

E. Diskussion

Im Zusammenhang mit bakteriell bedingten Durchfallerkrankungen des Menschen wird der Erreger *C. jejuni* weltweit am häufigsten isoliert. Während die Campylobacteriose in Deutschland zahlenmäßig hinter den Salmonellosen rangiert, verzeichnen v.a. Entwicklungsländer sowie auch viele industrialisierte Länder (z.B. Kanada, Japan, Großbritannien) eine höhere Inzidenzrate für *Campylobacter*-Infektionen. Die *Campylobacter*-Enteritis verläuft oftmals deutlich milder als die durch *Salmonella*-Spezies verursachte Durchfallerkrankung und wird in den meisten Fällen als nicht behandlungswürdig eingestuft. Diese Tatsache sowie auch die verhältnismäßig schwierige Diagnostik des Erregers (der demzufolge entsprechend seltener diagnostiziert wird) haben bis heute dazu geführt, dass *C. jejuni* in seiner Bedeutung für das Gesundheitswesen gewissermaßen unterschätzt wird. Dementsprechend wurde eine offizielle Meldepflicht, wie sie beispielsweise für Salmonellosen schon seit vielen Jahren existiert, auch erst im Jahre 2001 in Deutschland eingeführt. Die durch Campylobacteriosen und deren Spätfolgen entstehenden wirtschaftlichen Einbußen sind jedoch enorm, und äußern sich insbesondere in Form von Arbeitsausfällen sowie intensivmedizinischer Betreuung und langwierigen Folgebehandlungen von GBS- und MFS-Patienten. Allein in den USA belaufen sich diese Kosten auf geschätzte 1,5-8 Mrd. Dollar jährlich [259], wobei ähnliche Beträge für die EU angesetzt werden dürften.

Als ebenfalls kritisch bei der Beurteilung des Erregers für das Gesundheitswesen ist die Tatsache anzusehen, dass sowohl die Epidemiologie als auch die Pathogenese von *C. jejuni* weitestgehend nicht aufgeklärt sind. So bleibt bis heute unbeantwortet, ob möglicherweise an bestimmte Wirte angepasste oder für einzelne Krankheitsmanifestationen verantwortliche *C. jejuni*-Subtypen existieren. Diese „Unbekannten“, die in hohem Masse auf die sehr komplex organisierte Populationsstruktur des Erregers zurückzuführen sind, erschweren die Ergreifung geeigneter Schutzmaßnahmen und die Verfolgung von Infektketten erheblich. *C. jejuni* betreibt einen regen genetischen Austausch durch verschiedene Mechanismen der Rekombination, wobei *in vivo* Studien belegen, dass dieser Austausch sowohl zwischen homologen als auch heterologen Stämmen sowie intragenomisch stattfindet [12; 82; 81; 260]. Die Frequenz dieser Ereignisse scheint jedoch nicht hoch genug zu sein, um das Auftreten stabiler (adaptiver, ökologisch erfolgreicher) Klone zu verhindern, wie sie beispielsweise gehäuft in den Serovaren O:19 und O:41 anzutreffen sind [235; 93; 9].

In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, inwieweit die dem *C. jejuni*-Chromosom zugesprochene Diversität auch auf Stämme der weltweit sehr häufig isolierten Serovar O:2 [13] zutrifft, die laut bisherigen Untersuchungen als überwiegend nicht-klonal strukturiert gilt [15; 261; 262]. Für dieses Vorhaben wurden vier verschiedene Genotypisierungsverfahren ausgewählt:

1. Makrorestriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *BssHIII*, *EagI* und *SunI*, um die genetische Diversität des gesamten Genoms zu beleuchten und die Genomgrößen der untersuchten Stämme zu ermitteln;
2. Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung mit der Restriktionsendonuklease *DdeI*, zur Identifizierung von DNS-Polymorphismen innerhalb des Flagellin-Genlokus;
3. DNS-DNS-Hybridisierung zur Lokalisierung der virulenzassoziierten Gene *cadF* (*Campylobacter* adhesin for fibronectin), *cdtB* (cythoethal distending toxin B), *cheY* (chemotaxis regulatory gene), *flaA* (flagellin A), *fur* (ferric uptake regulator) und *porA* (major outer membrane protein [MOMP]) auf den durch *BssHIII*, *EagI* und *SunI* generierten Restriktionsfragmenten; zur Aufdeckung größerer genomischer Rearrangements innerhalb des Genoms;
4. Repräsentative Differenzanalyse von drei ausgewählten *C. jejuni*-Isolaten, zur Identifizierung stammspezifischer DNS-Sequenzen.

Die den Untersuchungen zugrundeliegenden 11 *C. jejuni*-Stämme weisen neben dem gemeinsamen Serotyp O:2 keine nähere epidemiologische Verwandtschaft auf, sondern wurden vielmehr aus unterschiedlichen Wirten und verschiedenen geographischen Regionen in Deutschland innerhalb eines Zeitraumes von 15 Jahren isoliert. Die ebenfalls einbezogenen Referenzstämme NCTC11168 (O:2) und NCTC11828 (O:6) wurden erstmalig 1977 in Worcester/UK bzw. 1982 in Südostengland aus humanen Durchfallgeschehen isoliert und zur Evaluierung der verschiedenen genotypischen Tests eingesetzt, wobei die Mitführung des komplett sequenzanalysierten NCTC11168 insbesondere für die während der RDA durchgeführten Sequenzabgleiche unerlässlich war. Mit dem O:6-Isolat NCTC11828 sollte zudem überprüft werden, inwieweit sich die mit einem unterschiedlichen Phänotyp verbundenen Eigenschaften auch auf Ebene des Genotyps ausdrücken.

E.1 Makrorestriktion/Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse mit drei verschiedenen Endonukleasen bestätigen generell die bereits mehrfach für *C. jejuni*-Stämme der Serovar O:2 beschriebene hohe genetische Diversität. Der Grad der ermittelten genetischen Ähnlichkeit rangierte zwischen 61-100% (*Bss*HIII-Analyse) und läßt auf eine teilweise nur geringe Verwandtschaft der untersuchten Stämme schließen. Allerdings wurden sowohl innerhalb der Humanisolate als auch zwischen Human- und tierischen Isolaten auch mehrfach identische PFGE-Bandenmuster angetroffen. Insbesondere die Humanisolate NCTC11168 und 5042 zeigten mit allen drei verwendeten Restriktionsenzymen identische Restriktionsprofile, was dafür spricht, dass sie einer klonalen Linie bzw. einem Klon angehören. Die Stämme 1187-I und BgVV1766 zeigten sich in der *Eag*I- und *Sun*I-Analyse als ebenfalls identisch zu diesen beiden Stämmen, wiesen jedoch in der *Bss*HIII-Analyse drei bzw. zwei Bandenunterschiede auf. Die Natur dieser Bandenvariationen läßt allerdings darauf schließen, dass es sich nur um kleinere genetische Rearrangements handelt, die die Zugehörigkeit dieser beiden Stämme zu dem von NCTC11168 und 5042 gebildeten Klon keineswegs ausschließt. So fehlten dem Stamm 1187-I in der *Bss*HIII-Analyse zwei Restriktionsfragmente in der Größe von ca. 190 und 240 kb, die von den Stämmen NCTC11168 und 5042 generiert werden konnten. An Stelle dessen wurde für 1187-I jedoch ein größeres Fragment erzeugt, das der Größe dieser beiden kleineren Fragmente entspricht (ca. 430 kb). Das veränderte *Bss*HIII-Restriktionsprofil von 1187-I ist demzufolge möglicherweise das Ergebnis einer Punktmutation, die zum Verlust einer einzelnen *Bss*HIII-Schnittstelle geführt hat. Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm BgVV1766 in der *Bss*HIII-Analyse die gleiche Anzahl an Fragmenten wie auch die Stämme NCTC11168 und 5042. Eines dieser Fragmente erwies sich jedoch als etwas größer (ca. 325 kb) als das in NCTC11168 und 5042 korrespondierende (ca. 290 kb). Da die PFGE-Analyse insbesondere bei der Verwendung von verschiedenen Restriktionsendonukleasen über ein sehr hohes Diskriminationspotential verfügt und die Diversität des gesamten Genoms beleuchtet, welche im Laufe der Zeit und mit der Verbreitung der Organismen akkumuliert, kann davon ausgegangen werden, dass diese geringfügigen Alterationen auf einzelne genetische Ereignisse zurückzuführen sind. Die vier Isolate NCTC11168, 5042, BgVV1766 und 1187-I gehören also sehr wahrscheinlich einem Klon an.

