

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Epigenetische DNS-Modifikation von *Campylobacter coli***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Anne-Marie Goldschmidt**  
aus Haselünne  
Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
Referent Priv. Doz. Dr. med. A. E. Zautner  
Ko-Referent/in: Prof. Dr. Tim Reißbarth

Datum der mündlichen Prüfung: 20.03.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Epigenetische DNS-Modifikation von *Campylobacter coli*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Gattung <i>Campylobacter</i> .....	1
1.2 Die Campylobacteriose .....	2
1.2.1 Epidemiologie .....	2
1.2.2 Infektionsquellen und Übertragungswege .....	4
1.2.3 Pathomechanismen .....	5
1.2.4 Klinisches Erscheinungsbild und Verlauf.....	11
1.2.5 Komplikationen der akuten Campylobacteriose.....	12
1.2.6 Postinfektiöse Komplikationen.....	12
1.2.7 Therapie .....	15
1.3 Epigenetische Mechanismen.....	16
1.3.1 Methylierung bakterieller DNS .....	16
1.3.2 DAM-Methylierung .....	17
1.3.3 DCM-Methylierung .....	18
1.3.4 Epigenetische Switch-Mechanismen: Phasenvariation .....	18
1.3.5 Restriktions-Modifikationssysteme .....	20
1.4 Phylogenetische Verwandtschaft .....	21
1.5 Zielsetzung .....	22
<b>2 Material .....</b>	<b>23</b>
2.1 Bakterienstämme.....	23
2.2 Nukleinsäuren .....	24
2.2.1 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion .....	24
2.2.2 Nukleinsäuren- Längenstandards.....	28
2.3 Verwendete Enzyme .....	28

2.4	Verwendete Kits .....	29
2.5	Puffer und Nährmedien .....	29
2.6	Chemikalien, Reagenzien, Geräte, Verbrauchsmittel .....	30
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>33</b>
3.1	Anzucht und Lagerung von <i>Campylobacter</i> -Isolaten .....	33
3.2	Isolation von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS).....	33
3.3	Konzentrationsbestimmung von DNS.....	34
3.4	<i>Isoschizomer-Digestions-Assay</i> der genomischen <i>C. jejuni</i> - und <i>C. coli</i> -DNS ....	34
3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
3.6	Aufbereitung der PCR-Produkte .....	39
3.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNS-Molekülen .....	40
3.8	<i>Multilocus-Sequenz-Typing</i> (MLST) .....	41
3.9	PacBio-Sequenzierung .....	42
3.10	Bioinformatik .....	44
3.10.1	Verarbeitung der SMRT-Rohdaten:.....	44
3.10.2	CRISPR-finder.....	45
3.10.3	Software .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
4.1	MLST und Kladen.....	47
4.1.1	Aufteilung der Isolate nach Spezies.....	47
4.1.2	Kladeneinteilung der <i>C. coli</i> -Isolate .....	50
4.2	<i>Isoschizomer-Digestions-Assay</i> der genomischen <i>C. jejuni</i> - und <i>C. coli</i> -DNS ....	56
4.2.1	DAM-/DCM-Aktivität und Phylogenetik.....	62
4.3	SMRT-Sequenzierung von <i>C.coli BFR-CA-9557</i> .....	62
4.3.1	Vergleich BFR-CA-9557 mit anderen <i>Campylobacter</i> -Isolaten .....	64
4.3.2	Poly-G/C-Abschnitte und Polysaccharidkapsel.....	66
4.3.3	<i>N-linked flagellar glycosylation locus</i> .....	68
4.3.4	Virulenz-assoziierte Gene.....	69

4.3.5	<i>Campylobacter jejuni</i> integrated element 1-like element (CJIE1).....	69
4.3.6	Methylierungsmotive und RM-Systeme im Genom von BFR-CA-9557 .....	69
4.4	SMRT-Sequenzierung von <i>Campylobacter coli</i> CCS249-07-13784.....	74
4.5	SMRT-Sequenzierung von <i>Campylobacter coli</i> CCS17341-20 .....	76
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
5.1	Kladen und Verwandtschaft.....	78
5.2	Methylierung der genomischen <i>C. jejuni</i> - und <i>C. coli</i> -DNS.....	79
5.3	SMRT-Sequenzierung.....	81
5.4	Das <i>C. coli</i> -Methylom.....	82
5.5	Ausblick .....	84
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>97</b>
8.1	Abbildungen.....	97
8.2	Verwendete Isolate.....	101
8.3	Bisherige Veröffentlichung.....	122

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Campylobacter jejuni</i> .....	2
Abbildung 2: <i>Minimum spanning tree</i> : Aufteilung nach Spezies, Teil 1 .....	48
Abbildung 3: <i>Minimum spanning tree</i> : Aufteilung nach Spezies, Teil 2 .....	49
Abbildung 4: <i>Minimum spanning tree</i> : Kladeneinteilung, Teil 1 .....	51
Abbildung 5: <i>Minimum spanning tree</i> : Kladeneinteilung, Teil 2 .....	52
Abbildung 6: UPGMA-Dendrogramm: Kladeneinteilung, Teil 1 .....	54
Abbildung 7: UPGMA-Dendrogramm: Kladeneinteilung, Teil 2 .....	55
Abbildung 8: <i>Minimum spanning tree</i> : DAM-Methylierung, Teil 1 .....	58
Abbildung 9: <i>Minimum spanning tree</i> : DAM-Methylierung, Teil 2 .....	59
Abbildung 10: <i>Minimum spanning tree</i> : DCM-Methylierung, Teil 1 .....	60
Abbildung 11: <i>Minimum spanning tree</i> : DCM-Methylierung, Teil 2 .....	61
Abbildung 12: Durch RAST identifizierte Subsysteme .....	63
Abbildung 13: Vergleich BFR-CA-9557 mit anderen Isolaten .....	65
Abbildung 14: Sequenz-Logo der acht Methylierungsmotive.....	73
Abbildung 15: UPGMA-Dendrogramm: DAM-Methylierung, Teil 1 .....	97
Abbildung 16: UPGMA-Dendrogramm: DAM-Methylierung, Teil 2 .....	98
Abbildung 17: UPGMA-Dendrogramm: DCM-Methylierung, Teil 1 .....	99
Abbildung 18: UPGMA-Dendrogramm: DCM-Methylierung, Teil 2 .....	100

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für die Amplifikation und Sequenzierung von <i>C. coli</i> MLST .....	25
Tabelle 2: Primer für die Amplifikation von <i>C. jejuni</i> MLST .....	26
Tabelle 3: Primer für die Sequenzierung von <i>C. jejuni</i> MLST .....	27
Tabelle 4: Enzyme .....	28
Tabelle 5: Kits .....	29
Tabelle 6: Chemikalien .....	30
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien .....	31
Tabelle 8: Geräte .....	32
Tabelle 9: Mastermix für <i>DpnI</i> / <i>MboI</i> .....	35
Tabelle 10: Mastermix für <i>Sau3AI</i> / <i>BstNI</i> .....	35
Tabelle 11: Mastermix für <i>EcoRII</i> .....	36
Tabelle 12: Mastermix für Kontrolle .....	36
Tabelle 13: Thermocycler-Programm für PCR .....	38
Tabelle 14: PCR-Ansatz für eine Probe .....	39
Tabelle 15: Agarose-Gel .....	41
Tabelle 16: DAM- und DCM-Methylaseaktivität von <i>C. coli</i> -Stämmen .....	57
Tabelle 17: Position der poly-G tracts im BFR-CA-9557-Genom .....	67
Tabelle 18: Position der poly-C tracts im BFR-CA-9557-Genom .....	67
Tabelle 19: Methylierungsmotive von <i>C. coli</i> -BFR-CA-9557 .....	71
Tabelle 20: Methylierungsmotive von <i>C. coli</i> -CCS249-07-13784 .....	75
Tabelle 21: Methylierungsmotive von <i>C. coli</i> -CCS249-07-13784 (REBASE) .....	75
Tabelle 22: Methylierungsmotive von <i>C. coli</i> -CCS17341-20 .....	77
Tabelle 23: Methylierungsmotive von <i>C. coli</i> -CCS17341-20 (REBASE) .....	77
Tabelle 24: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika der verwendeten <i>C. coli</i> -Stämme .....	101
Tabelle 25: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika der verwendeten <i>C. jejuni</i> -Stämme .....	106
Tabelle 26: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika der verwendeten Referenzstämme .....	121



## Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>Artemis Comparison Tools</i>
ansB	Periplasmatische Asparaginase mit akzessorischem sec-Signal
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BFR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI-Medium	<i>Brain Heart Infusion</i> -Medium (Herz-Hirn-Bouillon)
Bp.	Basenpaare
C.	<i>Campylobacter</i>
CC	klonaler Komplex (eng. <i>clonal complex</i> )
CadF	Cadharin F (Kalzium-abhängiges Fibronectin-bindendes Adhäsionsmolekül)
Cdt	Cytolethales distendierendes Toxin
Cia	<i>Campylobacter</i> -Invasions-Antigen
CJIE1	<i>campylobacter jejuni-integrated element</i>
CLRs	<i>continous long reads</i>
COS-Platten	Columbia Schafsblutagarplatten
CPS	<i>capsular polysaccharid gene locus</i>
CpG-Inseln	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DAM-Methylase	DNS-Adenin-Methylase
DCM-Methylase	DNS-Cytosin-Methylase
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EIA	Enzymimmunoassay
HflK/C	<i>high frequency of lysogenization locus K/C</i>
GBS	Guillan-Barré-Syndrom
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GGT	$\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase

Kb	Kilo-Basenpaare
LegAM	legionaminische Säure
LOS	Lipooligosaccharid
Mb	Mega-Basenpaare
MLST	Multilocus Sequenz-Typisierung
MSCRAMM	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
Mtasen	Methylasen
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RAST	<i>rapid annotation-using subsystem technology</i>
ReA	reaktive Arthritis
RKI	Robert Koch-Institut
RM-Systeme	Restriktions-Modifikations-Systeme
RNS	Ribonukleinsäure
SMRT-Sequenzierung	<i>Single Molecule Real Time-Sequenzierung</i>
SOR	Sulfit Cytochrom-c Oxidoreduktase
SPFH-Domäne	Stomatin, Prohibitin, Flotillin und HflK/C Domäne
spp.	Spezies
ST	Sequenztyp
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UPGMA	<i>unweight-pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT-Stamm	Wild-Typ-Stamm
ZMWs	<i>zero-mode waveguides</i>

# 1 Einleitung

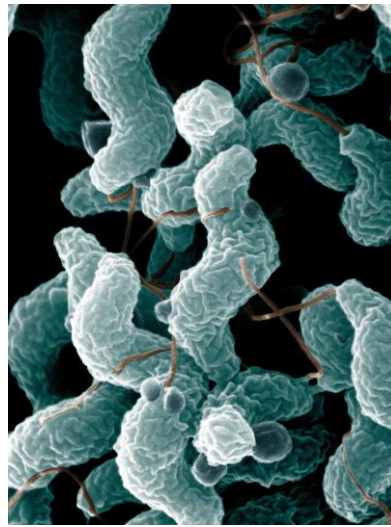
## 1.1 Die Gattung *Campylobacter*

Die Gattung *Campylobacter* gehört der Klasse der Proteobakterien an und innerhalb dieser zur Familie der *Campylobacteriaceae*. Von den von Humphrey *et al.* (2007) 18 anerkannten Spezies sind vor allem *C. jejuni* und *C. coli* als Erreger von Durchfallerkrankungen beim Menschen von Bedeutung (Zautner *et al.* 2010).

Weltweit sind *Campylobacter*-Infektionen der häufigste Grund für bakterielle Gastroenteritiden (Kaakoush *et al.* 2015). Mehr als 95 % der *Campylobacteriosen* entstehen durch die mikrobiellen Spezies *C. jejuni* und *C. coli* und stellen somit die wichtigsten humanpathogenen *Campylobacter*-Arten dar (Butzler 2004).

Die Gattung *Campylobacter* gehört zu den nichtsporenbildenden, gramnegativen Bakterien. Sie sind schlank, leicht gebogen oder spiralig gedrehte Stäbchen mit einer Länge von 0,5-5,0  $\mu\text{m}$  und einer Breite von 0,2–0,8  $\mu\text{m}$ . Flagellen an einem oder an beiden Enden, mono- bzw. amphotrich begeißelt, machen sie beweglich (Vandamme und De Ley 1991). *Campylobacter*-Spezies sind thermophil, haben ein Temperaturoptimum bei 42 ° Celsius und wachsen nur sehr langsam (Allos 2001). Dafür benötigen sie mikroaerophile (5-10 %  $\text{O}_2$ ) und kapnophile (5-10 %  $\text{CO}_2$ ) Bedingungen. Die Generationszeit von *Campylobacter* beträgt 90 min., im Vergleich hierzu beträgt sie bei *E. coli* nur 20 min.

1973 wurde *Campylobacter* als neue Spezies deklariert. Im Jahr 2001 ist das *Campylobacter*-Genom sequenziert worden (Allos 2001). Dabei wurden hypervariable Regionen gefunden, die möglicherweise eine Bedeutung für die Phasenvariation von Oberflächen und Flagellarproteinen besitzen und damit eine Rolle bei der Immunevasion und somit für das Überleben der Bakterien im Wirtsorganismus spielen (Parkhill *et al.* 2000).



**Abbildung 1: *Campylobacter jejuni***

(De Wood D, Pooley C 2008, *United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service*, Elektronenmikroskop)

## 1.2 Die Campylobacteriose

### 1.2.1 Epidemiologie

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde erstmalig eine *Campylobacter*-Infektion bei Nutztieren festgestellt. Jedoch war zu diesem Zeitpunkt die Gattung *Campylobacter* noch nicht bekannt (Allos 2001).

Heutzutage ist bekannt, dass die Infektion mit Bakterien der Gattung *Campylobacter* die weltweit häufigste bakterielle Ursache für Magen- Darmerkrankungen ist (Kaakoush *et al.* 2015). Insgesamt sind diese Infektionen häufiger als Infektionen mit *Salmonella spp.* oder *E. coli*. In Europa wird die Inzidenzrate mit 49/100 000 Einwohner/Jahr (2010) angegeben. In Deutschland liegt sie sogar noch höher bei 80/100 000 Einwohner/Jahr (2010) (Schielke *et al.* 2014). Laut dem RKI lag im Jahr 2005 die Zahl der gemeldeten *Campylobacter*-Infektionen (62 129) in Deutschland erstmals über denen der *Salmonellose* (52 257) (RKI 2006).

Eine Untersuchung vom Robert Koch-Institut aus dem Jahr 2014 konnte zeigen, dass die Anzahl an gemeldeten *Campylobacter*-Infektionen in Deutschland in den Jahren von 2001

bis 2010 kontinuierlich gestiegen ist. Die durchschnittliche Inzidenzrate betrug in dieser 10-Jährigen-Periode 72/100 000 Einwohner/Jahr, wobei die niedrigste Inzidenzrate im Jahr 2003 mit 58/100 000 und die höchste im Jahr 2007 mit 81/100 000 Einwohner/Jahr gemeldet war. Männer waren mit 96/100 000 häufiger betroffen als Frauen mit 83/100 000 Einwohner/Jahr (Schielke *et al.* 2014). Wie bereits von Butzler 2004 beschrieben, können alle Altersgruppen von einer *Campylobacteriose* befallen sein, jedoch zeigen sich hauptsächlich zwei Inzidenzgipfel. Zum einen in der frühen Kindheit (0-4 Jahre), zum anderen junge Erwachsene (15-44 Jahre). Bestätigt werden diese Inzidenzgipfel auch durch die Untersuchung von Schielke *et al.* (2014). Hier zeigten sich die höchsten Infektionsraten bei den 0-4-Jährigen mit durchschnittlich 123/100 000 und bei den 20-29-Jährigen mit 107/100 000 Einwohner/Jahr. Laut den aktuellsten Zahlen des RKI wurde im Jahr 2014 ein weiterer Anstieg der gemeldeten Fallzahlen mit 70.972 *Campylobacter*-Enteritiden übermittelt. Dies entspricht einer Inzidenz von 87,9 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner und stellt im Vergleich zum Vorjahr eine Zunahme der Erkrankungen um 11,5 % dar. Im Vergleich zu den vorherigen Jahren seit 2001 war die Anzahl der übermittelten Fälle 2014 am höchsten (RKI 2015).

