C. Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialen sind im Anhang aufgelistet (s. G.1)

C.1.2 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen

Alle verwendeten Nährmedien und Lösungen wurden, soweit möglich, autoklaviert oder sterilfiltriert, oder aus autoklavierten oder sterilfiltrierten Stammlösungen hergestellt. Die dazu benötigten Stammlösungen und deren Zusammensetzung sind im Anhang aufgeführt (s. G.2).

C.1.3 Oligonukleotid-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind den unter G.3 des Anhangs aufgelisteten Tabellen 10-14 zu entnehmen.

C.1.4 Verwendete Bakterienstämme

Alle verwendeten *C. jejuni*-Stämme sind in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *C. jejuni*-Stämme

Stammbezeichnung	Serovar	isoliert aus/Ort	Jahr der Isolierung	Referenz
NCTC11168	O:2	Mensch/Worcester (UK)	1977	CPHL, Colindale
NCTC11828	O:6	Mensch/Southhampton (UK)	1984	CPHL, Colindale
5042	O:2	Mensch/Berlin (D)	1984	diese Arbeit
BgVV1766	O:2	Mensch/Sachsen (D)	1996	diese Arbeit
ASH1805	O:2	Mensch/Schleswig-Holstein (D)	1996	diese Arbeit
Kassel 1595	O:2	Mensch/Kassel (D)	1996	diese Arbeit
Pb16	O:2	Mensch/Paderborn (D)	1998	[228]
H48	O:2	Hund/Berlin (D)	1998	[228]
K14	O:2	Katze/Berlin (D)	1998	[228]
Bi50	O:2	Katze/Berlin (D)	1998	[228]
BgVV1474	O:2	Huhn/Niedersachsen (D)	1999	[228]
E4 St.	O:2	Ente/Berlin (D)	1986	diese Arbeit
1187-I	O:2	Rind/Berlin (D)	1985	diese Arbeit

Die Referenzstämme NCTC11168 und NCTC11828 wurden bei der Culture Collection University of Göteburg (CCUG), Schweden, erworben und dienten der Evaluierung verschiedener genotypischer Tests.
Für die Klonierung subgenomischer *C. jejuni*-Sequenzen wurde der *E. coli* K12-Stamm TOP10 als Empfängerorganismus eingesetzt.

C.1.4.1 Anzucht der Bakterienstämme

Die Anzucht der *C. jejuni*-Stämme erfolgte auf Mueller-Hinton-Agarplatten, angereichert mit 5% defibriniertem Schafblut (MHB), für 48 h bei 39°C unter mikroaerophilen Bedingungen (5% O_2, 10% CO_2 und 85% N_2).
Die *E. coli*-Stämme wurden 24 h bei 37°C in LB-Medium angezogen. Bei den Klonierungsarbeiten wurden die rekombinanten Stämme unter Zusatz von 50 µg Ampicillin/ml Medium inkubiert.
Die Archivierung der Bakterienstämme erfolgte durch Kryokonservierung. Dabei wurden diese in Thioglykolat-Bouillion unter Zusatz von 15% Glycerin (Rotipuran®, Glycerol, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) in 1,8 ml-Portionen in Kryo-Röhrchen (Cryovial®, Roth GmbH & Co., Karlsruhe) bei -70°C verwahrt.

C.1.4.2 Bestimmung des Serotyps

Die Serotypisierung der in dieser Arbeit untersuchten *C. jejuni*-Stämme erfolgte in Anlehnung an die von Penner und Hennessy (1980) erarbeitete Methode [32]. Als Antisera gegen die formaldehyd-inaktivierten Bakterien wurden *C. jejuni*-Referenzstämme der Serotypen O:1, O:2, O:4, O:9, O:13, O:16, and O:43 (Penner) sowie die *C. jejuni*-Wildtyp-Stämme O:37 und O:40 verwendet [245].

C.2 Methoden

C.2.1 Isolierung und Reinigung von Desoxyribonukleinsäure (DNS)

C.2.1.1 Isolierung von Gesamt-DNS

Zur Gewinnung genomischer DNS wurde das Master Pure Genomic DNS Purification Kit (Epicentre/Biozym, Hessisch Oldendorf) entsprechend den Vorschriften des Herstellers verwendet.
Durch Zugabe eines Lysis-Puffers wird zunächst die Zellwand der Bakterien zerstört. Das im Puffer enthaltene EDTA wirkt als Chelatbildner und bindet zweiwertige Ionen (z.B. Ca^{2+}),

wodurch es zur Freisetzung der Lipopolysaccharide kommt. Die DNS kontaminierende RNS wird anschließend durch RNAse A degradiert und die Zugabe einer Präzipitations-Lösung sorgt für das Aussalzen der Proteine. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wird der Überstand bei Raumtemperatur mit Isopropanol inkubiert, wodurch die Hydrathülle der DNS verdrängt und so deren Pelletierung ermöglicht wird. Durch die Inkubation bei Raumtemperatur wird außerdem einer möglichen Kopräzipitation der DNS mit Salzen entgegengewirkt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wird das DNS-Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in der gewünschten Menge TE-Puffer oder A. bidest. aufgenommen.

