

## **B. Schrifttum**

### **B.1. Allgemeine Eigenschaften des Chromosoms von *Campylobacter jejuni*, Stamm NCTC11168**

Die Annotation der Genomsequenz des Stammes NCTC11168 [20] im Februar 2000 erbrachte entscheidende Neuerkenntnisse über die bis zu diesem Zeitpunkt wenig geklärte Organisation des *C. jejuni*-Genoms. Dieses weist eine Größe von 1,64 Mb und einen G+C-Gehalt von 30,6% auf und kodiert insgesamt für 1,654 Proteine. Die kodierenden Sequenzen (CDS) entsprechen etwa 94,3% des Gesamtgenoms und machen es damit zum dichtesten bakteriellen Chromosom, das bisher sequenzanalysiert wurde.

Ein außergewöhnliches Merkmal des *C. jejuni*-Genoms ist das nahezu komplette Fehlen repetitiver DNS-Sequenzen: es beinhaltet lediglich drei Kopien des ribosomalen RNS-Operons und drei weitere dupli- oder triplizierte CDS. Ebenso bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Sequenzanalyse des Stammes NCTC11168, abgesehen von einer Transposon-ähnlichen CDS, keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein mobiler genetischer Elemente liefert. Für eine Reihe anderer *C. jejuni*-Stämme konnten dagegen derartige Strukturen im Zusammenhang mit dem Erwerb von Antibiotika-Resistenzgenen nachgewiesen werden [21; 22]. Das NCTC11168-Chromosom zeigt weitere Besonderheiten insofern, als dass nur wenige seiner Gene in Form von Operons oder Clustern organisiert sind. Lediglich für die beiden ribosomalen RNS-Untereinheiten (16S/23S) und u.a. für Gene, die in die Biosynthese und Modifikation von Lipoolysacchariden (LOS), extrazellulären Polysacchariden (EP) und des Flagellarapparates involviert sind, konnte eine solche Strukturierung bisher eindeutig nachgewiesen werden. Mit drei möglicherweise an der Biosynthese von Polysacchariden beteiligten Gen-Loci zeigt das Genom außerdem ein unerwartet hohes Potential für die Polysaccharid-Synthese [20].

Im Folgenden sollen einige mit der Veröffentlichung der Genomssequenz von NCTC11168 einhergehende, wichtige Neuerkenntnisse über die Genomorganisation dieser Spezies dargestellt werden.

#### **B.1.1 Hypervariable Regionen**

Das *C. jejuni* NCTC11168-Chromosom beherbergt mindestens 25 hypervariable Regionen, die sich hauptsächlich in Form von Längenvariationen G/C-reicher DNS-Abschnitte äußern. Solche Variationen können durch sog. „slipped-strand mispairing“ während der Replikation entstehen. Dabei kommt es durch unkorrekte Basenpaarungen im Zusammenhang mit

unzureichenden DNS-Reparationsmechanismen und erhöhter Empfindlichkeit der Replikations-Intermediate gegenüber Restriktions-Modifikations-Endonukleasen zur Aufnahme oder zum Verlust von einer oder mehreren Basen. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Bakterienspezies beschrieben und scheint in verschiedene Mechanismen der Genexpression involviert zu sein. So kann z.B. die Stärke von Promotoren durch Veränderung der Positionen wichtiger struktureller Domänen beeinflusst werden, oder aber auch die Integrität von Offenen Leserahmen (ORFs). Durch den damit verbundenen genetischen Switch (phasenvariable Expression bestimmter Gene) sind entsprechende Bakterien in der Lage, sich umgehend an veränderte Milieubedingungen anzupassen [23].

Die hypervariablen Regionen im *C. jejuni*-Chromosom treffen vornehmlich mit den Genclustern für LOS- und EP-Biosynthese sowie für die Modifikation der Flagellen zusammen [20]. In NCTC11168 konnte der Mechanismus der Phasenvariation u.a. für das in die LOS-Biosynthese involvierte Gen *wlaN* nachgewiesen werden, das für eine  $\beta$ -1,3-Galaktosyltransferase kodiert. Die reversible Expression des *wlaN*-Genprodukts resultiert in unterschiedlichen Zellpopulationen mit alternierenden Gangliosid GM<sub>1</sub>- oder GM<sub>2</sub>-ähnlichen LOS-Strukturen, die über den Mechanismus der molekularen Mimikry an der Entstehung der Neuropathien Guillain-Barré- (GBS) und Miller-Fisher-Syndrom (MFS) beteiligt sein können [24]. In *C. jejuni* 81-176 (O:23/36) konnte dagegen eine phasenvariable Expression des Genes *cgtA* beobachtet werden, das für eine N-Acetylgalactosamintransferase kodiert und Bakterienpopulationen mit sowohl Gangliosid GM<sub>2</sub>- als auch GM<sub>3</sub>-Strukturen hervorbringt. Die Mutagenisierung dieses Gens geht einher mit einer verstärkter Expression zugunsten von GM<sub>3</sub>-Varianten, die im Gegensatz zum Wildtyp eine deutlich gesteigerte Invasion in humane epitheliale Zellen zeigen. Neben der Bedeutung der Gangliosid-Mimikry in der GBS-/MFS-Pathogenese ist damit also zusätzlich der Hinweis gegeben, dass die Fähigkeit des Erregers, eine gastrointestinale Erkrankung auszulösen, durch Strukturvariationen in den LOS beeinflusst werden kann. Da innerhalb des *cgtA* von *C. jejuni* NCTC11168 keine ähnlichen homopolymeren Sequenzen vorliegen, ist außerdem davon auszugehen, dass es sich bei den *C. jejuni* LOS um sehr dynamische Strukturen handelt, deren Variationsfähigkeit in den einzelnen Stämmen unterschiedlich ausgeprägt ist [25]. An der variablen Expression des für die Motilität verantwortlichen Flagellums sind in *C. jejuni* sog. *maf*- (motility accessory factor) Gene beteiligt. Neben der „slipped-strand mispairing“-vermittelten Mutagenese spielen bei der Formierung motiler und nicht-motiler Phasenvarianten v.a. die homologe Rekombination bzw. Deletions- und Duplikationsereignisse innerhalb der *maf*-Gene eine Rolle, die untereinander bis zu 100% Sequenzidentität aufweisen. Die Notwendigkeit für eine

flexible Expression des Flagellums ist wahrscheinlich durch dessen duale Funktion als Adhäsion und Fortbewegungsapparat zu erklären. Nach erfolgreicher initialer Anlagerung an die Wirtszellen zur Etablierung der Infektion könnte anschließend die Expression zugunsten nicht-motiler Varianten von Vorteil sein. Kommt es allerdings an der Infektionsstelle zu limitierten Nährstoffbedingungen, können wiederum die motilen Varianten verstärkt exprimiert werden, um an anderer Stelle zu kolonisieren [26]. Zusätzlich stellt die reversible Expression des Flagellums wahrscheinlich einen Vorteil bei der Umgehung der Wirtimmunität dar [27].

Man geht davon aus, dass *C. jejuni* in der Lage ist, viele seiner Oberflächenstrukturen bzw. antigenetischen Determinanten auf diese Weise kontinuierlich abzuwandeln. Der vergleichsweise geringe Anteil phasenvariabler Gene im *C. jejuni*-Chromosom - *Neisseria (N.) meningitidis* verfügt beispielsweise über mindestens 65 dieser Gene [28] - scheint durch deren gegenüber anderen Bakterienspezies wesentlich höher liegende Variationsrate ausgeglichen zu werden. Dem Mechanismus der Phasenvariation wird daher eine ähnlich wichtige Rolle in der Überlebensstrategie und Adaptation von *C. jejuni* zugesprochen, wie sie bereits für andere Pathogene beschrieben wurde [29; 30; 31].

### **B.1.2 Kapsel-Polysaccharid-Biosynthese-Lokus**

Das Penner-Serotypisierungsverfahren wird weltweit seit nahezu zwei Jahrzehnten dazu benutzt, *C. jejuni*-Stämme zu typisieren und in epidemiologische Zusammenhänge zu bringen [32]. Die dabei reagierenden hitzestabilen (HS- oder O-) Antigene wurden lange Zeit als übereinstimmend mit Strukturvariationen der Lipopolysaccharide (LPS) erachtet [33]. Im Jahre 1996 lag dann erstmals ein von Chart et al. gegebener und nicht viel beachteter Hinweis auf das Vorhandensein von Kapsel-Polysacchariden (KPS) in *C. jejuni* vor [34]. Seine Vermutung, bei den HS-Antigenen handele es sich nicht um langkettige LPS, sondern um KPS, wurde erst im Jahre 2000 von Karlyshev et al. [35] wieder aufgegriffen und bestätigt. Durch Sequenzabgleich mit anderen Bakterienspezies konnte diese Arbeitsgruppe ein den *Escherichia (E.) coli kps*-Genen ähnliches Gencluster in NCTC11168 identifizieren. Dessen Beteiligung an der Synthese hochmolekularer Polysaccharide konnte durch Ausschalten von drei Genen dieses Clusters mittels Insertionsmutagenese bestätigt werden. Betreffende Stämme waren nach der Mutagenisierung nicht mehr in der Lage, entsprechende Polysaccharide zu produzieren. Die Arbeitsgruppe konnte außerdem durch Phospholipase-Behandlung der extrahierten Kapsel-ähnlichen Polysaccharide nachweisen, dass diesen anstelle eines Lipid A-Moleküls ein Phospholipid eigen ist. Diese Phospholipide sind

charakteristisch für KPS, während hingegen Lipid A-Gruppen typischerweise Bestandteile von LPS sind. Den Beweis dafür, dass es diese KPS sind, welche die Penner-Serovar determinieren, lieferte die Tatsache, dass die mutagenisierten und zur Biosynthese hochmolekularer Polysaccharide nicht mehr fähigen Stämme häufig einen Wechsel der Serovar anzeigten und mit dem Penner-System nicht mehr typisierbar waren. Im Gegensatz dazu behielten Mutanten mit veränderter LOS-Struktur ihre ursprüngliche Serovar bei [35]. Die Bestimmung der Penner-Serovar durch Kapsel-Antigene konnte kurze Zeit später von der Arbeitsgruppe um Dorell (2002) bestätigt werden, die mit Hilfe der Mikroarray-Technik die Konservierung aller Gene des KPS-Biosynthese-Lokus in *C. jejuni*-Stämmen derselben Serovar nachweisen konnten. In Stämmen mit unterschiedlicher Serovar dagegen wiesen mehrere dieser Gene (5-17) deutliche Sequenzunterschiede auf oder aber konnten gar nicht detektiert werden [7]. Die sehr unterschiedlich aufgebauten KPS-Genlozi der *C. jejuni*-Stämme NCTC11168 und NCTC12517 sind in der nachfolgenden Abbildung 1 dargestellt.

**Abb. 1: KPS-Genlozi von *C. jejuni* NCTC11168 (O:2) und *C. jejuni* NCTC12517 (O:19)**  
(modifiziert nach [36])



Das *kps*-ähnliche Gencluster von *C. jejuni* NCTC11168 beherbergt eine 34 kb große zentrale und variable Biosynthese-Region, die von konservierten Genen für den Transport der Polysaccharide flankiert wird. Diese zentrale Region enthält mehrere phasenvariable Gene,

weshalb eine schnelle antigene Variation innerhalb der KPS wahrscheinlich ist. Weiterhin wird angenommen, dass es diese zentrale Region des *kps*-ähnlichen Genclusters ist, die in Stämmen mit unterschiedlichen Penner-Serotypen variiert und die deshalb ein geeignetes Gencluster für neuartige Genotypisierungsverfahren darstellen könnte [35].

Für Bakterien stellen KPS sowohl innerhalb als auch außerhalb des Wirtes eine wichtige „Schutzhülle“ dar. Die auf der Zelloberfläche lokalisierten, oftmals negativ geladenen Moleküle bieten erhöhten Schutz vor Phagozytose und, aufgrund ihrer wenig immunogenen Eigenschaften, auch vor der wirtsspezifischen Immunantwort [37]. Da es sich bei KPS um stark hydratisierte Moleküle handelt, können sie den Erreger während der Transmission und des Überlebens außerhalb des Wirtes vor der Austrocknung schützen [38]. Im Falle von *C. jejuni* konnte außerdem eine direkte Beteiligung des in den KPS-Transport involvierten *kpsM*-Gens am Virulenzgeschehen bewiesen werden. Durch Insertionsmutagenese hergestellte *kpsM*-defekte Stämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierte Adhäsions- und Invasionsraten in der Zellkultur (54 bzw. 11% des Wildtyp-Niveaus) sowie eine verminderte Virulenz im Tiermodell [39].