Als mögliche Ursache für diesen signifikanten Anstieg der Inzidenz nennt Schielke *et al.* einen höheren Geflügelkonsum in der untersuchten Population. Seit 2006 ist laut der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung der Geflügelverzehr pro Kopf konstant von 10 Kilogramm auf 11,6 Kilogramm (2014) gestiegen. Außerdem sind die Programme zur Kontrolle und Eindämmung von *Campylobacter*-Infektionen in der Geflügelhaltung noch nicht genügend etabliert. Dagegen ist das Programm zur Bekämpfung von *Salmonellen* sehr erfolgreich, was sich an der Abnahme der *Salmonellosen* zeigt. Seit 2004 wurden zusätzlich Antigen-basierte Verfahren, ELISA sowie EIA, zu den Untersuchungsmethoden zum Nachweis von *Campylobacter*-Enteritiden, die nicht durch Stuhlkultur nachweisbar waren, in die epidemiologischen Statistiken miteinbezogen. Hierdurch lässt sich der Anstieg in den Fallzahlen für das Jahr 2005 erklären, da somit die Diagnostik sensitiver war als zuvor (Schielke *et al.* 2014).

Des Weiteren zeigt die *Campylobacteriose* eine saisonale Häufung, vor allem im Spätsommer und Herbst (Zautner *et al.* 2010; Konkel *et al.* 2001). In Deutschland ist zudem ein jährlich wiederkehrender kurzzeitiger Anstieg in der 2. und 3. Meldewoche zu verzeichnen (RKI 2015; Schielke *et al.* 2014).

Von den in Deutschland gemeldeten *Campylobacter*-Enteritiden aus dem Jahr 2014 mit Angaben zur Spezies 48.748 (69 %) entfielen 69 % auf *C. jejuni*, 9 % auf *C. coli* und 22 % auf *C. coli/jejuni* (nicht differenziert). Weiterhin entfielen jeweils weniger als 1 % der Angaben auf die Spezies *C. lari*, *C. fetus* und *C. upsaliensis* (RKI 2015).

### 1.2.2 Infektionsquellen und Übertragungswege

Neben der *Salmonellose* ist die Infektion mit *Campylobacter spp.* eine hauptsächlich durch Nahrungsmittel übertragene Erkrankung. Die Bakterien besiedeln ein breites Spektrum an Wild-, Nutz- und Haustieren. Hauptsächlich betroffen sind die meisten Geflügelarten, da in deren Intestinum, die für *Campylobacter jejuni* und *C. coli* besonders geeigneten mikro-aerophilen Bedingungen sowie eine optimale Temperatur um 42 ° Celsius vorherrscht (Zautner *et al.* 2010). Somit stellen der Verzehr von kontaminiertem Geflügelfleisch und die Zubereitung kreuzkontaminierter Nahrung (Salate usw.) die Hauptinfektionsquelle dar. Auch der Konsum von Rindfleisch und das Trinken unpasteurisierter Milch können zur Infektion führen. Darüber hinaus kann nach dem Baden in kontaminierten Oberflächengewässern eine Infektion auftreten (Zautner *et al.* 2010; Friedman *et al.* 2000). Die Inkubationszeit nach Infektion beträgt zwischen zwei und sieben Tagen. Bereits eine sehr geringe Dosis von Organismen (500-800) reicht aus, um die Erkrankung auszulösen (Black *et al.* 1988).

Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist durch eine Schmierinfektion möglich und trifft vor allem für Kleinkinder und Immunsupprimierte zu (Zautner *et al.* 2010; Allos 2001; Friedman *et al.* 2000).

Wichtige Präventionsmaßnahme einer durch Lebensmittel induzierten Campylobacteriose ist sorgfältiges Erhitzen vor allem von Geflügelfleisch mit hohen Temperaturen. Dadurch werden *Campylobacter*-Bakterien abgetötet (Zautner *et al.* 2010). Weitere Maßnahmen sind separate Schneidebretter für Geflügelfleisch und andere Zutaten sowie eine gründliche Handhygiene während der Zubereitung der Speisen. Schwangere und immungeschwächte Personen sollten den Verzehr von Rohmilch vermeiden.

### 1.2.3 Pathomechanismen

Um die Pathogenese der Campylobacteriose besser verstehen zu können, ist die Kenntnis von Virulenz- und Pathogenitätsmerkmalen essentiell.

Nach oraler Aufnahme von *Campylobacter*-Bakterien kommt es zunächst zu einer Besiedlung von Jejunum, Ileum und Kolon, was meist asymptomatisch verläuft oder Durchfallssymptome auslösen kann (Zautner *et al.* 2010; Janssen *et al.* 2008). Dafür muss das Bakterium die humane Intestinalflora überwinden.

Die physiologische Darmflora des Menschen bietet normalerweise eine natürliche Schutzbarriere gegen Infektionen. Diese sogenannte Kolonisationsresistenz verhindert eine Besiedlung des Darms mit pathogenen Keimen (Masanta *et al.* 2013; Stecher und Hardt 2008). Kommt es durch, zum Beispiel, besonders fettreiche Ernährung, genetische Prädisposition, Umweltfaktoren oder antibiotische Behandlungen (Masanta *et al.* 2013; Lozupone *et al.* 2012; Penders *et al.* 2006) zu einer Schwächung der Mikrobiota-Schutzbarriere der Darmmukosa, entsteht eine überschießende Entzündungsreaktion, und eine Kolonisierung mit darmpathogenen Keimen, wie *C. jejuni* oder *C. coli*, wird erleichtert (Bereswill *et al.* 2011b). Die in der Darmmukosa vorherrschenden Bedingungen führen in der Folge dazu, dass verschiedene Virulenzfaktoren, die eine Campylobacteriose auslösen, aktiviert werden (Konkel *et al.* 2001; Malik-Kale *et al.* 2008).

Auf diese virulenz-assoziierten Faktoren wird im Folgenden genauer eingegangen.

#### **Motilität und Chemotaxis**

„Die zielgerichtete Bewegung, d. h. die Kopplung der Motilität an die Rezeption der Konzentration bestimmter Stoffe in der Umwelt, wird als Chemotaxis bezeichnet“ (Zautner *et al.* 2010). *Campylobacter spp.* besitzen sowohl an einem oder an beiden Bakterienpolen eine Geißel, die die Motilität ermöglicht, als auch Chemorezeptoren zur Chemotaxis. Im Genom von *C. jejuni* wurden 13 Chemo-Rezeptor-Gene sowie zwei Aerotaxis-Gene identifiziert (Mund und Masanta 2016; Zautner *et al.* 2010; Marchant *et al.* 2002). Diese Rezeptoren wurden in drei Gruppen (A, B, C) unterschiedlicher Charakteristik eingeteilt. Gruppe-A-Chemorezeptoren weisen eine hohe Ähnlichkeit zu Familie-A-Chemorezeptoren des *Halobacterium salinarium* und Methylakzeptierenden-Rezeptoren von *E. coli* auf. Gruppe

B zeigt Ähnlichkeit zu den Familie-B-Chemorezeptoren von *Halobacterium salinarium* und Gruppe C zu den Familie-C-Chemorezeptoren von *Halobacterium salinarium* (Zautner *et al.* 2010; Zhang *et al.* 1996).

Die Geißeln des Bakteriums sind aus *O*-glykosyliertem Flaggelin aufgebaut. Sie spielen bei der Kolonisation des Intestinums eine bedeutende Rolle. Wassenaar und Blaser (1999) wiesen nach, dass Defekte in der Flagelle, z.B. durch fehlerhafte *O*-Glykosylierung, zu einer verminderten Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der Wirtszelle *in vitro* führten. Zum Teil erwiesen sich *Campylobacter spp.* mit Verlust der Motilität sogar als unfähig, den Darm von Menschen oder Versuchstieren zu kolonisieren (Zautner *et al.* 2010; Yao *et al.* 1994; Black *et al.* 1988). Der am stärksten exprimierte Chemorezeptor ist der Ameisensäure-spezifische Chemorezeptor TLP7 (Day *et al.* 2012; Bereswill *et al.* 2011b; Tareen *et al.* 2010).

### **Adhäsion und Invasion**

Zur Adhäsion an die Zellmembran als ersten Schritt der Interaktion des Bakteriums mit dem Wirt besitzen die meisten Bakterien Haftfimbrien (Haftpili) oder matrixbindende Faktoren, die auch „Nicht-Fimbrien-Adhäsine“ oder MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) genannt werden (Zautner *et al.* 2010).

*Campylobacter* besitzen keine solchen Haftfimbrien und nutzen daher in erster Linie matrixbindende Faktoren. Ein häufig vorkommender Matrixfaktor stellt das Fibronectin, welches als eine Art Brückenmolekül fungiert, dar. Das für *Campylobacter* identifizierte Calcium-abhängig fibronectin-bindende Membranprotein ist CadF (Zautner *et al.* 2010; Konkel *et al.* 1997). Es konnte gezeigt werden, dass CadF von *C. jejuni* besser an Fibronectin bindet, als das von *C. coli*, obwohl sich das Genom nur um eine 39Bp lange Insertion unterscheidet. Liegt bei isogenen Stämmen jeweils ein defektes *cadF*-Gen vor, taucht der zuvor beschriebene Unterschied in der Zellinvasivität kaum noch auf. Dies lässt darauf schließen, dass CadF ein bedeutender Pathogenitätsfaktor ist (Zautner *et al.* 2010; Krause-Gruszczynska *et al.* 2007). Durch Biopsien von Patienten mit Campylobacteriose konnte nachgewiesen werden, dass *Campylobacter* zellinvasiv ist und intrazellulär zu finden ist (Zautner *et al.* 2010; Grant *et al.* 1993). *CadF* spielt hierbei eine Doppelrolle: Es vermittelt direkt über Fibronectin die initiale Adhäsion an die Wirtszelle und löst sekundär eine Signalkaskade aus, die dann zur Internalisierung des gesamten Bakteriums führt (Zautner *et*



*al.* 2010; Krause-Gruszczynska *et al.* 2007). Die Internalisierung in die Zelle erfolgt über Mikrotubuli, aber aktinfilament-unabhängig (Zautner *et al.* 2010; Monteville *et al.* 2003).

Neben CadF gibt es weitere Faktoren, die das Invasivitätspotenzial von *Campylobacter*-Stämmen beeinflussen. Dazu gehört das Lipooligosaccharid (LOS). Anhand der genetischen Organisation des LOS-Clusters erfolgt mittels PCR die Gruppierung der *Campylobacter spp.* in sogenannten LOS-Klassen (Zautner *et al.* 2010; Parker *et al.* 2005). Bislang gibt es 19 LOS-Klassen (Zautner *et al.* 2010; Parker *et al.* 2008, 2005). Je nach LOS-Klassifikation gibt es Unterschiede in der Invasivität. Hierbei sind die sialinisierten LOS-Stämme - im Vergleich zu den nicht-sialinisierten Stämmen - von besonders hoher Invasivität geprägt. Sie stehen außerdem im Zusammenhang mit durch *Campylobacter* ausgelösten GBS.

### **Protein Cj0268c**

Das Protein Cj0268c des *Campylobacter*-Gens *cj0268c* spielt als ein weiterer Pathogenitätsfaktor eine wichtige Rolle bei der Infektion des Wirts (Tareen *et al.* 2013, 2010; Novik *et al.* 2010). Es hat ein molekulares Gewicht von 40,2 kDa und besitzt eine putative Transmembrandomäne sowie eine SPFH-Domäne (stomatin/prohibitin/flotilin/HflK/C). SPFH-Domänen sind in verschiedenen Spezies zu finden, von Bakterien bis hin zu Säugtieren. Bisher ist die Funktion der Domäne unklar (Tareen *et al.* 2013; Browman *et al.* 2007; Rivera-Milla *et al.* 2006; Morrow und Parton 2005). Beim Invasionsprozess ist das Protein *Cj0268c* bei der Adhäsion der Wirtszelle beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein nicht mit anderen *C. jejuni*-Proteinen interagieren muss, um einen adhäsionsfähigen Phänotyp zu entwickeln (Tareen *et al.* 2013). Heimesaat *et al.* führten 2014 Untersuchungen zur Rolle des Proteins Cj0268c während der *C. jejuni*-Infektion im Mausmodell durch. Nach Infektion der Mäuse sowohl mit dem Wildtyp-Stamm, als auch mit der Deletionsmutante und Komplementanten, hat man eine Kolonisation mit *C. jejuni* nach peroraler Infektion festgestellt. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Abwesenheit des *cj0268c*-Gens keinen Einfluss auf die Kolonisationskapazität von *C. jejuni* im Darm der untersuchten Mäuse hat. Mäuse, die mit der Deletionsmutante infiziert wurden, zeigten signifikant weniger stark ausgeprägte Immunpathologien und somit Entzündungsreaktionen im Intestinaltrakt auf. Außerdem wurden signifikant weniger apoptotische Zellen und T-Lymphozyten im Vergleich zu den mit dem WT-Stamm bzw. den mit Komplementanten

infizierten Mäusen gezählt, was zu einer reduzierten *C. jejuni* pro-inflammatorischen Immunantwort führte (Heimesaat *et al.* 2014). Letztlich zeigten Heimesaat *et al.*, dass obwohl es bei allen Mäusen zu einer Infektion und den resultierenden Symptomen gekommen war, das Gen *cj0268c* eine wichtige Rolle bei der Invasion und Adhäsion des Wirts spielt.

### **Legionaminsäure**

*C. jejuni* besitzt die Fähigkeit Sulfite mithilfe einer Sulfit Cytochrom-c Oxidoreduktase (SOR) zu oxidieren und damit als Elektronendonator zu benutzen. Die *Campylobacter jejuni*-SOR wird durch die Gene *cj0004c* und *cj0005c* kodiert (Myers und Kelly 2005; Tareen *et al.* 2011). Untersuchungen von Tareen *et al.* (2011) ergaben, dass *cj0005c* Defektmutanten deutlich weniger invasiv in Caco 2 Zellen waren (Tareen *et al.* 2011). Außerdem zeigten die *cj0005c*-defiziente Mutanten eine reduzierte Motilität sowie eine verminderte Adhärenzfähigkeit zur Wirtszelle (Tareen *et al.* 2011). Neben der reduzierten Invasionsfähigkeit ist die Transkription der Gene, die für die Synthese von legionaminischen Säuren (LegAm) verantwortlich sind, herunter reguliert, was durch eine eingeschränkte Kapazität in der Agglutinationsfähigkeit zum Ausdruck kam (Tareen *et al.* 2011). Die Acetoamino-Form der LegAm ist neben der Pseudoaminsäure auch eine Nonose (C-9-Zucker). Beide sind O-glykosidisch an Flaggelin gebunden und in den meisten *C. jejuni*-Stämmen zu finden (Logan *et al.* 2008; Tareen *et al.* 2011). Für die Synthese von LegAm sind acht Gene bekannt (McNally *et al.* 2007; Tareen *et al.* 2011). Die Untersuchung von Howard *et al.*, (2009) brachte zum Ergebnis, dass eine *cj1324-Knockout*-Mutante bei voller Motilität weniger Hydrophobie zeigt und neben einer eingeschränkten Autoagglutinationsfähigkeit auch eine eingeschränkte Biofilmbildung aufweist. Dies wird begründet durch die Abwesenheit von LegAm und die damit fehlende Glycan-Modifikation. Weiterhin war die Mutante nur eingeschränkt in der Lage, Hühnerisolate zu kolonisieren (Tareen *et al.* 2011). Untersuchungen von Tareen *et al.* (2011) hingegen konnten eine Einschränkung der Autoagglutination nachweisen, jedoch keine signifikante Einschränkung der Biofilmbildung. Es besteht somit eine Korrelation zwischen der eingeschränkten Fähigkeit der Autoagglutination und Adhäsion der Mutanten und der Downregulierung von Genen, die für die LegAm Synthese verantwortlich sind (Tareen *et al.* 2011).

