

Aus dem  
**Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen**  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur genetischen Plastizität von *Campylobacter jejuni*-Stämmen der  
Serovar O:2**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Claudia Latschus**  
Tierärztin aus Brake

Berlin 2005

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L.H. Wieler  
Zweiter Gutachter: PD Dr. I. Moser  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. G. Schlenker

Tag der Promotion: 08.12.2005

*Für meine Eltern.*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>A. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>B. SCHRIFTTUM .....</b>	<b>7</b>
<b>B.1. Allg. Eigenschaften des Chromosoms von <i>Campylobacter jejuni</i>, Stamm NCTC11168.....</b>	<b>7</b>
B.1.1 Hypervariable Regionen .....	7
B.1.2 Kapsel-Polysaccharid-Biosynthese-Lokus.....	9
B.1.3 Allg. Protein-Glykosylierungs-System .....	11
B.1.4 Flagellar-und LOS-Glykosylierungs-System.....	13
B.1.5 DNS-Strukturmotive .....	14
<b>B.2. Virulenzassoziierte Gene von <i>C. jejuni</i>.....</b>	<b>15</b>
B.2.1 Klinische und pathogenetische Aspekte der <i>C. jejuni</i> -Infektion .....	15
B.2.2 Motilität .....	18
B.2.3 Chemotaxis .....	19
B.2.4 Eisen-Akquirierung.....	20
B.2.5 Adhäsine .....	22
B.2.6 Invasine .....	25
B.2.7 Toxinproduktion .....	28
B.2.7.1 Enterotoxine .....	28
B.2.7.2 Zytotoxine .....	28
<b>B.3. Methoden zur Untersuchung der genetischen Diversität in <i>C. jejuni</i>.....</b>	<b>32</b>
B.3.1 Plastizität des <i>C. jejuni</i> -Genoms .....	32
B.3.2 DNS Mikroarray-Technologie .....	35
B.3.3 Makrorestriktionsanalyse/Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) .....	36
B.3.4 Amplifizierter Fragmentlängen-Polymorphismus (AFLP) .....	37
B.3.5 Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) .....	38
B.3.6 Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP).....	40
B.3.7 Subtraktive Hybridisierung/Repräsentative Differenzanalyse (SH/RDA) .....	40
<b>C. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>42</b>
<b>C.1 Material .....</b>	<b>42</b>
C.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel .....	42
C.1.2 Chemikalien, Nährmedien und Lösungen.....	42
C.1.3 Oligonukleotid-Primer .....	42
C.1.4 Verwendete Bakterienstämme .....	42

C.1.4.1	Anzucht der Bakterienstämme .....	43
C.1.4.2	Bestimmung des Serotyps .....	43
<b>C.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>43</b>
C.2.1	Isolierung und Reinigung von Desoxyribonukleinsäure (DNS) .....	43
C.2.1.1	Isolierung von Gesamt-DNS .....	43
C.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNS.....	44
C.2.1.3	Aufreinigung von DNS mittels Chloroform-Phenol-Extraktion.....	44
C.2.1.4	Alkoholpräzipitation von DNS.....	45
C.2.1.5	Reinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten .....	45
C.2.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNS .....	45
C.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
C.2.2.1	Standard-PCR .....	46
C.2.2.2	Inverse PCR.....	47
C.2.2.3	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese .....	48
C.2.3	Restriktion von DNS.....	48
C.2.3.1	Mikrorestriktion.....	48
C.2.3.1.1	Flagellin PCR-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (Fla-PCR-RFLP) .....	48
C.2.3.2	Makrorestriktion.....	49
C.2.3.2.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) .....	49
C.2.3.2.2	Präparation chromosomaler DNS in Agaroseblöckchen .....	49
C.2.3.2.3	Restriktionsendonuklease-Verdau von DNS in Agaroseblöckchen.....	50
C.2.3.2.4	Contour clamped homogeneous electric field-Pulsfeld-Gelelektro-phorese (CHEF-PFGE)50	50
C.2.4	Desoxyribonukleinsäure (DNS-DNS)-Hybridisierung .....	51
C.2.4.1	Herstellung von Desoxyribonukleotidsonden.....	51
C.2.4.1.1	Markierung von Oligonukleotidsonden mit Digoxigenin (DIG).....	51
C.2.4.1.2	Markierung von chromosomaler DNS mit DIG .....	51
C.2.4.2	Southern-Blot .....	52
C.2.4.3	Dot-Blot.....	52
C.2.4.4	Hybridisierungsvorgang und Visualisierung .....	52
C.2.4.5	Entfernung der DNS-Sonden von Membranen (Stripping) .....	52
C.2.5	Repräsentative Differenzanalyse (RDA).....	53
C.2.5.1	Restriktionsenzymverdau mit Sau3AI.....	55
C.2.5.2	Präzipitation der verdauten DNS.....	55
C.2.5.3	Herstellung der Adaptoren .....	55
C.2.5.4	Ligation der Adaptoren an die verdaute „Tester“-DNS.....	56
C.2.5.5	Hybridisierung von „Tester“- und „Driver“-DNS .....	56
C.2.5.6	PCR zur exponentiellen Amplifikation „Tester“-spezifischer DNS.....	56
C.2.6	Isolierung und Identifizierung der RDA-Fragmente .....	57
C.2.6.1	Klonierung der PCR-Produkte .....	57
C.2.6.2	PCR zur Identifizierung von Klonen mit „Tester“-spezifischen DNS-Fragmenten.....	57
C.2.6.3	Überprüfung der Spezifität der RDA-Fragmente .....	57