### **B.1.3 Allgemeines Protein-Glykosylierungs-System**

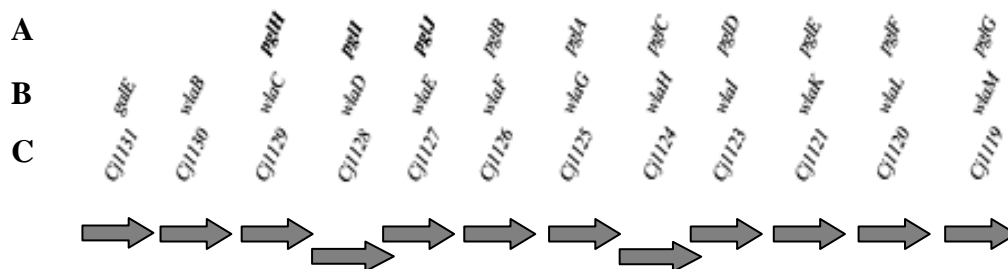
Die Fähigkeit zur Glykosylierung von Proteinen wurde bis vor kurzem noch als exklusiv für Eukaryonten erachtet. Seit einigen Jahren ist jedoch gesichert, dass auch Prokaryonten hierzu in der Lage sind [40; 41]. Als Beispiele für prokaryotische Glykoproteine sind die S-Layer-Proteine vieler Archaeobakterien und Gram-positiver Eubakterien, einige am Kohlenhydratabbau beteiligte Enzyme sowie Protein-Untereinheiten des Flagellums, der Pili und der Fimbrien zu nennen [42; 40]. Die biologische Funktion dieser Protein-Modifikationen wird sehr kontrovers diskutiert, wobei kürzlich veröffentlichte Studien von einer Rolle in der Adhäsion [43; 44; 45], Löslichkeit [46], antigenen Variation [47; 48; 49], protektiven Immunität [50; 51] und im Schutz vor Proteasen [52] berichten.

1999 wiesen Szymanski et al. erstmals auf einen Gen-Lokus in *C. jejuni* 81-176 hin, der scheinbar in die Biosynthese hoch immunogener Glykoproteine involviert ist. Die diesem Lokus zugeordneten und als *pglA-J* (**P**rotein-**G**lykosylierung) bezeichneten Gene weisen innerhalb von *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen einen hohen Grad an Konservierung auf und verfügen - im Gegensatz zu den Loci für die KPS-, LOS- und Flagellar-Biosynthese - nicht über homopolymere Sequenzen. Der Gen-Lokus kodiert für verschiedene Proteine mit hoher Aminosäure-Sequenzähnlichkeit zu an der bakteriellen LPS- und KPS-Biosynthese beteiligten Enzymen. Durch Mutagenisierung einzelner *pgl*-Gene konnte jedoch keine erkennbare

Beeinträchtigung der genannten Strukturen erzielt werden, dafür aber ein dramatischer Verlust der Immunreaktivität verschiedener, nicht näher identifizierter *C. jejuni*-Proteine und des Flagellins [53]. Mit Hilfe von Zellkultur- und Tierversuchen konnte dieselbe Arbeitsgruppe nachweisen, dass Insertionsmutagenese der Gene *pglB* und *pglE* in *C. jejuni* 81-176 mit einer verminderten Adhärenz und Invasion in INT407-Zellen einhergeht und mit einem reduzierten Kolonisierungspotential im Mäusedarm verbunden ist [54]. Ähnliche Ergebnisse konnten durch Inaktivierung des *pglH*-Gens erzielt werden; auch solche Mutanten zeigten eine verminderte Anheftung an humane epitheliale Zellen und ein nur noch eingeschränktes Kolonisierungsvermögen von *C. jejuni* im Intestinaltrakt von Hühnern [55]. Unabhängig davon wurden in *C. jejuni* NCTC11828 (81116) [56; 57] und NCTC11168 [57] dem *pgl*-Gencluster von *C. jejuni* 81-176 ähnliche Loci gefunden (s. Abb. 2). Die dazugehörigen Gene wurden aufgrund ihrer vermuteten Beteiligung an der LPS-Biosynthese und der damit verbundenen Nomenklatur [58] als *wla* bezeichnet, wobei allerdings keine der beiden Arbeitsgruppen umfangreichere Untersuchungen bezüglich der Funktion dieser Gene vorgenommen hatte. Durchmusterung der Genomsequenz von NCTC11168 nach dem *pgl/wla* Gencluster ergab, dass dieser Stamm scheinbar über zwei unterschiedlich lokalisierte Protein-Glykosylierungs-Loci verfügt: den Flagellin-Modifikations-Lokus (s. B.1.4), der in die Glykosylierung der Flagellin-Untereinheit involviert ist und in Nachbarschaft zu den Strukturgenen *flaA* und *flaB* liegt, und den *pgl/wla*-Gen-Lokus, der an der Glykosylierung von Proteinen im allgemeinen (inkl. Flagellin) beteiligt ist [20; 59].

**Abb. 2: *pgl*-Genlocus in *C. jejuni* NCTC11828 (81116)**

(modifiziert nach [55])



**A** Genbezeichnung nach Szymanski et al., 1999 (inkl. Umbenennungen durch Karlyshev et al., 2004 [**fett**])

**B** vorherige Genbezeichnung nach Fry et al., 1998

**C** Genbezeichnung anhand der NCTC11168-Genomsequenz ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/C\\_jejuni/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_jejuni/))

Durch Mutagenisierung weiterer *pgl*-Gene konnten Linton et al. (2002) nachweisen, dass nunmehr mindestens 10 *pgl*-Gene an der Proteinglykosylierung in *C. jejuni* NCTC11168 beteiligt sind. Damit sind es bis dato nur noch zwei Gene (*wlaB* und *wlaJ*) der ursprünglich in die LPS-Biosynthese involviert geglaubten Gen-Region, deren Beteiligung an der Protein-Glykosylierung noch nicht vollständig geklärt ist [60]. *WlaJ* scheint für diesen Prozess allerdings nicht essentiell zu sein, da es in einigen *C. jejuni*-Stämmen nicht angetroffen wird. Die ABC-Transporter-Komponente *WlaB* hingegen ist möglicherweise für den Transport der glykosylierten Komponenten über die innere Membran verantwortlich [59].

Mit PEB3, CgpA und weiteren >30 Proteinen konnte mittlerweile eine Vielzahl von N-Acetylgalaktosamin-assoziierten Komponenten im Stamm NCTC11168 identifiziert werden, die alle dem allgemeinen Glykosylierungs-System von *C. jejuni* zugerechnet werden [60]; [61]. Ihre genaue Funktion, wie auch die der weiteren vorhandenen Glykoproteine, muß noch geklärt werden. Da die meisten von ihnen aber mit der Oberfläche des Erregers assoziiert sind oder aber sezerniert werden, lässt sich eine Rolle in der Interaktion mit Wirts- und Immunzellen vermuten. Sicher ist aber, dass das Protein-Glykosylierungs-System dieser Spezies in ihrem Umfang als bisher einzigartig bei Bakterien erachtet werden kann und wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der *Campylobacter*-Infektionen spielt.

#### **B.1.4 Flagellar-und LOS-Glykosylierungs-System**

N-azetyl-Neuraminsäure (NANA) ist ein seltener Bestandteil bakterieller Oberflächen-Polysaccharide und gilt als potentieller Virulenzfaktor. Zu den wenigen bekannten Beispielen gehören u.a. die Alpha-2-8-Polysialinsäure-Kapseln von *E. coli* K1 und Serogruppe B *N. meningitidis* sowie die sialinsäurehaltigen LOS-Strukturen von *N. meningitidis*. Die Sialylierung dieser Strukturen geht jeweils einher mit einer verminderten Immunogenität und erhöhter Resistenz gegen die Komplement-vermittelte Lyse und Phagozytose [62; 63] und wird durch sog. *neu*-Gene reguliert [64]. Vor Veröffentlichung der Genomsequenz war aufgrund von Strukturanalysen lediglich bekannt, dass viele *C. jejuni*-Stämme mit NANA-assoziierte LOS produzieren können [65]. Später konnten Linton et al. [66] durch Sequenzabgleich drei Gene in NCTC11168 identifizieren, die eine signifikante Ähnlichkeit zu den *neu*-Genen von *E. coli* und *N. meningitidis* zeigen. Von den als *neuB1-neuB3* designierten Genen weist lediglich das im LOS-Biosynthese-Lokus positionierte *neuB1* eine hohe NANA-Synthetase-Aktivität auf, während *neuB2* und *neuB3* in die post-translationelle Modifikation des Flagellin-Proteins involviert zu sein scheinen. So sind beispielsweise durch

Insertionsmutagenese hergestellte *neuB3*-defekte Stämme nicht mehr motil und nicht flagelliert. Die Gene *neuB3* und *neuB2* liegen in Nachbarschaft zu den Flagellar-Strukturgenen *flaA* und *flaB* sowie zu einem dem *ptmB*-Gen von *C. coli* sehr ähnlichen ORF [66]. Bei *C. coli* kodiert dieses Gen für eine CMP-NANA-Synthetase und ist an der Sialylierung des Flagellums beteiligt [47; 50]. Linton et al. folgerten daraus, dass bei *C. jejuni* nicht nur die LOS sondern auch das Flagellin-Protein sialyliert wird [66]. Kurze Zeit später fanden dann Thibault et al. (2001), dass die glykosylierte Komponente des Flagellins nicht aus NANA sondern aus Pseudaminsäure und seinen Analoga besteht, die allerdings hohe Strukturähnlichkeit zueinander aufweisen. Als weitere an der Sialylierung beteiligte Gene sind *neuA1/A2* und *neuC1/C2* zu nennen, die ebenfalls im LOS-Biosynthese- bzw. im Flagellar-Glykosylierungs-Lokus anzutreffen sind und für die Enzyme N-azetylglukosamin-6-phosphatase und N-azylneuraminat Zytidylyltransferase kodieren [67].

Neben ihrer Rolle in der Immunabwehr [68] gilt die Beteiligung der sialylierten LOS an der Entstehung der Neuropathien Guillain-Barré- (GBS) und Miller-Fisher-Syndrom (MFS) als gesichert. Als Folge einer *C. jejuni*-Enteritis basieren diese mit akuten schlaffen Lähmungen einhergehenden Autoimmunerkrankungen auf der molekularen Mimikry zwischen *C. jejuni*-LOS und humanen Gangliosiden. Hierbei kommt es wahrscheinlich zu einer initialen Immunreaktion gegen die LOS, die sich anschließend im Rahmen einer Kreuzreaktion gegen Markscheiden-Antigene peripherer Nerven richtet [69; 70; 71]. GBS-Patienten mit vorheriger *C. jejuni*-Infektion weisen am häufigsten Antikörper gegen das Gangliosid GM<sub>1</sub> auf, das einen Sialinsäure-Rest trägt [72; 73; 74]. Das *C. jejuni*-Flagellarprotein ist mit einem etwa 10%igen Kohlenhydratanteil eines der am stärksten modifizierten Proteine, die man bisher in Bakterien identifiziert hat. Da sich die glykosylierten Komponenten in einer nach außen gerichteten Domäne befinden und außerdem variabel sind, ist eine Funktion in der Umgehung der Immunabwehr des Wirts durch antigene Variation wahrscheinlich [75].

### **B.1.5 DNS-Struktur motive**

Innerhalb der *C. jejuni* NCTC11168-Genomsequenz gibt es eine Reihe von Hinweisen auf besonders für Mutationen anfällige DNS-Regionen, sog. Hot Spots, die sich vor allem in den für die Oberflächenstrukturen kodierenden Bereichen konzentrieren. So weist das NCTC11168-Chromosom im Vergleich zu den Genomen anderer Proteobakterien zwar nur wenige globale, dafür aber eine Vielzahl lokaler Repeats auf, die etwa 15% des Gesamtgenoms ausmachen [76]. Die hohe Frequenz dieser lokalen Repeats ist - zumindest teilweise - als Reflektion des hohen AT-Gehalts des Genoms (69,4%) zu betrachten, da dieser



eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten gleicher Basen bewirkt. Zugleich ist sie aber auch indikativ für einen gegenüber anderen Proteobakterien erhöhten Level an Mutations- und Rekombinationsereignissen, die sich z.B. in Form von Replikations-induzierten Fehlern („slipped-strand mispairing“), quasi-palindromer Korrektur (imperfektes Palindrom wird zu einem perfekten hin verändert) und homologer Rekombination äußern können [77; 78].

Insbesondere die DNS-Regionen für die Modifikation und Synthese der LOS und Oberflächenpolysaccharide sind gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an palindromischen und repetitiven Sequenzen, eine verhältnismäßig niedrige Basenstapelenergie („Stacking energy“) und einen im Vergleich zum Genomdurchschnitt erhöhten AT-Gehalt. Da die meisten Mutationen an DNS-Einzelsträngen stattfinden, erhöht die mit einer niedrigen Basenstapelkraft verbundene schnellere Dissoziation die Wahrscheinlichkeit für solche Ereignisse [76]. Im Gegensatz zum Gesamtgenom weisen die für die Synthese und Modifikation des Flagellums kodierenden Regionen zusätzlich einen beträchtlichen Anteil globaler Repeats auf, wobei die beiden Strukturgene *flaA* und *flaB* tandemartig wiederholt sind und die zur Cj1318-Proteinfamilie gehörenden Gene (*maf1-7*) eine untereinander konservierte Domäne aufweisen [79; 80; 26]. Die erwähnten Eigenschaften lassen ebenfalls eine erhöhte Bereitschaft zu spontanem genetischen Austausch durch Rekombination und Mutation erwarten und stehen im Einklang mit der mehrfach beobachteten Variabilität in den Oberflächenstrukturen von *C. jejuni* [81; 65; 82].

Für die dem Erreger zugrunde liegende genetische Diversität scheinen die erwähnten DNS-Struktur motive also von großer Bedeutung zu sein und können zumindest teilweise als Erklärung für die schwach-klonale Populationsstruktur des Erregers herangezogen werden. Die Tatsache jedoch, dass das panmiktisch organisierte Bakterium *Helicobacter (H.) pylori* einen vergleichsweise geringeren Anteil lokaler Repeats aufweist [83; 84] spricht dafür, dass die zur DNS-Rekombination führenden Mechanismen weitaus komplexer sind und weitere, bisher nicht identifizierte Faktoren, diesbezüglich eine wichtige Rolle spielen.