### **Campylobacter Invasions Antigen (Cia)**

Als weitere virulenz-assoziierten Faktoren sind die *Campylobacter-Invasions-Antigene* (Cia) zu nennen. Bakterien besitzen Sekretionssysteme, die dem transmembranären Export von Proteinen dienen. Von den fünf bekannten Sekretionssystemen (T1-5SS) findet man bei pathogenen Bakterien häufig das Typ III-Sekretionssystem (T3SS). Dadurch können Virulenzfaktoren exportiert werden (Aizawa 2001). Auch bei *C. jejuni* findet man ein Typ III-homologes Sekretionssystem im Flagellenapparat, worüber bei der Zellinvasion sog. *Campylobacter Invasions-Antigene* in die Zelle injiziert werden (Dasti *et al.* 2010; Konkel *et al.* 2004). Es gibt acht verschiedene Cias (CiaA-CiaH), die sich nach ihrer Molekularmasse einteilen lassen (Rivera-Amill *et al.* 2001). Durch Kontakt zu epithelialen Zellen sowie durch die Gallensäure Desoxycholat (DOC) wird die Sekretion der Cias induziert (Zautner *et al.* 2010; Malik-Kale *et al.* 2008). Die Injektion wird durch Kontakt mit der Zelle sowie stimulusabhängig getriggert (Konkel *et al.* 2001). CiaB-Defektmutanten zeigen eine deutliche Reduktion der Invasionsfähigkeit von Zellen im Vergleich zum *C. jejuni* Wildtyp (Zautner *et al.* 2010; Rivera-Amill *et al.* 2001).

### **Bakterielle Toxine**

Typisch für die Campylobacteriose sind blutig-wässrige Diarrhoen, was den Verdacht auf eine Ausschüttung von Enterotoxinen lenkt (Zautner *et al.* 2010; Wassenaar 1997). Dieser Verdacht konnte jedoch nicht bestätigt werden. Bei der vollständigen Sequenzierung des Genoms durch Parkhill *et al.* (2000) konnte das einzig bisher gesicherte Toxin, das *Cytotoxales distendierende Toxin* (Cdt), für *Campylobacter* entdeckt werden (Zautner *et al.* 2010).

*Cdt* bewirkt eine Zelldistension, was sich als Aufblähen und Anschwellen der Zellen beobachten lässt. Strukturell besteht *Cdt* aus drei Untereinheiten (A, B, C), wobei *CdtB* die aktiv zytotoxische Komponente ist (Zautner *et al.* 2010; Karlyshev und Wren 2001). Sie bewirkt durch ihre *Desoxyribonuklease-(DNaseI-)Aktivität* (Zautner *et al.* 2010; Lara-Tejero und Galán 2000) einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Übergangsphase (Zautner *et al.* 2010; Pickett und Whitehouse 1999).

### **Tenazität und Stressresistenz**

Bedingt durch die mikroaerophilen und thermophilen Bedingungen, die *Campylobacter*-Spezies zum Überleben benötigen, wird ihre Tenazität im Vergleich zu anderen Erregern eingeschränkt. Des Weiteren kann *Campylobacter* aufgrund einer fehlenden Phosphofruktokinase nur Amino-, Carboxyl- und Ketonensäuren aus der intestinalen Standortflora als Energiequelle heranziehen. Einige Stämme sind jedoch in der Lage durch die Aufnahme von Genen, z. B. für die *gamma-Glutamyltransferase* (ggt) oder für ein sec-abhängiges Sekretionssignal für die *zytoplasmatische Asparaginase* (ansB), Glutamin und Glutathion sowie Asparagin zu metabolisieren. Hierdurch kann die Kolonisation des murinen Intestinums aber auch die Fähigkeit zur Leberinvasivität gesteigert werden (Zautner *et al.* 2010; Hofreuter *et al.* 2008).

Hinsichtlich der Stressresistenz sind *Campylobacter spp.* empfindlicher als viele andere darm-pathogene Keime. Dies wird vor allem durch den fehlenden globalen Regulator RpoS erklärt. Durch seine mikroaerophilen Eigenschaften, gekennzeichnet durch eine fehlende Katalase sowie Superoxiddismutase, ist *Campylobacter* empfindlich gegenüber Sauerstoff und seinen Reduktionsprodukten. Außerdem kann *Campylobacter* nicht, wie für viele andere Bakterien nachgewiesen, auf osmoregulatorische Mechanismen zur Stressbewältigung zurückgreifen (Zautner *et al.* 2010; Pearson *et al.* 2007; Fouts *et al.* 2005; Parkhill *et al.* 2000). Murphy *et al.* (2003) zeigten jedoch, dass *Campylobacter* sehr wohl auf saure als auch auf aerobe Bedingungen reagieren kann (Zautner *et al.* 2010). Gallensalze stellen einen weiteren Stressor dar, immer wenn eine intestinale Kolonisation sowohl aviärer als auch humaner Wirte erfolgt (Zautner *et al.* 2010; Gunn 2000). Demgegenüber können *Campylobacter spp.* die *Multidrug-Efflux-Pumpe CmeABC* exprimieren. Diese besteht aus drei Untereinheiten und wird dementsprechend auch von einem drei Gene umfassenden Operon, *cmeABC*, kodiert (Zautner *et al.* 2010; Lin *et al.* 2002). Gallensalze führen über eine Konformationsänderung im Transkriptionsregulator (CmeR) der CmeABC zu einer erhöhten Expression dieser Pumpe. Dadurch wird eine erhöhte Hemmkonzentration gegenüber mehreren Antibiotika sowie Fusidinsäure und Novobiocin erreicht (Zautner *et al.* 2010; Lin *et al.* 2005).

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, liegt das Temperaturoptimum für die Vermehrung der *Campylobacter* Arten bei 42 °C. Diese optimalen Bedingungen herrschen vor allem im Intestinum aviärer Organismen vor. Aber auch die im humanen Darm vorliegenden 37 °C stellen gute Voraussetzungen für *Campylobacter* dar. Liegen Temperaturen über

42 °C oder unterhalb 37 °C vor, erfahren *Campylobacter* spp. thermischen Stress. *Campylobacter* ist jedoch in der Lage extrem niedrige Temperaturen von < 4 °C zu überleben. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei diesen niedrigen Temperaturen Chemotaxis zu Orten besserer Bedingungen erfolgt (Zautner *et al.* 2010; Hazeleger *et al.* 1998). Oberhalb der optimalen 42 °C wird eine typische Hitzeschockreaktion ausgelöst. Mutanten, die Defekte in einem der nachgewiesenen Hitzeschockproteine haben, zeigten drastisch reduzierte Wachstumsraten bei 46 °C (Zautner *et al.* 2010; Konkel *et al.* 2001; Thies *et al.* 1999, 1998).

#### 1.2.4 Klinisches Erscheinungsbild und Verlauf

Das klinische Erscheinungsbild der Campylobacteriose verläuft unterschiedlich und erstreckt sich von einer rein asymptomatischen Infektion bis hin zu einer schweren neurologischen Erkrankung (Butzler 2004). *Campylobacter*-Bakterien besiedeln in der Regel zunächst den unteren Darmtrakt (Jejunum, Ileum, Kolon), wobei die Erkrankung in dieser Phase oftmals asymptomatisch verläuft (Zautner *et al.* 2010). In einigen Fällen schließt sich eine unspezifische Prodromalphase an, die in eine akute Enterokolitis übergehen kann. Die klinische Symptomatik der *Campylobacter*-Kolitis dauert im Mittel vier Tage (Humphrey *et al.* 2007).

Zu den typischen Symptomen gehören Durchfall, Fieber und abdominelle Krämpfe. Die Durchfälle sind meist wässrig, z. T. blutig und verlaufen selbstlimitierend. Dabei kann es von acht bis zu zehn Stuhlentleerungen pro Tag kommen. Bei einigen Patienten tritt kaum oder kein Durchfall, nur Bauchschmerzen und Fieber auf, welches häufig zu Fehldiagnosen führt (Allos 2001). Über 90 % der Patienten entwickeln während der Erkrankung durch *Campylobacter*-Bakterien Fieber von niedriger bis hoher (> 40 °C) Temperatur für die Dauer von circa einer Woche (Allos 2001). Die Diagnosestellung erfolgt vorrangig durch Stuhlkultur (Allos 2001). In 50 % der diagnostizierten Infektionen verläuft diese je nach Population asymptomatisch. Bei gesunden Personen ist *Campylobacter* nur selten in Stuhlproben zu finden (Allos 2001).

### 1.2.5 Komplikationen der akuten Campylobacteriose

Komplikationen treten nur in wenigen Fällen auf und betreffen häufig immunsupprimierte Patienten. Sie sind meistens das Resultat einer direkten Streuung der Bakterien. Dabei kann es zur Ausbildung einer Cholezystitis, Pankreatitis, Peritonitis oder einer gastrointestinalen Blutung kommen (Allos 2001). Jedoch sind dabei extraintestinale Infektionen relativ selten. Laut Allos (2001) kann auch ein Auftreten von Meningitis, Endokarditis, septischer Arthritis, Osteomyelitis oder neonataler Sepsis beobachtet werden. Eine Bakteriämie wird mit unter 1 % der Fälle angegeben und vorrangig bei immunkompromittierten Patienten, sehr jungen oder sehr alten Menschen beobachtet.

### 1.2.6 Postinfektiöse Komplikationen

Im Gegensatz zu den akuten Symptomen der Campylobacteriose können die postinfektiösen Komplikationen wie das Guillan-Barré-Syndrom, reaktive Arthritis und die entzündliche Darmerkrankung auch noch nach bereits ausgeheilten Infektionen auftreten (Butzler 2004). Die gefährlichste Komplikation stellt das Guillan-Barré-Syndrom dar, daher wird dieses im nächsten Abschnitt erläutert.

#### **Guillan-Barré-Syndrom**

Das erstmals 1859 von dem französischen Arzt Jean Landry beschriebene Guillan-Barré-Syndrom (GBS) wird als eine der gefährlichsten Komplikationen der Campylobacteriose angesehen (Allos 2001; Butzler 2004). Im Jahr 1916 beschreiben die Neurologen George Charles Guillan, Jean Alexander Barré sowie André Strohl, weswegen es eigentlich Guillan-Barré-Strohl-Syndrom heißt, die Erkrankung als Syndrom mit aufsteigender Lähmung. (Sie stellten außerdem die für das GBS charakteristische Liquor-Eiweißvermehrung fest.)

Das GBS ist eine i. d. R. reversible, periphere Neuropathie, wobei als häufiger Auslöser *C. jejuni* genannt wird. Neben *C. jejuni* kommen auch *Cytomegalie-Virus*, *Eppstein-Barr Virus* sowie *Mycoplasma pneumoniae* als Ursache in Frage (Zautner *et al.* 2014; Schwerer

2002). Neueste Erkenntnisse lassen einen Zusammenhang mit dem Zika-Virus vermuten. In einer Studie von Cao-Lormeau *et al.* (2016) konnten bei 42 Patienten aus Französisch-Polynesien mit Guillain-Barré-Syndrom nachweisbare Antikörper gegen das Zika-Virus als Anzeichen für eine Zika-Infektion - und damit ein vermutlicher Auslöser des GBS - gefunden werden. Typischerweise kommt es eine bis drei Wochen nach Krankheitsausbruch einer *Campylobacter*-Infektion zum Auftreten der Symptome des GBS (Allos 2001). Auf einer Basis von 91 Probanden wurden 34-39 % der GBS-Fälle als Postinfektionskomplikation nach Campylobacteriose angegeben (Zautner *et al.* 2014), allerdings besteht im Umkehrschluss nur ein niedriges Risiko, nach einer *C. jejuni*-Infektion ein GBS zu entwickeln. Die Inzidenz dafür beträgt < 1 von 1000 Infektionen (Zautner *et al.* 2010; Humphrey *et al.* 2007; Schmidt-Ott *et al.* 2006). Die GBS auslösende *Campylobacter*-Infektion verläuft meist ohne intestinale Symptome (Zautner *et al.* 2010; Kuroki *et al.* 1993).

Charakteristisch für das GBS ist eine axonale Schädigung, die mit einem erhöhten Risiko für irreversible, neurologische Beeinträchtigungen einhergeht (Zautner *et al.* 2010; Allos 2001). Pathophysiologisch kommt es zu einer Antikörperreaktion gegen die Sialinsäuregruppen des *Campylobacter*-Lipooligosaccharides (LOS), die mit GM1- und GD1a-Gangliosiden des ZNS kreuzreagieren. Diese molekulare Mimikry führt zur Schädigung der Myelinscheide peripherer Nerven (Godschalk *et al.* 2004; Yuki *et al.* 2004). Aus diesem Zusammenhang lassen sich auch die klinischen Symptome erklären. Dazu zählt eine aufsteigende Lähmung von zunächst Armen und Beinen, die sich im Extremfall auch auf die Atemmuskulatur bis hin zum ZNS ausbreiten kann (Godschalk *et al.* 2004).

Als Miller-Fischer-Syndrom bezeichnet man eine seltenere Variante des GBS, die einen Symptomkomplex aus Lähmungen im Bereich der Augenmuskeln, Ataxie und Areflexie zeigt. In diesem Fall richten sich die Autoantikörper gegen das GQ1b-Gangliosid (Chiba *et al.* 1993).