C.2.6.4	Plasmid-Präparation .....	58
C.2.6.5	DNS-Sequenzanalyse/Datenabgleich .....	58
<b>D.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
<b>D.1</b>	<b>Untersuchung der Verwandtschaft von <i>C. jejuni</i>-Isolaten .....</b>	<b>59</b>
D.1.2	Makrorestriktions-Analyse (Pulsfeld-Gelelektrophorese) .....	59
<b>D.2</b>	<b>Bestimmung der Genomgrößen der untersuchten <i>C. jejuni</i>-Stämme .....</b>	<b>64</b>
<b>D.3</b>	<b>Identifizierung virulenzassozierter Gene auf den durch <i>BssHII</i>, <i>EagI</i> und <i>SunI</i> generierten Restriktionsfragmenten.....</b>	<b>65</b>
<b>D.4</b>	<b>Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung (Mikro-Restriktionsanalyse) .....</b>	<b>69</b>
D.4.1	PCR mit <i>flaA</i> / <i>flaB</i> -spezifischen Primern.....	69
<b>D.5</b>	<b>Isolierung Stamm-spezifischer DNS-Fragmente mittels Repräsentativer Differenzanalyse.....</b>	<b>73</b>
D.5.1	Repräsentative Differenzanalyse (RDA).....	73
D.5.2	Überprüfung der Spezifität der RDA-Fragmente .....	74
D.5.3	Isolierung größerer RDA-Fragmente .....	75
D.5.4	<i>C. jejuni</i> NCTC11828-spezifische Fragmente .....	75
D.4.5	<i>C. jejuni</i> 1187-I-spezifische Fragmente .....	79
D.4.6	<i>C. jejuni</i> K14-spezifische Fragmente .....	81
<b>E.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>E.1</b>	<b>Makrorestriktion/Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) .....</b>	<b>86</b>
<b>E.2</b>	<b>Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung .....</b>	<b>88</b>
<b>E.3</b>	<b>Bestimmung der Lage virulenzassozierter Gene auf den <i>BssHII</i>-, <i>EagI</i>- und <i>SunI</i>-Restriktionsfragmenten durch DNS-DNS-Hybridisierung .....</b>	<b>91</b>
<b>E.4</b>	<b>Isolierung <i>C. jejuni</i> spezifischer DNS-Fragmente mittels Repräsentativer Differenzanalyse .....</b>	<b>93</b>
<b>F.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>105</b>
<b>F.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>108</b>
<b>G.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>111</b>
<b>G.1</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmittel.....</b>	<b>111</b>

<b>G.2</b>	<b>Chemikalien, Nährmedien und Lösungen .....</b>	<b>112</b>
G.2.1	Chemikalien .....	112
G.2.2	Nährmedien.....	113
G.2.3	Lösungen.....	113
G.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese (DNS).....	113
G.2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	114
G.2.3.3	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	114
G.2.3.4	DNS-DNS-Hybridisierung .....	115
G.2.3.5	Subtraktive Hybridisierung .....	116
<b>G.3</b>	<b>Verwendete Oligonukleotid-Primer/PCR-Bedingungen .....</b>	<b>118</b>
<b>H.</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>123</b>

