Ziel dieser Arbeit, mögliche Funktionen der drei potentiellen RNA-Chaperon-Genen durch klassische Mutationsanalyse zu identifizieren. Dazu wurden für jedes der drei Gene *C. jejuni*-Mutanten hergestellt, in denen die Gene defekt waren oder überexprimiert wurden.

Mit diesen Mutanten wurde untersucht, ob die entsprechenden Gene Funktionen haben, die für das Überleben, die Genregulation und die Virulenz des Krankheitserregers essentiell sind.

Um mögliche Funktionen der Gene zu identifizieren, wurden die phänotypischen Eigenschaften der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Bakterium *in vitro* und *in vivo* mikrobiologisch analysiert. Die mögliche Bedeutung der drei Gene für die Virulenz, die Pathogenese und die Immunantwort des Wirtes wurde in zwei etablierten murinen *C. jejuni*-Infektionsmodellen erforscht.

3. Material und Methoden

3.1 Molekularbiologie

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden am Institut of Food Research, Norwich, England durchgeführt.

3.1.1 Material

Tabelle 2: Materialien

Material	Hersteller/ Zusammensetzung
Aqua dest. (destilliert) Wasserfilter	NANOpure Diamond machine; Barnstead
Clean Bench mit Lamina Air flow	CLASS II Exhaust Gen3; Walker
Gefrierschrank	-20°C; Peachman -80°C U410 Premium; New Brunswick Scientific
Gelektrophorese	Horizon 11-14; Life Technologies, Inc. (GIBCO) Power Pac 300; Bio-Rad
Glaswaren	Pyrex borosilicate glass; Corning Incorporated
Feinwaage	E2000D; Sartorius excellence
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	0,2 g KCl (Sigma) + 0,2 g KH ₂ PO ₄ (Sigma) + 8 g NaCl (Sigma) + 1,15 g Na ₂ HPO ₄ (Fisher Scientific) + 1 l Aqua dest.
Petrischalen	90 mm, triple vent; Sterilin
Pipetten	1 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml; GILSON
Pipettenspitzen	1 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml; Starlab
Spektrometer	Bio Mate5; Thermo Electron Corporation
5x TBE (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer); pH 8	54 g Tris (Melford Labs) + 27,5 g Boric Acid (Sigma-Aldrich) + 20 ml 0,5M EDTA (BDH) + Aqua dest. auf 1000 ml
TE (Tris-EDTA-Puffer)	1,21 g Tris (10mM, Melford Laboratories) + 0,37 g EDTA (1mM, Duchefa) + Aqua dest. auf 100 ml
UV Projektor	UVP; ANACHEM
Wasserbad	JB1; Grant
Zentrifuge	5415C; Eppendorf 5810R; Eppendorf Spectrafuge; Jencons
Bebrütung von <i>Campylobacter jejuni</i> (<i>C. jejuni</i>)	
Mikroaerophiles Kabinett	MACS-MG-1000 anaerobic workstation; Don Whitley Scientific (5% O ₂ , 10% CO ₂ , 85% N ₂ , regulär bei 37°C)
Brucella-Bouillon	1 l Aqua dest. + 28 g BBL TM Brucella Broth (BD)
Brucella-Agar	Brucellabouillon + 15 g Agar Bacteriological (Oxoid)
Schüttler	POS-300; Grant-bio
Zellkulturflaschen (Flüssigkulturen)	TPP tissue culture flasks 25 cm ² und 75 cm ² ; Sigma-Aldrich

Bebrütung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	
Brutschrank	Innova 4230 mit Schüttlung; New Brunswick Scientific Jouan EB115EL; Jouan (regulär bei 37°C und Raumluft)
SOC-Bouillon	20 g Bacto-tryptone (Difco) + 5 g yeast extract (Difco) + 0,5 g NaCl (Sigma) + Aqua dest. auf 1000 ml + 10 ml 1M MgCl ₂ (Sigma) + 10 ml 250mM KCl (Sigma) + 27,8 ml 2M D-Glucose (Sigma) alles durch 0,2 µm Filter (Millipore) sterilisiert filtriert
LB-Bouillon	10 g Bacto-tryptone (Difco) + 5 g yeast extract (Difco) + 10 g NaCl (Sigma) + pH-Einstellung auf 7,0 mit NaOH (Sigma) + Aqua dest. auf 1000 ml
LB-Agar	LB-Bouillon + 15 g Agar Bacteriological (Oxoid)
Antibiotika (Nährmedienzusätze)	
Ampicillin sodium salt	100 µg/ml; Melford
Chloramphenicol	25 µg/ml; Sigma-Aldrich
Kanamycin monosulphate	50 µg/ml; Formedium

3.1.2 Generierung des Mutationsplasmides

Die Herstellung der Mutationsplasmide ist beispielhaft in Abb. 4 für das Gen *cj1103* dargestellt und erfolgte mit der Hilfe von zwei PCRs (Polymerase-Kettenreaktion). Mit der ersten PCR wurde jeweils ein Stück des 5'- und des 3'-Endes von *cj1103* (gelb) zusammen mit den jeweils flankierenden Regionen (rot und blau) amplifiziert. Die vom Gen wegzeigenden Primer 2 und 3 (Tabelle 3) wurden so konzipiert, dass sie neben den komplementär bindenden Nukleotiden (schwarz), zusätzliche Nukleotide (pink) enthalten. Mit der zweiten PCR wurden die zwei Fragmente zusammengefügt. Durch die erfolgreiche Amplifikation und Zusammenfügung der zusätzlichen Nukleotide entstand in der Mitte eine *Bam*H1-Restriktionsschnittstelle (5'-GGATCC). Im Anschluss an jede PCR wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick-PCR-Purification-Kit (Qiagen) gereinigt. Es folgte die Einlegierung des Fragmentes in den pGEM®-T-Easy-Vektor mit Hilfe des pGEM®-T-Easy-Kits (Promega). Der Vektor wurde in kompetente *E. coli* Zellen (One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells, Invitrogen) durch Hitzeschock bei 42°C für 30 s (Sekunden) transformiert, in SOC für 90 min (Minuten) angereichert, anschließend auf speziellem LB-Agar ausplattiert und für 13 h inkubiert. Der Vektor pGEM®-T-Easy enthält eine Ampicillinresistenz und ein Gen, das für eine β-Galaktosidase kodiert. Genau das wurde für die Selektion genutzt und dem LB-Agar sowohl Ampicillin als auch X-Gal (0,5 mg, Milligramm, Sigma) zugesetzt. Bei

Einlagerung des PCR-Produktes in den Vektor, wird das β -Galaktosidase-Gen gestört und somit entstehen weiße Kolonien. Hat die Transformation nicht funktioniert, wird X-Gal durch die intakte β -Galaktosidase zersetzt und es entstehen blaue Kolonien.

Es wurde eine weiße Kolonie ausgewählt und mit ihr eine ampicillinhaltige LB-Bouillon beimpft. Nach erfolgreichem Wachstum für 13 h wurde die Bouillon mit dem GenElute™-HP-Plasmid-Midiprep-Kit (Sigma) behandelt. Zur Überprüfung, dass keine Sequenzveränderungen durch die PCRs entstanden sind, wurde das entstandene Midiprep-Produkt durch eine Sequenzanalyse kontrolliert. Anschließend erfolgte das Einligieren des Gens für die Neomycin-Phosphotransferase mit eigenem Promotor durch die *Bam*H1-Restriktionsendonuklease (Invitrogen) und T4-DNA-Ligase (Promega). Dadurch waren alle Mutationsplasmide resistent gegen Kanamycin (Km^R). Der nun komplette Vektor wurde erneut in kompetente *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock transformiert, in SOC angereichert, zur Selektion diesmal auf kanamycinhaltigem LB-Agar ausplattiert und mit einer selektierten Kolonie eine kanamycinhaltige LB-Bouillon beimpft. Diese wurden erneut mittels GenElute™-HP-Plasmid-Midiprep-Kit behandelt und anschließend mittels Sequenzanalyse auf Genauigkeit und Richtung der einligierten Kanamycinkassette analysiert.

Die Mutationsplasmide wurden teilweise von Bruce Pearson (Institute of Food Research, UK) zur Verfügung gestellt.

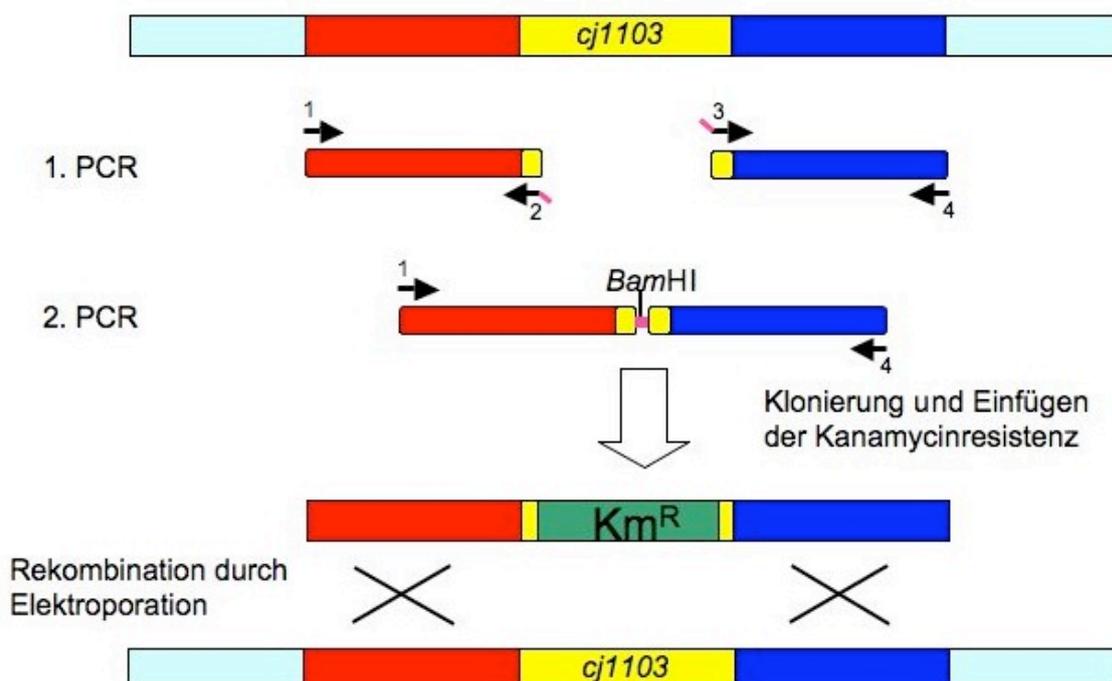


Abb. 4: Schematische Darstellung der Generierung der Mutanten am Beispiel von *cj1103*.

Tabelle 3: Primer zur Herstellung der Mutationsplasmide

Primerbezeichnung	Sequenz
Δ Cj1103-1	5'-AACAAATCATTGATCAAATG
Δ Cj1103-2	5'-GACGCGGATCCGCGTTGGCGCGCCCATCCCTGTTTGAACGACTTT
Δ Cj1103-3	5'-GGCGCGCCAACGCGGATCCGCGTCAGAATGATATTAACCTTGAT
Δ Cj1103-4	5'-AGTTTGGCAAGATATTTGTG
Δ Cj0667-1	5'-ACTCACGCCATGGAGCGATG
Δ Cj0667-2	5'-GACGCGGATCCGCGTTGGCGCGCCATTTATCTACTCTCATAAAAG
Δ Cj0667-3	5'-GGCGCGCCAACGCGGATCCGCGTCATAAAGAGGTTAAGGTAGATG
Δ Cj0667-4	5'-ACCTCCAAGAAATTCCATG
Δ Cj0138-1	5'-CGCAGGTTGTATGGTAACTG
Δ Cj0138-2	5'-GACGCGGATCCGCGTTGGCGCGCCATCTTTGCAAAGGGCTTCAAG
Δ Cj0138-3	5'-GGCGCGCCAACGCGGATCCGCGTCAGCTAGAACCTTTGTGGAGTG
Δ Cj0138-4	5'-TTCTTTACATCTTGATAATG

3.1.3 Generierung des Komplementationsplasmides

Zur Herstellung der Komplementationsplasmide wurde zuerst nach dem oben beschriebenen Schema ein Mutationsplasmid für das Pseudogen *cj0046* hergestellt. Als Unterschiede wurden durch das Einbringen des Gens für die Chloramphenicol-Acetyltransferase eine Chloramphenicolresistenz (Cm^{R}) im Gegensatz zur Km^{R} und *Esp31*-Restriktionsschnittstellen (5'-CGTCTC) anstelle von *Bam*H1 eingebracht (Abb. 5). Unter Verwendung der *Esp31*-Restriktionsendonuklease (Fermentas) und T4-DNA-Ligase (Promega) wurde ein Promotor hinter die Cm^{R} einlegiert. Für das Gen *cj1103* wurde der Promotor *metK* verwendet, für die Gene *cj0667* und *cj0138* der Promotor *fdxA*. Mit *Esp31* (Fermentas) wurde dieser Vektor geöffnet und durch die Zugabe von Antarctic-Phosphatase (New England Biolabs) wurde ein erneutes Verschließen des Vektors verhindert.

Mit Hilfe einer PCR wurden entsprechend die drei Gene, ohne den eigenen Promotor, unter der Verwendung der Primer aus Tabelle 4 amplifiziert. Auch diese Primer wurden so entwickelt, dass sie durch zusätzliche Nukleotide eine Restriktionsschnittstelle, diesmal *Esp31*, generierten. Das Gen wurde hinter den Promotor im geöffneten Vektor durch die T4-DNA-Ligase einlegiert. Der nun komplette Vektor wurde anschließend in kompetente *E. coli* Zellen durch Hitzeschock bei 42°C für 30 s transformiert, in SOC für 90 min angereichert, auf chloramphenicolhaltigem LB-Agar ausplattiert und für 13 h

bebrühtet. Mit einer ausgesuchten Kolonie wurde eine chloramphenicolhaltige LB-Bouillon beimpft und nach 13 h Wachstum mittels GenElute™-HP-Plasmid-Midiprep-Kit behandelt. Mit einer Sequenzanalyse wurden das Produkt und die Orientierung des eingebrachten Gens kontrolliert.

Die Komplementationsplasmide wurden teilweise von Duncan Gaskin (Institute of Food Research, UK) zur Verfügung gestellt.

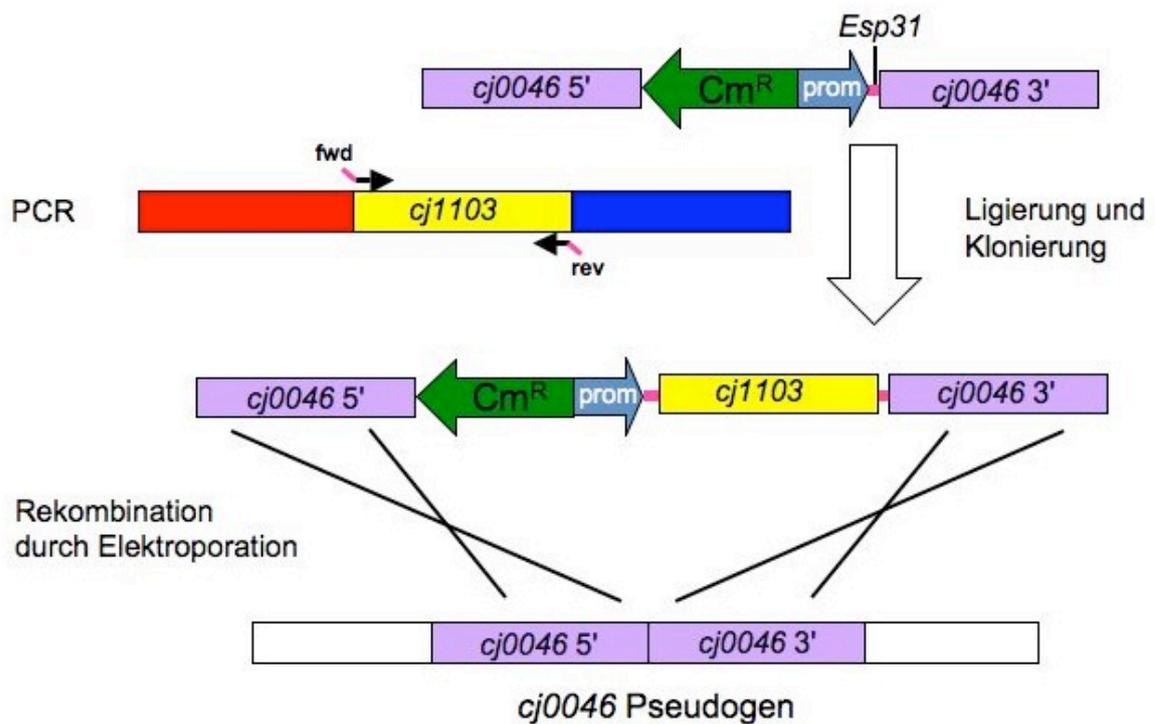


Abb. 5: Schematische Darstellung der Herstellung der Komplementationsplasmide am Beispiel von *cj1103*.

Tabelle 4: Primer zur Herstellung der Komplementationsplasmide

Primerbezeichnung	Sequenz
Cj1103compfwd	5'-TACGTCTCACATGTTAATATTATCAAGAAAAGAAAATGA
Cj1103comprev	5'-TACGTCTCACATGCCTTTGATTAGTTTTTTGCTTAAGTCATCA
Cj0667compfwd	5'-TACGTCTCTCATGAGAGTAGATAAATTTTTAAATGTAGT
Cj0667comprev	5'-ATCGTCTCACATGCCTAATTTTACCACATATTCATTTTGTGCGT
Cj0138compfwd	5'-TACGTCTCACATGTTAATATTATCAAGAAAAGAAAATGA
Cj0138comprev	5'-TACGTCTCACATGCCTTTGATTAGTTTTTTGCTTAAGTCATCA

3.1.4 Herstellung der *C. jejuni*-Stämme (Transformation der Plasmide)

Das Einbringen der Mutations- und/oder Komplementationsplasmide in den *C. jejuni*-Stamm NCTC11168 erfolgte über eine Transformation mittels Elektroporation. Für die

Herstellung der Mutanten wurde das Mutationsplasmid in den *C. jejuni* NCTC11168 Wildtyp eingebracht. Für die Herstellung der Komplementanten wurde das Komplementationsplasmid in die entsprechenden Mutanten eingebracht. Für die Herstellung der Überexpressionsmutanten wurde das Komplementationsplasmid in den *C. jejuni* NCTC11168 Wildtyp eingebracht. Das Genom der Überexpressionsmutanten enthält das jeweilige Gen zweimal, einmal an der Originalposition und einmal an dem Genlokus *cj0046*.

Tabelle 5: Übersicht der generierten Stämme

	Bezeichnung			Resistenzen
Mutante	Δ1103	Δ0667	Δ0138	Kanamycin
Komplementante	1103K	0667K	0138K	Kanamycin und Chloramphenicol
Überexpressionsmutante	Wto1103	Wto0667	Wto0138	Chloramphenicol

Der *C. jejuni* NCTC11168 Wildtyp und die zuvor generierten Mutanten wurden zur Herstellung kompetenter Elektroporationszellen bei -80°C gelagerte, aufgetaut und auf Brucella-Agar ausplattiert. Nach 24 h mikroaerophiler Kultivierung wurden die kultivierten Bakterien mit 2 ml steriler Brucella-Bouillon gelöst, davon jeweils erneut 200 µl auf Brucella-Agar ausplattiert und für 24 h bebrühtet. Der Bakterienrasen wurde erneut mit 2 ml steriler Brucella-Bouillon gelöst und in ein Mikrozentrifugationsgefäß (Eppendorf) überführt. Die Säuberung der Zellen erfolgte durch Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und mehreren Waschschritten mit CCC-Puffer. 100 ml CCC-Puffer bestanden aus 9,31 g Saccharose, 19 g Glycerol (beide Sigma-Aldrich) und Aqua dest. Nach dem letzten Säuberungsschritt wurden die Zellen in 500 µl CCC-Puffer resuspendiert. 100 µl der gewaschenen Zellen wurden zusammen mit 10 µl Plasmid in eine Elektroporationsküvette (EP-202, 2 mm, Cell Projects) überführt und bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF (Gene Pulser 11, Bio-Rad) elektroporiert. Anschließend wurde der Inhalt der Küvette mit 250 µl steriler Brucella-Bouillon auf Brucella-Agar ausplattiert. Nach 5 h Kultivierung wurden die gewachsenen Zellen mit 400 µl steriler Brucella-Bouillon gelöst und auf Brucella-Agar mit Antibiotikazusatz (Kanamycin für Mutanten, Chloramphenicol für Komplementanten und Überexpressionsmutanten) ausplattiert und für zwei bis fünf Tage mikroaerophil bebrühtet. Anschließend wurden Einzelkolonien entnommen, dreifach über Antibiotika-versetzte-Brucellafestmedien passagiert und am Ende 50 ml sterile Brucella-Bouillon beimpft. Nach 13 h Kultivierung wurden die Zellen bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einen

Glycerolbeatstock (Protect, Technical Service Consultants Ltd) überführt und bei -80°C gelagert.

Es erfolgte eine erneute Kontrolle der generierten Stämme mittels PCR aus dem Zellpellet-Rest. Zur DNA-Extraktion wurde der Zellpellet-Rest mit 1 ml PBS gelöst, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das neu entstandene Pellet in 400 µl TE resuspendiert. Es wurden 70 µl 10% SDS (Natriumdodecylsulfat, GIBCO) und 5 µl 10 mg/ml Proteinkinase K (Qiagen) hinzugegeben, alles gemischt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl NaCl (5M Natriumchlorid, Sigma-Aldrich) und 100 µl 10% CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Fluka Biochemika) in 0,7M NaCl hinzugegeben, gemischt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Es wurden 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, Sigma-Aldrich) hinzugegeben, gut gemischt und für 5 min zentrifugiert. Die dabei entstandene, gut abgrenzbare obere wässrige Schicht wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 360 µl Isopropanol (Fisher Scientific) versetzt, durch Schwenken gemischt und bei -20°C für 30 min inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 10 min und Verwerfen des Überstandes, wurde das Pellet mit 500 µl kaltem 70-%igem Ethanol (Sigma-Aldrich) gewaschen. Ethanolreste wurden mit einer Pipette entfernt und das Pellet für 10 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde mit 100 µl TE resuspendiert und mit 1 µl 10 mg/ml RNase (Sigma-Aldrich) bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Lagerung des DNA-Isolates erfolgte bei -20°C.

Die Kontrolle der generierten Stämme erfolgte mittels PCR. Im PCR-Ansatz wurden 0,5 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 10 µl Phusion HF Buffer (beides Thermo Scientific), 1 µl Nukleotidmix (Promega), 1 µl des DNA-Templates, je 1 µl beider Primer (Tabellen 6 und 7) und 35 µl Aqua dest. gemischt. Die PCR wurde nach dem Schema in Tabelle 8 mit 30 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 6: Primer zur Kontrolle der Mutanten

Primerbezeichnung	Sequenz
Cj1103 forcheck	5'-T T A C T C C T T A A G T C T T G A T G
Cj1103 revcheck	5'-A G A T T T G C G C T T G A T T A T T G
Cj0667 forcheck	5'-A T C T T C T T C A G G T G C G T G T G
Cj0667 revcheck	5'-A G G T A A A T A A C C T A T C C C T G
Cj0138 forcheck	5'-G A T T A G A C A A G T G A T C A A T G
Cj0138 revcheck	5'-T T C T A T C A T T T T A A C T A A T G

Tabelle 7: Primer zur Kontrolle der Komplementanten und Überexpressionsmutanten

Primerbezeichnung	Sequenz
Cj0046 Duncan for	5'-GTGTGTGCCGCAGTTATCTG
Cj0046 Duncan rev	5'-TTGTTGAAGATACTTATGTG
Cj1103K for	5'-ATATGCCAAAATAGGCATAG
Cj1103K rev	5'-GGGATTTTGGAGCTTCTATG
Cj0667K for	5'-TGTGTAAAAGTGGTGTAGTG
Cj0667K rev	5'-AAATAGCTCTTCTTTTCGTG
Cj0138K for	5'-TGATGATGAGCTAGTAAGTG
Cj0138K rev	5'-ATATCTCCATTTACAGGTG

Tabelle 8: PCR-Reaktionsablauf

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Primerbindung	Strangverlängerung
1min	30sek	30sek	90sek
98°C	98°C	45°C	72°C

Es wurden 1,3 g Agarose (Melford labs) mit 100 ml 1x TBE zum Sieden gebracht, mit 5 µl Safe-View-Stain (NBS Biologicals Ltd.) vermischt und alles in eine Form zum Aushärten gegossen. Je 15 µl PCR-Produkt und 5 µl 6x-DNA-Loading-Dye (Fermentas) wurden vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Weiter wurden 10 µl TE, 5 µl Loading-Dye und 1 µl GeneRuler™-1-kb-DNA-Ladder (Fermentas) vermischt und ebenfalls aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1xTBE-Puffer über 120 min bei 130 V mittels Gelelektrophorese und die entstandenen Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.5 Wachstumsanalysen

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurde der jeweilige *C. jejuni*-Stamm auf Brucella-Agar ausplattiert und für 24 h mikroaerophil bei einer Gaszusammensetzung von 85% N₂, 5% O₂ und 10% CO₂ kultiviert. Der entstandene Bakterienrasen wurde mit 2 ml steriler Brucella-Bouillon gelöst und zum Ansetzen einer „Übernachtkultur“ wurden 50 ml sterile Brucella-Bouillon mit 500 µl der gelösten Zellen beimpft. Die mikroaerophile Bebrütung der „Übernachtkultur“ erfolgte für etwa 13 h, sodass sich die Zellen im exponentiellen Wachstumsstadium befanden.

Von einem ml der „Übernachtkultur“ wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm im Spektrometer bestimmt. Mit der gemessenen optischen Dichte wurde mit

Hilfe der Formel:

$$\frac{A_{\text{start}} \times V_{\text{start}}}{A_{\text{ÜN}}} = V_{\text{ÜN}}$$

A_{start} : Gewünschte Startdichte (meist 0.05)

V_{start} : zu inokulierende Volumen steriler Brucellabouillon (meist 50ml)

$A_{\text{ÜN}}$: gemessene optische Dichte der „Übernachtkultur“

$V_{\text{ÜN}}$: Volumen der Übernachtkultur, welches zum Beimpfen der sterilen Brucellabouillon genommen wurde, um im gewünschten Volumen die gewünschte optische Dichte zu haben

berechnet, mit welchem Volumen der „Übernachtkultur“ eine definierte Menge steriler Brucella-Bouillon als „Wachstumskultur“ beimpft werden musste, damit das Wachstum aller untersuchten *C. jejuni*-Stämme bei der gleichen optischen Dichte starteten. Das Wachstum wurde durch die anschließende stündliche Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm von je 1 ml „Wachstumskultur“ analysiert.

3.1.6 Analysen in Selektivmedien

Die Grundlage der Mangelmedien bildeten 500ml MEM α (Minimum Essential Medium α , GIBCO) und 0,5 ml FeCl₃ (10mM, Sigma-Aldrich), welche gemischt wurden. Davon wurden jeweils 83 ml erneut mit einem der folgenden fünf Zusätze: 68,0 mg Natriumacetat (BDH), 91,3 mg Natriumpyruvat, 93,0 mg Natriumlaktat, 110,5 mg Asparaginsäure und 87,2 mg L-Serin (die letzten vier Komponenten alle Sigma-Aldrich) gemischt, steril filtriert und bei 4°C gelagert. Unter Berücksichtigung der Molekularen Masse der einzelnen Zusätze waren unterschiedliche Gewichte nötig, um für alle Zusätze die gleiche Molarität von 10mM in den Mangelmedien zu erreichen. Ein sechstes 83 ml Mangelmedium erhielt keinen weiteren Zusatz.

Für die drei *C. jejuni*-Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und den Wildtyp wurden „Übernachtkulturen“ angefertigt, die optische Dichte bestimmt und ausgerechnet mit welchem Volumen der Übernachtkultur 20 ml Selektivmedium beimpft werden müssten um die gewünschte Startdichte von 0,03 herzustellen (siehe 3.1.5). Von jedem Selektivmedium wurden jeweils 20 ml in kleine Zellkulturflaschen überführt und mit dem entsprechenden Volumen der „Übernachtkultur“ beimpft. Es wurden Wachstumskurven für das Wachstum in Selektivmedien durch die stündliche Messung der optischen Dichte analog zu 3.1.5 erstellt.

3.1.7 Autoagglutination

Es wurde jeweils 1 ml der „Übernachtkultur“ (siehe 3.1.5) steril in eine Küvette (10 x 4 x 45 mm Polystyrol, Sarstedt) überführt und diese mit Parafilm-Verschlussfolie (Pechiney

Plastic Packaging) verschlossen. Das Experiment erfolgte bei Raumtemperatur und ruhig, sodass das Aufwirbeln von abgesunkenen Zellen unterblieb. Es erfolgte eine stündliche Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm.

3.1.8 Schwärmphänomen

Das Schwärmphänomen wurde auf weichem 0,4%igem Brucella-Agar getestet. Es wurde mit einem sterilen Holzstäbchen in einen mit *Campylobacter* überwucherten Agar eingestochen und anschließend durch Einstechen in den Schwärm-Agar Zellen übertragen. Nach 2 Tagen (d) mikroaerophiler Bebrütung wurden die Durchmesser der Wachstumszonen gemessen.

3.1.9 Biofilmformation

Für eine Quantifizierung der Biofilmformation wurde zuerst eine „Übernachtskultur“ (siehe 3.1.5) hergestellt. Es wurden 96% sterile Brucella-Bouillon mit 3% Übernachtskultur und Kongorot (1-%ig, Hopkin and Williams Ltd) gemischt. Je 1 ml von dem Gemisch wurde in drei vorbereitete sterile Glasteströhrchen (Corning) gegeben und zwei Tage mikroaerophil ohne Schüttelung inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Glasröhrchen entfernt und zweimal mit Wasser vorsichtig gewaschen ohne dabei den roten Biofilmring mechanisch zu zerstören. Um das Spülwasser komplett zu entfernen, wurden die Röhrchen bei 37°C für etwa eine Stunde getrocknet. Der Biofilmring wurde schließlich in genau 1 ml von 50% Ethanol (Sigma-Aldrich) in PBS gelöst, in eine Küvette überführt und der Biofilm als Absorption bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen.

Es erfolgte die Bestimmung der *C. jejuni*-Konzentration in der „Biofilmkultur“ im Anschluss an die zweitägige Inkubation im Glasteströhrchen. Dafür wurde eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt. Vor dem ersten Waschen bzw. Verwerfen der „Biofilmkultur“ wurden 20 µl von der „Biofilmkultur“ entnommen und in 180 µl steriles PBS überführt und gemischt. Das entsprach einer 1:10 ($1:10^1$) Verdünnung. Für das Anfertigen einer 1:100 ($1:10^2$) Verdünnung wurden 20 µl der $1:10^1$ Verdünnung in 180 µl steriles PBS gemischt. Um eine 1:1000 ($1:10^3$) Verdünnung herzustellen wurden 20 µl der $1:10^2$ Verdünnung erneut in 180 µl steriles PBS gemischt. Nach diesem Schema wurde eine Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von $1:10^8$ hergestellt. Nach jedem Verdünnungsschritt wurde die Pipettenspitze verworfen. Jeweils 50 µl der

Verdünnungen $1:10^6$, $1:10^7$ und $1:10^8$ wurden auf Brucella-Agar ausplattiert und bei 37°C für 48 h mikroaerophil bebrütet. Die Verdünnung, bei der zwischen 30 und 300 klar abgrenzbare *C. jejuni*-Kolonien auf dem Brucella-Agar gewachsen waren, meist die $1:10^7$ Verdünnung, wurde ausgezählt. Mit Hilfe der anderen hergestellten Verdünnungen wurde die Plausibilität des gezählten Ergebnisses überprüft. Die Quantifizierung erfolgte in Kolonie-bildende-Einheiten je ml (KBE/ml), indem die gezählten Kolonien mit 20 multipliziert wurden, da nur $50\ \mu\text{l}$ ausplattiert wurden und sich die Angabe auf einen ml bezieht. Zusätzlich wurde die Anzahl mit der Verdünnung multipliziert, in der die Kolonien gezählt worden waren.

3.1.10 Taxisanalysen

Zur Herstellung der Taxisteströhrchen wurde 0,4 g Agar-Bacteriological (Oxoid) zu 100 ml steriler Brucella-Bouillon gegeben, autoklaviert und anschließend, um vorzeitiges Verfestigen zu vermeiden, in einem 45°C warmen Wasserbad aufbewahrt. Es wurde 1 ml 1% TCC (Fluka) hinzugegeben und alles gut miteinander vermischt. Jeweils 10 ml des endgültigen Gemischs wurden in 15 ml konische Röhrchen (BD Falcon) aliquotiert. Nach etwa 30 min hatte sich der Agar verfestigt und die Taxisröhrchen konnten bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt werden.

Die jeweiligen *C. jejuni*-Stämme wurden auf Brucella-Agar ausplattiert und für ca. 13 h bebrütet. Die gewachsenen Zellen wurden mit 2 ml sterilem PBS gelöst. Mit $50\ \mu\text{l}$ der gelösten Zellen wurde die Oberfläche der Agarsäule des Taxisröhrchen, welches auf Raumtemperatur equilibriert worden war, beimpft. Die Röhrchen wurden mit geschlossenem Deckel bei 37°C und Raumluft aufbewahrt und täglich der Stand der Farbsäule fotodokumentarisch festgehalten.

3.1.11 Wasserstoffperoxidstress

Die einzelnen *C. jejuni*-Stämme wurden auf Brucella-Agar ausplattiert und für ca. 13 h bebrütet. Der Bakterienrasen wurde mit 2 ml Brucella-Bouillon gelöst, die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und die Verdünnung für eine Absorption von 1 errechnet. Durch die Zugabe von Brucella-Bouillon wurde diese Verdünnung hergestellt.

1,5 g Agar-Bacteriological (Oxoid) wurde zu 100 ml steriler Brucella-Bouillon gegeben, autoklaviert und anschließend, um vorzeitiges Verfestigen zu vermeiden, bei 42°C im Wasserbad aufbewahrt. Es wurden 20 ml des 42°C flüssigen Brucella-Agars mit 1 ml

verdünnter Bakterienkultur (Absorption 1) gemischt und in eine sterile Petrischale gegossen. Nach ca. 30 min Abkühlung hatte sich der Agar verfestigt und es wurden sterile Papierscheiben (GE Healthcare) aufgebracht. Auf die Scheiben wurden jeweils 10 µl von 3%, 1% oder 0,1% H₂O₂ (Wassersstoffperoxid 30% verdünnt, Sigma-Aldrich) pipettiert. Auf eine vierte Scheibe wurden als Kontrolle 10 µl PBS aufgebracht. Nach 24 h Inkubation wurden die Hemmhöfe gemessen.

3.2 Material und Methoden für die Analyse der Pathogenität im Tiermodells

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

3.2.1 Material

Materialien, die nicht spezifisch im Text erwähnt werden, sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 9: Materialien

Material	Hersteller
Aqua dest.	Institut für Mikrobiologie
Glaswaren	Schott Duran, Simax
Feinwaage	Sartorius
Gefrierschrank -20°C und -80°C	Liebherr und Sanyo-Fisher Sales
Natriumchlorid	Merck
Mikroskop Zeiss Standard 25	Zeiss
Mikrotiterplatte, unbeschichtet	Nunc
Mörser und Stößel (Porzellan)	Halbenwanger
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA
Petrischalen	Nunc
Pipetten (Multikanal, Multistep, 1 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml)	Eppendorf, Falcon, BD Biosciences
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettierhilfe	Hirschmann
Präparierbesteck	Aesculap/Braun
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Falcon, BD Biosciences
Schüttler	Braun
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments
Plattenzentrifuge	Heraeus Instruments
Tischzentrifuge	Eppendorf

Nährmedien und ihre Bebrütung

Anaerobier-Töpfe	Oxoid
AnaeroGen®	Oxoid
AnaeroTest®	Merck
Brutschrank	Heraeus Instruments
CampyGen®	Oxoid
Columbia Schafsblut Agar	Oxoid
Columbia Schafsblut + CNA	BD Biosciences
Columbia Schafsblut + Kanamycin/ Vancomycin	Oxoid
Karmali Selektivagar	Oxoid
MacConkey Selektivagar	Oxoid
Microbiologica Bactident® Oxidase	Merck
De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) Selektivagar	Oxoid

3.2.2 Versuchstiere

C57BL/6- und C57BL/10-Mäuse wurden bei „The Jackson Laboratories“ (Bar Harbor, USA) kommerziell erworben und im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité - Universitätsmedizin Berlin gehalten und weiter gezüchtet.

Von Professor R. Balfour Sartor (University of Carolina, USA) wurden IL10^{-/-}-Mäuse im 129/SvJ-Hintergrund zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden IL10^{-/-}-Mäuse im C57BL/6- und C57BL/10-Hintergrund verwendet. Diese Mäuse wurden durch Kreuzung der oben genannten C57BL/6 bzw. C57BL/10-Mäuse mit IL10^{-/-}-Mäuse im 129/SvJ-Hintergrund generiert.

Die verwendeten Infektionsmodelle wurden in Mäusen mit dem C57BL/6- und dem C57BL/10-Hintergrund etabliert. Da die Ausprägung der IL10-Colitis vom genetischen Hintergrund der Maus abhängt [87-89], wurden die nötigen Kreuzungen durchgeführt und somit der genannte genetische Hintergrund beibehalten.

Die Versuchstiere wurden ab der 6. Generation in die Experimente aufgenommen.

Die Haltung aller Tiere erfolgte im FEM unter Spezifisch-Pathogenfreien (SPF) Bedingungen bei 21°C Raumtemperatur, 50% relativer Luftfeuchtigkeit und einem 12/12 Stunden Hell-Dunkelrhythmus. Einmal wöchentlich erhielten die Tiere frische Käfige mit Einstreu, sowie Futter und Trinken. Letztere standen den Mäusen während der gesamten Experimentalzeit frei zur Verfügung.

Die Tierexperimente der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des Tierversuchsvorhabens G 0173/07 und des Tötungsantrags T 0114/05 durchgeführt.

3.2.3 Generierung und Haltung gnotobiotischer Mäuse

Eine sterile Haltung und Handhabung der Mäuse ist essentiell für die Generierung gnotobiotischer Mäuse. Hierfür wurden die Mäuse in einem eigenen Tierhaltungsraum in autoklavierten Käfigen und Abdeckhauben gehalten. Durch die Verwendung von Einmal-Kitteln, sterilen Handschuhen, Kopfhäuben und Mundschutz wurde die Arbeit an den Mäusen steril durchgeführt. Gegenstände und Materialien, die mit den Mäusen in Kontakt kamen, wurden zuvor autoklaviert oder entsprechend desinfiziert.

Zur Eradikation der murinen Flora wurde ein Antibiotika-Cocktail, bestehend aus Imipenem (250 mg/l; MSD), Ampicillin (1,5 g/l; Ratiopharm), Vancomycin (500 mg/l; Cell Pharm), Metronidazol (1 g/l; Fresenius) und Ciprofloxacin (200 mg/l; Bayer Vital) in sterilem Trinkwasser aufbereitet und steril filtriert. Der Antibiotika-Cocktail wurde über sterile Trinkflaschen verabreicht und stand den Mäusen im jeweiligen Zeitraum zur freien Verfügung. Um den Erfolg der Eradizierung der murinen Flora zu überprüfen, wurden von den Tieren genommene Faecesproben steril in Thioglykolat-Bouillons (Oxoid) überführt und bei 37°C bebrühtet. Waren in drei aufeinander folgenden wöchentlichen Faeceskontrollen keine Keime kultivierbar, galten die Tiere als keimfrei und somit gnotobiotisch.

3.2.4 Aufbereitung humaner Faecesproben

Die frisch abgesetzte humane Stuhlprobe wurde unter einer Cleanbench mit Lamina-Airflow in ein 500 ml Becherglas überführt und bis zu einem Gesamtvolumen von 300 ml unter Rühren mit PBS versetzt. Zur Sedimentation wurde die Suspension für 15 min bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend jeweils 30-40 ml des Überstandes in sterile 50 ml Falcons überführt. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand in 2 ml Eppendorf-Tubes aliquotiert und bei -80°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen der Stuhlproben wurden serielle Verdünnungen hergestellt und auf entsprechenden Kulturmedien (Universal- und Selektivnährböden) ausplattiert um eine komplexe quantitative Florenanalyse zu erheben. Somit konnte das Vorhandensein enteropathogener Keime wie z.B. *Salmonellen*, *Shigellen*, *Campylobacter*, *Yersinien*, *Clostridium difficile* und enteropathogener *E. coli* ausgeschlossen werden. Ferner wurde der durch das Auftauen bedingte quantitative und qualitative Verlust der einzelnen Bakteriengruppen untersucht. Der quantitative Unterschied betrug maximal eine halbe logarithmische

Stufe, was im Rahmen der Messgenauigkeit der Kultivierungsmethoden als akzeptabel erschien.

3.2.5 Infektion mit *Campylobacter jejuni*

Für die Herstellung der Infektionslösung wurden zuerst je Stamm 100 µl des gelagerten Kryobeatstocks in 1,5 ml steriles PBS eingerührt, gemischt und davon je 100 µl auf Karmali-Agar, etwa 15 Stück pro Stamm, ausplattiert. Nach 48 h mikroaerophiler Bebrütung bei 37°C wurden die noch sichtbaren Einzelkolonien von einer Platte mit einem sterilen Tupfer abgenommen und in 1,5 ml sterilem PBS eingerührt. Daraus wurden erneut je 100 µl auf 10 Karmali-Agar pro Stamm ausplattiert und für 48 h mikroaerophil bei 37°C bebrütet. Es entstanden zu einem Bakterienrasen konfluierend wachsende *Campylobacter*-Kolonien, die zur Herstellung der eigentlichen Infektionssuspension verwendet wurden.

Für jedes zu infizierende Tier wurde der Bakterienrasen einer halben komplett bewachsenen Karmali-Agar mit einem sterilen Tupfer abgenommen und in steriles PBS eingerührt. Das dabei verwendete PBS-Volumen errechnete sich aus der Anzahl der Tiere multipliziert mit 0,45 ml. Mit Hilfe von zwei Sedimentationsschritten wurden klumpige Agar-Reste aus der Suspension entfernt. Durch diese Schritte ging etwa ein Drittel des Volumens verloren, was jedoch im Ansatz berücksichtigt wurde. Jedes Tier wurde mit 0,3 ml der Infektionslösung unter Verwendung einer Gavagiersonde (Roth) per os infiziert.

Ein Volumen von 100 µl jeder Infektionslösung wurde unverdünnt auf CNA-Agar ausplattiert und bei 37°C in normaler Atmosphäre für 48 h bebrütet, um als Sicherheitsstandard eventuelle Kontaminationen zu detektieren.

Die *C. jejuni*-Konzentration jeder Infektionssuspension wurde durch das Anfertigen einer seriellen Verdünnungsreihe bestimmt. Es wurden je 100 µl der Suspension unverdünnt und jeder Verdünnungsstufe auf sowohl Columbia-Agar als auch auf Karmali-Agar ausplattiert und mikroaerophil bebrütet. Für das Anfertigen der 1:100 (1:10²) Verdünnung wurden 100 µl der Infektionslösung in 9,9 ml steriles 0,9-%iges NaCl gemischt. 100 µl der 1:10² Verdünnung wurden erneut in 9,9 ml steriles 0,9-%iges NaCl gemischt, um eine 1:10000 (1:10⁴) Verdünnung herzustellen. Um eine 1:1000000 (1:10⁶) Verdünnung herzustellen, wurden erneut 100 µl der 1:10⁴ Verdünnung in 9,9 ml

steriles 0,9-%iges NaCl gemischt. Nach jedem Verdünnungsschritt wurde die Pipettenspitze verworfen.

Da es sich bei den verwendeten *Campylobacter* um gentechnisch veränderte Stämme handelt, wurde durch das Aufbringen von 1000 µg Kanamycin- und 30 µg Chloramphenicolscheiben (Antimicrobial Susceptibility Test Discs; Oxoid) auf die unverdünnte Columbiaplatte das Vorhandensein der eingebrachten Kassetten kontrolliert.

Die Quantifizierung der auf dem Agar gewachsenen Kolonien erfolgte in Koloniebildende-Einheiten (KBE) je ml nach dem in der folgenden Formel aufgeführten Prinzip:

$$\frac{\text{KBE}}{\text{ml}} = n \times V \times 10$$

n: Anzahl der gezählten Kolonien
V: Verdünnung, in der die Kolonien gezählt wurden
10: Um die ausplattierten 100µl auf die Einheit in ml beziehen zu können, ist eine Multiplikation mit dem Faktor 10 nötig.