### **Reaktive Arthritis**

Die reaktive Arthritis (ReA) betrifft vor allem Patienten nach durchgemachter Infektion im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) im Alter von 30-40 Jahren. Dabei können einer inflammatorischen Gelenkentzündung von z.B. den Knien oder den Fußgelenken auch die Augen sowie der Genitaltrakt und auch die Urethra befallen sein (Kaakoush *et al.* 2015). Die Gelenkentzündung verläuft „steril“, der auslösende Erreger lässt sich nicht aus der Synovi-

a/Synovialis anzüchten (Trauzeddel und Girschick 2013). Die ReA gehört dem rheumatologischen Formenkreis der Spondylarthropathien an, zu der beispielsweise die Psoriasis-Arthritis angehört (Townes 2010; Pacheco-Tena *et al.* 2002; Yu 1999). Wie viele rheumatische Krankheitsbilder ist auch die ReA mit dem humanen Leukozyten-Antigen HLA-B27 assoziiert (Townes 2010; Leirisalo-Repo 2005; Braun *et al.* 2000). Die Symptome der ReA beginnen zumeist ca. 1 Monat nach durchgemachter GI-Infektion und legen sich innerhalb eines Jahres wieder (Kaakoush *et al.* 2015; Batz *et al.* 2013). Neben *Campylobacter* können z.B. *Salmonella enterica*, *Shigella dysenterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* oder *Chlamydia trachomatis* eine reaktive Arthritis triggern (Kaakoush *et al.* 2015; Pope *et al.* 2007). Nach Pope *et al.* (2007) lag die Inzidenz nach durchgemachter *Campylobacter*-Infektion eine ReA zu entwickeln bei 1-5 %. Aus anderen Studien geht eine Inzidenz von 3 bis 13 % nach *Campylobacter*-Infektionen hervor. Im Gegensatz dazu liegt die Inzidenz nach einer Infektion mit *E. coli* bei 0-9 %, 2-15 % nach Infektion mit *Salmonellen*, 1-10 % nach Infektion mit *Shigellen* und 0-14 % für Infektionen mit *Yersinien* (Kaakoush *et al.* 2015; Pope *et al.* 2007). Ajene *et al.* (2013) fassten 14 Kohortenstudien zusammen, um die Inzidenz für eine ReA nach *Campylobacter*-Infektion zu erfassen. Demzufolge entwickelten 537 von 63206 Pat. mit *Campylobacter*-Enteritis eine ReA, was eine Inzidenz von 9 von 1000 Pat. mit *Campylobacter*-Enteritis ergibt (Ajene *et al.* 2013; Kaakoush *et al.* 2015). Die Inzidenz zwischen Erwachsenen und Kindern variiert. Während Erwachsene in 8-16 % der Fälle eine ReA entwickeln, liegt sie bei Kindern bei 0-6 % (Ajene *et al.* 2013; Kaakoush *et al.* 2015). Kaakoush *et al.* berichteten 2015 von anderen Studien, die niedrigere Inzidenzen angaben und vermuten geographische Unterschiede.

### **Entzündliche Darmerkrankung**

Unter dem Begriff der entzündlichen Darmerkrankung werden alle chronisch inflammatorischen Reaktionen des GI-Traktes zusammengefasst. Dazu gehören unter anderen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (Kaakoush *et al.* 2015; Man *et al.* 2011). Morbus Crohn ist definiert als transmurale Infektion, die sich über den gesamten GI-Trakt ausbreiten kann. Im Gegensatz dazu beschränkt sich Colitis Ulcerosa auf das Kolon. Die Läsionen befinden sich v. a. in der Submukosa der Darmwand (Kaakoush *et al.* 2015; Man *et al.* 2011). Zu den Leitsymptomen der entzündlichen Darmerkrankung gehören Diarrhoe und Bauchschmerzen. Hypothesen zur Entstehung der entzündlichen Darmerkrankung, bei der es durch eine Dysregulation der Immunantwort zu einer chronischen Inflammation kommt,



sind zum einen eine gestörte mikrobielle Flora im Darm, zum anderen genetische Faktoren und Unterbrechungen des gastrointestinalen Epitheliums, getriggert durch umgebungsbedingte Faktoren (Kaakoush *et al.* 2015; Man *et al.* 2011). Gradel *et al.* (2009) zeigten, dass durch Infektionen mit *C. jejuni* und nachfolgender Enteritis ein erhöhtes Risiko besteht, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung zu entwickeln. Bereits geringe Veränderungen der Vielfalt und Belastungen der kommensalen Mikroflora des Darms aufgrund von Ernährung und anderen unbekanntem Agenzien kann die Invasion von *C. jejuni* ins intestinale Epithel fördern und zur chronischen Darmerkrankung führen (Bereswill *et al.* 2011b, 2011a; Masanta *et al.* 2013; Zautner *et al.* 2014). Zum einen sind Pat. mit bereits vorhandener chronischer Darmerkrankung anfälliger für darmpathogene Keime wie *C. jejuni* (Jess *et al.* 2011; Kalischuk und Buret 2010; Man *et al.* 2011; Zautner *et al.* 2014), zum anderen triggern wiederkehrende Episoden akuter Enterokolitis die Manifestation einer chronischen Darmerkrankung (Garcia Rodríguez *et al.* 2006; Gradel *et al.* 2009; Helms *et al.* 2006; Zautner *et al.* 2014).

### 1.2.7 Therapie

Da es sich bei der Campylobacteriose um eine oftmals selbstlimitierende Erkrankung handelt, ist in den wenigsten Fällen eine antibiotische Behandlung indiziert. Erkrankte sollten auf eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr und Elektrolyte achten, um einer Dehydratation vorzubeugen (Zautner *et al.* 2010). Dies ist insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern zu beachten. Kann eine ausreichende Hydratation nicht gewährleistet werden, ist unter Umständen eine intravenöse Zufuhr von Flüssigkeit und Elektrolyten sowie eine stationäre Überwachung vonnöten. Bei schwerwiegenden Krankheitsverläufen, die mit hohem Fieber oder blutigen Stühlen einhergehen, bei einer sehr langen Krankheitsdauer (> 1 Woche), bei Schwangerschaft oder bei immunsupprimierten oder HIV-infizierten-Patienten sollte eine Antibiotika-Gabe nach Resistenztestung in Erwägung gezogen werden (Allos 2001).

### 1.3 Epigenetische Mechanismen

Das Gebiet der Epigenetik befasst sich damit, in welcher Form die Aktivität und damit die Funktion eines Gens durch verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Dabei kommt es im Unterschied zu Mutationen nicht zu einer veränderten Gensequenz, somit kann sich der Phänotyp bei gleichem Genotyp unterscheiden. Conrad Hal Waddington hat den Begriff Epigenetik erstmals im Jahr 1942 benutzt und definierte Epigenetik als den „Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp hervorbringen, untersucht“. Eine modernere Definition, die auf neueren Erkenntnissen beruht, liefert z. B. Adrian Bird: „Die strukturelle Anpassung chromosomaler Regionen, um veränderte Zustände der Aktivierung zu kodieren, zu signalisieren, oder zu konservieren“ (Bird 2007).

Zu den epigenetischen Mechanismen zählen DNS-Methylierung und De-Methylierung, Histon-Modifikation, Transposons und nicht kodierende siRNA.

Im Weiteren wird vor allem auf die Methylierungsmechanismen genauer eingegangen, da sie Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren.

#### 1.3.1 Methylierung bakterieller DNS

Epigenetische Mechanismen können bei Bakterien zu autoregulatorischen Prozessen in der Expression bestimmter Gene aber auch über die bakterielle Infektion zu epigenetischen Veränderungen der Wirtszellen führen (Zautner und Frickmann 2013).

Im Rahmen der epigenetischen Modifikation verschiedener Bakterienarten spielt unter anderem der Mechanismus der Methylierung bakterieller DNS eine wichtige Rolle. Hierbei muss unterschieden werden zwischen eigener und fremder DNS. Für die eigene DNS dient die Methylierung oftmals als Schutzmechanismus gegen sequenzspezifische Restriktionsenzyme, wohingegen fremde unmethylierte oder nicht ausreichend methylierte DNS zerstört wird (Zautner und Frickmann 2013). Viele gramnegative Bakterien zeigen ein solches Methylierungsverhalten, insbesondere der Base Adenin (Barbeyron *et al.* 1984; Hughes und Johnson 1990; Roberts 1985; Zautner und Frickmann 2013).

Höhere eukaryotische Organismen zeigen Methylierungsmuster nur in der Base Cytosin, am häufigsten in den sogenannten CpG-Inseln, während in prokaryotischen Organismen Adenin und Cytosin parallel methyliert vorliegen können. Razin und Riggs (1980) und Barras und Marinus (1988) zeigten, dass eine Hemi- oder Voll-Methylierung von Adenin in GATC-Sequenzen bakterieller DNS die Genexpression erheblich verbessern kann. Wo hingegen die Methylierung von Cytosin in 5'-CCWGG-3' einen Verdau der DNS durch EcoRII-Methylasen verhindert und somit das zelluläre genetische Material schützt (Schlagman *et al.* 1976; Zautner und Frickmann 2013). Anders als bei der Methylierung der eigenen DNS können Bakterien, vor allem gramnegative, beim Wirt eine Hypermethylierung regulatorischer Sequenzen bewirken, was wiederum zu einer Inaktivierung der Genexpression führen kann (Zautner und Frickmann 2013).

Insbesondere das Methylierungsverhalten von *Escherichia coli* wurde vielfältig untersucht. In der überwiegenden Mehrheit zeigt *E. coli* drei verschiedene (DAM: DNS-Adenin-Methylase, DCM: DNS-Cytosin-Methylase, *EcoKI*-Methylase) standortspezifische DNS-Methylasen. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit verwandt, um das Methylierungsverhalten von *C. coli* und *C. jejuni* zu untersuchen.

### 1.3.2 DAM-Methylierung

Die DNS-Adenin-Methylase (DAM) von *E. coli* wird von dem *dam*-Gen kodiert und ist in der Lage den Transfer einer Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-Methionin auf die N6-Position von Adenin-spezifischen-GATC-Folgen während der Replikation zu übertragen (Barbeyron *et al.* 1984; Geier und Modrich 1979; Marinus und Morris 1973; Zautner und Frickmann 2013). Als Beispiel für die Rolle dieses Mechanismus während der Replikation bakterieller DNS, ist die 245 bp lange Gensequenz *oriC* von *E. coli* untersucht worden, da sie eine hohe Anzahl an GATC-Abfolgen in ihrer Sequenz beinhaltet. Es konnte gezeigt werden, dass bei vollständiger Methylierung der GATC-Sequenzen eine doppelt so hohe Aktivität im Vergleich zu unmethylierter Sequenz vorliegt (Barras und Marinus 1988; Boye 1991; Zautner und Frickmann 2013).

Neben *E. coli* konnte die DAM-Methylierung für viele verschiedene Bakterienspezies nachgewiesen werden. Dazu zählen neben *Campylobacter* spp. auch *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Salmonella* und *Streptococcus* (Barbeyron *et al.*

1984; Dingman 1990; Dreiseikelmann und Wackernagel 1981; Zautner und Frickmann 2013; Gómez-Eichelmann 1979).

### 1.3.3 DCM-Methylierung

Die DNS-Cytosin-Methylase (DCM), kodiert im *dcm*-Gen von *E. coli*, methyliert die C5-Position von Cytosin in 5'-CCAGG-3'- und 5'-CCTGG-3'-Sequenzen (Marinus und Morris, 1973; May und Hattman, 1975; Zautner und Frickmann, 2013). Bereits vor 35 Jahren wurde über die Anwesenheit von DCM-Methylierung in bakterieller DNS berichtet. Allerdings ist noch immer unklar, welche Auswirkungen diese Methylierung genau hat (Militello *et al.* 2012; Palmer und Marinus 1994; Zautner und Frickmann 2013). Ebenso wie die DAM-Methylierung wurde die DCM-Methylierung für viele verschiedene Spezies nachgewiesen.

Die DCM-Methylierung schützt das bakterielle Genom. Bei manchen Bakterien, wie beispielsweise *S. enterica* und *H. pylori*, ist die Anwesenheit von Methyltransferasen mit inaktiven Restriktionsenzym-Genen vergesellschaftet (Ibáñez *et al.* 1997; Kong *et al.* 2000; Lin *et al.* 2001; Zautner und Frickmann 2013). Dagegen liegt dies beim *dcm*-Gen von *E. coli* nicht vor (Zautner und Frickmann 2013).

Um die Adenin-spezifische sowie die Cytosin-spezifische Methylierung bakterieller DNS nachzuweisen, wie in der vorliegenden Arbeit angestrebt, kann die DNS mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut werden. (siehe Methodenteil)

### 1.3.4 Epigenetische Switch-Mechanismen: Phasenvariation

Phasenvariation ermöglicht Bakterien phänotypische Heterogenität in einer Population genetisch identischer Stämme. Sie ist eine erbliche aber reversible Form der Genregulation, welche sich in unterschiedlicher Weise auf die Expression spezifischer Proteine von Zellen einer klonalen Population auswirkt. Phasenvariation ist entscheidend für eine klonale Population in Bezug auf deren Überleben, Virulenz und Vermehrung (Bayliss 2009; Van der Woude 2011, 2006). Sie schützt Zellen vor fremder DNS, insbesondere vor Phagen

und kann in spezifischen Fällen auch stressresistente Phänotypen hervorbringen (Hoskisson und Smith 2007; Srikhanta *et al.* 2010; Van der Woude 2011).

Zur Phasenvariation gehören verschiedene Mechanismen, die man in genetische und epigenetische Mechanismen unterteilen kann. Genetische Mechanismen führen zu einer Änderung der DNS-Sequenz durch z.B. *slipped strand mispairing* oder *conservative site-specific recombination* sowie Insertionen oder Exzisionen (Van der Woude 2004). *Slipped strand mispairing* beschreibt einen Mechanismus, bei dem es während der DNS-Replikation oder der DNS-Reparatur zu einer Veränderung der Anzahl an DNS-*Repeats*, multiple gleiche DNS-Sequenzen, in einem Gen kommt. Somit entsteht eine Differenz an *Repeats* zwischen Mutter- und Tochter-DNS, wobei es zu einer längeren oder kürzeren *Repeat*-Anzahl kommen kann. Wenn es in der Folge zu einem Verschieben des Leserahmens oder zu einer geänderten *Repeat*-Anzahl in der Promotorregion kommt, kann dies zu einer unterschiedlich ausgeprägten Proteinexpression führen (Van der Woude 2004; Van Belkum *et al.* 1999; Van Belkum *et al.* 1998; Levinson und Gutman 1987). Daneben beschreibt die *site-specific recombination*, die ortsspezifische Rekombination, einen Austausch von sehr ähnlichen DNS-Sequenzen zwischen zwei Strängen durch spezifische Enzyme, was zu Insertion, Deletion oder Integration von DNS führen kann (Hallet und Sherratt 1997; Johnson 2002; Komano 1999; Van der Woude 2004). Zu den epigenetischen Mechanismen zählt z.B. auch die DNS-Methylierung, wie in 1.3 bereits genauer beschrieben (Van der Woude 2011, 2004).

Diese genannten Mechanismen führen zu einem spontanen An- und Abschalten von Genen und damit zu einer unterschiedlich ausgeprägten Proteinexpression, was innerhalb von wenigen Generationen zu unterschiedlichen Phänotypen innerhalb einer klonalen Population führt. Die Häufigkeit in der eine Population den Phänotypen wechselt, ist teilweise abhängig von externen Faktoren sowie Regulationsmechanismen, die die Population mitbringt. Das charakterisiert ein Gen oder eine bakterielle Spezies (Van der Woude 2004). Die meisten identifizierten Phasenvariationen betreffen Strukturen der Zelloberfläche, weshalb davon ausgegangen wird, dass Bakterien durch Phasenvariation das Immunsystem des spezifischen Wirt umgehen können (Van der Woude 2004). Für *Streptococcus pneumoniae* existiert eine starke Relation zwischen Phänotyp und Virulenz oder Kolonisationsfähigkeit. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass derjenige Phänotyp, der eine undurchsichtige Zellwand besaß, eine höhere Virulenz und damit eine systemische Infektion beim Wirt auslösen konnte. Der Phänotyp mit einer durchsichtigen Zellwand war in höhe-

rem Maße fähig sich im Nasopharynx des Wirts anzusiedeln (Van der Woude 2004; Waite *et al.* 2003; Kim und Weiser 1998). Auch für das in dieser Arbeit mehrfach beschriebene Bakterium *E. coli* konnten Mechanismen der Phasenvariation aufgedeckt werden, z.B. für die Flagelle. Diese ist für die Fortbewegung und Kolonisation des Bakteriums von Bedeutung. Das Protein FlhA, welches für die Expression von Flagellin, einem Bestandteil der Flagelle, verantwortlich ist, phasenvariiert bei *C. coli*-Stämmen (Park *et al.* 2000; Van der Woude 2004).