## Verwendete Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung(en)
<b>ABC</b>	ATP-binding cassette
<b>A. bidest.</b>	destilliertes Wasser
<b>AFLP</b>	Amplifizierter Fragmentlängen Polymorphismus
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase
<b>AS</b>	Aminosäure(n)
<b>AT</b>	Adenin, Thymidin
<b>ATP</b>	Adenosin-Triphosphat
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	bovines Serum-Albumin
<b>BRSS</b>	Blocking Reagenz Stock Solution
<b>C</b>	Cytosin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalzium-Ionen
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Kalziumchlorid
<b>Caco-2-Zellen</b>	Zelllinie aus Kolon-Karzinom
<b>CadF</b>	<i>Campylobacter</i> adhesin to fibronectin
<b>CMLP1</b>	<i>Campylobacter</i> Mu-like phage1
<b>CBF1</b>	cell Binding Factor 1
<b>CCUG</b>	Culture Collection University of Göteborg
<b>CDS</b>	coding sequence
<b>CdtABC</b>	Cytolethales distending Toxin ABC
<b>CeuBCDE</b>	<i>Campylobacter</i> enterocholin uptake BCDE
<b>CfrA</b>	<i>Campylobacter</i> ferric receptor A
<b>CHEF</b>	Contour-clamped homogeneous electric field
<b>CheY</b>	Chemotaxis regulator
<b>CHO-Zellen</b>	chinese hamster ovary (Zelllinie)
<b>ChuABCD</b>	hemin uptake system ABCD
<b>Cia</b>	<i>Campylobacter</i> Invasions-Antigene
<b>Cj</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<b>CLRT</b>	Cytolethales rounding Toxin
<b>CMP</b>	Cytidin 5'-Monophosphat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>CPHL</b>	Central public health laboratory
<b>CSPD</b>	chemilumineszierendes Reagenz (Warenname)
<b>CT</b>	Cholera Toxin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>D</b>	Deutschland
<b>Dig</b>	Digoxigenin
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DNA</b>	desoxyribonucleic acid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (dATP=Desoxy-Adenosin-Triphosphat, dCTP=Desoxy-Cytosin-Triphosphat, dGTP=Desoxy-Guanin-Triphosphat, dTTP=Desoxy-Thymidin-Triphosphat, dUTP=Desoxy-Uracil-Triphosphat)
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethyldiamintetraacetat

<b>EMBL</b>	europäisches Molekularbiologielabor (in Heidelberg)
<b>EP</b>	extrazelluläre Proteine
<b>ESP</b>	EDTA-Sarcosyl-Proteinase K
<b>ExbB/ExbD</b>	zytoplasmatische Proteine, Bestandteile des TonB-abhängigen Energie-Transduktionssystems für den Import von Eisen-Siderophoren-Komplexen und Vitamin B12
<b>Fla</b>	Flagellin
<b>FM</b>	Flagellarmodifikation
<b>Fops</b>	flagellar outer proteins
<b>Forw</b>	forward
<b>Fur</b>	ferric uptake regulator
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Guanin
<b>GBS</b>	Guillain-Barré-Syndrom
<b>h</b>	Stunde
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HeLa-Zellen</b>	Epithel-Zelllinie aus Zervix-Karzinom
<b>HEp2-Zellen</b>	humane Epithel-Zelllinie (Tumor)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HS/O</b>	hitzestabiles Antigen
<b>Hsp</b>	heat shock protein (Hitzeschock-Protein)
<b>i.d.F.</b>	in diesem Fall
<b>i.d.R.</b>	in der Regel
<b>INT407 -Zellen</b>	intestinale epitheliale Zelllinie (Mensch)
<b>Inv</b>	invasion adhesion molecule
<b>IPTG</b>	Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
<b>IS</b>	inverted sequenze
<b>JlpA</b>	<i>Jejuni</i> Lipoprotein A
<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium-Ionen
<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KPS</b>	Kapselpolysaccharide (auch als Bezeichnung entsprechender Gene/Proteine)
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LOS</b>	Lipooligosaccharide
<b>LPS</b>	Lipopolsaccharide
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>LT</b>	heat-labile toxin
<b>λ</b>	Lambda
<b>M</b>	molare Masse
<b>max.</b>	maximal
<b>Mb</b>	Megabasenpaare ( $10^9$ bp)
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MAP</b>	mitogen-activated protein
<b>MCP</b>	methyl-accepting chemotaxis proteins
<b>MF</b>	Mikrofilament
<b>MFS</b>	Miller-Fisher-Syndrom
<b>mg</b>	Milligramm
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesium-Ionen
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid

<b>MHB</b>	Müller-Hinton-Blutagar
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MLEE</b>	Multilokus Enzym Elektrophorese
<b>MLST</b>	Multilokus Sequenz Typisierung
<b>MOMP</b>	major outer membrane protein
<b>MT</b>	Mikrotubuli
<b>N</b>	Normal
<b>N<sub>2</sub></b>	molekularer Stickstoff
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NANA</b>	N-azetyl-Neuraminsäure
<b>NCTC</b>	National Collection of Type Cultures
<b>NF-κB</b>	nuclear factor kappa b
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b> mM</b>	millimolar
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µM</b>	mikromolar
<b>O<sub>2</sub></b>	molekularer Sauerstoff
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>o.g.</b>	oben genannt
<b>OPS</b>	Oberflächenpolysaccharid
<b>ORF</b>	open reading frame
<b>p19</b>	19 kDa Protein mit möglicher Funktion im Eisen-Transport
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PEB1</b>	von Pei und Blaser identifiziertes Protein
<b>PFGE</b>	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<b>PglA-J</b>	an der Proteinglykosylierung beteiligte Proteine A-J
<b>pH</b>	potentia hydrogenii
<b>PorA</b>	Porin A (Hauptprotein der äußeren Membran)
<b>PR</b>	Plastizitäts-Region
<b>pVir</b>	Virulenzplasmid
<b>RDA</b>	Repräsentative Differenzanalyse
<b>Rev</b>	reversed
<b>RFLP</b>	Restriktionsfragmentlängen Polymorphismus
<b>Pkt.</b>	Punkt
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNAse A</b>	Ribonuklease A
<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>RR</b>	Response Regulator
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.</b>	siehe
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylphosphat
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SH</b>	Subtraktive Hybridisierung
<b>SNP</b>	single nucleotide polymorphism
<b>SSC</b>	Sodiumchlorid-Sodiumcitrat

<b>ST</b>	sequence type
<b>Stx</b>	Shiga toxin
<b>T</b>	Thymidin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TIGR</b>	The Institute for Genomic Research
<b>Tlp</b>	transducer-like protein
<b>Tm</b>	Schmelztemperatur
<b>TonB</b>	zytoplasmatisches Membranprotein, Bereitstellung von Energie für den Import von Eisen-Siderophoren-Komplexen und Vitamin B12 über die äußere Membran
<b>TSST</b>	Toxisches Schock Syndrom Toxin
<b>U</b>	Unit
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UK</b>	United Kingdom
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>ü.N.</b>	über Nacht
<b>V</b>	Volt
<b>Vero</b>	Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze
<b>Vol.</b>	Volumenanteil
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Galactosid
,	Minuten
"	Sekunden

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lothar H. Wieler für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit unter optimalen Bedingungen. Ich danke ihm für die mir jederzeit entgegengebrachte freundliche Unterstützung, für den gewährten Handlungsspielraum und seine Diskussionsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau PD Dr. Irmgard Moser für die gute Betreuung in der Anfangsphase der Arbeit, für die Überlassung der *C. jejuni*-Stämme, einer Vielzahl der verwendeten Oligonukleotide und sonstiger Materialien sowie für ihre fachlichen Ratschläge und Anregungen für die Fortführung der Arbeiten bei ihrem Weggang.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerald Gerlach (Institut für Mikrobiologie, Tiermedizinische Hochschule Hannover) für die Möglichkeit der zweiwöchigen Laborrotation, seine geduldige Anleitung während der Durchführung der ersten Repräsentativen Differenzanalyse sowie für die vielen wertvollen Ratschläge und fruchtbaren Diskussionen. In diesem Zusammenhang sei auch den Doktorandinnen des Instituts gedankt, die mir während meines dortigen Aufenthaltes mit Rat und Tat zur Seite standen und mich freundlich in ihrer Runde aufnahmen.

Herrn Peter Schwerk danke ich für seine wertvolle Hilfe während der Einarbeitungsphase im Labor und die von ihm jederzeit gewährte Unterstützung bei computertechnischen Problemen. An dieser Stelle sei auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen gedankt, die mich in irgendeiner Weise unterstützt und zur Zusammenarbeit in entspannter und freundlicher Atmosphäre beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Gerd Schlenker danke ich für seine Bereitschaft, diese Dissertation zu begutachten.

Nicht unerwähnt bleiben soll an dieser Stelle auch die finanzielle Hilfe, die ich seitens der Freien Universität Berlin in Form eines Promotionsstipendiums nach dem Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses (NaföG) erhielt.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, die an mich glauben und die mich jederzeit sowohl moralisch als auch finanziell unterstützten und mir alles ermöglichten.