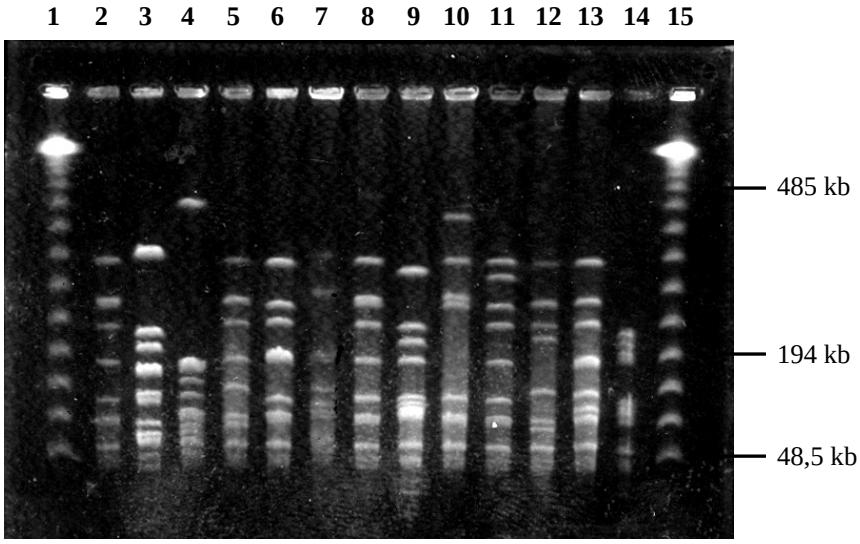
D. Ergebnisse

D.1 Untersuchung der Verwandtschaft von *C. jejuni*-Isolaten

D.1.2 Makrorestriktions-Analyse (Pulsfeld-Gelelektrophorese)

In dieser Arbeit wurden insgesamt 13 *C. jejuni*-Isolate durch Makrorestriktions-Analyse mit den Restriktionsendonukleasen *Bss*HII, *Eag*I und *Sun*I auf ihre genetische Verwandtschaft hin untersucht (s. Abb. 4a-c). Die Auswahl der Isolate erfolgte anhand des gemeinsamen Serotyps O:2, der weltweit sehr häufig angetroffen wird und in der Literatur bisher vorwiegend als genetisch heterogen beschrieben wurde. Die Stämme weisen darüber hinaus keine nähere epidemiologische Verwandtschaft auf, sondern wurden vielmehr aus unterschiedlichen Wirten und verschiedenen Regionen Deutschlands innerhalb eines Zeitraumes von 15 Jahren isoliert (s. Tab. 3 unter C.1.4). Bei NCTC11168 (O:2) und NCTC11828 (O:6) handelt es sich um bereits vielfach von anderen Untersuchern in der Makrorestriktionsanalyse und anderen Genotypisierungsverfahren eingesetzte Isolate, die in dieser Arbeit als Referenzstämme mitgeführt wurden. Die generierten Bandenmuster (s. Abb. 4a-c) wurden mithilfe des Computerprogrammes GelCompar 4.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ausgewertet und der ermittelte Verwandtschaftsgrad der Stämme in Form von Dendrogrammen ausgedrückt (s. Abb. 5). Um die Verwandtschaftsanalyse auf Stämme des Serotyps O:2 zu beschränken und damit die Aussagekraft der Untersuchung möglichst hoch zu halten, wurde der O:6-Referenzstamm NCTC11828 in die Dendrogramme nicht miteinbezogen.

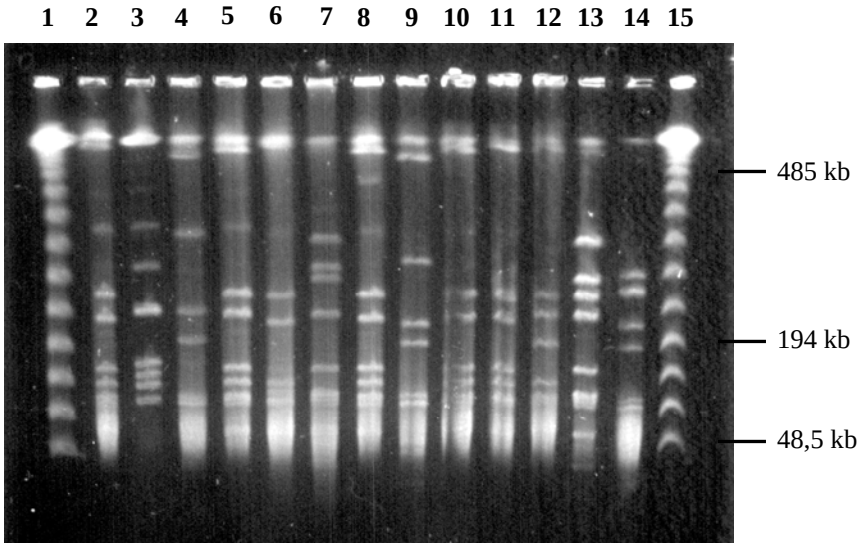
Abb. 4a): Makrorestriktions-Analyse mit *Bss*HII



1. Lambda Ladder PFG Marker, 2. NCTC11168, 3. NCTC11828, 4. K14, 5. H48, 6. ASH1805, 7. Kassel1595, 8. 5042, 9. E4St., 10. 1187-I, 11. BgVV1766, 12. Bi50, 13. Pb16, 14. BgVV1474, 15. Lambda Ladder PFG Marker.

Laufbedingungen: die DNS-Fragmente wurden in einem 1.2 %igen Agarose-Gel (Pulsed field certified agarose, Bio-Rad, München) durch einen Contour-clamped homogeneous electric field-Apparat (CHEF DR III; Bio-Rad, München) unter den folgenden Bedingungen aufgetrennt: Spannung: 6 V cm^{-1}, Pulszeiten: 15-40 s, Elektrodenwinkel: 120°, Temperatur: 14 °C, Laufzeit: 22 Std. Als DNS-Marker wurden λ Konkatemere (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) mitgeführt.

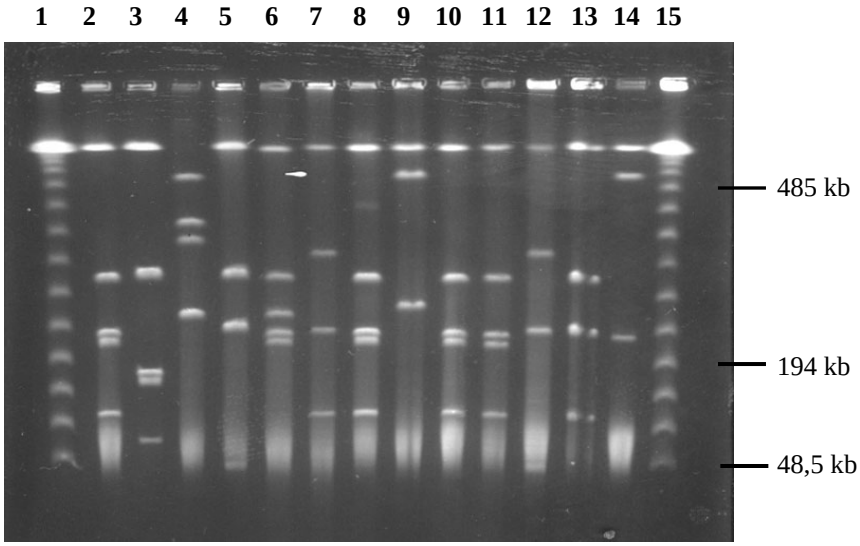
Abb. 4b): Makrorestriktions-Analyse mit *Eag*I



1. Lambda Ladder PFG Marker, 2. NCTC11168, 3. NCTC11828, 4. K14, 5.H48, 6. ASH1805, 7. Kassel1595, 8. 5042, 9. E4St., 10. 1187-I, 11. BgVV1766, 12. Bi50, 13. Pb16, 14. BgVV1474, 15. Lambda Ladder PFG Marker.