### 1.3.5 Restriktions-Modifikationssysteme

Prokaryotische Organismen besitzen sogenannte Restriktions-Modifikationssysteme (RM-Systeme). Diese erlauben ihnen, fremde DNS, die nicht ausreichend modifiziert ist, zu erkennen und zu verändern (Van der Woude 2004). Sie bestehen aus zwei Komponenten: Ein Anteil stellt eine Restriktionsendonuklease dar, die bestimmte DNS-Motive identifizieren kann. Die andere Komponente stellt eine verwandte DNS-Methyltransferase dar, die die eigene DNS methylieren kann, um sie vor Verdau durch andere Restriktionsendonukleasen zu schützen. (Tock und Dryden 2005; Zautner *et al.* 2015).

Es gibt vier verschiedene Typen von RM-Systemen. Typ I-RM-Systeme bestehen typischerweise aus drei verschiedenen Untereinheiten. Dazu gehören zwei Restriktionsendonuklease-Einheiten (R), welche die Fähigkeit besitzen, DNS zu verdauen. Die zweite Untereinheit (S) kann spezifische DNS-Sequenzmotive erkennen. Die dritte Untereinheit bilden zwei Methylasen (M), die die Methylierung von N6-Adenin katalysieren (Dryden *et al.* 2001; Murray 2000; Zautner *et al.* 2015). Hierdurch ist das Typ I-RM-System in der Lage, unmethylierte DNS zu verdauen, hemimethylierte DNS weiter zu methylieren und vollmethylierte DNS nicht zu verdauen (Vovis *et al.* 1974; Zautner *et al.* 2015). Typ II-RM-Systeme bestehen meistens aus zwei homodimeren R-Untereinheiten und einer separaten M-Einheit, wobei die R- und die M-Einheit dieselben DNS-Motive erkennen (Pingoud und Jeltsch 2001; Zautner *et al.* 2015). Typ III-RM-Systeme bestehen aus zwei Modifikationseinheiten (Mod) und zwei R-Untereinheiten (Meisel *et al.* 1992; Zautner *et al.* 2015). Typ IV-RM-Systeme setzen sich aus zwei separaten R-Untereinheiten zusammen. Diese können DNS verdauen, die entweder methyliertes, hydroxymethyliertes oder glucosylhydroxymethyliertes Cytosin enthält (Sutherland *et al.* 1992; Zautner *et al.* 2015).

## 1.4 Phylogenetische Verwandtschaft

Die Definition der phylogenetischen Klade beschreibt eine Gruppe von Isolaten mit gleicher Abstammung. *Campylobacter coli*-Stämme lassen sich über ihre phylogenetische Verwandtschaft im Vergleich zu *Campylobacter jejuni*-Stämmen in verschiedene Kladen einteilen.

Die phylogenetische Analyse von Sheppard *et al.* zeigt, dass *C. coli*-Stämme sich in drei verschiedene phylogenetische Gruppen (Kladen) einteilen lassen (Sheppard *et al.* 2008, 2013; Skarp-de Haan *et al.* 2014). Es gibt Evidenz, dass die Kladen mit der Herkunft der Isolate in Verbindung gebracht werden können (Sheppard *et al.* 2010; Sopwith *et al.* 2010). Isolate der Klade 1 kolonisieren vornehmlich Schweine, sind aber auch bei Geflügel und Menschen nachweisbar (Litrup *et al.* 2007; Sheppard *et al.* 2010; Zautner *et al.* 2015). Klade 2- und 3-Isolate kommen häufig im Oberflächenwasser vor (Sheppard *et al.* 2010; Sopwith *et al.* 2010).

Weitere Untersuchungen zur Verwandtschaft zwischen *C. jejuni*-Isolaten und *C. coli*-Isolaten zeigten, dass Klade 1-Isolate eine hohe genomweite Introgression, eine Bewegung eines Gens oder Chromosoms von einer Art auf eine andere mikrobielle Art, mit *C. jejuni*-Stämmen aufweisen. Wohingegen die *C. coli*-Kladen 2 und 3 weniger als 2 % Verwandtschaft zu *C. jejuni* zeigen (Skarp-de Haan *et al.* 2014). Durch MLST-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die zwei klonalen *C. coli*-Komplexe ST828 und ST1150 eine ausgedehnte genomweite Introgression zu *C. jejuni* aufweisen. Die beiden klonalen Komplexe gehören der Klade 1 an (Sheppard *et al.* 2008, 2013; Skarp-de Haan *et al.* 2014). Neben den bereits bekannten klonalen Komplexen untersuchten Skarp-de Haan *et al.* (2014) viele *C. coli*-Stämme, die keinem bekannten klonalen Komplex angehören und sich in zwei weitere Kladen einteilen ließen (Kladen 2 und 3). In diesen Kladen konnte nur 2 % Introgression und damit Verwandtschaft zu *C. jejuni* nachgewiesen werden (Sheppard *et al.* 2013; Skarp-de Haan *et al.* 2014).

## 1.5 Zielsetzung

*Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* weisen innerhalb ihrer mikrobiellen Spezies eine primär hohe genetische Variabilität auf. Neben Phasenvariation, LOS-Cluster und Kapsel-Polysaccharid-Cluster gibt es Mechanismen der Antigenvariation, so dass keine anhaltende Immunität nach durchgemachter Infektion induziert wird. Einer dieser Mechanismen ist die Phasenvariation von exponierten Strukturen, wie der Flagelle, der Kapsel oder der Zelloberfläche.

Voraussetzung für eine solche Phasenvariation sind homopolymere Trakte aus Poly-Adenin, -Thymin, -Cytosin oder- Guanin-Regionen, die das phasenverschobene Ablesen der DNS ermöglichen und welche im Genom von *C. jejuni* und *C. coli* stark ausgeprägt sind.

Epigenetische Mechanismen, die die Phasenregulation steuern, wurden insbesondere für *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* beschrieben. Hier spielt insbesondere die DNS-Methylierung von Translations-Initiationsstellen eine besondere Rolle. Ein häufiges Beispiel hierfür ist die Expression unterschiedlicher Formen der bakteriellen Flagelle.

Das Ziel meiner Dissertation ist es, das Methylom sowie die RM-Systeme von jeweils einem *C. coli*-Isolat der drei beschriebenen Kläden zu analysieren. Hierfür sollen die Isolate-Gruppen, welche eine Adenin- und/oder Cytosin-Methylierung durchführen können, mithilfe verschiedener *Isoschizomer-Digestions-Assays* identifiziert und mittels *Multilocus-Sequenz-Typisierung* phylogenetisch klassifiziert werden.

Darüber hinaus sollen über 454- und *Pac-Bio-Whole-Genome-Shotgun-Sequenzierung* nach *DNS-Library-Präparation* mittels methylierungsspezifischen Verdaus entsprechend regulierte Regionen untersucht werden und Methylierungsmuster sowie Restriktions-Modifikations-Systeme (RM-Systeme) identifiziert werden.



## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

Für die vorliegende Arbeit wurden 293 *C. jejuni*-Isolate, die bereits in zwei Vorarbeiten MLST-typisiert wurden (Zautner et al. 2011, 2012), und 95 bislang nicht-typisierte *C. coli*-Isolate, die *C. jejuni*-Referenzstämme NCTC11168, 81-176, 84-25, 81116/NCTC 11828 sowie der *C. coli*-Referenzstamm RM2228 verwendet.

Von den 293 *C. jejuni*-Isolaten wurden die Puten-Isolate, die Rinder-Isolate und ein Teil der Hühner-Isolate freundlicherweise von Herrn Prof. Thomas Alter (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) zur Verfügung gestellt. Weitere Hühner-Isolate stammen vom Friedrich-Löffler-Institut Jena, die Frau Dr. Ingrid Hänel bereitstellte.

Alle humanen Isolate stammen aus dem Stuhllabor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen, welche uns von Dipl. Biol. Ortrud Zimmermann zur Verfügung gestellt wurden. Hier erfolgte die Identifizierung mittels API Campy (Bio-merieux). Die Differenzierung zwischen *C. jejuni* und *C. coli* mittels Multiplex-PCR (nach Vandamme et al. 1997) und MALDI-TOF MS, mit dem Massenspektrometer Autoflex III TOF/TOF und BioTyper3.0-Software (Bruker Daltonics, Bremen).

Von den 95 *C. coli*-Isolaten wurden 53 Isolate erfreulicherweise vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin zur Verfügung gestellt. Aus dem hauseigenen Stuhllabor stammen 18 Isolate. Weitere 24 *C. coli*-Isolate stammen von Frau Prof. Sonja Smole Možina von der Universität Ljubljana in Slovenien.

Die DSMZ (Braunschweig) stellte alle Referenzstämme zur Verfügung.

Eine Übersicht über alle verwendeten Stämme ist in den Tabellen 24, 25 und 26 im Anhang zu finden.

## 2.2 Nukleinsäuren

### 2.2.1 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifizierung und Sequenzierung der sieben *C. coli-Houskeeping*-Gene, um eine MLST-Typisierung der vorhandenen *C. coli*-Isolate vorzunehmen, wurden die in der MLST-Database (<http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>) beschriebenen Primer verwandt, welche in Tabelle 1 angegeben sind. Weitere Primer wurden nach Angaben von Dingle *et al.* (2001) zur Charakterisierung von Klade 2- und 3- *C. coli*-Isolaten benutzt (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Alle Primerpaare stammen von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim). Nach Angaben des Herstellers wurden sie vor Gebrauch in *Aqua bidest* gelöst und auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}/\text{ml}$  (Stammlösung) eingestellt. Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnung (10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) hergestellt, die zusammen mit der Stammlösung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde.

**Tabelle 1: Primer für die Amplifikation und Sequenzierung von *C. coli* MLST**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
Aspcoli S1	5'-CAACTTCAAGATGCAGTACC-3'
Aspcoli S2	5'-ATCTGCTAAAGTATGCATTGC-3'
Glncoli S1	5'-TTCATGGATGGCAACCTATTG-3'
Glncoli S2	5'-GCTTTGGCATAAAAGTTGCAG-3'
Gltcoli S1	5'-GATGTAGTGCATCTTTTACTC-3'
Gltcoli S2	5'-AAGCGCTCCAATACCTGCTG-3'
Glycoli S1	5'-TCAAGGCGTTTATGCTGCAC-3'
Glycoli S2	5'-CCATCACTTACAAGCTTATAC-3'
Pgmcoli S1	5'-TTATAAGGTAGCTCCGACTG-3'
Pgmcoli S2	5'-GTTCCGAATAGCGAAATAACAC-3'
Tktcoli S1	5'-AGGCTTGTGTTTTTCAGGCGG-3'
Tktcoli S2	5'-TGACTTCCTTCAAGCTCTCC-3'
Unccoli S1	5'-AAGCACAGTGGCTCAAGTTG-3'
Unccoli S2	5'-CTACTTGCCTCATCCAATCAC-3'

**Tabelle 2: Primer für die Amplifikation von *C. jejuni* MLST**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Annealing</b>
aspA A1 F	AAA GCT GCA GCT ATG GC	50 °C 1 min
aspA A2 R	AAG CGC AAT ATC AGC CAC TC	
glnA A1 F	TAG GAA CTT GGC ATC ATA TTA CC	50 °C 1 min
glnA A2 R	TTG GAC GAG CTT CTA CTG GC	
gltA A1 F	GGG CTT GAC TTC TAC AGC TAC TTG	50 °C 1min
gltA A2 R	CCA AAT AAA GTT GTC TTG GAC GG	
glyA A1 F	GAG TTA GAG CGT CAA TGT GAA GG	50 °C 1min
glyA A2 R	AAA CCT CTG GCA GTA AGG GC	
tkt A1 F	TTT AAG TGC TGA TAT GGT GC	50 °C 1min
tkt A4 R	CAT AGC GTG TTC TCT GAT ACC	
pgm A1 F	TTG GAA CTG ATG GAG TTC G	50 °C 1min
pgm A2 R	AAG AGC TTA ATA TCT CTG GCT TCT AG	
uncA A3 F	AAA GCT GAT GAG ATC ACT TC	50 °C 1min
uncA A2 R	GCT AAG CGG AGA ATA AGG TGG	

**Tabelle 3: Primer für die Sequenzierung von *C. jejuni* MLST**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
aspA S3 F	CCA ACT GCA AGA TGC TGT ACC
aspA S6 R	TTC ATT TGC GGT AAT ACC ATC
glnA S1 F	GCT CAA TTC ATG GAT GGC
glnA S4 R	GCA TAC CAT TGC CAT TAT CTC CG
gltA S1 F	GTG GCT ATC CTA TAG AGT GGC
gltA S6 R	CCA AAG CGC ACC AAT ACC TG
glyA S3 F	AGC TAA TCA AGG TGT TTA TGC GG
glyA S4 R	AGG TGA TTA TCC GTT CCA TCG C
tkf S1 F	TGC ACC TTT GGG CTT AGC
tkf S4 R	ACT TCT TCA CCC AAA GGT GCG
pgm S3 F	GCT TAT AAG GTA GCA CCT ACT G
pgm S2 R	TCC AGA ATA GCG AAA TAA GG
uncA S3 F	AAA GTA CAG TGG CAC AAG TGG
uncA S4 R	TGC CTC ATC TAA ATC ACT AGC

### 2.2.2 Nukleinsäuren- Längenstandards

Mit den Längenstandards „GeneRuler Tm 1 kb Plus DNA Ladder“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und dem „SmartLadder“ (Eurogentec, Köln) wurde die Größe von DNS-Fragmenten bei der Gelelektrophorese bestimmt.