C.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Gewinnung von Plasmid-DNS wurde laut Angaben der Hersteller mit dem „QIAwell 8 Ultra Plasmid Kit“ (Quiagen, Hilden) und dem „High Pure Plasmid Isolation Kit“ vorgenommen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [246] wird hierbei die episomale von der chromosomalen DNS getrennt und im Lysat vorhandene RNS durch eine RNAse aufgelöst. Durch die Gegenwart eines chaotropen Salzes bindet die Plasmid-DNS daraufhin selektiv an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen, wird durch mehrfaches Waschen und Zentrifugieren von kontaminierenden bakteriellen Komponenten befreit und schließlich mithilfe eines salzarmen Puffers eluiert.

C.2.1.3 Aufreinigung von DNS mittels Chloroform-Phenol-Extraktion

Aus wässrigen DNS-Lösungen können Proteine durch Chloroform-Phenol-Extraktion abgetrennt werden. Die Proteine werden dabei denaturiert, während die DNS gelöst in der wässrigen Phase verbleibt [247].

Zur Fällung der Proteine wurde 1 Vol. eines Gemisches aus TE-gesättigtem Phenol pH 7,8 und Chloroform (1:1) der DNS-haltigen Lösung hinzugegeben und der Ansatz kräftig durchmischt (vortexen). Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei RT und maximaler Umdrehungszahl (10.000 rpm) lagern sich vorhandene Proteine in einer Interbande zwischen der phenolischen Unterphase und der wässrigen, DNS-haltigen Oberphase ab. Der Überstand (Wasser-Phase) wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versehen. Der Ansatz wurde erneut kräftig gemischt und zentrifugiert (5 min, 10.000 rpm, RT). Dieser letzte Waschschritt wurde 2-3 Mal wiederholt. Anschließend wurde die DNS mittels Alkohol-Fällung aufkonzentriert.

C.2.1.4 Alkoholpräzipitation von DNS

Die Alkoholpräzipitation dient vor allem der Konzentrierung von DNS nach vorhergegangenen Reinigungsschritten wie z.B. der Phenol-Extraktion. Bei der alkoholischen Fällung werden auch Salze entfernt, die überwiegend in Lösung bleiben.

Bezogen auf das Volumen der DNS-haltigen Lösung wurde das 0,1-fache Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 zugesetzt, und mit dem 2,5-fachen Volumen eisgekühlten Isopropanols (96%ig) gemischt. Nach zweistündiger Inkubation bei -20°C wurde der Fällungsansatz zentrifugiert (10 min,10.000 rpm, 4° C), das die DNS enthaltene Pellet mit 2,0 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zu gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstands wurde das Pellet für 10-15 min luftgetrocknet, in der gewünschten Menge TE-Puffer oder A. bidest. resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

C.2.1.5 Reinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten

Zum Zwecke der Reinigung von PCR-Produkten (Herstellung von DNS-Sonden) und zur Umpufferung (z.B. Restriktionsansätze) wurden der „High Pure PCR Product Purification Kit“ und der „Agarose Gel DNA Extraction Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Protokolle verwendet. In Anwesenheit eines chaotropen Salzes bindet die DNS selektiv an eine Glasfaser- oder Silica-Matrix und wird anschließend durch eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten von noch vorhandenen Primern, Nukleotiden und Salzen gereinigt. Durch Zugabe eines Puffers mit niedriger Salzkonzentration kann die DNS anschließend wieder eluiert werden.

C.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die DNS-Menge wurde gelelektrophoretisch unter Verwendung von Standardmarkern abgeschätzt bzw. fluorometrisch bestimmt. Die mittels Fluorometer (DyNA Quant 2000, Hoefer, San Francisco, USA) durchgeführte Konzentrationsmessung beruht auf der Bindung des Fluoreszenz-Farbstoffs H 33258 (Hoechst, Hamburg) in die kleine Furche der DNS, wodurch eine Veränderung des Emissionsspektrums des Farbstoffs von 365 nm auf 458 nm bewirkt wird. Die DNS-Menge korreliert mit dem für das emitierte Licht gemessenen Wert, weshalb letzterer ein direkter Indikator für die DNS-Konzentration ist. Die vor jeder Nutzung durchgeführte Kalibrierung des Geräts erfolgte mittels Standard-DNS (100 ng/µl) und Nullwert.

C.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

C.2.2.1 Standard-PCR

Das Prinzip der PCR beruht auf der selektiven enzymatischen Vervielfältigung eines definierten Abschnitts in einem DNS-Molekül. Hierbei wird der ausgewählte DNS-Bereich unter zu Hilfenahme spezifischer Oligonukleotid-Primerpaare sowie der *Taq*-DNS-Polymerase *in vitro* exponentiell amplifiziert.

Die als Template-DNS (Matritzen-DNS) dienende, chromosomale DNS dissoziiert nach thermischer Denaturierung in zwei DNS-Einzelstränge, an deren komplementäre Abschnitte die beiden Primer bei entsprechenden Annealingtemperaturen binden. Bei der anschließend erfolgenden Elongation werden mithilfe der *Taq*-DNS-Polymerase neue Komplementärstränge synthetisiert, deren Länge exakt dem Abstand der beiden Primer zueinander entspricht. Jedes dieser Amplifikate dient im nachfolgenden Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wiederum als Matrizen-DNS, so daß letztendlich bis zu 2^{28} Kopien (bei 30 Zyklen) der ursprünglichen DNS synthetisiert werden [248].

Die PCR wurde im Allgemeinen in 25 µl-Ansätzen und unter Verwendung von „*Taq* DNA Polymerase“ (Invitrogen Corporation, Karlsruhe) durchgeführt. Ausnahmsweise wurde größere Ansätze (50 µl) gewählt (z.B. für die DNS-Sondenherstellung, PCR-RFLP-Fla-Typisierung) oder alternativ das Enyzm „Herculase“ (Stratagene, Kalifornien, USA) für die Amplifikation eingesetzt (z.B. Inverse PCR).