## **B.2. Virulenzassoziierte Gene von *C. jejuni***

### **B.2.1 Klinische und pathogenetische Aspekte der *C. jejuni*-Infektion**

Trotz der hohen Infektionsrate und des teilweise schwerwiegenden klinischen Verlaufs sind die Pathogenese-Mechanismen der *C. jejuni*-Infektion bislang nur unzureichend geklärt. Die zahlenmäßig weitaus dominierende Durchfallerkrankung äußert sich nach einer Inkubationszeit von 1-7 Tagen in einer akut verlaufenden Enteritis, deren Prodromalstadium

durch Fieber, Übelkeit, Schwindel und heftige abdominale Krämpfe gekennzeichnet ist. Bald darauf kommt es zu starkem Durchfall, der entweder wässrig oder schleimig, teilweise auch blutig ist. Während das Fieber nach zwei Tagen wieder abnimmt, dauern die Durchfälle normalerweise 2-7 Tage an, in einzelnen Fällen auch bis zu 10 Tage [85]. Die Bakterien werden noch etwa 4, maximal 10 Wochen ausgeschieden und sind dann nicht mehr nachweisbar. Dauerausscheider sind nicht bekannt [86].

Neben der Enteritis führen *C. jejuni*-Infektionen in seltenen Fällen zu teilweise lebensbedrohlichen, extraintestinalen Komplikationen, so z.B. zu Septikämie, Meningitis, Karditis, Pankreatitis, Cholezystitis, Hepatitis sowie zum Hämolytisch-Urämischen-Syndrom [87]. Außerdem sind sie eine der ätiologischen Ursachen der sog. Reaktiven Arthritis [88], des Reiter-Syndroms - charakterisiert durch die Trias Arthritis, Urethritis und Konjunktivitis [89] - sowie des Guillain-Barré- (GBS) und des Miller-Fisher-Syndroms (MFS). Bei letzteren beiden handelt es sich um dramatische, meist postinfektionell auftretende Autoimmunerkrankungen des peripheren bzw. zentralen Nervensystems, die heutzutage, nach fast vollständiger Eradikation der Polio in den weitesten Teilen der Welt, die häufigste Ursache für akute schlaffe Lähmungen darstellen. *C. jejuni* wird dabei als wichtigster infektiöser Auslöser angegeben (ca. 30% der GBS-Fälle führt man auf eine Infektion mit diesem Keim zurück [90; 91]; die Dunkelziffer liegt wahrscheinlich aufgrund nicht diagnostizierter vorangegangener Enteritiden um einiges höher), wobei im Zusammenhang mit dem GBS überdurchschnittlich häufig die Serotypen O:19 und O:41 isoliert werden [92; 93; 94] und das MFS vorwiegend mit dem Serotyp O:2 assoziiert ist [95; 71; 91].

Wie viele andere Infektionserkrankungen wird auch die klinische Manifestation der *C. jejuni*-Infektion als multifaktorielles Geschehen angesehen, das u.a. vom Immunstatus des Wirts und der Expression von Virulenzfaktoren durch den Erreger abhängig ist. Da das Intestinum das natürliche Habitat von *C. jejuni* darstellt, muß das Bakterium nach seiner Ingestion zunächst in der Lage sein, die Schleimhaut des Darmes entgegen der Peristaltik zu kolonisieren. Voraussetzung hierfür ist die Motilität des Erregers [96; 97; 98] und ein direkter, über Membranproteine mit hoher Affinität zu Wirtszellrezeptoren vermittelter Kontakt zum Darmepithel [99; 100]. Nach erfolgreicher Kolonisierung kann *C. jejuni* die Darmschleimhaut durch verschiedene Mechanismen schädigen, so z.B. durch Invasion der Wirtszellen [101; 102], Produktion von Toxinen [103; 104] und Auslösung von Apoptose [102]. Einige Bakterien können das Epithel überwinden und in die darunterliegende Lamina propria und das Zirkulationssystem gelangen. Hier sind sie der Immunantwort des Wirts ausgesetzt, die sich z.B. in Phagozytose oder Freisetzung von Cytokinen äußert [105]. Die durch entzündliche

Läsionen irritierte Mukosa kann Eintrittspforte für weitere Bakterien sein, lockt andererseits aber auch vermehrt Phagozyten an, die der Invasion weiterer Erreger gegebenenfalls Einhalt bieten können [106].

**Tab. 1: Übersicht virulenzassoziierter Faktoren in *C. jejuni***

<b>Virulenzfaktor</b>	<b>Bedeutung in der Pathogenese</b>	<b>Verantwortliche Faktoren</b>	<b>Referenz</b>
<b>Beweglichkeit</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Flagellar-Apparat</li> <li>➤ Chemotaxis-System</li> </ul>	Motilität und gerichtete Fortbewegung des Erregers als Voraussetzung für eine erfolgreiche Kolonisierung des Darmepithels.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ FlaA/B</li> <li>➤ CheY</li> </ul>	<p>[80]</p> <p>[107]</p>
<b>Adhäsine</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Lipooligosaccharid-Komplex</li> <li>➤ Kapselpolysaccharid-Komplex</li> <li>➤ Flagellum</li> <li>➤ Äußere Membran-Proteine</li> </ul>	Anheftung an Zellen des Darmepithels. (*Beteiligung fraglich.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ CadF</li> <li>➤ PEB1</li> <li>➤ MOMP</li> <li>➤ LOS/JlpA</li> <li>➤ KpsM</li> <li>➤ PglB/PglE</li> <li>➤ Flagellum</li> <li>➤ Pili*</li> </ul>	<p>[99]</p> <p>[100]</p> <p>[108]</p> <p>[109; 110]</p> <p>[39]</p> <p>[54]</p> <p>[109]</p> <p>[111]</p>
<b>Invasine</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Virulenzplasmid</li> <li>➤ sezernierte Proteine</li> <li>➤ Flagellum</li> <li>➤ Kapselpolysaccharid-Komplex</li> <li>➤ Lipooligosaccharid-Komplex</li> <li>➤ allg. Protein-Glykosylierungs- System</li> </ul>	Penetration der epithelialen Mukosa.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ pVir</li> <li>➤ Cia</li> <li>➤ FlaA/B/C</li> <li>➤ KpsM</li> <li>➤ LOS</li> <li>➤ PglB/PglE</li> </ul>	<p>[112]</p> <p>[113; 114]</p> <p>[115; 116]</p> <p>[39]</p> <p>[25]</p> <p>[54]</p>
<b>Toxine und Zytotoxine</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ vakuolisierende Zytotoxine</li> <li>➤ Hauptprotein der äußeren Membran</li> <li>➤ Lipooligosaccharid-Komplex</li> </ul>	CdtABC: Blockierung des Zellzyklus, Vakuolisierung der Zielzellen. (Existenz <sup>(*)</sup> bzw. Funktion der übrigen Toxine noch weitestgehend ungeklärt.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ CdtABC</li> <li>➤ MOMP/LOS</li> <li>➤ CLRT*</li> <li>➤ Hämolytische Aktivität*</li> <li>➤ Hepatotoxische Aktivität*</li> <li>➤ Stx1*</li> </ul>	<p>[104]</p> <p>[117]</p> <p>[118]</p> <p>[119]</p> <p>[120]</p> <p>[121]</p>
<b>Eisenaquirierende Systeme</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Enterocholin-Transport-Sytem</li> <li>➤ Hämin-Transport-System</li> <li>➤ Siderophoren-Rezeptoren</li> <li>➤ ABC-Eisentransport-Systeme</li> </ul>	Entzug von Eisen aus wirtseigenen Komplexen. Beschleunigtes Wachstum und schnelle Vermehrung des Erregers.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fur</li> <li>➤ CeuBCDE</li> <li>➤ ChuABCD</li> <li>➤ CfrA</li> <li>➤ p19</li> <li>➤ Cj0178</li> </ul>	<p>[122]</p> <p>[123]</p> <p>[124]</p> <p>[125]</p> <p>[126]</p> <p>[127]</p>
<b>Anti-Wirtsabwehrsysteme</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hauptprotein der äußeren Membran</li> <li>➤ Kapselpolysaccharid-Komplex</li> <li>➤ Lipooligosaccharid-Komplex</li> </ul>	Schutz vor bakteriziden Wirkungen des Wirtes in der Blutbahn.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ MOMP</li> <li>➤ <i>kps</i>-Gencluster</li> <li>➤ LOS</li> </ul>	<p>[128]</p> <p>[39]</p> <p>[48]</p>

## B.2.2 Motilität

Das Flagellum ist ein zu kreisender bis schlagender Bewegung befähigter fadenförmiger Zellfortsatz, der verantwortlich für die außerordentlich hohe Motilität von *C. jejuni* ist und eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Erregers spielt. Hauptbestandteil des Flagellar-Apparates, an dessen Biosynthese und Funktion nahezu 50 Gene beteiligt sind [68], ist das Flagellin-Protein, dem immunodominante Eigenschaften während des Infektionsgeschehens [129; 130] und eine Rolle als protektives Antigen [131; 68] zugesprochen werden. Dieses Protein wird von den beiden Strukturgenen *flaA* und *flaB* kodiert, die tandemartig nacheinander auf dem Chromosom angeordnet sind und eine Sequenzähnlichkeit von > 93 % aufweisen [79; 80]. Die Flagellin-Gene werden von eigenen Promotoren reguliert, wobei *flaA* von dem klassischen Flagellin-Promotor  $\sigma^{28}$  und *flaB* von einem  $\sigma^{54}$  Promotor überwacht wird [79; 80; 132; 27]. Die Expression dieser Gene kann u.a. über den Mechanismus der Phasen-Variation gesteuert werden [133; 26], wobei in den nicht-motilen Varianten zwar das *flaB*-, nicht aber das *flaA*-Gen transkribiert wird [134; 27].

Experimente mit verschiedenen *C. jejuni*-Stämmen, in denen das *flaA*-Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde, zeigen, dass entsprechende Mutanten ein verkürztes Flagellum produzieren, welches in einem nicht beweglichen Phänotyp resultiert. Entsprechende Inaktivierung des *flaB*-Gens hat dagegen keine Auswirkungen auf die Motilität [135]. Ebenso zeigen *flaA*-defekte Mutanten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine stark verminderte Adhäsion und Invasion, während Inaktivierung des *flaB*-Gens in diesem Zusammenhang keine Beeinträchtigung zur Folge hat [136; 97; 98]. Da nicht direkt in die erwähnten Virulenzmechanismen involviert, scheint die Bedeutung des *flaB*-Gens in der Rolle eines Donors zu liegen, der Teile seiner genetischen Information auf das *flaA*-Gen überträgt und somit Mutationen kompensieren oder die antigenetische Vielfalt erhöhen kann [137; 138; 139]. Wassenaar et al. (1993/1995) konnten außerdem nachweisen, dass der Flagellin-Genlocus neben intragenomischen Rekombinationsereignissen auch durch horizontalen Gentransfer, also durch die Aufnahme exogener DNS-Moleküle, variiert werden kann. Diese DNS-Rearrangements finden nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* statt. So können beispielsweise nicht-motile *flaA*-Mutanten während der Kolonisierung des Hühnerdarms Rekombinationsereignissen unterliegen, die zur Wiederherstellung der Motilität und des Kolonisierungspotentials der Mutanten führen können [82].

Die vielfältigen Möglichkeiten zur Variierung des Flagellin-Genlocus durch intragenomische Rearrangements, horizontalen Gentransfer, Phasenvariation und die Fähigkeit zur post-translationalen Modifizierung des Flagellins durch Glykosylierung ermöglichen *C. jejuni*

demnach eine schnelle Anpassung an veränderte Milieubedingungen und sind in zahlreiche Mechanismen zur Umgehung der Wirtsimmunität involviert.

### B.2.3 Chemotaxis

Unter bakterieller Chemotaxis versteht man die Fähigkeit dieser Organismen, auf chemische Gradienten (Reizquellen) zu reagieren und sich entlang dieser gerichtet fortzubewegen. Wenn die Konzentration einer positiv eingestuften Substanz („Attractant“) steigt, schwimmen Bakterien statistisch bevorzugt in diese Richtung. Bei Abnahme der „Attractant“-Konzentration bzw. bei steigenden Konzentrationen abstoßender Substanzen („Repellants“), ändern sie dagegen ihre Schwimmrichtung [140]. Um eine solche Orientierung zu realisieren, müssen die Bakterien in der Lage sein, die Konzentrationen entsprechender Substanzen ständig zu messen, zwischenzuspeichern und im zeitlichen Verlauf vergleichen zu können. An allen drei Vorgängen sind wahrscheinlich spezifische Membranproteine, die **Methyl-Accepting-Chemotaxis-Proteine** (MCPs), beteiligt, deren Rezeptoraktivität auf das Aktivitätsmuster der teils löslichen, teils membranassoziierten zytoplasmatischen Che-Proteine einwirkt [141]. Die Che-Proteine wiederum beeinflussen direkt die Rotationsrichtung des Flagellarmotors [142].