Längenstandard „GeneRuler Tm 1 kb Plus DNA Ladder“:

Fragmentgrößen in bp: 20000/ 10000/ 7000/ 5000/ 4000/ 3000/ 2000/ 1500/ 1000/ 700/  
500/ 400/300/ 200/ 75

Längenstandard „SmartLadder“:

Fragmentgrößen in bp: 10000/ 8000/ 6000/ 5000/ 4000/ 3000/ 2500/ 1500/ 1000/ 800/ 600/  
400/ 200

### 2.3 Verwendete Enzyme

**Tabelle 4: Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller/ Ort</b>
Taq-DNS-Polymerase	Roche/ Basel, Schweiz
Proteinkinase K	QIAGEN/ Venlo, Niederlande
<i>Mbo</i> I	New England BioLabs GmbH/ Frankfurt, Deutschland
<i>Dpn</i> I	New England BioLabs GmbH/ Frankfurt, Deutschland
<i>Sau</i> 3AI	New England BioLabs GmbH/ Frankfurt, Deutschland
<i>Bst</i> NI	New England BioLabs GmbH/ Frankfurt, Deutschland
<i>Eco</i> RII	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG/ Braunschweig, Deutschland

## 2.4 Verwendete Kits

**Tabelle 5: Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller/ Ort</b>
QIAamp®- DNA Mini Kit	QIAGEN/ Venlo, Niederlande
MinElute PCR Purification Kit (50)	QIAGEN/ Venlo, Niederlande
MinElute PCR Purification Kit (250)	QIAGEN/ Venlo, Niederlande

## 2.5 Puffer und Nährmedien

Elektrophoresepuffer-Lösung	20 ml TAE (50x) mit 980 ml H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 50 mM EDTA (pH 7, 5-7, 8) 5,75 % (v/v) Essigsäure
BHI-Medium	MERCK KGaA/ Darmstadt

## 2.6 Chemikalien, Reagenzien, Geräte, Verbrauchsmittel

**Tabelle 6: Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller/ Ort</b>
6x DNS Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Agarose NEED Ultra-Qualität Roti®agarose für die DNS/RNS Elektrophorese	Carl Roth GmbH/ Karlsruhe
Ethidiumbromid, ~ 95 % (HPLC)	Sigma-Aldrich®/ St. Louis, USA
MidoriGreen	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Nukleinsäuren- Längenstandards „GeneRuler Tm 1 kb Plus DNA Ladder“	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Nukleinsäuren- Längenstandards „SmartLadder“	Eurogentec, Köln
PCR Grade Nucleotide Mix (dATP, dCTP,dGTP,dTTP)	Roche /Basel, Schweiz
PCR reaction buffer, 10x konz.	Roche /Basel, Schweiz
Columbia-Agar (Basis)	Merck KGaA/ Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck KGaA/ Darmstadt
Schafsblut, defibriniert	Oxoid Ltd./ Hampshire, England
Glycerin, etwa 87 % reinst	Merck KGaA/ Darmstadt
Aqua bidest	



**Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller/ Ort</b>
Entsorgungsbeutel	Labor-Brand/ Gießen
Filter-Pipettenspitzen	Sarstedt/ Nümbrecht
Flächendesinfektionsmittel "Biguacid Liquid"	Antiseptica/ Pulheim/ Brauweiler
Labortücher (Kimwipes)	Kimberly-Clarke/ Dallas, USA
Nitrilhandschuhe: Nitro-Tex®EP	Ansell/ Brüssel, Belgien
PCR-Reagiergefäß 0,2 ml	Biozym/ Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (verschiedene Farben)	Sarstedt/ Nümbrecht
Pipettierhilfe: Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG/ Eberstadt
Reagiergefäß 0,5 ml	Eppendorf/ Hamburg
Reagiergefäß 1,5 ml	Eppendorf/ Hamburg
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt/ Nümbrecht
Schutzhandschuhe	Microflex Corporation/ Wien, Österreich
Campy Gen TM CN25	Oxoid Ltd. /Hampshire, England
Einweg- Impfschlingen (1 µl und 10 µl)	Sarstedt/ Nümbrecht
Wattetupfer	Copan innovation/ Brescia, Italien

**Tabelle 8: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/ Ort</b>
Digitaler Graphikdrucker Digital Graphik Printer UP-D890	Biometra/ Göttingen
Elektrophoresekammer	Von Keutz/ Reiskirchen
Feinwaage LP6200S	Sartorius AG/ Göttingen
Geldokumentationsstation "Transilluminator Bio-Doc2™"	Biometra/ Göttingen
Diverse Glaswaren	Schott AG/ Mainz
Kamera Axion Cam	Carl Zeiss AG/ Oberkochen
Kühlschrank	Liebherr/ Bulle, Schweiz
Mikrowelle	Blomberg/ Neu-Isenburg
Mini-Zentrifuge/ vortex CombiSpin FVL-2400N	Biosan/ Riga, Litauen
PCR-Gerät T3 Thermocycler	Biometra/ Göttingen
Spannungsgerät "Biometra Standard Power Pack 25"	Biometra/ Göttingen
Zentrifuge "Centrifuge 5415 R"	Eppendorf / Hamburg
NanoDrop ND-1000	ThermoSCIENTIFIC/ Waltham, USA
Brutschrank (37 °C)	ThermoSCIENTIFIC/ Waltham, USA
Thermomixer compact	Eppendorf/ Hamburg

## 3 Methoden

### 3.1 Anzucht und Lagerung von *Campylobacter*-Isolaten

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte auf Columbia-Schafsblutagarplatten (COS-Platten), die mit je 5 % Schafsblutzusatz supplementiert waren. Nach dem Beimpfen der Platten wurden diese für 24 Stunden bei 42 °C unter capno- und mikroaerophilen Bedingungen (5 % O<sub>2</sub>, 5-10 % CO<sub>2</sub> und 85-90 % N<sub>2</sub>) inkubiert. Um die capno- und mikroaerophile Atmosphäre zu gewährleisten, wurde ein CampyGen™ CN25-Gasentwicklerbeutel pro 2,5 L Fassungsvermögen eingesetzt.

Zur Lagerung der Bakterienstämme wurden mit einer Impföse bzw. einem Tupfer *Campylobacter*-Kolonien von den Columbia-Schafsblutagarplatten entnommen und in ein Glycerin-BHI-Gemisch (20 % Glycerin in BHI) oder in Microbank-Röhrchen überführt.

### 3.2 Isolation von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS)

Zur Isolation der genomischen DNS wurde das QIAamp®-DNA Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die zuvor auf Columbia-Schafsblutagarplatten ausplattierten Bakterien sind in 180 µl Puffer ATL resuspendiert worden und mit 20 µl Proteinase K bei 56 °C und 750 min<sup>-1</sup> 1-3 Stunden in einem Thermomixer inkubiert worden, bis die Bakterien vollständig lysiert waren. Nach kurzem Zentrifugieren konnten die Proben mit 200µl Puffer AL versetzt und gemischt werden. Um die Proteinase K zu denaturieren und um die Reaktion zu stoppen, sind die Proben bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert worden. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert und anschließend mit 200 µl 100 % Ethanol versetzt, gründlich gemischt und erneut kurz zentrifugiert. Die kompletten Proben sind im Anschluss jeweils vorsichtig auf den Membranfilter einer vorbereiteten QIAamp-Spinsäulen gegeben worden und bei 8.000 min<sup>-1</sup> für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluß konnte verworfen werden. Im Anschluß erfolgten weitere Waschschriffe bis die Spinnssäule von Pufferresten befreit war. Anschließend wurde die Spinnssäule in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt, um eine Elution der DNS von der Säule mit dem Elutionspuffer AE zu erreichen. Dafür ist 180 µl des vorgewärmten Puffers AE auf die Membran gegeben

worden und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert worden. Die Proben wurden dann bei 8.000 min<sup>-1</sup> für 1 Minute zentrifugiert und die gewonnene DNS konnte bei -20 °C gelagert werden.

### 3.3 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentration der DNS in den Proben wurde mittels eines NanoDrop-Photometers ND-1000 (ThermoSCIENTIFIC/ Waltham, USA) gemessen.

### 3.4 *Isoschizomer-Digestions-Assay* der genomischen *C. jejuni*- und *C. coli*-DNS

Um die Isolate-Gruppen, welche DNS-Adenin- und/oder Cytosin-Gruppen methylieren können, zu identifizieren, wurden die gemäß der Publikationen von Edmonds *et al.* (1992) und Gomez-Eichelmann *et al.* (1991) veröffentlichten Restriktionsendonukleasen *DpnI*, *MboI* und *Sau3AI* sowie *EcoRII* und *BstNI* verwendet.

Zur Identifizierung der DAM-Methylierung wurden *DpnI*, *MboI* und *Sau3AI* eingesetzt. Diese drei Restriktionsendonukleasen sind Isoschizomere, die die Sequenz 5'-GATC-3' in unterschiedlicher Weise schneiden. Das Enzym *DpnI* schneidet die DNS nur, wenn methyliertes Adenin in GATC-Sequenzen vorliegt. *MboI* hingegen, wird durch die Anwesenheit von methyliertem Adenin blockiert, *Sau3AI* schneidet in beiden Fällen.

Die beiden Isoschizomere *EcoRII* und *BstNI* wurden eingesetzt, um die DCM-Methylierung von Cytosin an 5'-CC(A/T)GG-3' zu erkennen. *EcoRII* schneidet nur unmethylierte Sequenzen, während *BstNI* sowohl methylierte als auch unmethylierte Sequenzen schneidet.

Bei der Versuchsdurchführung wurde die DNS der verschiedenen *Campylobacter*-Isolate, wie zuvor in 3.2 beschrieben, isoliert. Die Enzyme *MboI*, *DpnI*, *Sau3AI* und *BstNI* wurden von der Firma New England BioLabs GmbH (Frankfurt) bezogen, das Enzym *EcoRII* von Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG (Braunschweig).

Für jedes Enzym wurde nach Herstellerangaben ein Mastermix (s. Tab. nachfolgend) angefertigt. Als Negativkontrolle diente ein Mastermix ohne Restriktionsendonuklease. Enzyme wurden bei der Herstellung des Mastermix jeweils auf Eis gelagert. Der *Campylobacter*-DNS-*Bst*NI-Reaktionsansatz wurde anschließend bei 60 °C für 4 Stunden inkubiert. Die *Dpn*I-, *Sau*3AI-, *Mbo*I-, *Eco*RII-, und Kontroll-Reaktionsansätze sind bei 37 °C für 12 h inkubiert worden. Nach Ende der Reaktionszeit wurden die DNS-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.7)

**Tabelle 9: Mastermix für *Dpn*I /*Mbo*I**

Substanz	Menge in $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	5,5
Puffer 4	1
Enzym	0,5
DNS	3
Gesamt	10

**Tabelle 10: Mastermix für *Sau*3AI/ *Bst*NI**

Substanz	Menge in $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	4,5
Puffer 1/ 2	1
BSA	1
Enzym	0,5
DNS	3
Gesamt	10

**Tabelle 11: Mastermix für *EcoRII***

<b>Substanz</b>	<b>Menge in <math>\mu\text{l}</math></b>
H <sub>2</sub> O	7,875
Puffer 0	1
Enzym	0,125
DNS	1
Gesamt	10

**Tabelle 12: Mastermix für Kontrolle**

<b>Substanz</b>	<b>Menge in <math>\mu\text{l}</math></b>
H <sub>2</sub> O	6
Puffer	1
DNS	3
Gesamt	10

### 3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifizierung und dem Nachweis von DNS. Diese schnelle und effiziente Methode wurde 1971 durch Kjell Kleppe bzw. 1983 durch Kary Mullis entdeckt. Sie beruht auf dem Prinzip der Amplifikation eines spezifischen DNS-Abschnittes, welcher durch jeweils definierte Primer-Paare mit gegenläufiger Orientierung festgelegt wird. Die enzymatische Replikation eines DNS-Fragments wird durch die zyklische Wiederholung von drei verschiedenen Reaktionsschritten Denaturierung, Annealing, und Elongation, erreicht. Diese drei Schritte unterscheiden sich sowohl in ihrer Dauer als auch in der Reaktionstemperatur. Das für die PCR konzipierte und in dieser Arbeit verwendete Gerät, der Thermocycler, stellt die für den jeweiligen Reaktionsschritt eingestellte Temperatur präzise her. Somit wird die gewünschte Matrize exponentielle amplifiziert und ist damit leichter nachweisbar, z. B. mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.7)

#### Reaktionsablauf:

Initial wird der Deckel des Geräts auf 105 °C vorgeheizt. Anschließend die DNS bei 95 °C denaturiert, was als Anfangsdenaturierung bezeichnet wird (Stufe 1, Tabelle 13).

Danach folgen in der Regel 30 Amplifikationszyklen (Stufe 2 Tabelle 13). Jeder Amplifikationszyklus besteht aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Denaturierung wird die DNS durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C aufgeschmolzen, so dass die zu amplifizierenden DNS-Doppelstränge vollständig zu Einzelsträngen dissoziieren. Durch sukzessives Herabsetzen der Temperatur können die Primer an den komplementären DNS-Einzelstrang binden (Annealing). Dabei bilden sich zwischen den korrespondierenden Basen feste Wasserstoffbrückenbindungen. Die genaue Annealing-Temperatur hängt von den Primern ab und liegt in der Regel ca. 2-4 °C unter ihrem Schmelzpunkt. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, besteht die Gefahr, dass sich die Primer nicht an die komplementäre DNS anlagern können. Wird sie hingegen zu niedrig gewählt, können sich die Primer auch an nicht vollständig komplementäre Regionen anlagern und es entstehen unspezifische Produkte, die man „Geisterbanden“ nennt. Im letzten Schritt, der Elongation, fügt eine DNS-Polymerase freie Nukleotide in 5'→3' Richtung an die Primer an und generiert so einen neuen DNS-Doppelstrang. Da die Temperaturen zyklisch 95 °C betragen, ist es not-

wendig eine thermostabile DNS-Polymerase zu verwenden. In dieser Arbeit wurde die Taq-DNS-Polymerase von Roche eingesetzt.

Abschließend erfolgen die Schritte der Primer-Extention (Stufe 3, Tabelle 13) und der Abkühlung der Proben auf 4 °C (Stufe 4, Tabelle 13).

**Tabelle 13: Thermocycler-Programm für PCR**

	Temperatur		Zeit
<b>Stufe 1</b>			
Anfangsdenaturierung	95,0 °C		1 min
<b>Stufe 2</b>			
Denaturierung	95,0 °C	} 34x	30 sec
Annealing	Entsprechend Tab. 1 und 2		30 sec
Elongation	72,0 °C		30 sec
<b>Stufe 3</b>			
Primer Extention	72,0 °C		5 min
<b>Stufe 4</b>			
Kühlung	4,0 °C		∞

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde entsprechend der Anzahl der zu verwendenden DNS-Templates hochgerechnet, wie viel Reagenzien benötigt werden und nach Tabelle 14 ein Mastermix hergestellt. Dieser wurde dann auf 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße gleichmäßig verteilt und zu jeder Probe wurde 1 µl DNS-Template hinzupipettiert. Die Komponenten wurden mithilfe einer Mini-Zentrifuge vermischt.

Außerdem wurden jeweils eine positiv- und eine negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle bestand nur aus einem Reaktionsansatz ohne DNS-Templates. Als Positivkon-



trollen dienten für *C. coli* der Referenzstamm RM2228 und für *C. jejuni* die Stämme NCTC11168, 81-176, 84-25 und 81116 /NCTC 11828. Bei negativem Ergebnis in der Positiv-Kontrolle wurde die PCR wiederholt.

**Tabelle 14: PCR-Ansatz für eine Probe**

Material	Konzentration	Menge in $\mu\text{l}$
Aqua bidest	-	19,75
10x PCR-Puffer	10x	2,5
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Jeweils 10 mM	0,5
Vorwärts-Primer	10 $\mu\text{M}$	0,5
Rückwärts-Primer	10 $\mu\text{M}$	0,5
Taq-DNS-Polymerase	5 U/ $\mu\text{l}$	0,25
Template- DNS	50-150 ng/ $\mu\text{l}$	1
Gesamtvolumen		25

### 3.6 Aufbereitung der PCR-Produkte

Die Aufbereitung der PCR-Produkte erfolgte mithilfe des *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN/ Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben. In diesem Arbeitsschritt wurden DNS-Fragmente aus den PCR-Reaktionen vor der Sequenzierung aufgereinigt. Bei diesem Vorgehen werden Primer, Nukleotide, Enzyme, Mineral-Öle, Salze und andere Verunreinigungen aus den Proben entfernt. Dies wird durch Adsorption der DNS an eine Silicamembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und eines pH-Wertes  $\approx 7.5$  erreicht.