Die Anzahl der Kolonien wurden dabei wie folgt gezählt: 1(10⁰), 10 (10¹), 100 (10²), 1000 (10³), beginnend konfluierendes Wachstum (10⁴), konfluierendes Wachstum (10⁵) und eine Überwucherung der Platte (>10⁵). Für eine genauere Quantifizierung des Wachstums wurde die Anzahl letztendlich in viertellogarithmischen Stufen angegeben. Die einzelnen Verdünnungen einer Probe wurden auf Plausibilität überprüft.

3.2.6 Mausmodell 1: humanisierte Gnotobioten

In diesem Modell wurden C57/BL6-Wildtypmäuse nach erfolgreicher Gnotobiotisierung (3.2.3) mit einem, von vier gesunden Erwachsenen stammendem, humanem Florenmix (3.2.4) rekolonisiert. Nach erfolgreicher Rekolonisierung mit humaner Flora erfolgte die Infektion mit den verschiedenen *C. jejuni* Stämmen an drei konsekutiven Tagen (3.2.5). Die murine Flora stellt eine Kolonisationsresistenz für *C. jejuni* dar, welche durch die humane Kolonisierung der Maus aufgehoben werden kann. [90]

3.2.7 Mausmodell 2: IL-10 defiziente Gnotobioten

Für dieses Modell wurden IL10^{-/-} Mäuse (3.2.2) ab dem Alter von drei Wochen, direkt nach dem Absetzen von der Mutter, mit einem Antibiotikacocktail behandelt (3.2.3) und somit keimfrei gemacht. Im Alter von vier bis fünf Monaten wurden die Tiere dann mit

den verschiedenen *Campylobacter jejuni* Stämmen an zwei aufeinander folgenden Tagen infiziert (3.2.5).

IL10^{-/-} Mäuse beginnen im Alter von 4 bis 8 Wochen eine chronische Enterokolitis, welche mit Gewichtsverlust und Anämie einhergeht, zu entwickeln. [91-93] Durch die frühe Antibiotikagabe wurde die Ausbildung der murinen Flora und somit auch die Entwicklung der chronischen Darmentzündung unterdrückt. Die Infektion mit *C. jejuni* führt zur Auslösung einer starken akuten Colitis, welche der humanen Campylobacteriose ähnelt. [94]

3.2.8 „Klinischer Score“

In die Bewertung des „klinischen Scores“ gingen der äußerlich sichtbare klinische Zustand, die Faeceskonsistenz und der Nachweis von Blut im Faeces ein. Hierbei handelt es sich um eine standardisierte Bewertung der Ausprägung einer DSS-Colitis (durch Natriumsulfatdextran induzierte Kolitis), wobei das Kriterium Gewichtsverlust mit dem Kriterium klinisches Erscheinungsbild ersetzt wurde. [95] Für jedes dieser drei Kriterien wurden 0 bis 4 Punkte, nach den in Tabelle 9 aufgeführten Aspekten, vergeben. Für jedes Tier wurde täglich die Summe der drei Kategorien von 0 bis 12 als Klinischer Score ermittelt. Für den Nachweis von Blut im Faeces wurde ein Hämocultttest (Beckman Coulter) mit der nach Greegor modifizierten Guajak-Testmethode durchgeführt. Auf ein mit Guajak-Harz versehenes Filtertestfeld wurde Stuhl gestrichen und die Vorderseite verschlossen. Auf die Rückseite des Testfeldes wurde wasserstoffperoxidhaltige Entwicklerlösung geträufelt. Bei Vorhandensein von Blut im Stuhl kam es zu einem blauen Farbumschlag.

Tabelle 10: Punktezuordnung des Klinischen Scores

Punktwert	Klinischer Aspekt
0	Gesundes Erscheinungsbild
1	Struppiges Fell
2	Struppiges Fell + gekrümmte Haltung
3	Struppiges Fell + gekrümmte Haltung + Isolationsverhalten
4	Präfinales Stadium bzw. Tod
Faeceskonsistenz	
0	Harter, geformter Faeces
1	Weicher, jedoch noch geformter Faeces
2	Weicher, leicht breiiger Faeces
3	Breiiger Faeces
4	Sehr flüssig, wässriger bzw. am Anus klebender Faeces
Haemoccult	
0	Kein Farbumschlag
1	Langsamer, kaum sichtbarer Farbumschlag (in <10% des Feldes)
2	Langsamer Farbumschlag (in <50% des Feldes)
3	Schneller, sofortiger Farbumschlag (in >50% des Feldes)
4	Makroskopisch sichtbares Blut oder Rektumprolaps (Farbumschlag in >75% des Feldes)

3.2.9 Sektion: Tötung und Probenentnahme

Die Tötung der humanisierten Wildtypmäuse (3.2.6) erfolgte 14 Tage und die Tötung der IL10^{-/-}Gnotobioten (3.2.7) erfolgte 8 Tage nach der ersten Infektion durch CO₂-Inhalation. Es erfolgte eine Ganzkörperdesinfektion der Mäuse mit 70% Isopropanol (Sigma-Aldrich) und die Felleröffnung und -entfernung über Thorax und Abdomen. Vollblut wurde durch eine Herzpunktion gewonnen. Nach Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle wurden die Organe nach pathologischen Veränderungen und Auffälligkeiten untersucht und diese gegebenenfalls protokolliert. Leber, Nieren, Milz und mesenteriale Lymphknoten (MLN) wurden mit einem separaten „Organbesteck“ entnommen und in je 0,75 ml PBS überführt. Der komplette Magen-Darmtrakt wurde vorsichtig vom umliegenden Gewebe gelöst, der Länge nach entnommen, ausgebreitet und vermessen. Der Inhalt von einem halben Magen und jeweils einem 1cm langen Stück Duodenum, Ileum und Colon wurde jeweils in 1,5 ml steriles PBS überführt. Dasselbe Stück Duodenum, Ileum und Colon wurde anschließend der Länge nach aufgeschnitten und der pH-Wert mit Pehanon pH-Streifen (Macherey-Nagel) bestimmt. Aus den Darmabschnitten Ileum und Colon wurden jeweils ein weiteres ca. 1 cm langes

Stück für die Organkultur und ein ca. 0,5 cm langes Stück für die PCR-Analyse entnommen, aufgeschnitten und gründlich in PBS gespült. Die verbleibenden Darmstücke wurden in Einbettkassetten (Uni Link, R.Langensbrinck) überführt und in 4% Formaldehyd (Herbeta Arzneimittel) gelagert. Bei den IL10^{-/-} Mäusen wurde zusätzlich die Schwanzspitze für eine Genotypisierung entnommen.

3.2.10 Kinetik, Kolonisation und Translokation

Um den Infektionserfolg und –verlauf zu beobachten wurden an definierten Tagen des Experimentes die *C. jejuni*-Konzentrationen im Faeces der Tiere bestimmt. Für das Erstellen dieser Kinetik wurde Faeces steril in 1,5 ml PBS überführt.

Um die *C. jejuni* Kolonisation der einzelnen Stämme am Sektionstag zu quantifizieren, wurde aus den jeweiligen Darmabschnitten Inhalt entnommen und in PBS überführt. Um eine Translokation von *C. jejuni* aus dem Darm in andere Organe detektieren und quantifizieren zu können, wurden die Organe steril in PBS überführt (3.2.9).

Die anschließende Aufarbeitung dieser entnommenen Proben erfolgte nach einem Schema. Organe, Faeces und Darminhalte wurden mit sterilen Tupfern und anschließender Zentrifugation homogenisiert. Es wurden serielle Verdünnungsreihen (in 3.2.5 beschrieben) angefertigt und auf Karmali und Columbiablut-Agar ausplattiert. Die Platten wurden für 72 h bei 37°C mikroaerophil bebrütet. Die Quantifizierung der gewachsenen Kolonien erfolgte in viertellogarithmischen Stufen und wie in 3.2.5 beschrieben.

Auf die unverdünnten Columbiaplatten wurden zusätzlich 1000 µg Kanamycin- und 30 µg Chloramphenicolscheiben (Antimicrobial Susceptibility Test Discs; Oxoid) aufgebracht. Die entstandenen Hemmhöfen wurden ausgewertet und somit das Vorhandensein der Antibiotikaresistenzen in den gentechnisch veränderten Stämmen kontrolliert.

Neben den Organen wurde auch das Blut auf Translokationen untersucht. Ein Tropfen des mittels Herzpunktion entnommenen Blutes wurde auf Karmali-Agar ausplattiert und der Rest in eine Thioglykolat-Bouillon (Oxoid) überführt. Die Karmali-Festmedium wurde für 72 h bei 37°C mikroaerophil bebrütet. Die Bouillon diente einer Anreicherung und wurde für eine Woche bei 37°C bebrütet. Anschließend folgte ein fraktionierter Drei-Ösen-Ausstrich auf Karmali-, Columbia- und CNA-Agar. Die Translokationsbestimmung mittels Bouillon lässt aufgrund der Anreicherung jedoch keine Quantifizierung, sondern nur den Nachweis von Bakterien im Blut zu.

3.2.11 Analysen der Organkulturüberstände

Der gründlich gespülte 1 cm lange Darmabschnitt wurde bis zur weiteren Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert. Es folgte die Überführung in RPMI 1640 + Glutamax-Kulturmedium (GIBCO/Invitrogen), welches vorher zum Kontaminationsschutz mit 0,01%-Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) versetzt wurde. Die Inkubation wurde bei 37°C und 5% CO₂ für 18 h durchgeführt, der Überstand entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Das verbleibende Organstück wurde gewogen. Die gemessenen Zytokinmengen wurden sowohl auf das Organgewicht als auch auf die gemessene Proteinmenge bezogen.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 35 µl des Organüberstandes mit 100 µl 37-%iger Salzsäure (HCl, Merck) und 25 µl Trichloressigsäure (Merck) gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die entstandene Trübung wurde als Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration konnte über die Absorption in einer aus Bovinem Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) hergestellten Standardkurve abgelesen werden.

Die Bestimmung von IL-6, IL12p70, IFN- γ , TNF- α , MCP-1 und IL10 wurde mit dem BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences) dem Protokoll folgend durchgeführt. Jede Gruppe der im Kit enthaltenen Kugeln (Beads) ist mit einem zytokinspezifischem Antikörper versehen. Durch die Inkubation von antikörpertragenden Beads, im Organüberstand enthaltenen Zytokinen und einem detektierenden Antikörper wurden „Sandwichkomplexe“ gebildet. Diese wurden durchflusszytometrisch am FACS Canto (BD Biosciences) erfasst, wobei die Fluoreszenzintensität für jede Beadgruppe spezifisch ist. Die Fluoreszenzsignale entstehen durch das am detektierenden Antikörper konjugierte Phycoerythrin und sind proportional zur jeweils spezifisch gebundenen Zytokinmenge.

Zur Bestimmung von IL-22 wurde das Quantikine Mouse/Rat IL-22 Immunoassay Kit (R&D Systems) dem Protokoll folgend verwendet. Organüberstände, Standard und Kontrolle wurden in eine mit polyklonalem Maus/Ratte anti-IL-22-Antikörper versehene Mikrotiterplatte überführt. Vorhandes IL-22 wurde durch die Antikörper gebunden. Durch Zugabe eines Enzym-tragenden zweiten anti-IL-22-Antikörpers konnte ein hinzugegebenes Substrat vom Enzym umgesetzt und photometrisch gemessen werden. Die IL-22 Konzentrationsbestimmungen erfolgten über die gemessene optische Dichte des Substrats anhand einer Standardkurve.

Die Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentration der Organüberstände wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Für die Herstellung des Griess-Reagenz wurden 3 g Sulfanilamid (Sigma-Aldrich) mit 18 ml Phosphorsäure (Merck) und 300 ml Aqua dest. gemischt. Zusätzlich wurden in 300 ml Aqua dest. 300 mg N-(1-naphthyl)ethyldiamin (Roth) gelöst und hinzugegeben. 50 µl des fertigen Griess-Reagenz und 50µl des Organkulturüberstandes wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben. Aufgrund der geringen Halbwertszeit von NO erfolgte die Bestimmung über das Stoffwechselprodukt Nitrit, welches zusammen mit N-(1-naphthyl)ethyldiamin zur Bildung eines Azofarbstoffes führt. Dieser konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden. Eine mit Natriumnitrit (Sigma-Aldrich) hergestellte Standardkurve diente der NO-Bestimmung anhand der gemessenen optischen Dichte.

3.2.12 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) zur mRNA Analyse

Das für die mRNA Analysen entnommene 0,5 cm lange, gespülte Darmstück wurde in Flüssigstickstoff (Fa. Messer) schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des peqGold Total RNA Kits (Peqlab Biotechnologie). Die Darmstücke wurden mit ZR Bashing Beads™ (Zymo Research) zerkleinert und homogenisiert. RNAsen wurden inaktiviert. Dem Protokoll folgend wurde aus dem Lysat mit der ersten Säule die genomische DNA gebunden. Aus dem Durchfluss wurde mit der zweiten Säule die RNA gebunden, mit mehreren Waschschrinen mögliche Kontaminanten entfernt und anschließend die RNA mit 40 µl RNase-freiem Aqua bidest. eluiert. Die RNA-Isolate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 11: Oligonukleotidprimer für mRNA-Analysen (hergestellt von der Firma TIB Molbiol)

Primerbezeichnung	Sequenz	Orientierung
HPRT ex7,8 F	5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGT	sense
HPRT as	5'-CACAGGACTAGAACACCTGC	antisense
mu IFN γ se	5'-CATCGCAACAACATAAGCGTCA	sense
mu IFN γ 04	5'-CTCTTCCCCACCCCGAATCA	antisense
IL-6ex3 F	5'-TGATGGATGCTACCAAAGTGGAT	sense
mu IL-6 A	5'-GGTCTTGGTCCTTAGCCACT	antisense
IL-18 S	5'-ACCCCAGACCAGACTGATAATATAC	sense
IL-18 R	5'-GAAGATTCAAACCTCCATCTTGTTG	antisense
IL-22 S	5'-GCTGAAGGAGACAGTGAAAAAG	sense
IL-22 R	5'-AGGAAGGAGCAGTTCTTCG	antisense
IL-23 F'	5'-CCAGCGGGACATATGAATCTAC	sense
IL-23 R''	5'-TGCAAGCAGAACTGGCTGTT	antisense
Muc2 F	5'-CTGGATTGTAACAACACATGTACTTG	sense
Muc2 A	5'-CTCTTCCAACCTGAACAGCC	antisense
TNF α ex3,4 F	5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGCA	sense
TNF α R	5'-CGGCAGAGAGGAGTTGACT	antisense

Tabelle 12: Oligonukleotidsonden für mRNA-Analysen (hergestellt von der Firma TIB Molbiol)

Sondenbezeichnung	Sequenz
HPRT FL-Sonde	5'-AAAGCCTAAGATGAGCGCAAGTTGA
HPRT LC-Sonde	5'-TCTGCAAATACGAGGAGTCCTGTTG
IFN γ FL-Sonde	5'-CATCAGCAACAACATAAGCGTCA
IFN γ LC-Sonde	5'-CATCAGCAACAACATAAGCGTCA
IL-6 FL-Sonde	5'-CATAAAATAGTCCTTCTACCCCAATTTCC
IL-6 LC-Sonde	5'-TGCTCTCCTAACAGATAAGCTGGAGTCAC
IL-18 FL-Sonde	5'-AGGATGCTGAAGTAGGGGAAGC
IL-18 LC-Sonde	5'-CTGCAGGCAGTACAGGACAAGGTC
IL-22 FL-Sonde	5'-CTCAGAGACATAAACAGCAGGTCCAGT
IL-22 LC-Sonde	5'-CCCCAATCGCCTTGATCTCTCCA
IL-23 FL-Sonde	5'-CCCGTATCCAGTGTGAAGATGGTT
IL-23 LC-Sonde	5'-TGACCCACAAGGACTCAAGGACAA
Muc2 FL-Sonde	5'-AGCACCTGCTCTATCTACGGGAGTG
Muc2 LC-Sonde	5'-CCACTACATCACCTTCGACGGGAA
TNF α FL-Sonde	5'-CCCGACTACGTGCTCCTCACCCA
TNF α LC-Sonde	5'-CCGTCAGCCGATTTGCTATCTCATACC

Zur quantitativen RT-PCR Messung wurden die mRNA-Extrakte dem Protokoll folgend mit dem SuperScript™ III Platinum^R One-Step Quantitative-PCR System (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben und im LightCycler (Roche) analysiert. Für den PCR-Ansatz wurden 1 µl RNA-Template, 5 µl 2fach Puffer, je 0,5 µl BSA, Primermix (Tabelle 11), Sonde FL und Sonde LC (Tabelle 12) sowie 0,25 µl MgCl₂, 0,4 µl Enzymmix und 1,35 µl Aqua dest. in einer LightCycler Glaskapillare (Roche) gemischt und im LightCycler (Roche) gemessen. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser eingesetzt. Die Messung erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

Tabelle 13: Reaktionsablauf der RT-PCR

	HPRT	TNF α	IFN γ	IL18	Muc2	IL23p19	IL6	IL22
Reverse Transkription	30min	30min	30min	30min	30min	30min	30min	30min
	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C	55°C	55°C
Initiale Denaturierung	2min	2min	2min	2min	2min	2min	2min	2min
	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Denaturierung	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek	5sek
	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
Primerbindung	7sek	10sek	10sek	10sek	10sek	7sek	7sek	8sek
	58°C	59°C	60°C	57°C	55°C	58°C	59°C	58°C
Strangverlängerung	10sek	9sek	7sek	9sek	7sek	5sek	10sek	5sek
	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C

3.2.13 Genotypisierung der IL10^{-/-} Mäuse

Der Gendefekt jeder Maus wurde an der entnommenen Schwanzspitze kontrolliert. Zur DNA-Extraktion aus dem ca. 0,5 cm langen Schwanzspitzenstück wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) verwendet. Es wurde dem Tissue Protokoll folgend verfahren. Die DNA aus den mit Proteinkinase K lysierten Schwanzspitzen wurde an die QIAamp Säule gebunden und nach 2-maligem Waschen mit 50 µl Aqua dest. eluiert. Die DNA-Extrakte wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Mittels PCR wurde die extrahierte DNA amplifiziert. Die Primerkombination IL-10 L und IL-10 R bindet bei einer vorliegenden IL-10-Mutation, die Kombination IL-10 L und IL-10 neoR bei einem Wildtypzustand. Um auch eine Heterozygotie zu detektieren, wurden jeweils beide PCRs mit den genannten Primerkombinationen durchgeführt (Tab. 13).

Im PCR-Ansatz wurden 0,25 µl BSA (20mg/ml; Fermentas), 2,5 µl MgCl₂, 0,25 µl Ampli Taq DNA Polymerase, 2,5 µl 10fach TBE-Puffer (alle Applied Biosystems), 0,5 µl

Nukleotidmix (Roche), 1 µl des DNA-Templates, 0,25 µl jedes Primers und 17,5 µl Aqua dest. (Sigma) gemischt.

Tabelle 14: Zur Genotypisierung verwendete Primer (TIB Mobiol) und PCR-Reaktionsablauf

IL-10 L	5'-TAGGCGAATGTTCTTCC			sense
IL-10 R	5'-CAGCTCTAGGAGCATGTGGC			antisense
IL-10 neoR	5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTG			antisense
Initiale				Finale
Denaturierung	Denaturierung	Primerbindung	Strangverlängerung	Strangverlängerung
5min	45sek	45sek	1min	5min
95°C	95°C	63°C	72°C	72°C

Es wurden 1,5 g Agarose (Roth) mit 100 ml TBE (1xTris-Borsäure-EDTA-Puffer pH 8; Roth) zum Sieden gebracht und mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) vermischt und alles in eine Form zum Aushärten gegossen. Je 3 µl PCR-Produkt und der Gene-Ruler-100bp-DNA-Ladder-Plus (Fermentas) wurden mit je 3 µl Blaupuffer (Formamid mit je 0,1% Bromphenolblau und Cyanoxylen; Roth) vermischt und auf das 1,5%ige Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1xTBE-Puffer über 45 min bei 120 V mittels Gelelektrophorese (PeqLab). Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid konnten die entstandenen Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.2.14 Histologie

Um Gewebeanalysen durchzuführen, wurden unter der Sektion Darmgewebe der einzelnen Abschnitte entnommen, in Einbettkassetten überführt und mit 4% Formaldehyd fixiert. Im Institut für Pathologie der Charité wurden die fixierten Proben gründlich mit Aqua dest. gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol und Methylbenzoat entfettet und entalkoholisiert, sowie in Parafin eingebettet. Von den Parafinblöcken wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Shandon EXCELSIOR ES, Thermo Electro Corporation; Microm HM355, MICROM) 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger (Menzel-Gläser) über Nacht bei 60°C im Trockenschrank (Mettler) getrocknet und fixiert.

Für die Beurteilung der aufgetretenen Darmpathologien wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der Präparate angefertigt. Dafür wurden die Präparate in Xylol

(J.T.Baker) zweimal für 5 min entparaffiniert, mit einer absteigenden Alkoholreihe (100-%iges, 96-%iges, 80-%iges und 70-%iges Ethanol, Sigma-Aldrich) rehydriert, mit Aqua dest. gewaschen, für drei Minuten mit Hämatoxylin (Merck) gefärbt und erneut gewaschen. Durch das Eintauchen der Präparate in 1-%ige Salzsäure (Merck) erfolgte die Differenzierung des Hämatoxylins. Anschließend wurde zuerst mit Aqua dest., dann für 5 min mit Leitungswasser und erneut mit Aqua dest. gewaschen. Es erfolgte die Färbung mit Eosin (Merck) für 30-60 s, eine Entwässerung mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe und eine Endbehandlung mit Xylol. Die Schnitte wurden mit Entellan (Merck) und einem Deckglas (Menzel-Gläser) versehen und somit haltbar gemacht. Die histopathologische Beurteilung der HE-Schnitte erfolgte unter Verwendung des OVA-Colitis-Scores (Tabelle 15) bei 100- bis 400facher Vergrößerung im Lichtmikroskop.

Tabelle 15: OVA-Score

Punktwert	Morphologische Kriterien
0	Keine Veränderungen
1	Einzelne, isolierte Zellinfiltrate in der Mukosa, keine Epithelhyperplasie
2	Wenige verstreute bis diffuse Zellinfiltrate in Mukosa und Submukosa, schwache Epithelhyperplasie, beginnender Verlust von Becherzellen
3	Zellinfiltrate in Mukosa, Submukosa und vereinzelt transmural, Epithelhyperplasie, Verlust von Becherzellen
4	Zellinfiltrate in Mukosa, Submukosa und häufig schwere transmurale Entzündung, Verlust von Becherzellen und Krypten, schwere Epithelhyperplasie

Für den Nachweis und die Quantifizierung verschiedener Zellpopulationen im Darm wurden immunhistochemische Färbungen der getrockneten und fixierten Präparate durchgeführt. Diese Färbungen sind in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin entstanden. Mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Reaktionen wurden populationstypische Epitope erkannt und die Zellen darüber sichtbar gemacht. Zuerst erfolgte eine Epitop-Demaskierung in Citratpuffer (pH 6) im Schnellkochtopf und anschließend die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen Caspase3 (1:200, Cell Signaling), Ki67 (1:100, DAKO), CD3 (1:20, DAKO), MPO7 (1:400, DAKO) oder B220/CD45R (1:200, ebioscience) für 30min. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper gegen Foxp3 (Forkhead box P3, 1:100, ebioscience) wurde eine Behandlung mit H₂O₂ (3%, Biochrom AG) zur Blockierung der endogenen Peroxidase durchgeführt. Der biotinylierte Esel-anti-Kaninchen-Antikörper (1:200,

Dianova) und der Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper (1:200, DAKO) banden als verwendete Sekundarantikörper an den Primärantikörper. Die tertiäre Struktur, der Enzym-tragende Komplex, war entweder die mit Streptavidin gekoppelte Alkalische Phosphatase (DAKO) oder im Fall von Foxp3 die Envision Peroxidase Anti-Kaninchen (DAKO). Die Peroxidase wurde mittels Diaminobenzidin bzw. mit Fast Red (DAKO) als Chromogen detektiert und sichtbar gemacht. Die angefärbten Zellen wurden in sechs repräsentativen Colonabschnitten in 400facher Vergrößerung gezählt, der Mittelwert gebildet und als Anzahl pro Gesichtsfeld angegeben.

3.3 Statistik und Darstellungen

Bei fast allen erhobenen Datensätzen handelt es sich um Daten einer Intervallskala. [96] Diese Datensätze wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilks Test auf eine vorhandene Normalverteilung der Daten untersucht. Handelte es sich um normalverteilte Datensätze, wurden diese mit der einfachen Varianzanalyse, dem ANOVA Test, statistisch ausgewertet. Für die Post-hoc-Testung wurde der Bonferroni Test angewendet. Handelte es sich um nicht normalverteilte Datensätze, wurde eine statistische Auswertung mit Hilfe des nicht parametrischen Kruskal-Wallis Tests durchgeführt. Anschließend erfolgte eine nicht parametrische Post-hoc-Testung mit Einzelvergleichen durch die Anwendung des Mann-Whitney-U Tests. Da es sich bei diesen mehrfach durchgeführten Mann-Whitney-U Tests nicht um eine Mehrfachtestung im eigentlichen Sinn handelt und diese Testungen ursprünglich so geplant waren, wurde auf eine Bonferroni-Korrektur des p-Wertes bewusst verzichtet.

Im Mausmodell wurden der klinischen Score und der OVA-Score erhoben. Bei beiden handelt es sich um „kategoriale“ Daten einer Ordinalskala. Kategoriale Daten werden mit der Hilfe von nicht-parametrischen Tests analysiert. [96] Analog zu den nicht normalverteilten Daten der Intervallskala, wurden auch hier der Kruskal-Wallis Test, gefolgt von mehreren Mann-Whitney-U-Einzelvergleichen im Rahmen der statistischen Auswertung durchgeführt. Auch hier wurde aus den oben genannten Gründen auf eine Bonferroni-Korrektur des p-Wertes ausdrücklich verzichtet.

Bei den Analysen der Biofilmformation wurde ein zweiter Faktor, die Temperatur, im Experimentalaufbau berücksichtigt. Für die statistische Auswertung des Einflusses der Temperatur auf die Biofilmformation wurde eine zweifache Varianzanalyse, die two-way-ANOVA Testung, durchgeführt.

Eine Plausibilitätsüberprüfung der Ergebnisse erfolgte bei allen Datensätzen vor der statistischen Auswertung. Der Grubbs Test wurde zur Identifizierung und Elimination von „Ausreißern“ im Datensatz verwendet.

Statistik und Graphiken:	GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, LaJolla)
Abbildungen:	PowerPoint (Microsoft)
ELISA-Auswertung:	SERION Evaluate (Virion)
LightCycler Software:	Relquant 1.0 (Roche Molecular Biochemicals)
Foto-Auswertung:	ImageJ 1.440 (National Institutes of Health)

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der phänotypischen Analysen

Um herauszufinden, welche mögliche Bedeutung die *Campylobacter jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für lebenswichtige Funktionen, grundlegende Eigenschaften, den Metabolismus, die Virulenz und den Umgang mit ungünstigen Umgebungsbedingungen haben, wurden mehrere *C. jejuni*-Mutanten, die zunächst *in vitro* phänotypisch charakterisiert wurden, hergestellt.

Die Ergebnisse der phänotypischen Analysen sollten zeigen, welche der generierten *C. jejuni*-Mutanten: *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$), *cj1103*-Komplementante (1103K), *cj0667*-Komplementante (0667K), *cj0138*-Komplementante (0138K), *cj1103*-Überexpressionsmutante (Wto1103), *cj0667*-Überexpressionsmutante (Wto0667) und *cj0138*-Überexpressionsmutante (Wto0138) zusammen mit dem Wildtyp (Wt) anschließend im Tiermodell weiter untersucht werden sollten.

4.1.1 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667*, *cj0138* auf *C. jejuni* bei optimalen Umgebungsbedingungen

Die genetischen Veränderungen in allen generierten *C. jejuni*-Mutanten wurden erfolgreich mittels PCR überprüft und verifiziert (Ergebnisse nicht dargestellt). Anschließend wurden alle *C. jejuni*-Mutanten zusammen mit dem Elternstamm NCTC11168 unter idealen Umgebungsbedingungen untersucht. Dabei wurden das Wachstum, die Zellmorphologie, die generelle Lebensfähigkeit und die Beweglichkeit in einer mikroaerophilen Gaszusammensetzung von 85% N₂, 5% O₂ und 10% CO₂ bei 42°C (Temperaturoptimum von *C. jejuni* [4]) und bei 37°C (standardisierte Untersuchungstemperatur für *C. jejuni* im Labor [4]) analysiert. Brucella-Flüssigmedium enthält alle nötigen Nährstoffe für *C. jejuni* und wurde hier als Standardnährmedium für die kulturellen Analysen verwendet.

Alle *C. jejuni*-Mutanten überlebten unter mikroaerophilen Bedingungen bei sowohl 37°C als auch 42°C (Ergebnisse im Folgenden nicht dargestellt) und zeigten ein suffizientes Wachstum (Abb. 6, 7, 8).

Das bakterielle Wachstum in einem geschlossenen System, wie hier untersucht, ist durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf gekennzeichnet. Der sigmoidale Kurvenverlauf beschreibt eine Anlaufphase (lag), gefolgt von einer exponentiellen Wachstumsphase (log), welche wiederum von einem stationärem Wachstum gefolgt wird. [97] Das Wachstum aller untersuchten *C. jejuni*-Stämme zeigte graphisch annähernd den erwarteten sigmoidalen Kurvenverlauf (Abb. 6, 7, 8).

Da ein Überleben und ein deutliches Wachstum aller untersuchten *C. jejuni*-Stämme unter optimalen Bedingungen gegeben war, wurde das Wachstum detaillierter analysiert. Hierfür wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen untersuchten *C. jejuni*-Stämme jeweils zwischen zwei Messpunkten erhoben. Da es sich um ein geschlossenes System im Versuchsaufbau handelte, wurden lediglich Messpunkte der exponentiellen Wachstumsphase [97] berücksichtigt. Die höchste erreichte Wachstumsgeschwindigkeit von jeder generierten *C. jejuni*-Mutante wurde mit der des Wildtyps verglichen.

Die *cj1103*-Überexpressionsmutante erreichte eine höhere maximale Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp, der *cj1103*-Mutante (beide *** $p < 0,001$) und der *cj1103*-Komplementante (* $p < 0,05$). Die Komplementante 1103K erreichte eine höhere maximale Wachstumsgeschwindigkeit als die Mutante $\Delta 1103$ (* $p < 0,05$) (Abb. 6).

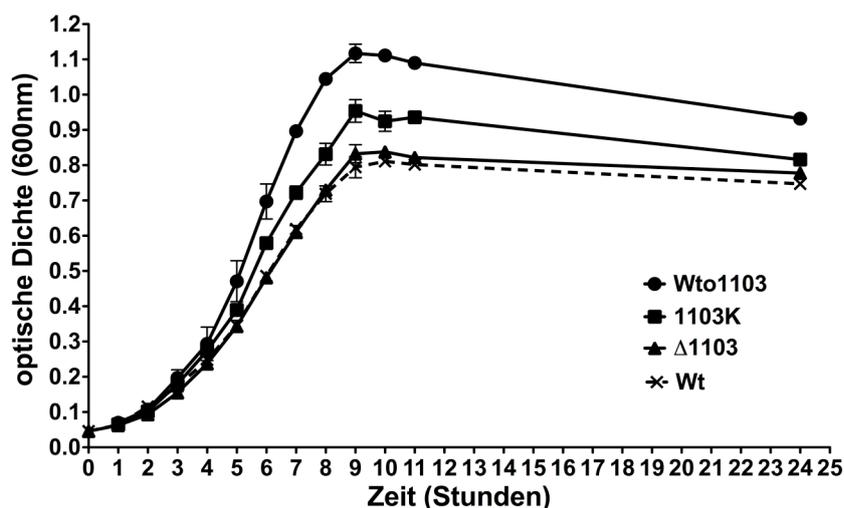


Abb. 6: Wachstumsanalysen der NCTC1168 *C. jejuni*-Stämme: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj1103*-Komplementante (1103K) und *cj1103*-Überexpressionsmutante (Wto1103). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Bei der statistischen Auswertung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten des Wildtyps, der Mutante $\Delta 0667$, der Komplementante 0667K und der Überexpressionsmutante Wto0667 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (Abb. 7)

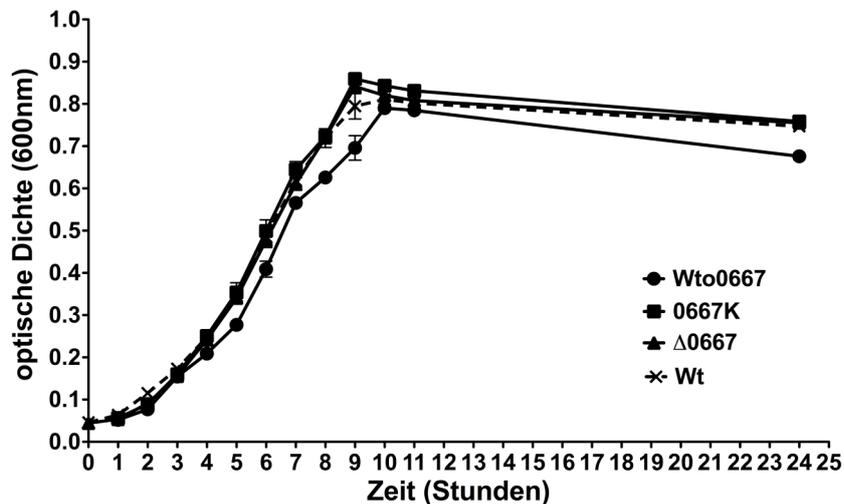


Abb. 7: Wachstumsanalysen der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme Wildtyp (Wt), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0667*-Komplementante (0667K) und *cj0667*-Überexpressionsmutante (Wto0667). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten des Wildtyps, der Mutante $\Delta 0138$, der Komplementante 0138K und der Überexpressionsmutante Wto0138. (Abb. 8)

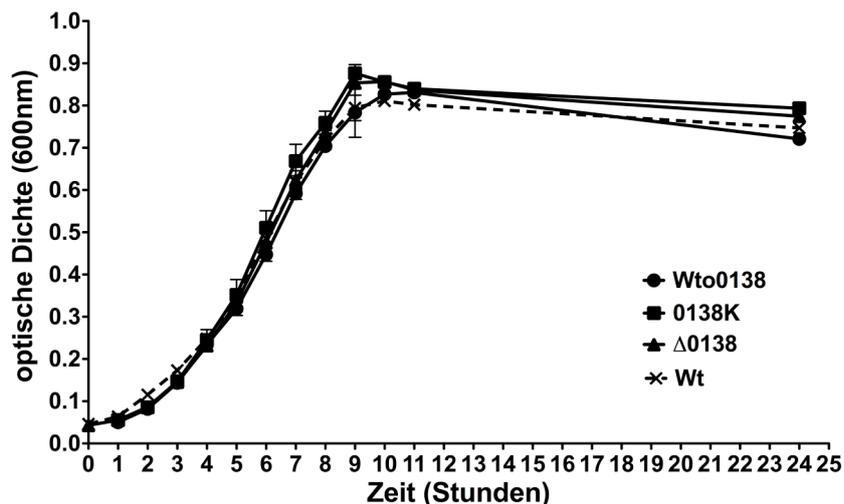


Abb. 8: Wachstumsanalysen der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme Wildtyp (Wt), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$), *cj0138*-Komplementante (0138K) und *cj0138*-Überexpressionsmutante (Wto0138). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Die Beweglichkeit aller generierten *C. jejuni*-Stämme wurde unter dem Lichtmikroskop analysiert. Es wurden verschiedene Wachstumsstadien der in Brucella-Bouillon kultivierten *C. jejuni*-Mutanten untersucht. Die Vitalität der unterschiedlichen Wachstumsstadien in den Brucella-Flüssignährmedien wurde ebenfalls überprüft und verglichen. Es konnten keine Unterschiede in der Vitalität, der Beweglichkeit oder in der Bewegung zwischen dem Wildtyp und den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$, den Komplementanten 1103K, 0667K, 0138K und den Überexpressionsmutanten Wto1103, Wto0667, Wto0138 gefunden werden. Die Zellmorphologie von Kolonien, die auf Brucella-Agar gewachsen waren, wurde ebenfalls untersucht. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den genannten *C. jejuni*-Stämmen. (Ergebnisse nicht dargestellt)

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für das Wachstum, das Überleben und die Beweglichkeit von *C. jejuni* nicht benötigt werden. Eine Überexpression des Gens *cj1103* hatte jedoch eine signifikante Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit zur Folge.

4.1.2 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667*, *cj0138* auf den *C. jejuni*-Metabolismus

Im *C. jejuni*-Katabolismus werden vor allem Aminosäuren, organische Säuren, Pyruvat und Acetyl-CoA für die Energiegewinnung verwendet. In Kapitel 1.1.6 und Abbildung 2 sind die dafür relevanten Stoffwechselwege von *C. jejuni* detailliert beschrieben und aufgeführt. [4, 44, 63] Um zu untersuchen, ob die *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* oder *cj0138* eine Rolle für den Stoffwechsel spielen, wurden Wachstumsanalysen in Mangelmedien durchgeführt. Als Grundlage für die Mangelmedien wurde das definierte Vollmedium MEM α verwendet. Hierbei handelt es sich um ein kommerziell erworbenes Flüssignährmedium, welches alle wichtigen Nährstoffe in minimalen Konzentrationen enthält, sodass ein Überleben gerade möglich sein sollte. Zu MEM α wurde in jedem Fall 10 μM Fe $^{3+}$ gegeben, da Eisen ein essentielles Spurenelement [98] und nicht ausreichend in MEM α enthalten ist. Neben der Wachstumsanalyse in MEM α und Eisen, wurden weitere Wachstumsanalysen unter der zusätzlichen Zugabe jeweils eines Nährstoffes durchgeführt. Jeder dieser Nährstoffe lag in dem Selektivmedium mit einer Molarität von 10mM vor und stand somit dem *C. jejuni*-Metabolismus im Überfluss zur Verfügung. Zugegeben wurden die Aminosäuren L-Serin und Asparaginsäure.

Asparaginsäure dissoziiert in Wasser zu Aspartat. Ferner wurden Pyruvat und Acetat, die von *C. jejuni* aus der Umgebung aufgenommen werden können, hinzugegeben. Acetat wird im Rahmen des Stoffwechsels zu Acetyl-CoA umgewandelt und dem Citratzyklus zugeführt. [44] Zuletzt wurde die organische Säure Laktat als Zusatz zur Vervollständigung des sechsten Selektivmediums hinzu gegeben. Es wurde das Wachstum des *C. jejuni* NCTC11168 Wildtyp und der Mutanten Δ 1103, Δ 0667, Δ 0138 in allen sechs Selektivmedien untersucht und miteinander verglichen.

Wie erwartet, zeigte der *C. jejuni*-Wildtyp ein „normales“ Wachstum in allen Selektivmedien (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieses „normale“ Wachstum war wie bei den Wachstumsanalysen in Brucella-Bouillon durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einer Anlaufphase, gefolgt von einer exponentiellen Wachstumsphase und einem stationärem Wachstum gekennzeichnet. [97]

Die Mutanten Δ 1103, Δ 0667 und Δ 0138 zeigten alle ein ähnliches Wachstum untereinander und ein ähnliches Wachstum wie der Wildtyp in allen sechs Selektivmedien (Ergebnisse nicht dargestellt). Da das Wachstum in den Selektivmedien der vier *C. jejuni*-Stämme Wt, Δ 1103, Δ 0667 und Δ 0138 sich sehr ähnlich darstellte und sich keine Auffälligkeiten im ersten unabhängigen Experiment zeigten, wurde auf die Durchführung eines zweiten und dritten Experimentes aus wirtschaftlichen Gründen verzichtet. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für Funktionen im Eisen-, Pyruvat-, Laktat-, Acetat-, Aspartat- oder Serin-Stoffwechsel von *C. jejuni* NCTC 11168 nicht benötigt werden.

4.1.3 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf das *C. jejuni*-Überleben unter pessimalen Umgebungsbedingungen mittels Autoagglutinationsanalysen

Das Wort Autoagglutination beschreibt die „Verklumpung“ einzelner Zellen zu einem Zellkonglomerat. [99] Zellkonglomerate sind schwerer als einzelne Zellen und sinken schneller der Schwerkraft folgend auf den Boden einer Flüssigkeit. In den hier durchgeführten Autoagglutinationsanalysen wurden die abgesunkenen Zellkonglomerate durch die spektrometrische Messung am Boden einer Küvette nachgewiesen und quantifiziert. Alle generierten *C. jejuni*-Mutanten wurden in Brucella-Flüssigmedium, unter mikroaerophilen Bedingungen (85% N₂, 5% O₂, 10% CO₂) und bei 37 °C bis zu einer spätexponentiellen Wachstumsphase kultiviert und anschließend in eine Küvette überführt. Mit dem Überführen der Bakterienkulturen in die Küvetten wurden die Umgebungsbedingungen von optimal auf pessimal abrupt geändert. Die

Küvetten wurden bei pessimalen etwa 20°C Raumtemperatur und einer atmosphärischen Gaszusammensetzung (78% N₂, 21% O₂, 0,04% CO₂) gelagert. Diese ungünstigen Extrembedingungen führen zum Verklumpen bzw. zur Autoagglutination und letztendlich zum Absterben der *C. jejuni*-Zellen. Die Autoagglutinationsanalysen wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob die Gene *cj1103*, *cj0667* oder *cj0138* eine Rolle für das Überleben von *C. jejuni* unter pessimalen Extrembedingungen spielen.

Alle *C. jejuni*-Stämme zeigten eine Autoagglutination. Ferner zeigten alle einen für das hier verwendete geschlossene System typischen Hyperbel-Kurvenverlauf. Für die statistische Auswertung wurde die maximal erreichte Sedimentierungsgeschwindigkeit der einzelnen *C. jejuni*-Stämme bestimmt und miteinander verglichen.

Die *cj1103*-Mutante (Δ 1103) zeigte eine schnellere Sedimentierung im Vergleich zu dem Wildtyp (Wt), der *cj1103*-Komplementante (1103K) und der *cj1103*-Überexpressionsmutante (Wto1103) (alle *** $p < 0,001$). Zusätzlich zeigte sich eine schnellere Autoagglutination von Wt im Vergleich zu Wto1103 (* $p < 0,05$). In der Graphik (Abb. 9) ist ebenfalls ein langsames Sedimentieren der Überexpressionsmutante Wto1103 und ein schnelleres Sedimentieren des Wildtyps im Vergleich zur Komplementante 1103K zu sehen. Diese zwei Unterschiede zeigten im Rahmen der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede. Die Komplementante 1103K zeigte eine hohe Standardabweichung in den Wiederholungen (Balken in Abb. 9). Diese ist ausschlaggebend dafür, dass trotz der deutlich sichtbaren unterschiedlichen Kurvenverläufe keine signifikanten Unterschiede statistisch festgestellt werden konnten. Eine Wertung als Tendenz wurde vorgenommen.

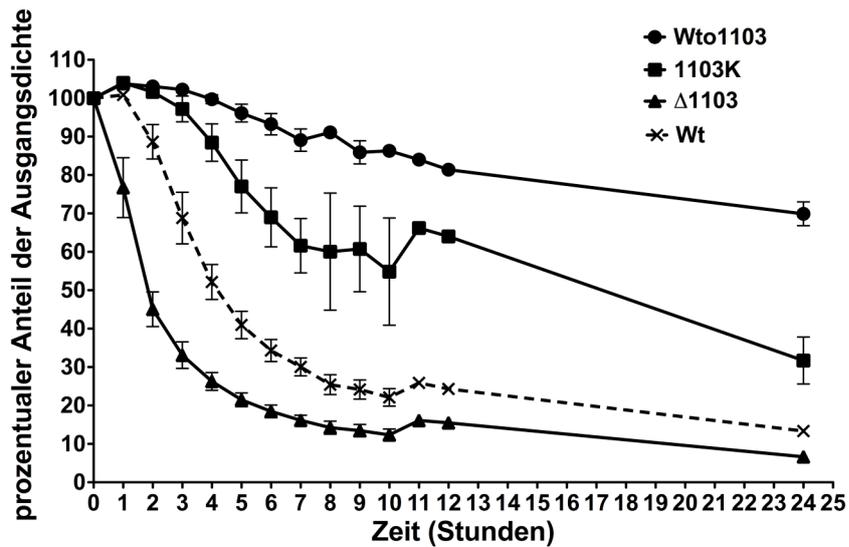


Abb. 9: Autoagglutination der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj1103*-Komplementante (1103K) und *cj1103*-Überexpressionsmutante (Wto1103). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den maximalen Sedimentierungsgeschwindigkeiten der *C. jejuni*-Stämme Wt, $\Delta 0667$, 0667K und Wto0667 nachgewiesen werden. Die in Abbildung 10 dargestellten Kurven zeigen eine ähnliche Form.