Laufbedingungen: **s. Abb. 4a)**

Abb. 4c): Makrorestriktions-Analyse mit *Sun*I

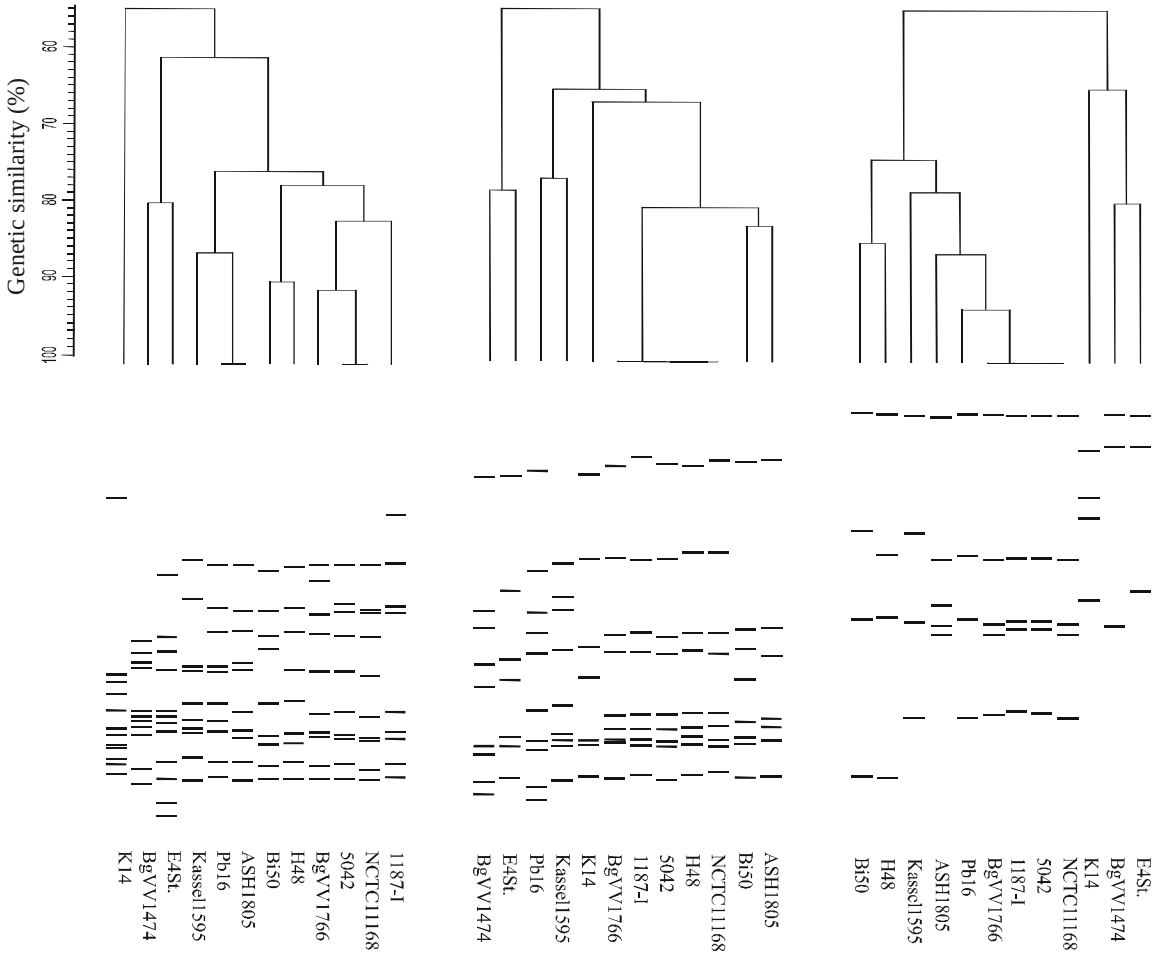


1. Lambda Ladder PFG Marker, 2. NCTC11168, 3. NCTC11828, 4. K14, 5. H48, 6. ASH1805, 7. Kassel1595, 8. 5042, 9. E4St., 10. 1187-I, 11. BgVV1766, 12. Bi50, 13. Pb16, 14. BgVV1474, 15. Lambda Ladder PFG Marker.

Laufbedingungen: **s. Abb. 4a)**

Abb. 5: Darstellung der genetischen Verwandtschaft der untersuchten *C. jejuni*-Stämme in Form von Dendrogrammen

Die genetische Ähnlichkeit der Bandenprofile wurde mithilfe des Computer-Programms GelCompar 4.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) unter Verwendung des Ward Algorithmus und des Dice Koeffizienten ermittelt. Dabei wurde eine maximale Toleranz von 1.0 % und eine Optimierung von 0.5 % bei allen drei verwendeten Enzymen (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) zugelassen.



Die mit *Bss*HII, *Eag*I und *Sun*I durchgeführte Makrorestriktions-Analyse ergab einen insgesamt hohen Grad an genetischer Diversität innerhalb der untersuchten *C. jejuni*-Isolate. Während die für alle O:2-Stämme ermittelte genetische Ähnlichkeit insgesamt nur gering ausfiel (*Bss*HII: 61%), wurden jedoch sowohl innerhalb der Humanisolate als auch zwischen humanen und von Tieren isolierten Stämmen identische Restriktionsmuster angetroffen (s. Abb. 5). Dabei stellte sich die Restriktionsendonuklease *Bss*HII als Enzym mit dem höchsten diskriminatorischen Potential heraus, da es insgesamt 11 unterschiedliche Restriktionsmuster mit bis zu 12 Fragmenten in der Größenordnung von ca. 20-455 kb bei den untersuchten Stämmen generierte. Lediglich die Isolate NCTC11168 und 5042 sowie ASH1805 und Pb16 zeigten in der *Bss*HII-Analyse identische Bandenmuster (s. Abb. 4a und Abb. 5). Die Restriktionsendonuklease *Eag*I dagegen erzeugte nur neun unterschiedliche Bandenmuster, die jeweils aus 7-10 Fragmenten in der Größe von ca. 35-520 kb bestanden. Der mit diesem Enzym ermittelte Verwandtschaftsgrad rangierte zwischen 66 und 100%, wobei für die Isolate NCTC11168, H48, 5042, 1187-I und BgVV1766 ein jeweils identisches Restriktionsmuster erzeugt werden konnte (s. Abb. 4b und Abb. 5). Die *Sun*I-Analyse ergab wiederum identische Bandenmuster für die Stämme NCTC11168, 5042, 1187-I und BgVV1766 und eine genetische Verwandtschaft von ebenfalls 66-100% für die untersuchten O:2-Isolate. Das Enzym generierte insgesamt 10 unterschiedliche Restriktionsprofile mit 3-5 Fragmenten, die in der Größenordnung von ca. 50-735 kb rangierten (s. Abb. 4c und Abb. 5). Insgesamt betrachtet, konnten nur für die beiden Stämme NCTC11168 und 5042 mit allen drei Enzymen identische Bandenmuster generiert werden. Die Isolate 1187-I und BgVV1766 zeigten sich in der *Eag*I- und *Sun*I-Analyse als ebenfalls übereinstimmend zu den genannten Isolaten. In der *Bss*HII-Analyse zeigten sie allerdings drei bzw. zwei Bandenabweichungen: dem *Bss*HII-Restriktionsprofil des Stammes 1187-I fehlten im Gegensatz zu den Restriktionsprofilen von NCTC11168 und 5042 zwei Banden der Größe von ca. 190 und 240 kb. Dafür wies es allerdings ein größeres, zusätzliches Fragment auf, welches der Größe der erwähnten zwei kleineren Fragmente entsprach. Das *Bss*HII-Restriktionsprofil des Stammes BgVV1766 zeigte dagegen die gleiche Anzahl an Fragmenten wie sie auch für NCTC11168 und 5042 ermittelt wurde. Eines dieser Fragmente erwies sich jedoch als etwas größer (325 kb) als das in diesen zwei Stämmen korrespondierende (290 kb) (s. Abb. 4a und Abb. 5). Die Ergebnisse der Makrorestriktions-Analysen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

D.2 Bestimmung der Genomgrößen der untersuchten *C. jejuni*-Stämme

Basierend auf den *Bss*HII-, *Eag*I- und *Sun*I-Restriktionsprofilen und mithilfe des Computer-Programms EasyWin 3.2 (Herolab, Wiesloch) wurden die Größen der einzelnen *Bss*HII-, *Eag*I und *Sun*I-Restriktionsfragmente bestimmt und hieraus die Gesamtgenom-Größe der untersuchten Stämme errechnet. Hierbei wurden Genomgrößen von 1,64-1,70 Mb ermittelt (s. Tab. 5). Für alle 13 untersuchten *C. jejuni*-Isolate ergab sich eine durchschnittliche Genomgröße von 1,68 Mb.