Tab. 4: Komponenten der PCR-Reaktion

Komponente	Konzentration	Endkonzentration	Volumen je Reaktion [µl]
10 x PCR-Puffer	10 x	1 x	2,5 (5)
$MgCl_2$	50 mM	1,5 mM	0,75 (1,5)
dNTP’s (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	jeweils 10 mM	jeweils 0,2 mM	0,5 (1)
Primer (forward/reversed)	jeweils 5 µM	jeweils 0,5 µM	2,5 (5)
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl	0,25 (0,5)
Template-DNS	5-20 ng/µl	25-100 ng	5 µl
A. bidest.	-	-	13,5 (32)
Gesamtvolumen			**25 (50)**

Der PCR-Ansatz wurde nach kurzem Vortexen anzentrifugiert und in den auf 94° C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Zusammenstellungen der verwendeten Primer und

Reaktionsbedingungen für die einzelnen Primerpaare befinden sich in den Tabellen 10-14 des Anhangs. Soweit nicht anders vermerkt, wurde zu Beginn jeder PCR-Reaktion ein initialer Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min durchgeführt. Im Anschluss an die aus 30-40 Zyklen bestehende DNS-Amplifikation erfolgte ein terminaler Elongationsschritt, der i.d.R. bei 72°C für 7 min durchgeführt wurde.
Die Anzahl und Größe der generierten Fragmente wurde anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese ermittelt.

C.2.2.2 Inverse PCR

Die von mehreren Arbeitsgruppen [249; 250; 251] entwickelte Methode der inversen PCR dient der Amplifikation unbekannter DNS-Sequenzen, die von DNS-Bereichen mit bekannter Sequenz flankiert sind. Hierzu wird eine entsprechende DNS-Probe zunächst mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten, die einzelnen Restriktionsfragmente anschließend durch intramolekulare Ligation rezirkularisiert und als Template in der PCR eingesetzt. Hierbei wird der unbekannte DNS-Bereich mithilfe zweier Oligonukleotid-Primer amplifiziert, die spezifisch und in entgegengesetzter Richtung an der bekannten DNS-Sequenz binden.

In Vorversuchen wurde zunächst die Größe der Restriktionsfragmente, die die bekannte DNS-Sequenz enthalten, über eine Hybridisierung unter Verwendung einer entsprechender Sonde ermittelt. Der Restriktionsenzymverdau wurde in einem 100 µl Ansatz mit 1 µg genomischer DNS und unter Verwendung verschiedener Restriktionsendonukleasen (z.B. *Xba*I, *Hind*III, *Pst*I) durchgeführt (s. C.2.3). Anschließend erfolgte die Aufreinigung der restringierten DNS mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und die Eluierung in 100 µl TE-Puffer. 5 - 20 ng der auf diese Weise gereinigten Restriktionsfragmente wurden in 20 µl Ansätzen unter Verwendung von 1/5 Vol. Ligationspuffer und 1 µl T_4-DNA-Ligase (400 U/µl; New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) religiert. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, wobei die erhöhte Ligationstemperatur sowie die niedrige DNS-Konzentration im Ansatz eine intramolekulare Ligation begünstigten. Da dieser Schritt kritisch ist, wurden variierende DNS-Mengen (5, 10 und 20 ng) eingesetzt. In der anschließenden PCR-Reaktion wurden jeweils 5 µl des entsprechenden Ligationsansatzes als Template-DNS in einem 50 µl-Ansatz und unter Verwendung des Enzyms „Herculase“ (Stratagene, Kalifornien, USA) eingesetzt, wobei das PCR-Protokoll entsprechend der Angaben des Herstellers angepasst wurde. Die Elongationszeit wurde anhand der Größe der gesuchten DNS-Amplifikate abgeleitet (1 min

pro 1 kb DNS) und die Annealing-Temperatur anhand der Primer gewählt (s. Tab. 12a und 12b des Anhangs). Zur Ermittlung und Identifizierung der Fragmentgrößen wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

C.2.2.3 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese [252] ist eine gebräuchliche und mit wenig Aufwand verbundene Methode zur Separierung und Identifizierung von DNS-Fragmenten. Die mit negativer Ladung behafteten DNS-Moleküle wandern im Agarose-Gel unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes zur positiv geladenen Elektrode der Elektrophoresekammer, wobei größere DNS-Moleküle hierfür eine entsprechend längere Zeit benötigen als die kleineren. Die auf diese Weise erhaltenen und in Abhängigkeit von Größenunterschieden entstandenen Bandenmuster wurden, nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid, mithilfe eines Transilluminators visualisiert und fotografisch festgehalten. Als DNS-Größenstandard wurde entweder ein 100 bp-, 1 kb- oder λ *Hind*III-Marker (Invitrogen Corporation, Karlsruhe) mitgeführt. Die im Rahmen der Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Reagenzien sind unter G.2.3.2 des Anhangs aufgeführt.