In *C. jejuni* waren die molekularen Mechanismen chemotaktischer Vorgänge bis vor kurzem nur wenig verstanden. Marchant et al. (2002) nutzten die Veröffentlichung der Genomsequenz von NCTC11168 um Chemotaxis-assoziierte Gene zu identifizieren und ein vorläufiges Modell der Chemotaxis-Signaltransduktion für diese Spezies zu entwerfen. Das NCTC11168-Chromosom enthält sechs Chemotaxis- (*cheA*, *cheW*, *cheV*, *cheY*, *cheR* und *cheB*), zehn Chemorezeptor- und zwei Aerotaxis-Gene. Drei der Chemotaxis-Gene (*cheY*, *cheA* und *cheV*) kodieren für Polypeptide mit sogenannter **Response Regulator** (RR) - Domäne, wobei wahrscheinlich nur **CheY** (chemotaxis regulatory gene) mit dem Flagellar-Motor interagiert, um dessen Rotationsrichtung zu beeinflussen [143]. Von den beiden weiteren RR-Domänen **CheA** und **CheV** ist anzunehmen, dass sie der Deaktivierung von CheY durch Entfernung einer Phosphatgruppe dienen [144; 145]. CheA besitzt außerdem eine Kinase-Aktivität mit der Fähigkeit zur Autophosphorylierung und Übertragung der Phosphatgruppe auf CheY. Das Adaptor-Protein **CheW** ist essentiell für die Bildung des ternären Komplexes aus Chemorezeptor, Protein-Kinase und Adaptor-Protein [144] und wird für die rezeptorvermittelte Aktivierung von CheA benötigt [146]. Die als Methyltransferase bzw.-esterase fungierenden **CheR** und **CheB** dienen der Methylierung und Demethylierung sowie der Desaminierung von Glutamat-/Glutaminresten im zytoplasmatischen Anteil der

Chemorezeptoren. Auf diese Weise und durch die Bindung von Liganden wird deren Fähigkeit determiniert, die Autophosphorylierung von CheA zu stimulieren [147].

Die in *C. jejuni* NCTC11168 identifizierten Chemorezeptoren können aufgrund von Strukturähnlichkeiten in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, wobei bislang noch ungeklärt ist, ob diese allesamt an der flagellaren Chemotaxis beteiligt sind oder aber an anderen zellulären Prozessen teilnehmen. Die zur Gruppe A gehörenden **Tlp** (transducer-like protein) 1-4, Tlp7 und Tlp10 haben eine den MCPs von *E. coli* und den Familie A-Transducern in *Halobacterium (H.) salinarum* ähnliche Struktur. Da sie mehrere Transmembran-Domänen und eine periplasmatische Liganden-Bindestelle aufweisen, ist anzunehmen, dass sie extrazelluläre Stimuli erfassen und weiterleiten. Das zur Gruppe B gehörende Tlp9 wird von den beiden Aerotaxis-Genen *aer1* und *aer2* flankiert und ist wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung des Redox-Potentials in der Zelle mitverantwortlich. Die in der Gruppe C vereinigten Tlp5, 6 und 8 zeigen Strukturähnlichkeiten zu Familie C-Transducern von *H. salinarum* und sind an der Erkennung zyttoplasmatischer Signale und damit wahrscheinlich an der Weiterleitung wichtiger physiologischer Signale beteiligt [143].

Die Mechanismen der Chemotaxis sind bei *C. jejuni* unerlässlich für eine effektive Besiedlung des Darmepithels. So konnten Takata et al. (1992) im Tiermodell nachweisen, dass chemisch mutagenisierte, nicht-chemotaktische *C. jejuni*-Stämme nicht mehr in der Lage sind, das Intestinum zu kolonisieren [148]. In Zellkultur-Assays zeigen *cheY*-Mutanten eine etwa dreifach höhere Adhäsions- und Invasionsrate als der Wildtypstamm. Diese Mutanten sind jedoch im Tiermodell nicht in der Lage zu kolonisieren oder gar eine Krankheit auszulösen, wodurch erneut die Wichtigkeit der Motilität und Chemotaxis für das Überleben von *C. jejuni* *in vivo* bestätigt wird. Umgekehrt bewirkt Überexpression des *cheY*-Gens eine Abschwächung von Adhäsion und Invasion in der Zellkultur. Es wird daher vermutet, dass dieses Gen eine bisher nicht genauer charakterisierte Rolle in der Regulation der Expression von Virulenzgenen spielt [107]. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass *cheY*-Mutanten eine im Vergleich zum Wildtypstamm erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Cytokine in der Zellkultur induzieren. Die *cheY*-Überexpression dagegen ist mit einer stark verminderten Cytokin-Freisetzung gekoppelt [149].

#### **B.2.4 Eisen-Akquirierung**

Das Spurenelement Eisen ist, wie für nahezu alle lebenden Organismen, so auch für *C. jejuni* ein essentieller Nährstoff. Es dient u.a. als Co-Faktor für verschiedene Enzyme und als Katalysator in Elektronen-Transportprozessen. Im Wirtsgewebe ist die Verfügbarkeit von

nicht gebundenem Eisen allerdings sehr gering, da es hier meist in Komplexen mit Wirtsproteinen wie etwa Hämoglobin, Lactoferrin oder Transferrin vorliegt [122]. Angepaßt an diese nutritiven Restriktionen haben viele Mikroorganismen ein spezielles Eisen-Akquirierungs-System entwickelt. Dieses beinhaltet u.a. die Synthese und Sekretion hochspezifischer Chelatoren für Eisen-Ionen, sog. Siderophoren, die in der Lage sind, Eisen aus bestehenden Komplexen im Wirt herauszulösen. Die Eisen-Siderophor-Komplexe werden von den Bakterien über hoch-affine Transportsysteme aufgenommen und für den eigenen Bedarf genutzt [150]. Eine weitere Möglichkeit, Eisen aus wirtseigenen Komponenten zu verwerten besteht für einige pathogene Bakterien in der Expression spezieller Rezeptoren, mit denen Eisen-Komplexe des Wirtes gebunden und nachfolgend intrazytoplasmatisch verwertet werden können [151].

*C. jejuni* verfügt - wie die meisten gram-negativen Bakterien - über eine Vielzahl von Systemen zur Eisenaufnahme und -verwertung, von denen bisher allerdings nur einige näher charakterisiert worden sind. Hierzu gehören beispielsweise das **CeuBCDE**- und das **ChuABCD**-Gencluster für die Enterocholin- und Hämin-Aufnahme, eine an ein periplasmatisches Bindeprotein gekoppelte Komponente (**p19**) und die beiden Siderophoren-Rezeptoren **CfrA** und **Cj0178** mit akzessorischen Genen [152; 125; 126; 122]. Die NCTC11168-Genomsequenz gibt außerdem Hinweise auf das Vorhandensein fünf weiterer Gene mit Ähnlichkeit zu Eisen-bindenden Proteinen, auf zwei putative ABC-Eisentransport-Systeme und drei putative TonB/ExbB/ExbD-Komplexe, wobei letztere die für die Translokation von Eisen über die äußere Membran notwendige Energie bereitstellen [153].

Obwohl essentieller Nährstoff, birgt die Anwesenheit von Eisen in der Bakterienzelle andererseits die Gefahr der Schädigung der bakteriellen DNS, von Proteinen und Membranen, wenn sich Eisen in Anwesenheit von Sauerstoff zu Sauerstoffradikalen verbindet. Die Utilisierung dieses Metallions bedarf also einer fein regulierten Homöostase, die bei *C. jejuni*, wie auch bei anderen Gram-negativen Bakterien, generell der Kontrolle des **Fur**-Proteins (**ferric uptake regulator**) unterliegt. Als Antwort auf steigende Eisenkonzentrationen unterdrückt das vom *fur*-Gen kodierte Protein die Transkription Eisen-regulierter Promotoren, indem es an spezielle Kontrollsequenzen bindet, sog. Fur-Boxen. Umgekehrt kann in Eisenmangel-Situationen die Expression verschiedener Eisen-Transport-Systeme in Form von z.B. Siderophoren ebenfalls über Fur induziert werden, um die Eisen-Homöostase in der Zelle aufrechtzuerhalten [122]. Auf diese Weise wird die Transkription einer Vielzahl von *C. jejuni*-Proteinen reguliert, zu denen nicht nur Komponenten der Eisenakquirierung und -assimilation wie das CeuBCDE- und ChuABCD-Transport-System und der putative

Siderophoren-Rezeptor CfrA gehören, sondern beispielweise auch an der Flagellar-Biosynthese oder Protein-Glykosylierung beteiligte Faktoren. So konnten Palyada et al. (2004) nachweisen, dass unter Eisenmangel-Bedingungen kultivierte *C. jejuni*-Stämme einen weitaus höheren Grad an glykosylierten Proteinen aufweisen, als Stämme, die in einem eisenreichen Medium angezüchtet wurden. Während die biologische Funktion der Protein-Glykosylierung bei *C. jejuni* im Detail nicht bekannt ist, kann zumindest deren Beteiligung am Invasions- und Kolonisationsvermögen des Erregers als gesichert gelten [54]. Die Arbeitsgruppe um Palyada testete folglich die kolonisierenden Eigenschaften eines Fur-defekten *C. jejuni*-Stammes im Gastrointestinaltrakt von Hühnern, wobei eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte Besiedlungsrate für die Mutante nachgewiesen wurde. Diese ist möglicherweise auf den mit der Akkumulation des Metallions verbundenen oxidativen Stress zurückzuführen und/oder durch die Ausschaltung an der Kolonisierung von *C. jejuni* beteiligter Gene bedingt, die der Kontrolle des Fur-Proteins unterliegen. Ähnliche Auswirkungen konnten auch bei der Mutagenisierung der drei Eisen-Transport-Komponenten CfrA, CeuE und Cj0178 beobachtet werden, die ebenfalls mit deutlich reduzierten Kolonisierungsraten im Gastrointestinaltrakt von Hühnern einhergeht [127]. Diese Experimente demonstrieren erstmalig eine direkte Beteiligung der in die Eisen-Homöostase involvierten Gene am Infektionsgeschehen von *C. jejuni* und lassen vermuten, dass diese für die Virulenz des Erregers von ähnlich großer Bedeutung sind wie dies auch bei anderen Bakterienspezies der Fall ist [154; 155; 156]. Weiterhin ist davon auszugehen, dass innerhalb der vom Fur-Protein regulierten Gene wahrscheinlich eine Reihe weiterer Faktoren anzutreffen ist, die an verschiedenen Pathogenesemechanismen des Erregers beteiligt sind. Die Untersuchung entsprechender Kandidaten-Gene sowie die Identifizierung der den Kolonisierungseigenschaften zugrunde liegenden Faktoren können künftig einen bedeutenden Ansatz zur Klärung der Pathogenese von *C. jejuni* liefern.

### **B.2.5 Adhäsine**

Voraussetzung für die Etablierung einer *C. jejuni*-Enteritis ist u.a. die Fähigkeit des Erregers, sich an die Zellen des Darmepithels anzuheften und somit dem Fortspülen durch die Darmperistaltik und den Flüssigkeitsstrom zu entgehen. Die Adhäsion ist außerdem eine notwendige Voraussetzung für das Eindringen in die Wirtszellen, was wiederum mit einem Schutz des Erregers vor humoralen und zellulären Immunantworten verbunden ist [157]. *C. jejuni* kann an eine Vielzahl von Molekülen wie z.B. Fibronectin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin,



Phosphatidylglycerol, Sphingomyelin etc. binden [99; 158]. Als an der Bindung beteiligte Strukturen gelten die LPS/KPS, das Flagellum und verschiedene Proteine der äußeren Membran. Zu den letzteren gehört u.a. das von Fauchère et al. [159] beschriebene, zunächst als **CBF1** (**cell binding factor**) designierte Protein, das sich in einer späteren Studie als identisch mit dem von Pei und Blaser identifizierten **PEB1** zeigte. Das mit einem Molekulargewicht von 28 kDa kalkulierte PEB1 weist eine deutliche Ähnlichkeit zu periplasmatischen Bindeproteinen des ABC-Transportsystems Gram-negativer Bakterien auf [160]. Die Ausschaltung des kodierenden Gens *peb1A* durch Einführung einer Kanamycin-Resistenz-Kassette führt zu einer 50- bis 100-fach verminderten Adhärenz an epitheliale Zellen und einer Reduktion der Invasion um das 15-fache. Diese PEB1-Mutanten wiesen außerdem eine reduzierte Fähigkeit zur Kolonisation des Darmes von Mäusen auf [100].

Als weiteres Adhäsion der äußeren Membran konnten Konkel et al. (1997) ein 37 kDa großes Protein identifizieren, das spezifisch an Fibronectin, einer Komponente der extrazellulären Matrix von Säugetierzellen, bindet und deshalb von ihnen als **CadF** (*Campylobacter adhesion to fibronectin*) bezeichnet wurde. In der Zellkultur zeigen *cadF*-defekte *C. jejuni*-Stämme eine drei- bis sechsfach verminderte Aktivität bezüglich der Bindung an Fibronectin [99]. In einer von Ziprin et al. (1999) durchgeführten *in vivo*-Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass *cadF*-Mutanten nicht in der Lage sind, das Intestinum von Hühnern zu kolonisieren [161]. Das *cadF*-Gen ist in *C. jejuni* hoch konserviert und konnte bei 96% der untersuchten Stämme nachgewiesen werden [162].

Für das als Kationen-selektives Porin fungierende Hauptprotein der äußeren Membran (**Major Outer Membrane Protein, MOMP**) konnten Moser et al. (1997) eine Bindung an Membranpräparationen von INT 407-Zellen nachweisen. Während die Bindung von intakten *C. jejuni*-Bakterien mit dem nativ isolierten Protein teilweise inhibiert werden konnte, gelang dies mit dem denaturierten Protein nicht [108].