Tab. 5: Durch Makrorestriktion mit *Bss*HII, *Eag*I und *Sun*I ermittelte Genomgrößen der untersuchten *C. jejuni*-Stämme (Angaben in Mb)

Stammbezeichnung	*BssH*II	*Eag*I	*Sun*I	Durchschnittl. Genomgröße
NCTC11168	1,73	1,70	1,65	1,69±0.04
NCTC11828	1,65	1,68	1,67	1,66±0.02
K14	1,67	1,73	1,63	1,68±0.05
H48	1,54	1,70	1,69	1,64±0.1
ASH1805	1,68	1,72	1,66	1,69±0.03
Kassel1595	1,66	1,69	1,63	1,66±0.03
BgVV1766	1,74	1,70	1,65	1,70±0.05
E4 St.	1,64	1,72	1,65	1,67±0.05
1187-I	1,74	1,70	1,65	1,70±0.05
5042	1,73	1,70	1,65	1,67±0.03
Bi 50	1,57	1,74	1,70	1,67±0.1
Pb 16	1,68	1,77	1,58	1,68±0.1
BgVV1474	1,62	1,78	1,62	1,67±0.09

D.3 Identifizierung virulenzassoziierter Gene auf den durch *Bss*HII, *Eag*I und *Sun*I generierten Restriktionsfragmenten

Um die Lokalisation der virulenzassoziierten Gene *cad*F, *cdt*B, *che*Y, *fla*A, *fur* und *por*A Gene auf den durch *Bss*HII, *Eag*I und *Sun*I generierten Fragmenten zu bestimmen, wurden die Restriktionsfragmente auf eine Nylon-Membran transferiert und gegen die entsprechenden Gen-Sonden hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Southern-Blot-Hybridisierungen sind beispielhaft für die Gene *cad*F und *fur* in den Abbildungen 7a und 7b dargestellt. Die Verteilung dieser Gene im Genom des sequenzanalysierten *C. jejuni*-Stammes NCTC11168 ist in der Abbildung 6 wiedergegeben.

Abb. 6: **Zirkuläre Darstellung des *C. jejuni* NCTC11168-Genoms** (von außen nach innen: äußerer Ring: CDS; 2. Ring: Position der hypervariablen Regionen; 3. Ring: an der Synthese von Oberflächenstrukturen beteiligte Gene; 4. Ring: Ähnlichkeit eines jeden Gens zu dem entsprechenden Ortholog in *H. pylori* (sofern vorhanden); innerster Ring/Pfeile: Lage der in dieser Arbeit untersuchten virulenzassoziierten Gene auf dem NCTC11168-Chromosom; die Gen-Lozi für die Lipooligosaccharid (LOS)- und Oberflächenpolysaccharid (OPS)- Synthese sowie für die Flagellarmodifikation (FM) sind hervorgehoben [modifiziert nach Parkhill et al., 2000]).

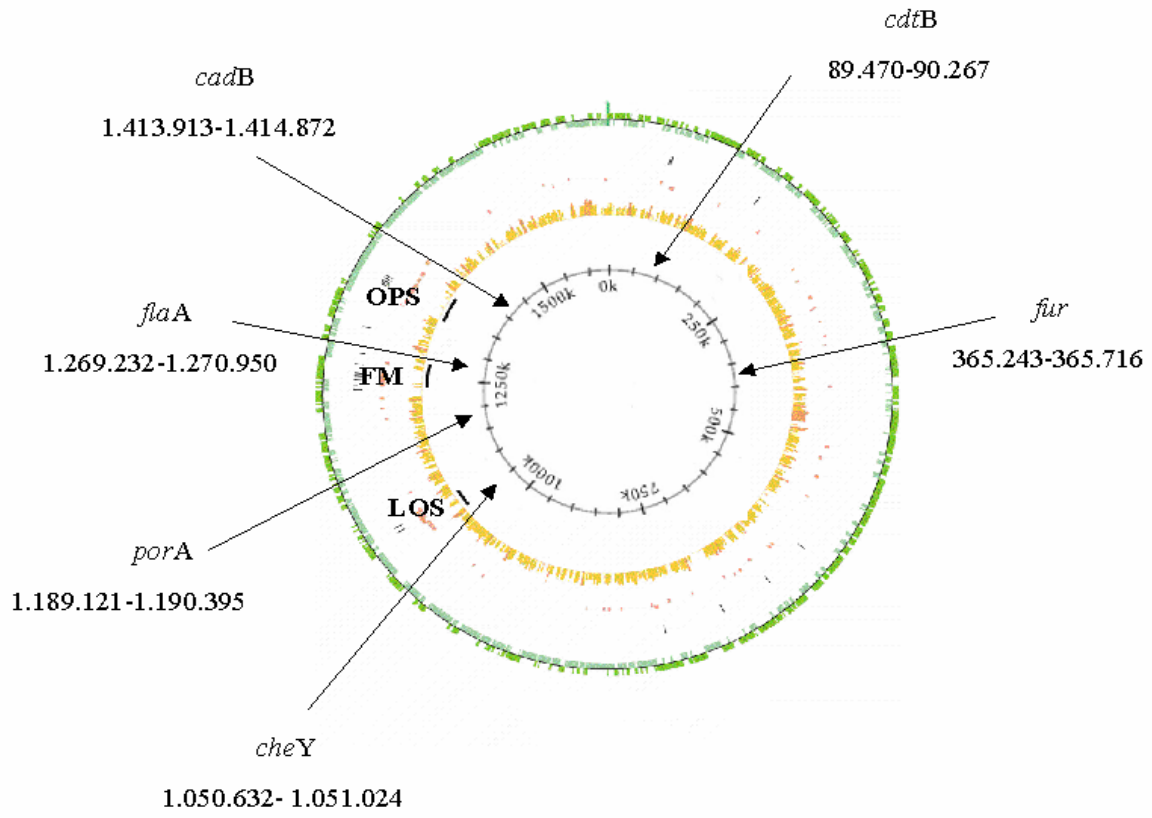
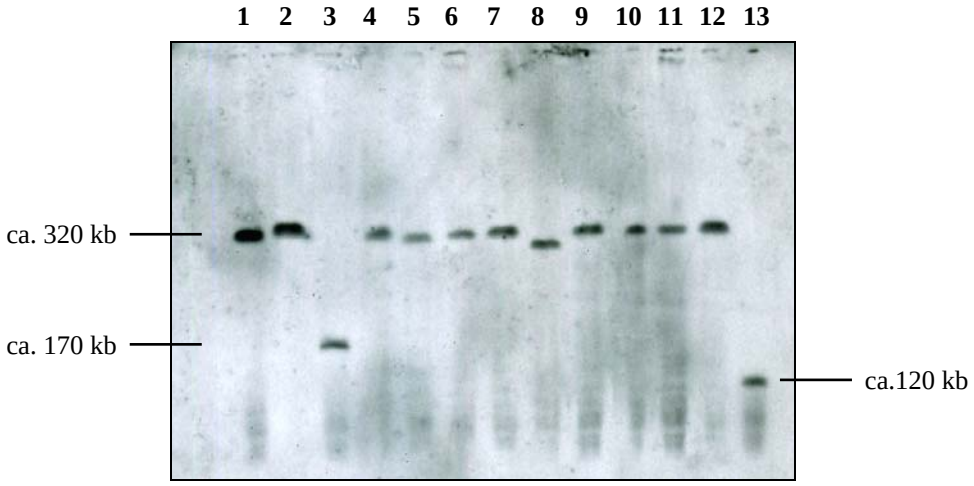
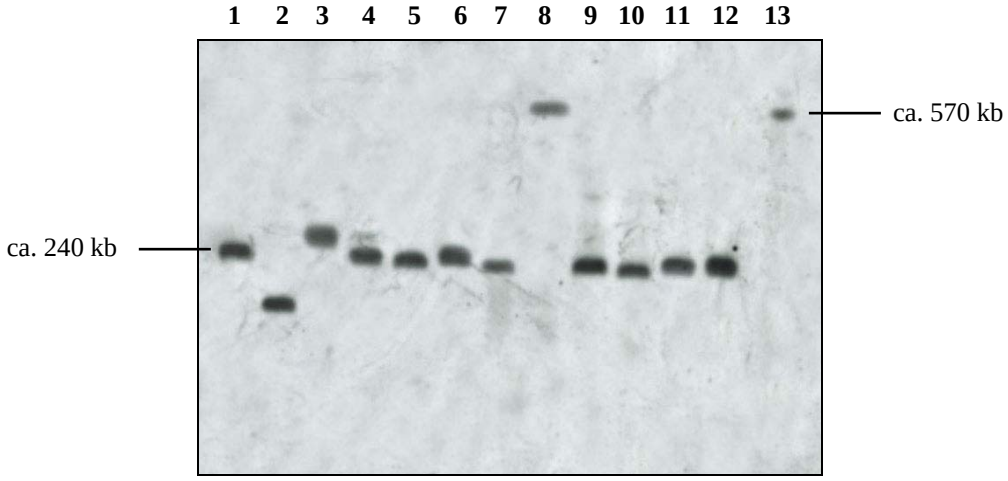