C.2.3 Restriktion von DNS

Zur Analyse von Plasmid- oder chromosomaler DNS wurden 1-2 µg DNS in einem 40 µl Ansatz verdaut. Die DNS-Lösung wurden mit 1/10 Vol. des entsprechenden Enzympuffers und 10-20 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzyms vermischt und anschließend mit A. bidest. auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 2-3 h bei der für das jeweilige Enzym vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Zur Analyse des Restriktionsenzymverdaus wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

C.2.3.1 Mikrorestriktion

C.2.3.1.1 Flagellin PCR-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (Fla-PCR-RFLP)

Die Mikrorestriktion beruht auf der Analyse des RFLP von PCR-Produkten (PCR-RFLP) und ermöglicht die Differenzierung bakterieller Isolate auf der Basis variabler Regionen innerhalb eines Genortes. Für die RFLP-Analyse des *fla*A- und *fla*B-Gens wurde die von Ayling et al. [253] entwickelte Methode angewendet. Hierbei kommen drei verschiedene Oligonukleotid-Primer zum Einsatz, von denen einer in der konservierten Region am 3'-Ende beider Gene und die beiden anderen an die variablen 5'-Enden beider Gene binden (s. Tab. 11a und 11b

des Anhangs). Das erhaltene Amplifikat mit einer Größe von 1490 bzw. 3394 bp wird anschließend mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut [253].
Die PCR wurde als 50 µl-Ansatz und unter den in Tabelle 2b des Anhangs aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Jeweils 10 µl der auf diese Weise generierten PCR-Produkte wurden mit 4 µl des entsprechenden Restriktionsenzympuffers, 20 Einheiten Enzym (*Alu*I und *Dde*I, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) und einer auf ein Gesamt-Volumen von 40 µl eingestellten Menge A. bidest. vermischt und der Ansatz für 2 h bei 37°C im Sandbad inkubiert. Zur Ermittlung und Identifizierung der Fragmentgrößen wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

C.2.3.2 Makrorestriktion

C.2.3.2.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Mit dem Einsatz selten schneidender Restriktionsendonukleasen und der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist ein Verdau des bakteriellen Gesamtgenoms in wenige große DNS-Fragmente möglich. Durch die Anwendung alternierend geschalteter elektrischer Felder in der PFGE [232] wird die Auftrennung von DNS-Molekülen einer Größe von mehr als 20 kb ermöglicht, die mit herkömmlichen Elektrophoreseverfahren nicht separiert werden können. Das in Abhängigkeit von der Größe und Anzahl der Fragmente entstehende Bandenmuster ist geeignet, die Unterscheidung von Einzelisolaten vorzunehmen.

C.2.3.2.2 Präparation chromosomaler DNS in Agaroseblöckchen

Zur Herstellung von DNS-Agaroseblöckchen wurde eine Öse Koloniematerial von einer beimpften MHB-Agarplatte entnommen und in 1,5 ml einer 150 mM NaCl-Lösung aufgenommen. Diese Bakteriensuspension wurde photometrisch auf eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 1,5 eingestellt, entnommene 1,5 ml in 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1,0 ml sowie nach erneuter Zentrifugation in 0,5 ml Kochsalzlösung resuspendiert. Zur Herstellung der Agaroseblöckchen wurden 500 µl der Bakteriensuspension und 700 µl einer 1,2%igen, auf ca. 56°C temperierten Agarose (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad, München) sorgfältig miteinander vermischt und entnommene 100 µl zügig unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen in die entsprechende Gießformen pipettiert. Die nach Abkühlung erstarrten Blöckchen wurden vorsichtig aus der

Gießschablone entfernt und jeweils in 500 µl ESP-Lösung mit 1,8 mg/ml Proteinase K (Roth GmbH & Co, Karlsruhe) bei 56° C für 48 h im Wasserbad inkubiert.

C.2.3.2.3 Restriktionsenendonuklease-Verdau von DNS in Agaroseblöckchen

Die in den Agaroseblöckchen freigesetzte DNS wurde für die nachfolgende Restriktion vorbereitet, indem jeweils zwei Agaroseblöckchen in je 14 ml TE-Puffer bei 4° C unter vorsichtigem Schwenken in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben für 90 min gewaschen wurden. Dieser Waschschritt wurde insgesamt zweimal wiederholt, die Blöckchen anschließend gedrittelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C in TE-Puffer gelagert. Für den DNS-Restriktionsenzymverdau wurde jeweils ein Drittel eines Gelblöckchens in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur 30 min in 600 µl Enzympuffer für *Bss*HII, *Eag*I oder *Sun*I inkubiert. Der Enzympuffer wurde anschließend verworfen und das gedrittelte Blöckchen nach erneuter Zugabe von 150 µl des entsprechenden Enzympuffers vermischt mit 20 Einheiten der Enzyme *Bss*HII, *Eag*I oder *Sun*I (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) über Nacht bei 37° C im Sandbad inkubiert.

C.2.3.2.4 Contour clamped homogeneous electric field-Pulsfeld-Gelelektrophorese (CHEF-PFGE)

Die verdauten Blöckchen wurden unter zu Hilfenahme eines Spatels in die Taschen eines 1,2%igen Agarose-Gels überführt und durch Überschichtung mit gelöster Agarose im Gel fixiert. Die elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNS-Fragmente wurde in einer Contour-clamped homogeneous-electric field (CHEF DR III; BioRad, München)-Kammer in 0,5 x TBE unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Laufzeit: 22 h; Temperatur: 14°C; Winkel: 120 °; Spannung: 6 V; Pulszeit: 15-40 sec. Die Visualisierung der DNS-Banden erfolgte durch 30-minütige Färbung in einer Ethidiumbromidlösung mit anschließender Wässerung in A. bidest. und Fotografieren des Gels unter UV-Licht (Transilluminator TI, Biometra, Wiesbaden; Photo-Kamera Polaroid MP4+ Instant Camera System). Die auf den Positionen der DNS-Banden basierende Verwandtschaftsanalyse wurde mit dem Computerprogramm Gelcompar®4.1 (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Belgien) unter Verwendung des Algorithmus nach Ward [254] und des Dice-Koeffizienten [255] durchgeführt. Dabei wurden für alle verwendeten Enzyme eine maximale Toleranz von 1,0% und eine Optimierung von 0,5% zugelassen. Als DNS-Größenstandard wurde der Lambda

Ladder PFG Marker der Firma New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, mitgeführt.