Als wichtigste antigenetische Determinanten auf der Zelloberfläche von gram-negativen Bakterien spielen **LPS** und **LOS** eine bedeutende Rolle in der Interaktion dieser Organismen mit ihrem Wirt bzw. der Umgebung. Diese Oberflächen-Polysaccharide sind nicht nur stark immunstimulatorisch und weisen ein breites Spektrum an endotoxischer Aktivität auf, sie werden auch als wichtiges Adhäsion für *C. jejuni* angesehen. Die Fähigkeit der LPS/LOS zur Bindung an INT407-Zellen und -Membranfraktionen ist bereits in älteren Studien beschrieben worden [109; 163], wobei allerdings ihre Spezifität bezüglich der Zielzellen bisher nicht näher bestimmt wurde. Eine Ausnahme bildet in dieser Hinsicht das von Jin et al. (2001) identifizierte und charakterisierte **JlpA** (**jejuni lipoprotein A**), für das eine spezifische

Bindung an das humane Hitze-Schock-Protein Hsp90 $\alpha$  in HEp-2-Zellen nachgewiesen werden konnte. Nach Bindung an dessen Rezeptor kann JlpA eine Signal-Transduktions-Kaskade initiieren, bei der es zur Aktivierung von NF-kB und der p38-MAP-Kinase kommt. Sowohl NF-kB, ein eukaryotischer Transkriptionsfaktor, als auch die p38-MAP-Kinase spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion und Regulation pro-inflammatorischer Prozesse. Mutanten, in denen das *jlpA*-Gen durch Deletion oder Insertion ausgeschaltet wurde, zeigen eine im Vergleich zum Wildtyp bis zu 19% reduzierte Adhäsion an epitheliale HEp-2-Zellen, die dosisabhängig mit der Präinkubation des Bakteriums mit Anti-GST-JlpA-Antikörpern oder der HEp-2-Zellen mit JlpA-Protein variiert [110].

Aufgrund der Tatsache, dass aflagelläre Mutanten wesentlich geringere Adhäsionsraten aufweisen [164] und für gereinigte Flagellar-Präparationen eine Bindeaktivität an INT407-Zellmembran-Fraktionen nachgewiesen werden konnte [109; 163] wird das **Flagellum** von vielen Autoren ebenfalls als putatives Adhäsion angeführt. Da allerdings gegen das Flagellum gerichtete Antikörper die Anheftung von *C. jejuni* an INT407-Zellen nicht beeinträchtigt [136], wird andererseits vermutet, dass es v.a. die durch den Flagellarapparat bewirkte Motilität ist, die zu einer optimalen Adhärenz und Invasion beiträgt und das Flagellum selbst keine spezifischen Bindestellen trägt. Diese Motilität im Zusammenhang mit chemotaktischen Signalen erlaubt es dem Erreger, die Schleimhautschicht zu durchdringen und bestimmte Wirts-Zell-Rezeptoren aufzufinden, die an der Kolonisierung und Invasion an und in die intestinale Schleimhaut beteiligt sind. Das Flagellum ist also zumindest indirekt an den Adhäsionsmechanismen von *C. jejuni* beteiligt.

Bei Kultivierung in gallensalzhaltigen Nährmedien wird in verschiedenen *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen die Synthese von fimbrienartigen Strukturen induziert, sogenannten **Pili**. Um deren Rolle während des Adhäsionsgeschehens zu überprüfen, stellten Doig et al. (1996) entsprechende Nullmutanten her und testeten diese sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Eine Beteiligung der Pili an der Bindung an oder Internalisierung in INT407 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden und auch im Tiermodell erwiesen sie sich als nicht notwendig für die Kolonisierung des Darmepithels. Die mit der Mutante infizierten Frettchen zeigten allerdings weniger ausgeprägte Krankheitssymptome als dies nach Infektion mit dem Wildtyp-Stamm der Fall war. Die Pili könnten daher eine bisher nicht näher definierte Rolle in anderen Pathogenese-Mechanismen spielen [111].

### B.2.6 Invasine

Die Fähigkeit zur Penetration der epithelialen Mukosa wird als wichtiger Prozess im Virulenzgeschehen verschiedener enteropathogener Bakterien beschrieben, da sie den Erregern erhebliche Vorteile wie u.a. Schutz vor Angriffen des Immunsystems, Teilschutz vor Antibiotika-Einwirkung, ein nährstoffreiches Habitat und die Möglichkeit zur Ausbreitung in tiefere Gewebe und zur Streuung in die Blutbahn bietet (zusammengefasst in:[165]). Die Zellinvasion wird durch bakterielle Invasionsproteine ausgelöst, die an Wirtszell-Rezeptoren binden. Die Invasin-Bindung an den Rezeptor induziert Signaltransduktions-Kaskaden, die in der Wirtszelle zur Umstrukturierung des Zytoskelettes und letztendlich zur Internalisierung des Erregers in ein endozytotisches Vesikel, ein Endosom oder Phagosom, führen. Die meisten der intensiv untersuchten invasiven Bakterienspezies betreiben einen Endozytosis-Prozess, der stark Mikrofilament (MF)-abhängig ist, was durch reduzierte Invasionsraten bei Anwesenheit der MF-depolymerisierenden Substanz Cytochalasin bestätigt wurde [166]. Im Falle von *C. jejuni* sprechen Berichte über das Auftreten von Bakteriämien während des Durchfallgeschehens [167] und der elektronenmikroskopische Nachweis des Erregers in epithelialen Zellen von Colitis-Patienten [101] dafür, dass zumindest ein Teil der Stämme in der Lage ist, eine invasive Form der Erkrankung im Intestinum auszulösen. Das invasive Potential der einzelnen Stämme ist allerdings sehr unterschiedlich ausgeprägt [168; 169; 170; 171; 172] und hängt außerdem von verschiedenen äußeren Faktoren, wie z.B. Inkubationstemperatur [170; 173] und Wachstumsphase der Bakterien [169; 170], verwendeter Zelllinie [174; 172] und Alter der Zellkultur [169] ab. Bisher wurden sowohl tierische [175; 176; 177; 102] als auch verschiedene humane Zelllinien zur Untersuchung des Invasionsvermögens von *C. jejuni* eingesetzt, wobei die höchsten Internalisierungsraten in Zellen humanen Ursprungs, v.a. INT407 und Caco-2, verzeichnet wurden [178; 174; 172; 169]. Unter optimalen Bedingungen liegt die Invasionseffizienz von *C. jejuni* bei 1-4% [169] und ist damit durchaus vergleichbar mit der von anderen invasiven Enteropathogenen wie *Salmonella* Typhimurium [179] oder der des *Yersinia inv*-Systems [180].

Als an der Internalisierung beteiligt gilt - zumindest im *C. jejuni*-Stamm 81-176 mit vergleichsweise hohen Invasionsraten - das 37 kb Plasmid **pVir**, das u.a. für mehrere Proteine mit deutlicher Übereinstimmung zu Komponenten eines Typ IV-Sekretionssystem von *H. pylori* kodiert. Die durch Insertionsmutagenese hervorgerufene Inaktivierung zweier dieser plasmidalen Gene - *virB10/comB3* und *virB11* - geht einher mit im Vergleich zum Wildtyp um etwa ein Drittel reduzierten Adhäsions- und Invasionsraten (*comB3*) bzw. 6-fach reduzierten Adhäsions- und 11-fach reduzierten Invasionsraten (*virB11*) in INT-407-Zellen. Im

Tiermodell konnten für die *virB11*-Mutante zudem deutlich herabgesetzte Infektionsraten bei Frettchen beobachtet werden. pVir beherbergt außerdem fünf weitere an der Invasion von *C. jejuni* beteiligte Gene (*Cjp02*, *Cjp15*, *Cjp29*, *Cjp32*, *Cjp49*), deren Mutagenisierung eine gegenüber dem Wildtyp 2-7 fache Reduktion des Invasionsvermögens bewirkt. Es handelt sich bei diesen wahrscheinlich um Effektorproteine des putativen Typ IV-Sekretionssystems [112]. Diese Experimente belegen zwar recht deutlich die Wichtigkeit dieses Plasmids im Invasionsgeschehen von *C. jejuni* 81-176, die Transformation des gesamten pVir-Plasmids in den wenig invasiven Stamm NCTC11168 hat allerdings keine nennenswert höheren Invasionsraten zur Folge. Es muß also davon ausgegangen werden, dass im Zusammenhang mit pVir weitere Faktoren für die Internalisierung benötigt werden, die offensichtlich nicht in allen Stämmen vorhanden sind. Auch die Tatsache, dass nur 6 von 58 untersuchten klinischen *C. jejuni*-Isolaten (10,3%) dieses Plasmid beherbergen [181], spricht dafür, dass sich die unterschiedlichen Stämme unterschiedlicher Virulenzmechanismen bedienen und dass das Invasionsvermögen des Erregers durch multiple Faktoren bestimmt wird.

Durch Immunoscreening einer genomischen DNS-Phagen-Bibliothek mit Antiserum gegen mit INT407-Zellen kokultivierten *C. jejuni* F3800 konnten Konkel et al. (1999c) die an der Invasion beteiligten **Cia-** (*Campylobacter* invasion antigens) Proteine nachweisen. Die Insertionsmutagenese des *ciaB*-Gens, das für ein 73,154 kDa Protein mit Ähnlichkeit zu Typ III-sezernierten Proteinen kodiert, bewirkt einen nicht invasiven Phänotyp mit allerdings im Vergleich zum Wildtyp gleichbleibenden Adhäsionsraten. CiaB wird nur während der Co-Kultivierung *C. jejunis* mit intestinalen Zellen sezerniert, wobei Synthese und Sekretion des Proteins nur durch Vorangehen bestimmter Stimuli erfolgt [114; 113]. Diese können experimentell durch Serum-Supplementierung der Gewebekultur imitiert werden, die tatsächliche Serumvariante ist allerdings bisher nicht identifiziert [182]. Die Sekretion der Cia-Proteine erfolgt - ähnlich wie die der Typ-III sezernierten **Flagellar outer proteins** (Fops) von *Yersinia* [183] - über den Flagellarapparat von *C. jejuni*, wobei für diesen Vorgang mindestens ein funktionelles Filament-Protein (FlaA oder FlaB) benötigt wird [115].

In *C. jejuni* TGH9011 konnte als weitere an der Invasion beteiligte Flagellar-Komponente das 26 kDa-Protein **FlaC** identifiziert werden, welches Sequenzähnlichkeit zu den N- und C-Termini von FlaA und FlaB aufweist, dem aber die zentrale Region dieser beiden Filament-Proteine fehlt. In Wildtyp-Kulturen wird FlaC hauptsächlich im extrazellulären Milieu als sezerniertes Protein angetroffen, dessen Ausschleusung über den Flagellar-Export-Apparat bzw. dessen Gene *flgE* und *flgF* bewerkstelligt wird. Während FlaC-Nullmutanten ein morphologisch völlig intaktes Flagellum ausbilden und hoch beweglich sind, zeigen sie

jedoch eine gegenüber dem Wildtyp bis zu 14% reduzierte Invasionsrate in HEp-2 Zellen [116].

Wie bereits an anderer Stelle beschrieben, so konnte auch für das am KPS-Transport beteiligte Gen *kpsM* (s. B.1.2) sowie für die in die Protein-Glykosylierung involvierten Gene *pgIB* und *pgIE* (s. B.1.3) eine Rolle im Invasionsgeschehen von *C. jejuni* nachgewiesen werden. Auch auf die mit der Phasenvariation des *cgtA* einhergehenden Strukturvariationen der LOS, die in einem Phänotyp mit höherer Invasionskapazität resultieren kann, wurde bereits vorher verwiesen (s. B.1.1).

Die Vielzahl an unterschiedlichen Stämmen und verwendeten Zelllinien, die bisher in Invasionsstudien eingesetzt wurden, lässt bis heute keinen endgültigen Schluß über die an der Internalisierung von *C. jejuni* beteiligten zytoskelettalen Strukturen der Wirtszellen zu. In dieser Hinsicht gibt es sowohl Angaben über die alleinige Beteiligung von Mikrofilamenten (MFs) [184; 185] oder Mikrotubuli (MTs) [169; 172] als auch das Ergebnis, dass keine der beiden Komponenten für diesen Vorgang benötigt wird [173]. In einer neueren Studie von Biswas et al. (2003) wird allerdings von einer Inhibierung der Invasionsfähigkeit von *C. jejuni* berichtet, die sowohl durch MF- als auch durch MT-depolymerisierende Substanzen ausgelöst werden kann. Die Untersucher gehen folglich davon aus, dass der Erreger durch gleichzeitige Polymerisierung und Akkumulation von Aktin und Tubulin in die Zelle aufgenommen wird [186].

Die Angaben bezüglich der invasiven Eigenschaften von *C. jejuni* sind teilweise noch widersprüchlich, was u.a. auf die nicht einheitlichen Untersuchungsmethoden und die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien zurückzuführen ist. Sie sind jedoch auch das Resultat der unterschiedlichen Mechanismen, derer sich die einzelnen Stämme bedienen, um die epitheliale Mukosa zu penetrieren. So wird beispielsweise das an der Invasion beteiligte Plasmid pVir nur in einem geringen Teil der untersuchten Stämme angetroffen [181; 187] und die Fähigkeit zur phasenvariablen Expression der LOS ist in den einzelnen Stämmen unterschiedlich ausgeprägt [25]. Diese Umstände sowie die Tatsache, dass ein allgemeingültiger Mechanismus bisher nicht identifiziert wurde, erschweren die Erstellung eines aussagekräftigen Pathogenese-Modells und spiegeln die in vielen Untersuchungen beobachtete, sehr variable Invasionskapazität von *C. jejuni* wider.