Die Mehrzahl der bisher durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen von *C. jejuni*-Isolaten wurden mithilfe der Makrorestriktionsanalyse durchgeführt. Bei bestimmten Fragestellungen findet dieses Genotypisierungsverfahren nach wie vor häufig Anwendung, wird in jüngster Zeit jedoch mehr und mehr von den neueren Methoden wie MLST und AFLP

abgelöst. Die Gründe hierfür sind sicherlich einerseits in der begrenzten Portabilität und Reproduzierbarkeit der PFGE-Ergebnisse zu suchen, die einen Vergleich der Restriktionsprofile zwischen verschiedenen Labors erschwert. Andererseits besitzt die Technik eine gegenüber den meisten anderen Typisierungsverfahren als sehr hoch einzustufende Diskriminationskraft, die in einigen Fällen zu Fehlinterpretationen führen kann. Während dieses hohe diskriminatorische Potential bei der Zuordnung von Stämmen zu einer Ausbruchssituation durchaus wünschenswert ist, kann allein die über Jahre hinweg erfolgende Akkumulation einzelner Punktmutationen in einem Stamm dazu führen, dass ein völlig neues Restriktionsprofil entsteht. Der Vorteil der AFLP- gegenüber der PFGE-Analyse liegt demnach v.a. in der Unterteilung des Genoms in noch kleinere Fragmente, womit der Überinterpretation von kleineren genetischen Rearrangements weitestgehend vorgebeugt wird. Im Gegensatz zur PFGE- und AFLP-Analyse, mit der die genetische Diversität des gesamten Genoms beleuchtet wird, gibt die MLST-Analyse Aufschluss über Sequenzvariationen in bestimmten Stoffwechselgenen. Da diese Gene einem geringen Selektionsdruck unterliegen und häufig in Rekombinationsereignisse involvierte DNS-Bereiche nicht erfasst werden, eignet sich die Methode vorwiegend zur Beantwortung Langzeit-epidemiologischer Fragestellungen. Das Prinzip der MLST verfolgt also den Aufbau globaler ST-Datenbanken vorwiegend mit dem Ziel, die Populationsstruktur und -biologie einzelner Bakterienspezies näher aufzuklären. Die Tatsache jedoch, dass es sich hierbei um eine recht kostenintensive Methode handelt und mit den in der offiziellen *Campylobacter*-MLST-Datenbank (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) verwerteten Informationen von über 2860 *C. jejuni*-Isolaten (Stand: Juni 2005) bisher keine größeren epidemiologischen Zusammenhänge verknüpft werden konnten, macht eine weitgehende Verdrängung der PFGE durch MLST zumindest in bestimmten Anwendungsbereichen (Kurzzeit- und lokale Epidemiologie) eher unwahrscheinlich.

Die Anwendung der Makrorestriktionsanalyse zur molekularen Typisierung von *C. jejuni*-Isolaten sollte also aufgrund der hohen Sensitivität der Technik und der genetischen Diversität des Erregers in Kombination mit mindestens einem weiteren Typisierungsverfahren erfolgen. Dies ist v.a. dann von Bedeutung, wenn epidemiologisch nicht miteinander verwandte Stämme untersucht werden. Da die in dieser Arbeit verwendeten Stämme innerhalb eines Zeitraumes von über 15 Jahren aus unterschiedlichen Wirten und unterschiedlichen geographischen Regionen isoliert wurden, ist die Aussagekraft der PFGE-Ergebnisse also insofern eingeschränkt, als über den tatsächlichen Verwandtschaftsgrad der nicht identischen Isolate wenig bekannt wird. Die ihren Restriktionsmustern möglicherweise zugrunde

liegenden Rekombinationsmechanismen können aufgrund der Vielzahl der Alterationen nicht näher definiert und allgemeingültige Interpretationsschemata [263] aufgrund der unterschiedlichen Isolierungszeitpunkte und -orte nicht angewendet werden. Hinzu kommt noch, dass die Anzahl der untersuchten *Campylobacter*-Stämme begrenzt und damit die Identifizierung eines klonalen Hintergrundes erschwert ist. Eine genauere Definierung des epidemiologischen Zusammenhangs dieser Isolate könnte demzufolge nur durch Anwendung eines weiteren Genotypisierungsverfahren wie der MLST erfolgen. Die nach der PFGE-Analyse vorgenommene Zuordnung der Isolate NCTC11168, 5042, 1187-I und BgVV1766 zu einer klonalen Linie scheint dagegen aus den schon erwähnten Gründen (hohes diskriminatorisches Potential der Technik, unterschiedlicher epidemiologischer Hintergrund der Isolate) umsomehr gerechtfertigt.

Die mithilfe der Makrorestriktionsanalyse für alle 13 untersuchten Stämme ermittelte durchschnittliche Genomgröße von 1,68 Mbp steht im Einklang mit den bisher für *C. jejuni* publizierten Daten [264; 265; 266] und zeigt, dass sich die Genomgröße dieser Spezies relativ konstant verhält. Die Berechnung erfolgte durch computergestützte Kalkulierung und Summierung der Größe der einzelnen Restriktionsfragmente (EasyWin 3.2, Herolab, Wiesloch). Dabei wurden mit den drei Restriktionsendonukleasen teilweise erhebliche Größenunterschiede ermittelt, die wahrscheinlich auf technische Unzulänglichkeiten während des PFGE-Laufs zurückzuführen sind. Die einzelnen Restriktionsendonukleasen produzieren Fragmente unterschiedlicher Anzahl und Größe, von denen einige - trotz gleichbleibender Laufbedingungen - möglicherweise nicht konstant aufgetrennt werden. Insbesondere sehr kleine Fragmente gehen während des Elektrophoreselaufs oftmals verloren, während Fragmente ähnlicher Größe sich gegenseitig überlagern können und folglich bei ihrer Darstellung nur als einzelnes Fragment erfasst werden. Da die Berechnungen jedoch anhand von Daten aus drei unterschiedlichen Restriktionsendonuklease-Verdaus erfolgten, kann davon ausgegangen werden, dass die für die 13 *C. jejuni*-Stämme ermittelte Genomgröße der tatsächlichen weitgehend entspricht.

E.2 Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung

Um die mithilfe der Makrorestriktionsanalyse erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und zu vervollständigen, wurde als weiteres Untersuchungsverfahren die von Ayling et al. (1996) etablierte Methode der Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung angewendet. Hierbei werden drei verschiedene Oligonukleotidprimer mit dem Ziel der Amplifizierung des *flaA*- und *flaB*-Gens eingesetzt. Die Amplifizierung beider Flagellin-Gene soll einerseits die Diskriminationskraft

dieses Typisierungsverfahrens erhöhen und gleichzeitig potentielle Effekte intergenischer Rearrangements minimieren [253]. Als Nachteil dieser Methode ist das Auftreten unspezifischer Produktbanden in der PCR zu erwähnen, wie sie nicht nur in dieser Arbeit sondern auch in einer von Harrington et al. (2003) durchgeführten Untersuchung angetroffen wurden [267]. Abweichend zu der von Ayling et al. beschriebenen Technik wurde in dieser Arbeit nur die Restriktionsendonuklease *DdeI* eingesetzt, da diese im Vergleich zu anderen Enzymen über ein höheres diskriminatorisches Potential bei der Fla-Typisierung von *C. jejuni*-Isolaten verfügt [267].