C.2.4 Desoxyribonukleinsäure (DNS-DNS)-Hybridisierung

Die Methodik der membrangebundenen DNS-DNS-Hybridisierung ermöglicht die Detektion und Quantifizierung spezifischer DNS-Bereiche. Während des Hybridisierungsvorganges bindet einzelsträngige markierte DNS (DNS-Sonde) unter geeigneten Bedingungen sequenzspezifisch an komplementäre Bereiche der denaturierten und membranfixierten Target-DNS. Die sich auf diese Weise formierenden DNS-DNS-Hybride können nach Entfernung der nicht gebundenen Sonde sichtbar gemacht werden.

C.2.4.1 Herstellung von Desoxyribonukleotidsonden

C.2.4.1.1 Markierung von Oligonukleotidsonden mit Digoxigenin (DIG)

Die für die Lokalisierung der virulenzassoziierten Gene auf den Makrorestriktionsfragmenten verwendeten DNS-Sonden wurden durch Einbau von Digoxigenin-11-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (DIG-11-dUTP) markiert. Sie wurden im Rahmen einer Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung des „PCR Product DIG probe synthesis Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) den Empfehlungen des Herstellers entsprechend hergestellt. Zum Nachweis des Markierungserfolges wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der das veränderte Laufverhalten des markierten gegenüber dem nicht markierten Amplifikat überprüft wurde. Die markierten Amplifikate wurden anschließend mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgereinigt und als DNS-Sonde in der Hybridisierung eingesetzt.

C.2.4.1.2 Markierung von chromosomaler DNS mit DIG

Die Markierung von Gesamt-DNS wurde unter zu Hilfenahme des „DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) vorgenommen. Hierfür wurden etwa 2 µg aufgereinigte chromosomale DNS und 2 µl Dig-Chem-Link Reagenz in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, der Ansatz mit Acila-Reagenzwasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 30 min bei 85°C inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 5 µl Stop-Lösung abgestoppt. Die markierte Gesamt-DNS wurde anschließend mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgereinigt und als DNS-Sonde in der Hybridisierung eingesetzt.

C.2.4.2 Southern-Blot

Für die Durchführung eines Southern-Blots wurden entsprechende Agarose-Gele zum Zwecke der Depurinisierung der DNS zunächst für 10 min in 0,25 M HCl-Lösung geschwenkt. In den darauffolgenden Schritten wurde das ebenfalls unter Schwenken gehaltene Gel zweimal 10 min in Denaturierungs- und anschließend zweimal 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Die Übertragung der DNS-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) erfolgte durch das Kapillar-Blot-Verfahren mit 20xSSC als Transferpuffer. Nach dem Trocknen der Membran wurde die transferierte DNS durch Inkubation für 30 min bei 120°C hitzefixiert und für weitere Arbeitsschritte in Aluminiumfolie eingepackt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

C.2.4.3 Dot-Blot

Für die Herstellung eines Dot-Blot wurden 3-5 µl bakterieller DNS in gereinigter Form (PCR-Produkt, 100-500 ng/µl) punktförmig auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgetropft. Nach Trocknung der Membran wurde diese zur Fixierung der DNS für 30 min bei 120°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

C.2.4.4 Hybridisierungsvorgang und Visualisierung

Der Hybridisierungsvorgang und dessen Visualisierung wurden leicht modifiziert nach den Herstellervorschriften des „DIG Luminescent Detection Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt.

Zum Nachweis der DNS-DNS-Hybride wurde der zellophanverhüllte DNS - Blot mit darunter plaziertem Röntgenfilm (X-O Mat AR, Kodak, Stuttgart) in einer Filmkassette für 1 - 2 h exponiert. Positive Hybridisierungssignale wurden anhand entsprechender Schwarzfärbung des Röntgenfilms identifiziert.

C.2.4.5 Entfernung der DNS-Sonden von Membranen (Stripping)

Zum Zwecke der Wiederverwendung bereits in der Hybridisierung eingesetzter Membranen, wurden diese zunächst für einige Minuten in A. bidest. gewaschen. Zur Entfernung der mit alkali-labilem DIG markierten DNS-Sonden erfolgte eine anschließende Inkubation mit