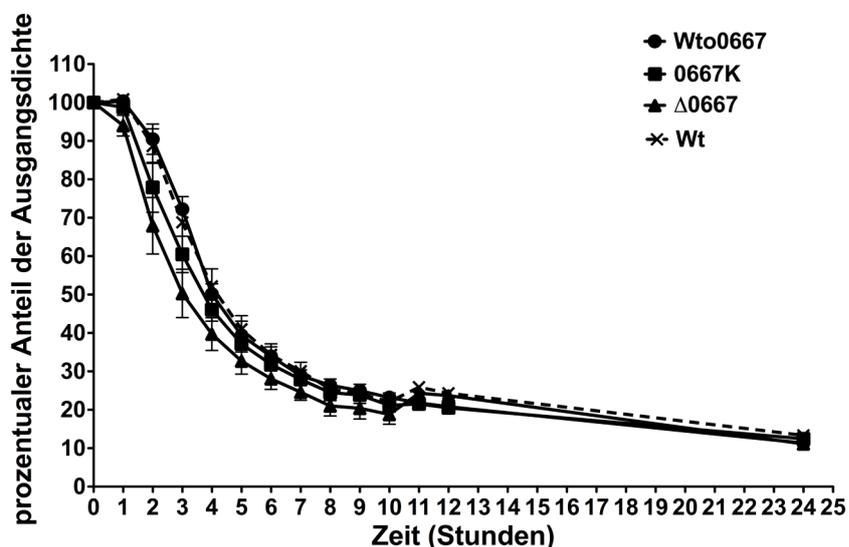


Abb. 10: Autoagglutination der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme: Wildtyp (Wt), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0667*-Komplementante (0667K) und *cj0667*-Überexpressionsmutante (Wto0667). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Die Mutante $\Delta 0138$ zeigte eine signifikant schnellere Autoagglutination im Vergleich zu Wt (** $p < 0,01$). Weitere Unterschiede in den Senkungsgeschwindigkeiten bei dem Vergleich der *C. jejuni*-Stämme Wt, $\Delta 0138$, 0138K und Wto0138 konnten nicht nachgewiesen werden. (Abb. 11)

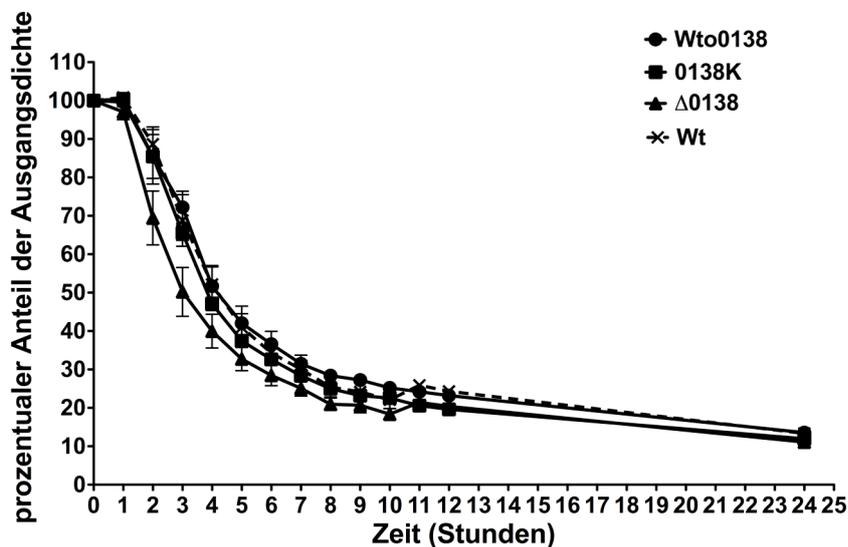


Abb. 11: Autoagglutination der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme: Wildtyp (Wt), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$), *cj0138*-Komplementante (0138K) und *cj0138*-Überexpressionsmutante (Wto0138). Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Gene *cj1103* und *cj0138* für die Autoagglutination von NCTC11168 *C. jejuni* essentiell sind. Das Gen *cj0667* spielt keine Rolle für die Autoagglutination von *C. jejuni*. Da mit der Autoagglutination auch die Überlebensfähigkeit von *C. jejuni* unter pessimalen Umgebungsbedingungen verbunden ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Gene *cj1103* und *cj0138* für das Überleben von *C. jejuni* unter ungünstigen Umgebungsbedingungen benötigt werden.

4.1.4 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf das Schwärmen

Das Schwärmen ist eine ungeordnete oder geordnete aktive Bewegung eines Schwarms bzw. einer Menge gleichartiger Lebewesen. Das Schwärmen ist eine Grundfunktion der *Campylobacter* Spezies. [100] Zur Überprüfung dieser Grundfunktion wurde die Testung des Schwärmens bei allen generierten *C. jejuni*-Stämmen auf weichem (4%igem) Brucella-Agar durchgeführt. Die entstandenen kreisförmigen Schwärmzonen wurden gemessen und statistisch analysiert.

Alle untersuchten *C. jejuni*-Stämme zeigten ein Schwärmverhalten.

Abbildung 12A zeigt die Schwärmzonen der *cj1103*-Mutante, der *cj1103*-Komplementante und der *cj1103*-Überexpressionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Bei der statistischen Auswertung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In dem angefertigten Foto (12A) sind die Schwärmzonen von $\Delta 1103$, 1103K und Wto1103 augenscheinlich kleiner als die Schwärmzone von Wt. Im Rahmen der Wiederholungen entstanden Schwankungen der gemessenen Schwärmzonen, wodurch die Standardabweichungen größer als die Unterschiede in den Schwärmzonen waren. Deswegen führte die statistische Auswertung zu einem nicht signifikanten Ergebnis. Die Beobachtungen können lediglich als Tendenzen gewertet werden.

Abbildung 12B zeigt die Schwärmzonen der *cj0667*-Mutante, der *cj0667*-Komplementante und der *cj0667*-Überexpressionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Schwärmverhalten von $\Delta 0667$, 0667K, Wto0667 und Wt.

Abbildung 12C zeigt die Schwärmzonen der *cj0138*-Mutante, der *cj0138*-Komplementante und der *cj0138*-Überexpressionsmutante im Vergleich zum Wildtyp. $\Delta 0138$, 0138K, Wto0138 und Wt zeigten keine signifikanten Unterschiede im Rahmen der statistischen Auswertung der Schwärmzonen. Die Schwärmzone von $\Delta 0138$ ist augenscheinlich kleiner als die anderen Schwärmzonen im angefertigten Foto (12C). In den Wiederholungen zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Standardabweichungen der Wiederholungen waren ebenfalls größer, als der gemessene Unterschied der Schwärmzonen. Deswegen führte die statistische Auswertung zu einem nicht signifikanten Ergebnis.

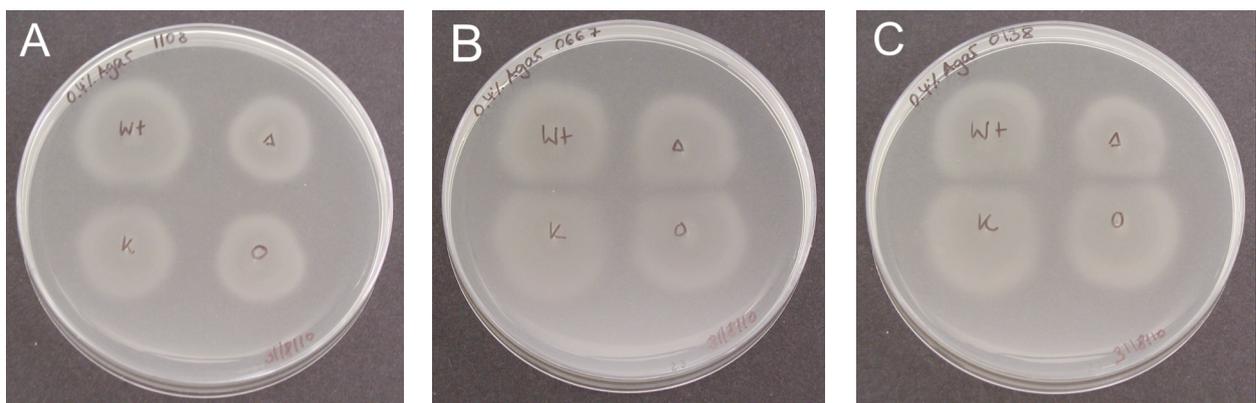


Abb. 12: Schwärmen der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme Wildtyp (Wt) oben links und der hergestellten Mutanten (Δ) oben rechts, Komplementanten (K) unten links und Überexpressionsmutanten (O) unten rechts der Gene *cj1103* (A), *cj0667* (B) und *cj0138* (C). Dargestellt ist ein ausgewähltes Exemplar aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Obwohl die Gene *cj1103* und *cj0138* eine Rolle für das Schwärmen von NCTC11168 *C. jejuni* spielen könnten, sind weitere Untersuchungen zur Bestätigung nötig, da nur Tendenzen und keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden konnten. Zum jetzigen Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass das Gen *cj0667* keine Rolle und die Gene *cj1103* und *cj0138* wahrscheinlich keine Rolle für die Grundfunktion Schwärmen von NCTC11168 *C. jejuni* spielen.

4.1.5 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die temperaturabhängige *C. jejuni*-Biofilmbildung

Um eine humane Campylobacteriose auslösen zu können, muss *C. jejuni* teilweise extreme und sehr unterschiedliche Umweltbedingungen überleben. Der „klassische“ Infektionsweg startet dabei im aviären Gastrointestinaltrakt und geht weiter über die gekühlte Lagerung des Geflügelfleisches im Supermarkt, mit anschließender Erhitzung bei der Geflügelfleischzubereitung in der Küche, bis zum humanen Gastrointestinaltrakt nach dem Verzehr des nicht ausreichend erhitzten Geflügelfleisches. Eine Möglichkeit diese ungünstigen und teilweise schnell wechselnden Bedingungen überleben zu können, ist die Ausbildung von Biofilmen. [40] Deswegen wurde untersucht, ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Rolle in der Biofilmbildung von *C. jejuni* spielen. Es wurde die Fähigkeit der Biofilmbildung der Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und des Wildtyps bei 37°C (standardisierte Laborbedingungen) und bei 42°C (Temperaturoptimum von *C. jejuni* [4]) analysiert.

Die untersuchten *C. jejuni*-Stämme Wt, $\Delta 1103$, $\Delta 0667$ und $\Delta 0138$ zeigten alle die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen sowohl bei 37°C als auch bei 42°C. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den gebildeten Biofilmmengen dieser Stämme weder bei 37°C, noch bei 42°C. (Abb. 13A) Alle untersuchten Stämme bildeten einen größeren Biofilm bei 42°C im Vergleich zu 37°C (** $p < 0,001$).

Es gibt unterschiedliche Definitionen des Biofilms. Allen gemein ist, dass es sich bei den Biofilm-bildenden Zellen um lebende Zellen bzw. lebensfähige Zellen handeln muss und nicht etwa um einzelne haftende, nicht wachsende oder geschädigte Zellen, welche durch simple physiochemische Prozesse einer Oberfläche anhaften. [40] Im Rahmen der Biofilmanalysen erfolgte eine Überprüfung, ob es sich tatsächlich um lebendige Bakterienzellen in den gemessenen vermeintlichen Biofilmen handelte und diese somit tatsächlich als Biofilm deklariert werden durften.

In allen gemessenen Biofilmen wurden ähnliche Konzentrationen an lebenden Bakterien gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den *C. jejuni*-Stämmen Wt, $\Delta 1103$, $\Delta 0667$ und $\Delta 0138$ bei 37°C oder bei 42°C gefunden werden. Ferner zeigten sich auch keine unterschiedlichen Mengen lebensfähiger Bakterien bei einem Gesamtvergleich zwischen 37°C und 42°C. (Abb. 13B)

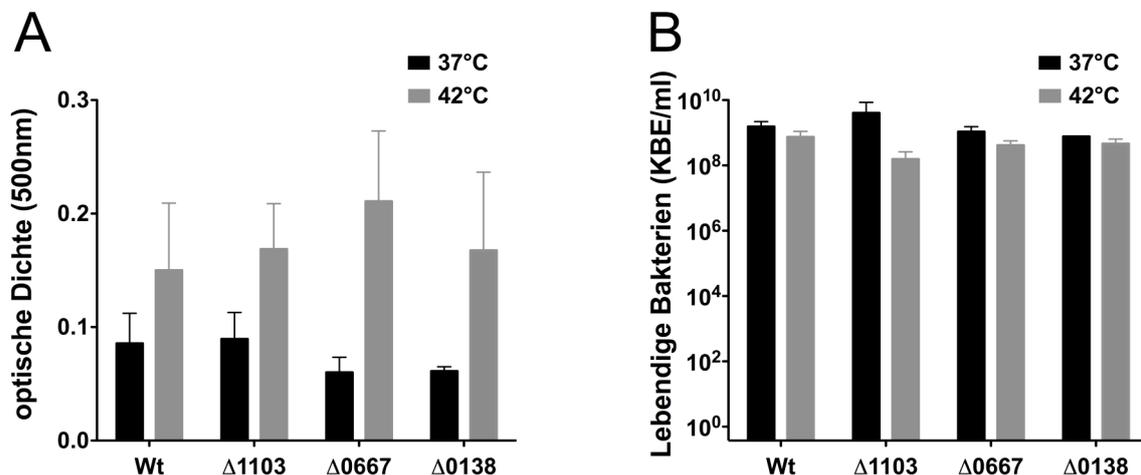


Abb. 13: Biofilmbildung (A) und *C. jejuni*-Konzentrationen (B) bei 37°C (schwarze Balken) und 42°C (graue Balken) der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$) und *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$). Dargestellt sind die Mittelwerte der optischen Dichte des bei 500nm gemessenen Kongorots (A) und die Mittelwerte der *C. jejuni*-Konzentrationen (B). Die Ergebnisse kommen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils dreifacher Ausfertigung. Die Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Rolle bei der Biofilmbildung bei 37°C oder 42°C von NCTC11168 *C. jejuni* spielen. Anhand der Beobachtungen kann jedoch angenommen werden, dass *C. jejuni* NCTC11168 temperaturabhängig mehr Biofilm bei 42°C im Vergleich zu 37°C aus einer ähnlichen Anzahl von Individuen bilden kann.

4.1.6 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die *C. jejuni*-Taxis

C. jejuni ist einem schnellen Wechsel der Umgebungsbedingungen ausgesetzt. Eine schnelle Adaptation an diese wechselnden Bedingungen ist essentiell für das Überleben. Im Rahmen der Taxis geht es zum einen um das Erkennen der Umgebungsbedingungen und zum anderen um eine gerichtete Bewegung weg von ungünstigen bzw. hin zu vorteilhaften Umgebungsbedingungen. [101]

Im Taxisexperiment wurde *C. jejuni* in einer mikroaerophilen Umgebung (85% N₂, 5% O₂, 10% CO₂) kultiviert und anschließend auf die Oberfläche des Taxisröhrchens

überführt. Die Taxisröhrchen wurden bei Raumluft (78% N₂, 21% O₂, 0,04% CO₂) gelagert. Somit wurde zum einen eine gerichtete Bewegung weg von einer O₂-reichen Umgebung zu einer O₂-ärmeren Umgebung am Taxisröhrchenboden untersucht. Die Bewegung konnte an Hand eines roten Farbumschlages verfolgt werden, welcher durch lebende Bakterien generiert worden war. Zum anderen wurde mit dem Versuchsaufbau eine Energietaxis untersucht. Bei der Energietaxis waren die Nährstoffe bzw. deren Knappheit ausschlaggebend für die aktive Bewegung. [102]

Es wurden alle generierten *C. jejuni*-Mutanten im Taxisexperiment analysiert. Taxisgeschwindigkeiten der einzelnen *C. jejuni*-Stämme wurden erhoben und miteinander verglichen. Zum einen wurden die Geschwindigkeiten zwischen allen Messpunkten bestimmt, gemittelt und als Durchschnittsgeschwindigkeit über den Zeitraum von 96 Stunden angegeben. Zum anderen wurde die absolute Taxisgeschwindigkeit zwischen den Messpunkten 24 Stunden und 48 Stunden bestimmt und miteinander verglichen. Diese zweite Betrachtung erfolgte vor allem, da es sich bei dem Experimentalaufbau um ein geschlossenes System handelte. Durch das Erreichen des Taxisröhrchenbodens war eine weitere Fortbewegung nicht möglich. Wiederholungen zeigten, dass die ersten 24 Stunden zur Äquilibration nötig waren. Die darauf folgenden 24 Stunden waren am besten für die optimale Entfaltung der Taxis der *C. jejuni*-Stämme geeignet.

In allen Wiederholungen erreichte der Wildtyp als Erster den Boden, danach ähnlich schnell die *cj1103*-Mutante (Δ 1103) und die *cj1103*-Komplementante (1103K). Die *cj1103*-Überexpressionsmutante (Wto1103) war am Langsamsten und erreichte den Boden des Röhrchens innerhalb der 96 Stunden nicht. (Abb. 14 A-D)

Über den Zeitraum der 96 Stunden erreichte der Wildtyp eine signifikant höhere durchschnittliche Taxisgeschwindigkeit als Δ 1103, 1103K und Wto1103 (** $p < 0,001$). In diesem Zeitraum erreichte Δ 1103 ebenfalls eine signifikant höhere durchschnittliche Taxisgeschwindigkeit im Vergleich zu Wto1103 (* $p < 0,05$).

Bei Betrachtung der absoluten Geschwindigkeiten zwischen 24 Stunden und 48 Stunden zeigten sich weitere signifikante Unterschiede. Auch hier zeigte Wt eine höhere Taxisgeschwindigkeit im Vergleich zu Δ 1103, 1103K und Wto1103 (** $p < 0,001$). Die Mutante Δ 1103 zeigte im Rahmen der Wiederholungen eine höhere Geschwindigkeit als die Komplementante 1103K (* $p < 0,05$) und als die

Überexpressionsmutante Wto1103 (** $p < 0,01$). Die Komplementante 1103K wiederum zeigte eine höhere Geschwindigkeit als die Überexpressionsmutante Wto1103 (** $p < 0,01$). (Abb. 14 B zu C)

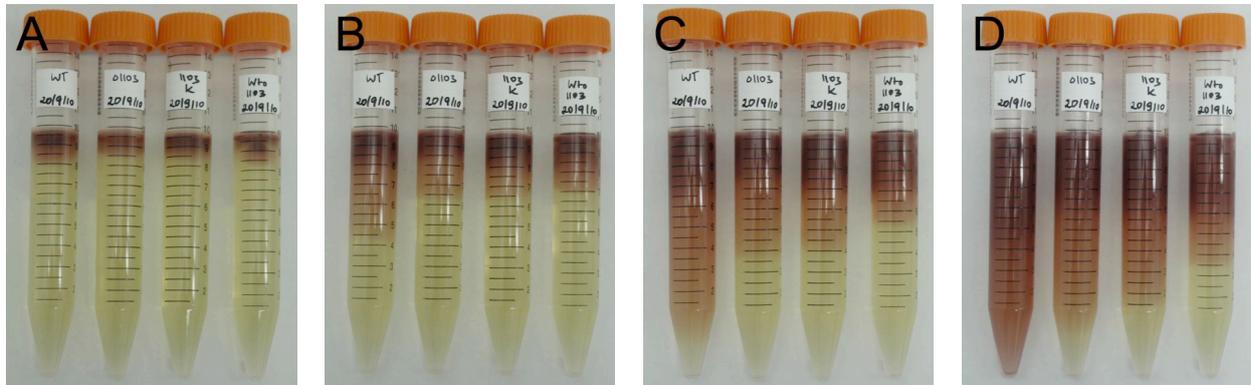


Abb. 14: Taxis der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj1103*-Komplementante (1103K) und *cj1103*-Überexpressionsmutante (Wto1103) nach 24 (A), 48 (B), 72 (C) und 96 (D) Stunden. Dargestellt ist ein ausgewähltes Exemplar aus vier voneinander unabhängigen Experimenten.

Bei den Vergleichen der Taxisgeschwindigkeiten von der Mutante $\Delta 0667$, der Komplementante 0667K, der Überexpressionsmutante Wto0667 und des Wildtyps konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Es zeigten sich keine Unterschiede, weder bei der Erhebung der Durchschnittsgeschwindigkeiten über die 96 Stunden, noch bei der Betrachtung der absoluten Geschwindigkeiten zwischen 24 und 48 Stunden. (Abb. 15 zeigt die Mutante $\Delta 0667$. Weitere Ergebnisse sind nicht dargestellt.)

Die Mutante $\Delta 0138$ zeigte eine signifikant langsamere Taxisgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp, sowohl bei der Betrachtung der Durchschnittsgeschwindigkeit über 96 Stunden (** $p < 0,01$), als auch bei der Betrachtung der absoluten Geschwindigkeit zwischen 24 und 48 Stunden (* $p < 0,05$). (Abb. 15) Bei der statistischen Analyse der Mutante $\Delta 0138$, der Komplementante 0138K, der Überexpressionsmutante Wto0138 und des Wildtyps konnten keine weiteren Unterschiede festgestellt werden. (Ergebnisse nicht dargestellt)

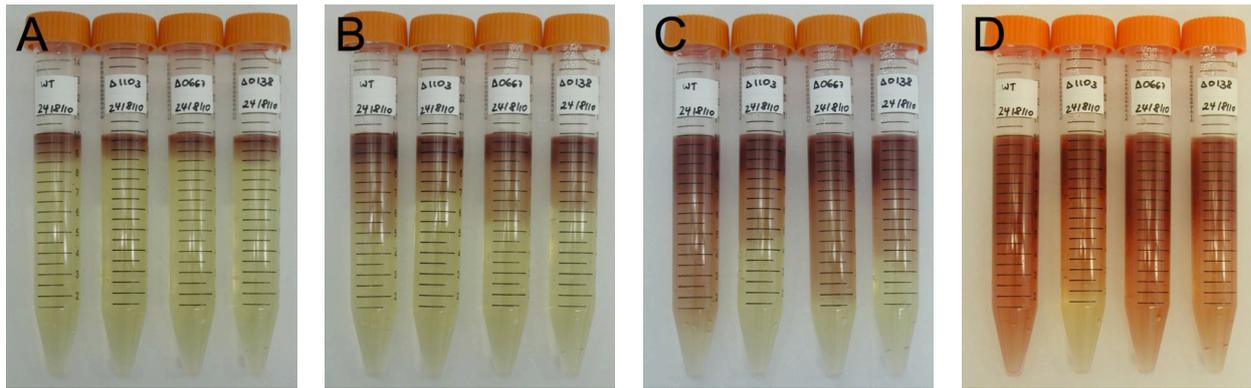


Abb. 15: Taxis der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$) und *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) nach 24 (A), 48 (B), 72 (C) und 96 (D) Stunden. Dargestellt ist ein ausgewähltes Exemplar aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Gene *cj1103* und *cj0138* für die Taxis von *C. jejuni* benötigt werden. Das Gen *cj0667* scheint für die Taxisfähigkeit von NCTC11168 *C. jejuni* nicht essentiell zu sein.

4.1.7 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf *C. jejuni* bei Wasserstoffperoxidstress

C. jejuni verfügt über verschiedene Enzyme um mit oxidativem Stress umgehen zu können (siehe 1.1.5). Im Rahmen des Wasserstoffperoxidstresstests wurde überprüft, ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Rolle bei dem Umgang mit oxidativem Stress, im Konkreten hier mit Wasserstoffperoxid, spielen. Der Wildtyp, die Mutane $\Delta 1103$, die Mutante $\Delta 0667$ und die Mutante $\Delta 0138$ wurden mit Wasserstoffperoxid in den Konzentrationen 0,1%, 1% und 3% konfrontiert. Eine Kontrolle erfolgte mit PBS. Die entstandenen Hemmhöfe, in denen kein Wachstum vorhanden war, wurden gemessen und verglichen.

Wie erwartet, variierte die Größe der Hemmhöfe von groß bei 3%, kleiner bei 1% bis hin zu kaum messbar bei 0,1% Wasserstoffperoxid. Bei den PBS-Kontrollen entstanden keine Hemmhöfe. Dies war der Fall bei allen untersuchten *C. jejuni*-Stämmen.

Im Rahmen der statistischen Auswertung konnten keine Unterschiede zwischen Wt, der Mutante $\Delta 1103$, der Mutante $\Delta 0667$ und der Mutante $\Delta 0138$ in den gemessenen Größen der Hemmhöfe bei 3%, 1% und 0,1% H_2O_2 nachgewiesen werden.

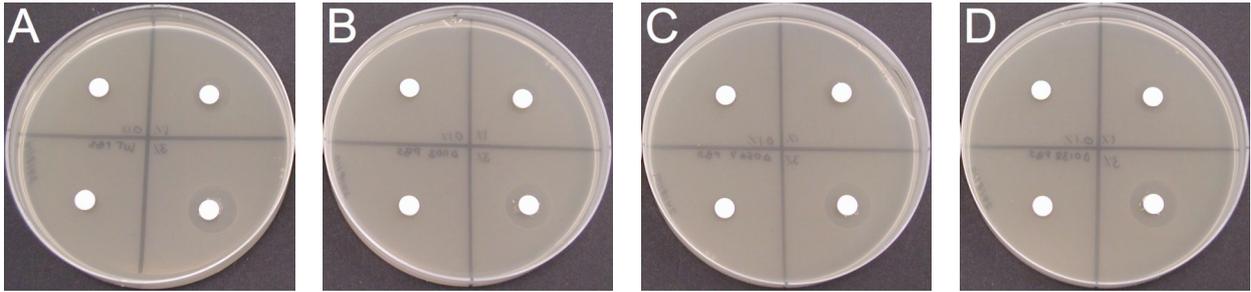


Abb. 16: Wasserstoffperoxidstress der NCTC11168 *C. jejuni*-Stämme: Wildtyp (Wt in A), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$ in B), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$ in C) und *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$ in D) bei oben links 0,1%, oben rechts 1% und unten rechts 3% Wasserstoffperoxid. Unten links erfolgte eine Kontrolle mit PBS. Dargestellt ist ein ausgewähltes Exemplar aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Rolle bei dem Umgang mit Wasserstoffperoxidstress von NCTC11168 *C. jejuni* spielen.

4.2 Auswahl der *C. jejuni*-Mutanten für die weitere Analyse in Mausmodellen

Um die Bedeutung der drei Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Virulenz von *C. jejuni in vivo* detaillierter zu analysieren, wurden die *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), die *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$) und die *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) unabhängig von den Ergebnissen der phänotypischen Untersuchungen in zwei etablierten Mausmodellen analysiert. Vermeintliche Unterschiede in der Virulenz, der Pathogenese und der ausgelösten Wirtsimmunreaktionen können durch die phänotypischen Analysen nicht erfasst werden. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse der *cj1103*-Komplementante (1103K) und der *cj1103*-Überexpressionsmutante (Wto1103) signifikante Unterschiede zum *C. jejuni*-Elternstamm in den phänotypischen Analysen des Wachstums, der Autoagglutination und der Taxis (siehe 4.1.1, 4.1.3 und 4.1.6). Das führte dazu, dass die Komplementante 1103K und die Überexpressionsmutante Wto1103 ebenfalls *in vivo* weiter analysiert werden sollten. Bei der Komplementante 1103K handelt es sich um eine gelungene Komplementierung (siehe detaillierte Ausführungen in 5.1, 5.2.1, 5.2.2), die phänotypisch einer leichten Überexpression des Gens *cj1103* entsprach. Im Rahmen dieser Arbeit und durch die Arbeit von Timmermans *et al.* mit dem Bakterium *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine zu hohe Expressionsrate des Gens *cj1103* mit dem Überleben des jeweiligen Organismus nicht vereinbar war. [103] Die Expressionsrate kann also auch für die Bedeutung des Gens *cj1103* in der Wirtsinteraktion *in vivo* eine entscheidende Rolle spielen. Somit wurde für eine detaillierte weitere Analyse der Bedeutung des *C. jejuni*-Gens *cj1103* die *cj1103*-

Komplementante mit leichter Überexpression und die *cj1103*-Überexpressionsmutante mit starker Überexpression des Gens in Infektionsmodellen in der Maus untersucht und bewertet.

Bei der Herstellung der Mutationsplasmide wurde an die Stelle des jeweils veränderten Gens ein Gen für die Kanamycinantibiotikaresistenz (Km^R) in das Genom eingefügt. (siehe 3.1.2) Die Komplementationsplasmide, die zur Generierung der Komplementanten und der Überexpressionsstämme in das Genom eingefügt wurden, enthielten eine Chloramphenicolresistenz (Cm^R) (siehe 3.1.3). Die Komplementationsplasmide wurden zum einen in die zuvor generierten Mutanten eingebracht um Komplementanten zu erzeugen und zum anderen in den Wildtyp um Überexpressionsmutanten zu generieren. Dementsprechend sind die hergestellten Mutanten durch eine Kanamycinresistenz, die Überexpressionsmutanten durch eine Chloramphenicolresistenz und die Komplementanten durch beide Resistenzen (Km^R/Cm^R) gekennzeichnet. (siehe Tab. 5 in 3.1.4) Die in das Genom eingebrachten Antibiotikaresistenzen wurden für eine Selektion bei der Herstellung der *C. jejuni*-Stämme verwendet. Zusätzlich wurden sie im Rahmen des Mausmodells an mehreren Stellen zur Qualitätskontrolle genutzt. Mit Hilfe von Chloramphenicol- und Kanamycinhaltigen Plättchen wurden im Agardiffusionsverfahren die Infektionslösungen, mit denen die Tiere infiziert wurden, die Faecesproben und die bei der Sektion gewonnenen Coloninhalte, welche der Bestimmung der *C. jejuni*-Konzentrationen dienen, im Agardiffusionstest auf die Präsenz der entsprechenden Marker-Antibiotikaresistenz analysiert. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Infektionslösungen, die den Tieren peroral verabreicht wurden, die erwarteten Marker-Antibiotikaresistenzen trugen. Bei den kultivierten *Campylobacter*-Stämmen aus dem Faeces und dem Coloninhalt fiel auf, dass bei der Überexpressionsmutante Wto1103 die Chloramphenicolresistenz nicht mehr vorhanden war. Durch PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass bei allen Tieren, die mit der Überexpressionsmutante Wto1103 infiziert worden waren, das eingebrachte Komplementationsplasmid, welches aus dem Gen *cj1103*, dem Promotor *metK* und der Chloramphenicolresistenz bestand, verloren gegangen war. Zum Zeitpunkt der Infektion der Tiere war die Überexpressionsmutante Wto1103 jedoch im Agardiffusionstest unauffällig.

Da sich in einzelnen murinen Individuen *C. jejuni*-Mischkulturen nachweisen ließen, kann der Zeitpunkt bzw. die Anzahl an Magen-Darm-Passagen durch die Maus nicht

identifiziert werden, an dem es zu dem Verlust des Komplementationsplasmides kam. Das wiederum macht die Auswertung und Analyse der gewonnenen Daten für die Überexpressionsmutante Wto1103 unmöglich. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Darstellung der gewonnenen Daten verzichtet.

4.3 Analyse der *C. jejuni*-Mutanten und -Komplementante im humanisierten gnotobiotischen Mausmodell (HGM)

Um die Rolle der drei *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* in der Kolonisationskapazität, der Virulenz, der Pathogenese und der Wirtsimmunantwort zu untersuchen, wurden der Wildtyp (Wt), die *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), die *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), die *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und die *cj1103*-Komplementante (1103K) im humanisierten gnotobiotischen Mausmodell (HGM) analysiert. Im HGM wurden gnotobiotische Mäuse, die mit einer Darmflora des Menschen rekolonisiert worden waren, anschließend mit den oben genannten *C. jejuni*-Stämmen infiziert. Im HGM, einem chronischen Kolitismodell, lassen sich vor allem die Wechselwirkungen zwischen *C. jejuni*, der Wirtsdarmflora und des Wirtsimmunsystems untersuchen. [90]

4.3.1 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die intestinale Kolonisation von *C. jejuni* im HGM

Für die Überprüfung des Infektionserfolges und für die Analyse der Kolonisationskapazität wurden die *C. jejuni*-Konzentrationen bestimmt. Unterschiede im Kolonisationsverlauf wurden bis einschließlich des Sektionstages analysiert. An den Tagen 3, 4, 5, 7 und 10 post infectionem (p.i.) erfolgte die quantitative Bestimmung aus dem Faeces und an Tag 14 p.i. aus dem Coloninhalt, welcher bei der Sektion entnommen wurde.

Die Mäuse wurden an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag 0, 1 und 2) mit einer oral verabreichten Dosis von $7,25 \times 10^8$ – $2,71 \times 10^9$ KBE/ml des jeweiligen *C. jejuni*-Stamms bzw. der oben genannten Mutanten infiziert. Naive Mäuse dienten als Kontrollgruppe und wurden nicht infiziert. Die durchschnittliche Infektionsdosis mit dem Wildtypstamm (Wt) betrug $7,25 \times 10^8$ KBE/ml, mit der *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$) $1,30 \times 10^9$ KBE/ml, mit der *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$) $2,71 \times 10^9$ KBE/ml, mit der *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) $1,80 \times 10^9$ KBE/ml und mit der *cj1103*-Komplementante (1103K) $2,33 \times 10^9$

KBE/ml. Im Rahmen der statistischen Auswertung zeigten sich keine Unterschiede in den Infektionsdosen der einzelnen *C. jejuni*-Stämme bzw. -Mutanten.

Die Infektionen im HGM wurden in zwei voneinander zeitlich unabhängigen Experimenten durchgeführt. Aufgrund von signifikant unterschiedlichen Ergebnissen dieser zwei Experimente werden die Ergebnisse im Folgenden getrennt dargestellt, analysiert und diskutiert.

An Tag 3 p.i. zeigten sich in den Ergebnissen aus den Teilerperimenten keine signifikanten Unterschiede. Bei allen Tieren wurde im Mittel eine *C. jejuni*-Konzentration von $4,43 \times 10^4$ KBE im Faeces nachgewiesen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen *C. jejuni*-Konzentrationen der Wildtyp-infizierten Tiere und den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Bei einem Tier der Gruppe $\Delta 0138$ konnte *C. jejuni* nicht nachgewiesen werden. (Abb. 17, Tag 3)

An Tag 7 p.i. wurde signifikant mehr *C. jejuni* im ersten Teilerperiment im Vergleich zum zweiten Teilerperiment nachgewiesen (** $p < 0,001$). Im zweiten Teilerperiment konnte lediglich bei fünf Tieren, davon bei drei Tieren der Gruppe $\Delta 1103$ und je einem Tier der Gruppen $\Delta 0667$ und 1103K, noch *C. jejuni* nachgewiesen werden. Dennoch waren an Tag 7 p.i. die gemessenen *C. jejuni*-Konzentrationen aller infizierter Tiere mit im Mittel $7,05 \times 10^{11}$ KBE/ g Faeces höher als an Tag 3 p.i..

Im ersten Experiment zeigten sich keine unterschiedlichen *C. jejuni*-Konzentrationen zwischen den Wildtyp-infizierten Tieren und den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$ und $\Delta 0667$ infiziert worden waren. Bei einem Tier der Gruppe $\Delta 1103$ konnte *C. jejuni* nicht nachgewiesen werden. Die Wildtyp-infizierten Tiere zeigten jedoch höhere *C. jejuni*-Konzentrationen als die Tiere, die mit der Mutante $\Delta 0138$ (** $p < 0,01$) und mit der Komplementante 1103K (* $p < 0,05$) infiziert worden waren. Bei einem Tier der Gruppe $\Delta 0138$ und drei Tieren der Gruppe 1103K konnte *C. jejuni* nicht mehr nachgewiesen werden.

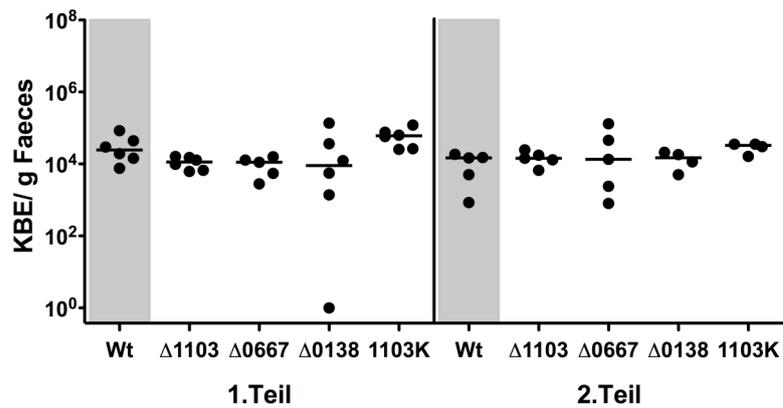
Im zweiten Experiment zeigten die Wt-infizierten Tiere keine unterschiedlichen *C. jejuni*-Konzentrationen im Vergleich zu den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. (Abb. 17, Tag 7)

An Tag 14 p.i. wurden im ersten Teilexperiment im Vergleich zum zweiten Teilexperiment ebenfalls signifikant höhere *C. jejuni*-Konzentrationen im Coloninhalt gemessen (** $p < 0,001$). Im zweiten Teilexperiment gelang der *C. jejuni*-Nachweis lediglich bei sieben Tieren, drei Tiere, die mit der *cj1103*-Mutante infiziert worden waren und jeweils einem Tier, das mit dem Wildtyp, der *cj0667*-Mutante, der *cj0138*-Mutante und der *cj1103*-Komplementante infiziert worden war. An Tag 14 p.i. lagen die gemessenen *C. jejuni*-Konzentrationen aller infizierter Tiere im Mittel bei $4,17 \times 10^6$ KBE/ g Coloninhalt und somit zwischen den niedrigen Konzentrationen von Tag 3 p.i. und den hohen Konzentrationen von Tag 7 p.i..

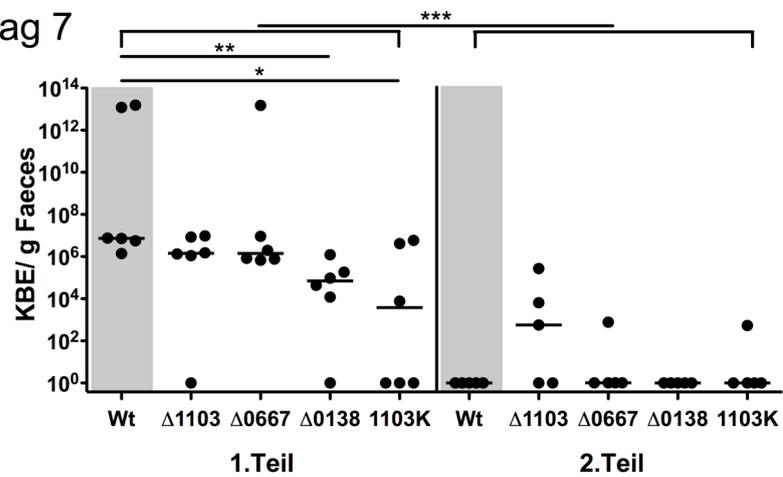
Im ersten Teilexperiment zeigten die Wildtyp-infizierten Tiere höhere *C. jejuni*-Konzentrationen im Vergleich zu den Tieren, die mit der *cj1103*-Mutante (** $p < 0,01$), der *cj0138*-Mutante (* $p < 0,05$) und der *cj1103*-Komplementante (** $p < 0,01$) infiziert worden waren. Bei drei Tieren der Gruppe $\Delta 1103$ und je zwei Tieren der Gruppen $\Delta 0138$ und $1103K$ konnte *C. jejuni* nicht nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich der Wildtyp-infizierten Tiere und der Tiere, die mit der Mutante $\Delta 0667$ infiziert worden waren zeigten sich keine Konzentrationsunterschiede beim *C. jejuni*-Nachweis.

Im zweiten Experiment zeigten die Wt-infizierten Tiere keine unterschiedlichen *C. jejuni*-Konzentrationen im Vergleich zu den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante $1103K$ infiziert worden waren. (Abb. 17, Tag 14)

Tag 3



Tag 7



Tag 14

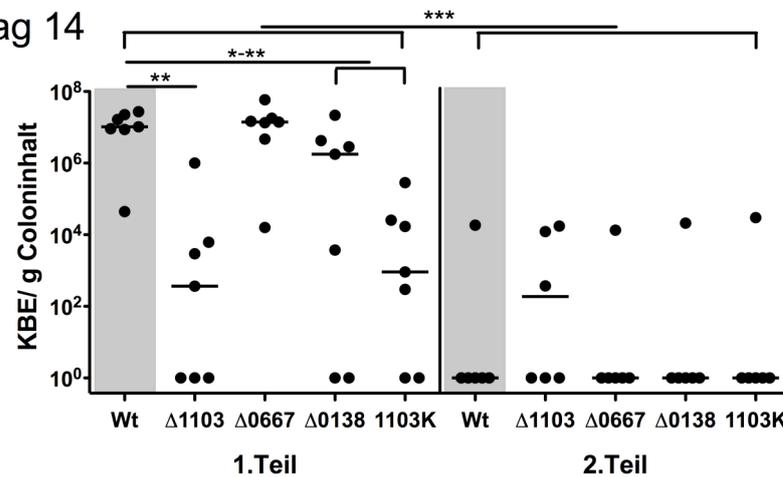


Abb. 17: *Campylobacter jejuni*-Konzentrationen an Tag 3, 7 und 14 im Faeces bzw. im Coloninhalt im HGM nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse der zwei voneinander unabhängigen Experimente sind getrennt dargestellt (Experiment 1/ Experiment 2). Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Zusammenfassend konnte im ersten Experiment bis zum Sektionstag eine *C. jejuni*-Kolonisation erreicht werden. Eine stabile Kolonisation aller Tiere, die mit dem Wildtyp und der Mutante $\Delta 0667$ infiziert worden waren, konnte realisiert werden und es zeigten sich keine Kolonisationsunterschiede zwischen diesen zwei Tiergruppen. Die Tiere, die mit den Mutanten $\Delta 1103$ und $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren, zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-infizierten Tieren eine geringere Kolonisationskapazität. Diese geringere Kolonisationskapazität beruhte vor allem auf einem kompletten *C. jejuni*-Verlust einzelner Tiere. Zusätzlich konnten bei den Tieren der Gruppen $\Delta 1103$, $\Delta 0138$ und 1103K, bei denen der *C. jejuni*-Nachweis gelang, teilweise nur geringe *C. jejuni*-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Gene *cj1103* und *cj0138* können für die Kolonisationskapazität von NCTC11168 *C. jejuni* im HGM eine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu spielt das Gen *cj0667* für die Kolonisationskapazität von NCTC11168 *C. jejuni* im HGM keine Rolle.

Im zweiten Experiment konnte eine stabile Kolonisation bis zum Tag 3 p.i. gezeigt werden. Bis zu diesem Tag waren keine Kolonisationsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, weder im ersten noch im zweiten Experiment sichtbar. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Rolle für die Kolonisation von NCTC11168 *C. jejuni* bis zum Tag 3 p.i. im HGM spielen. Nach Tag 3 im zweiten Experiment kam es zu einem Rückgang bzw. Verlust der Kolonisation bei allen infizierten Tieren.

4.3.2 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf luminale pH-Werte im Darm von infizierten Tieren im HGM

Im Rahmen einer Darmentzündung kann es zu einer Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der Darmflora kommen. [104-106] Die dabei begünstigten Bakterien wiederum sind durch unterschiedliche Stoffwechselleistungen gekennzeichnet. Diese unterschiedlichen Stoffwechselleistungen wiederum können zu einer Veränderung des pH-Werts im Darm führen. Ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion zu einer veränderten Zusammensetzung der Wirtsdarmflora führen, wurde durch luminale pH-Messungen in den Darmabschnitten Duodenum, Ileum und Colon untersucht.

Im ersten Telexperiment zeigten sich keine Signifikanzen zwischen den gemessenen pH-Werten im Duodenum der nicht infizierten Tiere und der Wt-infizierten Tiere. Auch

zwischen den Wildtyp-infizierten Tieren und den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$ und $\Delta 0667$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren, zeigten sich keine unterschiedlichen pH-Werte. Die Tiere, die mit der Mutante $\Delta 0138$ infiziert worden waren, zeigten signifikant höhere pH-Werte im Duodenum als die Wildtyp-infizierten Tiere (** $p < 0,01$). Zusätzlich zeigten die Tiere der Gruppe $\Delta 1103$ höhere duodenale pH-Werte im Vergleich zu den Tieren der Gruppe 1103K (** $p < 0,01$).