Interessanterweise zeigten die bereits laut PFGE-Analyse einer klonalen Linie angehörenden Stämme NCTC11168, 5042 und 1187-I auch in der mit *DdeI* durchgeführten Flagellin-PCR-RFLP-Analyse denselben Fla-Typ a. Die Tatsache, dass der Stamm BgVV1766 mit Typ e einen hiervon abweichenden PCR-Fla-Typ aufwies, schließt jedoch einen ansonsten identischen Genotyp und damit die Zuordnung dieses Stammes zu dem von NCTC11168, 5042 und 1187-I gebildeten Klon nicht aus. Ähnlich den Resultaten der PFGE müssen auch die Ergebnisse der Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung im Hinblick auf langzeitepidemiologische Untersuchungen mit Vorsicht bewertet werden, da die Flagellin-Gene unter hohem Selektionsdruck stehen und folglich sehr anfällig für spontanen genetischen Austausch sind [260]. Im Hinblick auf die für diese vier Stämme generierten Makrorestriktionsprofile scheint der in BgVV1766 veränderte Fla-Typ also eher das Resultat eines Rekombinationsereignisses und nicht durch genetische Drift entstanden zu sein. Die in dieser Arbeit kombinierte Anwendung von PFGE und Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung gibt allerdings auch den Hinweis darauf, dass selbst in *C. jejuni*-Stämmen mit sehr unterschiedlichen Makrorestriktionsprofilen identische PCR-Fla-Typen existieren können (Bsp.: ASH1805 und H48). Somit kann also selbst in diesen als sehr variabel geltenden Genen über längere Zeit ein gewisser Grad an genomischer Konservierung beobachtet werden.

Anhand der Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse und PCR-RFLP-Fla-Typisierung kann ausgesagt werden, dass bestimmte *C. jejuni*-Genotypen der Serovar O:2, die aus unterschiedlichen Wirten und unterschiedlichen geographischen Regionen in Deutschlands isoliert wurden, über Jahre hinweg genetisch stabil geblieben sind, i.d.F. für mindestens 15 Jahre. Die Tatsache, dass auch der erstmals 1978 in Worcester/UK isolierte Referenzstamm NCTC11168 ein hierzu identisches bzw. sehr ähnliches genotypisches Profil aufweist, spricht außerdem dafür, dass solche stabilen Genotypen über beachtliche geographische Distanzen hinweg existieren können.

Während für andere *C. jejuni*-Serovaren wie O:19, O:41 und O:55 die Existenz solcher klonalen Linien bereits mehrfach beschrieben wurde [92; 235; 9; 226], gibt es bisher nur wenige Anhaltspunkte für das Auftreten solcher Linien innerhalb der Serovar O:2 [14; 18]. Diese gilt vielmehr als genetisch sehr divers, was sich bei der Anwendung verschiedener Typisierungsverfahren herausstellte [15; 261; 262]. Die mit dieser Arbeit vorgelegten Resultate belegen jedoch recht deutlich, dass klonale Linien auch in dieser Serovar angetroffen werden und man könnte daraus schließen, dass genetische Plastizität nicht die ihr bisher zugeordnete, herausragende Bedeutung für die Adaptation und das Überleben von *C. jejuni* besitzt. Die Tatsache, dass kürzlich auch in der Serovar O:6 ein über 20 Jahre hinweg stabil gebliebener Genotyp identifiziert werden konnte [10], macht es eher wahrscheinlich, dass klonale Linien in allen Serovaren existieren, und dass diese Spezies generell über klonale und nicht-klonale Elemente verfügt. So gehen auch Meinersmann et al. (2002) davon aus, dass das Modell des „klonalen Rahmens“ grundsätzlich auch auf *C. jejuni* übertragbar ist. Aus dieser Sicht besteht die Spezies also aus sog. „Meroklonen“ (partiellen Klonen), deren Genome mosaikähnlich strukturiert sind und neben der „ursprünglichen“ (Rückgrat)-DNS verschieden große Anteile importierter DNS beinhalten [222]. Die Frequenz, mit der neue DNS in das *C. jejuni*-Genom integriert wird, ist allerdings -wie auch bei anderen Bakterienspezies- nicht konstant und wird durch unterschiedliche Selektionskräfte innerhalb der verschiedenen Gen-Loci bestimmt (Beispiel: „housekeeping“-Gene versus oberflächenassoziierte Gene) [224; 268]. Im Vergleich zu der stärker klonal strukturierten Spezies *E. coli* scheint der Anteil zur Aufnahme und zum Austausch fähiger DNS-Regionen im *C. jejuni*-Genom jedoch deutlich größer zu sein [222].

In höherem Masse als andere Vertreter des Genus teilt *C. jejuni* sehr viele seiner Allele mit anderen *Campylobacter*-Spezies, wobei größte Übereinstimmungen zu *C. coli* bestehen. Da die Rekombinationsrate einer Spezies durch die Fähigkeit zur exogenen DNS-Aufnahme, die Ähnlichkeit der am Austausch beteiligten DNS-Sequenzen und die Anzahl der zum Austausch oder zur Aufnahme von DNS zur Verfügung stehenden Möglichkeiten bestimmt wird [269], scheint *C. coli* in dieser Hinsicht der ideale „Partner“ zu sein. Die zwischen diesen beiden Spezies beobachteten hohen Rekombinationsraten sind demnach auf deren genetische Ähnlichkeit, die großen, durch sie dargestellten Populationen und die Nutzung gemeinsamer Habitate zurückzuführen. *C. jejuni* besitzt jedoch sehr wahrscheinlich eine größere Transformationskapazität als *C. coli* oder aber bewegt sich schneller innerhalb der einzelnen Habitate [222].

Das Auftreten und die Persistenz von auch in dieser Arbeit beobachteten klonalen Linien kann verschiedene Gründe haben. De Boer et al. gehen davon aus, dass Angehörige solcher Linien natürlicherweise nicht kompetent zur Aufnahme exogener DNS sind. Zu dieser Annahme trug eine von ihnen durchgeführte Untersuchung bei, in der *C. jejuni*-Stämme unterschiedlicher Serovare auf ihre Fähigkeit zur Inkorporation exogener DNS getestet wurden. Die meisten Stämme der klonal assoziierten Serovaren (i. d. Fall O:41, O:55, O:19) waren nicht in der Lage, heterologe oder isogene DNS aufzunehmen. Der nicht-klonal assoziierten Serovar O:1 angehörende Stämme zeigten sich dagegen in den meisten Fällen als natürlich transformierbar, während Stämme der Serovar O:2 eine Zwischenstellung einnahmen [229]. Ein weiterer Grund für das Auftreten und Fortbestehen klonaler Komplexe kann die erfolgreiche Adaptation an eine bestimmte ökologische Nische sein. In diesem Fall verringern sich die den rekombinatorischen DNS-Austausch antreibenden Selektionskräfte zumindest für einen bestimmten Zeitraum [230].

E.3 Bestimmung der Lage virulenzassoziiierter Gene auf den *Bss*HII-, *Eag*I- und *Sun*I-Restriktionsfragmenten durch DNS-DNS-Hybridisierung

Das Vorhandensein eines „klonalen Rahmens“ im *C. jejuni*-Genom kann mit den in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsexperimenten bestätigt werden. Trotz teilweise erheblichen Variationen in den Makrorestriktionsprofilen konnte für eine Vielzahl der untersuchten *C. jejuni*-Stämme eine überwiegend konservierte Lage der virulenzassoziierten Gene *cadF*, *cdtB*, *cheY*, *flaA*, *fur* und *porA* auf den *Eag*I- und *Sun*I-Restriktionsfragmenten nachgewiesen werden. In der Hybridisierung gegen die *Sun*I-Fragmente zeigten lediglich die Isolate ASH1805, K14, E4-St. und BgVV1474 eine zu den übrigen Stämmen abweichende Verteilung dieser Gene, während die Isolate ASH1805 und BgVV1474 jeweils nur geringe und Kassel1595 und Pb16 jeweils deutliche Unterschiede im *Eag*I-Kartierungsmuster aufwiesen. Da die untersuchten virulenzassoziierten Gene auf unterschiedlichen Abschnitten des NCTC11168-Genoms anzutreffen sind und teilweise mit den DNS-Regionen für die Synthese der genetisch sehr variablen Oberflächenstrukturen zusammenfallen, kann also davon ausgegangen werden, dass einem Großteil der untersuchten Stämme keine größeren genomischen Rearrangements zugrunde liegen. Die variableste Verteilung dieser sechs genetischen Marker zeigte sich bei der Hybridisierung gegen die mit der Restriktionsendonuklease *Bss*HII generierten Fragmente. Hier wiesen insbesondere die beiden Geflügelisolate E4St. und BgVV1474 sowie die Stämme K14, ASH1805 und Kassel1595 ein von den übrigen Stämmen deutlich abweichendes Verteilungsmuster der virulenzassoziierten

Gene auf. Da die genetische Ähnlichkeit dieser Stämme zu den übrigen untersuchten auch in der Makrorestriktionsanalyse nur gering ausfiel, liegt ihnen folglich ein deutlich abweichender Genotyp zugrunde. Dieser kann durch die verschiedensten Mechanismen der Rekombination, also z.B. Inkorporation, Exzision oder Duplikation größerer oder mehrerer kleiner DNS-Fragmente bedingt und/oder durch Akkumulation von Mutationsereignissen entstanden sein.