Abb. 7a): Southern-Blot-Hybridisierung der *cad*F-Sonde gegen die durch *Bss*HII generierten Restriktionsfragmente



1. NCTC11168, 2. NCTC11828, 3. K14, 4. H48, 5. ASH1805, 6. Kassel1595, 7. 5042, 8. E4St., 9. 1187-I, 10. BgVV1766, 11. Bi50, 12. Pb16, 13. BgVV1474.

Abb. 7b): Southern-Blot-Hybridisierung der *fur*-Sonde gegen die durch *Sun*I generierten Restriktionsfragmente



1. NCTC11168, 2. NCTC11828, 3. K14, 4. H48, 5. ASH1805, 6. Kassel1595, 7. 5042, 8. E4St., 9. 1187-I, 10. BgVV1766, 11. Bi50, 12. Pb16, 13. BgVV1474.

Abb. 8a): Lage der virulenzassoziierten Gene auf den *Bss*HII-Restriktionsfragmenten

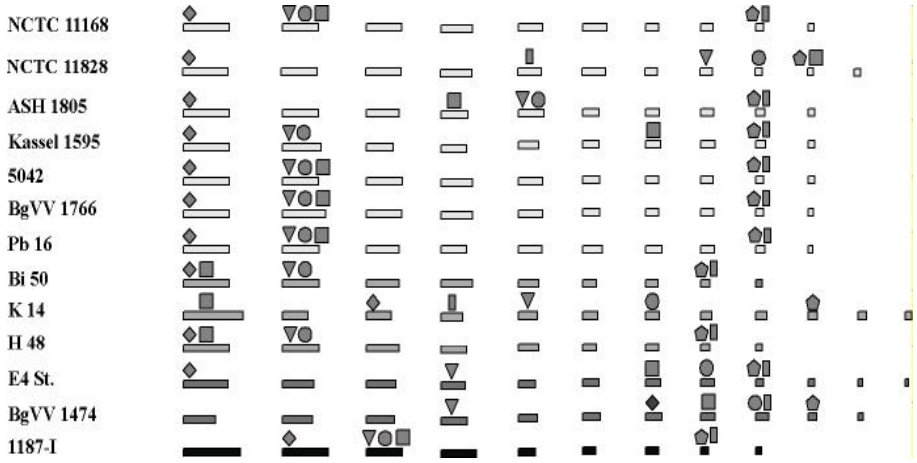


Abb. 8b): Lage der virulenzassoziierten Gene auf den *Eag*I-Restriktionsfragmenten

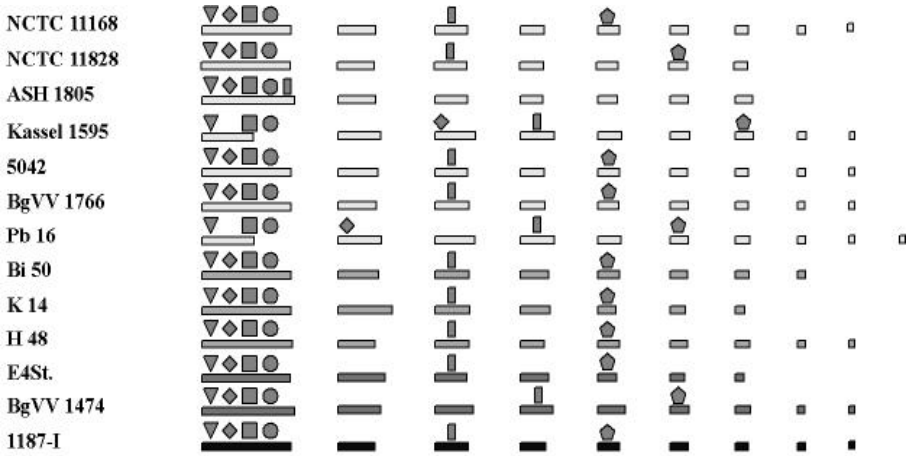
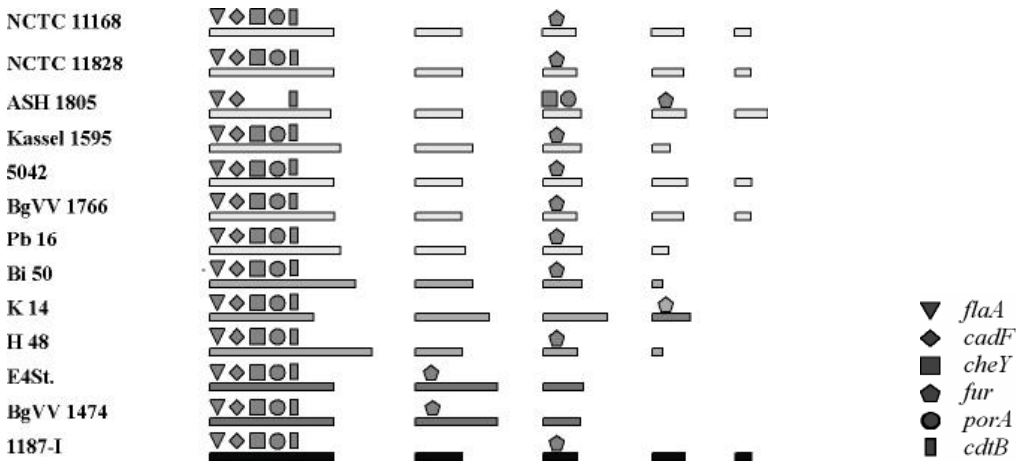


Abb. 8c): Lage der virulenzassoziierten Gene auf den *Sun*I-Restriktionsfragmenten



Die Balken repräsentieren Anzahl und Größe der ermittelten Restriktionsfragmente. Eine unterschiedliche Schattierung der Balken deutet auf die jeweilige Wirtsspezies hin, aus der entsprechende Stämme isoliert wurden (Mensch [6], Hund/Katze [4], Geflügel [2] und Rind [1].

Die Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse ergab eine heterogene Verteilung der untersuchten Gene auf den *Bss*HII-Restriktionsfragmenten, wobei jedoch die Isolate NCTC11168, BgVV1766, 5042 und Pb16 sowie H48 und Bi50 ein jeweils identisches Kartierungsmuster zeigten. Alle anderen Stämme zeigten unterschiedliche Hybridisierungsergebnisse, wobei für das Isolat 1187-I zu beachten ist, das im Vergleich zu den Stämmen NCTC11168, 5042 und BgVV1766 ein lediglich verschobenes Kartierungsmuster vorliegt, das mit den in der Makrorestriktions-Analyse mit *Bss*HII ermittelten Bandenabweichungen konform geht (s. Abb. 8a). Die Kartierungsergebnisse für die *Eag*I-Restriktionsfragmente zeigten eine überwiegend konservierte Lage der virulenzassoziierten Gene auf dem größten und dritt- bzw. fünftgrößten Fragment. Lediglich für die Isolate NCTC11828, ASH1805, PB16, Kassel1595 und BgVV1766 wurden hiervon abweichende Hybridisierungsergebnisse erzeugt (s. Abb. 8b). Auf den *Sun*I-Restriktionsfragmenten war eine ebenfalls einheitliche Verteilung der virulenzassoziierten Gene auf dem größten sowie auf dem drittgrößten Fragment zu beobachten. Eine Ausnahme bildeten in dieser Hinsicht die Stämme ASH1805, K14, E4-St. und BgVV1474, bei denen die Gene *che*Y (ASH1805) und *fur* (ASH1805, K14, E4-St. und BgVV1766) auf jeweils unterschiedlichen Fragmenten anzutreffen waren (s. Abb. 8c). Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