Im zweiten Experimentaltel zeigten alle Tiergruppen ähnliche pH-Werte. Es konnten keine duodenalen pH-Unterschiede zwischen den nicht infizierten und den Wildtyp-infizierten Tieren gefunden werden. Zusätzlich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen pH-Werten zwischen den Wildtyp-infizierten Tieren und den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren.

Zwischen den zwei Telexperimenten konnten keine signifikanten Unterschiede bei den duodenalen pH-Werten gezeigt werden. (Abb. 18A)

Auch im Ileum zeigten die erhobenen pH-Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Telexperimenten. In beiden Experimenten zeigten die nicht infizierten Tiere und die Wildtyp-infizierten Tiere ähnliche pH-Werte. Auch zwischen den Wildtyp-infizierten Tieren und den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante infiziert worden waren, konnten im Ileum keine unterschiedlichen pH-Werte festgestellt werden. (Abb. 18B)

Bei der pH-Wert-Bestimmung im Colon konnten keine Unterschiede zwischen den zwei Experimenten nachgewiesen werden.

Im ersten Experiment zeigten sich keine unterschiedlichen pH-Werte zwischen den nicht infizierten Tieren und den Wildtyp-infizierten Tieren. Sowohl die naiven Tiere als auch die Wildtyp-infizierten Tiere zeigten signifikant geringere pH-Werte im Vergleich zu den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$ und $\Delta 0138$ infiziert worden waren (* $p < 0,05$ – *** $p < 0,001$). Zwischen den Wildtyp-infizierten Tieren und den Tieren, die mit der Mutante $\Delta 0667$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren, zeigten sich keine signifikanten pH-Unterschiede im Colon. Die Tiere der Gruppe $\Delta 1103$ wiesen höhere pH-Werte im Vergleich zu den Tieren der Gruppe 1103K auf (*** $p < 0,001$). (Abb. 18C)

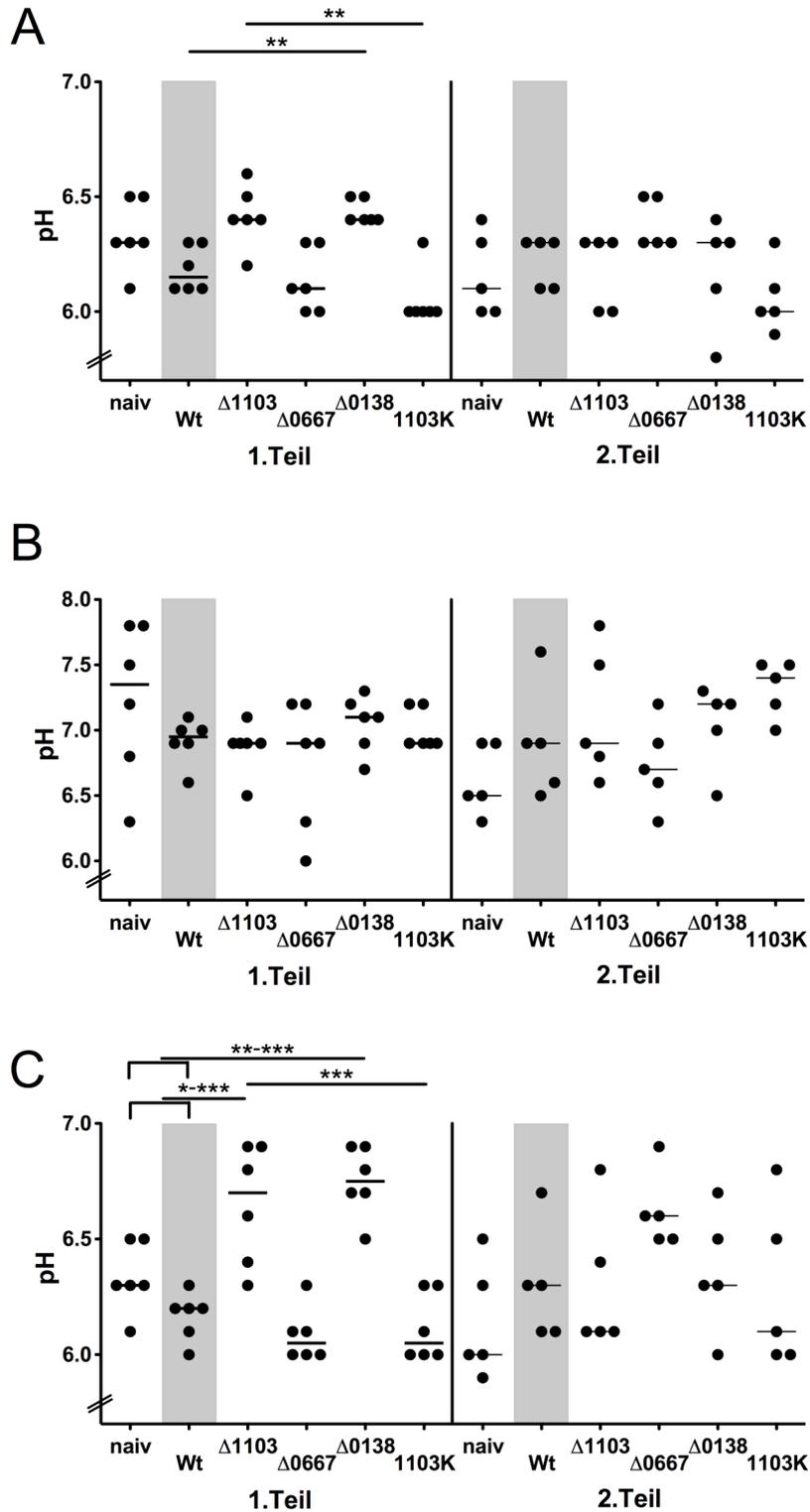


Abb. 18: Luminale pH-Werte im Duodenum (A), im Ileum (B) und im Colon (C) an Tag 14 im HGM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse der zwei voneinander unabhängigen Experimente sind getrennt dargestellt (Experiment 1/ Experiment 2). Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Unterschiede in den erhobenen pH-Werten weisen darauf hin, dass die Gene *cj1103* und *cj0138* im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion eine Veränderung der Wirtsdarmflora im Duodenum und Colon bewirken können. Das Gen *cj0667* spielte hierbei keine Rolle.

4.3.3 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die Darmlängen von infizierten Tieren im HGM

Eine Darmentzündung kann beim Wirt als Schutzfunktion eine Verringerung der „Angriffsfläche“ bewirken und zu einer Darmlängenverkürzung führen. Die Erhebung der Darmlängen liefert somit erste Hinweise für das Ausmaß bzw. die Schwere einer Entzündungsreaktion.

Sowohl im Ileum als auch im Colon zeigten sich keine signifikanten Darmlängen-Unterschiede zwischen den naiven und den Wildtyp-infizierten Tieren. In beiden Darmabschnitten zeigten sich ebenfalls keine Darmlängendifferenzen zwischen den Wildtyp-infizierten Tieren und den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. (Abb. 19A und B)

Die Ileumlänge wurde im Mittel mit $44,3 \pm 2,4$ cm bestimmt und es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Experimenten. Die Colonlängen der Tiere im ersten Teilexperiment lagen im Mittel bei $8,2 \pm 0,6$ cm und waren signifikant kürzer als die Colonlängen der Tiere im zweiten Teilexperiment, welche im Mittel bei $8,5 \pm 0,7$ cm lagen (* $p < 0,05$).

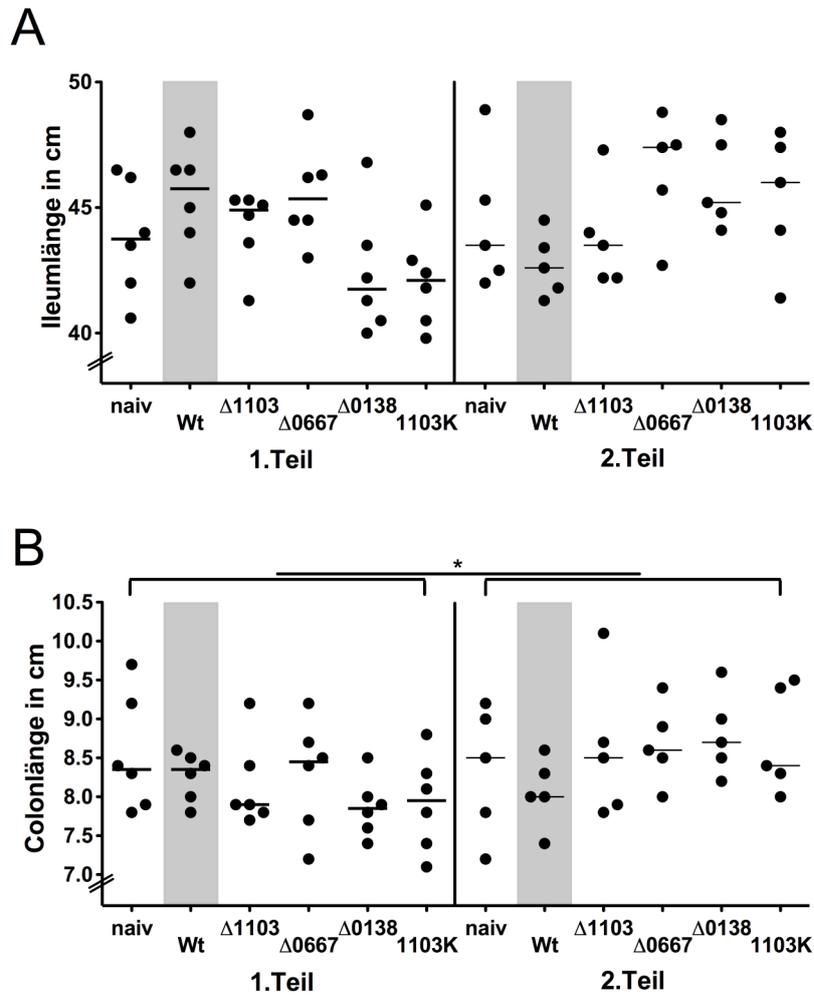


Abb. 19: Ileum- (A) und Colonlängen (B) an Tag 14 im HGM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse der zwei voneinander unabhängigen Experimente sind getrennt dargestellt (Experiment 1/ Experiment 2). Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Im ersten Experiment konnte an Tag 14 p.i. eine Kolonisation im HGM gezeigt werden. Im zweiten Experiment war dies nicht der Fall. Im ersten Experiment zeigte sich im Vergleich zum zweiten Experiment eine Colonverkürzung der Tiere nach *C. jejuni*-Infektion. Das könnte bedeuten, dass die NCTC11168 *C. jejuni*-Kolonisation unabhängig von den untersuchten Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer Entzündungsreaktion im Wirt führte.

4.3.4 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf intestinale Mediatoren und Zytokine der angeborenen Immunität von infizierten Tieren im HGM

Um den Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf das angeborene Wirtsimmunsystem im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion im HGM zu untersuchen, wurden die Mediatoren MUC2 und NO, das Chemokin MCP-1 und die Zytokine IL-6, TNF- α , IL-10 und IL-22 untersucht.

Durch die Induktion der NO-Synthase wird NO gebildet und kann als reaktiver Metabolit direkt Mikroben abtöten. [64]

Die NO-Proteinkonzentrationen wurden im Ileum und Colon gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen oder den Teilerperimenten detektiert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion im HGM zu keiner Induktion von NO führte.

Das Chemokin MCP-1 reguliert die Migration und Infiltration von Makrophagen und Monozyten in entzündete Gewebe. [107]

MCP1-Proteinkonzentrationen wurden im Ileum und Colon gemessen. Im Rahmen der statistischen Auswertung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Ileum, weder zwischen den einzelnen Tiergruppen noch zwischen den zwei Experimenten. Im ersten Experiment zeigten alle infizierten Tiere im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp und den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ infiziert worden waren, höhere MCP-1-Konzentrationen im Colon. Im zweiten Experiment konnten auch im Colon keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. (Abb. 20)

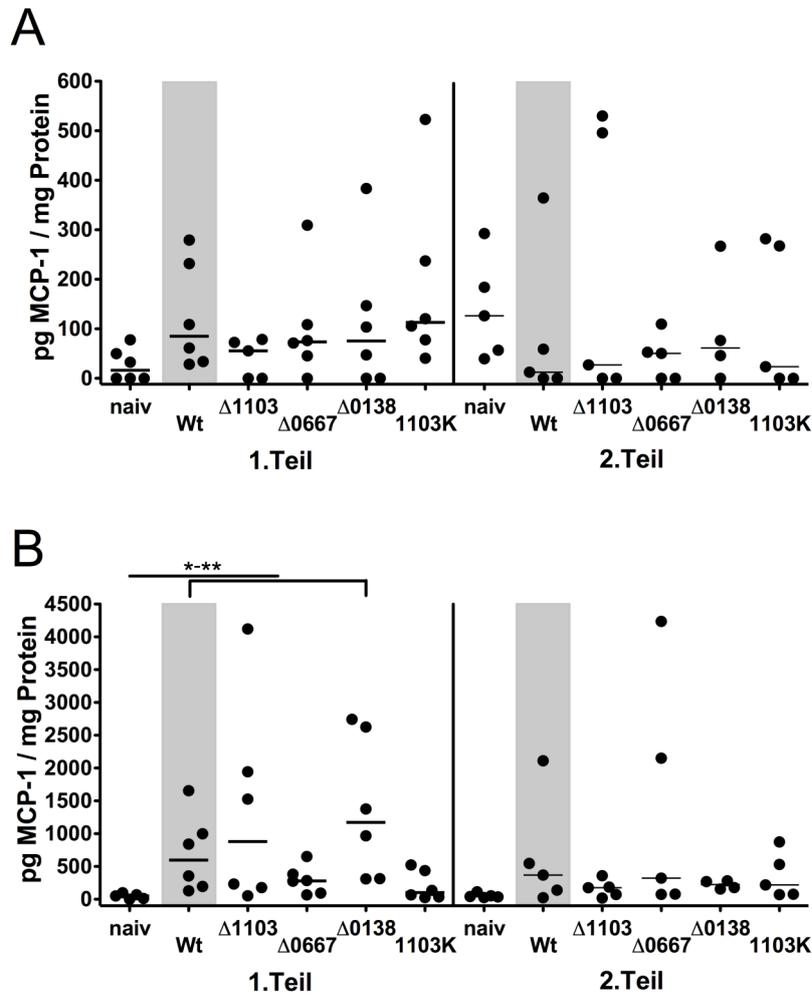


Abb. 20: Monozyten-Chemotaktische-Protein-1-Konzentrationen an Tag 14 im Ileum (A) und im Colon (B) im HGM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse der zwei voneinander unabhängigen Experimente sind getrennt dargestellt (Experiment 1/ Experiment 2). Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Die *C. jejuni*-Infektion führte im Colon unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer Induktion von MCP-1.

MUC2 ist ein Protein, das von den Becherzellen produziert wird und zusammen mit weiteren Proteinen eine schützende Schleimschicht bildet. [108]

Die MUC2-Expression im Colon zeigte keine signifikanten Unterschiede bei dem Vergleich der naiven und der Wildtyp-infizierten Tiere. Die Wildtyp-infizierten Tiere im Vergleich zu den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der

Komplementante 1103K infiziert worden waren, zeigten auch keine signifikant unterschiedliche MUC2-Expression. (Abb. 21)

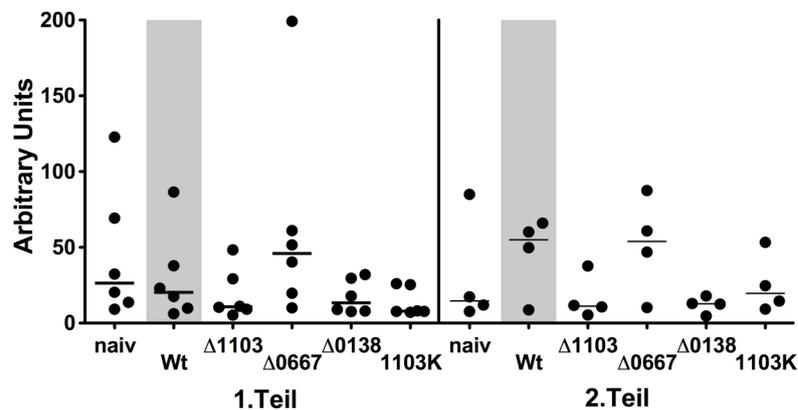


Abb. 21: MUC2-mRNA-Expression an Tag 14 im Colon im HGM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse der zwei voneinander unabhängigen Experimente sind getrennt dargestellt (Experiment 1/ Experiment 2). Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Es kann davon ausgegangen werden, dass die *C. jejuni*-Infektion bzw. die *C. jejuni*-Kolonisation im HGM zu keiner Inaktivierung der MUC2-Expression führte.

Die Zytokine IL-6 und TNF- α sind als Bestandteil der unspezifischen Abwehr wichtige Zytokine in der frühen Abwehr und bei der Entzündung. Zum größten Teil werden sie von Monozyten und Makrophagen gebildet. Lipopolysaccharide (LPS) aus gramnegativen Bakterien stellen den Synthesereiz für TNF- α dar. TNF- α selber kann die Synthese von IL-6 auslösen. [64]

Die TNF- α -Werte im Colon wiesen auf mRNA-Ebene keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen untereinander oder den Telexperimenten auf. Auf Proteinebene zeigten sich im zweiten Telexperiment höhere TNF- α -Konzentrationen als im ersten Telexperiment. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen im ersten Experiment oder im zweiten Experiment. (Ergebnisse nicht dargestellt) Die *C. jejuni*-Infektion im HGM führte zu keiner erhöhten TNF- α -Expression im Colon. Eine *C. jejuni*-Kolonisation führte zu einer Aktivierung von TNF- α -Protein im Colon.

Im Ileum zeigten sich keine IL-6-Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen und zwischen den zwei Teilexperimenten. Im ersten Experiment zeigten alle infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren höhere IL-6-Proteinkonzentrationen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der zwei Teilexperimente. Im zweiten Experiment zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen. (Abb. 22)

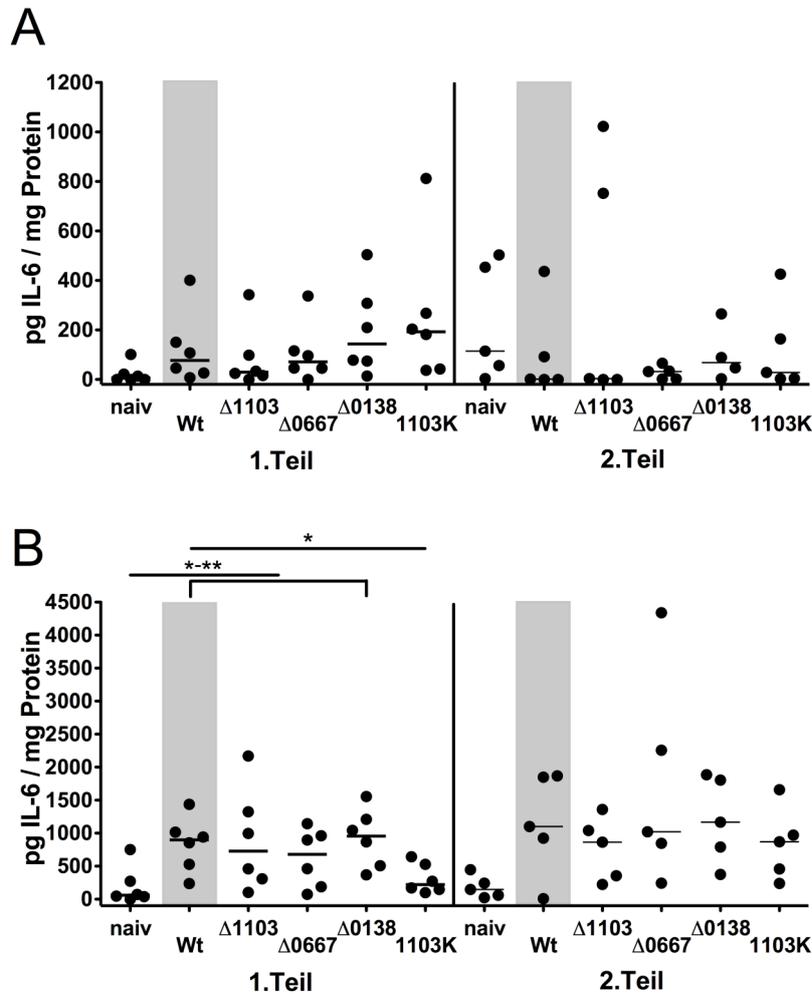


Abb. 22: Interleukin-6-Proteinkonzentrationen an Tag 14 im Ileum (A) und im Colon (B) im HGM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse der zwei voneinander unabhängigen Experimente sind getrennt dargestellt (Experiment 1/ Experiment 2). Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die *C. jejuni*-Infektion und -Kolonisation führten unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer Aktivierung des Zytokins IL-6.

Das Zytokin IL-10 dient der Kontrolle der unspezifischen Abwehr durch die Hemmung aktivierter Makrophagen. Es wird von aktivierten Makrophagen im Sinne einer negativen Rückkopplung gebildet. Zusätzlich synthetisieren auch T-Zellen und Keratinozyten IL-10. [64]

Im HGM konnte im Ileum der Tiere weniger IL-10-Protein im ersten Experiment nachgewiesen werden als im zweiten Experiment. Zwischen den einzelnen Tiergruppen zeigten sich weder im ersten noch im zweiten Experiment im Ileum oder Colon signifikante Unterschiede in der Menge an IL-10. Es kann davon ausgegangen werden, dass die *C. jejuni*-Kolonisation unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer Aktivierung von IL-10 führte. (Ergebnisse nicht dargestellt)

Auch das Zytokin IL-22 ist ein Teil der unspezifischen, angeborenen Abwehr und wird vorwiegend von Natürlichen Killerzellen und speziellen Populationen von T-Zellen gebildet. Im Rahmen der Entzündung kann es sowohl proinflammatorisch als auch schützend wirken. [109]

Im HGM konnten bei allen Tieren lediglich minimale IL-22-Konzentrationen gemessen werden. Im zweiten Telexperiment konnten bei jeweils einem Individuum in den Gruppen $\Delta 1103$ und $\Delta 0667$ minimal höhere IL-22-Konzentrationen nachgewiesen werden, die im Rahmen der statistischen Auswertung zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Telexperimenten führten. (Ergebnisse nicht dargestellt) Schlussfolgernd wurde IL-22 durch die *C. jejuni*-Infektion bzw. Kolonisation im HGM in nicht biologisch relevanten Mengen induziert.

4.3.5 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf intestinale Zytokine der erworbenen Immunität von infizierten Tieren im HGM

Um den Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf das angeborene Wirtsimmunsystem im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion im HGM zu untersuchen, wurden die Zytokine IL-18, INF- γ und IL-23 im Colon der Tiere bestimmt.

IL-18 reguliert sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität und wird vor allem von aktivierten Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Neutrophilen synthetisiert. IL-18 sorgt für die Aktivierung Natürlicher Killerzellen und kann zusammen mit IL-12 die Produktion von INF- γ in T_H1-Zellen anregen. [110]

Im ersten Telexperiment zeigten die nicht infizierten Tiere die geringsten IL-18-Konzentrationen. Diese waren niedriger als bei den Tieren, die mit dem Wildtyp, den Mutanten $\Delta 1103$ und $\Delta 0138$, sowie der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Im zweiten Telexperiment zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den erhobenen IL-18-Konzentrationen zwischen den nicht infizierten Tieren und den Wildtyp-infizierten Tieren. Zusätzlich zeigten sich keine IL-18-Konzentrationsunterschiede zwischen den Wildtyp-infizierten und den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. (Abb. 23)

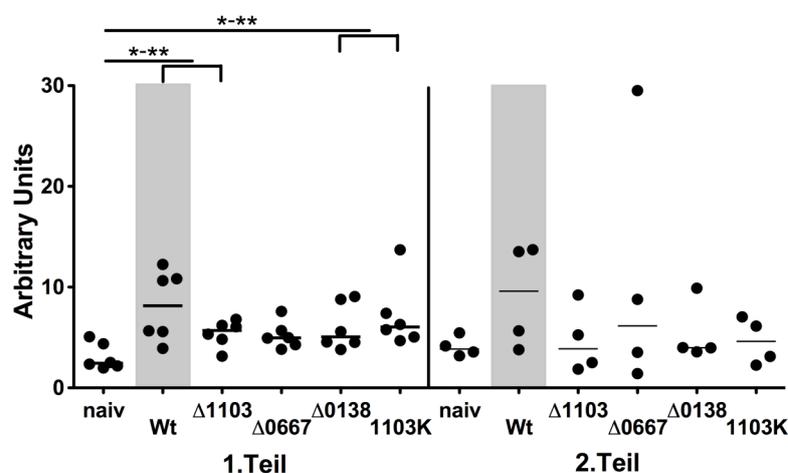


Abb. 23: Interleukin-18-mRNA-Expression an Tag 14 im Colon im HGM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse der zwei voneinander unabhängigen Experimente sind getrennt dargestellt (Experiment 1/ Experiment 2). Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die *C. jejuni*-Kolonisation im HGM führte unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0138* zu einer erhöhten IL-18-Expression im Colon. Das Gen *cj0667* spielte hierbei eine Rolle.

Vor allem T_H1 -Zellen bilden $INF-\gamma$. Natürlichen Killerzellen (NK) und zytotoxische T-Zellen können $INF-\gamma$ auch synthetisieren. $INF-\gamma$ unterstützt die zelluläre Abwehr durch die Aktivierung von Makrophagen, die wiederum reaktive Sauerstoff- und NO-Metabolite produzieren. [64]

Interferon- γ wurde auf mRNA-Ebene im Colon und auf Proteinebene mittels CBA im Ileum und Colon bestimmt. In den drei Erhebungen zeigten sich insgesamt signifikant

höhere INF- γ -Konzentrationen im ersten Experiment im Vergleich zum zweiten Experiment. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen konnten nicht gefunden werden. Das könnte bedeuten, dass eine *C. jejuni*-Kolonisation im HGM zu einer Aktivierung von INF- γ unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* im Ileum und Colon führte. (Ergebnisse nicht dargestellt.)

IL-23 wird mit dem Auslösen von Autoimmunität durch die Bildung von Th17-Zellen in Verbindung gebracht. IL-23 wird von aktivierten Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet und unterstützt die Bildung von Th17-Zellen. [111]

Es zeigten sich keine unterschiedlichen IL-23-Konzentrationen zwischen den einzelnen Tiergruppen, weder innerhalb eines Telexperimentes noch beim Vergleich der zwei Telexperimente untereinander. Im Rahmen der Infektion mit dem *C. jejuni*-Stamm NCTC11168 konnte im HGM kein IL-23 induziert werden.

4.4 Analyse der *C. jejuni*-Mutanten und -Komplementante im IL-10^{-/-} Gnotobioten Mausmodell (IL10^{-/-}GM)

Um die Rolle der drei *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* in der Kolonisationskapazität, der Virulenz, der Pathogenese und der Wirtsimmunantwort des Bakteriums zu untersuchen, wurde der *C. jejuni* NCTC11168 Wildtyp-Stamm (Wt), die *cj1103*-Mutante (Δ 1103), die *cj0667*-Mutante (Δ 0667), die *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und die *cj1103*-Komplementante (1103K) in einem zweiten Mausmodell, dem IL-10^{-/-} Gnotobioten Mausmodell (IL10^{-/-}GM), analysiert. Bei dem IL10^{-/-}GM wurden IL10^{-/-}-Jungtiere mit Antibiotika keimfrei gemacht und im Alter von vier bis fünf Monaten mit den oben genannten *C. jejuni*-Mutanten infiziert. Im IL10^{-/-}GM wird durch die Infektion mit *C. jejuni* eine akute Colitis bei den Tieren ausgelöst, die der Campylobacteriose des Menschen sehr ähnelt. [61, 94, 112-114] Die Untersuchungen in diesem Modell ermöglichen vor allem Rückschlüsse auf die Campylobacteriose beim Menschen.

4.4.1 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die Pathogenität von *C. jejuni* im IL10^{-/-}GM

Zur Objektivierung des Krankheitsgeschehens und der Quantifizierung der Symptomatik der akut erkrankten Tiere wurde der klinische Score an jedem Tag für jedes Tier im IL-10^{-/-}GM erhoben. Es wurden das Erscheinungsbild, die Stuhlkonsistenz und das Ergebnis eines Hämocultttests gleichwertig beurteilt. Der klinische Score wurde

erhoben, um erste Hinweise auf eine mögliche Veränderung der Virulenz durch Verlust der Genfunktionen in den *C. jejuni*-Mutanten zu erhalten.

Die Mäuse wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen (Tag 0 und 1) mit einer oral verabreichten Dosis von $1,00 \times 10^9$ – $3,56 \times 10^9$ KBE/ml des jeweiligen *C. jejuni*-Stamms infiziert. Naive Mäuse dienten als Kontrollgruppe und wurden nicht infiziert. Die durchschnittliche Infektionsdosis mit dem Wildtyp (Wt) betrug $1,13 \times 10^9$ KBE/ml, mit der *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$) $1,00 \times 10^9$ KBE/ml, mit der *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$) $3,56 \times 10^9$ KBE/ml, mit der *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) $1,94 \times 10^9$ KBE/ml und mit der *cj1103*-Komplementante (1103K) $2,31 \times 10^9$ KBE/ml. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Infektionsdosen der einzelnen *C. jejuni*-Stämme bzw. -Mutanten im Rahmen der statistischen Auswertung.

An Tag 0 wurde der Klinische Score als Kontrolle des Ausgangszustandes der Tiere vor der *C. jejuni*-Infektion erhoben. Hier zeigten sich erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen den $IL10^{-/-}$ -Tieren und es kann davon ausgegangen werden, dass alle Tiere die gleichen Ausgangsbedingungen hatten. (nicht dargestellt)

An Tag 2 post infectionem (p.i.) ging es den Tieren aus den Gruppen Wt, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und 1103K klinisch signifikant schlechter als den Tieren in der nicht infizierten Gruppe (* $p < 0,05$ - ** $p < 0,01$). Die vergebenen Punkte setzten sich aus den drei Kriterien: Stuhlkonsistenz, äußeres Erscheinungsbild und der Testung auf okkultes Blut im Stuhl zusammen. An Tag 2 p.i. spielte die Faeceskonsistenz eine geringe Rolle mit dem höchstens vergebenen Punktwert von 1. Eine entscheidende Rolle für die signifikanten Unterschiede waren ein struppiges Fell, eine gekrümmte Körperhaltung, teilweise ein Isolierverhalten und okkultes Blut im Stuhl. Bei jeweils einem Tier der Gruppen $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und 1103K wurde die Höchstpunktzahl von 4 für makroskopisch sichtbares Blut im Stuhl bzw. Rektumprolaps vergeben. (Abb. 24, Tag 2)

An Tag 4 p.i. wiesen alle infizierten Tiere gegenüber den nicht infizierten Tieren einen signifikant schlechteren klinischen Zustand auf (** $p < 0,01$ - *** $p < 0,001$). Dieser schlechte Zustand setzte sich aus allen drei Kriterien - äußeres Erscheinungsbild, Faeceskonsistenz und okkultes Blut im Stuhl - zusammen. Drei Tieren aus der Wildtyp-infizierten Gruppe (Wt), zwei Tieren aus der $\Delta 1103$ -infizierten Gruppe, zwei Tieren aus der $\Delta 0667$ -infizierten Gruppe und einem Tier aus der $\Delta 0138$ -infizierten Gruppe wurde

die höchste Punktzahl mit 4 Punkten für wässrigen Stuhl gegeben. Bei vier Tieren der Gruppe Wt, zwei Tieren der Gruppe $\Delta 1103$ und jeweils einem Tier der Gruppen $\Delta 0667$ und 1103K wurden 4 Punkte - die höchste Zahl in einer Kategorie - für den Nachweis von Blut im Stuhl vergeben. Die Höchstzahl stand für makroskopisch sichtbares Blut oder einen vorhanden Rektumprolaps. Besonders die Wildtyp-infizierten Tiere fielen an Tag 4 p.i. durch hohe Gesamtpunktzahlen auf, welche signifikant höher im Vergleich zu der Gruppe $\Delta 0138$ waren (* $p < 0,05$). Diese erhöhten Gesamtpunktzahlen sind vor allem durch das Kriterium okkultes Blut im Stuhl entstanden. Alle infizierten Tiergruppen zeigten auch an diesem Tag Krankheitssymptome. Für die Gesamtpunktzahl spielte das Kriterium äußeres Erscheinungsbild im Vergleich zu den anderen zwei Kriterien jedoch eine untergeordnete Rolle. Die Tiere, die mit der Mutante $\Delta 0667$ infiziert worden waren, zeigten neben dem struppigen Fell und der gekrümmten Körperhaltung dreimal ein Isolationsverhalten und zweimal einen präfinalen Zustand. (Abb. 24, Tag 4)

An Tag 6 p.i. zeigten alle infizierten Tiere im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren weiterhin signifikant mehr Symptome (***) $p < 0,001$). Den Wildtyp-infizierten Tieren ging es am schlechtesten und sie zeigten signifikant mehr Symptome als die restlichen infizierten Tiere (* $p < 0,05$ - *** $p < 0,001$). An diesem Tag wurde der erhobene klinische Score besonders durch die Kriterien okkultes Stuhl und die Faeceskonsistenz geprägt. Für die Faeceskonsistenz wurde die Höchstzahl von 4 Punkten bei allen zehn Tieren der Gruppe Wt, neun Tieren der Gruppe $\Delta 1103$, drei Tieren der Gruppe $\Delta 0667$, keinem Tier der Gruppe $\Delta 0138$ und einem Tier der Gruppe 1103K vergeben. Für das Kriterium okkultes Blut im Stuhl wurde die Höchstzahl von 4 Punkten bei 8 Tieren der Gruppe Wt, 4 Tieren der Gruppe $\Delta 1103$, 6 Tieren der Gruppe $\Delta 0667$, einem Tier der Gruppe $\Delta 0138$ und drei Tieren der Gruppe 1103K vergeben. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die mit der Mutante $\Delta 1103$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Die Gruppe 1103K zeigte weniger Symptome als die Gruppe $\Delta 1103$ (** $p < 0,01$). Dieser signifikante Unterschied war an Tag 8 p.i. nicht mehr nachzuweisen. (Abb. 24, Tag 6)

An Tag 8 p.i. zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen in Bezug auf die Symptomausprägung am deutlichsten. Auch an Tag 8 p.i. zeigten alle infizierten Tiere deutliche Symptome im Gegensatz zu der naiven Kontrollgruppe. Die naiven Tiere zeigten keine Symptome. Die Symptomausprägung war bei den Wildtyp-infizierten Tieren am deutlichsten. Den Wildtyp-infizierten Tieren

ging es signifikant schlechter als den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren (* $p < 0,05$ - *** $p < 0,001$). Der klinische Zustand aller infizierten Tiere wurde vor allem durch okkultes Blut im Stuhl und die Faeceskonsistenz beeinträchtigt. In allen infizierten Tiergruppen war der Klinische Score uneinheitlich und reichte von gesund aussehenden Tieren, über struppiges Fell mit oder ohne gekrümmter Körperhaltung und gelegentlichem Isolierungsverhalten bis hin zu einem präfinalen Erscheinungsbild. (Abb. 24, Tag 8)

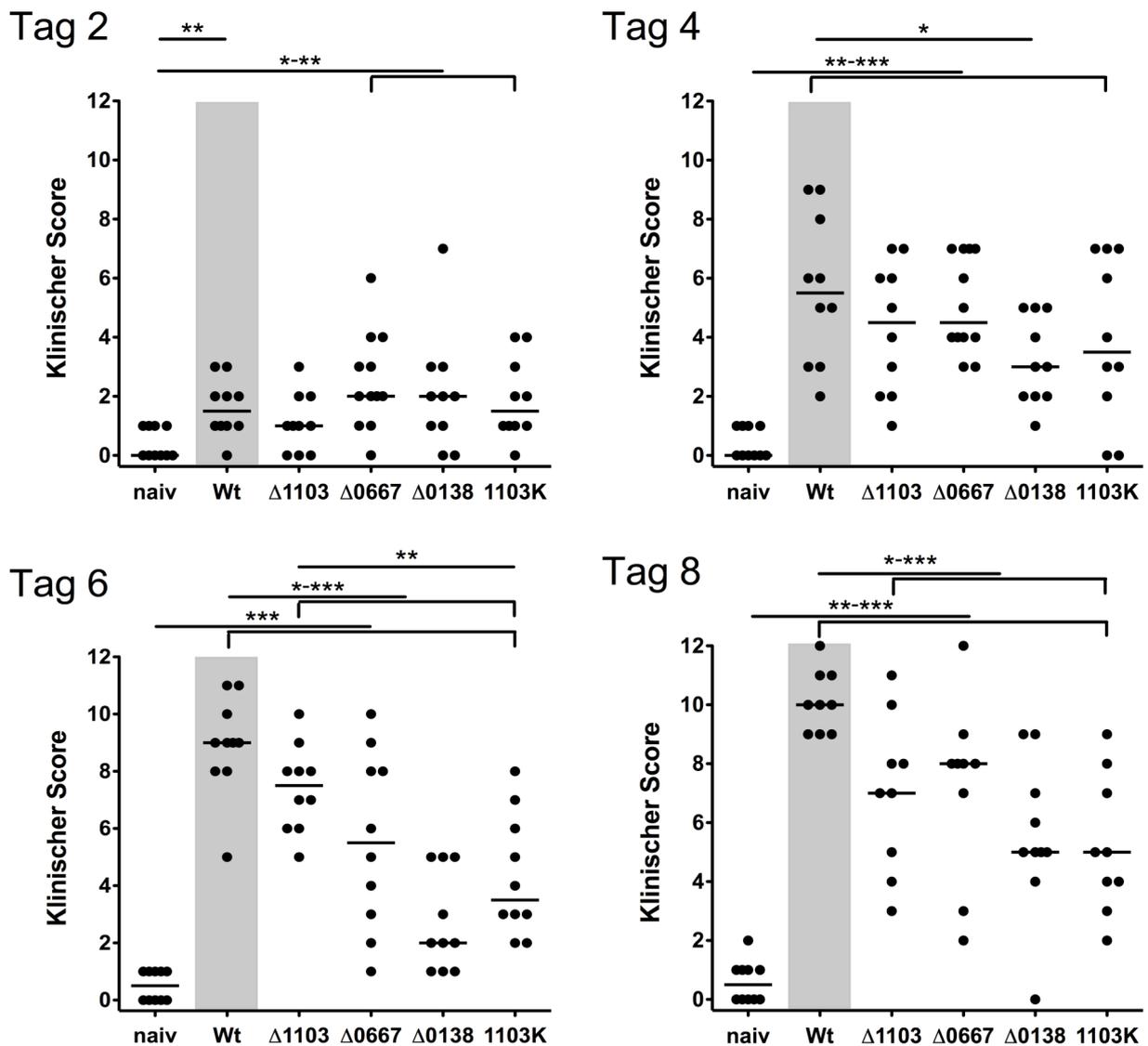


Abb. 24: Klinischer Score an Tag 2, 4, 6 und 8 von $IL10^{-/-}$ GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$), *Cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Zusammenfassend konnte mit der Erhebung des klinischen Scores gezeigt werden, dass die nicht infizierten Kontrolltiere bis zur Sektion keine Krankheitssymptome aufwiesen. Alle *C. jejuni*-infizierten Tiere entwickelten bis zur Sektion deutliche Symptome. Die Symptome bei den Wildtyp-infizierten Tieren waren stärker ausgeprägt im Vergleich zu den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise darauf, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Pathogenität von *C. jejuni* NCTC11168 im IL10^{-/-}GM von essentieller Bedeutung sind.

4.4.2 Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* im IL10^{-/-}GM

Um den Infektionserfolg und die damit einhergehende bakterielle Kolonisation zu überprüfen und eventuelle Unterschiede im Verlauf bis zum Tag der Sektion des IL10^{-/-}GM nachweisen zu können, wurden an den Tagen 2, 3, 4 und 6 p.i. die Konzentrationen von *C. jejuni* in den Faeces kulturell quantitativ bestimmt. An Tag 8 p.i. erfolgte diese Analyse aus dem bei der Sektion entnommenen Coloninhalt.

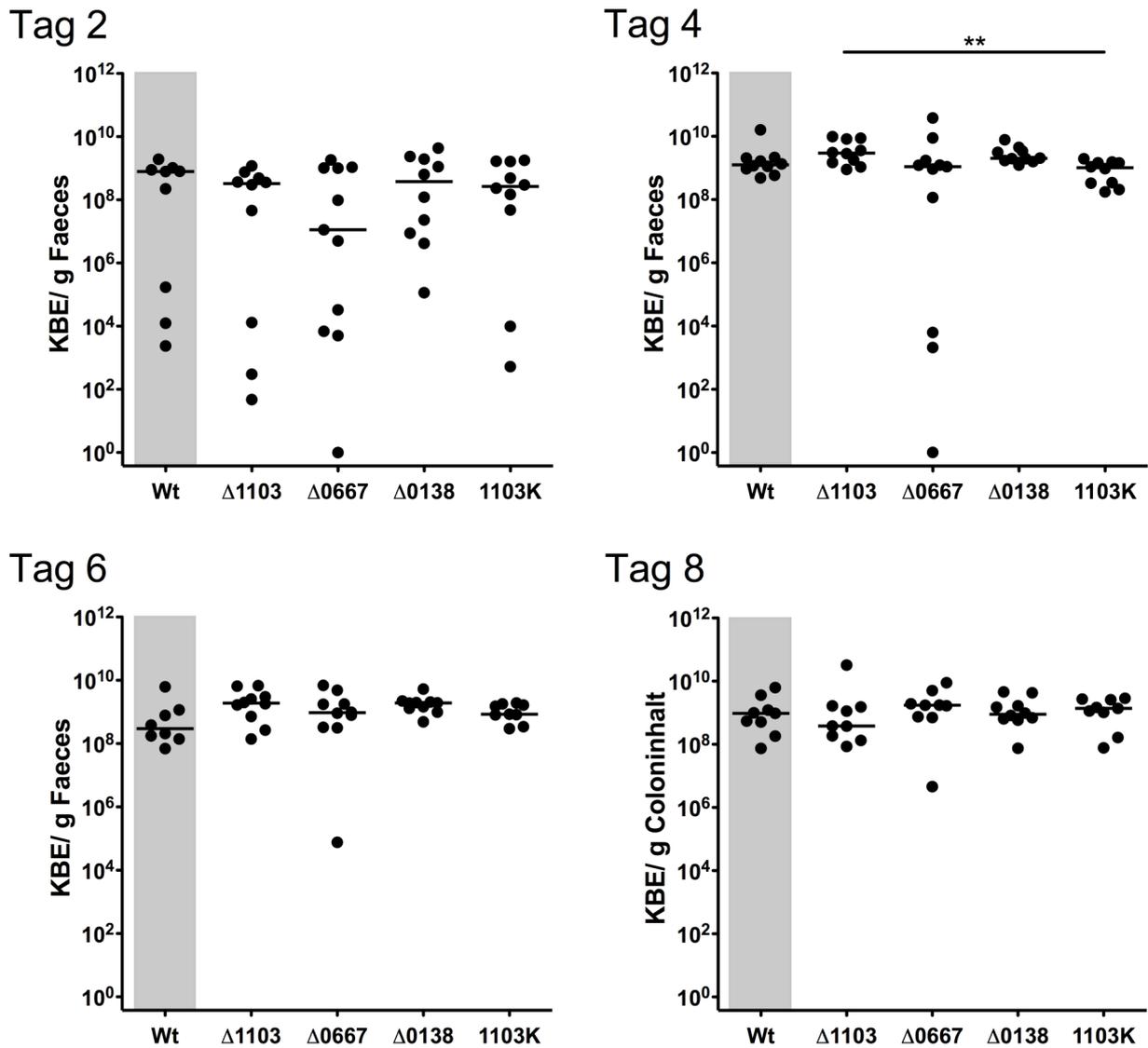


Abb. 25: *Campylobacter jejuni*-Konzentrationen an Tag 2, 4, 6 und 8 im Faeces bzw. im Coloninhalt von IL10^{-/-}GM nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ1103), *cj0667*-Mutante (Δ0667), *cj0138*-Mutante (Δ0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die Ergebnisse stammen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01;*p<0,001).**

An den Tagen 2, 4, 6 und 8 p.i. zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Kolonisationskapazität bei den Wildtyp-infizierten Tieren im Vergleich zu den Tieren, die mit den Mutanten Δ1103, Δ0667, Δ0138 und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. An Tag 4 p.i. zeigten die Tiere, die mit der Mutante Δ1103 infiziert worden waren, im Vergleich zu den Tieren, die mit der Komplementante 1103K infiziert worden waren, signifikant höhere *C. jejuni*-Konzentrationen (** p<0,01). Dieser signifikante Unterschied bestätigte sich an den anderen Tagen nicht. An Tag 2 p.i.

zeigte sich noch eine Streuung der *C. jejuni*-Konzentrationen in allen Gruppen, welche im Verlauf immer geringer wurde. (Abb. 25)

Zusammenfassend konnte eine stabile *C. jejuni*-Kolonisation bei allen infizierten Tieren bis zur Sektion an Tag 8 p.i. festgestellt werden. Am Tag der Sektion waren die *C. jejuni*-Kolonisationen gleichmäßig und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen gefunden werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Rolle für die Kolonisationskapazität von NCTC11168 *C. jejuni* im IL10^{-/-}GM spielen.