Das der Serovar O:6 angehörende Isolat NCTC11828 zeigte bei der Hybridisierung der virulenzassoziierten Marker gegen die *EagI*-Restriktionsfragmente nur geringe, bezüglich deren Lage auf den *BssHII*-Fragmenten aber wiederum deutliche Unterschiede im Kartierungsmuster. Inwieweit diese Unterschiede auf die mit dieser Serovar verbundenen phänotypischen Eigenschaften zurückzuführen sind, lässt sich anhand dieser Ergebnisse jedoch nicht beantworten, da einige der O:2-Stämme in ähnlichem Masse voneinander abweichende Hybridisierungsergebnisse zeigten. Aufgrund der Tatsache, dass die Lokalisation der Virulenzmarker auf den *SunI*- und *EagI*-Fragmenten für alle untersuchten Stämme gleich bzw. ähnlich ausfiel, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass ein gemeinsamer „klonaler Rahmen“ nicht nur innerhalb einer Serovar sondern auch serovarübergreifend besteht. Dies wird im Übrigen auch durch die bisher für *C. jejuni* durchgeführten MLST-Analysen bestätigt, da alle ST-Komplexe immer auch unterschiedliche Serovaren beinhalten (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

Für die übrigen Isolate konnten auch in der *BssHII*-Analyse identische oder nahezu einheitliche Hybridisierungsergebnisse erzielt werden, was allenfalls auf kleinere genetische Rearrangements innerhalb der Chromosomen schließen lässt. Die einem Klon zugeordneten Stämme NCTC11168, 5042, BgVV1766 und 1187-I zeigten sowohl auf den *BssHII*-, *EagI*- als auch den *SunI*-Restriktionsfragmenten eine identische Verteilung der virulenzassoziierten Marker. Aufgrund der Tatsache, dass 1187-I in der *BssHII*-Restriktionsanalyse ein Fragment weniger hervorbringt, verschiebt sich die Lage der Gene *cadF*, *flaA*, *porA* und *cheY* entsprechend auf das zweit- bzw. drittgrößte *BssHII*-Fragment.

Die Stabilität bestimmter genetischer Marker und damit auch die Annahme eines „klonalen Rahmens“ für das *C. jejuni*-Chromosom wird durch eine von Pickett et al. (1996) durchgeführte Studie weiter bestätigt. In dieser konnte für 10 von 11 untersuchten Isolaten eine konservierte Lage des *cdtB*-Gens auf ein und demselben *ClaI*-Restriktionsfragment demonstriert werden [103].

E.4 Isolierung *C. jejuni* spezifischer DNS-Fragmente mittels Repräsentativer Differenzanalyse

Während mithilfe der Makrorestriktionsanalyse durch PFGE zwar die genetische Verwandtschaft der untersuchten *C. jejuni*-Stämme aufgrund von Bandenalterationen ermittelt werden konnte, lässt dieses Typisierungsverfahren allerdings keine Aussage über die diesen Variationen zugrunde liegenden DNS-Rearrangements zu. Die Tatsache jedoch, dass das *C. jejuni*-Genom fast ausschließlich aus CDS besteht [20], liess vermuten, dass den unterschiedlichen Restriktionsmustern wie auch den teilweise nicht unerheblichen Genomgrößenunterschieden ein unterschiedlicher Gengehalt zugrunde liegt. Um die mithilfe der PFGE-Analyse aufgedeckten Variationen auf Ebene der Nukleotidabfolge näher zu beleuchten, wurde daher im weiteren Verlauf der Arbeit eine Repräsentative Differenzanalyse für drei ausgewählte *C. jejuni*-Stämme durchgeführt.

Die Methode der Repräsentativen Differenzanalyse (RDA) wurde erstmals von Lisitsyn et al. (1993) zur Analyse von Sequenzunterschieden zwischen eng verwandten DNS-Populationen beschrieben. Im Vergleich zur subtraktiven Hybridisierung, bei der überwiegend diejenigen Sequenzen erfaßt werden, die ausschließlich in einem von zwei zu vergleichenden Bakterienpopulationen anzutreffen sind, können mit der RDA auch geringfügige Sequenzunterschiede sehr effizient ermittelt werden. Dies wird erreicht durch die Kombination einer subtraktiven Hybridisierung mit einem PCR-gestützten „Repräsentationsschritt“, der zur Reduktion der Komplexität und Größe der Ausgangs-DNS-Fragmente beiträgt, sowie durch mehrere, ebenfalls PCR-gestützte Subtraktions- und Amplifikationsschritte, die zur exponentiellen Amplifikation und Anreicherung der spezifischen Zielsequenzen führen. Ursprünglich zur Anwendung bei komplexen eukaryotischen Genomen entwickelt, findet die RDA heute vielfach Anwendung auch bei der Subtraktion eng verwandter bakterieller Genome. So nutzten Iwobi et al. (2003) die Technik, um genetische Unterschiede zwischen einem apathogenen und einem hochpathogenen *Yersinia enterocolitica*-Stamm aufzuzeigen [270]. Choi et al. (2002) gelang mit dieser Methode die Identifizierung spezifischer Virulenzfaktoren in *Pseudomonas aeruginosa* [271] während eine weitere Arbeitsgruppe die RDA zur Isolierung spezifischer DNS-Bereiche in einem hoch-virulenten *Neisseria meningitidis*-Stamm anwendete [272].

Ahmed et al. (2002) setzten die subtraktive Hybridisierung erstmals zur Identifizierung stammspezifischer DNS-Sequenzen in *C. jejuni* ein, um für das unterschiedliche Kolonisierungspotential der beiden untersuchten Stämme verantwortliche Genabschnitte zu identifizieren. Dabei gelang ihnen nicht nur die Generierung mehrerer stammspezifischer

DNS-Fragmente sondern auch der Nachweis nur geringfügiger Sequenzvariationen in einigen für *C. jejuni* bereits bekannten Genen. Die Sequenzanalyse ergab allerdings keinen direkten Hinweis auf die Beteiligung dieser DNS-Abschnitte am Kolonisierungsvermögen des Erregers [244]. Gaynor et al. (2004) setzten die Methode ebenfalls mit nur wenig Erfolg hinsichtlich der Überprüfung verschiedener virulenzassoziierter Phänotypen auf Ebene des Genotyps ein. Sie untersuchten die sequenzanalytisierte und die ursprüngliche klinische Variante des Stammes NCTC11168 mit deutlichen Unterschieden in Motilität sowie Invasions- und Kolonisierungseigenschaften, wobei die SSH allerdings keine Hinweise auf die hierfür verantwortlichen Gene liefern konnte. Erst die nach Kultivierung der beiden Stämme unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen durchgeführte Transkriptionsanalyse mittels Mikroarray ergab deutliche Unterschiede in der Expression bestimmter Gen-Familien und damit den Hinweis auf die den unterschiedlichen Phänotypen zugrunde liegenden DNS-Bereiche [273]. Neben der Tatsache, dass es sich um eine relativ aufwendige und kostenintensive Methode handelt und die Lage der identifizierten Sequenzen innerhalb des Genoms nicht reflektiert wird, liegt der Nachteil der SSH/RDA also vor allem im nicht-selektiven Charakter der erhaltenen stammspezifischen DNS. Während Größe und Spezifität der aus dem „Tester“-Stamm zu generierenden PCR-Produkte u.a. über die Auswahl des Restriktionsenzym oder die während der Hybridisierung von „Tester“ und „Driver“ gewählte Temperatur beeinflusst werden können, bietet die Methode nicht die Möglichkeit der zielgerichteten Identifizierung bestimmter Genbereiche.