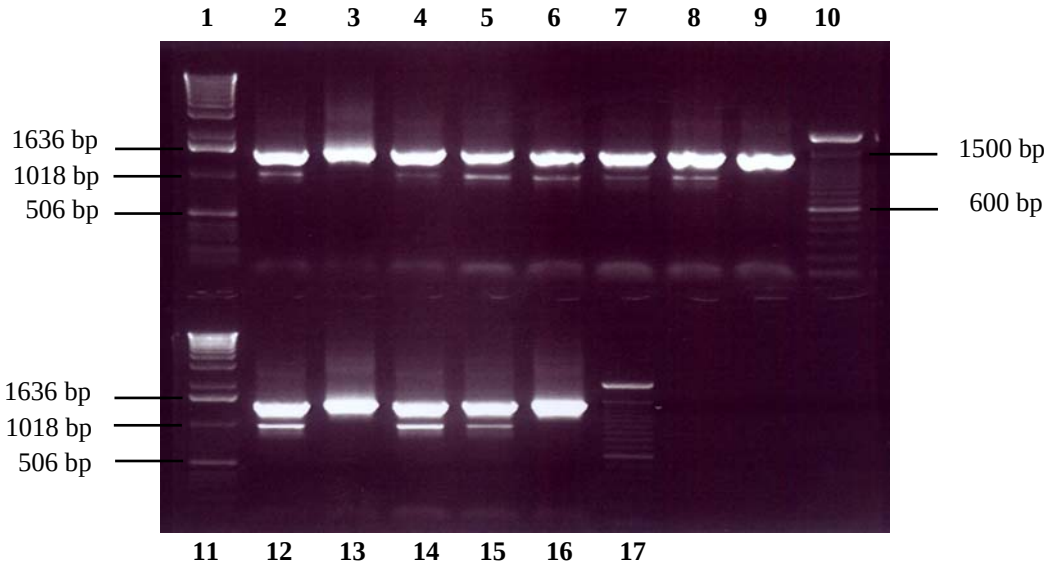
D.4 Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung (Mikro-Restriktionsanalyse)

Um den Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) der Flagellin-Gene (*fla*A/*fla*B) zu bestimmen, wurden diese zunächst bei allen Stämmen über eine PCR amplifiziert und anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Dde*I verdaut.

D.4.1 PCR mit *fla*A/*fla*B-spezifischen Primern

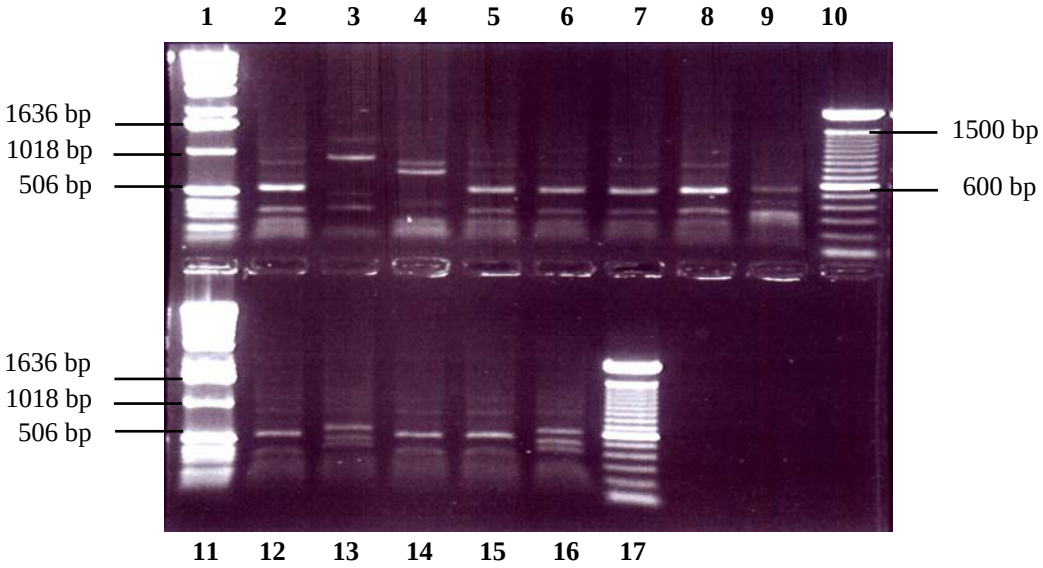
Für alle 13 untersuchten *C. jejuni*-Isolate konnte ein für die Flagellin-Gene A und B spezifisches Amplifikat in der Größe von 1490 bp generiert werden. Ein Großteil der Stämme wies zusätzlich ein ca. 1000 bp großes Fragment auf, welches auch durch Modifikation der PCR-Reaktionsbedingungen (Erhöhung der Annealing-Temperatur, Erhöhung der $MgCl_2$-Konzentration, Zugabe von 10% Glycerol [v/v]) nicht entfernt werden konnte (s. Abb. 9a). Aus diesem Grunde wurden die *fla*A/*fla*B-spezifischen Amplifikate aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNS anschließend mithilfe des „Agarose Gel DNA Extraction Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) extrahiert. Die auf diese Weise gereinigte DNS wurde im Restriktionsenzymverdau mit der Endonuklease *Dde*I (Invitrogen Corporation, Karlsruhe) eingesetzt (s. Abb. 9b).

Abb. 9a): Ergebnisse der PCR mit *fla*A-/*fla*B-spezifischen Primern



Obere Reihe: 1. 1 kb DNS-Marker, 2. NCTC11168, 3. NCTC11828, 4. K14, 5. H48, 6. ASH1805, 7. Kassel1595, 8. 5042, 9. E4St., 10. 100 bp DNS-Marker.
Untere Reihe: 11. 1 kb DNS-Marker, 12. 1187-I, 13. BgVV1766, 14. Bi50, 15. Pb16, 16. BgVV1474, 17. 100 bp DNS-Marker.

Abb. 9b): Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit *Dde*I



Obere Reihe: 1. 1 kb DNS-Marker, 2. NCTC11168, 3. NCTC11828, 4. K14, 5. H48, 6. ASH1805, 7. Kassel1595, 8. 5042, 9. E4St., 10. 100 bp DNS-Marker.
Untere Reihe: 11. 1 kb DNS-Marker, 12. 1187-I, 13. BgVV1766, 14. Bi50, 15. Pb16, 16. BgVV1474, 17. 100 bp DNS-Marker.

In der Flagellin-PCR-RFLP-Analyse mit *Dde*I konnten insgesamt fünf unterschiedliche Flagellin (Fla)-Typen für die untersuchten Stämmen ermittelt werden (s. Abb. 9b). Als dominierender Fla-Typ stellte sich dabei Typ a heraus, der sich bei den Isolaten NCTC11168, H48, ASH1805, Kassel1595, 5042, 1187-I, Bi50 und Pb16 zeigte. Ein ebenfalls identisches FlaA/B-Restriktionsprofil konnte auch für die Isolate BgVV1766 und BgVV1474 generiert werden (Typ e), während alle übrigen Stämme unterschiedliche Fla-Typen aufwiesen (s. Tab. 6).