### 3.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNS-Molekülen

Um die verschiedenen DNS-Moleküle aus 3.4 und 3.5 voneinander zu trennen, wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hiermit lassen sich DNS-Moleküle abhängig von ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennen. Durch den Vergleich mit DNS-Standards mit bekannter Fragmentlänge kann die Größe bestimmt werden. Aufgrund eines Phosphodiester-Rückgrats besitzen DNS-Moleküle eine negative Ladung und wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Mit zunehmender Höhe der Agarose-Konzentrationen wird die Porengröße des Gels feiner. Dies hat neben Ladung und Molekülgröße ebenfalls einen Einfluss auf das Laufverhalten der Proben. Des Weiteren spielen bei diesem Verfahren Temperatur, angelegte Spannung und die Pufferbedingungen eine ausschlaggebende Rolle. Je kleiner DNS-Moleküle sind, desto schneller wandern sie in Richtung der Anode. Große Moleküle werden stärker behindert und wandern weniger weit durch die Poren. Es entsteht eine Art „Siebeffekt“. Um den sonst nicht sichtbaren Gel-Lauf der Proben zu visualisieren, wurden die Proben vor Auftragung in die Geltaschen mit einem Ladepuffer versetzt, welcher Bromphenolblau enthält. Dem Agarose-Gel wird zusätzlich der Farbstoff Midori-Green zugesetzt. Es interkaliert mit einzelnen Basen der DNS und fluoresziert unter UV-Licht.

#### Versuchsdurchführung

In der vorliegenden Arbeit wurden 1 % Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Hierfür wurden 2 g Agarose und 160 ml des TAE 1x Puffer vermischt und in der Mikrowelle zum Sieden gebracht, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde unter ständigem Schwenken unter kaltem Wasser abgekühlt und im Anschluss wurden 6 µl Midori-Green zugesetzt. Danach hat man die Lösung in eine mit Kämmen zur Probentaschenformung präparierte Gelgießkammer gegeben. Nach Auspolymerisation des Gels wurden die Kämmen entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer gegeben und mit 1x TAE-Puffer bedeckt. In die Geltaschen wurden die mit Ladepuffer und Farbindikator vermischten Proben pipettiert. In die erste und letzte Probenspur pro Reihe wurde ein geeigneter Längenstandard zur Größenbestimmung der DNS-Fragmente gegeben. Die Elektrophorese lief 45 min unter einer konstanten Spannung von ca. 150 V. Nach ausreichender Auftrennung der Fragmente konnten die entstandenen Banden unter dem UV-Tisch sichtbar gemacht werden und photographisch dokumentiert werden.

**Tabelle 15: Agarose-Gel**

Substanz	Menge
Agarose	2 g
TAE-Puffer	160 ml
Ethidiumbromid	12 $\mu$ l
Midori-Green	6 $\mu$ l
1 kb-Lader	10 $\mu$ l für eine Geltasche
Loading Dye	3 $\mu$ l pro DNS Probe (10 $\mu$ l)

### 3.8 *Multilocus-Sequenz-Typing* (MLST)

MLST ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Typisierung von Bakterienstämmen mittels Sequenzierung von mehreren Gen-Abschnitten, sogenannten *Housekeeping*-Genen (Maiden *et al.* 1998). Diese sind innerhalb der Isolate der Erregerspezies hoch konservierte Genloci, die am zentralen Stoffwechsel beteiligt sind. Die Genloci weisen jedoch trotzdem Variationen untereinander auf, daher eignet sich MLST besonders für die Unterscheidung von eng verwandten Bakterienstämmen oder zur Typisierung innerhalb einer Spezies. Durch die Sequenzierung der *Housekeeping*-Gene und deren Vergleich mit bereits MLST-typisierten Referenzstämmen ergibt sich für Laboratorien eine rasche und einfache Methode zur Typisierung von Bakterienpopulationen (Urwin und Maiden 2003). Je nach Sequenz des Genfragments wird jedem Genlocus eine Allelnummer zugeordnet und die Kombination von mehreren Allelnummerierungen, die in einem typisierten Bakteriengenom vorliegen, wird wiederum unter einer Zahl, dem Sequenztyp, zusammengefasst. Stämme, die die gleiche Allelkombination aufweisen, gehören dem gleichen Sequenztyp an. Genetisch eng verwandte Isolate können zu klonalen Komplexen oder Gruppen zusammengefasst werden. Die zentrale Vergabe der Allelnummern für spezifische Sequenzen und die Einteilung in

Sequenztypen erfolgt durch die von Keith Jolley und Man-Suen Chan entwickelte Online-datenbank <http://pubmlst.org/>.

Für die MLST-Typisierung der *C. coli*-Stämme wurden die folgenden Primer nach Angaben der Website <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml> verwendet: *aspcoli* (Aspartat-Ammonium-Lyase), *glncoli* (Glutamin-Synthetase), *gltcoli* (Citrat-Synthetase), *glycoli* (Serin-Hydroxy-Methyltransferase), *pgmcoli* (Phosphoglycerat-Mutase), *tktcoli* (Transketolase), *unccoli* (ATP-Synthase).

Außerdem wurden zur MLST-Typisierung der Klade 2 und 3 *C. coli*-Stämme, bei denen die zuvor genannten Klade 1-Primer nicht binden, die nach Dingle *et al.* (2001) für *C. jejuni* beschriebenen Primer zur Sequenzierung der sieben Housekeeping-Gene benutzt: *aspA* (Aspartat-Ammonium-Lyase), *glnA* (Glutamin-Synthetase), *gltA* (Citrat-Synthetase), *glyA* (Serin-Hydroxy-Methyltransferase), *pgm* (Phosphoglycerat-Mutase), *tkt* (Transketolase) und *uncA* (ATP-Synthase).

### 3.9 PacBio-Sequenzierung

Das Prinzip der PacBio-Sequenzierung (SMRT Sequencing - Pacific Biosciences) beruht auf zwei Schlüsseltechnologien: den *zero-mode waveguides* (ZMWs) und phosphorylierten Nukleotiden. Die ZMWs ermöglichen es, nur den Boden einer einzelnen Vertiefung einer SMRTcell zu beleuchten, an dem ein DNS-Polymerase-Template-Komplex immobilisiert ist. Durch die phosphorylierten Nukleotide kann die Synthese eines DNS-Einzelstranges durch den DNS-Polymerase-Komplex unmittelbar beobachtet werden.

Jedes der vier Nukleotide ist durch einen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Beim Einbau eines Nukleotids durch den DNS-Polymerase-Komplex wird der fluoreszierende Anteil abgespalten und ein Lichtimpuls emittiert, der nach Anregung durch Licht einer spezifischen Wellenlänge von dem Fluoreszenzfarbstoff emittiert wird und durch den ZMW detektiert wird. Hierdurch kann die Basenreihenfolge abgelesen werden.

Durch diese Methode ergeben sich einige Vorteile: Es ist keine Amplifizierung der zu untersuchenden DNS mehr notwendig, große DNS-Abschnitte können in ihrer Gesamtheit sequenziert werden, und die Methode führt sehr schnell zu Ergebnissen. Außerdem wird nur ein DNS-Template benötigt, die Ergebnisse sind genauer und es gibt keine Fehler bei

zu großen DNS-Stücken an den Überlappungsstellen (SMRT Sequencing - Pacific Biosciences).

In der vorliegenden Arbeit wurden die *C. coli*-Stämme BFR-CA-9557, CCS249-07-13784 und CCS17341-20 mittels SMRT-DNS-Sequenzierung der Firma Pacific-Bio-Sciences sequenziert. Dazu wurde der *Pacific-High-Quality de novo genome assembly Algorithmus (HGAP.2)* verwendet. Durchgeführt wurde die Sequenzierung im Functional Genomics Center Zürich (FGCZ, Switzerland) sowie durch das Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig.

#### Versuchsdurchführung:

Die genomische DNS des *C. coli*-Isolats ist mithilfe des QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Venlo) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert worden. Anschließend wurde, gemäß den PacBio-Empfehlungen, die DNS-Library präpariert. Die vollständige Genom-Sequenzierung erfolgte in einer *SMRT-Cell* unter Anwendung der patentierten *Pacific-Biosciences-RS*-Sequenzier-Technologie (Pacific Biosciences, Menlo Park, USA).

Zunächst wurde die DNS-Konzentration der eingesetzten genomischen Bakterien-DNS unter Zuhilfenahme des *Qubit Fluoremeter dsDNA Broad Range Assays* (Life Technologies, Carlsbad, USA; p/n 32850) gemessen.

Für die Herstellung der sogenannten *SMRTbell*<sup>TM</sup>-Templates ist das *DNS-Template Prep Kit 1.0* (Pacific Biosciences, p/n 100-259-100) benutzt worden. Ein *SMRTbell*<sup>TM</sup>-Template ist ein Doppelstrang-DNS-Template mit zwei Haarnadel-Schleifen an beiden Enden. Damit ist ein *SMRTbell*<sup>TM</sup>-Template strukturell linear, topologisch jedoch zirkulär. Die Haarnadeladapter werden an jedes Fragment ligiert, um eine gemeinsame Primerbindungsstelle für die DNS-Polymerase bereitzustellen. Durch diese gemeinsame Primerbindungsstelle werden Sequenzierfehler vermindert.

Für die Library-Präparation wurden 10 µg der genomischen DNS mithilfe von *Covaris gTubes* (Kbiosciences, Hoddesdon, UK; p/n 520079) mechanisch durch Scherung zu einer durchschnittlichen Länge von 10 kb fragmentiert. Mit dem *Bioanalyzer 2100 12 K DNA Chip Assay* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA; p/n 5067-1508) wurde im Anschluss die Größenverteilung der Fragmentlängen bestimmt. Von der fragmentierten genomischen Bakterien-DNS sind 5 µg mit speziellen „Polier“-Enzymen versetzt worden, die einzel-

strängige DNS-Enden sowie DNS-Schäden im Doppelstrang reparieren. Danach wurde durch eine *blunt end ligation reaction* und einer anschließenden Exonuklease-Behandlung die Matrix für die *SMRTbells*<sup>TM</sup> erstellt. Ein *Blue Pippin device* (Sage Science, Beverly, USA) wurde genutzt, um große Fragmente (> 8 kbp) anzureichern und die *SMRTbell*<sup>TM</sup>-Matrix von zu kleine Fragmenten zu reinigen. Die gröbenselektierte DNS-Library wurde im Anschluß mit dem *Agilent Bioanalyzer 12 Kb DNA Chip* auf ihre Qualität überprüft und mit dem *Qubit Fluorimeter* quantifiziert.

Unter Zugabe von P6-DNS-Polymerase (*P6 DNA/Polymerase binding kit 2.0*, Pacific Biosciences, Menlo Park, USA; p/n 100-236-500) wurde der *SMRTbell*<sup>TM</sup>-Polymerase-Komplex gebildet.

Für die genomische Sequenzierung ist ein *Pacific Bioscience RS2* Gerät und eine einzelne *SMRTcell v.3.0* (Pacific Biosciences; p/n 100-171-800) eingesetzt worden (Sequenzierzeit 120 min). Um die Anreicherung der großen Fragmente zu verbessern, verwendete man die *MagBead-loading*-Methode (PacBio, Menlo Park, USA; p/n 100-133-600). Abschließend wurde über das *SMRT-Portal* für die SMRT-Cell ein Sequenzierbericht erstellt, in dem u.a. die Adapter-Dimer-Kontamination, die erzielte durchschnittliche *Read*-Länge und die Anzahl der gefilterten *sub-reads* ausgewertet worden ist.

### 3.10 Bioinformatik

#### 3.10.1 Verarbeitung der SMRT-Rohdaten:

Die Verarbeitung der SMRT-Sequenzierungsrohdaten nach Abschluss des Versuchsdurchlaufs erfolgte mithilfe des *Pacific Biosciences SMRT Analysis System* (Version 2.3, Januar 2015; PacBio, Menlo Park, USA).

Für das Schließen der *C. coli* BFR-CA-9557-, CCS249-07-13784- und CCS17341-20- Genome aus den einzelnen Reads, wurde der *high quality Hierarchical Genome Assembly Process* (RS\_HGAP\_Assembly.2), mit den Standard Parametern für Bakteriengenome, verwendet. (Detaillierte Informationen zum Algorithmus sind auf <http://github.com/PacificBiosciences/Bioinformatics-Training/wiki/HGAP-in-SMRT-Analysis> zu finden).

Das vollständige Genom konnte anschließend unter Verwendung der *rapid annotation using subsystem technology platform* (RAST, <http://rast.nmpdr.org>) sowie der *Prodigal/Prokka annotation pipeline* annotiert werden.

Für die Analyse der Methylierungsmotive wurde das *RS\_Modification\_and\_Motif\_Analysis.1* Protokoll, als Teil der *SMRT-Analysis-Software*, und der *Restriction-Modification-Finder-1.0 server* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/Restriction-Modification-Finder-1.0/>), der auf der *Restriction Enzyme database* (REBASE, <https://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>) basiert, angewandt.

Zusätzlich wurde im *C. coli* BFR-CA-9557-Genom mithilfe des BLAST-Algorithmus nach Homologen zu bekannten, d.h. bereits publizierten, Restriktionsmodifikationssystemen von *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* gesucht.

### 3.10.2 CRISPR-finder

Der CRISPR-finder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/Advanced.CRISPR-finder.php>) (Grissa *et al.* 2007) ist eingesetzt worden, um nach sogenannten *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPRs) zu suchen.

### 3.10.3 Software

Die MLST-Typisierung der *C. coli*-Isolate und deren Einteilung in klonale Komplexe sowie die Zuteilung des Sequenztyps wurde mithilfe der MLST-Website <http://pubmlst.org/campylobacter/> vorgenommen (Jolley *et al.* 2004).

UPGMA (Unweighted-pair Group Method with Arithmetic mean) -Dendrogramme sind mittels der MEGA6-Software ([http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/hc\\_upgma.htm](http://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/hc_upgma.htm)) konstruiert worden (Kumar *et al.* 2008).

Zum Vergleich des *C. coli* BFR-CA-9557-Genoms mit dem *C. jejuni* NCTC 11168-Genom sowie mit den *C. coli*-Genomen der Stämme RM4661 (Klade 1) und 76339 (Klade 3) wurde das *Artemis comparison tool* (ACT) eingesetzt (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>).

Zur Erstellung der Minimum Spanning Trees ist das Online-Tool PHYLOViZ (<https://online.phyloviz.net>) zur Anwendung gekommen (Ribeiro-Gonçalves *et al.* 2016).