In dieser Arbeit wurde eine vereinfachte Form der RDA, ohne initiale PCR-gestützte Amplifikation der Ausgangs-DNS („Repräsentation“) und mit nur einer Subtraktions- und Amplifikationsrunde durchgeführt. Dabei wurde restriktionsenzymatisch verdaute chromosomale DNS von *C. jejuni* NCTC11168 („Driver“) von ebenfalls restriktionsenzymatisch verdauter chromosomaler *C. jejuni* NCTC11828-, K14- und 1187-I-DNS („Tester“) subtrahiert und „Tester“-spezifische Fragmente im nachfolgenden PCR-Schritt exponentiell amplifiziert. Mit der Auswahl dieser „Tester“-Stämme, die in der Makrorestriktionsanalyse teilweise nur geringe (1187-I), teilweise erhebliche (NCTC11828, K14) Bandenunterschiede zum „Driver“-Stamm NCTC11168 aufzeigten, wurde sowohl die Möglichkeit zur Identifizierung serovar- (NCTC11828) als auch wirtsspezifischer (1187-I, K14) DNS-Bereiche berücksichtigt. Darüberhinaus wies jedes dieser Isolate eine vom „Driver“-Stamm abweichende Genomgröße auf (ca. 0,01 bzw. 0,03 Mb), was aufgrund der Dichte des *C. jejuni*-Genoms einen unterschiedlichen Gengehalt vermuten liess. Die Mitführung des komplett sequenzanalytisierten und annotierten Stammes NCTC11168 war für

die Analyse der erhaltenen Sequenzdaten unerlässlich. Mittlerweile ist die Genomsequenz eines weiteren *C. jejuni*-Isolates (Stamm RM1221, Serovar O:53) verfügbar, die bei der Auswertung ebenfalls berücksichtigt wurde.

Zur Durchführung der modifizierten Methode wurden in jeder RDA etwa 5 µg „Tester“- und 10 µg „Driver“-DNS eingesetzt. Die eingesetzte DNS-Menge hätte durch eine initiale Amplifikation („Repräsentation“) verringert werden können [256]; eine solche wurde jedoch nicht durchgeführt, um eine PCR-abhängige Selektion sehr kleiner Fragmente zu verhindern.

In den bereits oben beschriebenen Anwendungen der RDA-Technik wurden - wie im Originalprotokoll [256] - meist mehrere Subtraktions- und Amplifikationsschritte durchgeführt. Durch diese schrittweise Selektion sollen nach zwei bis vier Runden überwiegend „Tester“-spezifische Fragmente isoliert werden können. Anstelle dieser zusätzlichen Subtraktions- und Amplifikationsrunden wurden die nach der ersten Runde isolierten RDA-Fragmente in dieser Arbeit mit chemisch markierten Sonden aus chromosomaler DNS von *C. jejuni* NCTC11168 und dem jeweiligen „Tester“-Stamm hybridisiert, um „Tester“-spezifische Fragmente zu ermitteln.

Mit der auf diese Weise vereinfachten Repräsentativen Differenzanalyse wurden insgesamt 34 RDA-Fragmente aus den drei „Tester“-Stämmen generiert und anschließend im Sequenzvergleich näher charakterisiert. Dabei erwiesen sich 28 (82%) der identifizierten RDA-Fragmente als stammspezifische DNS-Sequenzen von denen wiederum 14 (50%) eine hohe, 7 (25%) eine nur geringe und weitere 7 (25%) keinerlei Übereinstimmung zum Referenz- und „Driver“-Stamm NCTC11168 aufwiesen.

Innerhalb der für den „Tester“-Stamm NCTC11828 generierten RDA-Fragmente fallen 11828-A12, 11828-E20 und 11828-H19 laut Ergebnissen der Sequenzanalyse mit Genbereichen zusammen, die für die Synthese und Modifikation von Oberflächenstrukturen verantwortlich sind. Die für diese Fragmente auf Proteinebene ermittelte Ähnlichkeit zum „Driver“-Stamm NCTC11168 fiel mit 90-100% sehr hoch aus und spricht dafür, dass zumindest ein Teil dieser als sehr variabel geltenden Gene ebenfalls genomisch konserviert ist. Allerdings ist auch keines dieser Gene in die Synthese oder Modifikation der die O-Antigenspezifität determinierenden Kapselpolysaccharide involviert, von denen im Falle des O:6-Isolates NCTC11828 deutlichere Sequenzunterschiede zu erwarten wären. Das RDA-Fragment 11828-A12 zeigte Übereinstimmungen sowohl zu einem Glutamin-bindenden periplasmatischesn Protein (GlnH) als auch zum Flagellar-Biosynthese-Protein FliP von *C. jejuni* NCTC11168. Während die Ähnlichkeit zu ersterem nur 80% betrug (weshalb u.a. eine Detektion durch die RDA möglich war), wies der mit dem FliP-Protein

übereinstimmende Anteil eine 100%ige Homologie auf. Zwischen diesen beiden Gene liegen im „Driver“-Stamm NCTC11168 allerdings für zwei kleinere Proteine (76 bzw. 75 AS) kodierende Nukleotidabschnitte, die in NCTC11828 nicht vorhanden und ein weiterer Grund für die Identifizierung des RDA-Fragments 11828-A12 sind. Dieses, sowie auch die der Serovar O:53 bzw. O:23/26 angehörenden Stämme RM1221 und 81-176, weisen an entsprechender Stelle einen Sequenzbereich auf, der lediglich für ein aus 37 AS bestehendes Protein kodiert. Die in NCTC11168 vorhandenen Gene sind also möglicherweise serovarspezifisch, wobei ihre Funktion allerdings nicht bekannt ist. Neben der Identifizierung neuer sowie variabler Sequenzbereiche können mithilfe der RDA also auch Aussagen über möglicherweise in den untersuchten Stämmen stattgefundenen genomische Rearrangements getroffen werden, wobei i.d.F. ein Insertions- oder Deletions-Ereignis vorliegt. Bei den weiteren für den Stamm NCTC11828 identifizierten RDA-Fragmenten mit hoher Übereinstimmung zum „Driver“-Stamm NCTC11168 handelt es sich um Membran-, periplasmatische oder hypothetische Proteine, wobei das RDA-Fragment 11828-B1 eine 91%ige Ähnlichkeit zum Cytochrom C-Protein von NCTC11168 aufweist, welches im O:53-Isolat RM1221 in dieser Form nicht vorhanden ist. Cytochrome vom Typ C spielen typischerweise eine Rolle im Elektronentransport, werden aber auch im aktiven Zentrum einer Vielzahl unterschiedlicher Enzyme angetroffen. Sie sind charakterisiert durch eine aus zwei (oder seltener einer) Thioether-Brücken bestehende, kovalente Bindung von Häm (Eisen-Protoporphyrin IX) an das Cys-Xaa-Xaa-Cys-His-Motif von Polypeptidketten. Die Diversität bakterieller Atmungssysteme bedingt die Existenz vieler verschiedener Typ C-Cytochrome, die eine unterschiedliche Anzahl Häm pro Polypeptidkette gebunden haben. Diese bilden zwar insgesamt eine nur geringe Anzahl strukturell miteinander verwandter Familien, können aber innerhalb dieser Familien eine hohe Sequenzdiversität aufweisen [274]. Auch *Campylobacter*-Spezies haben in der Regel eine hohe Konzentration an Typ C-Cytochromen, wobei deren Anzahl und Vielfalt offensichtlich von Stamm zu Stamm unterschiedlich ausfällt. In *C. jejuni* wurden alternative Elektronenakzeptoren bereits von Poly et al. beschrieben [275] und auch Dorell et al. berichten von einer unterschiedlichen Cytochrom C-Ausstattung selbst in Stämmen derselben Serovar [7]. Diese Differenzen sind möglicherweise mit einem unterschiedlichen Anpassungsvermögen der betreffenden Stämme an eine sauerstoffarme Umgebung gekoppelt.