4.4.3 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf luminale pH-Werte im Darm von infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Die Erhebung des Parameters pH-Wert erfolgte an der luminalen Seite des aufgeschnittenen Darms in den Abschnitten Duodenum, Ileum und Colon als Hinweis auf eine veränderte Darmflora (siehe 4.3.2), die sich im Rahmen einer Darmentzündung entwickeln kann. Im IL10^{-/-}GM wurden keimfreie Tiere ausschließlich mit *C. jejuni* infiziert. Ein veränderter pH-Wert wäre ein Hinweis auf eine zusätzliche Besiedlung des Darms durch andere Erreger. Eine vorhandene Keimfreiheit der Tiere vor der *C. jejuni*-Infektion und die Reinheit der Infektionslösungen wurden mehrfach kontrolliert und konnten bestätigt werden. (Ergebnisse nicht dargestellt) Im IL10^{-/-}GM sollte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion und vor allem die Bedeutung der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* bei der Infektion untersucht werden. Eine zusätzliche Infektion durch andere Erreger würde die Zuordnung von kausalen Zusammenhängen bei den untersuchten Parametern unmöglich machen. Die alleinige Darmbesiedelung durch *C. jejuni* im IL10^{-/-}GM ist essentiell und wurde mit der pH-Messung kontrolliert. Zusätzlich wurden kulturelle Untersuchungen an den bei der Sektion entnommen Organen und Darminhalten zur Detektion weiterer bakterieller Besiedelungen durchgeführt. (Ergebnisse nicht dargestellt)

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den pH-Werten im Darm der naiven Tiere im Vergleich zu allen infizierten Tieren. Die pH-Werte im Darm der Wildtyp-infizierten Tiere waren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den IL10^{-/-}-Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Im Duodenum wurde als Mittelwert für alle Mäuse von 6,3 mit einer Standardabweichung von 0,24 gemessen, im Ileum ein Mittelwert von 7,2 mit

einer Standardabweichung von 0,39 und im Colon ein Mittelwert von 6,7 mit einer Standardabweichung von 0,37. (Abb. 26)

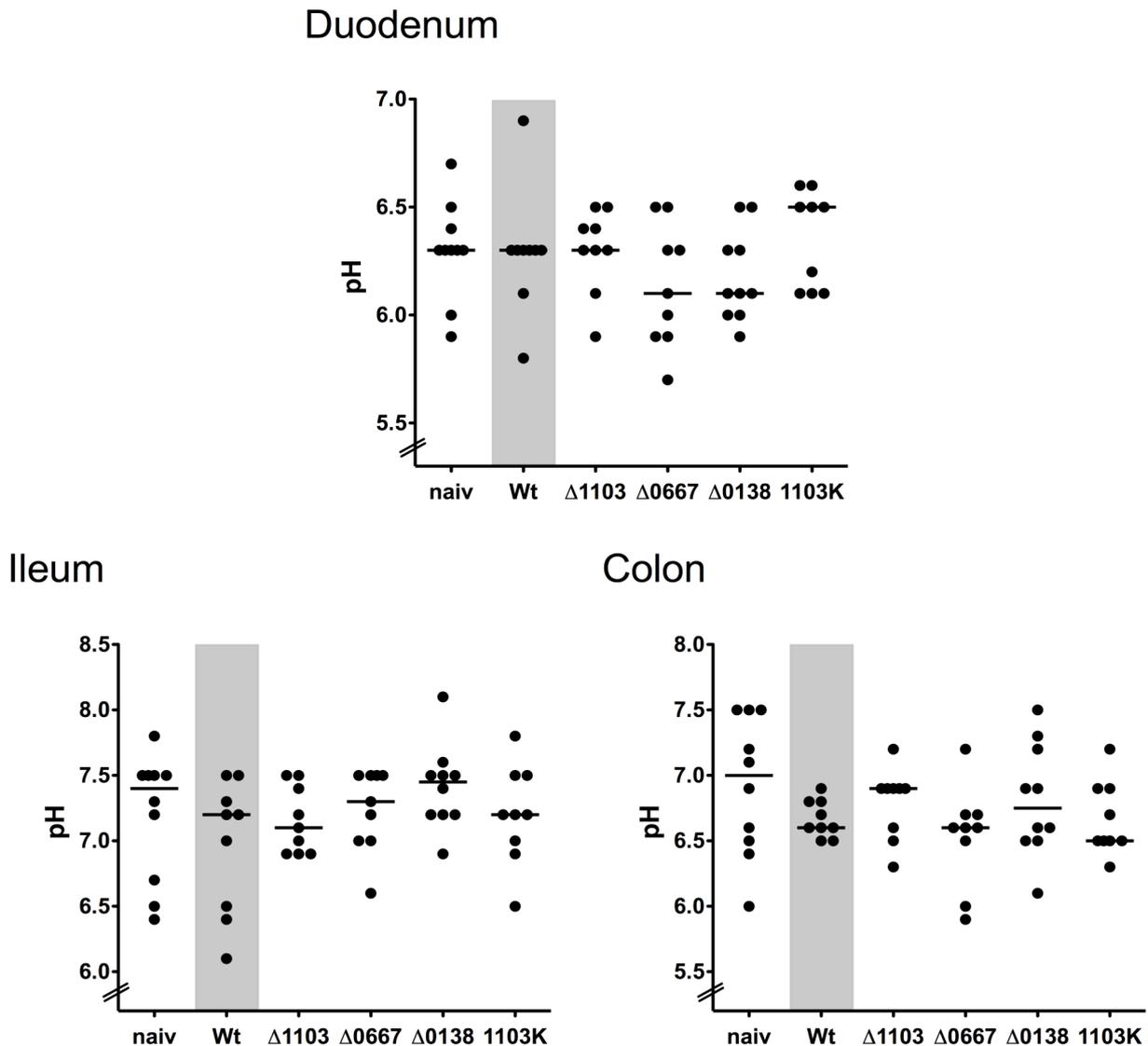


Abb. 26: Luminale pH-Werte im Duodenum, Ileum und Colon an Tag 8 von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ1103), *cj0667*-Mutante (Δ0667), *cj0138*-Mutante (Δ0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken gekennzeichnet.

Es konnten keine unterschiedlichen pH-Werte in den Darmabschnitten Duodenum, Ileum und Colon für die IL10^{-/-}-Tiere detektiert werden. Es kann angenommen werden, dass sowohl der NCTC11168 Wildtyp sowie im Speziellen die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Veränderung des Säure-Basenmilieus im Darm bewirken. Eine zusätzliche mikrobielle Besiedelung konnte ausgeschlossen werden.

4.4.4 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die Darmlängen von infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Die Erhebung der Darmlängen kann Hinweise auf das Ausmaß bzw. die Schwere einer Entzündungsreaktion liefern (siehe 4.3.3). Ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Bedeutung für die Ausprägung einer Darmentzündung haben, wurde analysiert.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den gemessenen Darmlängen der naiven IL10^{-/-}-Tiere im Vergleich zu allen infizierten IL10^{-/-}-Tieren. Ebenfalls zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Darmlängen der Wildtyp-infizierten Tiere im Vergleich zu den IL10^{-/-}-Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Die Ileumlänge wurde im Mittel mit 42,2 cm \pm 3,2 cm gemessen und die Mediane der einzelnen Tiergruppen waren ähnlich. Im Colon wurde im Mittel eine Darmlänge von 8,2 cm \pm 1,0 cm bestimmt. Der Median der naiven Tiere lag bei 9,1 cm. Die Mediane der infizierten Tiergruppen lagen bei etwa 8 cm. Die Mediane der infizierten Tiergruppen waren mit etwa 1 cm geringer als der Median der naiven IL10^{-/-}-Tiere. Bei einer Standardabweichung von 1 cm war dieser Unterschied der Darmlängen im Colon im Rahmen der statistischen Auswertung nicht signifikant. (Abb. 27)

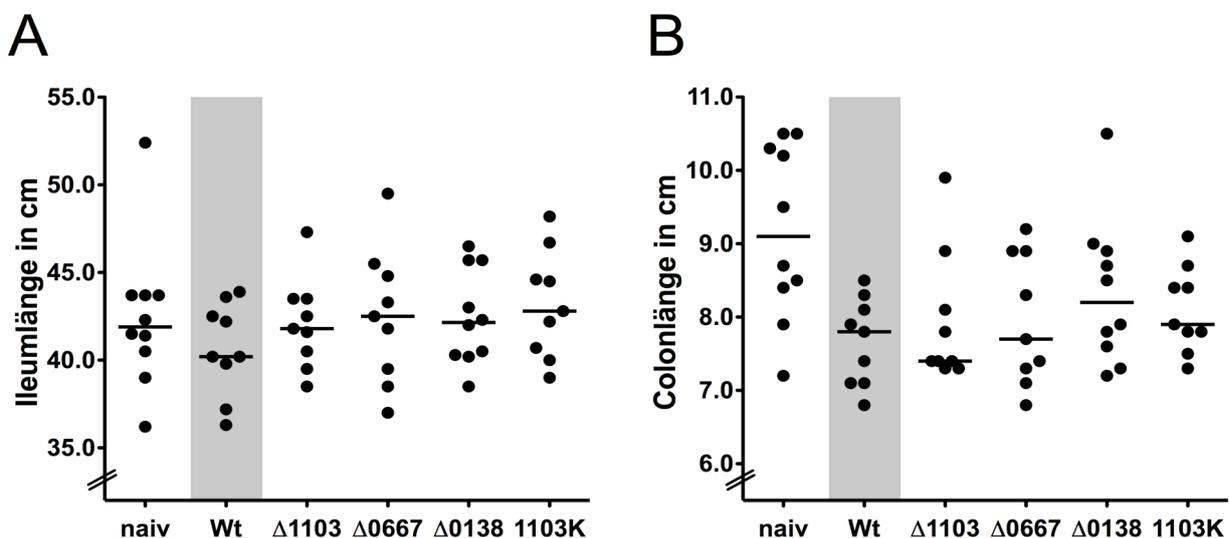


Abb. 27: Ileum- (A) und Colonlängen (B) an Tag 8 von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Sämlingen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die gemessenen Darmlängen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken gekennzeichnet.

Bei der Längenmessung des Ileums ergaben sich keine signifikanten Unterschiede nach NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion. Auch im Colon zeigten sich keine signifikanten

Darmlängen-Unterschiede zwischen den naiven und den infizierten IL10^{-/-}-Tieren. Die Betrachtung der Mediane zeigte lediglich eine Tendenz.

4.4.5 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die Histopathologie des Colons von infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Zur Beurteilung und zur Quantifizierung der durch die *C. jejuni*-Infektion ausgelösten morphologischen Veränderungen am Darmgewebe wurden HE gefärbte Colonschnitte angefertigt, analysiert und ausgewertet. Die Quantifizierung der Pathologie erfolgte anhand des OVA Scores durch die Betrachtung der morphologischen Kriterien Zellinfiltrationen, Epithelhyperplasien, Verlust von Becherzellen und Krypten, sowie transmuralen Entzündungen. (siehe Tabelle 15 in Kap. 3.2.14)

Wie zu erwarten, zeigte die nicht infizierte Gruppe keine pathologischen Veränderungen im Darm. Die *C. jejuni*-infizierten Tiere wiesen größtenteils ausgeprägte Entzündungsreaktionen auf. Histologische Colonschnitte der Tiere, die mit dem Wildtyp und der *cj1103*-Mutante infiziert worden waren, zeigten schwere transmurale entzündliche Infiltrate und erhielten somit die höchste Punktzahl von 4. Die Entzündungsreaktion war deutlicher ausgeprägt als bei den Tieren, die mit der *cj1103*-Komplementante infiziert worden waren (** p<0,01 - *** p<0,001). Ebenfalls zeigten die Tiere der Gruppen Δ0667 (** p<0,01) und Δ0138 (* p<0,05) geringere Pathologien und eine geringere Entzündungsreaktion auf histologischer Ebene im HE-Schnitt als die Tiere, die mit dem Wildtyp infiziert worden waren. (Abb. 28)

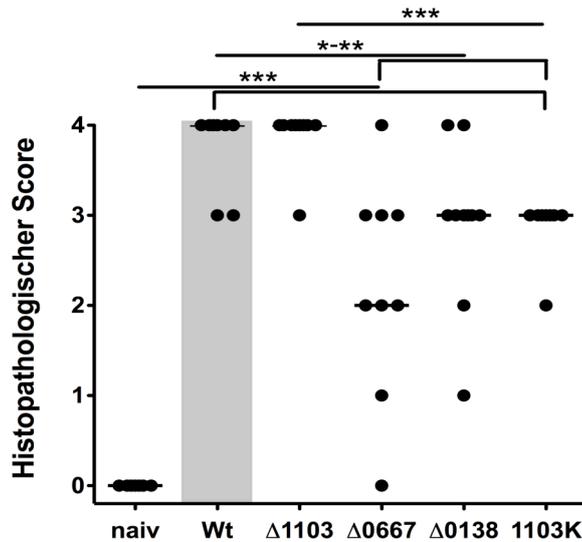


Abb. 28: Histologischer (OVA) Score des Colons an Tag 8 von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ1103), *cj0667*-Mutante (Δ0667), *cj0138*-Mutante (Δ0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01;***p<0,001).

Mit Hilfe der Auswertung der HE-Colonschnitte konnte gezeigt werden, dass die *C. jejuni*-Infektion zu einer starken Entzündungsreaktion im Colon der IL10^{-/-}-Tiere führte. Da die pathologischen Veränderungen der IL-10^{-/-}-Tiere, die mit den Mutanten Δ0667 und Δ0138 infiziert worden waren, signifikant schwächer ausgeprägt waren als bei den Wildtyp-infizierten Tieren, deutet darauf hin, dass die Gene *cj0067* und *cj0138* für die Pathogenität von NCTC11168 *C. jejuni* essentiell sind.

4.4.6 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die Apoptose und Proliferation von infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* im Rahmen der *C. jejuni*-Infektion im IL10^{-/-}GM eine Rolle für die Apoptose oder die Proliferation von intestinalen Wirtszellen spielen, wurde analysiert. Es wurden apoptotische Zellen über Antikörper gegen Caspase3 und proliferierende Zellen über Antikörper gegen Ki67 in histologischen Schnitten des Colons markiert. Wegen einer inkompletten Paraffinisierung konnte anschließend ein Teil der Präparate nicht immunhistochemisch angefärbt und dementsprechend nicht ausgewertet werden.

Bei den naiven IL10^{-/-}-Tieren wurden weniger proliferierende Zellen im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp (* p<0,05), mit den Mutanten Δ1103 und Δ0138 (beide **

p<0,01), sowie mit der Komplementante 1103K (* p<0,05) infiziert worden waren, detektiert. (Abb. 29A)

Im Colon aller infizierten Tiere wurden signifikant mehr apoptotische Zellen im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe gefunden (* p<0,05 - ** p<0,01). Zusätzlich zeigten die Wildtyp-infizierten Tiere eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen im Colon als die Tiere, die mit den Mutanten $\Delta 0667$ und $\Delta 0138$ infiziert worden waren (beide * p<0,05). (Abb. 29B)

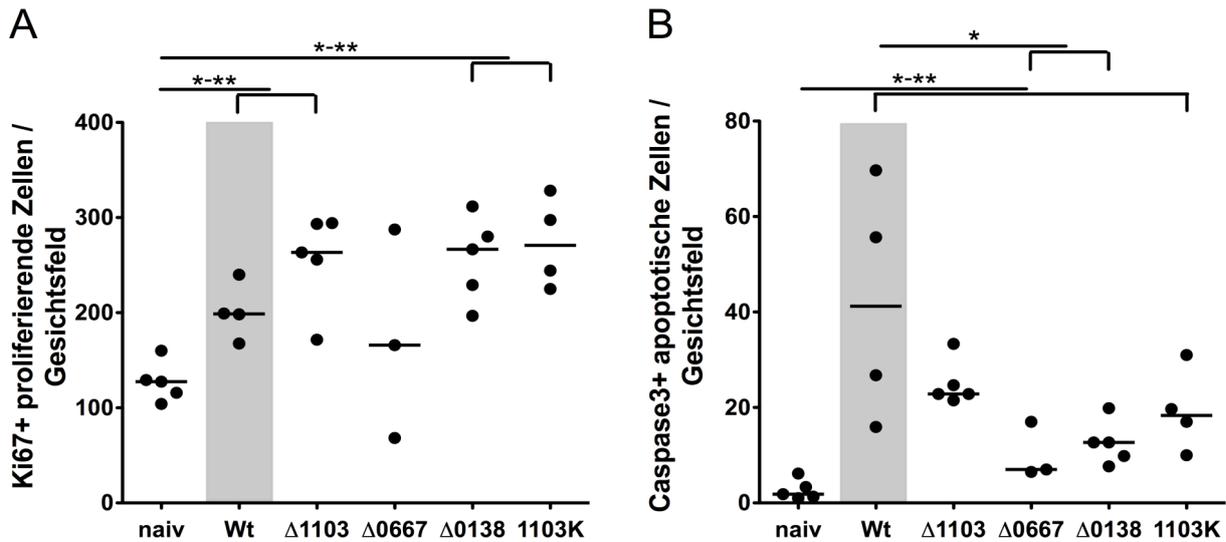


Abb. 29: Proliferierende, Ki67 positive (A) und apoptotische, Caspase 3 positive (B) Zellen an Tag 8 im Colon von $IL10^{-/-}$ GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01;*p<0,001).**

Zusammenfassend führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion zu einer erhöhten Zellproliferation und einer erhöhten Apoptose im $IL10^{-/-}$ GM. Die Tiere, die mit der Mutante $\Delta 0667$ infiziert worden waren, zeigten im Vergleich zu den naiven Tieren keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl proliferierender Zellen. Das bedeutet, dass das Gen *cj0667* eine Rolle für die Proliferation im Wirtsdarm spielt. Die Gene *cj1103* und *cj0138* spielen keine Rolle für die ausgelöste Proliferation. Für Apoptosen im Wirtsdarm spielt das Gen *cj1103* keine Rolle. Die Gene *cj0667* und *cj0138* hingegen spielen für die ausgelösten Apoptosen im Wirtsdarm eine essentielle Rolle und sind somit auch für die Pathogenität von *C. jejuni* von großer Bedeutung.

4.4.7 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf intestinale Zellen des angeborenen Immunsystems von infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Um den Einfluss der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf das zelluläre, angeborene Wirtsimmunsystem im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion im IL10^{-/-}GM zu untersuchen, wurden myeloische Zellen in histologischen Colonschnitten mittels MPO7 angefärbt und gezählt. Wegen einer inkompletten Paraffinisierung konnte lediglich ein Teil der Präparate ausgewertet werden.

Im Generellen konnten nur geringe myeloische Zellzahlen in den einzelnen Präparaten detektiert werden. Im Rahmen der statistischen Auswertung zeigten die naiven Tiere signifikant weniger myeloische Zellen in den Colonschnitten im Vergleich zu den IL10^{-/-}-Tieren, die mit dem Wildtyp und der Mutante Δ 1103 infiziert worden waren (beide * p<0,05). Zusätzlich zeigten die Tiere, die mit der Mutante Δ 0138 infiziert worden waren, geringere myeloische Zellzahlen als die Wildtyp-infizierten Tiere. (Abb. 30)

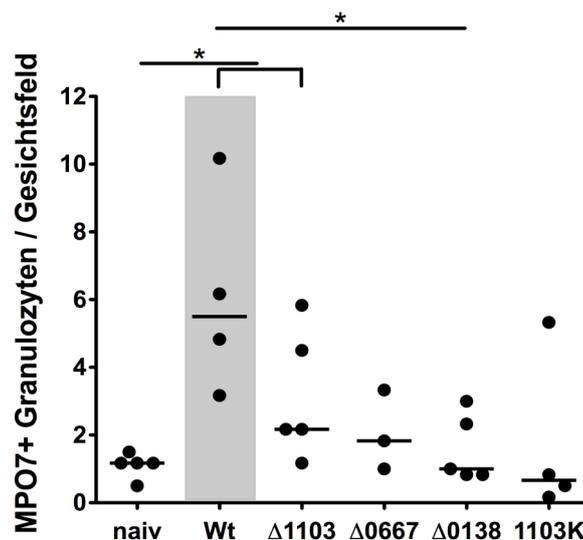


Abb. 30: MPO7 positive, myeloische Zellen an Tag 8 im Colon von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ 1103), *cj0667*-Mutante (Δ 0667), *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die Infektion mit NCTC11168 *C. jejuni* führte unabhängig von dem Gen *cj1103* zu einer vermehrten zellulären Rekrutierung des angeborenen Wirtsimmunsystems im IL10^{-/-}GM. Die Gene *cj0667* und *cj0138* spielten eine Rolle bei der Aktivierung des murinen zellulären angeborenen Immunsystems im IL10^{-/-}GM.

4.4.8 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf intestinale Zellen des erworbenen Immunsystems von infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Um die mögliche Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* bei der *C. jejuni*-Infektion, im Besonderen bei den ausgelösten Wirtsimmunreaktionen zu untersuchen, wurden intestinale Zellen immunhistochemisch angefärbt. Speziell für die erworbene Wirtsimmunität wurden B-Zellen mit dem Marker B220, T-Zellen mit dem Marker CD3 und die Untergruppe der regulatorischen T-Zellen mit dem Marker Foxp3 in histologischen Colonschnitten sichtbar gemacht und quantifiziert. Es konnte nur ein Teil der Präparate bei einer inkompletten Paraffinisierung ausgewertet werden.

Bei den nicht infizierten Tieren wurden weniger T-Zellen in den Colonschnitten nachgewiesen im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp (* p<0,05), den Mutanten Δ1103 und Δ0138 (beide ** p<0,01), sowie der Komplementante 1103K (* p<0,05) infiziert worden waren. (Abb. 31A)

Bei den naiven Kontrolltieren wurden signifikant weniger B-Zellen in den Colonschnitten detektiert im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp und der Mutante Δ1103 infiziert worden waren (***) p<0,001). Zusätzlich zeigten die Tiere, die mit den Mutanten Δ0667 und Δ0138 (beide *** p<0,001), sowie der Komplemente 1103K (** p<0,01) infiziert worden waren, weniger B-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-infizierten Tieren. (Abb. 31B)

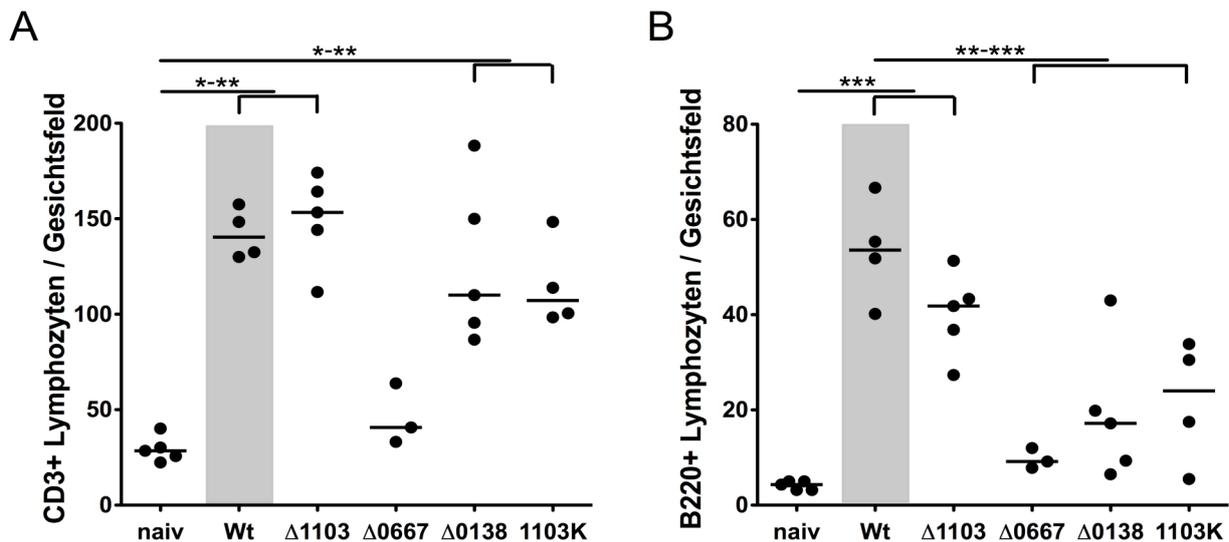


Abb. 31: CD3 positive T- (A) und B220 positive B- (B) Lymphozyten an Tag 8 im Colon von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ1103), *cj0667*-Mutante (Δ0667), *cj0138*-Mutante (Δ0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die naiven Kontrolltiere zeigten weniger regulatorische, Foxp3 positive T-Zellen als die Tiere, die mit dem Wildtyp, den Mutanten $\Delta 1103$ und $\Delta 0138$, sowie der Komplementante 1103K infiziert worden waren (alle * $p < 0,05$). (Abb. 32)

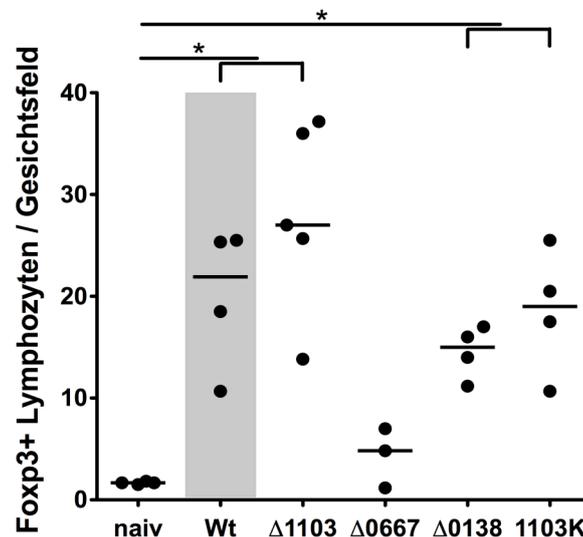


Abb. 32: Foxp3 positive, regulatorische T-Zellen an Tag 8 im Colon von $IL10^{-/-}$ GM ohne Infektion und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Für die Aktivierung von T-Zellen im Generellen und der Untergruppe der regulatorischen T-Zellen im Speziellen spielte die Infektion mit NCTC11168 *C. jejuni* unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0138* eine Rolle. Das Gen *cj0667* spielte eine Rolle bei der Aktivierung von sowohl T-Zellen, als auch regulatorischen T-Zellen des Wirtsimmunsystems im Rahmen der *C. jejuni*-Infektion im $IL10^{-/-}$ GM. Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion im $IL10^{-/-}$ GM führte unabhängig vom Gen *cj1103* zu einer Aktivierung der B-Zellen des erworbenen Wirtsimmunsystems. Die Gene *cj0667* und *cj0138* sind für die Aktivierung der B-Zellen im Colon essentiell.

4.4.9 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf intestinale Mediatoren und Zytokine der angeborenen Immunität von infizierten Tieren im $IL10^{-/-}$ GM

Neben den zellulären Aspekten der angeborenen Wirtsimmunabwehr (4.4.7) wurden auch humorale Aspekte im $IL10^{-/-}$ GM untersucht. Die Mediatoren NO, MUC2 und das

Chemokine MCP-1 wurden für eine detailliertere Betrachtung des angeborenen Immunsystems erhoben und analysiert. Zusätzlich wurden die Zytokine IL-6, TNF- α und IL-22 untersucht.

NO kann als reaktiver Metabolit zum Beispiel von Makrophagen durch die Induktion der NO-Synthase gebildet werden und direkt Mikroben abtöten. [64]

Im Ileum wurde signifikant weniger NO bei den Tieren, die mit der Komplementante 1103K infiziert worden waren, im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp und der Mutante Δ 1103 infiziert worden waren, nachgewiesen. In allen Tiergruppen waren die erhobenen NO-Mengen im Ileum uneinheitlich. (Abb. 33A) Im Colon konnten innerhalb der einzelnen Tiergruppen einheitlichere Resultate gewonnen werden. Im Colon zeigten die nicht-infizierten IL10^{-/-}-Tiere signifikant weniger NO im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp, den Mutanten Δ 1103, Δ 0138 und der Komplementante 1103K infiziert worden waren (alle *** p<0,001). (Abb. 33B)

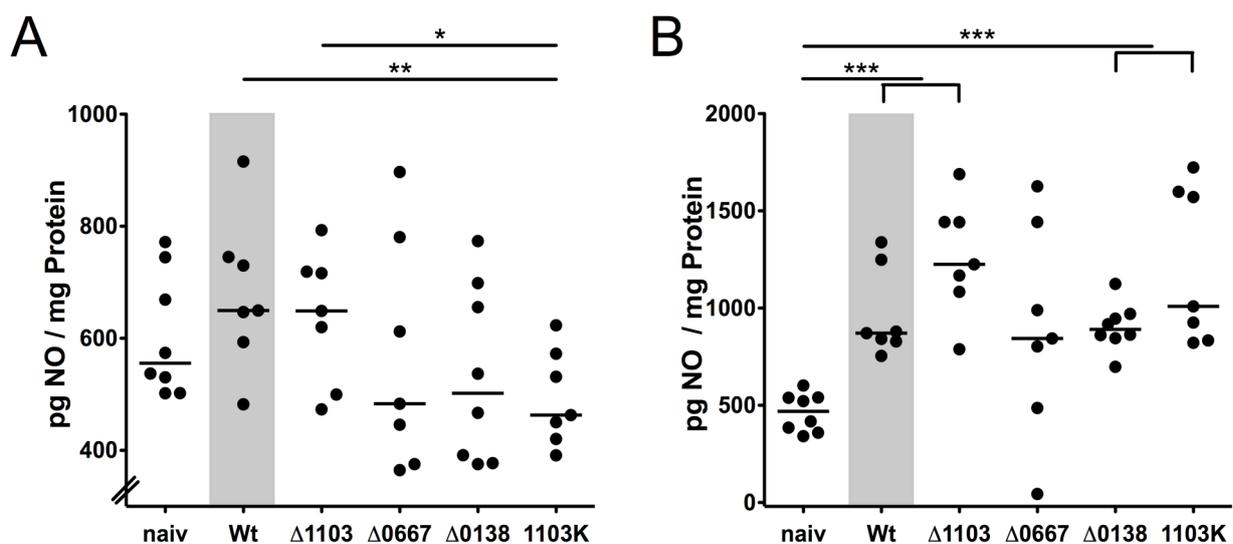


Abb. 33: Stickstoffmonoxid-Konzentrationen im Ileum (A) und Colon (B) an Tag 8 von IL10^{-/-}-GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ 1103), *cj0667*-Mutante (Δ 0667), *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Die gemessenen NO-Konzentrationen sind auf das gemessene Proteingewicht bezogen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001).**

Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0138* im Colon zu einer vermehrten NO-Ausschüttung im IL10^{-/-}-GM. Das Gen *cj0667* spielte dabei eine Rolle.

MCP-1 reguliert als Chemokin die Migration und Infiltration von Makrophagen und Monozyten in entzündete Gewebe. [107]

Im Ileum wurde weniger MCP-1-Protein detektiert als im Colon. Im Ileum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den naiven Tieren und allen *C. jejuni*-infizierten Tieren. (Abb. 34A) Im Colon der naiven Tiere wurde signifikant weniger MCP-1-Protein nachgewiesen im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. (Abb. 34B)

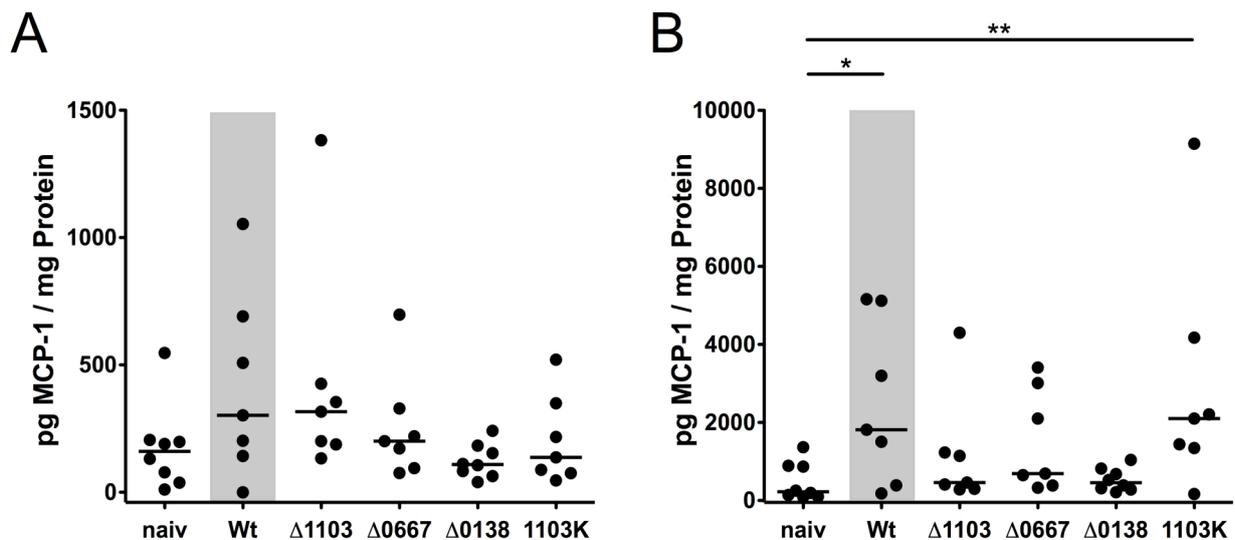


Abb. 34: Monozyten-Chemotaktische-Protein-1-Konzentrationen im Ileum (A) und Colon (B) an Tag 8 von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ1103), *cj0667*-Mutante (Δ0667), *cj0138*-Mutante (Δ0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01;*p<0,001).**

Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer erhöhten Proteinkonzentration des Chemokins MCP-1 im Colon der IL10^{-/-}-Tiere. Die drei untersuchten Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* spielten für das Anlocken von Makrophagen und Monzyten in die entzündeten Gewebe eine Rolle.

MUC2 ist ein Protein, das von den Becherzellen produziert wird und zusammen mit weiteren Proteinen eine schützende Schleimschicht bildet. [108]

Im Ileum zeigten die IL10^{-/-}-Tiere, die mit dem Wildtyp, den Mutanten Δ1103, Δ0667 und der Komplementante 1103K infiziert worden waren, geringere MUC2-Konzentrationen im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren. (Abb. 35A) Im Colon der naiven Kontrolltiere wurde signifikant mehr MUC2-mRNA nachgewiesen als bei den Tieren, die mit dem

Wildtyp, den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Tiere, die mit der Mutante $\Delta 0667$ infiziert worden waren, zeigten im Colon mehr MUC2-mRNA als die Wildtyp-infizierten Tiere. (Abb. 35B)

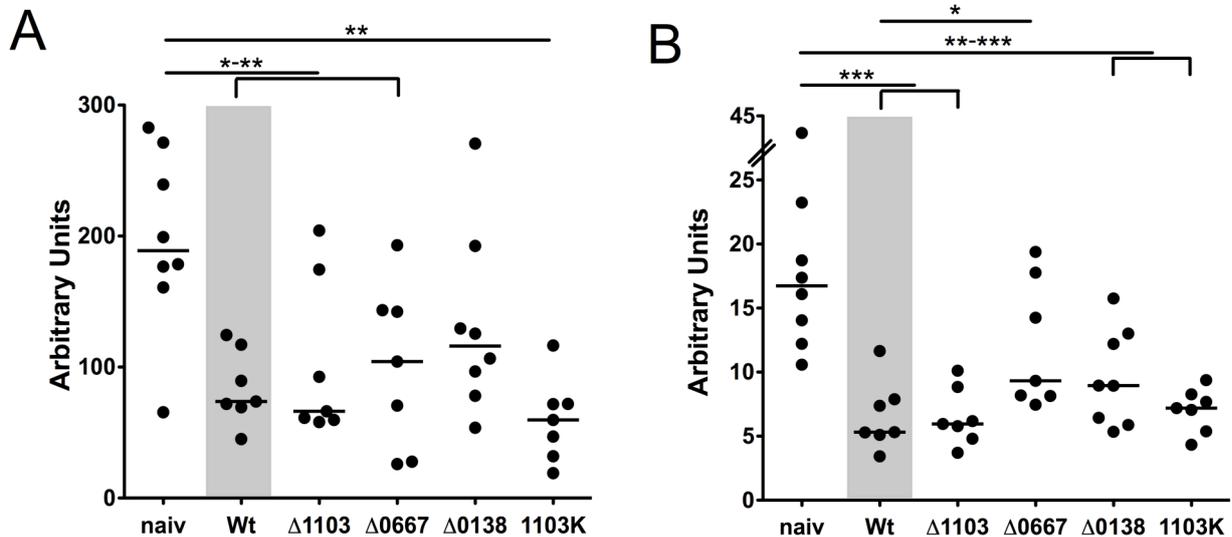


Abb. 35: MUC2-mRNA-Expression im Ileum (A) und Colon (B) an Tag 8 von $IL10^{-/-}$ GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001).**

Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer Reduzierung der schützenden Schleimschicht im Ileum und Colon. Die Gene *cj1103* und *cj0667* spielten im Ileum bei diesem Effekt keine Rolle. Das Gen *cj0138* spielte im Ileum eine Rolle. Im Colon spielten die Gene *cj1103* und *cj0138* keine Rolle bei Zerstörung der schützenden Schleimschicht durch *C. jejuni*. Im Gegensatz dazu war das Gen *cj0667* hierfür von grundlegender Bedeutung.

IL-6 und TNF- α sind Bestandteile der unspezifischen, angeborenen Abwehr und wichtige Zytokine in der frühen Abwehr und in der Entzündung. Zum größten Teil werden sie von Monozyten und Makrophagen gebildet. TNF- α selber kann die Synthese von IL-6 auslösen. [64]

Proteinkonzentrationen und mRNA-Konzentrationen des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) wurden im Ileum und im Colon bestimmt. Bei beiden Verfahren wurden geringere Mengen an TNF- α im Ileum detektiert. Es konnten signifikant höhere TNF- α -mRNA-Konzentrationen im Ileum der Tiere, die mit der Mutante $\Delta 1103$ infiziert worden waren,

im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren nachgewiesen werden. Sonst zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den TNF- α -Konzentrationen der einzelnen Gruppen im Ileum. (Abb. 36A und C) Im Colon wiesen alle infizierten Tiere erhöhte TNF- α -Konzentrationen im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren auf (** p<0,01 - *** p<0,001). Zusätzlich wurde mehr TNF- α -Protein im Colon der Wildtyp-infizierten Tiere gemessen im Vergleich zu den IL-10^{-/-}-Tieren, die mit der Mutante Δ 0138 infiziert worden waren (* p<0,05). (Abb. 36B und D)

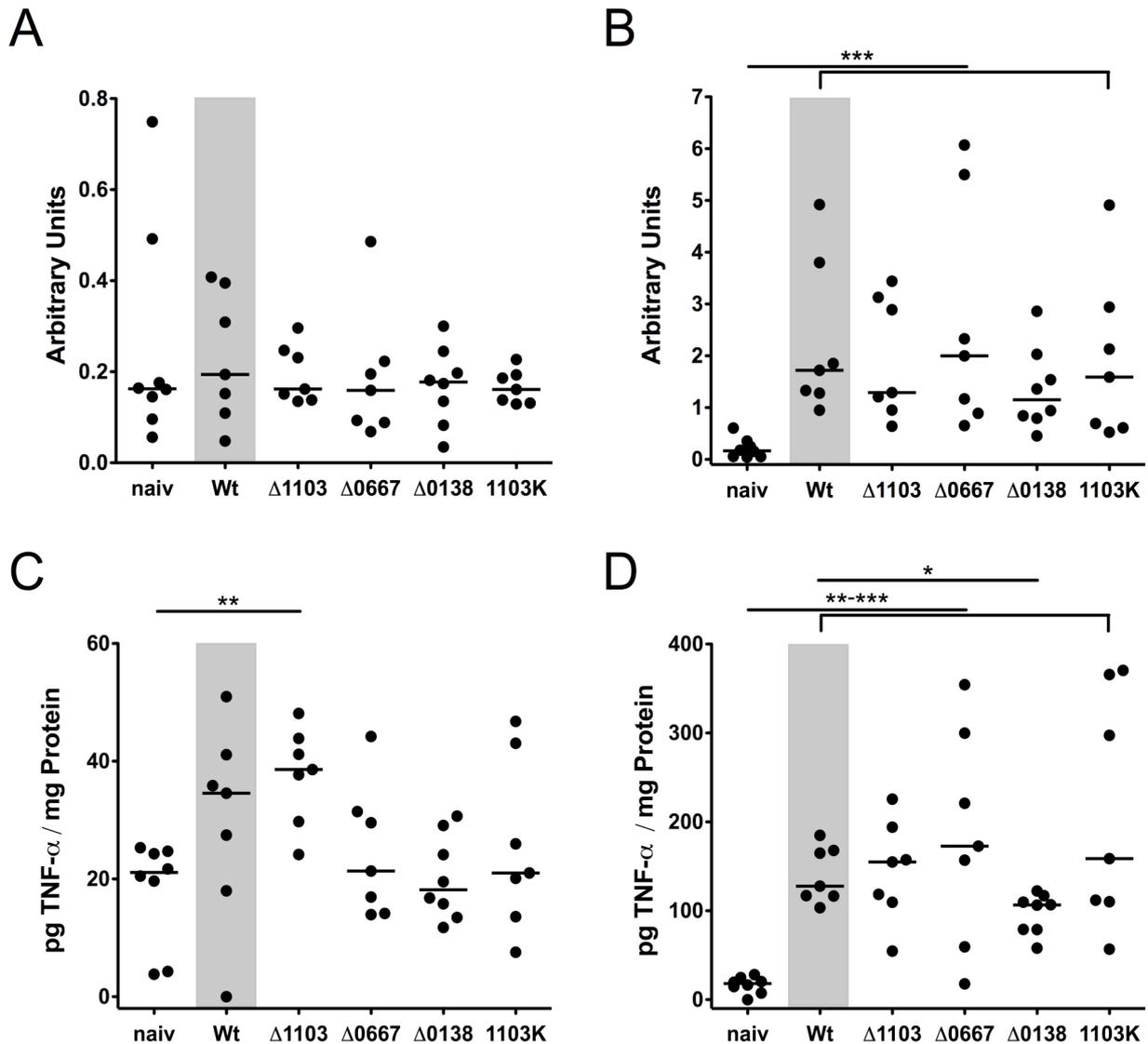


Abb. 36: Tumornekrosefaktor- α -mRNA-Expression im Ileum (A) und Colon (B) und Tumornekrosefaktor- α -Proteinkonzentrationen im Ileum (C) und Colon (D) an Tag 8 von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ 1103), *cj0667*-Mutante (Δ 0667), *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer vermehrten Expression und zu erhöhten Proteinkonzentrationen des Zytokins TNF- α im Colon der IL10^{-/-}-Tiere. Die Gene *cj1103* und *cj0667* spielten hierbei keine Rolle. Das Gen *cj0138* kann im Rahmen der TNF- α -Proteinkonzentrationen eine Rolle spielen. Im Ileum führte die *C. jejuni*-Infektion zu keiner veränderten TNF- α -Expression oder zu veränderten TNF- α -Proteinmengen.