## **B.2.7 Toxinproduktion**

### **B.2.7.1 Enterotoxine**

Bei Enterotoxinen handelt es sich um sezernierte Proteine, die nach ihrer Bindung an zelluläre Rezeptoren in Darmzellen eindringen und u.a. zum Anstieg des intrazellulären cAMP- (zyklisches Adenosinmonophosphat) Spiegels führen können. Dies führt zu einer Veränderung des luminalen Ionen-Flusses mit daraus resultierender exzessiver Flüssigkeitssekretion, was letztendlich das klinische Bild des wäßrigen Durchfall hervorruft. Die Prototypen dieser Art von Toxinen sind das *Vibrio cholerae*-Toxin (CT) und dessen nahe verwandtes *E. coli* Hitze-labiles Toxin (LT).

Da das klinische Bild einer *C. jejuni*-Infektion häufig mit wäßrigem Durchfall assoziiert ist, kann vermutet werden, dass der Erreger in der Lage ist, ein dem CT-/LT-ähnliches Toxin zu bilden. In der Tat konnten verschiedene Arbeitsgruppen zumindest für einige *C. jejuni*-Stämme sowohl eine enterotoxische Aktivität [188; 189; 190; 191] als auch eine antigene Verwandtschaft des produzierten Toxins zu CT und LT nachweisen [192; 93; 188]. Die Validität dieser Ergebnisse wurde jedoch bald darauf in Frage gestellt, da eine Vielzahl weiterer Untersuchungen keinerlei Hinweise auf eine Enterotoxin-Produktion durch *C. jejuni* ergaben [194; 195; 196; 197]. Auch die Tatsache, dass bisher kein CT-/LT-ähnliches Gen detektiert werden konnte [198] und die Genomsequenz von *C. jejuni* NCTC11168 kein entsprechendes Gen beherbergt, lassen eine enterotoxische Aktivität dieses Bakteriums anzweifeln. Die Methoden und Ergebnisse dieser Studien variieren in so hohem Maße, dass bislang kein endgültiger Aufschluß über die Fähigkeit zur Enterotoxinbildung durch *C. jejuni* erbracht werden konnte. Dies wird künftig nur durch den Nachweis der enterotoxischen Aktivität des entsprechenden gereinigten Toxins oder aber die Identifizierung der für die Aktivität kodierenden Gene gelingen.

### **B.2.7.2 Zytotoxine**

Zytotoxine sind rezeptoraktivierende, membranschädigende oder intrazellulär wirkende Proteine, die entsprechende Zielzellen zerstören oder funktionell schädigen können. Der durch intrazellulär wirkende Zytotoxine bedingte Zelltod kann beispielsweise durch eine Störung der Ribosomen-Funktion und der damit verbundenen Inhibition der zellulären Proteinsynthese hervorgerufen werden. Bekannte Beispiele hierfür sind das *Shigella dysenteriae*-Toxin und das Diphtherie-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae* [199; 200]. Bei den über Membranschädigung der Wirtszellen wirksamen Zytotoxinen handelt es sich um enzymatische Toxine mit Phospholipase-Aktivität (Lecithinase von *Clostridium*

*perfringens*, Hämolysine verschiedener Pathogene) oder um porenbildende Toxine (Alpha-Toxin von *Staphylococcus (S.) aureus*, Streptolysin O von *Streptococcus pyogenes*), die zum enzymatischen Abbau der Plasmamembran bzw. zu massivem Wassereintritt und damit zum Anschwellen und Platzen der Zielzellen führen [201]. Zu den rezeptoraktivierenden Zytotoxinen gehören u.a. die Superantigen-Toxine, die in relativ unspezifischer Weise an MHC- und T-Zell-Rezeptoren binden und dadurch eine grosse Anzahl von T-Zellen zur Produktion von Cytokinen stimulieren (z.B. Toxisches Schock Syndrom Toxin, TSST-1, von *S. aureus*) [202].

Bei *C. jejuni* ist das cytolethale **distending Toxin (CDT)** das am besten charakterisierte und am häufigsten nachgewiesene Zytotoxin. Es wird von den drei benachbarten Genen *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* codiert, die innerhalb der Spezies einen hohen Grad an Konservierung aufweisen, während zu den entsprechenden Proteinen der nahe verwandten Spezies *C. coli* lediglich eine Ähnlichkeit von ca. 68% besteht [203; 204; 103]. Die toxische Aktivität von CDT führt zur Blockade der Zellteilung eukaryotischer Zellen in der G<sub>2</sub>- bzw. in der frühen M-Phase, wodurch es zum Stillstand des Zellzyklus kommt und die betroffenen Zellen zugrunde gehen. Als Rezeptor des Toxins dient möglicherweise die CDC2-Kinase, deren Aktivierung durch CDT unterdrückt und damit der Eintritt der Zellen in die Mitose-Phase verhindert wird [104]. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass das Toxin in einigen humanen Zelllinien zur Akkumulation des Tumor-Suppressor-Proteins p53 führt. P53 erkennt und bindet geschädigte DNS und induziert die Formierung eines Komplexes aus p21 und dem die Zellteilung stimulierenden Protein CDK2. Hierdurch kommt der Zellzyklus entweder vorübergehend zum Stillstand oder es werden apoptotische Prozesse eingeleitet. In Zellkultur-Tests mit verschiedenen humanen und tierischen Zelllinien äußert sich die toxische Aktivität von CDT in einer auffälligen Vergrößerung der Zellleiber und -kerne etwa 24 h nach Zugabe des Toxins. Während die CDT-behandelten Zellen weiter kontinuierlich anschwellen, setzen Disintegrations-Prozesse ein, die nach etwa vier Tagen zur Apoptose führen [104; 189].

Über die Rolle des CDT in der Pathophysiologie von *C. jejuni*-Infektionen kann aufgrund des Fehlens aussagekräftiger und vergleichbarer Tiermodelle nur spekuliert werden. Ausgehend von der Tatsache, dass in Zellkultur-Tests eingesetzte, humane intestinale Epithelzellen CDT-sensitiv sind, wird eine entsprechende Wirkung auch auf die intestinalen Kryptenzellen vermutet. Durch den damit verbundenen Verlust der Absorptionsfähigkeit dieser Zellen könnte das CDT zum klinischen Bild des wäßrigen Durchfalls beitragen [104]. Im dem bislang einzigen veröffentlichten Infektionsmodell mit immundefizienten Mäusen sind CDT-negative Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm in ihren intestinalen

Kolonisierungseigenschaften nicht beeinträchtigt. Die Mutanten zeigen jedoch eine verminderte Invasionsrate in die Blutbahn sowie in das Milz- und Lebergewebe, weshalb eine Mitbeteiligung des CDT an den Invasionsprozessen durch *C. jejuni* angenommen werden kann [205]. Das Toxin ist außerdem an der Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) beteiligt, welches die Ausbildung lokalisierter entzündlicher Prozesse vermittelt und damit zum klinischen Bild der Campylobacter-Enteritis beiträgt [206].

Die ubiquitäre Präsenz des *cdtABC*-Operons [207; 103; 204] sowie dessen toxische Wirkung auf verschiedene Zelllinien und Mitbeteiligung am Invasionsgeschehen lassen vermuten, dass es sich hierbei um das für den Pathogenesemechanismus von *C. jejuni* bedeutsamste Toxin handelt. Obwohl CDT die einzige im Genom von NCTC11168 nachgewiesene Toxin-Sequenz ist, konnte für verschiedene CDT-Insertionsmutanten eine zumindest geringfügige toxische Rest-Aktivität nachgewiesen werden [205]. Eine Vielzahl von Studien berichtet, allerdings ohne Angabe genetischer Daten, von weiteren Toxin-Aktivitäten in *C. jejuni*, wobei die Untersucher von einer Vereinheitlichung der Arbeitsmethoden weitestgehend absahen. Die Auswertung der Resultate ist durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, Kultivierungsbedingungen und Stämme dementsprechend erschwert und führte letztendlich dazu, dass nunmehr mindestens sechs verschiedene Zytotoxine in diesem Bakterium vermutet werden.

Hanel et al. (1998) berichten von einer neben der CDT-Komponente bestehenden Toxin-Aktivität, die sie aufgrund von Abrundung der betroffenen CHO-Zellen als **cytholethales rounding Toxin (CLRT)** bezeichneten. Lysate von CDT- und CLRT-produzierenden Stämmen verursachen in der Zellkultur eine Kombination aus aufgequollenen und abgerundeten Zellen. Die Arbeitsgruppe untersuchte eine Vielzahl von *Campylobacter*-Isolaten auf diese scheinbar unterschiedlichen Aktivitäten hin, konnte aber keinen Zusammenhang zwischen Toxin-Typ und der Herkunft der Stämme feststellen. Da die genannten Effekte denen anderer in *C. jejuni* beschriebener Toxine sehr ähneln, ist das CLRT möglicherweise identisch zu einer dieser Aktivitäten.

Zudem sind verschiedene *C. jejuni*-Stämme möglicherweise in der Lage, eine sowohl zell-assoziierte als auch sezernierte **hämolytische Aktivität** zu entwickeln [208; 209; 119; 210]. Die hämolytische Aktivität auf Blutagar-Platten wird nur bei einer Inkubationstemperatur von 42°C, nicht aber bei 37°C beobachtet, und wird nur mit fortschreitender Alterung der Kulturen entwickelt [208]. Da für *C. jejuni* bislang keine Hinweise auf das Vorhandensein von Hämolsin-ähnlichen Genen vorliegen, könnte die beobachtete hämolytische Aktivität demnach ebenso das Resultat der bereits beschriebenen zytotoxischen Aktivitäten oder aber



der oftmals beobachteten Metabolit-bedingten Lyse in der Kultur älterer Bakterienzellen sein. Bezüglich der sezernierten hämolytischen Aktivität finden sich Angaben über ein Zytotoxin, dessen hämolytischer Phänotyp in 27 von 60 *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen angetroffen wurde und der toxisch auf CHO-Zellen wirkt. Dieses Zytotoxin konnte von den Untersuchern mit Anti-Hämolyisin bzw. Zytolysin-Antitoxin von *Vibrio (V.) cholerae* neutralisiert werden, wobei allerdings kein Vergleich mit *V. cholerae*- Zytolysinen auf DNS-Ebene unternommen wurde [211].

Über eine **hepatotoxische Aktivität** in *C. jejuni* wurde bislang lediglich von der Arbeitsgruppe um Kita berichtet (1992). Diese Aktivität soll verantwortlich für Läsionen an Hepatozyten und einer damit verbundenen chronischen Leberstörung in Mäusen sein, die zuvor mit verschiedenen *C. jejuni*-Stämmen intragastral infiziert wurden. Das verantwortliche Toxin und seine Wirkungsweise wurden jedoch bisher nicht näher charakterisiert [120].

Im Lysat von 11 von 36 *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen konnten Moore et al. (1988) ein Zytotoxin identifizieren, dass sich mit **Shiga-Toxin 1** ( $stx_1$ )-Antikörpern von *E. coli* neutralisieren ließ. Neben dieser immunologischen Kreuzreaktivität konnten jedoch keine Ähnlichkeiten zwischen dem  $stx_1$ -Gen von *E. coli* und dem Genom dieser zytotoxischen *C. jejuni*-Stämme nachgewiesen werden [121]. Da auch die Genomsequenz von *C. jejuni* NCTC11168 keine signifikante Ähnlichkeit zu Shiga-Toxin-Sequenzen aufweist, muß die Anwesenheit dieses Toxins in einzelnen Stämmen künftig durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

Eine Vielzahl von Untersuchern berichtet außerdem über eine **zytotoxische Aktivität** von *C. jejuni* **auf verschiedene Zelllinien, darunter Vero-, HeLa-, CHO-, Hep-2- und INT407-Zellen** [212; 213; 214; 215; 117; 216; 217; 218; 219]. Die betroffenen Zellen reagierten nahezu einheitlich mit der Abrundung ihrer Zelleiber und darauffolgendem Absterben. Im Verlauf dieser Studien beobachtete Toxin-Titer variierten allerdings beträchtlich, wobei die für einzelne Toxine beobachtete Aktivität durch wiederholte Subkultivierung und Lagerung der Isolate sogar gänzlich verloren ging.

Die mit dem **Porin-Lipopolysaccharid-Komplex** assoziierte zytotoxische Aktivität konnte an HEp-2-Zellen demonstriert werden und äußert sich in der temporären Ausbildung von Vakuolen, dem Abrunden und anschließendem Absterben der betroffenen Zellen. Durch Sequenzanalyse der Proteinkomponente des Komplexes konnte diese als Major Outer Membrane Protein von *C. jejuni* identifiziert werden, das allerdings nur im Zusammenhang mit LPS seine toxische Aktivität entfaltet [117].

Diese teilweise widersprüchlichen und noch sehr unvollständigen Angaben hinsichtlich der Zytotoxin-Produktion in *C. jejuni* erfordern weitere Untersuchungen, in denen einheitliche Arbeitsmethoden zur Verwendung kommen sollten. Bislang kann lediglich die Existenz des CDT als gesichert und seine Beteiligung am Virulenzgeschehen des Erregers als wahrscheinlich gelten. Von den weiteren beschriebenen Toxinen muß dagegen angenommen werden, dass sie zumindest teilweise identisch sind, wofür auch die sehr ähnlichen Auswirkungen auf die verwendeten Zelllinien sprechen. In weiteren Arbeiten sollte daher die Herstellung von CDT-Mutanten der bisher in die Untersuchung zur Toxinproduktion einbezogenen *C. jejuni*-Stämmen berücksichtigt werden. Auf diese Weise könnte überprüft werden, ob die unterschiedlichen Aktivitäten nicht letztendlich doch auf das CDT zurückzuführen sind. Sollte dies nicht der Fall sein, so können künftig nur die Aufreinigung der entsprechenden Toxinkomponente und/oder die Identifizierung der DNS-Sequenz endgültigen Aufschluß über die tatsächlich vorhandene Zytotoxin-Produktion in *C. jejuni* geben.