Tab. 6: Charakteristika und genotypisches Profil der untersuchten *C. jejuni*-Stämme, ermittelt durch PFGE, Flagellin-PCR-RFLP-Typisierung und Southern Blot-Hybridisierung

Stammbez.	Quelle/Jahr der Isolierung	PFGE-Typ			Fla-Typ	Verteilung der virulenz-assoziierten Gene		
		*Bss*HII	*Eag*I	*Sun*I	*Dde*I	*Bss*HII	*Eag*I	*Sun*I
NCTC11168	Mensch (Worcester, UK), 1977	A	I	1	a	A	I	1
NCTC11828	Mensch (Chelmsford, UK), 1981	B	II	2	b	B	II	1
K14	Katze (Berlin), 1998	C	III	3	c	C	I	2
H48	Hund (Berlin), 1998	D	I	4	a	D	I	1
ASH1805	Mensch (Schleswig Holstein)*, 1996	E	IV	5	a	E	III	3
Kassel1595	Mensch (Hessen)*, 1996	F	V	6	a	F	IV	1
5042	Mensch (Berlin), 1984	A	I	1	a	A	I	1
E4St.	Ente (Berlin), 1986	G	VI	7	d	G	I	4
1187-I	Rind (Brandenburg), 1985	H	I	1	a	H	I	1
BgVV1766	Mensch/Rind (Sachsen)*, 1996	I	I	1	e	A	I	1
Bi50	Katze (Nordrhein-Westfalen), 1998	J	VII	8	a	D	I	1
Pb16	Katze (Nordrhein-Westfalen), 1998	E	VIII	9	a	A	V	1
BgVV1474	Huhn (Niedersachsen), 1999	K	IX	10	e	I	VI	4

*Ausbruch

D.5 Isolierung Stamm-spezifischer DNS-Fragmente mittels Repräsentativer Differenzanalyse

D.5.1 Repräsentative Differenzanalyse (RDA)

In dieser Arbeit wurde eine vereinfachte Repräsentative Differenzanalyse durchgeführt, der keine initiale PCR-gestützte Amplifikation ("Repräsentation") von "Tester"- und "Driver"-DNS voranging. Zur Durchführung dieser modifizierten Methode wurden in jeder RDA ca. 5 µg "Tester" (*C. jejuni* NCTC11828, Serotyp O:6; *C. jejuni* 1187-I und *C. jejuni* K14, beide Serotyp O:2) und 10 µg „Driver“ (*C. jejuni* NCTC11168, Serotyp O:2) eingesetzt.

Die Stämme wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt: der dem Serotyp O:6 angehörende Stamm NCTC11828 wurde ausgesucht, um mit unterschiedlichem Antigen assoziierte, variable DNS-Bereiche detektieren zu können. NCTC11828 verfügt außerdem über ein deutlich höheres Kolonisierungspotential als NCTC11168 [257]. Die O:2-Isolate 1187-I und K14 sind im Gegensatz zu den Human-Isolaten NCTC11168 und NCTC11828 aus Rind und Katze isoliert worden, was die Identifizierung Wirts-spezifischer DNS-Bereiche ermöglichen sollte. Die beiden Stämme wiesen in der Makrorestriktionsanalyse (s. Punkt D.1.2) teilweise nur geringe (1187-I), teilweise erhebliche (K14) Bandenunterschiede zum „Driver“-Stamm NCTC11168 auf. Bei dem als „Driver“ ausgewählten Stamm NCTC11168 handelte es sich bis vor kurzem um den bisher einzigen *C. jejuni*-Stamm, dessen Genomsequenz komplett sequenzanalysiert und annotiert vorliegt. Die Mitführung dieses Stammes war also für die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten unerlässlich.

Nach Subtraktion der "Driver"-DNS von der "Tester"-DNS durch Hybridisierung beider Gesamtgenome gegeneinander wurden die hiernach erhaltenen "Tester"-spezifischen Fragmente exponentiell amplifiziert. Nach Klonierung der PCR-Produkte in den pCRII®TOPO-Vektor, Identifizierung der rekombinanten Klone und Isolierung der darin enthaltenen Fragmente wurden diese anschließend sequenzanalysiert. Die Analyse der auf diese Weise erhaltenen Sequenzdaten ergab insgesamt 32 verschiedene RDA-Fragmente für die drei als "Tester" ausgewählten *C. jejuni*-Isolate, die in den Tabellen 4-6 näher charakterisiert sind. Die Bezeichnung dieser Fragmente erfolgte anhand des jeweiligen Stammes, aus dem sie isoliert wurden, sowie einer ihrer Organisation in Mikrotiterplatten nach vorgenommen Nomenklatur (A1-H12).

D.5.2 Überprüfung der Spezifität der RDA-Fragmente

Die Spezifität der generierten Fragmente wurde in dreifacher Hinsicht überprüft. Mit den Sequenzinformationen der RDA-Fragmente wurden zunächst Homologiesuchen in der EMBL-Datenbank durchgeführt, wobei die Sequenzdaten mit den für *C. jejuni* NCTC11168 bereits bekannten Sequenzdaten verglichen wurden. Die durch den Sequenzabgleich ermittelten Ergebnisse sind in den Tabellen 7-9 aufgeführt. Sofern vorhanden, sind dort auch Ähnlichkeiten zu dem erst kürzlich komplett sequenzanalysierten Stamm *C. jejuni* RM1221 (Serotyp O:53 [258]) vermerkt (Stand der Daten-Analyse: Juni 2005). Die Tabellen sind nach folgenden Kriterien unterteilt:

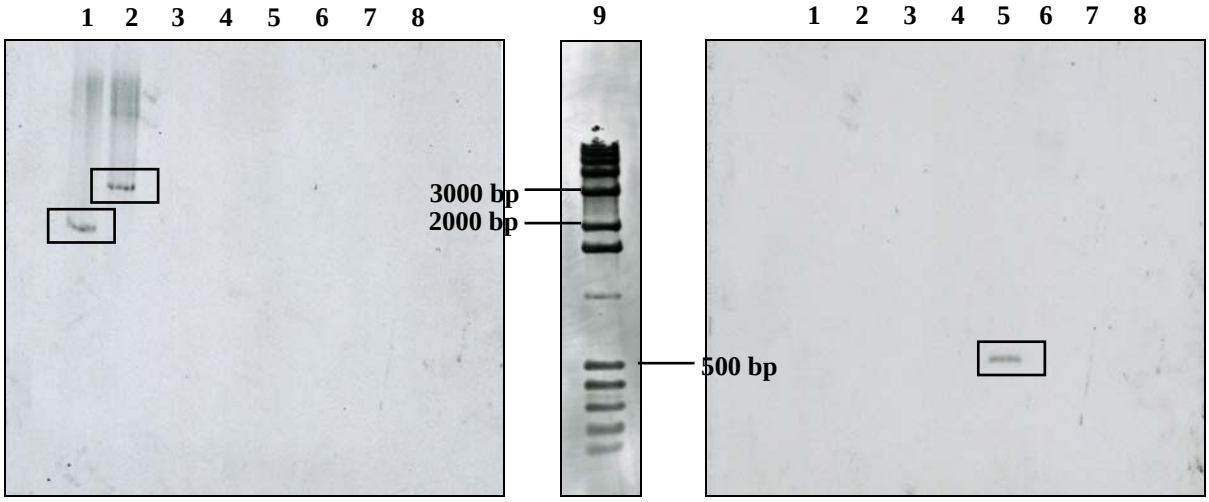
I. hohe Übereinstimmung zum Referenz- und „Driver“-Stamm NCTC11168 (>70%)

II. geringe Übereinstimmung zum Referenz- und „Driver“-Stamm NCTC11168 (<70%)

III. keine Übereinstimmung zum Referenz- und „Driver“-Stamm NCTC11168

Desweiteren wurde die Spezifität der RDA-Fragmente in einer Dot Blot-Analyse mit einer Digoxigenin-markierten DNS-Sonde überprüft, die aus chromosomaler Gesamt-DNS des „Drivers“ hergestellt wurde. Alternativ dazu wurden Southern-Blot-Analysen mit chromosomaler DNS von *C. jejuni* NCTC11168, NCTC11828, K14 und 1187-I und dem jeweiligen RDA-Fragment als Digoxigenin-markierter DNS-Sonde durchgeführt. In den Abbildungen 10a und 10b sind diese Southern Blots beispielhaft für die RDA-Fragmente 11828-D7 und K14-B12 dargestellt. Insgesamt konnten 28 unterschiedliche RDA-Fragmente in den drei „Tester“-Stämmen identifiziert werden, von denen sieben keinerlei Übereinstimmung zu den für *C. jejuni* NCTC11168 bekannten Sequenzdaten zeigten.

Abb. 10: Überprüfung der Spezifität von RDA-Fragmenten mittels Southern-Blot-Analyse



a) Sonde aus RDA-Fragment 11828-D7 **b) Sonde aus RDA-Fragment K14-B12**

1. NCTC11828, *Bst*YI-verdaut; 2. NCTC11828, *Hha*I-verdaut; 3. NCTC11168, *Bst*YI-verdaut; 4. NCTC11168, *Hha*I-verdaut; 5. K14, *Bst*YI-verdaut; 6. K14, *Hha*I-verdaut; 7. 1187-I, *Bst*YI-verdaut; 8. 1187-I, *Hha*I-verdaut; 9. 1 kb DNS-Marker.