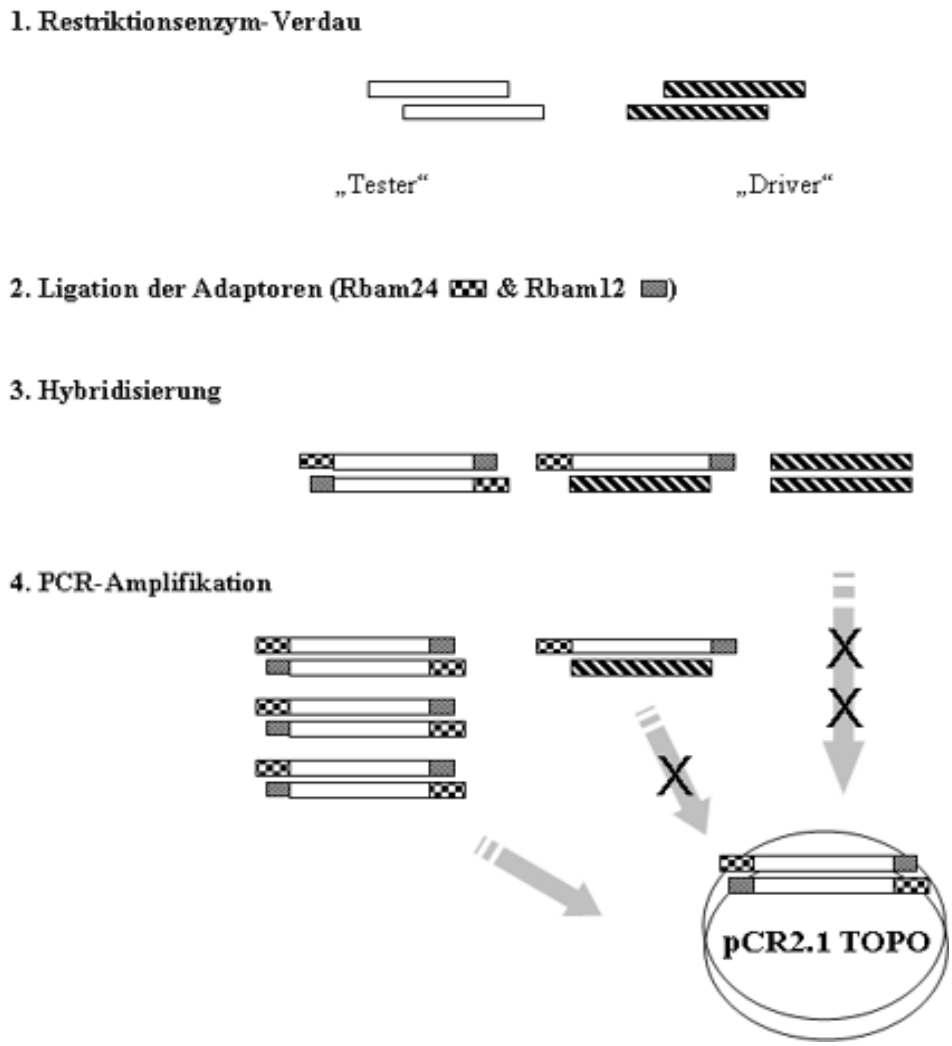
alkalischem Stripping-Puffer (2x15 min bei 37°C) und ein 5-minütiger Waschschritt mit 2xSSC-Lösung (bei RT) zur Fixierung der Target-DNS auf der Membran. Die während dieser Prozedur in Plastikschalen befindlichen Membranen wurden zwischenzeitlich mehrmals manuell geschwenkt und anschließend entweder direkt wiederverwendet oder folienverpackt bei Raumtemperatur gelagert. Sie konnten auf diese Weise 5-6 Mal mit verschiedenen DNS-Sonden inkubiert werden.

C.2.5 Repräsentative Differenzanalyse (RDA)

Die Repräsentative Differenzanalyse (RDA) ermöglicht die Identifizierung stammspezifischer DNS-Sequenzen in nahe verwandten oder gleichen Bakterienspezies. Das Prinzip dieser Methode - welches schematisch in Abbildung 3 dargestellt ist - beruht auf der Hybridisierung zweier Gesamtgenome („Tester“ und „Driver“) gegeneinander und der anschließenden Amplifizierung der nicht hybridisierten „Tester“-DNS mittels PCR [256]. Die Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, um das Genom von *C. jejuni* NCTC1168 („Driver“) von denen von *C. jejuni* NCTC11828, *C. jejuni* K14, *C. jejuni* 1187-I und *C. jejuni* K14 („Tester“) zu subtrahieren und „Tester“-spezifische DNS-Abschnitte exponentiell zu amplifizieren.

Abb. 3: Schematische Darstellung der Repräsentativen Differenzanalyse

(nach dem Restriktionsendonuklease-Verdau von „Tester“- und „Driver“-DNS mit der Restriktionsendonuklease *Sau*3AI (1) werden zu den Enden der Restriktionsfragmente komplementäre Adaptoren an die verdaute „Tester“-DNS ligiert (2). Die auf diese Weise mit Adaptoren versehene „Tester“-DNS wird anschließend gegen die „Driver“-DNS hybridisiert, wobei es zur Formierung von drei unterschiedlichen Hybrid-Molekülen kommt (3). Bei der nachfolgenden PCR mit Adaptor-spezifischen Primern werden nur diejenigen DNS-Hybride exponentiell amplifiziert, deren beider Einzelstränge Adaptoren aufweisen (=„Tester“-spezifische DNS). Für Hybrid-Moleküle, die nur an einem Einzelstrang oder aber an keinem der beiden Einzelstränge Adaptoren aufweisen, erfolgt hierbei lediglich eine lineare (X) bzw. keine (XX) Amplifikation (4). Die erhaltenen PCR-Amplifikate werden in Vorbereitung auf deren Sequenzanalyse in einen TOPO-Vektor kloniert).