Eine nur geringe Übereinstimmung zum „Driver“-Stamm wurde für das RDA-Fragment 11828-C16 ermittelt, welches Ähnlichkeit zu einer Komponente des Azetyl-KoenzymA-Karboxylase-Komplex aufweist (AccD). Dieser Komplex besteht aus einem Biotin-Karboxyl-

Carrier-Protein, der Biotin-Karboxylase und der Karboxyl-Transferase und katalysiert den ersten Schritt des Fettsäurestoffwechsels: die ATP-abhängige Formierung von Malonyl-CoA aus Azetyl-CoA und Bikarbonat. Die Fettsäure-Synthese ist essentiell für das bakterielle Wachstum, da diese Bestandteil der membranbildenden Phospholipide sind. Der Vergleich der AS-Sequenz verschiedener Azetyl-KoenzymA-Karboxylasen hat gezeigt, dass innerhalb der Domänen ein hoher Grad an Konservierung besteht, wobei allerdings auch Rearrangements zwischen unterschiedlichen Gruppen von Karboxylasen beobachtet wurden [276]. Ob oder inwiefern dies Auswirkungen auf die Aktivität des Komplexes haben kann, ist allerdings noch nicht geklärt

Mit dem RDA-Fragment 11828-D7 ist außerdem ein Hinweis auf ein möglicherweise serovarspezifisches ABC-Transportsystem gegeben. Es handelt sich hierbei um eine 246 bp große Sequenz, die neben einer nur geringen Übereinstimmung zu einer ATP-bindenden Komponente eines Eisen-ABC-Transport-Systems von *C. jejuni* NCTC11168 und RM1221 (28%) eine deutlichere Ähnlichkeit zu einem Zucker-bindenden Protein als Komponente eines ABC-Transportsystems von *Mesorhizobium loti* zeigt (40%). Die Bezeichnung ABC-Transporter beruht auf dem Vorhandensein einer hochkonservierten ATP-Bindungsdomäne (ABC = ATP-binding cassette). Diese Systeme verwenden die bei der ATP-Hydrolyse aufgebrauchte Energie zum Transport einer Vielzahl von Metaboliten in die Zelle bzw. aus dieser heraus. Jeder ABC-Transporter ist aus vier Proteindomänen aufgebaut, wobei die zwei hydrophoben, die Membran durchspannenden Untereinheiten den Kanal für die zu transportierenden Substanzen bilden, während zwei hydrophile Nukleotid-bindende Domänen an der zytoplasmatischen Membran interagieren, um die für den Transport notwendige Energie bereitzustellen. Alle bakteriellen ABC-Transporter benutzen außerdem ein hochaffines, lösliches Substrat-Bindeprotein, das im Periplasma lokalisiert ist (gram-negative Bakterien) oder an der Zelloberfläche gebunden bzw. mit dem Transportsystem verschmolzen ist (gram-positive Bakterien). Diese Transportsysteme können an der bakteriellen Signaltransduktion, Protein-Sekretion, Antibiotika-Resistenz, Antigen-Präsentation, Sporulation und damit auf verschiedene Weise an der Virulenz beteiligt sein und dienen dem Überleben des Bakteriums innerhalb des Wirtsorganismus. Die Tatsache, dass das im „Tester“-Stamm NCTC11828 identifizierte und die typische Signatur aufweisende ABC-Transportsystem in den O:2-Isolaten NCTC11168, K14 und 1187-I sowie im O:53-Isolat RM1221 nicht angetroffen wird und außerdem deutliche Übereinstimmung zu einem Zucker-bindenden Protein der ABC-Transporter anderer Bakterienspezies aufweist, legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine serovarspezifische und möglicherweise in die

Antigen-Präsentation involvierte Komponente handelt. Dies kann allerdings nur durch den weiteren Vergleich mit *C. jejuni*-Stämmen der Serovar O:6 wie auch anderer Serovaren eindeutiger belegt werden.

Bei den RDA-Fragmenten 11828-E7 und 11828-G8, die keine Ähnlichkeit zum „Driver“-Stamm NCTC11168 aufwiesen, handelt es sich um Genfragmente mit Übereinstimmung zu hypothetischen Proteinen von *Clostridium tetani* und *Salmonella* Typhimurium bzw. *Yersinia pestis*. Die Funktion dieser Proteine ist derzeit noch nicht bekannt und eine mögliche Beteiligung am Virulenzgeschehen von *C. jejuni* NCTC11828 könnte daher nur durch deren Isolierung und funktionelle Charakterisierung nachgewiesen werden. Da dieses Isolat über ein vergleichsweise sehr hohes Kolonisations- und Invasionspotential verfügt, wäre es im weiteren Verlauf interessant, entsprechend hergestellte Mutanten in Zellkultur-Versuchen zu überprüfen.

Für das im „Tester“-Stamm 1187-I identifizierte RDA-Fragment 1187-I-C3 mit nur geringer Übereinstimmung zum „Driver“-Stamm wurden Ähnlichkeiten zu verschiedenen hypothetischen Proteinen ermittelt, die innerhalb des NCTC11168-Genoms in den hypervariablen Sequenzbereich fallen. Die für 1187-I-C3 erhaltenen Sequenzdaten zeigen, dass dieser DNS-Abschnitt über einen identischen PolyG(9)-Trakt verfügt und das korrespondierende Gen möglicherweise phasenvariabel exprimiert werden kann. Das gesamte Fragment zeigte allerdings eine nur 68%ige Übereinstimmung zu genannten NCTC11168-Proteinen, weshalb anzunehmen ist, dass es sich auch funktionell von ihnen unterscheidet. Dass die Verteilung der homopolymeren Sequenzen in den einzelnen *C. jejuni*-Stämmen nicht identisch sein muss, konnte bereits für das O:23/36-Isolat 81-176 nachgewiesen werden. Dieses weist einen PolyG-Trakt im an der Modifikation der LOS beteiligten Gen *cgtA* auf, der im entsprechenden Gen in NCTC11168 nicht vorhanden ist [25]. Auch Dorell et al. (2001) konnten mittels Mikroarray-Analyse die Abwesenheit verschiedener phasenvariabler Gene in *C. jejuni*-Stämmen unterschiedlicher Serovaren feststellen [7]. Die für das RDA-Fragment 1187-I-C3 erhaltenen Daten zeigen nun, dass auch in Stämmen derselben Serovar eine unterschiedliche Verteilung dieser PolyG:C-Trakts vorkommt. Da viele, wenn nicht alle der phasenvariablen Gene an der Virulenz von *C. jejuni* beteiligt sind, ist auch für das in 1187-I detektierte eine Rolle in der Modifikation von Oberflächenstrukturen zur Umgehung der Wirtsimunität anzunehmen.

Für diesen „Tester“-Stamm konnte außerdem ein RDA-Fragment (1187-I-A2) mit geringer Übereinstimmung zu einem periplasmatischen Protein von NCTC11168 bzw. einem Substrat-

bindenden Protein eines ABC-Transportsystems von RM1221 identifiziert werden (jeweils 38%). Dies könnte also bedeuten, dass diese Transportsysteme nicht nur serovar- sondern möglicherweise auch stammspezifisch in den einzelnen Stämmen existieren können.

Als DNS-Bereiche ohne Übereinstimmung zu den für *C. jejuni* bereits bekannten Genen konnten die RDA-Fragmente 1187-I-A11, 1187-I-E2 und 1187-I-A6 identifiziert werden, von denen ersteres eine geringe Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein von *Xylella fastidiosa* (35/57) zeigt. Das eine Übereinstimmung zu einem ATP-Bindeprotein (UgpC) eines Glycerol-3-Phosphat-Transport-Systems von *Brucella melitensis* (23/44) aufweisende Fragment 1187-I-E2 gibt dagegen einen erneuten Hinweis auf die selbst in Stämmen einer Serovar bestehende Vielfalt an ABC-Transport-Systemen. Glycerol-3-Phosphat ist essentielles Substrat für die Glykolyse und Phospholipid-Synthese und kann sowohl als Kohlenstoff- als auch als Phosphat-Quelle genutzt werden. In *E. coli* existieren mehrere Aufnahme-Systeme gleichzeitig und ein entsprechender ABC-Transporter ist für diesen Erreger bereits näher charakterisiert worden. Das UgpABCE Glycerol-3-Phosphat-Aufnahme-System kann bei diesem Erreger zwar die alleinige Phosphat-Versorgung der Zelle übernehmen, ist aber nicht in der Lage, genügend Kohlenstoff für das bakterielle Wachstum bereitzustellen. Da über die Glycerol-3-Phosphat-Aufnahme und den damit verbundenen intrazellulären Anstieg der Phosphat-Konzentration ein negatives Feedback ausgelöst wird, bestehen in *E. coli* alternative Systeme, um die Kohlenstoff-Versorgung ebenfalls zu gewährleisten [277]. Wie die für das RDA-Fragment 1187-I-E2 erhaltenen Sequenzdaten vermuten lassen, verfügt offensichtlich auch *C. jejuni* über verschiedene Möglichkeiten des Glycerol-3-Phosphat-Transports. Zumindest aber können unterschiedliche Varianten dieser ABC-Transport-Systeme in den einzelnen Stämmen angetroffen werden.