D.5.3 Isolierung größerer RDA-Fragmente

Um die RDA-Fragment-flankierenden Sequenzbereiche zu identifizieren, wurde für mehrere dieser Fragmente (11828-D7, 11828-E7, 11828-G8, K14-B12 und 1187-I-A6) eine Inverse PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Dabei konnten jedoch keine größeren Amplifikate generiert werden. Die Sequenzanalyse kleinerer PCR-Produkte (200-300 bp) ergab keine Hinweise auf entsprechende fortführende DNS-Bereiche.

D.5.4 *C. jejuni* NCTC11828-spezifische Fragmente

Für den "Tester"-Stamm NCTC11828 wurden insgesamt 12 unterschiedliche RDA-Fragmente generiert, von denen acht (67%) eine hohe und zwei (17%) eine nur geringe Übereinstimmung zum Referenz- und "Driver"-Stamm NCTC11168 aufwiesen. Durch Vergleich der Genomsequenz von NCTC11168 mit dem RDA-Fragment 11828-A12, welches eine hohe Ähnlichkeit zu einem Glutamin-bindenden periplasmatischen Protein (*gln*H) und zum Flagellar-Biosynthese-Protein *fli*P von *C. jejuni* NCTC111168 aufweist, konnte nachgewiesen werden, dass die DNS-Region zwischen diesen beiden Genen unterschiedlich organisiert ist. Im Stamm NCTC11168 (O:2) sind hier ein putatives Lipoprotein (76 AS) und ein kleines hydrophobes Protein (75 AS) lokalisiert, während das aus NCTC11828 (O:6)

isolierte Fragment 11828-A12 in dieser Region lediglich 37 AS beherbergt. Diese zeigen eine hohe Übereinstimmung (97 bzw. 94%) zu entsprechend deletierten Regionen von *C. jejuni* RM1221 (O:53) und *C. jejuni* 81-176 (O:5). Das RDA-Fragment 11828-E7 wies bei der BLAST-Suche keine Ähnlichkeit zu den von *C. jejuni* bereits bekannten Sequenzdaten auf. Es handelt sich hierbei um einen DNS-Bereich mit Übereinstimmung zu einem hypothetischen Protein von *Clostridium tetani*. Für den ersten Abschnitt des RDA-Fragments 11828-G8 (116 bp) wurde eine 77%ige Ähnlichkeit zum Katalase-Gen des *C. jejuni*-Stammes Q59296 nachgewiesen. Der größere zweite Abschnitt (402 bp) zeigte jedoch keine Ähnlichkeit zu den für *C. jejuni* bisher bekannten Sequenzdaten. Für kurze Bereiche dieses Abschnitts wurden dagegen Übereinstimmungen zu hypothetischen Proteinen von *Salmonella* Typhimurium (27/37) und *Yersinia pestis* (23/23) ermittelt. Mindestens drei (25%) der für den Stamm NCTC11828 ermittelten RDA-Fragmente (11828-A12, 11828-E20 und 11828-H19) zeigen eine genetische Ähnlichkeit zu den für die Modifikation und Biosynthese von Oberflächenstrukturen verantwortlichen Genen von *C. jejuni*. Die Zusammenfassung der Charakteristika dieser RDA-Fragmente sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 7: Charakterisierung der für *C. jejuni* NCTC11828 ermittelten RDA-Fragmente

Fragment	Größe (bp)	Ähnlichkeit auf Protein-Ebene/Spezies	Identität der Aminosäure-Sequenz (%)	E-value*	Bemerkung
I.					
11828-A12	504	Glutamin-bindendes periplasmatisches Protein (*gln*H)			Signatur (Prosite): Glutamat-Rezeptor Domäne.
		C. jejuni NCTC11168	**80%**	**6e-58**	
		Aminosäure-bindendes Protein (CJE0906)			Region zwischen *glnH* und *fliP* ist in den *C. jejuni*-Stämmen NCTC11828, RM1221 und 81-176 deletiert.
		C. jejuni RM1221	**98%**	**1e-67**	
		Flagellar-Biosynthese-Protein (*fli*P)			
		C. jejuni NCTC11168	**100%**	**2e-10**	
		C. jejuni RM1221	**100%**	**2e-10**	
11828-E20	130	ADP-Glyceromannoheptose-6-epimerase (*waa*D)			
		C. jejuni NCTC11168	**90%**	**4e-13**	
		C. jejuni RM1221	**87%**	**2e-12**	
11828-E22	365	Integral-Membranprotein (Cj0999c, CJE1079)			
		C. jejuni NCTC11168	**85%**	**4e-53**	
		C. jejuni RM1221	**85%**	**4e-53**	
11828-H19	221	N-Acetylneuraminsäure-Synthetase (*neu*B3)			
		C. jejuni NCTC11168	**90%**	**3e-32**	
		N-Acetylneuraminsäure-Synthetase (*neu*B)			
		C. jejuni RM1221	**90%**	**4e-32**	
11828-G13	241	Stark saures Protein (Cj1178)			
		C. jejuni NCTC11168	**91%**	**3e-36**	
		Hypothetisches Protein (CJE1312)			
		C. jejuni RM1221	**91%**	**3e-36**	
11828-A15	68	Zweikomponenten-Response-Regulator (Cj0643)			
		C. jejuni NCTC11168	**91%**	**4e-07**	
		C. jejuni RM1221	**91%**	**4e-07**	
11828-B1	168	Cytochrom C (Cj0874c)			Signatur (Prosite): 2Fe-2S Ferredoxin, Eisen-Sulfat bindende Region.
		C. jejuni NCTC11168	**91%**	**5e-26**	
		Putatives Cytochrom C (Cj0037c)			CJE0036 entspricht Cj0037c (putatives Cytochrom C) aus NCTC11168; Cj0874c zeigt in *C. jejuni* RM1221 keine Übereinstimmung!
		C. jejuni NCTC11168	**39%**	**9e-07**	
		Protein der Cytochrom C-Familie (CJE0036)			
		C. jejuni RM1221	**39%**	**9e-07**	
11828-E10	99	Periplasmatisches Protein (Cj0606)			
		C. jejuni NCTC11168	**81%**	**2e-10**	
		Makrolid-spezifisches Efflux-Protein (*macA*)			
		C. jejuni RM1221	**81%**	**2e-10**	

Fragment	Größe (bp)	Ähnlichkeit auf Protein-Ebene/Spezies	Identität der Aminosäure-Sequenz (%)	E-value	Bemerkung
II.					
11828-C16	125	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase Carboxyl-Transferase (Beta-Untereinheit) (*acc*D)			
		C. jejuni NCTC11168	**63%**	**3e-12**	
		C. jejuni RM1221	**63%**	**3e-12**	
11828-D7	246	ATP-bindende Komponente eines Eisen-Aufnahme ABC-Transportsystems (Cj0173c, CJE0166)			Signatur (Prosite): ABC-Transporter Familie
		C. jejuni NCTC11168	**28%**	**0.003**	
		C. jejuni RM1221	**28%**	**0.003**	
		Zucker-bindendes Protein/ABC-Transporter			
		Mesorhizobium loti (34/83)	**40%**	**4e-10**	
III.					
11828-E7	457	Hypothetisches Protein CTC00549 *Clostridium tetani* E88 (58/83)	**69%**	**7e-39**	
11828-G8	402	Hypothetisches 16.9K Protein (Plasmid NTP16) *Salmonella* Typhimurium (27/37)	**72%**	**1e-06**	Signatur (Prosite): 4Fe-4S Ferredoxin, Eisen-Sulfat bindende Region.
		Hypothetisches Protein pPCP04 *Yersinia pestis* (23/23)	**100%**	**8e-08**	

***E-value (expectation value):** gibt ein Maß dafür an, inwiefern die ermittelte Übereinstimmung zufällig aufgetreten sein könnte. Je niedriger der E-value, desto unwahrscheinlicher ist die Zufälligkeit während ein hoher E-value eher eine zufällige Übereinstimmung vermuten lässt.