### **B.3. Methoden zur Untersuchung der genetischen Diversität in *C. jejuni***

#### **B.3.1 Plastizität des *C. jejuni*-Genoms**

Die Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge von *C. jejuni*-Infektionen ist nicht nur aufgrund des sporadischen Auftretens der Erkrankung, der weiten Verbreitung des Erregers in der Natur und des Fehlens repräsentativer Populationsproben deutlich erschwert. Hierzu trägt im Wesentlichen auch die dem *C. jejuni*-Chromosom zugrundeliegende hohe genetische Diversität bei, die mit Hilfe unterschiedlichster Genotypisierungsverfahren (Übersichten in: [220; 221]) ermittelt wurde und dazu führte, dieser Spezies eine nur schwach klonale Populationsstruktur zuzuordnen [222].

Genetische Plastizität ist eine charakteristische Eigenschaft einer Vielzahl pathogener Bakterien und erleichtert deren Anpassung an veränderte Milieubedingungen und damit das Überleben in unterschiedlichen Wirten und Umgebungen. Während genetische Ereignisse wie horizontaler Gentransfer zwischen und innerhalb von Bakterienpopulationen (Übersichten in: [223; 224]) sowie intragenomische Rearrangements (Deletionen, Duplikationen, Punktmutationen etc.) zu dieser Diversität im Allgemeinen beitragen, sind die an der Plastizität des *C. jejuni*-Chromosoms beteiligten Mechanismen im Detail nicht bekannt. Der Interpretation neuerer Genotypisierungsverfahren wie der Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) nach generiert das Bakterium seine genetische Vielfalt durch hohe Raten an Intra- und Interspezies-Rekombination [11; 18], wobei noch nicht geklärt ist, ob diese allein für die

allelische Diversität oder auch für größere genomische Rearrangements verantwortlich sind. Obwohl *C. jejuni* ein relativ kleines Genom aufweist, das außerdem keine nennenswerte Anzahl an mobilen genetischen Elementen, repetitiven DNS-Sequenzen und paralogen Genfamilien beinhaltet, ist der Erreger in der Lage, sich an verschiedenste Umgebungsbedingungen anzupassen. Möglicherweise wird das Fehlen dieser oftmals an intragenomischen Rearrangements beteiligten Strukturen durch die Anwesenheit der sog. hypervariablen Regionen und die damit gegebene Fähigkeit der phasenvariablen Genexpression kompensiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass *C. jejuni* größtenteils von diesem Mechanismus abhängig ist, um seine Oberflächenstrukturen kontinuierlich abzuwandeln und damit dem Immunsystem des Wirtes entgegenzutreten [20].

Andererseits gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Untersuchern, die über das Vorkommen klonaler Linien in *C. jejuni* berichten, die oftmals mit einem bestimmten Serotyp [18; 225; 226] oder einer bestimmten Isolationsquelle [227; 228] assoziiert sind. Während die meisten dieser Studien sich mit Stämmen beschäftigen, die innerhalb eines nur kurzen Zeitraumes isoliert wurden, gibt es nur wenig Hinweise auf länger bestehende genetische Stabilität in *C. jejuni*. So konnten Manning et al. (2001) durch Anwendung des Amplifizierten Fragmentlängen-Polymorphismus (AFLP) feststellen, dass der weltweit vielfach eingesetzte Laborstamm NCTC11828 (O:6) für nahezu 20 Jahre genetisch stabil geblieben ist und immer noch außerordentlich hohe Identität zu Stämmen desselben Serotyps aufweist [10]. Das Auftreten und die Persistenz solcher klonaler Linien beruht möglicherweise auf dem Unvermögen entsprechender Stämme, exogene DNS aufzunehmen [229] oder aber ist eine Folge der Anpassung an eine bestimmte ökologische Nische [230].

**Tab. 2: Übersicht häufig eingesetzter Methoden zur Untersuchung genetischer Diversität in *C. jejuni*-Stämmen**

	DNS-Mikroarray-Technologie	Pulsfeld-Gelelektrophorese -PFGE-	Amplifizierter Fragmentlängen-Polymorphismus -AFLP-	Multilokus-Sequenztypisierung -MLST-	Single-Nukleotid-Polymorphismus -SNP-	Subtraktive Hybridisierung/ Repräsentative Differenzanalyse -SH/RDA-
Anwendung	Vergleich von Einzelstämmen; Erstellung von Genprofilen.	Konservative Typisierung; Kurzzeit- und lokale Epidemiologie.	Konservative Typisierung; Kurz- oder Langzeit-Epidemiologie.	Konservative Typisierung; Langzeit- oder globale Epidemiologie.	Konservative Typisierung; Langzeit- oder globale Epidemiologie.	Vergleich von Einzelstämmen; Identifizierung stammspezifischer DNS-Sequenzen.
Diskriminationskraft	-	Sehr hoch	Sehr hoch	Hoch	Hoch	-
Reproduzierbarkeit	-	Gut	Gut	Sehr gut	Sehr gut	-
Vorteile	Genetische Zusammensetzung eines Bakteriums wird in einem Schritt erfasst.	Relativ einfache Interpretation und Durchführung.	Relativ einfache Interpretation. Im Ggs. zur PFGE wird eine deutlich höhere Anzahl an Fragmenten generiert, wodurch es seltener zu Fehlinterpretationen kommt.	Relativ einfache Interpretation. Erhaltene Sequenzdaten können leicht verwaltet und transferiert werden (Aufbau von globalen Datenbanken).	Relativ einfache Interpretation und Verwaltung der erhaltenen Sequenzdaten. Im Ggs. zur MLST werden nur einzelne Nukleotide detektiert und ausgewertet.	Auch neue (bislang nicht identifizierte) DNS-Bereiche werden detektiert.
Nachteile	Genomische Rearrangements und neue (bislang nicht identifizierte) DNS-Bereiche können nicht detektiert werden; hohe Anschaffungskosten für benötigte Geräte.	Geringe Bandenanzahl kann zu Fehl- oder Überinterpretationen führen; eingeschränkte Portabilität der Ergebnisse.	Eingeschränkte Portabilität der Ergebnisse; hohe Anschaffungskosten für Sequenziergerät.	Es werden nur einzelne Bereiche (Gene) des Genoms reflektiert.	Es werden nur einzelne Bereiche (Gene) des Genoms reflektiert.	Lage der neu identifizierten DNS-Bereiche im Genom wird nicht erfasst; gezielte Identifikation best. Genbereiche ist nicht möglich.
Typisierbarkeit	Alle Stämme.	Einige Stämme können aufgrund methylierter Restriktionsschnittstellen nicht typisiert werden.	Einige Stämme können aufgrund methylierter Restriktionsschnittstellen nicht typisiert werden.	Alle Stämme.	Alle Stämme.	Alle Stämme.

### B.3.2 DNS-Mikroarray-Technologie

Im Zuge der stetig wachsenden Anzahl komplett entschlüsselter Genomsequenzen entwickelte sich die DNS-Mikroarray-Technologie, mit deren Hilfe die genetische Zusammensetzung eines Bakterienstammes in einem einzelnen Schritt erfasst werden kann. Hierzu werden alle Gen-spezifischen DNS-Sequenzen („Elemente“) eines Bakterienstammes mit bekannter Genomsequenz auf einer Matrix („Chip“) angeordnet, die dann wiederum simultan mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Zielsequenzen („Targets“) hybridisiert werden kann. Die Targets repräsentieren im Idealfall die Gesamtheit aller Gene des zu untersuchenden Bakterienstammes. Durch den Einsatz hochleistungsfähiger Bildanalyse- und Datenverarbeitungsverfahren werden die durch Hybridisierung auf dem DNS-Mikroarray erhaltenen Fluoreszenz-Signale ausgewertet. Die unterschiedliche Intensität dieser Signale gestattet Aussagen über das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Genen oder auch über Variabilitäten innerhalb eines Gens. Punktmutationen, kleinere Deletionen, genomische Rearrangements und zuvor nicht identifizierte Sequenzbereiche (die nicht auf dem Chip vorhanden sind) können mit dieser Technik allerdings nicht detektiert werden [231].

Die Arbeitsgruppe um Dorell untersuchte insgesamt 11 *C. jejuni*-Stämme unterschiedlicher Herkunft mithilfe der Gesamtgenom-Mikroarray-Technik und konnte so feststellen, dass von den 1.654 annotierten Genen des Stammes NCTC11168 etwa 1.300 (78,6%) in allen untersuchten Stämmen vorkommen und wahrscheinlich sog. „Core“-Gene darstellen. Erwartungsgemäß zählen hierzu überwiegend Gene mit „housekeeping“-Funktion, also Gene, die an metabolischen, biosynthetischen, zellulären und regulatorischen Prozessen beteiligt sind. Allerdings sind auch viele Virulenzdeterminanten und Oberflächenstrukturen von *C. jejuni*, wie z.B. das CDT-Toxin, CadF, CheY und verschiedene Flagellar-Struktur-Proteine, hoch konserviert. Mindestens 354 (21,4%) der bisher annotierten Gene von NCTC11168 aber scheinen innerhalb der Spezies variabel und teilweise sogar entbehrlich zu sein, da sie in mindestens einem der untersuchten Stämme stark abweichende DNS-Sequenzen aufweisen oder auch abwesend sind. Hierzu gehören vorwiegend die an der Biosynthese und Modifikation der Oberflächenstrukturen (Flagellum, LOS, KPS, EP) beteiligten Gene. Desweiteren konnte diese Arbeitsgruppe in mehreren Stämmen deutliche Sequenzunterschiede innerhalb der für die Eisen-Aquirierung und die DNS-Restriktion und -Modifikation verantwortlichen Gene nachweisen. Diese Faktoren sind oftmals an der Pathogenese und den verschiedensten Mechanismen beteiligt, die das Überleben und die Übertragung des Erregers sichern [7].

Ähnliche Ergebnisse konnten auch Pearson et al. (2003) und Poly et al. (2004) erzielen, die verschiedene Stämme im Mikroarray untersuchten und auf diese Weise mehrere Plastizitäts-Regionen (PR) innerhalb des *C. jejuni*-Genoms identifizieren konnten. Die Anordnung der variablen Genbereiche in größeren Clustern lässt vermuten, dass diese im Laufe der Evolution gruppenweise aufgenommen oder aber verloren gingen. Da es keine Assoziation dieser PR zu den oftmals in horizontalen Gentransfer involvierten mobilen genetischen Elementen gibt und ihr G/C-Gehalt nur unwesentliche Abweichungen zu den „Core“-Regionen des Genoms zeigt, spielt die natürliche Kompetenz *C. jejuni* zur Aufnahme exogener DNS wahrscheinlich die tragende Rolle bei der Generierung der genetischen Variabilität. Neben den Genen für die Synthese von Oberflächenstrukturen und für die posttranslationelle Glykosylierung und Sialylierung des Flagellums und der LOS, enthalten die PR außerdem DNS-Regionen, die für die Utilisierung alternativer Elektronen-Akzeptoren in der Zellatmung kodieren. Diese bergen möglicherweise einen Vorteil für entsprechende Stämme, in sauerstoffarmer Umgebung überleben zu können.

### **B.3.3 Makrorestriktionsanalyse/Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Mit dem Einsatz selten schneidender Restriktionsendonukleasen und der Auftrennung der verdauten DNS über die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wird eine Auftrennung bakterieller Genome in eine begrenzte Anzahl von DNS-Fragmenten möglich. Ausgehend von der Tatsache, dass bereits einzelne Nukleotidabweichungen in der Sequenzfolge eines Bakterienstammes dazu führen, dass neue Restriktionsschnittstellen entstehen oder aber entfallen, unterscheiden sich die untersuchten Bakterienstämme durch die Anzahl und Größe dieser Restriktionsfragmente [232].

Ausgezeichnet durch ein hohes diskriminatorisches Potential hat die PFGE in der vergangenen Zeit wesentlich zur Aufdeckung der genetischen Variabilität von *C. jejuni* und damit zum Verständnis der Genomorganisation des Erregers beigetragen. Engberg et al. (2001) untersuchten beispielsweise 58 mit Gastroenteritis und GBS assoziierte *C. jejuni*-Stämme unterschiedlichen Serotyps und unterschiedlicher geographischer Herkunft mittels PFGE und generierten dabei - in Abhängigkeit von der verwendeten Restriktionsendonuklease - bis zu 47 unterschiedliche Restriktionsprofile. Eine Assoziation der PFGE-Typen zu einem der beiden Krankheitsbilder, einem bestimmten Serotyp oder der Herkunft der Stämme konnte dabei allerdings nicht festgestellt werden [15]. Trotz der Tatsache, dass genetische Stabilität innerhalb eines Serotyps keine typische Eigenschaft von *C. jejuni* zu sein scheint, konnte mit Hilfe der Makrorestriktionsanalyse jedoch auch der Zusammenhang des

Auftretens von klonalen Linien in bestimmten Serotypen wie O:55 [226] und O:1 [233] erbracht werden.