Im Ileum konnte IL-6 nicht und im Colon lediglich in geringen Mengen mittels PCR nachgewiesen werden. Im Colon wurden signifikant höhere IL-6-mRNA-Konzentrationen bei den Tieren, die mit dem Wildtyp, den Mutanten Δ 1103, Δ 0138 und der Komplementante 1103K infiziert worden waren, im Vergleich zu den naiven Tieren bestimmt (* p<0,05 - ** p<0,01). Zusätzlich zeigten die Wildtyp-infizierten Tiere höhere IL-6-mRNA-Mengen als die Tiere, die mit der Mutante Δ 0138 infiziert worden waren (** p<0,01). (Abb. 37A) Es wurden höhere IL-6-Proteinkonzentrationen im Ileum der Wildtyp-infizierten Tiere nachgewiesen im Vergleich zu den Tieren, die mit der Mutante Δ 0138 infiziert worden waren (* p<0,05). Im Colon aller infizierten Tiere wurden signifikant höhere IL-6-Proteinkonzentrationen im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren gefunden (** p<0,01). (Abb. 37B und C)

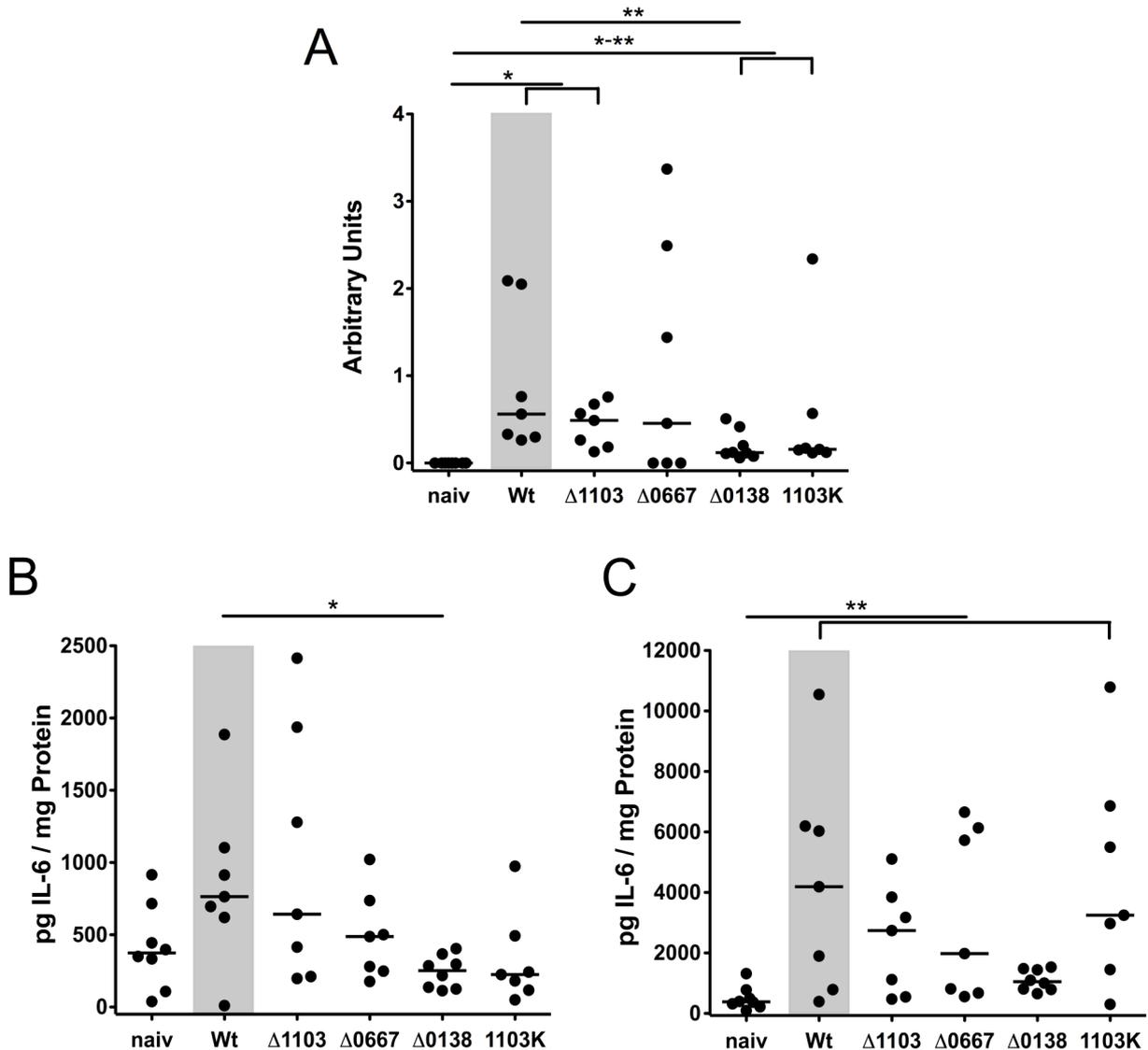


Abb. 37: Interleukin-6-mRNA-Expression im Colon (A) und Interleukin-6-Proteinkonzentrationen im Ileum (B) und Colon (C) an Tag 8 von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ1103), *cj0667*-Mutante (Δ0667), *cj0138*-Mutante (Δ0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte im Colon der IL10^{-/-}-Tiere zu einer erhöhten Expression von IL-6 und zu erhöhten IL-6-Proteinkonzentrationen. Mittels PCR wurden lediglich geringe Mengen an IL-6 nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Gene *cj0667* und *cj0138* zu einer erhöhten Expression von IL-6 im IL10^{-/-}GM beitragen. *cj1103* spielte dabei keine Rolle. Die vermehrte IL-6-Proteinausschüttung im Wirt erfolgte unabhängig von den untersuchten Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* durch die *C. jejuni*-Infektion.

IL-22 wird vorwiegend von Natürlichen Killerzellen und speziellen Populationen von T-Zellen gebildet. IL-22 ist ein Teil der unspezifischen, angeborenen Abwehr. Im Rahmen der Entzündung kann es sowohl proinflammatorisch als auch schützend wirken. [109] Im Ileum und im Colon wurden signifikant höhere IL-22-mRNA-Konzentrationen bei allen infizierten Tieren im Vergleich zu den naiven Tieren nachgewiesen. (Abb. 38)

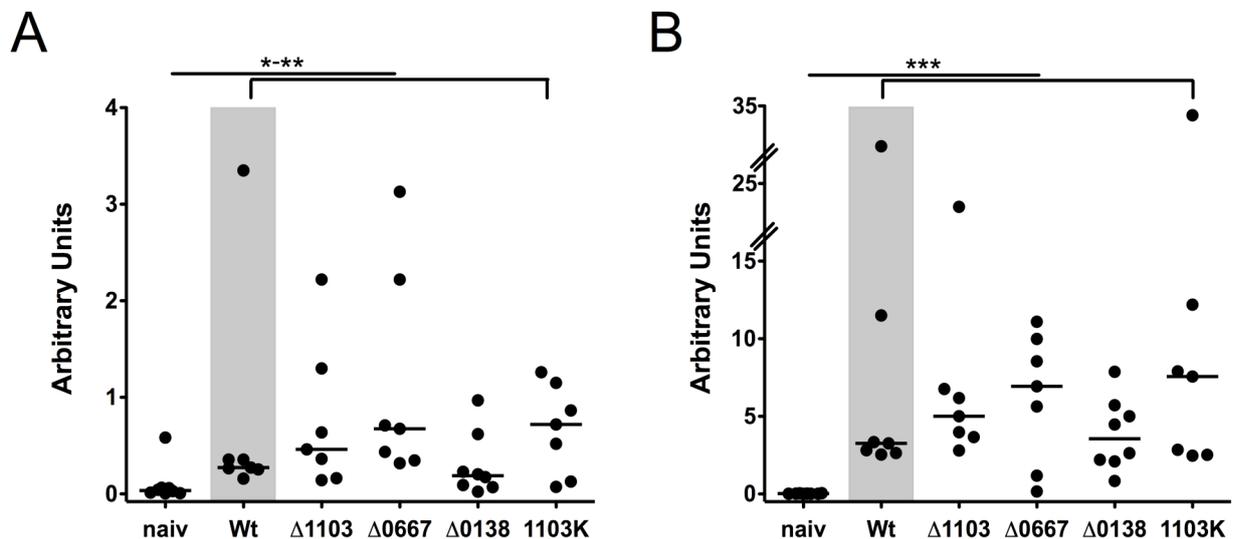


Abb. 38: Interleukin-22-mRNA-Expression im Ileum (A) und Colon (B) an Tag 8 von IL10^{-/-} GM Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ 1103), *cj0667*-Mutante (Δ 0667), *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Im Rahmen des IL10^{-/-}GM führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer vermehrten Expression des Zytokins IL-22 im Darm der Tiere.

4.4.10 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf intestinale Zytokine der erworbenen Immunität von infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Um die angeborene Wirtsimmunität detaillierter zu untersuchen wurden neben den zellulären Anteilen (4.4.8) auch die humoralen Anteile untersucht. Von den Zytokinen IL-18, INF- γ und IL-23 wurden mRNA-Konzentrationen im Darm bestimmt. Für INF- γ wurden zusätzlich die Protein-Konzentrationen erhoben.

IL-18 wird vor allem von aktivierten Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Neutrophilen synthetisiert. IL-18 sorgt für die Aktivierung Natürlicher Killerzellen und

kann zusammen mit IL-12 die Produktion von INF- γ in T_H1-Zellen anregen. [110] IL-18 reguliert sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität.

Im Ileum der naiven IL10^{-/-}-Tiere wurden signifikant geringere IL-18-Konzentrationen nachgewiesen im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp (***) p<0,001), den Mutanten Δ 1103 und Δ 0667, sowie der Komplementante 1103K (alle ** p<0,01) infiziert worden waren. Zusätzlich zeigten die IL10^{-/-}-Tiere, die mit den Mutanten Δ 0667, Δ 0138 (beide ** p<0,01) und der Komplementante 1103K (* p<0,05) infiziert worden waren, geringere Mengen an IL-18-mRNA im Ileum als die Wildtyp-infizierten Tiere. (Abb. 39A)

Im Colon wurden für die nicht-infizierten Tiere höhere IL-18-Konzentrationen gemessen im Vergleich zu IL-10^{-/-}-Tieren, die mit dem Wildtyp (* p<0,05), der Mutante und der Komplementante 1103K (beide ** p<0,01) infiziert worden waren. (Abb. 39B)

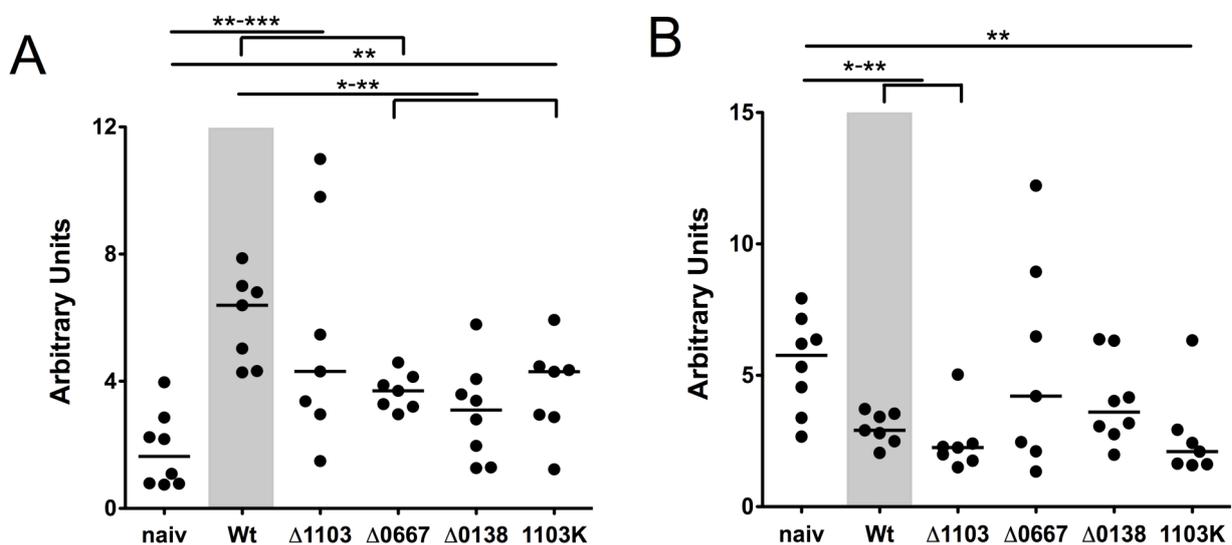


Abb. 39: Interleukin-18-mRNA-Expression im Ileum (A) und Colon (B) an Tag 8 von IL10^{-/-} GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ 1103), *cj0667*-Mutante (Δ 0667), *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01;*p<0,001).**

Es kann davon ausgegangen werden, dass eine NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion unabhängig von dem Gen *cj1103* eine erhöhte IL-18-Expression im Ileum und eine niedrigere IL-18-Expression im Colon bewirkt. Für die *C. jejuni*-vermittelte IL-18-Expression sind die Gene *cj0667* und *cj0138* essentiell, sowohl im Ileum als auch im Colon.

INF- γ wird vor allem von T_H1-Zellen, aber auch von Natürlichen Killerzellen (NK) und zytotoxische T-Zellen synthetisiert. INF- γ unterstützt die zelluläre Abwehr durch die

Aktivierung von Makrophagen, die wiederum reaktive Sauerstoff- und NO-Metabolite produzieren. [64]

Im Ileum der Tiere des IL10^{-/-}GM konnten mittels mRNA-Bestimmungen lediglich geringe Mengen von Interferon- γ detektiert werden. Es wurden geringere INF- γ -Proteinmengen im Ileum im Vergleich zum Colon bei allen Tieren gemessen. Die INF- γ -mRNA-Mengen im Colon und die INF- γ -Proteinmengen im Ileum und Colon waren bei allen infizierten Tieren signifikant höher im Vergleich zu den naiven Kontrollen. (Abb. 40)

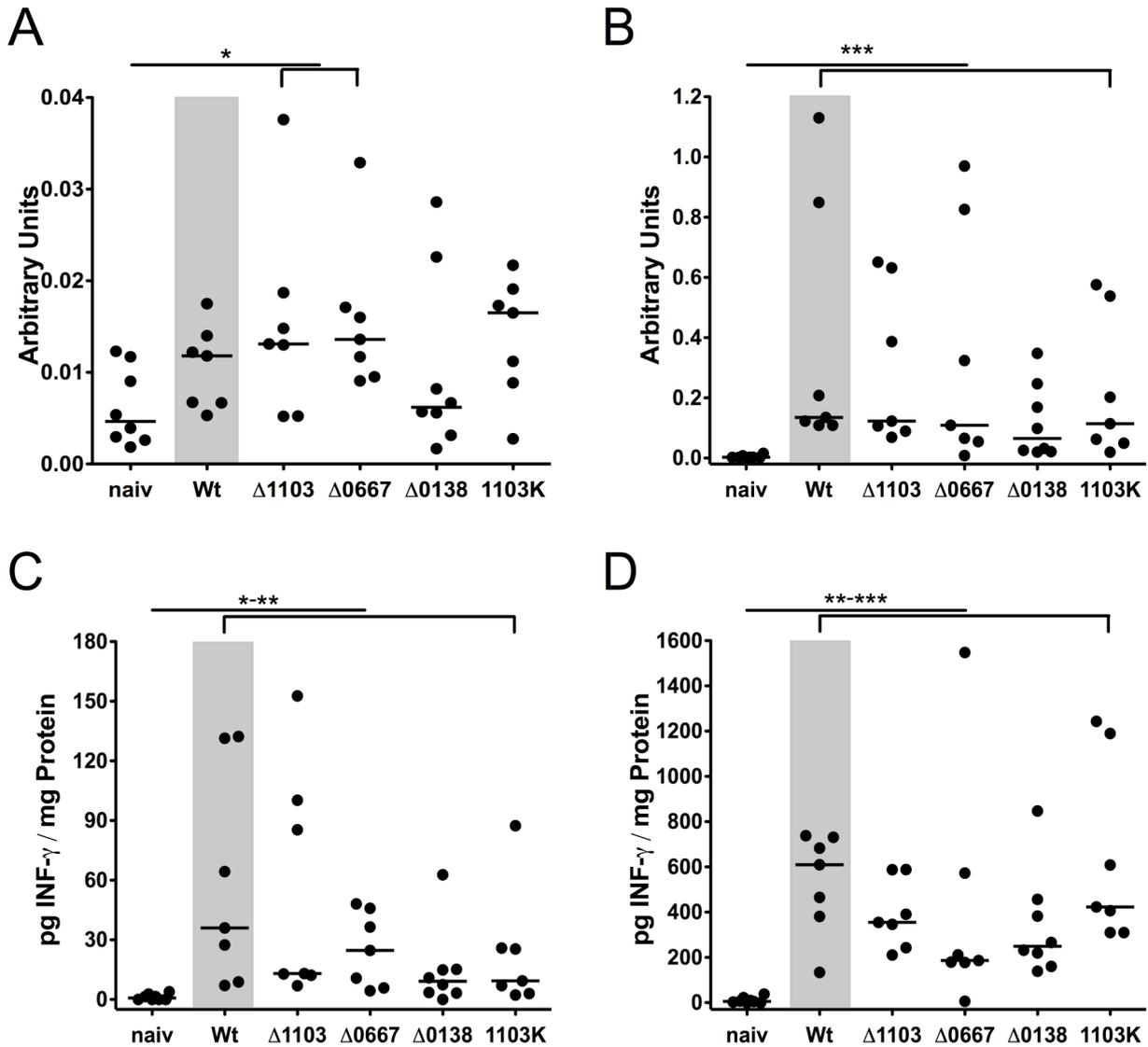


Abb. 40: Interferon- γ -mRNA-Expression im Ileum (A) und Colon (B) und Interferon- γ -Proteinkonzentrationen im Ileum (C) und Colon (D) an Tag 8 von IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante ($\Delta 1103$), *cj0667*-Mutante ($\Delta 0667$), *cj0138*-Mutante ($\Delta 0138$) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01;*p<0,001).**

Es kann davon ausgegangen werden, dass die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer vermehrten Synthese des Zytokins INF- γ im IL10^{-/-}GM führte.

IL-23 wird von aktivierten Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet und unterstützt die Bildung von Th17-Zellen. Th17-Zellen produzieren dann wiederum IL-17, IL-6 und TNF- α und werden mit dem Auslösen von Autoimmunität in Verbindung gebracht. [111]

Bei den naiven Tieren konnte mehr IL-23-mRNA im Ileum nachgewiesen werden im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp, der Mutante Δ 0138 (beide * $p < 0,05$) und der Komplementante 1103K (** $p < 0,01$) infiziert worden waren. Im Colon zeigte die Wildtyp-infizierte Gruppe mehr IL-23-mRNA im Vergleich zu der Tiergruppe, die mit der Mutante Δ 0138 infiziert worden war (* $p < 0,05$). Die gemessenen IL-23-mRNA-Konzentrationen waren bei allen Tieren relativ gering. Die Mediane aller Tiergruppen im Ileum und Colon zeigten lediglich geringe Unterschiede. (Abb. 41)

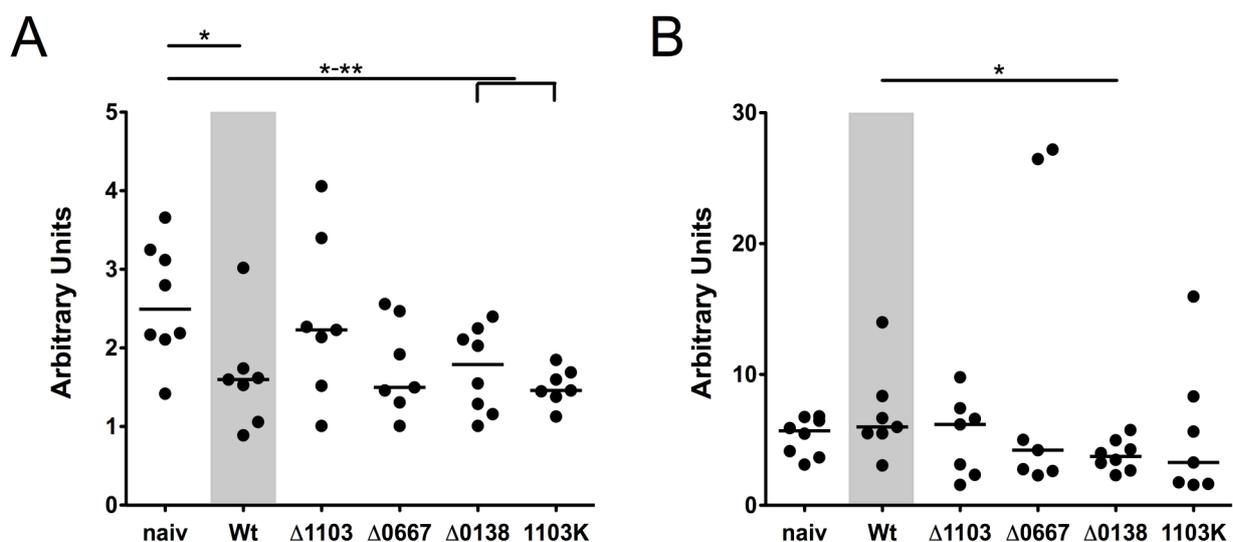


Abb. 41: Interleukin-23-mRNA-Expression im Ileum (A) und Colon (B) an Tag 8 IL10^{-/-}GM ohne Infektion (naiv) und nach der Infektion mit den NCTC11168 *C. jejuni*-Stämmen: Wildtyp (Wt), *cj1103*-Mutante (Δ 1103), *cj0667*-Mutante (Δ 0667), *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und *cj1103*-Komplementante (1103K). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mediane sind durch Balken und Signifikanzniveaus durch Sterne gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Die Einordnung des Zytokins IL-23 im durch geführten IL10^{-/-}GM anhand der erhobenen Ergebnisse ist schwierig. Im Colon führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion zu keiner veränderten IL-23-Expression im Rahmen des IL10^{-/-}GM. Im Ileum zeigten sich zwar signifikante Unterschiede, jedoch wurden nur geringe Mengen von IL-23 nachgewiesen.

Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer geringeren IL-23-Expression im Ileum, unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0667*. Das Gen *cj0138* spielte dabei offenbar eine grundlegende Rolle.

4.4.11 Einfluss der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf die bakterielle Translokation in infizierten Tieren im IL10^{-/-}GM

Im Rahmen einer Colitis kann es zu epithelialen Barrieredefekten im Darm kommen. Bei vorhandenen Epitheldefekten können Bakterien in andere Kompartimente, wie bei einer Sepsis, translozieren. Ob die Infektion mit NCTC11168 *C. jejuni* im Rahmen des IL10^{-/-}GM zu einer bakteriellen Translokation führt und ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* hierbei eine Rolle spielen, wurde untersucht. Betrachtet wurden die Kompartimente Leber, Niere, Milz, mesenteriale Lymphknoten und das Blut, die bei der Sektion an Tag 8 p.i. entnommen wurden.

Am häufigsten wurde eine Translokation in die mesenterialen Lymphknoten, die von den untersuchten Kompartimenten dem Darm am nächsten liegen, beobachtet. Bei den Wildtyp-infizierten Tieren kam es zu keiner bakteriellen Translokation in die mesenterialen Lymphknoten. Zwei Tiere der Gruppe Δ1103 (22,2%), vier Tiere der Gruppe Δ0667 (44,4%), acht Tiere der Gruppe Δ0138 (88,8%) und sechs Tiere der Gruppe 1103K (66,6%) zeigten eine bakterielle Translokation in die mesenterialen Lymphknoten. Zusätzlich zeigte ein Tier der Gruppe Δ1103 eine bakterielle Translokation in die Milz. Zwei Tiere der Gruppe Δ0667 zeigten eine Translokation in die Leber und ein Tier der Gruppe Δ0667 zeigte eine Translokation in die Niere. Je ein Tier der Gruppe Δ0138 zeigte eine bakterielle Translokation in die Milz und in das Blut.

Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte zu keiner bakteriellen Translokation in die untersuchten Kompartimente. Die Mutationen in den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* begünstigten eine Translokation von *C. jejuni*. Das könnte bedeuten, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die lokale Pathogenese der *C. jejuni*-Enteritis essentiell sind.

5. Diskussion

5.1 Die *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138*

Cj1103 wird als *CrsA* (carbon storage regulator A) annotiert. [115] Homologe des *CrsA*-Proteins konnten in einer Vielzahl unterschiedlicher Bakterienspezies gefunden werden. Meistens sind die *crsA*-Gene in den Kohlenstoffmetabolismus und der Expression von Virulenzfaktoren involviert. [116] Bei *E. coli* wirkt das *crsA*-Gen als globaler Regulator bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie der Glykogenbiosynthese, der Glykolyse, der Beweglichkeit und der Biofilmbildung. [103] Timmermans *et al.* untersuchten das *crsA*-Gen in *E. coli*. Die Generierung einer *crsA*-Komplementante in *E. coli* gestaltete sich problematisch, da es mit dem verwendeten Promotor zu einer zu hohen Expressionsrate für das *crsA*-Gen kam. Die Autoren griffen auf einen Promotor mit einer niedrigeren Ableserate zurück, um eine lebensfähige *CrsA*-Komplementante in *E. coli* zu generieren und weiter zu analysieren. [103, 117] Ähnliche Resultate konnten im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden. Bei der Konstruktion der *cj1103*-Komplementante wurde zunächst der Standardpromotor *fdxA* mit einer mittleren Ableserate verwendet. Die Transformation in sowohl den NCTC11168 *C. jejuni*-Wildtyp als auch der zuvor erfolgreich generierten *cj1103*-Mutante gelang selbst nach mehreren Versuchen nicht. Anschließend wurde auf den Standardpromotor *metK* mit einer niedrigen Ableserate zurückgegriffen. Hiermit konnte die Transformation erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden eine *cj1103*-Komplementante und eine *cj1103*-Überexpressionsmutante generiert. Diese Ergebnisse, sowohl bei *E. coli* als auch bei *C. jejuni*, legen nahe, dass eine zu hohe Ableserate des *crsA*-Gens schädlich für das Bakterium und nicht mit dem Überleben vereinbar ist. [103] Warum wurde auf Standardpromotoren zurückgegriffen und nicht der Originalpromotor des Gens *cj1103* verwendet? Die Verwendung des originalen *cj1103*-Promotors ist theoretisch möglich, praktisch aufwendig und kann zu unerwünschten Nebeneffekten führen. Das Gen *cj1103* liegt in einem so genannten Operon. Ein Operon ist eine Regulationseinheit, die sich aus Operatorgenen und Strukturgenen zusammensetzt und dessen Aktivität durch vom Operon räumlich getrennte Regulatorgene gesteuert wird. [118] Dugar *et al.* führten Transkriptomanalysen mit Hilfe einer RNA-seq-Methode an vier verschiedenen *C. jejuni*-Stämmen durch. Die gefundenen und veröffentlichten Transkriptions-Start-Stellen (TSS) des *C. jejuni*-Genoms bilden die Grundlage für die Lokalisation von Promotoren und somit auch Operonen. [83] In der Nähe des Gens *cj1103* befinden sich mehrere

TSS. Das Operon wird wahrscheinlich von den Genen *cj1102* bis *cj1104* gebildet. [83] Da das Gen *cj1103* nicht das erste Gen in der Operonstruktur ist, wäre eine Konstruktion mit dem originalen Promotor doppelt so aufwendig gewesen. Wie bei unserer Konstruktion des Komplementationsplasmides (Kap. 3.1.3) hätte man das Gen *cj1103* aus dem Genom herauslösen müssen. In einem zusätzlichen zweiten Schritt hätte man den Operonpromotor, welcher vor dem Gen *cj1102* liegt, herauslösen müssen. Anschließend hätte man beide Fragmente in einem Plasmid zusammengefügt und ein Komplementationsplasmid mit originalem *cj1103*-Promotor, welcher dem Operonpromotor entspricht, hergestellt. Dieses wäre praktisch machbar, jedoch aufwendiger gewesen. Vom Operon räumlich getrennte Regulatorgene steuern die Aktivität des Operonpromotors und somit des ganzen Operons. [118] Regulatorgene können die Expression der Operongene steigern oder unterdrücken. Müsste man bei der Konstruktion eines Komplementationsplasmides mit dem Operonpromotor diese Regulatorgene zusätzlich in das Plasmid einfügen? Bzw. funktioniert der Operonpromotor überhaupt ohne diese regulierenden Gene? Hinzu kommt, dass man bisher gar nicht alle Regulatorgene eines Operons vollständig identifiziert hat. Im Genom müssen die Regulatorgene nicht direkt vor dem Operonpromotor lokalisiert sein, sondern können sich an unterschiedlichen Orten im Genom befinden. Das einzelne Herauslösen dieser Gene aus dem Genom wäre noch einmal aufwendiger als die bereits aufwendige Konstruktion des Komplementationsplasmides mit dem originalen *cj1103*-Promotor. Selbst wenn man diese aufwendige Herstellung eines Komplementationsplasmides mit Operonpromotor und Regulatorgenen durchführen würde, ist es fraglich, ob das ganze Konstrukt in sich noch funktionieren würde. Zusätzlich würden die Regulatorgene die Expression des Gens *cj1103* verändern und die Ergebnisse könnten verfälscht werden. Die aufwendige Konstruktion und die unerwünschten Nebeneffekte sind ausschlaggebend für die Verwendung von Standardpromotoren. Standardpromotoren werden nicht reguliert. Die Gen-Expressionsrate wird nicht aktiviert oder unterdrückt, sondern ist immer vorhanden und bei einer kontinuierlichen Rate gleich bleibend. Der Standardpromotor *metK* hat eine kontinuierlich niedrige Expressionsrate und der Standardpromotor *fdxA* eine kontinuierliche mittlere Expressionsrate.

Cj0667 wird als Protein, das eine S4 Gendomäne enthält, annotiert. [119] Die Biogenese einer funktionstüchtigen 30S-Untereinheit des Ribosoms geht mit einer

räumlichen Umstrukturierung sowohl der 16S-rRNA als auch der ribosomalen Proteinanteile einher. Hierbei spielt das ribosomale Protein S4 eine entscheidende Rolle, entweder in einer frühen Phase des Zusammenfügens der 30S-Untereinheit durch die Regulierung eines Operons oder durch die Regulierung an mehreren Strukturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Assimilierung der 30S-Untereinheit. [120] Auch *cj0667* befindet sich in einem Operon, welches von den Genen *cj0667* bis *cj0669* gebildet wird. [83]

Cj0138 wird als ein hypothetisches Protein annotiert. [121] Bisher konnte keine Proteinfunktion oder Bedeutung des Gens beschrieben werden. Das Gen *cj0138* liegt in einem relativ langen Operon, welches von den Genen *cj0136* bis *cj0140* gebildet wird. [83]

5.2 Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für den Phänotyp von NCTC11168 *C. jejuni*

5.2.1 Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Lebensfähigkeit, das Wachstum und die Beweglichkeit von *C. jejuni* unter optimalen Bedingungen

C. jejuni ist mikroaerophil, capnophil und gehört zu den thermophilen *Campylobacter*-Arten. Für eine optimale Umgebung werden 3-15% Sauerstoff, mindestens 3% Kohlenstoffdioxid und eine Temperatur zwischen 34°C und 44°C benötigt. Die Standard-Untersuchungsbedingungen in den meisten Laboratorien für *C. jejuni* bestehen aus einer mikroaerophilen Umgebungsgaszusammensetzung von 5% O₂, 10% CO₂ und 85% N₂, sowie einer Umgebungstemperatur von 37°C. 37°C entsprechen der Körperkerntemperatur des Menschen. 42°C ist das Temperaturoptimum von *C. jejuni* und entspricht etwa der Körperkerntemperatur von Vögeln. [4, 98] Ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Rolle in der Lebensfähigkeit, für das Wachstum oder die Beweglichkeit von *C. jejuni* NCTC11168 spielen, wurde unter diesen standardisierten Bedingungen analysiert. Des Weiteren wurden diese Analysen auch bei einer Temperatur von 42°C, dem Temperaturoptimum von *C. jejuni* [4], durchgeführt.

Um die Rolle des Gens *cj1103* in *C. jejuni* NCTC11168 untersuchen zu können, wurden gentechnisch veränderte *C. jejuni*-Stämme hergestellt. Bei der Mutante Δ 1103 fehlt das funktionstüchtige Gen *cj1103*. Auch der Komplementante 1103K fehlt das

funktionstüchtige Gen *cj1103* am Genlokus *cj1103*. In das Genom der Komplementante wurde dafür ein funktionstüchtiges Gen *cj1103* an den Genlokus *cj0046* eingebracht. Die Überexpressionsmutante Wto1103 enthält zwei funktionstüchtige Genkopien des Gens *cj1103*, eine an dem Genlokus *cj1103* und eine an dem Genlokus *cj0046*. Die Lebensfähigkeit, die Beweglichkeit und das Wachstum der Mutante $\Delta 1103$, der Komplementante 1103K und der Überexpressionsmutante Wto1103 wurden analysiert und mit dem Wildtyp verglichen. Die Mutante $\Delta 1103$, die Komplementante 1103K und die Überexpressionsmutante Wto1103 zeigten keine Unterschiede zum Wildtyp bei den generellen Fähigkeiten Überleben, Beweglichkeit und Wachstum bei sowohl 37°C als auch 42°C. Ferner wurde die maximal erreichte Wachstumsgeschwindigkeit in dem hier verwendeten geschlossenen Versuchsaufbau untersucht. Die Überexpressionsmutante Wto1103 erreichte die höchste maximale Wachstumsgeschwindigkeit. Diese war signifikant höher als die erreichten Wachstumsgeschwindigkeiten vom Wildtyp, der Mutante $\Delta 1103$ und der Komplementante 1103K. Die Komplementante 1103K wiederum erreichte eine signifikant höhere Wachstumsgeschwindigkeit als die Mutante $\Delta 1103$. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Überexpression des Gens *cj1103* für die Wachstumsgeschwindigkeit von *C. jejuni* NCTC11168 eine Rolle spielt. Jedoch spielt das Gen *cj1103* für die Lebensfähigkeit und die Beweglichkeit unter optimalen Bedingungen keine Rolle. Die Fähigkeit eines schnelleren Wachstums kann einen Vorteil für *C. jejuni* unter komplexeren Bedingungen bedeuten und dann als Virulenzfaktor gewertet werden. Eine weitere Überprüfung unter komplexeren Bedingungen, wie zum Beispiel im Tiermodell, ist nötig und ließe dann auch eine Aussage über die biologische Relevanz dieses beobachteten schnelleren Wachstums der Komplementante 1103K und der Überexpressionsmutante Wto1103 zu. Fields *et al.* untersuchten ebenfalls das Gen *cj1103* jedoch in *C. jejuni* 81-176. Auch hier zeigten die hergestellte Mutante und der Wildtyp ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die Autoren bestätigen somit, dass eine Mutation im Gen *cj1103* keine Bedeutung für das Wachstum bzw. für die Wachstumsgeschwindigkeit von *C. jejuni* hat. [100]

Das Gen *cj1103* liegt in einem Operon (Kap. 5.1). Phänotypische Veränderungen, die von Mutationen in einem Operon ausgehen, können auch durch einen so genannten Polareffekt bedingt sein. Mit den Analysen der Komplementante 1103K sollten mögliche Polareffekte ausgeschlossen werden. Ein Polareffekt wäre z.B. wenn die Mutation im Gen *cj1103* die Expression im Operon vorzeitig stoppen würde. In der hergestellten

Mutante würde dann sowohl das Gen *cj1103* als auch das Gen *cj1104* nicht mehr exprimiert. Zeigt diese Mutante einen veränderten Phänotyp, könnte dieser durch das Gen *cj1103* oder das Gen *cj1104* bedingt sein. Um einen Polareffekt ausschließen zu können und sicher zu sein, dass der gesehene Phänotyp tatsächlich durch die Mutation im Gen *cj1103* hervorgerufen wurde, erfolgte die Herstellung der Komplementante 1103K zur Kontrolle. In der Komplementante wurde lediglich das intakte Gen *cj1103* an einer anderen Stelle im Genom eingebracht. Am Genlokus *cj1103* war das Gen weiterhin funktionsuntüchtig und in diesem Beispiel ebenfalls das im Operon folgende Gen *cj1104*. Das Genom der Komplementante hätte ein intaktes Gen *cj1103* und ein funktionsuntüchtiges Gen *cj1104*. Würde die Komplementante mindestens einen dem Wildtyp ähnlichen Phänotyp zeigen, wäre ein Polareffekt ausgeschlossen. Der gezeigte Phänotyp der Mutante wäre tatsächlich durch die Mutation im Gen *cj1103* bedingt. Würde die Komplementante einen ähnlichen Phänotyp wie die Mutante zeigen, müsste von einem Polareffekt ausgegangen werden und dieser Phänotyp wäre in diesem Beispiel auf das Gen *cj1104* bzw. auf andere im Operon folgende Gene zurückzuführen. Für die Konstruktion der Komplementationsplasmide wurden Standard-Promotoren verwendet (siehe 3.1.3 und 5.1), welche eine kontinuierliche Expression bewirken. Die Genexpression wird nicht aktiviert oder unterdrückt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten legen nahe, dass der in der Komplementante 1103K verwendete Promotor *metK* immer noch zu einer relativen hohen Ableserate des Gens *cj1103* führte. Die Komplementierung führte nicht nur zu einer Restaurierung des Wildtyp-Phänotyps, sondern ging darüber hinaus. Die Komplementante 1103K zeigte einen Phänotyp zwischen dem Wildtyp und der Überexpressionsmutante Wto1103. Die hergestellte Komplementante 1103K zeigte somit eine leichte Überexpression des Gens *cj1103*. Es handelt sich um eine gelungene Komplementante, da die Kontrollfunktion und somit die Evaluierung von vermeintlichen Polareffekten gegeben waren. Die erhöhten Ableseraten der Komplementante 1103K und der Überexpressionsmutante Wto1103 waren mit dem Leben vereinbar und führten zu einem je nach Ableserate abgestuften schnelleren Wachstum.

Um die Rolle des Gens *cj0667* in *C. jejuni* NCC11168 untersuchen zu können, wurden analog zum Gen *cj1103* (siehe oben) die Mutante $\Delta 0667$, die Komplementante 0667K und die Überexpressionsmutante Wto0667 hergestellt und im Vergleich zum Wildtyp

analysiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Mutante $\Delta 0667$, der Komplementante 0667K und der Überexpressionsmutante Wto0667 im Vergleich zum Wildtyp für die generelle Lebensfähigkeit, die Beweglichkeit und das Wachstum gefunden werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Gen *cj0667* keine Rolle für die Lebensfähigkeit, die Beweglichkeit und das Wachstum von *C. jejuni* NCTC11168 unter optimalen Bedingungen spielt.

Auch für die Untersuchung des Gens *cj0138* wurden eine Mutante ($\Delta 0138$), eine Komplementante (0138K) und eine Überexpressionsmutante (Wto0138) hergestellt. Dieses geschah wie oben beschrieben analog zu dem Gen *cj1103*. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Lebensfähigkeit, der Beweglichkeit und des Wachstums zwischen der Mutante $\Delta 0138$, der Komplementante 0138K und der Überexpressionsmutante Wto0138 im Vergleich zum Wildtyp. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Gen *cj0138* keine Rolle für die Lebensfähigkeit, die Beweglichkeit und das Wachstum von *C. jejuni* NCTC11168 spielt.

5.2.2 Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für den *C. jejuni*-Metabolismus

Der *C. jejuni*-Metabolismus verwertet vor allem Aminosäuren, organische Säuren, Pyruvat und Acetyl-CoA energiebringend. *C. jejuni* ist nicht in der Lage eine vollständige Glykolyse zum Abbau von Kohlehydraten zu Pyruvat durchzuführen, da *C. jejuni* das Schlüsselenzym Phosphofruktokinase fehlt. In Kapitel 1.1.6 und Abbildung 2 sind die einzelnen Stoffwechselwege von *C. jejuni* detailliert beschrieben und aufgeführt. [4, 44, 63] Ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Bedeutung für den Metabolismus von *C. jejuni* NCTC11168 haben, wurde an Wachstumsanalysen in Mangelmedien untersucht. Die supplementierten Mangelmedien enthielten alle nötigen Nährstoffe in minimalen Konzentrationen und den getesteten, supplementierten Nährstoff im Überfluss. Es wurde untersucht, ob dieser im Überfluss vorhandene Nährstoff einen Vorteil für das Wachstum der Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$ oder $\Delta 0138$ im Vergleich zum Wildtyp brachte.

Untersucht wurde das essentielle Spurenelement Eisen, welches für *C. jejuni* sehr wichtig ist. [98] Der Eisenstoffwechsel in *C. jejuni* wird sehr gut kontrolliert. [84] Als repräsentative Aminosäuren wurden L-Serin und Asparaginsäure, welche in Wasser zu

Aspartat dissoziiert, untersucht. Ebenfalls wurde die organische Säure Laktat untersucht. Die Nährstoffe Pyruvat und Acetat können von *C. jejuni* aus der Umgebung aufgenommen werden. Pyruvat ist normalerweise das Produkt des Kohlenhydratabbaus im Rahmen der Glykolyse, die *C. jejuni* jedoch nicht durchführen kann. Pyruvat kann direkt nach der Aufnahme dem Citratzyklus zur Energiegewinnung zugefügt werden oder steht der Glukoneogenese zur Bildung von Glukose zur Verfügung. *C. jejuni* benötigt Glukose für Lipopolysaccharide, die Kapsel, O- und N-Glykosylierungen von Proteinen. Aufgenommenes Acetat wird zu Acetyl-CoA, welches dem Produkt des Fettsäureabbaus beim Menschen entspricht, umgewandelt und ebenfalls dem Citratzyklus zugefügt. [4, 44, 63]

Der Wildtyp zeigte in den sechs untersuchten supplementierten Mangelmedien ein ähnliches Wachstum wie die Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$ und $\Delta 0138$ und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Was den Schluss zulässt, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Rolle im Eisen-, Pyruvat-, Laktat-, Acetat-, Aspartat- oder Serin-Stoffwechsel von *C. jejuni* NCTC11168 spielen. Da durch die ausgewählten untersuchten Nährstoffe die großen Stoffwechselwege von *C. jejuni* untersucht wurden, kann weiter geschlussfolgert werden, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* wahrscheinlich keine Rolle für den gesamten Metabolismus von *C. jejuni* NCTC11168 spielen.

5.2.3 Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für *C. jejuni* NCTC11168 unter der pessimalen, aeroben Umgebungsbedingungen mit Hilfe von Autoagglutination und Taxis

Durch die Autoagglutination wurde der Umgang bzw. die Überlebensfähigkeit von *C. jejuni* unter atmosphärischen bzw. aeroben Umgebungsgaszusammensetzungen getestet. Die Taxis besteht aus zwei Fähigkeiten. Zum einen dem Erkennen von Umgebungsbedingungen als günstig oder ungünstig und zum anderen der aktiven Bewegung hin zu günstigen bzw. weg von ungünstigen Bedingungen. [101] Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl eine Aerotaxis als auch eine Energietaxis getestet. Bei der Aerotaxis handelt es sich um eine aktive Bewegung weg von ungünstigen aeroben Umgebungsbedingungen und hin zu mikroaerophilen Umgebungsbedingungen. Da beide Experimente auf unterschiedliche Art und Weise den Umgang mit aeroben Umgebungsbedingungen testeten, werden die Ergebnisse nachfolgend zusammen diskutiert. Zusätzlich wird mit der Energietaxis die aktive Bewegung hin zu

nährstoffreichen Gebieten und weg von Umgebungen, in denen die vorhandenen Nährstoffe aufgebraucht wurden, beschrieben. [102, 122]

Die Mutante $\Delta 1103$ zeigte eine signifikant schnellere Autoagglutination und eine signifikant langsamere Taxis als der Wildtyp. Das bedeutet zum einen, dass die Mutante $\Delta 1103$ unter aeroben, atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen schneller „verklumpte“ und starb als der Wildtyp. Somit war eine höhere Sauerstoff-Sensibilität als beim Wildtyp nachweisbar. Zum anderen zeigte die Mutante eine langsamere aktive Bewegung weg von ungünstigen Umgebungsbedingungen. In diesen ungünstigen Umgebungsbedingungen wurden die Nährstoffe knapp und es herrschten hohe O_2 -Konzentrationen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die erhöhte Sauerstoff-Sensibilität die Mutante $\Delta 1103$ schwächte und eine aktive Bewegung schwieriger machte. Eine weitere Erklärung wäre, dass der Mutante $\Delta 1103$ die Fähigkeit des Erkennens von günstigen bzw. ungünstigen Umgebungen „verloren“ gegangen war bzw. diese nicht mehr so gut funktionierte wie beim Wildtyp.