C.2.5.1 Restriktionsenzymverdau mit Sau3AI

Für die RDA wurde die Restriktionsendonuklease *Sau*3AI (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) ausgewählt, die das *C. jejuni* NCTC11168-Genom in ca. 3550 Fragmente zerlegt. Das Enzym erzeugt durch versetzte Spaltung der beiden DNS-Doppelstränge kurze überhängende Einzelstrangabschnitte (kohäsive Enden). Der Ansatz für den Restriktionsenzymverdau setzte sich wie folgt zusammen:

Tester:	2,5 µl DNS (ca. 5 µg)	**Driver:**	10 µl DNS (ca. 10 µg)
	5,0 µl Carlos Puffer (10x)		10 µl Carlos Puffer (10x)
	5 µl DTT (10x)		10 µl DTT (10x)
	37,5 µl A. bidest.		70 µl A. bidest.
	1 µl *Sau*3AI		2 µl *Sau*3AI
	(50 µl Gesamt-Ansatz)		**(100 µl Gesamt-Ansatz)**

Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Restriktionsenzymverdau wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

C.2.5.2 Präzipitation der verdauten DNS

Die Präzipitation der verdauten „Tester“- und „Driver“-DNS erfolgte durch Zugabe von 1/10 Vol. Na-Acetat [3 M], pH 5,2 und 2,5 Vol. 96%igem Ethanol zum Verdauansatz und anschließende Fällung über Nacht bei -22°C. Das entstandene Präziptitat wurde daraufhin zentrifugiert (20 min, 13.000 rpm, RT), das gewonnene Pellet zweimal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und 5-10 min luftgetrocknet. Bei der anschließenden Resuspension mit A. bidest. wurde die „Tester“-DNS auf eine Konzentration von ca. 0,5 µg/µl, die „Driver“-DNS auf eine Konzentration von ca. 1 µg/µl eingestellt.

C.2.5.3 Herstellung der Adaptoren

Bei Adaptoren handelt es sich um kurze, teilweise doppelsträngige Oligonukleotide, zur Ligation an die verdaute „Tester“-DNS. Die Auswahl des 12-mer Primers (5'-GATCCTCGGTGA-3') erfolgte anhand des im Restriktionsenzymverdau verwendeten Enzyms, da das 5’-Ende dieses Primers komplementär zu dem dort generierten Überhang war; die folgenden 8 Basen des 12-mer Primers waren komplementär zum 3’-Ende des 24-mer Primers (5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG-3’) und damit erforderlich zur Hybridisierung der beiden Primer. Jeweils 20 µl des spezifischen 12-mer und 24-mer Primers

[100 µM] wurden zusammen mit 10 µl 10x Ligationspuffer (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) in 0,5 ml-Reaktions-gefäßen vermischt und im Thermozykler zunächst für 5 min bei 95°C erhitzt. Um eine Hybridisierung der komplementären Primeranteile zu ermöglichen, wurde die Temperatur anschließend in 10-minütigen Intervallen über 60°C auf 42°C, 37°C und schließlich auf 21°C abgesenkt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -22°C.

C.2.5.4 Ligation der Adaptoren an die verdaute „Tester“-DNS

Zur Ligation der Adaptoren an die verdaute „Tester“-DNS wurden 15 µl Adaptoren [40 µm], 15 µl verdaute „Tester“-DNS [0,5 µg/µl], 1,2 µl ATP [25 mM] und 0,5 µl T_4-DNS-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) gemischt und über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Das zu diesem Zeitpunkt vorliegende Mischungsverhältnis zwischen „Tester“-DNS und Adaptoren entsprach einem molaren Verhältnis von 1:100.

C.2.5.5 Hybridisierung von „Tester“- und „Driver“-DNS

Jeweils 1 µl, 5 µl und 10 µl des Ligationsprodukts wurden mit 50 µl unverdünnter, mit dem gleichen Restriktionsenzym verdauter „Driver“-DNS [1 µg/µl] in einem 500 µl-Reaktionsgefäß vermischt, so dass ein 5-, 10- bzw. 50-facher Überschuss an „Driver“-DNS entstand. Die DNS wurde durch Zugabe von 2,5 Vol. 96%igem Ethanol und 1/10 Vol. Na-Acetat [3 M], pH 5,2 über Nacht bei -70°C präzipitiert, zentrifugiert (20 min, 13.000 rpm) und in 4 µl 1 x *Taq* Polymerasepuffer (Invitrogen Corporation, Karlsruhe) resuspendiert. Nach einem 5-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C im Thermoblock wurde jedem Reaktionsgefäß 1 µl NaCl [5M] zupipettiert, die Ansätze mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und diese über Nacht bei 67°C im Thermoblock inkubiert. Die hybridisierte DNS wurde anschließend mit 15 µl A. bidest. verdünnt.

C.2.5.6 PCR zur exponentiellen Amplifikation „Tester“-spezifischer DNS

Als Template in einem 50 µl PCR-Ansatz zur Amplifikation „Tester“-spezifischen DNS-Fragmente wurden 5 µl des Hybridisierungsproduktes eingesetzt. Die übrigen Komponenten der PCR-Reaktion sind in der Tabelle 4 (s. C.2.2.1) bzw. Tabelle 14a des Anhangs aufgeführt. Um die überhängenden Enden aufzufüllen, wurde der Ansatz zunächst ohne Primer pipettiert und für 15 min bei 72°C im Thermocycler vorinkubiert. Erst danach erfolgte die Zugabe von 5 µl Primer Rbam 24 [5 µM] und die eigentliche PCR-Reaktion wurde gestartet (s. Tab. 5b des Anhangs). Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 1,5%igen Agarose-Gel analysiert (s. C.2.2.3). Zur Reduzierung von starkem Hintergrund und Hervorhebung nur

undeutlich zu erkennender DNS-Amplifikate wurden von einzelnen PCR-Produkten unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) hergestellt und diese wiederum in der PCR eingesetzt.