De Boer et al. (2002) nutzten die Technik, um Rekombinationsereignisse zwischen natürlich kompetenten *C. jejuni*-Stämmen unter *in vivo*-Bedingungen nachzuweisen. Durch Vergleich der Restriktionsprofile ko-kultivierter *C. jejuni*-Stämme vor und nach der Passage durch das Huhn konnte diese Arbeitsgruppe erstmalig den bidirektionalen Austausch von DNS sowohl zwischen homologen als auch heterologen Stämmen in ihrem natürlichen Habitat nachweisen. Die Analyse alterierter Bandenmuster ergab außerdem, dass es neben dem horizontalen Gentransfer auch zu intragenomischen Rekombinationen kommt, die noch zusätzlich den bakteriellen Genotyp verändern und zur Diversität des Erregers beitragen. Da die beobachteten Rekombinationsereignisse offensichtlich auch unter neutralen Bedingungen stattfinden, ist die genetische Plastizität von *C. jejuni* vermutlich nicht nur auf Gene beschränkt, die funktionelle Diversität generieren und unter Selektionsdruck stehen (wie z.B. die Flagellin-Gene). Es muß vielmehr davon ausgegangen werden, dass - zumindest in einem Teil der Stämme - größere Bereiche des Genoms genetisch instabil sind und einem frequenten rekombinatorischen Austausch unterliegen [12].

#### **B.3.4 Amplifizierter Fragmentlängen-Polymorphismus (AFLP)**

Bei dieser ursprünglich zur Genotypisierung von Pflanzen entwickelten und erst kürzlich zur Typisierung von Bakterien adaptierten Methode wird die chromosomale DNS des zu untersuchenden Organismus mit Restriktionsendonukleasen verdaut und anschließend enzymespezifische Adaptoren an die verdauten DNS-Fragmente ligiert. Ein Teil dieser Fragmente wird anschließend mit adaptorspezifischen Primern in der PCR amplifiziert und die entstehenden Bandenmuster auf einem Gel analysiert. Die den untersuchten Stämmen zugrunde liegenden DNS-Polymorphismen können auf diese Weise erkannt und verglichen werden. Dabei wird - ähnlich wie bei der PFGE - die genetische Diversität des gesamten Genoms beleuchtet [234].

Wassenaar et al. (2000) untersuchten 11 mit dem GBS-Syndrom assoziierte *C. jejuni*-Stämme des Serotyps O:41, die sich - obwohl innerhalb eines Zeitraumes von 17 Jahren isoliert - in der AFLP-Analyse als genetisch identisch zeigten und sehr wahrscheinlich einer klonalen Linie angehören. [9]. Für den ebenfalls häufig in GBS involvierten Serotyp O:19 konnte mithilfe einer Reihe weiterer Typisierungsverfahren eine ebenfalls klonal organisierte Populationsstruktur nachgewiesen werden [92; 235]. Da sich die AFLP-Bandenmuster von O:19- oder O:41-Isolaten aus GBS-Patienten allerdings nicht von denen aus Patienten mit

lediglich gastrointestinaler Symptomatik unterscheiden, scheint die Manifestation der Erkrankung eher von Wirtsfaktoren abhängig als stammspezifisch zu sein. Weitere, sporadisch mit GBS assoziierte *C. jejuni*-Serotypen, wie z.B. O:1, O:2 und O:4 [91], verhalten sich dagegen genetisch eher heterogen. Dies wird auch in einer weiteren AFLP-Studie deutlich, in der unterschiedlichen Serotypen zugeordnete *C. jejuni*-Isolate aus Gastroenteritis- und GBS-Patienten untersucht und mit aus Geflügel isolierten Stämmen verglichen wurden. Während dieser Untersuchung zeichnete sich keine entsprechende klonale Linie ab, wobei jedoch einige der mit GBS assoziierten Stämme wiederum identische AFLP-Bandenmuster zu den aus Gastroenteritis-Patienten und Geflügel isolierten Stämmen aufwiesen [236].

Alter und Fehlhaber (2004) dagegen nutzten die AFLP-Technik um die Veränderung der Erregervielfalt während der verschiedenen Prozesse der Geflügelschlachtung und deren Einfluss im Hinblick auf die Verbreitung von *C. jejuni* in der Lebensmittelkette aufzuzeigen. Dabei konnten die Untersucher nachweisen, dass die Schlachtkörper zu Beginn des Schlachtprozesses mit einer Vielzahl unterschiedlicher *C. jejuni*-Stämme besiedelt sind, die sich in Form verschiedener AFLP-Bandenmuster ausdrückte. Die Stammvielfalt variierte jedoch während der einzelnen Schlachtposten, wobei nach dem Brühbad (zu Anfang des Schlachtprozesses) und auch nach der Luftkühlung (zum Ende des Vorgangs) nur noch wenige, eng verwandte Subtypen auffindbar waren. Zwischenzeitlich jedoch, also während der Entfederung und Eviszation, stieg die Anzahl *Campylobacter*-positiver Schlachtkörper und damit auch die Vielfalt unterschiedlicher AFLP-Genotypen. Für die am Ende der Schlachtung verbliebenen, eng verwandten Genotypen, konnte zudem eine hohe Ähnlichkeit zu humanen *C. jejuni*-Stämmen nachgewiesen werden. Diese Stämme verfügen möglicherweise über besondere Faktoren, die ihnen eine hohe Tenazität verleihen und mithilfe derer sie den unterschiedlichen Stressoren wie Brühbad und Kühlung - kombiniert mit Austrocknung - standhalten können [237].

### **B.3.5 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)**

Im Gegensatz zu der auf ähnlichem Prinzip basierenden Multilokus-Enzymelektrophorese (MLEE), die sich aus Gründen der schlechteren Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit als Genotypisierungsverfahren nicht durchsetzen konnte, gilt die MLST mittlerweile als "Goldstandard" für die konservative Typisierung von Bakterien sowie für globale und Langzeit-epidemiologische Untersuchungen. Statt der elektrophoretischen Auftrennung von Enzymen wird hierbei automatisiert die Nukleotidsequenz einer Reihe von Stoffwechselgenen bestimmt und durch den Nachweis signifikanter DNS-Sequenzunterschiede



Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Isolaten unterschiedlicher klonaler Linien aufgezeigt. Die untersuchten Isolate werden bestimmten Sequenztypen (ST) zugeordnet und Gruppen verwandter ST wiederum in klonale Linien zusammengefasst [238].

Suerbaum et al. (2001) unterzogen mehrere *C. jejuni*-Stämme mit unterschiedlichen Penner-Serotypen einer MLST-Analyse und konnten auf diese Weise zeigen, dass der Spezies insgesamt eine nur geringe Anzahl polymorpher Nukleotide, ein relativ begrenzter Pool an Allelen in den untersuchten „housekeeping“-Genen und hohe Raten an Intraspezies-Rekombination zugrunde liegen. Die Bedeutung der Intraspezies-Rekombination für die Generierung genetischer Diversität von *C. jejuni* wird noch dadurch unterstrichen, dass diese mit nahezu 50-fach höherer Wahrscheinlichkeit an Variationen einzelner Nukleotide beteiligt ist als dies für Punktmutationen der Fall ist [239]. Höhere Rekombinationsraten konnten bisher nur für die panmiktische Spezies *H. pylori* nachgewiesen werden [240]. Trotz der geringen Anzahl polymorpher Nukleotide in einzelnen Allelen konnten Suerbaum et al. eine Vielzahl unterschiedlicher Allel-Kombinationen beobachten, so dass für die insgesamt 33 untersuchten *C. jejuni*-Stämme 31 unterschiedliche ST definiert werden konnten. Die Untersucher vermuten, dass der Erreger erst kürzlich eine schnelle Ausdehnung erfahren hat, die möglicherweise durch die in den letzten ein bis zwei Jahrhunderten stattgefundenen Neuerungen in der lebensmittelliefernden Tierproduktion oder im Schlachtungsprozess angetrieben wurde. Eine solche Expansion von Klonen, die speziell dem Überleben in diesen Bereichen angepasst sind, könnte das Auftreten einer nur begrenzten Anzahl von Allelen und die geringe Sequenzdiversität erklären [11].

Weitere Studien, in denen entweder die MLST oder die MLEE angewendet wurde, bestätigen die nur schwach klonal organisierte Populationsstruktur von *C. jejuni* und die dem Erreger zugrunde liegenden hohen Raten an Intra- und Interspezies-Rekombination [19; 227; 239]. Im Gegensatz zu anderen *Campylobacter*-Spezies scheint *C. jejuni* viele der untersuchten Allele mit anderen Vertretern des Genus zu teilen, wobei größte Übereinstimmungen zu *C. coli* bestehen [222]. Wahrscheinlich aufgrund der Vielzahl der von ihnen einbezogenen Isolate (>1.000) konnte die Arbeitsgruppe um Dingle erstmals deutliche Assoziationen zwischen bestimmten ST-Komplexen und der Isolationsquelle oder dem Penner-Serotyp der untersuchten Stämme nachweisen. So konnten beispielweise 748 (92%) der von ihnen untersuchten *C. jejuni*-Stämme einem von 17 klonalen Komplexen zugeordnet werden, von denen wiederum sechs einen Großteil der Humanisolate beherbergten (318/63%). Für den offensichtlich weltweit am weitesten verbreiteten ST21-Komplex konnte eine Assoziation zu den Penner-Serotypen O:1 (25%), O:2 (33%) und O:4 (8%) bestätigt werden [19; 227].

### **B.3.6 Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP)**

Im Gegensatz zur MLST-Analyse, bei der die 500-700 bp große Nukleotidsequenz bestimmter Stoffwechselgene erfasst wird, um signifikante DNS-Sequenzunterschiede zu detektieren, liegen der Single-Nukleotid-Polymorphismus-Analyse lediglich einzelne Nukleotidvariationen (sog. „SNPS“) zugrunde. In der Humangenetik können diese SNPS bereits in einem hochautomatisierten Verfahren durch Anwendung von DNS-Chips schnell identifiziert werden. Dabei werden die die SNPS enthaltenen DNS-Regionen über eine PCR amplifiziert und durch anschließende Hitzedenaturierung zu einem Einzelstrang umgewandelt. Diese Einzelstrang-DNS wird hiernach auf einen speziellen Chip verbracht, der ebenfalls einzelsträngige DNS und eine Mikroschaltung enthält. Mithilfe spezieller Computer-Software können dann die spezifischen Polymorphismen abgelesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass die in bakteriellen Genomen stattfindenden Rekombinationsereignisse und damit auch das Auftreten von SNPS weniger kalkulierbar sind und die einzelnen Spezies zudem noch unterschiedliche Rekombinationsraten aufweisen, lässt sich das diskriminatorische Potential von SNP-Analysen bei Bakterien bislang nicht umfassend beurteilen. Bakterielle SNPS werden noch vorwiegend über den Abgleich mit MLST-Datenbanken identifiziert und über spezielle Computer-Programme ihrer statistischen Relevanz nach eingeteilt. Neben dem Einsatz der SNP-Analyse bei phylogenetischen Untersuchungen erhofft man sich hiermit zukünftig auch eine schnelle und eindeutige Diagnose bzw. Einteilung von Bakterien in bestimmte Varianten. Für einige Spezies, wie z.B. *Neisseria meningitidis*, konnten bereits SNP-Sets etabliert werden, die nunmehr als diagnostisches Werkzeug eingesetzt werden können [241]. Auch für *C. jejuni*-Isolate des weltweit sehr häufig anzutreffenden ST21-Komplexes besteht seit kurzem die Möglichkeit der Durchführung epidemiologischer Untersuchungen mittels SNP-Analyse [242].

### **B.3.7 Subtraktive Hybridisierung/Repräsentative Differenzanalyse (SH/RDA)**

Die Technik der Subtraktiven Hybridisierung/Repräsentativen Differenzanalyse ermöglicht die Identifizierung stammspezifischer DNS-Sequenzen in nahe verwandten oder auch innerhalb einer Bakterienspezies. Das Prinzip beruht auf der Hybridisierung zweier Gesamtgenome („Tester“ und „Driver“) gegeneinander und der anschließenden exponentiellen Amplifizierung der nicht hybridisierten Tester-DNS mittels PCR. Die erhaltenen Tester-spezifischen DNS-Fragmente werden kloniert und sequenzanalysiert [243].

Ahmed et al. (2002) wendeten die Technik an, um zwei *C. jejuni*-Stämme (NCTC11168 und NCTC11828) mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Kolonisierungspotential miteinander zu vergleichen und möglicherweise einige für die Kolonisierungseigenschaften von *C. jejuni* verantwortliche Gene zu identifizieren. Dabei gelang für den „Tester“-Stamm NCTC11828 die Generierung einer Reihe spezifischer DNS-Sequenzen mit Ähnlichkeit zu Genen, die u.a. an der DNS-Restriktions-Modifikation, an metabolischen Prozessen und an der Modifizierung von Oberflächenstrukturen (insbes. Flagellum) beteiligt sind. Des Weiteren konnten die detektierten Sequenzbereiche Genen zugeordnet werden, die für ein Phagen-Resistenz-Protein sowie für mehrere hypothetische Proteine und/oder Proteine mit unbekannter Funktion kodieren. Ein direkter Hinweis auf die den unterschiedlichen Kolonisierungseigenschaften zugrundeliegenden Faktoren konnte mit den identifizierten DNS-Sequenzen allerdings nicht erbracht werden [244]. Die Vielzahl der allein für den Stamm NCTC11828 identifizierten spezifischen DNS-Sequenzen lässt jedoch erahnen, dass mit der Genomsequenz des Stammes NCTC11168 noch lange nicht die gesamte Bandbreite an *C. jejuni*-Genen vorgegeben ist.