Die Komplementante 1103K zeigte sowohl in der Autoagglutinationstestung als auch in der Taxistestung Ergebnisse, die zwischen denen des Wildtyps und der Überexpressionsmutante Wto1103 lagen. Ähnliche Resultate konnten in den Wachstumsanalysen unter optimalen Bedingungen generiert werden (siehe 5.2.1). Die Vermutung, dass der verwendete Standardpromotor *metK* mit einer niedrigen Ableserate in der konstruierten Komplementante 1103K eine relativ zu hohe Ableserate hatte, bestätigte sich hiermit. Mit der Komplementante 1103K wurde eine „leichte“ Überexpression generiert. Polareffekte konnten, wie gewünscht, auch mit einer leichten Überexpression ausgeschlossen werden. (Kap. 5.2.1)

Die Überexpressionsmutante Wto1103 zeigte die langsamste Autoagglutination und die langsamste Taxis. Was bedeutet, dass die Überexpression des Gens *cj1103* zu einer Sauerstoff-Toleranz führte. Zusammen mit den Ergebnissen der Mutante $\Delta 1103$ ist davon auszugehen, dass das Gen *cj1103* für die Sauerstoff-Sensibilität von *C. jejuni* NCTC11168 eine Rolle spielt. Zum anderen zeigte die Überexpressionsmutante Wto1103 eine langsamere Taxis als die Mutante $\Delta 1103$, welche wiederum eine langsamere Taxis als der Wildtyp zeigte. Eine Erklärung hierfür wäre, dass hohe Sauerstoff-Konzentrationen die Mutante $\Delta 1103$ wirklich schwächten und eine aktive Bewegung tatsächlich erschwerten und verlangsamten. Im Gegensatz zu der

Überexpressionsmutante Wto1103, die mit den hohen Sauerstoffkonzentrationen besser umgehen konnte und deshalb eine aktive Bewegung weg von sauerstoffreichen Umgebungsbedingungen nicht in dem Maße benötigte wie der Wildtyp bzw. die Mutante Δ 1103. Ferner könnte es sein, dass die Überexpressionsmutante Wto1103 bei hohen Sauerstoff-Konzentrationen zum Schutz des Gesamtorganismus die Stoffwechsellleistungen verminderte und weniger Nährstoffe gebraucht wurden. Eine Bewegung hin zu nährstoffreichen Gebieten wäre in diesem Fall für die Überexpressionsmutante Wto1103 nicht so wichtig wie für den Wildtyp oder die Mutante Δ 1103. Es konnte gezeigt werden, dass das Gen *cj1103* keine Rolle im Metabolismus von *C. jejuni* NCTC11168 bei optimalen Bedingungen spielte (siehe Kap. 5.2.2). Diese Beobachtungen schließen jedoch nicht aus, dass das Gen *cj1103* eine Rolle im Metabolismus von *C. jejuni* NCTC11168 bei ungünstigen Bedingungen spielt. Da der Metabolismus nicht bei ungünstigen Bedingungen untersucht wurde, sind weitere Untersuchungen zur detaillierten Klärung der Beobachtungen nötig. Sicher konnte gezeigt werden, dass das Gen *cj1103* eine Bedeutung für die Autoagglutination und die Taxis von *C. jejuni* NCTC11168 hat.

Die Mutante Δ 0667, die Komplementante 0667K und die Überexpressionsmutante Wto0667 zeigten eine ähnliche Autoagglutination und eine ähnliches Taxisverhalten wie der Elternstamm. Da keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten, ist davon auszugehen, dass das Gen *cj0667* keine Rolle für die Autoagglutination und die Taxis von *C. jejuni* NCTC11168 spielt.

Die Mutante Δ 0138 zeigte eine schnellere Autoagglutination und eine langsamere Taxis als der Wildtyp. Beide Beobachtungen waren gleichermaßen gerichtet, aber nicht so ausgeprägt, wie bei der Mutante Δ 1103. Auch die Mutation im Gen *cj0138* führte zu einer erhöhten Sauerstoff-Sensibilität, welche wiederum zu einer Schwächung des Organismus führte und somit eine Taxis erschwerte.

Die Komplementante 0138K zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie der Wildtyp bei der Autoagglutination und der Taxis. Da die Mutante Δ 0138 gerade bei diesen Analysen einen anderen Phänotyp zeigte, könnten Polareffekte ausgeschlossen werden. Die gelungene Komplementation des Gens *cj0138* bestätigte, dass die gesehenen

Autoagglutinations- und Taxis-Phänotypen der Mutante $\Delta 0138$ tatsächlich durch das Gen *cj0138* bedingt waren.

Auch die Überexpressionsmutante Wto0138 zeigte eine ähnliche Autoagglutination und ein ähnliches Taxisverhalten wie der Wildtyp. Was bedeutet, dass eine Überexpression des Gens *cj0138*, im Gegensatz zu der Überexpression des Gens *cj1103*, keine Rolle für die Autoagglutination und die Taxis spielte. Obwohl das Gen *cj0138* eine Bedeutung für die Autoagglutination und die Taxis von *C. jejuni* NCTC11168 hat, welche durch die Mutante $\Delta 0138$ gezeigt werden konnte, scheint eine Überexpression des Gens *cj0138* keine Rolle zu spielen.

5.2.4 Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für das Schwärmen von *C. jejuni* NCTC11168

Das Schwärmen ist eine Grundfunktion der *Campylobacter* Spezies und stellt eine geordnete oder ungeordnete aktive Bewegung eines Schwarms, also einer Menge gleichartiger Lebewesen, dar. [100] Das Schwärmverhalten aller generierten *C. jejuni*-Stämme wurde getestet und analysiert, um herauszufinden, ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Rolle für das Schwärmen von *C. jejuni* NCTC11168 spielen.

Bei dem Vergleich des Schwärmens der Mutante $\Delta 1103$, der Komplementante 1103K, der Überexpressionsmutante Wto1103 und des Wildtyps zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Augenscheinlich konnten Unterschiede festgestellt werden, die jedoch durch die Standardabweichungen im Rahmen der Wiederholungen statistisch als nicht signifikant gewertet werden mussten. Die Schwärmzonen von $\Delta 1103$, 1103K und Wto1103 erschienen kleiner als die Schwärmzone von Wt. Fields *et al.* untersuchten das Schwärmverhalten einer *cj1103*-Mutante im Vergleich zum *C. jejuni* 81-176 Wildtyp und zeigten ein geringeres Schwärmen für die *cj1103*-Mutante. Da die Mutante und der Wildtyp ein ähnliches ebenfalls untersuchtes Wachstum zeigten, folgerten die Autoren, dass das Gen *cj1103* die Beweglichkeit oder das Chemotaxisverhalten reguliere. Sowohl die Beweglichkeit als auch die Chemotaxis könne das Schwärmverhalten beeinflussen. [100] In den vorherigen Kapiteln wurde bereits die Rolle des Gens *cj1103* bzw. die gezeigten Phänotypen diskutiert. Sowohl die Komplementante 1103K als auch die Überexpressionsmutante Wto1103 zeigten eine schnellere Wachstumsgeschwindigkeit als der Wildtyp. Zusätzlich zeigten die Mutante

$\Delta 1103$, die Komplementante 1103K und die Wildtypüberexpression Wto1103 im Vergleich zum Wildtyp eine verlangsamte Taxis. Diese gezeigten Phänotypen könnten bereits zu einem veränderten Schwärmen führen, da sowohl das Wachstum als auch eine intakte Taxis Voraussetzungen für die Grundfunktion Schwärmen darstellen. Es zeigten sich offensichtliche Unterschiede im Schwärmverhalten von $\Delta 1103$, 1103K und Wto1103 im Vergleich zum Wildtyp, die im Rahmen der Wiederholungen und der damit einhergehenden Standardabweichungen jedoch statistisch nicht signifikant waren. Da das Gen *cj1103* eine Rolle im Wachstum und der Taxis spielt, sind die offensichtlichen Unterschiede im Schwärmverhalten wahrscheinlich und gerade durch diese veränderten Eigenschaften des Wachstums und der Taxis zu erklären. Wahrscheinlich spielt das Gen *cj1103* nicht direkt, sondern nur indirekt, eine statistisch nicht belegte Rolle für das Schwärmverhalten von NCTC11168.

Bei der Analyse des Schwärmverhaltens der Mutante $\Delta 0667$, der Komplementante 0667K und der Überexpressionsmutante Wto0667 im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich weder augenscheinliche noch signifikante Unterschiede. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Gen *cj0667* keine Rolle für das Schwärmen von *C. jejuni* NCTC11168 spielt.

Bei dem Vergleich des Schwärmverhaltens der Mutante $\Delta 0138$, der Komplementante 0138K, der Überexpressionsmutante Wto0138 und des Wildtyps zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Schwärmzone der Mutante $\Delta 0138$ erschien kleiner als die des Wildtyps. Auch hier handelt es sich lediglich um eine Beobachtung, welche durch die Standardabweichungen der Wiederholungen im Rahmen der statistischen Analyse keine Signifikanz ergab. Auch die Mutante $\Delta 0138$ zeigte eine langsamere Taxis im Vergleich zum Wildtyp. Eine geringere Taxis kann eine Erklärung für ein geringeres Schwärmen sein. Die langsamere Taxis der Mutante $\Delta 0138$ liefert somit eine Erklärung für die beobachteten, jedoch statistisch nicht belegten, kleineren Schwärmzonen der Mutante $\Delta 0138$ im Vergleich zum Wildtyp. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Gen *cj0138* keine direkte Rolle für das Schwärmen von *C. jejuni* NCTC11168 spielt.

5.2.5 Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für den Umgang mit oxidativem Stress

Oxidativer Stress kann zu Schäden an der DNA, Proteinen und Lipiden bei *C. jejuni* führen. Zur Abwehr bzw. zur „Entschärfung“ von oxidativem Stress verfügt *C. jejuni* über mehrere Enzyme. (siehe Virulenzfaktoren, Kap. 1.1.5) [42, 43] Ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Rolle bei dem Umgang mit oxidativem Stress in NCTC11168 *C. jejuni* spielen, wurde anhand eines Stresstests, hier repräsentativ mit dem Stressor Wasserstoffperoxid, untersucht. Das Enzym Katalase katalysiert die Umwandlung von schädlichem Wasserstoffperoxid in zwei Schritten zu unschädlichem Wasser und Sauerstoff ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). Zusätzlich kann *C. jejuni* Wasserstoffperoxid durch das Enzym Alkyl-Hydroxid-Reduktase umwandeln. [44]

Im Wasserstoffperoxidstresstest wurden der *C. jejuni*-Wildtyp und die Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$ und $\Delta 0138$ mehreren verschiedenen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen ausgesetzt. Die entstandenen Hemmhöfe wurden gemessen, ausgewertet und analysiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$ und $\Delta 0138$ gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Bedeutung für den Umgang mit Wasserstoffperoxidstress von *C. jejuni* NCTC11168 haben. Und somit wahrscheinlich weder die Katalase noch die Alkyl-Hydroxid-Reduktase regulieren.

Fields *et al.* untersuchten das Gen *cj1103* in *C. jejuni* 81-176. Unter anderem wurde auch der Umgang mit oxidativem Stress untersucht und herausgefunden, dass das Protein CsrA, welches durch das Gen *cj1103* kodiert wird, am Umgang mit oxidativen Stress regulierend beteiligt ist. Diese regulierende Funktion von CsrA wurde bereits in *Helicobacter pylori* gesehen. Im Detail konnte gezeigt werden, dass ein Mutantenstamm, in dem das *csrA*-Gen nicht mehr enthalten war, stärker auf alle getesteten Konzentrationen Wasserstoffperoxids als der *C. jejuni*-Wildtypstamm 81-176 reagierte. [100]

Diese konträren Beobachtungen sind am ehesten durch die unterschiedlichen verwendeten Elternstämme, nämlich in dieser Arbeit der *C. jejuni*-Stamm NCTC11168 und in den Untersuchungen von Fields *et al.* der *C. jejuni*-Stamm 81-176, zu erklären. Die unterschiedlichen *C. jejuni*-Stämme können sehr variabel sein. Zusätzlich haben sie hypervariable Regionen im Genom, welche in unterschiedlichen Stämmen zu unterschiedlich expressierten Genen führen können. [4]

5.2.6 Die Bedeutung der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667*, *cj0138* und der Temperatur für die Biofilmbildung von *C. jejuni*

Biofilme sind definiert als strukturierte Lebensgemeinschaft von Mikroben einer oder mehrerer Spezies in einer selbst produzierten extrazellulären Matrix. Biofilme entstehen und haften an Grenzflächen oder Oberflächen von inerten oder lebenden Objekten. Biofilme schützen Bakterien vor verschiedenen Umweltstressoren, erhöhen ihre Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen, wie Antibiotika und Desinfektionsmitteln, und schützen sie vor einer Wirtsabwehr. [40, 123, 124]

Wir untersuchten ob die *C. jejuni*-Stämme Wt, Δ 1103, Δ 0667 und Δ 0138 die Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzen und ob hierbei Unterschiede auftreten. Die Untersuchungen erfolgten unter standardisierten Laborbedingungen bei 37°C und bei 42°C, der optimalen Umgebungstemperatur von *C. jejuni*. [4] Alle untersuchten *C. jejuni*-Stämme zeigten sowohl bei 37°C als auch bei 42°C die Fähigkeit Biofilme zu bilden. Bei beiden Umgebungstemperaturen waren die gebildeten Biofilmmengen vom Wildtyp und den Mutanten Δ 1103, Δ 0667 und Δ 0138 ähnlich. Da sich keine signifikanten Unterschiede zeigten, ist davon auszugehen, dass die *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Rolle bei der Biofilmbildung in NCTC11168 *C. jejuni* spielen. Reuter *et al.* konnten zeigen, dass *C. jejuni* NCTC11168 in einer aeroben Umgebung mit 20% O₂ schneller einen Biofilm bildete als in einer mikroaerophilen Umgebung mit 5% O₂ und 10% CO₂. Durch die Untersuchung der Biofilmbildung im mobilen und immobilen *C. jejuni* konnte gezeigt werden, dass eine vorhandene Beweglichkeit wichtig, jedoch nicht ausschlaggebend für die Entstehung eines Biofilms ist. Es werden zwei unterschiedliche Mechanismen, ein Flagellen-abhängiger und ein Flagellen-unabhängiger, vermutet. [125] Fields *et al.* untersuchten das Gen *cj1103* in *C. jejuni* 81-176 mit Hilfe einer generierten Mutante. Sie fanden eine geringere Biofilmbildung und eine eingeschränkte Beweglichkeit in der *cj1103*-Mutante im Vergleich zum *C. jejuni* 81-176 Wildtypstamm. Die Autoren vermuteten den Grund für die verminderte Biofilmbildung in der eingeschränkten Beweglichkeit. [100] Die unterschiedlichen Beobachtungen in den *cj1103*-Mutanten sind am ehesten durch die unterschiedlichen verwendeten *C. jejuni*-Stämme, nämlich 11168 versus 81-176, zu erklären.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die Biofilmbildung der untersuchten *C. jejuni*-Stämme hatte. Es konnte gezeigt werden, dass die *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auch keine Rolle bei der Biofilmbildung unter der Einbeziehung eines zusätzlichen Aspektes, der Temperatur,

spielten. Ferner konnte gezeigt werden, dass *C. jejuni* NCTC11168 einen größeren Biofilm bei 42°C als bei 37°C bildete. Es wurden ähnliche Bakterienmengen in den Biofilmen bei beiden Untersuchungstemperaturen nachgewiesen. Was bedeutet, dass die vermehrte Biofilmbildung bei 42°C nicht durch eine höhere Bakterienzahl ausgelöst wurde, sondern die optimale Umgebungstemperatur von 42°C die entscheidende Rolle für die Entstehung der größeren Biofilmmenge spielte. Dieses geschah unabhängig von den untersuchten *C. jejuni*-Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138*. Die standardisierte Untersuchungstemperatur 37°C entspricht der Körperkerntemperatur des Menschen. 42°C ist die optimale Umgebungstemperatur für *C. jejuni* und entspricht in etwa der Körperkerntemperatur von Geflügel. [4, 40, 98] Die erhobenen Daten könnten ein Hinweis dafür sein, dass *C. jejuni* NCTC11168 bereits im Geflügel unter optimalen Bedingungen und vor der Exposition von Umweltstressoren, wie einer kalten Umgebungstemperatur, einer aeroben Gaszusammensetzung und eventuell antimikrobiellen Massnahmen der Geflügelindustrie, Biofilme als eine Form von Lebensgemeinschaften bildet. Eine In-vivo-Biofilmbildung konnte für den Erreger *Vibrio cholerae* bestätigt werden. [126, 127] Untersuchungen mit Geflügelfleischexsudat, welches durch das Auftauen von tiefgefrorenem Hühnerfleisch bei Raumtemperatur gewonnen wurde, zeigten eine vermehrte Biofilmbildung. Das Geflügelfleischexsudat wirkt unterstützend bei der ersten Adhäsion von *C. jejuni* an Oberflächen, welche die Grundlage und den Ausgangspunkt für eine erfolgreiche Biofilmbildung darstellen. Ferner bietet das Geflügelfleischexsudat *C. jejuni* zahlreiche Nährstoffe zum Überleben und Mikropartikel, die in einem Biofilm eingebaut werden können. [128] Die Arbeit liefert somit einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Biofilmformation im Gastrointestinaltrakt von Geflügel unter optimalen Bedingungen und unter der Bereitstellung von wichtigen Nährstoffen und Biofilm-fördernden Komponenten. Huei *et al.* stellen generell die Fähigkeit der Biofilmbildung durch *C. jejuni* in Frage. Ausschlaggebend hierfür sind auf der einen Seite die eng definierten Umgebungsbedingungen, die *C. jejuni* zum Überleben braucht. Im Gegensatz dazu stehen auf der anderen Seite die sehr schnell wechselnden und extremen Umgebungsbedingungen, denen *C. jejuni* vom aviären Gastrointestinaltrakt bis hin zur Auslösung einer humanen Campylobacteriose ausgesetzt ist. *C. jejuni* bräuchte für die Herstellung eines schützenden Biofilms theoretisch länger als das Überleben unter diesen extremen Umgebungsbedingungen möglich wäre. Die Autoren halten eine einfache Anheftung von *C. jejuni* an Oberflächen oder an bereits existierende Biofilme

anderer Organismen für wahrscheinlicher. [40] Eine andere plausible Erklärung für das Überleben von *C. jejuni* in vermeintlich schädlichen, extremen und schnell wechselnden Umgebungsbedingungen könnte die bereits vorher erfolgte Biofilmbildung unter optimalen Bedingungen im aviären Gastrointestinaltrakt sein. Ein weiterer Aspekt, bei dem eine mögliche Biofilmbildung bei 42°C im aviären Gastrointestinaltrakt eine Rolle spielen könnte, ist die Pathogenität von *C. jejuni* in Vögeln. *C. jejuni* galt lange Zeit als kommensaler Bestandteil der aviären Darmflora. Neuere Studien konnten jedoch belegen, dass eine *C. jejuni*-Infektion bei Geflügel zu einer starken Entzündungsreaktion und zu Symptomen wie Durchfall führte. Diese wesentlichen Auswirkungen auf die Gesundheit des Geflügels zeigten sich vor allem in der stetig wachsenden und stark ökonomisierten Geflügelproduktion. [129] Die Projektion dieser Ergebnisse, welche in gut kontrollierten Laborbedingungen generiert wurden, auf eine *in vivo* Situation ist hypothetisch und müsste durch Untersuchungen der Biofilmbildung im Geflügel bestätigt werden.

5.3 Diskussion des humanisierten Gnotobioten-Modell (HGM)

Bei dem humanisierten Gnotobioten-Mausmodell (HGM) wurden C57/BL6-Wildtypmäuse erfolgreich gnotobiotisiert und mit einem humanen Florenmix, welcher von vier gesunden Erwachsenen stammte, rekolonisiert. Die murine Darmflora stellt eine natürliche Kolonisationsresistenz für *C. jejuni* dar. Durch die Kolonisierung der Maus mit humaner Darmflora konnte die Resistenz für *C. jejuni* aufgehoben werden und gleichzeitig ein Modell geschaffen werden, welches Rückschlüsse auf die humane Campylobacteriose durch die vorhandene humane Flora zulässt. [90] Die mögliche Bedeutung der drei Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Virulenz, die Pathogenese und die ausgelöste Wirtsimmunantwort einer *C. jejuni*-Infektion im Zusammenhang mit einer menschlichen Darmflora wurden untersucht. Nach erfolgreicher Rekolonisierung der Mäuse mit dem humanen Florenmix erfolgte eine Infektion mit dem NCTC11168 *C. jejuni*-Wildtypstamm (Wt), dem *cj1103*-Mutantenstamm (Δ 1103), dem *cj0667*-Mutantenstamm (Δ 0667), dem *cj0138*-Mutantenstamm (Δ 0138), und dem *cj1103*-Komplementantenstamm (1103K) an drei konsekutiven Tagen. Somit konnten vor allem in diesem chronischen Kolitismodell die Wechselwirkungen zwischen *C. jejuni*, den drei zu untersuchenden Genen, der Wirtsdarmflora und des Wirtsimmunsystems analysiert werden. [90]

5.3.1 Erster Experimentaltteil

Im Ersten Experiment konnte eine stabile Kolonisation aller Tiere, die mit dem Wildtyp und der Mutante $\Delta 0667$ infiziert worden waren, gezeigt werden. Die Tiere, die mit den Mutanten $\Delta 1103$ und $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren, zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-infizierten Tieren eine geringere Kolonisationskapazität. Das bedeutet, dass die Gene *cj1103* und *cj0138* für die Kolonisationskapazität von NCTC11168 *C. jejuni* im HGM eine Rolle spielen können. Im Gegensatz dazu spielt das Gen *cj0667* für die Kolonisationskapazität von NCTC11168 *C. jejuni* im HGM keine Rolle.

Die erhobenen pH-Werte deuteten darauf hin, dass die Gene *cj1103* und *cj0138* im Rahmen einer *C. jejuni*-Infektion eine Veränderung der Wirtsdarmflora im Duodenum und Colon bewirkten. Durch die detaillierte Auswertung musste festgestellt werden, dass dieses Ergebnis bzw. die Schlüsse daraus unter Umständen nicht korrekt sind. Im ersten Experiment wurde jeweils eine Tiergruppe von einem Untersucher seziiert. Die pH-Werte wurden mit Hilfe eines Farbumschlages in einem pH-Teststreifen bestimmt. Die Zuordnungen des Farbumschlages zu der Referenzskala durch die Untersucher zeigten leichte Unterschiede auf. Die vermeintlich beobachteten signifikanten Unterschiede in den pH-Werten der einzelnen Tiergruppen sind auf die unterschiedliche Bewertung der Untersucher zurückzuführen. Es handelt sich nicht um Wirkungen des Elternstammes oder der untersuchten Gene. Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu keiner Veränderung der pH-Werte im Darm bzw. zu keiner Veränderung der Zusammensetzung der Wirtsdarmflora. Ab dem zweiten Experiment im HGM wurden alle Tiergruppen durch alle Untersucher seziiert um einen vermeintlichen Untersucher-Bias zu eliminieren. Durch eine Rotation der Untersucher wurde weiter darauf geachtet, dass im Rahmen einer Qualitätskontrolle jede Tiergruppe zum Beispiel mit einem separaten Sezierbesteck seziiert wurde. Diese Qualitätskriterien waren ursprünglich ausschlaggebend für die Sektion einer Tiergruppe durch einen Untersucher.

Die Darmlängenbestimmung im HGM erfolgte für eine erste Einschätzung der Schwere einer durch *C. jejuni* ausgelösten Entzündung im Darm. Im Rahmen einer Darmentzündung führt eine Verkürzung des betroffenen Darms zu einer Verringerung der Oberfläche und somit auch zu einer Verringerung der „Angriffsfläche“ für den Erreger. Letztendlich stellt dieser Mechanismus eine Schutzfunktion des Wirtes dar. Bei dem Vergleich vom ersten zum zweiten Experiment konnte eine signifikant verminderte

Colonlänge im ersten Experiment nachgewiesen werden. Im ersten Experiment konnte eine *C. jejuni*-Kolonisation der infizierten Tiergruppen nachgewiesen werden. Im Zusammenhang bedeutet das, dass die Kolonisation mit NCTC11168 *C. jejuni* im HGM zu einer Colonverkürzung der Tiere führte. Das bedeutet wiederum, dass die *C. jejuni*-Kolonisation unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* wahrscheinlich zu einer Colitis im HGM führte.

Um eine Colitis durch die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion detaillierter zu analysieren, wurden Mediatoren und Zytokine des angeborenen und erworbenen Wirtsimmunsystems bestimmt. Durch diese Erhebungen konnte eine Kolitis als Folge der *C. jejuni*-Kolonisation im ersten Experiment bestätigt werden.

Die *C. jejuni*-Infektion führte im Colon unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer Induktion von MCP-1. Das Chemokin MCP-1 reguliert als Bestandteil des angeborenen Immunsystems die Infiltration und Migration von Monozyten und Makrophagen in entzündete Gewebe. [107]

Ebenfalls sind die Zytokine IL-6 und TNF- α Bestandteile der unspezifischen Abwehr. Lipopolysaccharide (LPS) aus gramnegativen Bakterien stellen den Synthesereiz für TNF- α dar. TNF- α selber kann die Synthese von IL-6 auslösen. Zum größten Teil werden IL-6 und TNF- α von Monozyten und Makrophagen gebildet und sind wichtige Zytokine in der frühen Abwehr und bei der Entzündung. [64] Beim Menschen kommt IL-6 in der Diagnostik und Therapie der Sepsis und des SIRS eine besondere Bedeutung als sensibler und früher Parameter zu. [130, 131] Im HGM führte die *C. jejuni*-Infektion unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer Aktivierung des Zytokins IL-6. Die *C. jejuni*-Kolonisation führte zu einer Aktivierung von TNF- α -Protein im Colon.

Das Zytokin IL-10 wird von aktivierten Makrophagen im Sinne einer negativen Rückkopplung gebildet und dient der Kontrolle der unspezifischen Abwehr durch die Hemmung aktivierter Makrophagen. Zusätzlich synthetisieren auch T-Zellen und Keratinozyten IL-10. [64] Im HGM führte die *C. jejuni*-Kolonisation unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer Aktivierung von IL-10.

Am Übergang zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität reguliert das Zytokin IL-18 beide Teile des Immunsystems. Aktivierte Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Neutrophilen synthetisieren IL-18. IL-18 sorgt für die Aktivierung Natürlicher Killerzellen und kann zusammen mit IL-12 die Produktion von

INF- γ in T_H1-Zellen anregen. [110] Im HGM konnte gezeigt werden, dass eine *C. jejuni*-Kolonisation unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0138* zu einer erhöhten IL-18-Expression im Colon führte. Das Gen *cj0667* spielte hierbei eine Rolle.

Als Zytokin der erworbenen Immunität unterstützt INF- γ die zelluläre Abwehr durch die Aktivierung von Makrophagen, die wiederum reaktive Sauerstoff- und NO-Metabolite produzieren. INF- γ wird vor allem von T_H1-Zellen, aber auch von Natürlichen Killerzellen (NK) und zytotoxische T-Zellen gebildet. [64] Im HGM konnte gezeigt werden, dass eine *C. jejuni*-Kolonisation zu einer Aktivierung von INF- γ unabhängig von den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* im Ileum und Colon führte.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit dem Elternstamm *C. jejuni* ATCC43431 im gleichen Mausmodell führten ebenfalls zu einer Aktivierung des Chemokins MCP-1 und der Zytokine TNF- α und IL-6 und bestätigten sowohl die Kolonisation als auch die Aktivierung typischer proinflammatorischer Reaktionen einer humanen Campylobacteriose, die im Rahmen des ersten Experimentes des HGMs dieser Arbeit gezeigt werden konnten. [90]

5.3.2 Zweiter Experimententeil

Im zweiten Experiment konnte eine stabile Kolonisation im HGM lediglich bis zum Tag 3 p.i. gezeigt werden. Im Anschluss bis zur Sektion an Tag 14 p.i. gelang der Nachweis von *C. jejuni* nur noch bei einigen Tieren. Die Etablierung des HGM, als chronisches Colitismodell, das besonders geeignet für die Erforschung der Campylobacteriose ist, erfolgte mit den Elternstamm *C. jejuni* ATCC 43431 und *C. jejuni* B2. Im Rahmen der Etablierung konnte bei diesen zwei Elternstämmen eine stabile Kolonisation bis Tag 14 p.i. nachgewiesen werden und der Sektionszeitpunkt an Tag 14 als geeignet festgelegt werden. [90] In der vorliegenden Arbeit wurde der Elternstamm NCTC11168 *C. jejuni* verwendet. Der verwendete Elternstamm ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass keine stabile Kolonisation bis zum Tag 14 p.i. im zweiten Experiment des HGM gezeigt werden konnte. Auch bei einigen Tieren im ersten Experiment gelang der *C. jejuni*-Nachweis zu diesem Zeitpunkt nicht mehr. Das bedeutet, dass der Elternstamm NCTC11168 *C. jejuni* wahrscheinlich weniger pathogen als die Elternstämme *C. jejuni* ATCC 43431 und *C. jejuni* B2 im HGM ist. Da alle infizierten Tiere des ersten und zweiten Experimentes eine stabile Kolonisation bis zum Tag 3 p.i. zeigten, könnte das bedeuten, dass für die Untersuchungen am Elternstamm NCTC11168 ein früherer

Sektionszeitpunkt im HGM nötig wäre. Eventuell könnte auch eine höhere Infektionsdosis zu einer längerfristigen Kolonisation im HGM durch NCTC11168 *C. jejuni* führen. Beide Ansätze bzw. Vermutungen müssten jedoch für eine abschließende Beurteilung tatsächlich in dem Modell getestet werden.

Theoretisch wäre auch denkbar, dass die Durchführung des zweiten Experimentes von der des ersten Experimentes abgewichen ist. Jedoch waren mehrere Kontrollen unterschiedlicher Aspekte ein Teil der Durchführung des HGM. Die durchgeführten Qualitätskontrollen waren sowohl beim ersten Experiment als auch beim zweiten Experiment unauffällig.

Wenn der Elternstamm NCTC11168 tatsächlich weniger pathogen oder weniger virulent im Vergleich zu den Elternstämmen *C. jejuni* ATCC 43431 und *C. jejuni* B2 wäre, müssten die oben genannten Ansätze, nämlich ein früherer Sektionszeitpunkt oder die Verwendung einer höheren Infektionsdosis, eine vollständige Auswertbarkeit der Ergebnisse im HGM bewirken. Wenn das nicht der Fall wäre, müsste geklärt werden, ob das HGM tatsächlich ein geeignetes Modell zur Erforschung von NCTC11168 wäre. Im ersten Experiment konnten Ergebnisse und auch Schlussfolgerungen gezogen werden, weshalb das HGM nicht komplett ungeeignet zur Erforschung von NCTC11168 sein kann. Vielleicht führt die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion jedoch eher zu einer akuten Colitis und die Erforschung in einem chronischen Colitismodell ist nicht so geeignet wie in einem akuten Modell. In einem zweiten Mausmodell, dem IL10^{-/-}GM, wurde besonders die Bedeutung von *C. jejuni* und den drei untersuchten Genen in einer akuten Entzündungsreaktion weiter analysiert.

5.4 Diskussion des IL-10^{-/-}-Gnotobioten Mausmodells

In diesem zweiten in-vivo-Mausmodell wurden drei Wochen alte IL10^{-/-}-Mäuse mit einer mehrfach Antibiotikabehandlung keimfrei gemacht und somit die Ausbildung der murinen Flora und die Entwicklung einer chronischen Enterokolitis unterdrückt. [132] Im Alter von vier bis fünf Monaten wurden die Tiere mit dem NCTC11168 *C. jejuni*-Wildtyp (Wt), der *cj1103*-Mutante (Δ 1103), der *cj0667*-Mutante (Δ 0667), der *cj0138*-Mutante (Δ 0138) und der *cj1103*-Komplementante (1103K) an zwei konsekutiven Tagen infiziert. Nicht infizierte IL10^{-/-}GM dienten dabei als Kontrolle. Die Infektion mit *C. jejuni* in diesem Alter führte zu einer akuten Colitis, die der Campylobacteriose des Menschen sehr ähnelt. [94] Die mögliche Bedeutung der drei *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und

cj0138 für die Virulenz, Pathogenese und Wirtsimmunreaktion wurde in diesem Modell erforscht um mögliche Rückschlüsse über die Bedeutung der Gene bei der Pathogenese der Campylobacteriose aufzeigen zu können. Die Untersuchungen in diesem Modell ermöglichen vor allem Rückschlüsse auf die Campylobacteriose beim Menschen und auf die akute Krankheitsphase.

5.4.1 Die Bedeutung der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Pathogenese von NCTC11168 *C. jejuni* im IL10^{-/-}GM

Im Rahmen des durchgeführten IL10^{-/-}GM wurde die Kolonisationskapazität von NCTC11168 *C. jejuni* untersucht. Zusätzlich wurde analysiert, ob die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Kolonisationskapazität eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine stabile *C. jejuni*-Kolonisation bei allen infizierten Tieren bis zur Sektion an Tag 8 p.i. festgestellt werden. Am Tag der Sektion zeigten alle infizierten Tiergruppen ähnliche *C. jejuni*-Konzentrationen im Colon und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen festgestellt werden. Die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* spielen somit keine Rolle für die Kolonisationskapazität von NCTC11168 *C. jejuni* im IL10^{-/-}GM. Das bedeutet, dass alle beobachteten Unterschiede in den folgenden erhobenen Parametern dieser Arbeit tatsächlich durch die Verwendung des NCTC11168 Elternstammes oder durch die Mutationen in den untersuchten Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* verursacht worden sein müssen. Da die gezeigten Unterschiede nicht auf einer unterschiedlichen Kolonisationskapazität beruhen, können Rückschlüsse auf die Bedeutung der untersuchten Gene als Pathogenitätsfaktoren bei der *C. jejuni*-Infektion aufgezeigt werden.

In Anlehnung an die Symptome der humanen Campylobacteriose wurden die Symptome der IL10^{-/-}-Tiere im Klinischen Score erfasst. Im zeitlichen Verlauf des IL10^{-/-}GM zeigten alle infizierten Tiere meistens sehr deutliche Zeichen einer Darmentzündung, welche durch struppiges Fell, eine gekrümmte Haltung, Isolationsverhalten und sehr flüssigem, blutigem Faeces gekennzeichnet waren. Bis zur Sektion zeigten die nicht infizierten Kontrolltiere, wie erwartet, keine Krankheitssymptome. Das bedeutet, dass die untersuchten Symptome tatsächlich durch die Infektion mit *C. jejuni* ausgelöst wurden und nicht auf andere Aspekte wie zum Beispiel dem genetischen IL-10-Defekt der Mäuse zurückgeführt werden können. Die Symptomausprägung der IL10^{-/-}-Tiere, die mit dem NCTC11168 *C. jejuni* Wildtyp

infiziert worden waren, war am deutlichsten und stärker als bei den Tieren, die mit den Mutanten $\Delta 1103$, $\Delta 0667$, $\Delta 0138$ und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Das bedeutet, dass die untersuchten Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* eine Rolle bei der Symptomausprägung im IL10^{-/-}GM spielen und in dieser Hinsicht als Pathogenitätsfaktoren von *C. jejuni* NCTC11168 gewertet werden können.

Um zu untersuchen, ob die subjektiven Einschätzungen des klinischen Zustandes der Tiere mit Morphologien einhergehen, wurden histologische Untersuchungen an HE-gefärbten Colonschnitten durchgeführt. Mit dem OVA Score, einem leicht veränderten standardisiertem Score der DSS-Colitis, wurden die histologischen Pathologien im Colon evaluiert. [95] Alle infizierten IL10^{-/-}-Tiere zeigten schwere Entzündungen im Colon. Am deutlichsten waren die Entzündungsreaktionen bei den Tieren, die mit dem Wildtyp und der Mutante $\Delta 1103$ infiziert worden waren. Die pathologischen Veränderungen im Colon der Tiere, die mit den Mutanten $\Delta 0667$ und $\Delta 0138$ infiziert worden waren, waren signifikant schwächer ausgeprägt als bei den Wildtyp-infizierten Tieren. Das bedeutet, dass die Gene *cj0667* und *cj0138* auch bei der Auslösung morphologischer Zeichen einer Colitis als Pathogenitätsfaktoren von *C. jejuni* NCTC11168 gewertet werden. Das Gen *cj1103* spielte für die untersuchten histologischen Darmopathologien keine Rolle. Die Bedeutung des Gens *cj1103* bei der Symptomausprägung und bei den histologisch beurteilten Pathologien ist nicht eindeutig. Da es sich bei der Erhebung des Klinischen Scores um eine subjektive Einschätzung durch den Untersucher handelte, könnten die Ergebnisse verfälscht worden sein. Um subjektiv verfälschte Ergebnisse weitgehend auszuschließen, erfolgte die Erhebung jeweils durch zwei Beobachter gemeinsam und es wurde ein klar definierter, standardisierter Score, der sich in der Vergangenheit bei der Colitis-Beurteilung bewährt hat, verwendet. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass das Gen *cj1103* für die Ausbildung von Krankheitssymptomen essentiell ist. Die für die Symptomausprägung verantwortlichen Interaktionen jedoch nicht durch den verwendeten OVA-Score detektiert wurden. Mansfield *et al.* untersuchten ebenfalls die Kolonisation, die Ausprägung klinischer Krankheitszeichen und die Pathologien bei *C. jejuni* 11168 infizierten C57BL/6 IL10^{-/-}-Mäusen. Die Autoren konnten eine stabile *C. jejuni*-Kolonisation, das Auftreten von sichtbaren Krankheitszeichen und histologisch nachweisbaren Pathologien am Ileocaecalen Übergang der IL10^{-/-}-Mäuse nachweisen. Obwohl Mansfield *et al.* teilweise andere Merkmale zur Beurteilung der histologischen Pathologien verwendeten, bekräftigen diese Ergebnisse unsere gewonnenen

Ergebnisse des NCTC11168 *C. jejuni*-Wildtyp. [133] Diese waren die Voraussetzung für die Evaluierung der Mutanten bzw. der Bedeutung der untersuchten Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138*. Ebenfalls konnten diese Ergebnisse durch Untersuchungen des *C. jejuni*-Stammes B2 im gleichen IL10^{-/-}GM unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. [94] Eine Verkürzung von entzündeten Darmabschnitten führt zu einer Oberflächenreduktion und somit zu einer Verminderung der „Angriffsfläche“ für das Pathogen. Es handelt sich um einen Schutzmechanismus des Wirtes. Für die detaillierte Analyse der vermeintlichen Entzündungsreaktion, die durch die *C. jejuni*-Infektion im Wirt ausgelöst wurde, erfolgte auch die Erhebung der Darmlängen im IL10^{-/-}GM. Im IL10^{-/-}GM zeigten die naiven Kontrolltiere ähnliche Darmlängen wie alle infizierten IL10^{-/-}-Tiere. Das bedeutet, dass die Infektion mit NCTC11168 *C. jejuni* unabhängig von den untersuchten Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* keine Verkürzung der Darmabschnitte im Wirt bewirkte. Bei Untersuchungen des *C. jejuni*-Stammes B2 im gleichen Mausmodell durch unsere Arbeitsgruppe konnte eine etwa 20%ige Verkürzung der Colonlänge bei *C. jejuni* B2 infizierten IL10^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den naiven Kontrollen nachgewiesen werden. [94] Diese unterschiedlichen Beobachtungen sind auf die unterschiedlichen verwendeten *C. jejuni*-Elternstämme, nämlich NCTC11168 und B2, zurückzuführen. *C. jejuni* B2 ist in diesem Aspekt im IL10^{-/-}GM pathogener als NCTC11168 *C. jejuni*.

Die Apoptose ist ein so genannter „programmierter Zelltod“ und stellt einen Schutzmechanismus bei irreparabel geschädigten Zellen bzw. deren Erbgut, dar. So kann das Immunsystem die Apoptose in Zielzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen über unterschiedliche Mechanismen auslösen. Hierbei wird die Apoptose, im Gegensatz zur Nekrose, von der betroffenen Zielzelle selbst gesteuert und reguliert. Durch die Apoptose erfolgt die „Opferung“ einer Zelle zum Schutz des Gesamtorganismus. [118] Im IL10^{-/-}GM führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion zu einer vermehrten Apoptose. Das untersuchte Gen *cj1103* war unbedeutend für das Auslösen von Apoptosen. Die Gene *cj0667* und *cj0138* hingegen spielten als Pathogenitätsfaktoren für das Auslösen von Apoptosen eine Rolle.

Neben den Apoptosen wurde auch die Zellproliferation im IL10^{-/-}GM untersucht. Eine Zellproliferation kann die Reaktion des Organismus auf eine vermehrte Apoptose sein. Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer erhöhten Zellproliferation im Colon der IL10^{-/-}-Tiere. Die untersuchten Gene *cj1103* und *cj0138* spielten dabei keine Rolle. Das Gen *cj0667* war für die ausgelösten Zellproliferationen von Bedeutung.

5.4.2 Die Bedeutung der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* für die Aktivierung des Wirtsimmunsystems im IL10^{-/-}GM

Die Reaktionen des Wirtsimmunsystems, welche durch die *C. jejuni*-Infektion im IL10^{-/-}GM verursacht worden waren, wurden untersucht. Die Bedeutung der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* in diesen Zusammenhang wurde ebenfalls analysiert.

Als zellulärer Anteil des angeborenen Immunsystems wurde in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der Granulozyten im Colon bestimmt. Die Infektion mit NCTC1168 *C. jejuni* führte unabhängig von dem Gen *cj1103* zu einer Aktivierung des zellulären angeborenen Wirtsimmunsystems im IL10^{-/-}GM. Die Gene *cj0667* und *cj0138* spielten eine Rolle bei der Aktivierung des zellulären angeborenen Immunsystems im IL10^{-/-}GM. Die Zytokine IL-6 und TNF- α sind als Bestandteil der unspezifischen Abwehr wichtige Zytokine in der frühen Abwehr und bei der Entzündung. Zum größten Teil werden sie von Monozyten und Makrophagen gebildet. Lipopolysaccharide (LPS) aus gramnegativen Bakterien stellen den Synthesereiz für TNF- α dar. TNF- α selber kann die Synthese von IL-6 auslösen. [64] Die NCTC1168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer Aktivierung des Zytokins IL-6 im Colon. An der ausgelösten Expression von IL-6 waren die Gene *cj0667* und *cj0138* beteiligt. Die vermehrte IL-6-Proteinausschüttung im Wirt erfolgte unabhängig von den untersuchten Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* durch die *C. jejuni*-Infektion. Die NCTC1168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer Aktivierung des Zytokins TNF- α im Colon der IL10^{-/-}-Tiere. Die Gene *cj1103* und *cj0667* spielten hierbei keine Rolle. Das Gen *cj0138* spielt wahrscheinlich hierfür eine Rolle. Im Ileum führte die *C. jejuni*-Infektion zu keiner Aktivierung von TNF- α . Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit *C. jejuni* B2 im gleichen Mausmodell bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse. Eine TNF- α -Aktivierung im Colon durch die *C. jejuni* B2-Infektion wurde beobachtet. [94] Huizinga *et al.* konnten zeigen, dass Dendritische Zellen IL-6 und TNF- α produzieren. Lediglich TNF- α führte, neben IL-10 und IFN- β , zu der folgenden B-Zell-Aktivierung. IL-6 spielte keine Rolle bei der B-Zell-Aktivierung durch Dendritische Zellen nach *C. jejuni*-Infektion. [134]

Auch das Zytokin IL-22 ist ein Teil der unspezifischen, angeborenen Abwehr. IL-22 wird vorwiegend von Natürlichen Killerzellen und speziellen Populationen von T-Zellen gebildet. Im Rahmen der Entzündung kann es sowohl proinflammatorisch als auch schützend wirken. [109] Im Rahmen des IL10^{-/-}GM führte die NCTC1168 *C. jejuni*-Infektion unabhängig von den untersuchten Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* zu einer

vermehrten Expression des Zytokins IL-22 im Darm der IL10^{-/-}-Tiere. Edwards *et al.* untersuchten die *C. jejuni*-Infektion an humanen ex vivo Colonbiopsien. Die Autoren beobachteten eine schwache IL-22-Sekretion von Dendritischen Zellen, die von Monozyten abstammten. Eine mukosale IL-22-Expression, eine spontane basale IL-22-Sekretion und eine IL-22-Induktion im Ileum nach der *C. jejuni*-Infektion konnten ebenfalls in diesem Modell beobachtet werden. [135] IL-22 wirkt vor allem auf Epithelzellen, wo es sowohl in der mikrobiellen Abwehr und schützend vor Zellschäden, als auch regenerativ wirken kann. [136]

NO ist ein reaktiver Metabolit, der durch die Induktion der NO-Synthase gebildet wird und Mikroben abtöten kann. Zum Beispiel verwenden Makrophagen NO in der Erregerabwehr. [64] Im IL10^{-/-}GM führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0138* im Colon zu einer vermehrten NO-Ausschüttung. Im Gegensatz dazu war das Gen *cj0667* für diesen Mechanismus von Bedeutung.