C.2.6 Isolierung und Identifizierung der RDA-Fragmente

C.2.6.1 Klonierung der PCR-Produkte

Zur Vervielfältigung und Reinigung der in der PCR erhaltenen, vermeintlich „Tester"-spezifischen Amplifikate wurde das „TOPO-TA Cloning Kit" (Invitrogen Corporation, Karlsruhe) verwendet. Unter Verwendung des Protokolls des Herstellers wurden 2 µl des entsprechenden PCR-Produktes in den „pCR 2.1-TOPO"-Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Das Ausplattieren der Transformationsansätze erfolgte auf ampicillinhaltigem LB-Agar [50 µg/ml] unter Zusatz von 5 µl IPTG (100 mM) und 50 µl X-gal (40 mg/ml) zur Unterscheidung von ß-Galaktosidase-positiven und -negativen Kolonien (Blau-Weiß-Selektion). Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die weißen Kolonien mithilfe von sterilen Zahnstochern entnommen und in eine Mikrotiterplatte mit 30 µl Flüssig-LB-Medium und Ampicillin [50 µg] überführt. Die Mikrotiterplatte wurde für 2-3 h bei 37°C inkubiert, daraufhin entnommene 5 µl in eine zweite Mikrotiterplatte mit 95 µl TE-Puffer transferiert und diese zwecks Lyse der Bakterien für 5 min bei mittlerer Leistungsstufe in der Mikrowelle erhitzt. 5 µl dieses Lysats wurden in der nachfolgenden PCR als Template eingesetzt.

C.2.6.2 PCR zur Identifizierung von Klonen mit „Tester"-spezifischen DNS-Fragmenten

Die Generierung von „Tester"-DNS-Fragmenten aus dem pCR 2.1-TOPO-Vektor erfolgte in 96-well-PCR-Multiplatten als 25 µl PCR-Ansatz mit Rbam 24 als Primer und unter den in Tabelle 5b des Anhangs aufgeführten Reaktionsbedingungen. Bei der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 1,5%iges Gel verwendet und eine elektrische Spannung von 20 V für 8 h angelegt.

C.2.6.3 Überprüfung der Spezifität der RDA-Fragmente

Die Überprüfung der Spezifität der RDA-Fragmente erfolgte im Dot Blot-Verfahren (s. C.2.4.1.4) mit einer Digoxigenin-markierten Sonde, die aus chromosomaler Gesamt-DNS des „Drivers" hergestellt wurde (s. C.2.4.1.2). Alternativ dazu wurden Southern-Blot-Analysen (s. C.2.4.1.3) mit chromosomaler DNS von „Driver" und verschiedenen „Testern"

und dem jeweiligen RDA-Fragment als Digoxiginin-markierter Sonde durchgeführt. Nur diejenigen Amplifikate aus der vorangegangenen PCR, die in der Hybridisierung eindeutig negative Hybridisierungssignale erzeugten, wurden für die anschließende Sequenzanalyse vorbereitet.

C.2.6.4 Plasmid-Präparation

Zur Isolierung und Vervielfältigung der auf diese Weise selektierten RDA-Fragmente wurden 20 ml LB-Medium mit Ampicillin [50 µg/ml] mit jeweils 2 µl des entsprechenden Transformationsprodukts beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Plasmid-Aufarbeitung (s. C.2.1.2) wurden 5 ml dieser Kultur eingesetzt und anschließend der DNS-Gehalt bestimmt (s. C.2.1.6). Um zu überprüfen, ob die isolierten Plasmide entsprechende Fragmente beinhalten, wurden ein Restriktionsenzymverdau mit *Eco*RI und eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

C.2.6.5 DNS-Sequenzanalyse/Datenabgleich

Die ihm Rahmen der RDA isolierten *C. jejuni* NCTC11828-, *C. jejuni* 1187-I-, *C. jejuni* K14- und *C. jejuni* BgVV1474-spezifischen Fragmente wurden anschließend sequenzanalysiert. Die Sequenzierreaktionen wurden durch die Firma AGOWA, Berlin, mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger vorgenommen.

Die Sequenzdatenanalyse wurde mit dem Programmpaket „Husar“ (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) durchgeführt. Sowohl die DNS Sequenzen als auch die potentiellen „offenen Leserahmen“ (ORFs = open reading frames) wurden mit verschiedenen Datenbanken (GenBank/EMBL, TIGR, Sanger Center) abgeglichen. Dabei wurden folgende Programme angewendet:

BlastN: Vergleich von Nukleotidsequenzen mit Nukleotidsequenzen aus der Datenbank

BlastX: Vergleich von Nukleotidsequenzen mit Proteinsequenzen aus der Datenbank

FASTA: Vergleich einer unbekannten Nukleotidsequenz mit Nukleotidsequenzen aus der Datenbank

TRANSlate: Übersetzung von Nukleotidsequenzen in Proteinsequenzen

Prosite: Vorhersage der Zugehörigkeit einer Proteinsequenz zu einer bestimmten Proteinfamilie