D.4.5 *C. jejuni* 1187-I-spezifische Fragmente

Für den Stamm *C. jejuni* 1187-I wurden insgesamt sechs verschiedene RDA-Fragmente generiert, von denen eines (17%) eine hohe und zwei (34%) eine nur geringe Übereinstimmung zum "Driver"-Stamm NCTC11168 aufwiesen. Die BLAST-Suche für die RDA-Fragmente 1187-I-A11, 1187-I-E2 und 1187-I-A6 ergab dagegen keine Übereinstimmung zu bereits bekannten *C. jejuni*-Datenbank-Einträgen. Es handelt sich hierbei um DNS-Bereiche mit Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein von *Xylella fastidiosa*, zu einer ATP-bindenden Komponente eines HP2SN-Glycerol-3-Phosphat-Transportsystems von *Brucella melitensis* und einer putativen Komponente des Bakteriophagen HP1 von *Hämophilus influenzae*. Die den RDA-Fragmenten des Stammes *C. jejuni* 1187-I zugeordneten Charakteristika sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8: Charakterisierung der für *C. jejuni* 1187-I ermittelten RDA-Fragmente

Fragment	Größe (bp)	Ähnlichkeit auf Protein-Ebene/Spezies	Identität der Aminosäure-Sequenz (%)	E-value	Bemerkung
I.					
1187-I-B4	368	Periplasmatisches Protein (Cj0034c)			
		C. jejuni NCTC11168	**97%**	**5e-64**	
		C. jejuni RM1221	**97%**	**5e-64**	
II.					
1187-I-A2	188	Periplasmatisches Protein (Cj0727)			
		C. jejuni NCTC11168	**38%**	**9e-08**	
		Substrat-bindendes Protein, ABC-Transporter (CJE0827)			
		C. jejuni RM1221	**38%**	**9e-08**	
1187-I-C3	123	Hypothetisches Protein			Sequenz liegt in hypervariabler Region.
		Cj1305c	**68%**	**5e-10**	
		Cj1310c	**68%**	**5e-10**	
		Cj1306c	**65%**	**3e-09**	
		C. jejuni NCTC11168			
		Hypothetisches Protein			
		CJE1495	**78%**	**1e-13**	
		CJE1504	**68%**	**5e-10**	
		C. jejuni RM1221			
III.					
1187-I-A11	168	Hypothetisches Protein XfasO02000019			
		Xylella fastidiosa (35/57)	**61%**	**9e-12**	
1187-I-E2	135	SN-Glycerol-3-Phosphat-Transport ATP-Bindeprotein UgpC	**52%**	**5e-08**	
		Brucella melitensis (23/44)			
1187-I-A6	296	Putatives Tail sheat Protein Bacteriophage HP1			
		Haemophilus influenzae (80/98)	**81%**	**2e-42**	

D.4.6 *C. jejuni* K14-spezifische Fragmente

Die für den Stamm *C. jejuni* K14 durchgeführte Analyse ergab insgesamt 10 verschiedene RDA-Fragmente, wobei sechs (60%) von ihnen eine hohe und weitere zwei (20%) eine nur geringe Übereinstimmung zum "Driver"-Stamm NCTC11168 aufzeigten. Das RDA-Fragment K14-A1 zeigte in der BLAST-Suche Übereinstimmungen sowohl zu einer Nukleotid-Zucker-Epimerase/Dehydratase (Cj1430c) als auch zum Flagellar-L-Ring Protein Precursor (*flg*H) von NCTC11168, weshalb angenommen werden kann, dass diese beiden Gene eine benachbarte Position im Stamm *C. jejuni* K14 einnehmen. Im "Driver"-Stamm NCTC11168 sind Cj1430c und *flg*H jedoch auf unterschiedlichen Segmenten des Genoms lokalisiert (5/6. bzw. 3/6.). Als DNS-Abschnitte ohne Übereinstimmung zum "Driver"-Stamm konnten die RDA-Fragmente K14-B12 und K14-F6 identifiziert werden, von dem ersteres eine hohe genetische Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein von *Campylobacter coli* RM2228 zeigte. Für das K14-F6-Fragment konnte dagegen eine deutliche Übereinstimmung zum Protein Tgh113 des *C. jejuni*-Stammes TGH9011 (ATCC 43431) ermittelt werden. Insgesamt drei der für den Stamm *C. jejuni* K14 identifizierten RDA-Fragmente (K14-D5, K14-A1 und K14-A6) zeigen eine genetische Ähnlichkeit zu den für die Synthese und Modifikation von Oberflächenstrukturen kodierenden Genen von *C. jejuni*. Eine detaillierte Beschreibung der für den Stamm *C. jejuni* K14 ermittelten RDA-Sequenzen ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Tab. 9: Charakterisierung der für *C. jejuni* K14 ermittelten RDA-Fragmente

Fragment	Größe (bp)	Ähnlichkeit auf Protein-Ebene/Spezies	Identität der Aminosäure-Sequenz (%)	E-value	Bemerkung
I.					
K14-E10	190	2-Oxoglutarat:Akzeptor Oxidoreduktase (Beta-Untereinheit) (Cj0537)			
		C. jejuni NCTC11168	**77%**	**8e-25**	
		C. jejuni RM1221	**77%**	**8e-25**	
K14-C6	266	Molybdän-bindendes Lipoprotein (Cj0303c)			
		C. jejuni NCTC11168	**80%**	**5e-37**	
		Periplasmatisches Molybdän-bindendes Protein, Molybdän ABC-Transporter			
		C. jejuni RM1221	**96%**	**2e-44**	
K14-H9	271	H+/K+-austauschende ATPase (beta-Kette) (*kdp*B)			Keine Übereinstimmung in *C. jejuni* RM1221.
		C. jejuni NCTC11168	**87%**	**4e-40**	
		C. jejuni RM1221	**-**	**-**	
K14-C3	466	1) Biotin-Synthese-Protein (*bio*C)			
		C. jejuni NCTC11168	**75%**	**7e-37**	
		C. jejuni RM1221	**97%**	**2e-48**	
		2) Hypothetisches Protein (Cj0305c/CJE0350)			
		C. jejuni NCTC11168	**68%**	**3e-22**	
		C. jejuni RM1221	**87%**	**7e-30**	
K14-A6	221	Hauptprotein der äußeren Membran (*por*A)			Signatur (Prosite): 2Fe-2S Ferredoxin, Eisen-Sulfat bindende Region.
		C. jejuni NCTC11168	**86%**	**5e-29**	
		C. jejuni RM1221	**93%**	**3e-34**	
K14-D5	176	ADP-Heptose-LPS-Heptosyltransferase (*waa*F)			
		C. jejuni NCTC11168	**88%**	**1e-53**	
		C. jejuni RM1221	**90%**	**2e-59**	
II.					
K14-A1	269	1) Nukleotid-Zucker-Epimerase/Dehydratase (Cj1430c)			Gene sind in NCTC11168 nicht benachbart.
		C. jejuni NCTC11168	**69%**	**2e-11**	
		2) Flagellar L-Ring-Protein Precursor (*flg*H)			1. Abschnitt (Cj1430c) zeigt keine Übereinstimmung in *C. jejuni* RM1221.
		C. jejuni NCTC11168	**47%**	**1e-18**	
		C. jejuni RM1221	**47%**	**1e-18**	
					Geringere Ähnlichkeiten zu entsprechenden Nukleotid-Zucker-Epimerasen/Dehydratasen von *C. jejuni*-Stämmen anderer Serovaren (O:5, O:23, O:36).

Fragment	Größe (bp)	Ähnlichkeit auf Protein-Ebene/Spezies	Identität der Aminosäure-sequenz (%)	E-value	Bemerkung
II.					
K14-H7	237	Hypothetisches Protein			Sequenz liegt in
		Cj1342c	**61%**	**2e-24**	hypervariabler Region.
		Cj0617	**57%**	**4e-21**	
		Cj1310c	**47%**	**1e-18**	
		C. jejuni NCTC11168			
		Hypothetisches Protein			
		CJE1531	**61%**	**2e-24**	
		CJE1504	**47%**	**3e-18**	
		C. jejuni RM1221			
III.					
K14-B12	229	Hypothetisches Protein CCOA0126			Signatur (Prosite):
		Campylobacter coli RM2228	**93%**	**5e-36**	Ankyrin Repeat Profil.
K14-F6	155	Tgh113			
		C. jejuni TGH9011	**96%**	**1e-56**	