Mit dem RDA-Fragment 1187-I-A6 ist außerdem ein Hinweis auf in das Chromosom von *C. jejuni* integrierte Phagen-DNS gegeben. Dieses 296 bp große Fragment weist eine Ähnlichkeit von 81% (80/98) zu einer putativen Phagenschwanz-Komponente des Bakteriophagen HP1 von *Haemophilus influenzae* auf. Aufgrund der Tatsache, dass die Genomsequenz des Stammes NCTC11168 keine Phagen-assoziierten DNS-Bereiche enthält und auch für andere *C. jejuni*-Isolate diesbezüglich lange Zeit keine Daten existierten, wurde den möglichen Auswirkungen der Phagenintegration auf die Genomstruktur des Erregers bislang kaum Beachtung geschenkt. Erst kürzlich konnten dann Fouts et al. (2005) durch Vergleich der beiden *C. jejuni*-Isolate RM1221 und NCTC11168 nachweisen, dass ersteres über eine Reihe von Phagensequenzen verfügt, die in der Nähe von tRNA-Genen inseriert sind. Phagen ermöglichen durch den Mechanismus der Transduktion den Austausch von

genetischem Material zwischen den Bakterienzellen und können somit deren Fitness erhöhen [278]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass durch Bakteriophagen übertragene Gene eine vielseitige Rolle in der bakteriellen Virulenz einnehmen können, wie z.B. in der Adhäsion, Invasion, Wirts-Evasion oder Toxin-Produktion [279]. Von den durch Fouts et al. in RM1221 identifizierten Phagen-Sequenzen konnte bislang nur das Element CMLP1 (Campylobacter **Mu-like phage**) induziert werden, während den übrigen Elementen teilweise wichtige Struktur-Gene fehlen und es sich bei ihnen möglicherweise um Satelliten- oder nicht funktionelle Phagen handelt. Da es sich bei den meisten der ihnen zugrundeliegenden ORFs um hypothetische Proteine handelt, kann die Funktion dieser Phagen-Elemente derzeit nicht annähernd benannt werden [258]. Sowohl die in RM1221 identifizierten Sequenzen als auch der mit dieser Arbeit gelieferte Hinweis auf eine phagenassoziierte Komponente in 1187-I mögen aber einen Anstoss geben, die Bedeutung der Phagenintegration für *C. jejuni* künftig näher zu beleuchten.

Von den im „Tester“-Stamm *C. jejuni* K14 identifizierten RDA-Fragmenten weist K14-A1 eine nur geringe Übereinstimmung zu oberflächenassoziierten Genen in NCTC11168 auf. Auf Proteinebene wurde für den ersten Abschnitt von K14-A1 eine Ähnlichkeit zu einer Nukleotid-Zucker-Epimerase/Dehydratase (Cj1430c) nachgewiesen, während der zweite Übereinstimmungen zum Flagellar L-Ring-Protein Precursor (FlgH) zeigt. Diese beiden an der Modifikation bzw. Synthese von Oberflächenstrukturen beteiligten Gene könnten folglich im Genom dieses Stammes direkt zueinander benachbart liegen, was in NCTC11168 allerdings nicht der Fall ist. Hier liegen Cj1430c und *flgH* auf weit voneinander entfernten Abschnitten des Chromosoms (Position bei ca. 1,36 Mpb bzw. bei 0,641 Mbp), wobei ersteres innerhalb des KPS-Genlokus anzutreffen ist. Ein weiterer Abgleich mit den Sequenzdaten für die Nukleotid-Zucker-Epimerasen/Dehydratasen von *C. jejuni*-Stämmen der Serovaren O:5, O:23 und O:36 ergab, dass diese eine noch geringere Ähnlichkeit zum Fragment K14-A1 aufweisen, wobei das Isolat RM1221 über entsprechendes Gen gar nicht verfügt. Auch Dorrell et al. (2001) konnten durch Mikroarray-Analyse erhebliche Variabilität in den KPS-Genlozi von *C. jejuni*-Stämmen unterschiedlicher Serovaren feststellen. In Stämmen der Serovar O:2 jedoch zeigten sich diese Lozi erwartungsgemäß hoch konserviert und wiesen keine Unterschiede bezüglich des Gengehalts auf [7]. Wie die für das RDA-Fragment K14-A1 erhaltenen Sequenzdaten vermuten lassen, kann es in entsprechenden Genbereichen von O:2-Isolaten jedoch zu genetischen Rearrangements kommen. Die ersten 76 bp von K14-A1 stimmen zu 100% mit dem 5'-Ende (AS 147-171 von 181) von Cj1430c überein, während die

darauffolgenden 63 bp („in-frame“) keinerlei Übereinstimmung zu den für *C. jejuni* bekannten Sequenzdaten zeigen. Die letzten 130 bp von K14-A1 wiederum weisen eine 97%ige Ähnlichkeit zu FlgH auf (AS 49-91 von 232). Diese Übereinstimmungen deuten darauf hin, dass dem RDA-Fragment K14-A1 ein Mosaik-Gen zugrunde liegen könnte, wie es mehrfach auch von Karlyshev et al. (2005) in den KPS-Genlozi von *C. jejuni*-Stämmen mit unterschiedlichen Serovaren identifiziert werden konnte [36]. Derartige intragenomische Rearrangements können möglicherweise eine veränderte Substratspezifität bewirken und - neben der „slipped-strand-mispairing“-vermittelten Mutagenese und horizontalem Gentransfer - zur strukturellen Variabilität der oberflächenassoziierten Gene beitragen. Ob dies tatsächlich eine Rolle auch in den KPS-Lozi von Stämmen derselben Serovar spielt, könnte letztendlich nur durch entsprechende Sequenzanalysen weiter bestätigt werden. Diese wurden bislang lediglich für Stämme unterschiedlicher Serovaren durchgeführt [36].

Für ein weiteres in diesem „Tester“-Stamm ermitteltes RDA-Fragment - K14-H7 - konnte eine Ähnlichkeit zum hypothetischen Protein Cj1342c nachgewiesen werden, welches in NCTC11168 mit einem hypervariablen Sequenzbereich assoziiert ist und ab AS 188 über einen PolyC(9/10)-Trakt verfügt. Da die für K14-H7 generierte Sequenz nur 237 bp lang ist, konnte ein entsprechend homopolymerer Trakt nicht nachgewiesen werden. Die deutlich abweichende AS-Sequenz lässt jedoch eine zu Cj1342c unterschiedliche Proteinfunktion vermuten.