Das Chemokin MCP-1 reguliert als Teil der unspezifischen Immunität die Migration und Infiltration von Makrophagen und Monozyten in entzündete Gewebe. [107] Im IL10^{-/-}GM führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion zu einer erhöhten Proteinkonzentration des Chemokins MCP-1 im Colon der IL10^{-/-}-Tiere. Die drei untersuchten Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* spielen dabei keine Rolle.

MUC2 ist ein Protein, das von den Becherzellen gebildet und in das Lumen ausgeschüttet wird. Besonders beim Menschen stellt MUC2 einen wesentlichen Bestandteil einer schützenden Schleimschicht im Darm dar. Als Teil der unspezifischen Abwehr schützt diese Schleimschicht die Epithelzellen durch das Verhindern eines direkten Kontaktes zwischen Bakterien und Epithelzellen vor Eindringlingen. [108] Im IL10^{-/-}GM führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion zu einer Reduktion der MUC2-haltigen schützenden Schleimschicht im Ileum und Colon. Die Gene *cj1103* und *cj0667* spielten im Ileum für diesen Effekt keine Rolle. Im Gegensatz dazu spielte das Gen *cj0138* für diesen Effekt im Ileum eine Rolle. Im Colon spielten die Gene *cj1103* und *cj0138* keine Rolle bei der Zerstörung der schützenden Schleimschicht durch *C. jejuni*. Das Gen *cj0667* war im Colon dabei von Bedeutung. Tu *et al.* untersuchten die Auswirkungen, die menschliches MUC2 auf *C. jejuni* hat. MUC2 ist ein Lockstoff für *C. jejuni* und *C. jejuni* kann an MUC2 binden. Die Autoren untersuchten die Wirkung dieser Bindung auf *C. jejuni* anhand von Transkriptomanalysen. Sie konnten 20 *C. jejuni*-Gene identifizieren, die eine veränderte Transkription durch die Bindung an menschliches MUC2 aufwiesen. Diese identifizierten Gene haben in *C. jejuni* sehr unterschiedliche

Funktionen. Die Autoren vermuten, dass menschliches MUC2 ein Auslöser für die Anpassung von *C. jejuni* an den Wirt ist. Und eventuell für eine therapeutische Intervention im Krankheitsgeschehen genutzt werden könnte, bzw. die Erklärung der unterschiedlichen Suszeptibilität verschiedener Individuen und Spezies liefert. [137]

Die Auswirkungen einer NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion und im Speziellen der Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* auf das erworbene Wirtsimmunsystem wurden im IL10^{-/-}GM untersucht. Die zellulären Anteile des erworbenen Immunsystems bilden die T-Zellen und die B-Zellen [66].

Im IL10^{-/-}GM zeigten die naiven Kontrolltiere signifikant weniger B-Zellen im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp und der Mutante Δ1103 infiziert worden waren. Zusätzlich zeigten die Tiere, die mit den Mutanten Δ0667, Δ0138 und der Komplemente 1103K infiziert worden waren, weniger B-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-infizierten Tieren. Das bedeutet, dass die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion ausschlaggebend für eine B-Zellaktivierung des erworbenen Wirtsimmunsystems im IL10^{-/-}GM war und unabhängig von dem Gen *cj1103* geschah. Die Gene *cj0667* und *cj0138* spielten für die Aktivierung der B-Zellen im Colon jedoch eine entscheidende Rolle. Huizinga *et al.* untersuchten *C. jejuni* Lipooligosaccharide (LOS), die Sialinsäure eingebaut hatten. Sialinierte LOS sind mit einer Krankheitsaggravierung und der Auslösung der Folgeerkrankung Guillain-Barré-Syndrom (GBS) vergesellschaftet. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Sialisierung der *C. jejuni*-LOS zu einer Aktivierung von Dendritischen Zellen führte, welche wiederum B-Zellen aktivierten. Die Autoren zeigten somit den Zusammenhang zwischen der Interaktion von Dendritischen Zellen und B-Zellen als ausschlaggebend für die B-Zell vermittelte Autoimmunität im GBS durch eine *C. jejuni*-Infektion auf. [134]

Im IL10^{-/-}GM wurden weniger T-Zellen im Colon der naiven Tiere gezählt im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Wildtyp, den Mutanten Δ1103, Δ0138 und der Komplementante 1103K infiziert worden waren. Das bedeutet, dass NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion auch zu einer Aktivierung der T-Zellen des erworbenen Wirtsimmunsystems führte. Diese erfolgte unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0138*. Das Gen *cj0667* spielte bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle. Malik *et al.* zeigten, dass die Infektion mit *C. jejuni* 11168 zu einer T-Zell-Infiltration des Colons von IL10^{-/-}-Mäusen führte. [138] Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass *C. jejuni* B2 im gleichen Mausmodell zu einer Aktivierung von B-Zellen und T-

Zellen führte. [94] Diese Ergebnisse bekräftigen die Beobachtungen dieser Arbeit. NCTC11168 *C. jejuni* führt zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems, sowohl B-Zell, als auch T-Zell vermittelt. Das Gen *cj1103* ist dabei nicht essentiell. Für die B-Zell vermittelte Aktivierung spielten die Gene *cj0667* und *cj0138* eine Rolle. Für die T-Zell vermittelte Aktivierung des adaptiven Immunsystems spielt das Gen *cj0667* eine Rolle.

Neben diesen zwei Zellpopulationen wurden die Zytokine IL-18 und INF- γ im Rahmen der erworbenen Wirtsimmunität im IL10^{-/-}GM bestimmt. IL-18 wird vor allem von aktivierten Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Neutrophilen synthetisiert. IL-18 sorgt für die Aktivierung Natürlicher Killerzellen und kann zusammen mit IL-12 die Produktion von INF- γ in T_H1-Zellen anregen. [110] Im IL10^{-/-}GM dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion zu einer erhöhte IL-18-Expression im Ileum und einer niedrigeren IL-18-Expression im Colon führte, unabhängig von dem Gen *cj1103*. Bei der IL-18-Expression spielten die Gene *cj0667* und *cj0138* sowohl im Ileum als auch im Colon eine Rolle. IL-18 werden im Rahmen der intestinalen Entzündung sowohl proinflammatorische Eigenschaften, als auch schützende Eigenschaften zugesprochen. Wahrscheinlich spielt der Ort der IL-18-Produktion die entscheidende Rolle für die schützende oder krankheitsfördernde Funktion. IL-18, das von intestinalen Epithelzellen produziert wurde, wirkt schützend durch die Aufrechterhaltung der Epithelzellbarriere und durch die Aktivierung der Zellproliferation. IL-18, das in der Lamina propria produziert wurde, unterstützt die Entzündungsreaktion durch die Aktivierung der Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und NF- κ B. [139] Diese unterschiedlichen und konträren IL-18 Funktionen stellen eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse in unserem IL-10^{-/-}GM dar. Die erhöhten IL-18-Konzentrationen im Ileum nach NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion lassen hier eine proinflammatorische Funktion vermuten. Im Colon wurden niedrigere IL-18-Konzentrationen nach der NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion gemessen und eine schützende Funktion des IL-18 in diesem Zusammenhang wäre denkbar.

INF- γ ist ein Zytokin der spezifischen, erworbenen Abwehr. INF- γ wird vor allem von T_H1-Zellen, aber auch von Natürlichen Killerzellen (NK) und zytotoxische T-Zellen synthetisiert. INF- γ unterstützt die zelluläre Abwehr durch die Aktivierung von Makrophagen, welche wiederum reaktive Sauerstoff- und NO-Metabolite produzieren.

[64] Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte zu einer vermehrten Synthese des Zytokins INF- γ im IL10^{-/-}GM im Ileum und im Colon. Die untersuchten Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* spielen dabei keine Rolle. Malik *et al.* untersuchten ebenfalls die immunologischen Reaktionen von IL10^{-/-}-Mäusen nach *C. jejuni* 11168 Infektion. Es konnte ein INF- γ Anstieg im Colon und im Plasma bei den *C. jejuni*-infizierten Tieren verzeichnet werden. [138] Edwards *et al.* untersuchten die *C. jejuni*-Infektion an humanen ex vivo Colonbiopsien. Die Autoren schreiben der gezeigten Aktivierung des Zytokins INF- γ eine entscheidende Rolle in der frühen akuten Krankheitsphase einer *C. jejuni*-Infektion zu. [135] Beide Arbeitsgruppen bestätigen unsere Ergebnisse einer Aktivierung von INF- γ im Wirtsimmunsystem durch eine *C. jejuni*-Infektion.

Die *C. jejuni*-Infektion beim Menschen wurde mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Bei 0,1% der *C. jejuni*-Infektionen entwickelt sich nach der akuten Phase ein Guillain-Barré-Syndrom. Zusätzlich konnten Zusammenhänge mit dem Miller-Fisher-Syndrom, der reaktiven Arthritis, dem Reiter-Syndrom, Morbus-Crohn, Colitis ulcerosa und dem Reizdarmsyndrom gefunden werden. Bei der Entstehung dieser Erkrankungen spielen Autoimmunmechanismen eine wesentliche Rolle. [8, 22-29] Mit diesem Hintergrund sollten im IL10^{-/-}GM auch Autoimmunmechanismen untersucht werden. Auf zellulärer Ebene wurden hierfür die regulatorischen T-Zellen genauer untersucht. Humoral wurde das Zytokin IL-23 im Colon aller IL10^{-/-}-Tiere analysiert. Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen sorgen dafür, dass es zu keiner pathologischen Aktivierung des Immunsystems gegen sich selbst oder gegen fremde Antigene, zum Beispiel kommensale Bakterien im Magen-Darm-Trakt, kommt. Sie sind entscheidend für die Entwicklung, aber auch für die Unterdrückung von Autoimmunreaktionen bzw. Autoimmunkrankheiten. [140] Die Foxp3-Expression, welche die Umwandlung von T-Lymphozyten in regulatorische T-Zellen bewirkt, wird durch IL-10, TGF- β (Tumor Growth Factor β ; Tumorstromungsfaktor β) oder RA (Retinoic Acid; Retinsäure, ein Vitamin-A-Metabolit) induziert. [140-143] In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant mehr regulatorische T-Zellen im Colon der Tiere, die mit dem Wildtyp, den Mutanten Δ 1103, Δ 0138 und der Komplementante 1103K infiziert worden waren, im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0138* zu einer Aktivierung der regulatorischen T-Zellen im IL10^{-/-}

GM führte. Das untersuchte Gen *cj0667* war für die Aktivierung der regulatorischen T-Zellen im Wirt durch NCTC11168 *C. jejuni* von Bedeutung. Im Rahmen des IL10^{-/-}GM wurden IL-10-defiziente Tiere verwendet. Die gezeigte Aktivierung der regulatorischen T-Zellen kann somit nicht durch IL-10 induziert worden sein. RA konnte als entscheidender Regulator der TGF- β -abhängigen Induktion regulatorischer T-Zellen identifiziert werden. [144] Eine spezielle Gruppe dendritischer Zellen, welche CD103⁺ sind, in der Darmmukosa vorkommen und RA ausschütten, konnte identifiziert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die RA-Ausschüttung zu einer erhöhten Foxp3-Expression führte und T-Zellen in regulatorische T-Zellen umwandelte. [141] Regulatorische T-Zellen, die im IL10^{-/-}GM bestimmt worden sind, können durch eine Induktion von RA und TGF- β erklärt werden.

IL-23 wird von aktivierten Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet und unterstützt die Bildung von Th17-Zellen. Th17-Zellen produzieren dann wiederum IL-17, IL-6 und TNF- α und werden mit dem Auslösen von Autoimmunität in Verbindung gebracht. [111] Im IL10^{-/-}GM führte die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion im Colon zu keiner veränderten IL-23-Expression. Im Ileum zeigten sich zwar signifikante Unterschiede, jedoch wurden nur geringe Mengen von IL-23 nachgewiesen. Die NCTC11168 *C. jejuni*-Infektion führte unabhängig von den Genen *cj1103* und *cj0667* zu einer geringeren IL-23-Expression im Ileum. Das Gen *cj0138* war für die IL-23-Expression im Ileum der Tiere von Bedeutung. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe mit *C. jejuni*-infizierten ex vivo Colonbiopsien bestätigten die IL-23-Induktion durch *C. jejuni*. Die Autoren konnten mukosales IL-23 nachweisen. Die Zellpopulation, die IL-23 produzierte, konnte nicht identifiziert werden. [135] Kamada *et al.* konnten eine Zellpopulation, die mit typischen Markern von Makrophagen und von Dendritischen Zellen reagierte, bei Morbus Crohn Patienten nachweisen. Für diese CD14⁺ Zellen konnte neben einer TNF- α Produktion auch eine IL-23 Produktion nachgewiesen werden. [145]

5.5 Kodieren die *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* RNA-Chaperone?

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der *C. jejuni*-Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* *in vitro* und *in vivo*, um herauszufinden, ob diese Gene für putative RNA-Chaperone bzw. Hfq-Homologe kodieren und - vor allem - für die Wirtsinteraktion (Pathogenität und/oder Virulenz) essentiell sind. RNA-Chaperone bzw. Hfq-Homologe konnten in

unterschiedlichen Bakterien identifiziert werden. In einer Vielzahl von Organismen übernehmen RNA-Chaperone die Regulierung der Proteinbiosynthese. RNA-Chaperone üben diese regulatorische Funktion meist durch die Stabilisierung der Bindung von sRNAs und mRNAs aus. In einigen Fällen können Hfq-Homologe alleine, ohne sRNAs, über die direkte Bindung von mRNAs fungieren. Die Existenz von sRNAs in *C. jejuni* konnte gesichert werden, jedoch ließen sich bis heute keine RNA-Chaperone bzw. Hfq-Homologe für *C. jejuni* identifizieren. Durch Diskrepanzen in Vergleichsuntersuchungen von Genexpression zu den tatsächlich entstandenen Proteinen in *C. jejuni*, geht man von einer intensiven Regulierung der Proteinbiosynthese aus. Diese intensive Regulierung könnte durch Hfq-Homologe bzw. RNA-Chaperone katalysiert werden und man geht davon aus, dass *C. jejuni* über RNA-Chaperone verfügt. [4, 70-75, 82-86]

In der vorliegenden Arbeit wurde das Genom von *Campylobacter jejuni* NCTC11168 bioinformatisch durchsucht und es konnten die Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* als potentielle Homologe von RNA-Chaperonen identifiziert werden. Durch Mutationsanalysen, Komplementationsanalysen und Überexpressionsanalysen dieser Gene wurden die möglichen Funktionen dieser Genhomologe in dieser Arbeit untersucht. Vor allem die Gene *cj1103* und *cj0138* waren für die Ausbildung von Autoagglutinations- und Taxis-Phänotypen, sowie für das Überleben unter pessimalen Bedingungen von Bedeutung. Im Rahmen der Untersuchungen in Infektionsmodellen in der Maus konnten alle drei Gene *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* als Pathogenitätsfaktoren der *C. jejuni*-Infektion identifiziert werden. Reichen diese gezeigten Phänotypen bzw. Pathogenitäten von *Cj1103*, *Cj0667* und *Cj0138* aus, um sie als RNA-Chaperone zu klassifizieren? Durch Untersuchungen an RNA-Chaperone-Mutanten in *E. coli* K12 und *Brucella abortus* konnten andere Arbeitsgruppen die Funktionsvielfalt und die damit einhergehende Vielzahl von Phänotypen nachweisen. In *E. coli* und *Salmonellen* werden zum Beispiel bis zu 20% der Gene über RNA-Chaperone reguliert. [68, 69, 73-75] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Phänotypen, die durch die untersuchten Gene hervorgerufen wurden, gezeigt. Diese sind jedoch als mild einzuordnen und entsprechen nicht der Vielzahl und Eindeutigkeit, wie sie durch RNA-Chaperone anderer Bakterien ausgelöst werden. Bei der Betrachtung aller gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit, ist zum jetzigen Zeitpunkt davon auszugehen, dass es sich bei den Genen *cj1103*, *cj0667* und *cj0138* nicht um RNA-Chaperon kodierende Gene in *C. jejuni* handelt.

Im Umkehrschluss wurde jedoch auch nicht bewiesen, dass es sich nicht um RNA-Chaperon kodierende Gene handelt. Es kann sehr gut sein, dass wir in Anlehnung an die Funktionen von RNA-Chaperonen in anderen Bakterien, die hergestellten *C. jejuni*-Mutanten unter den „falschen“ Bedingungen getestet haben und somit die vermeintliche Funktionsvielfalt gar nicht gezeigt werden konnte. Keiner Arbeitsgruppe gelang bisher die Identifizierung eines RNA-Chaperones in *C. jejuni*. Da wir davon ausgehen, dass es RNA-Chaperone in *C. jejuni* gibt, bedeutet das, dass die Identifizierung der „geeigneten“ Untersuchungsbedingungen offensichtlich nicht trivial ist.

Rieder *et al.* publizierten eine neue Herangehensweise zur Identifizierung von RNA-Interaktionen in *H. pylori*. Zuerst wurden unterschiedliche Aptamer-markierte sRNAs einem *H. pylori*-Zelllysate ausgesetzt und anschließend über Aptamer an eine Säule gebunden. Es erfolgte eine chromatographische Identifizierung der RNA-bindenden-Proteine, die an die untersuchte Aptamer-markierte sRNA gebunden hatten. In einem zweiten Ansatz wurde jeweils das Gen der zuvor vermeintlich identifizierten RNA-bindenden-Proteine FLAG-markiert und hiervon ein Zelllysate hergestellt. Durch die Zugabe von FLAG-Antikörpern wurden RNA-Proteinkomplexe gebunden, isoliert und anschließend sequenziert. Somit konnten sRNAs und mRNAs, die an die RNA-bindenden-Proteine bindeten, identifiziert werden. [146] Bei diesen RNA-bindenden-Proteinen könnte es sich um RNA-Chaperone handeln. Da mittlerweile eine Vielzahl von sRNAs in *C. jejuni* identifiziert werden konnten [86], ist eine Herangehensweise von der regulierten sRNA zur Identifikation von vermeintlichen RNA-Chaperonen in *C. jejuni* denkbar. Und stellt eine Alternative zum gewählten bioinformatischen Ansatz der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung von RNA-Chaperonen dar.

Eine weitere Erklärung für die Riboregulation der Proteinbiosynthese in *C. jejuni* könnten sRNAs liefern. sRNAs können auch alleine, ohne RNA-Chaperone bzw. Hfq-Homologe, ihre regulierende Funktion ausführen. [71] Da in *C. jejuni* [86] und *H. pylori* [85] eine Vielzahl von sRNAs identifiziert werden konnten und diese die Riboregulation übernehmen könnten, wäre es durchaus vorstellbar, dass die ϵ -Subdivision der *Proteobakterien* nicht über RNA-Chaperone verfügt. Das würde auch erklären, warum man in der ϵ -Subdivision der *Proteobakterien* bisher keine RNA-Chaperone bzw. Hfq-Homologe trotz vieler Versuche identifizieren konnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Ng LK, Sherburne R, Taylor DE, Stiles ME. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J Bacteriol*, 1985. 164. (1): p. 338-343.
2. Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie. Duale Reihe. 3. überarbeitete Auflage. Thieme, 2005: p. 436-437.
3. Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7. Auflage. Springer, 2012: p. 275-280.
4. Gaskin DJ, Reuter M, Shearer N, Mulholland F, Pearson BM, van Vliet AH. Genomics of thermophilic *Campylobacter* species. *Genome Dyn*, 2009. 6. p. 91-109.
5. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin Microbiol Rev*, 1998. 11. (3): p. 555-567.
6. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 2000. 403. (6770): p. 665-668.
7. NCBI. Genome Assembly and Annotation report. *Campylobacter jejuni*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/149>
8. Caspary WF, Kist M, Stein J. Infektiologie des Gastrointestinaltraktes. Springer, 2006.
9. Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, van Pelt W, Wagenaar JA, Owen RJ. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev*, 2008. 21. (3): p. 505-518.
10. Robert-Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch 2001-2014. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/jahrbuch_node.html
11. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis*, 1988. 157. (3): p. 472-479.
12. Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1981. 282. (6276): p. 1584.
13. Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2007. 5. (9): p. 665-679.
14. Blaser MJ. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis*, 1997. 176 Suppl 2. p. S103-105.
15. Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW, Bajaj-Elliott M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2008. 102. (2): p. 123-129.
16. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis*, 2002. 8. (3): p. 237-244.
17. Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni*—an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis*, 1999. 5. (1): p. 28-35.
18. Samuel MC, Vugia DJ, Shallow S, Marcus R, Segler S, McGivern T, Kassenborg H, Reilly K, Kennedy M, Angulo F, Tauxe RV. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. *Clin Infect Dis*, 2004. 38 Suppl 3. p. S165-174.

19. Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS, Hudson MJ, Roderick PJ. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *Bmj*, 1999. 318. (7190): p. 1046-1050.
20. van Pelt W, de Wit MA, Wannet WJ, Ligtoet EJ, Widdowson MA, van Duynhoven YT. Laboratory surveillance of bacterial gastroenteric pathogens in The Netherlands, 1991-2001. *Epidemiol Infect*, 2003. 130. (3): p. 431-441.
21. Weber R, Ledergerber B, Zbinden R, Altwegg M, Pfyffer GE, Spycher MA, Briner J, Kaiser L, Opravil M, Meyenberger C, Flepp M. Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons: prospective community-based cohort study. *Swiss HIV Cohort Study. Arch Intern Med*, 1999. 159. (13): p. 1473-1480.
22. Nachamkin I. *Campylobacter Enteritis and the Guillain-Barre Syndrome. Curr Infect Dis Rep*, 2001. 3. (2): p. 116-122.
23. Masuhr K, Neumann M. *Neurologie. Duale Reihe. 5. überarbeitete Auflage. Thieme*, 2005: 463-465.
24. Endtz HP, Ang CW, van Den Braak N, Duim B, Rigter A, Price LJ, Woodward DL, Rodgers FG, Johnson WM, Wagenaar JA, Jacobs BC, Verbrugh HA, van Belkum A. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. *J Clin Microbiol*, 2000. 38. (6): p. 2297-2301.
25. Yuki N, Takahashi M, Tagawa Y, Kashiwase K, Tadokoro K, Saito K. Association of *Campylobacter jejuni* serotype with antiganglioside antibody in Guillain-Barre syndrome and Fisher's syndrome. *Ann Neurol*, 1997. 42. (1): p. 28-33.
26. Locht H, Krogfelt KA. Comparison of rheumatological and gastrointestinal symptoms after infection with *Campylobacter jejuni/coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61. (5): p. 448-452.
27. Schiellerup P, Krogfelt KA, Locht H. A comparison of self-reported joint symptoms following infection with different enteric pathogens: effect of HLA-B27. *J Rheumatol*, 2008. 35. (3): p. 480-487.
28. Helms M, Simonsen J, Molbak K. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clin Infect Dis*, 2006. 42. (4): p. 498-506.
29. Berberian LS, Valles-Ayoub Y, Gordon LK, Targan SR, Braun J. Expression of a novel autoantibody defined by the VH3-15 gene in inflammatory bowel disease and *Campylobacter jejuni* enterocolitis. *J Immunol*, 1994. 153. (8): p. 3756-3763.
30. Hassane DC, Lee RB, Pickett CL. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infect Immun*, 2003. 71. (1): p. 541-545.
31. Lara-Tejero M, Galan JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol*, 2002. 10. (3): p. 147-152.
32. Ge Z, Schauer DB, Fox JG. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol*, 2008. 10. (8): p. 1599-1607.
33. McNally DJ, Lamoureux MP, Karlyshev AV, Fiori LM, Li J, Thacker G, Coleman RA, Khieu NH, Wren BW, Brisson JR, Jarrell HC, Szymanski CM. Commonality and biosynthesis of the O-methyl phosphoramidate capsule modification in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem*, 2007. 282. (39): p. 28566-28576.

34. Bacon DJ, Szymanski CM, Burr DH, Silver RP, Alm RA, Guerry P. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol Microbiol*, 2001. 40. (3): p. 769-777.
35. Maue AC, Mohawk KL, Giles DK, Poly F, Ewing CP, Jiao Y, Lee G, Ma Z, Monteiro MA, Hill CL, Ferderber JS, Porter CK, Trent MS, Guerry P. The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. *Infect Immun*, 2013. 81. (3): p. 665-672.
36. Champion OL, Karlyshev AV, Senior NJ, Woodward M, La Ragione R, Howard SL, Wren BW, Titball RW. Insect infection model for *Campylobacter jejuni* reveals that O-methyl phosphoramidate has insecticidal activity. *J Infect Dis*, 2010. 201. (5): p. 776-782.
37. Marsden GL, Li J, Everest PH, Lawson AJ, Ketley JM. Creation of a large deletion mutant of *Campylobacter jejuni* reveals that the lipooligosaccharide gene cluster is not required for viability. *J Bacteriol*, 2009. 191. (7): p. 2392-2399.
38. Houlston RS, Vinogradov E, Dzieciatkowska M, Li J, St Michael F, Karwaski MF, Brochu D, Jarrell HC, Parker CT, Yuki N, Mandrell RE, Gilbert M. Lipooligosaccharide of *Campylobacter jejuni*: similarity with multiple types of mammalian glycans beyond gangliosides. *J Biol Chem*, 2011. 286. (14): p. 12361-12370.
39. Hossain A, Stewart-Tull DE, Freer JH. Heat-labile and heat-stable haemolysins of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1993. 6. (4): p. 331-339.
40. Teh AH, Lee SM, Dykes GA. Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? *Appl Environ Microbiol*, 2014. 80. (17): p. 5154-5160.
41. Brown HL, Reuter M, Hanman K, Betts RP, van Vliet AH. Prevention of biofilm formation and removal of existing biofilms by extracellular DNases of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 2015. 10. (3): p. e0121680.
42. Flint A, Sun YQ, Stintzi A. Cj1386 is an ankyrin-containing protein involved in heme trafficking to catalase in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 2011. 194. (2): p. 334-345.
43. Belzer C, van Schendel BA, Hoogenboezem T, Kusters JG, Hermans PW, van Vliet AH, Kuipers EJ. PerR controls peroxide- and iron-responsive expression of oxidative stress defense genes in *Helicobacter hepaticus*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2011. 1. (3): p. 215-222.
44. Hofreuter D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. 4. p. 137.
45. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol*, 2007. 15. (10): p. 456-461.
46. Rossez Y, Wolfson EB, Holmes A, Gally DL, Holden NJ. Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog*, 2015. 11. (1): p. e1004483.
47. Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. 69. (4): p. 527-543.
48. Wosten MM, Wagenaar JA, van Putten JP. The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem*, 2004. 279. (16): p. 16214-16222.
49. Guerry P, Szymanski CM. *Campylobacter* sugars sticking out. *Trends Microbiol*, 2008. 16. (9): p. 428-435.
50. Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is

- dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol*, 2004. 186. (11): p. 3296-3303.
51. Neal-McKinney JM, Christensen JE, Konkel ME. Amino-terminal residues dictate the export efficiency of the *Campylobacter jejuni* filament proteins via the flagellum. *Mol Microbiol*, 2010. 76. (4): p. 918-931.
 52. Neal-McKinney JM, Konkel ME. The *Campylobacter jejuni* CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012. 2. p. 31.
 53. Barrero-Tobon AM, Hendrixson DR. Identification and analysis of flagellar coexpressed determinants (Feds) of *Campylobacter jejuni* involved in colonization. *Mol Microbiol*, 2012. 84. (2): p. 352-369.
 54. Boehm M, Lind J, Backert S, Tegtmeyer N. *Campylobacter jejuni* serine protease HtrA plays an important role in heat tolerance, oxygen resistance, host cell adhesion, invasion, and transmigration. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2015. 5. (1): p. 68-80.
 55. Barrero-Tobon AM, Hendrixson DR. Flagellar biosynthesis exerts temporal regulation of secretion of specific *Campylobacter jejuni* colonization and virulence determinants. *Mol Microbiol*, 2014. 93. (5): p. 957-974.
 56. Flanagan RC, Neal-McKinney JM, Dhillon AS, Miller WG, Konkel ME. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infect Immun*, 2009. 77. (6): p. 2399-2407.
 57. Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology*, 2003. 149. (Pt 1): p. 153-165.
 58. Konkel ME, Larson CL, Flanagan RC. *Campylobacter jejuni* FlpA binds fibronectin and is required for maximal host cell adherence. *J Bacteriol*, 2010. 192. (1): p. 68-76.
 59. Baek KT, Vegge CS, Brondsted L. HtrA chaperone activity contributes to host cell binding in *Campylobacter jejuni*. *Gut Pathog*, 2011. 3. p. 13.
 60. Ingmer H, Brondsted L. Proteases in bacterial pathogenesis. *Res Microbiol*, 2009. 160. (9): p. 704-710.
 61. Heimesaat MM, Alutis M, Grundmann U, Fischer A, Tegtmeyer N, Bohm M, Kuhl AA, Gobel UB, Backert S, Bereswill S. The role of serine protease HtrA in acute ulcerative enterocolitis and extra-intestinal immune responses during *Campylobacter jejuni* infection of gnotobiotic IL-10 deficient mice. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. 4. p. 77.
 62. Heimesaat MM, Fischer A, Alutis M, Grundmann U, Boehm M, Tegtmeyer N, Gobel UB, Kuhl AA, Bereswill S, Backert S. The impact of serine protease HtrA in apoptosis, intestinal immune responses and extra-intestinal histopathology during *Campylobacter jejuni* infection of infant mice. *Gut Pathog*, 2014. 6. p. 16.
 63. Kelly D. Complexity and versatility in the physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni*. 3. ed. Washington DC ASM Press, 2008: 41-61.
 64. Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B. *Biochemie des Menschen*. 2. korrigierte Auflage. Georg Thieme Verlag, 2002.
 65. Wright JA, Grant AJ, Hurd D, Harrison M, Guccione EJ, Kelly DJ, Maskell DJ. Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* in vitro growth reveals a stationary-phase physiological switch. *Microbiology*, 2009. 155. (Pt 1): p. 80-94.

66. Dettmer U, Folkerts M, Kächler E, Sönnichsen A. Intensivkurs Biochemie. 1. Auflage. Urban & Fischer, 2005.
67. Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature*, 1968. 219. (5154): p. 588-590.
68. Tsui HC, Leung HC, Winkler ME. Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 1994. 13. (1): p. 35-49.
69. Robertson GT, Roop RM, Jr. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol*, 1999. 34. (4): p. 690-700.
70. Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol*, 2004. 51. (6): p. 1525-1533.
71. Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 2009. 136. (4): p. 615-628.
72. Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 2007. 63. (1): p. 193-217.
73. Guisbert E, Rhodius VA, Ahuja N, Witkin E, Gross CA. Hfq modulates the sigmaE-mediated envelope stress response and the sigma32-mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2007. 189. (5): p. 1963-1973.
74. Sittka A, Sharma CM, Rolle K, Vogel J. Deep sequencing of *Salmonella* RNA associated with heterologous Hfq proteins in vivo reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biol*, 2009. 6. (3): p. 266-275.
75. Frohlich KS, Vogel J. Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol*, 2009. 12. (6): p. 674-682.
76. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 2005. 361. p. 13-37.
77. Wu L, Belasco JG. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 2008. 29. (1): p. 1-7.
78. Soper T, Mandin P, Majdalani N, Gottesman S, Woodson SA. Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107. (21): p. 9602-9607.
79. Carabetta VJ, Mohanty BK, Kushner SR, Silhavy TJ. The response regulator SprE (RssB) modulates polyadenylation and mRNA stability in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2009. 191. (22): p. 6812-6821.
80. Mohanty BK, Maples VF, Kushner SR. The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2004. 54. (4): p. 905-920.
81. Hankins JS, Denroche H, Mackie GA. Interactions of the RNA-binding protein Hfq with *cspA* mRNA, encoding the major cold shock protein. *J Bacteriol*, 2010. 192. (10): p. 2482-2490.
82. Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*, 2011. 9. (8): p. 578-589.
83. Dugar G, Herbig A, Forstner KU, Heidrich N, Reinhardt R, Nieselt K, Sharma CM. High-resolution transcriptome maps reveal strain-specific regulatory features of multiple *Campylobacter jejuni* isolates. *PLoS Genet*, 2013. 9. (5): p. e1003495.
84. Holmes K, Mulholland F, Pearson BM, Pin C, McNicholl-Kennedy J, Ketley JM, Wells JM. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology*, 2005. 151. (Pt 1): p. 243-257.

85. Pernitzsch SR, Sharma CM. Transcriptome complexity and riboregulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012. 2. p. 14.
86. Porcelli I, Reuter M, Pearson BM, Wilhelm T, van Vliet AH. Parallel evolution of genome structure and transcriptional landscape in the Epsilonproteobacteria. *BMC Genomics*, 2013. 14. p. 616.
87. Mahler M, Leiter EH. Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. 8. (5): p. 347-355.
88. Mahler M, Most C, Schmidtke S, Sundberg JP, Li R, Hedrich HJ, Churchill GA. Genetics of colitis susceptibility in IL-10-deficient mice: backcross versus F2 results contrasted by principal component analysis. *Genomics*, 2002. 80. (3): p. 274-282.
89. Mansfield LS, Patterson JS, Fierro BR, Murphy AJ, Rathinam VA, Kopper JJ, Barbu NI, Onifade TJ, Bell JA. Genetic background of IL-10(-/-) mice alters host-pathogen interactions with *Campylobacter jejuni* and influences disease phenotype. *Microb Pathog*, 2008. 45. (4): p. 241-257.
90. Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kuhl AA, Dasti JI, Zautner AE, Munoz M, Loddenkemper C, Gross U, Gobel UB, Heimesaat MM. Novel murine infection models provide deep insights into the "menage a trois" of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PLoS One*, 2011. 6. (6): p. e20953.
91. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 1998. 66. (11): p. 5224-5231.
92. Okada Y, Maeda N, Takakura S, Miyata K, Koshiba M. Preventive and therapeutic effects of tacrolimus in an interleukin-10-deficient mouse model of colitis. *Inflamm Res*, 2011.
93. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993. 75. (2): p. 263-274.
94. Haag LM, Fischer A, Otto B, Plickert R, Kuhl AA, Gobel UB, Bereswill S, Heimesaat MM. *Campylobacter jejuni* induces acute enterocolitis in gnotobiotic IL-10-/- mice via Toll-like-receptor-2 and -4 signaling. *PLoS One*, 2012. 7. (7): p. e40761.
95. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, 1993. 69. (2): p. 238-249.
96. Rowe P. Statistik für Mediziner und Pharmazeuten. 1. Auflage. Wiley-VCH, 2012.
97. Poeggel G. Kurzlehrbuch Biologie. 3. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, 2013: p. 143.
98. Dr. Retzlaff E. Schüler Duden Biologie. 3. überarbeitete Auflage 1994.
99. Hermann U. Wahrig - Die deutsche Rechtschreibung. Neuauflage 2006. Cornelsen, 2006.
100. Fields JA, Thompson SA. *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. *J Bacteriol*, 2008. 190. (9): p. 3411-3416.
101. Krell T, Lacal J, Munoz-Martinez F, Reyes-Darias JA, Cadirci BH, Garcia-Fontana C, Ramos JL. Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ Microbiol*, 2011. 13. (5): p. 1115-1124.

102. Reuter M, van Vliet AH. Signal balancing by the CetABC and CetZ chemoreceptors controls energy taxis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 2012. 8. (1): p. e54390.
103. Timmermans J, Van Melderen L. Conditional essentiality of the *csrA* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2009. 191. (5): p. 1722-1724.
104. Haag LM, Fischer A, Otto B, Plickert R, Kuhl AA, Gobel UB, Bereswill S, Heimesaat MM. Intestinal microbiota shifts towards elevated commensal *Escherichia coli* loads abrogate colonization resistance against *Campylobacter jejuni* in mice. *PLoS One*, 2012. 7. (5): p. e35988.
105. Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, Fuchs D, Jahn HK, Freudenberg M, Loddenkemper C, Batra A, Lehr HA, Liesenfeld O, Blaut M, Gobel UB, Schumann RR, Bereswill S. Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One*, 2007. 2. (7): p. e662.
106. Wohlgemuth S, Keller S, Kertscher R, Stadion M, Haller D, Kisling S, Jahreis G, Blaut M, Loh G. Intestinal steroid profiles and microbiota composition in colitic mice. *Gut Microbes*, 2011. 2. (3): p. 159-166.
107. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. 29. (6): p. 313-326.
108. Wenzel UA, Magnusson MK, Rydstrom A, Jonstrand C, Hengst J, Johansson ME, Velcich A, Ohman L, Strid H, Sjovall H, Hansson GC, Wick MJ. Spontaneous colitis in *Muc2*-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis. *PLoS One*, 2014. 9. (6): p. e100217.
109. Lin S, Yang X, Liang D, Zheng SG. Treg cells: a potential regulator for IL-22 expression? *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7. (2): p. 474-480.
110. Marçais A, Viel S, Grau M, Henry T, Marvel J, Walzer T. Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol*, 2013. 4. p. 450.
111. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med*, 2006. 203. (11): p. 2473-2483.
112. Masanta WO, Heimesaat MM, Bereswill S, Tareen AM, Lugert R, Gross U, Zautner AE. Modification of intestinal microbiota and its consequences for innate immune response in the pathogenesis of campylobacteriosis. *Clin Dev Immunol*, 2013. 2013. p. 526860.
113. Heimesaat MM, Lugert R, Fischer A, Alutis M, Kuhl AA, Zautner AE, Tareen AM, Gobel UB, Bereswill S. Impact of *Campylobacter jejuni* cj0268c knockout mutation on intestinal colonization, translocation, and induction of immunopathology in gnotobiotic IL-10 deficient mice. *PLoS One*, 2014. 9. (2): p. e90148.
114. Alutis ME, Grundmann U, Fischer A, Kuhl AA, Bereswill S, Heimesaat MM. Selective gelatinase inhibition reduces apoptosis and pro-inflammatory immune cell responses in *Campylobacter jejuni*-infected gnotobiotic IL-10 deficient mice. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2014. 4. (4): p. 213-222.
115. NCBI. Gene. *campylobacter jejuni*[orgn] Cj1103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=campylobacter+jejuni%5Borgn%5D+Cj1103>
116. Lapouge K, Schubert M, Allain FH, Haas D. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol*, 2008. 67. (2): p. 241-253.

117. Wang RF, Kushner SR. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1991. 100. p. 195-199.
118. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage. Walter de Gruyter, 2012.
119. NCBI. Gene. *campylobacter jejuni*[orgn] Cj0667.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=campylobacter+jejuni%5Borgn%5D+Cj0667>
120. Mayerle M, Woodson SA. Specific contacts between protein S4 and ribosomal RNA are required at multiple stages of ribosome assembly. *Rna*, 2013. 19. (4): p. 574-585.
121. NCBI. Gene. *campylobacter jejuni*[orgn] Cj0138.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=campylobacter+jejuni%5Borgn%5D+Cj0138>
122. Vegge CS, Brondsted L, Li YP, Bang DD, Ingmer H. Energy taxis drives *Campylobacter jejuni* toward the most favorable conditions for growth. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75. (16): p. 5308-5314.
123. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*, 1994. 176. (8): p. 2137-2142.
124. Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 2012. 7. (9): p. 1061-1072.
125. Reuter M, Mallett A, Pearson BM, van Vliet AH. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2010. 76. (7): p. 2122-2128.
126. Faruque SM, Biswas K, Udden SM, Ahmad QS, Sack DA, Nair GB, Mekalanos JJ. Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103. (16): p. 6350-6355.
127. Teschler JK, Zamorano-Sanchez D, Utada AS, Warner CJ, Wong GC, Linington RG, Yildiz FH. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 2015. 13. (5): p. 255-268.
128. Brown HL, Reuter M, Salt LJ, Cross KL, Betts RP, van Vliet AH. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 2014. 80. (22): p. 7053-7060.
129. Humphrey S, Chaloner G, Kemmett K, Davidson N, Williams N, Kipar A, Humphrey T, Wigley P. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *MBio*, 2014. 5. (4): p. e01364-01314.
130. Bloos F. Clinical diagnosis of sepsis and the combined use of biomarkers and culture- and non-culture-based assays. *Methods Mol Biol*, 2015. 1237. p. 247-260.
131. Neunhoeffer F, Plinke S, Renk H, Hofbeck M, Fuchs J, Kumpf M, Zundel S, Seitz G. Serum Concentrations of Interleukin-6, Procalcitonin, and C-Reactive Protein: Discrimination of Septical Complications and Systemic Inflammatory Response Syndrome after Pediatric Surgery. *Eur J Pediatr Surg*, 2015.
132. Albright CA, Sartor RB, Tonkonogy SL. Endogenous antigen presenting cell-derived IL-10 inhibits T lymphocyte responses to commensal enteric bacteria. *Immunol Lett*, 2009. 123. (1): p. 77-87.
133. Mansfield LS, Bell JA, Wilson DL, Murphy AJ, Elsheikha HM, Rathinam VA, Fierro BR, Linz JE, Young VB. C57BL/6 and congenic interleukin-10-deficient mice can serve as models of *Campylobacter jejuni* colonization and enteritis. *Infect Immun*, 2007. 75. (3): p. 1099-1115.

134. Huizinga R, van Rijs W, Bajramovic JJ, Kuijf ML, Laman JD, Samsom JN, Jacobs BC. Sialylation of *Campylobacter jejuni* endotoxin promotes dendritic cell-mediated B cell responses through CD14-dependent production of IFN-beta and TNF-alpha. *J Immunol*, 2015. 191. (11): p. 5636-5645.
135. Edwards LA, Nistala K, Mills DC, Stephenson HN, Zilbauer M, Wren BW, Dorrell N, Lindley KJ, Wedderburn LR, Bajaj-Elliott M. Delineation of the innate and adaptive T-cell immune outcome in the human host in response to *Campylobacter jejuni* infection. *PLoS One*, 2010. 5. (11): p. e15398.
136. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol*, 2010. 32. (1): p. 17-31.
137. Tu QV, McGuckin MA, Mendz GL. *Campylobacter jejuni* response to human mucin MUC2: modulation of colonization and pathogenicity determinants. *J Med Microbiol*, 2008. 57. (Pt 7): p. 795-802.
138. Malik A, Sharma D, St Charles J, Dybas LA, Mansfield LS. Contrasting immune responses mediate *Campylobacter jejuni*-induced colitis and autoimmunity. *Mucosal Immunol*, 2014. 7. (4): p. 802-817.
139. Siegmund B. Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? *Immunity*, 2010. 32. (3): p. 300-302.
140. Murai M, Krause P, Cheroutre H, Kronenberg M. Regulatory T-cell stability and plasticity in mucosal and systemic immune systems. *Mucosal Immunol*, 2010. 3. (5): p. 443-449.
141. Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol*, 2011. 32. (9): p. 412-419.
142. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*, 2009. 10. (11): p. 1178-1184.
143. Park Y, Jin HS, Lopez J, Elly C, Kim G, Murai M, Kronenberg M, Liu YC. TSC1 regulates the balance between effector and regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2013. 123. (12): p. 5165-5178.
144. Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G, Nowak E, Benson MJ, Kronenberg M, Noelle RJ, Cheroutre H. Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity*, 2009. 30. (4): p. 471-472; author reply 472-473.
145. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*, 2008. 118. (6): p. 2269-2280.
146. Rieder R, Reinhardt R, Sharma C, Vogel J. Experimental tools to identify RNA-protein interactions in *Helicobacter pylori*. *RNA Biol*, 2012. 9. (4): p. 520-531.

Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Johanna Meier, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Bedeutung von Homologen der RNA-Bindeproteine bei der *Campylobacter jejuni*-induzierten Enteritis selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der *Campylobacter*-Arbeitsgruppen des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Charité - Universitätsmedizin Berlin und des Instituts of Food Research in Norwich bedanken. Durch die schöne Zusammenarbeit haben alle die Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, intensiv geprägt. Vielen Dank!

Prof. Dr. Stefan Bereswill, Dr. Markus M. Heimesaat und Dr. Arnoud van Vliet danke ich für die gute Betreuung während der gesamten Doktorarbeit und für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit in einer Kooperation an zwei Instituten.

Dr. André Fischer, Bruce Pearson und Dr. Mark Reuter danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung, sowie allen praktischen und gedanklichen Hilfestellungen.

Den Tierpflegekräften des FEMs, Maddy Houchen und Gary Wortley danke ich für die Unterstützung und die stets gute Laune.

Dem Graduiertenkolleg „Immuko“ des Sonderforschungsbereiches 633 der deutschen Forschungsgemeinschaft e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung und das umfangreiche Lehrangebot.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter Dr. Uta Köpke, die immer für mich da ist. Du bist die Beste, Mama! Mein besonderer Dank gilt auch meinem Bruder Steffen Meier, Judith Gabriel und Dana Kern.