Das als ohne Übereinstimmung zum „Driver“-Stamm NCTC11168 identifizierte RDA-Fragment K14-B12 weist eine hohe Ähnlichkeit zu einem Ankyrin-Repeats enthaltenen Protein von *C. coli* auf. Ankyrin-Repeats sind hochkonservierte Sequenzmotive, die in den verschiedensten Proteinen von sowohl Bakterien, Pflanzen, Pilzen, Insekten als auch Vertebraten angetroffen werden. Es handelt sich hierbei um tandemartig wiederholte, aus 33 AS bestehende Regionen, die an unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionen wie z.B. an der Transkriptions-Initiation, Regulation des Zellzyklus, Integrität des Cytoskeletons, Ionen-Transport und Zell-zu-Zell-Signalübertragung teilnehmen. Bisher sind 10 Ankyrin-Strukturen hoch aufgelöst worden, die sich, abgesehen von ihrer unterschiedlichen Zellfunktion, nur geringfügig voneinander unterscheiden. Weiterhin gibt es keine Hinweise darauf, dass diese Motive eine bestimmte Struktur oder Sequenz erkennen. Ankyrin-Repeats sind bislang hauptsächlich bei Eukaryoten beschrieben worden und die wenigen bekannten Beispiele in Bakterien sind möglicherweise auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen. In *Ehrlichia phagocytophila* wurde beispielsweise ein AnkA-Protein identifiziert, das wahrscheinlich die Gen-Expression der Wirtszellen beeinflusst [280], während in *Coxiella burnetii* identifizierte

Ank-Proteine in die Anheftung an Wirtszellen involviert zu sein scheinen [281]. Für die in *Pseudomonas spp.* involvierten Ank-Proteine konnte festgestellt werden, dass diese für eine optimale Aktivität des Katalase-Gens B und für die Resistenz gegen Wasserstoffperoxide benötigt werden [282]. Die Rolle der Ankyrin-Repeats für *C. jejuni* kann derzeit nur grob diesen genannten Vorgängen zugeordnet werden und bleibt im Detail genauer abzuklären.

Für das ebenfalls keine Übereinstimmung zu NCTC11168 aufweisende RDA-Fragment K14-F6 wurde eine hohe Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein (Tgh113) des *C. jejuni*-Stammes TGH9011 (Serovar O:3) ermittelt. Dieses wurde erst kürzlich im Rahmen einer Mikroarray-Analyse identifiziert und zeigte sich auch dort als abwesend in NCTC11168 [275]. Während für das hier untersuchte Isolat K14 diesbezüglich keine Informationen existieren, wurde für TGH9011 bereits mehrfach ein gegenüber NCTC11168 deutlich höheres Invasionspotential nachgewiesen. Um sich der Funktion und einer möglichen Rolle des Tgh113 im Virulenzgeschehen des Erregers anzunähern, wäre es also zunächst interessant, dessen Prävalenz in *C. jejuni*-Isolaten mit unterschiedlichen Kolonisierungs- und Invasioneigenschaften zu testen.

Insgesamt wurden in den drei untersuchten „Tester“-Stämmen also 28 stammspezifische RDA-Fragmente identifiziert, von denen 15 (54%) eine hohe (>70% Ähnlichkeit), sechs (21%) eine nur geringe (<70% Ähnlichkeit) und weitere sieben (25%) keine Übereinstimmung zum Referenz- und „Driver“-Stamm *C. jejuni* NCTC11168 aufweisen. Die in dieser Arbeit modifiziert eingesetzte RDA ist somit nicht nur geeignet, die An- oder Abwesenheit bestimmter Gene zu detektieren, sondern kann auch Polymorphismen innerhalb einzelner Gene aufdecken. Darüberhinaus gestattet die Identifizierung von „chimären“ RDA-Fragmenten, wie i.d.F. 11828-A12 und K14-A1, Aussagen über die unterschiedliche Anordnung von Genen innerhalb der untersuchten Stämme. Dies ist, neben der Möglichkeit der Identifizierung neuer Gensequenzen, ein weiterer Vorteil der RDA gegenüber der Mikroarray-Analyse, die bei Untersuchungen zur genetischen Diversität ebenfalls häufig zur Anwendung kommt.

Die relativ geringe Anzahl an RDA-Fragmenten mit im NCTC11168-Genom nicht vorhandenen DNS-Sequenzen ist einerseits auf die anfangs schon erwähnte Modifizierung der Methode (kein Repräsentationsschritt, nur eine Subtraktions- und Amplifikationsrunde) zurückzuführen, die die Amplifikation nur geringgradig unterschiedlicher Sequenzbereiche fördert. Zum anderen ist die während der subtraktiven Hybridisierung von „Tester“ und „Driver“ gewählte Temperatur von 67°C als stringent anzusehen und der Anteil nicht in

NCTC11168 vorhandener Genbereiche hätte möglicherweise über eine Temperaturerniedrigung erhöht werden können. Hierauf wurde jedoch verzichtet, da auch kleinere genetische Rearrangements, wie sie insbesondere für den „Tester“-Stamm 1187-I zu erwarten waren, detektiert werden sollten. Nichtsdestotrotz wurden in allen drei untersuchten *C. jejuni*-Isolaten Sequenzen identifiziert, die im Genom des „Driver“-Stammes nicht vorhanden sind. Dies läßt darauf schließen, dass sowohl innerhalb von Stämmen unterschiedlicher als auch identischer Serovaren eine Intraspezies-Variation existiert.

Die im Rahmen des Sequenzabgleichs den einzelnen RDA-Fragmenten zugeordneten Ähnlichkeiten und Funktionen sind aufgrund der geringen Sequenzgrößen allerdings als vorläufig anzusehen. Dies gilt insbesondere für die RDA-Fragmente mit nur geringer oder ohne Übereinstimmung zur Genomsequenz von *C. jejuni* NCTC11168. Eine zur weiteren Charakterisierung der RDA-Fragmente 11828-D7, 11828-G8, 11828-E7, 1187-I-A6 und K14-B12 angewendete Inverse PCR lieferte keine weiteren Informationen bezüglich der diese Fragmente flankierenden DNS-Bereiche. Trotz variierender Reaktionsbedingungen und dem Einsatz unterschiedlicher Primerpaare konnte lediglich eine Vielzahl unspezifischer Banden oder aber auch gar kein Amplifikat erzeugt werden. Als hierfür verantwortliche Fehlerquelle kommen v.a. drei Punkte in Betracht: zum einen ist diese Form der PCR v.a. für einzelne DNS-Fragmente und weniger für komplexe DNS, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, geeignet. Zum anderen gelang es trotz des Einsatzes unterschiedlicher DNS-Mengen möglicherweise nicht, die für die Ligationsreaktion optimale Konzentration zu erzielen. Während der Einsatz einer zu hohen Konzentration an DNS dazu führt, dass sich Ketten aus den einzelnen Fragmenten bilden, läßt sich bei der Verwendung einer zu geringen Konzentration die zirkularisierte DNS nicht mehr amplifizieren. Des Weiteren hängt der Experimentierverlauf der inversen PCR im Wesentlichen von einer unbekanntem Größe ab, nämlich der Position einer Restriktionsschnittstelle. Ist die unbekanntem Restriktionsschnittstelle sehr nah zum Ende der bekannten Sequenz, bringt das Experiment nur geringen Sequenzzuwachs. Ist die unbekanntem Restriktionsschnittstelle dagegen sehr weit jenseits des Sequenzabbruchs lokalisiert, ist der intramolekulare Verlauf der Ligation eher unwahrscheinlich, und die Amplifizierung der großen Region zwischen den beiden Oligo-Primerstellen wird wahrscheinlich scheitern. Obwohl bis zu fünf verschiedene Restriktionsendonukleasen eingesetzt wurden, ist das Scheitern dieses Experiments also möglicherweise auch in der Verwendung einer nicht geeigneten Endonuklease begründet.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Charakterisierung der einzelnen RDA-Fragmente wurden in dieser Arbeit nicht vorgenommen, weshalb neben der Bestätigung der Genfunktion

der Nachweis zu erbringen bleibt, ob diese letztendlich auch exprimiert werden. In diesem Zusammenhang wäre es zunächst interessant, über Hybridisierungsexperimente die Prävalenz der stammspezifischen DNS-Bereiche in anderen *C. jejuni*-Stämmen zu ermitteln. Dabei sollten vermehrt auch Isolate der Serovar O:2 getestet werden, um die Serovar-Spezifität einiger RDA-Fragmente entweder bestätigen oder widerlegen zu können. Mit dem Einsatz mehrerer aus den RDA-Fragmenten hergestellten DNS-Sonden in der Southern-Blot-Hybridisierung könnte außerdem die Lage dieser stammspezifischen DNS-Bereiche näher bestimmt werden. Dies würde Aufschluß darüber geben, ob diese über weite Bereiche des Genoms verteilt oder eher in Clustern angeordnet sind.