## 4 Ergebnisse

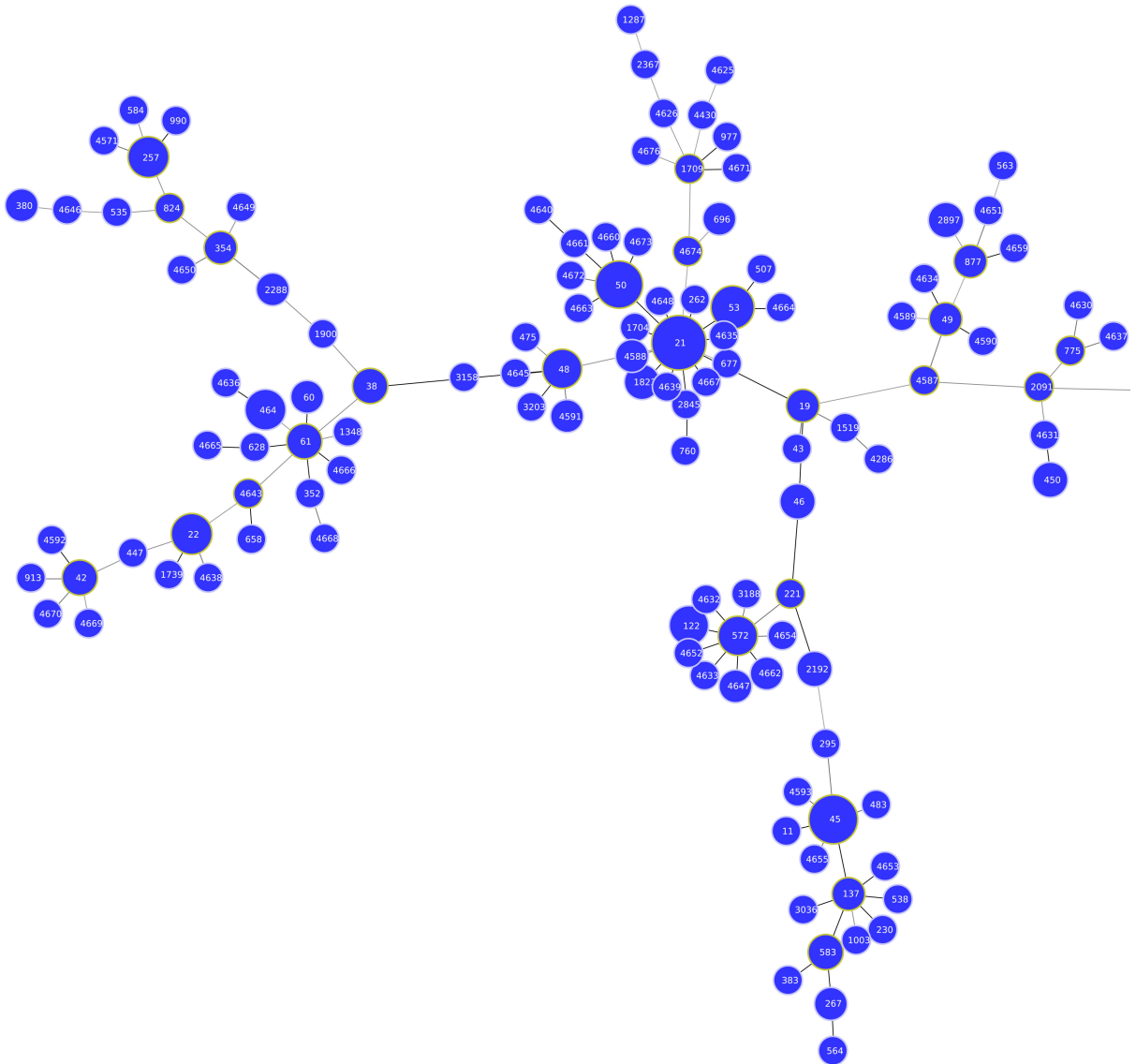
### 4.1 MLST und Kladen

MLST eignet sich besonders für die Unterscheidung von eng verwandten Bakterienstämmen oder zur Typisierung innerhalb einer Spezies. Durch die Sequenzierung der *Housekeeping*-Gene und deren Vergleich mit bereits MLST-Typisierten Referenzstämmen ergibt sich eine rasche und einfache Methode zur Typisierung von Bakterienpopulationen (Urwin und Maiden 2003).

Alle in dieser Arbeit verwendeten *C. coli*-Isolate wurden mittels 7-Gene-MLST typisiert und in die *C. jejuni/C. coli*-MLST-Datenbanken eingepflegt. Für die verwendeten *C. jejuni*-Stämme lagen diese Daten bereits aus vorhergehenden Arbeiten vor. Zu jedem in dieser Arbeit untersuchten Isolat liegt nun ein Sequenztyp vor (s. Tabelle 24, 25 und 26 im Anhang), der sich aus der Kombination von mehreren Allelnummerierungen ergibt. Auf Basis der fusionierten Gensequenzen wurden UPGMA-Dendrogramme und Minimum Spanning Trees für sowohl *C. coli*- als auch für die *C. jejuni*-Stämme berechnet. Diese werden im Folgenden genauer erläutert.

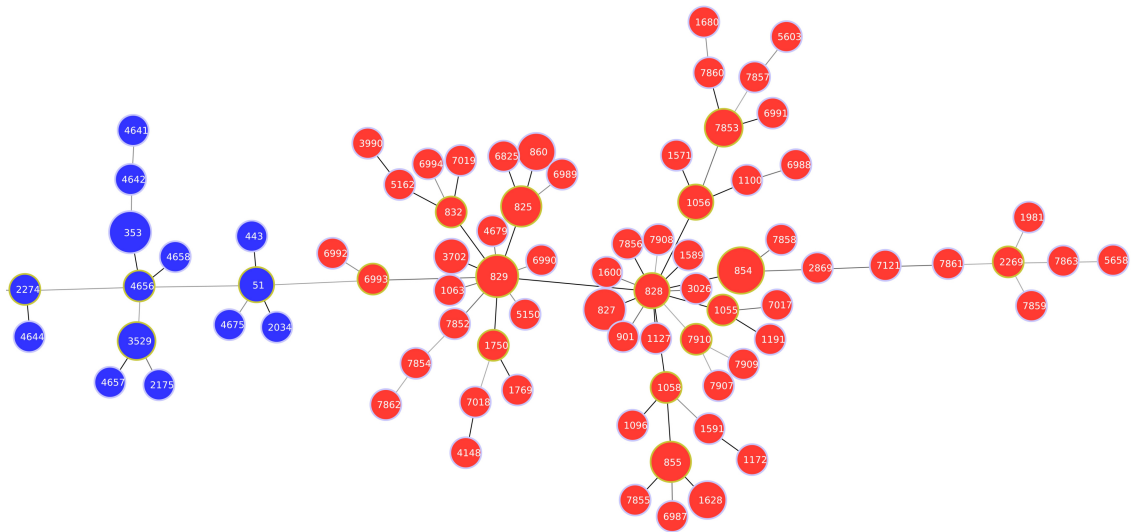
#### 4.1.1 Aufteilung der Isolate nach Spezies

Da aus derselben Familie der *Campylobacteriaceae* stammend, besteht eine enge Verwandtschaft zwischen den beiden Spezies *C. coli* und *C. jejuni*. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die Verteilung der durch MLST-Typisierung erhaltenen Sequenztypen der *C. coli* und *C. jejuni*-Isolate sowie die berechneten Verwandtschaftsverhältnisse in einem Minimum Spanning Tree. Farblich sortiert nach der vorliegenden Spezies sind in blau alle *C. jejuni*-Isolate zu sehen und in rot sind alle *C. coli*-Isolate markiert. Der nachfolgende *minimum spanning tree* lässt erkennen, dass sich die untersuchten Isolate der beiden Spezies voneinander abgrenzen lassen und sich keine engen phylogenetischen Überschneidungen zeigen. Dennoch ist eine Verwandtschaft der Isolate erkennbar.



**Abbildung 2: *Minimum spanning tree*: Aufteilung nach Spezies, Teil 1**

(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)



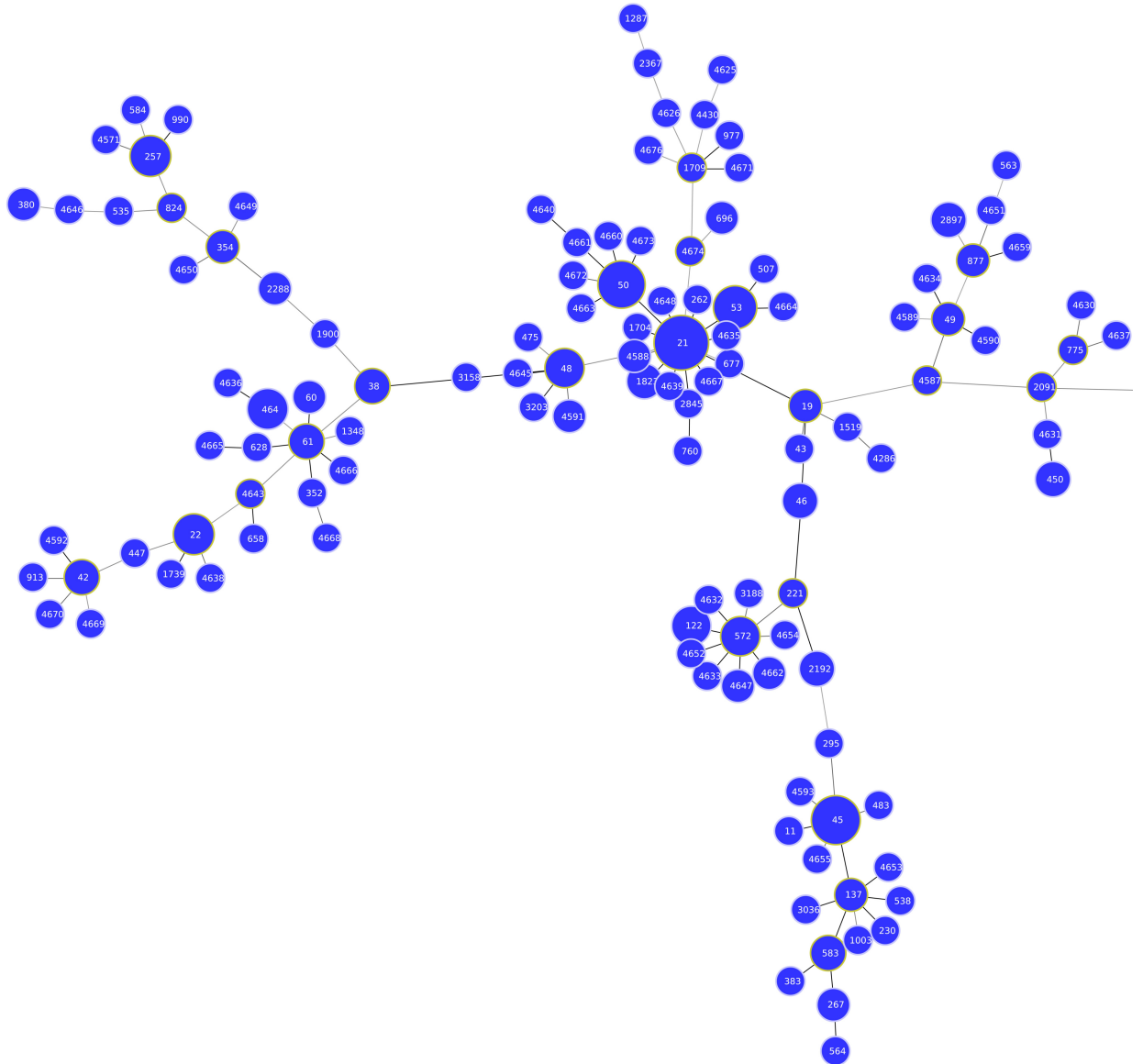
**Abbildung 3: *Minimum spanning tree*: Aufteilung nach Spezies, Teil 2**

(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)

### 4.1.2 Kladeneinteilung der *C. coli*-Isolate

Entsprechend ihrem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad sind alle *C. coli*-Isolate einer der drei Kladen zugeordnet worden. Für *C. jejuni* existiert eine Kladeneinteilung nicht. In Klade 2 konnten sieben der 95 untersuchten *C. coli*-Isolate eingruppiert werden. Alle Isolate entstammen Oberflächengewässern. Weitere sieben Isolate gehören der Klade 3 an. Die Herkunft der Isolate setzt sich aus Isolaten von Puten und Oberflächengewässern zusammen. Klade 1 ist die größte Klade und ihr gehören die restlichen 81 Isolate mit einer Herkunft aus den untersuchten *C. coli*-Stämmen von Mensch, Rind, Schwein, Schaf, Affe, Ziege, Rothirsch, europ. Fischotter, Huhn, Pute, Wasservogel, Taube, Fasan, Wachtel, Schalentiere und aus Oberflächengewässern an. Zur weiteren Analyse mittels SMRT-Sequenzierung wurde aus jeder Klade ein Isolat ausgewählt. Aus Klade 1 entstammt das Hühner-Isolat *C. coli* BFR-CA-9557, aus Klade 2 stammt *C. coli*-CCS249-07-13784 und aus Klade 3 *C. coli*-CCS17341-20 (beide aus Oberflächengewässern gewonnen).

Abbildung 4 und 5 zeigen die Kladeneinteilung von *C. coli* farblich markiert in einem Minimum Spanning Tree. In den farbigen Kreisen stehen jeweils die Sequenztypen. Klade 1 ist in rot (1A), dunkelorange (1B) und hellorange (1C) markiert. In grün sind alle Isolate der Klade 2 markiert. Blau und gelb stehen für Klade 3. Wie schon in der Abbildung zur Einteilung der Spezies zu sehen, sind auch hier die *C. jejuni*-Isolate abgebildet (dunkelblau).



**Abbildung 4: *Minimum spanning tree*: Kladeneinteilung, Teil 1**

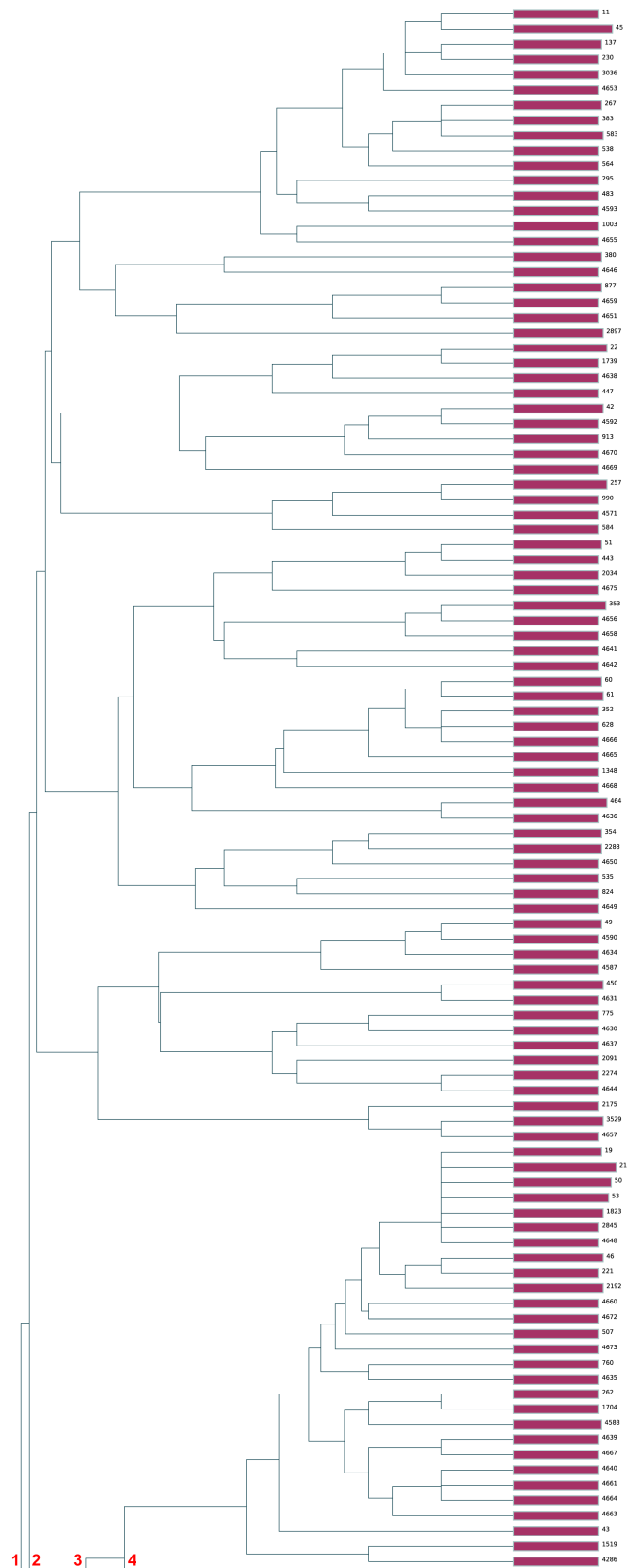
(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)



**Abbildung 5: *Minimum spanning tree*: Kladeneinteilung, Teil 2**

(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)

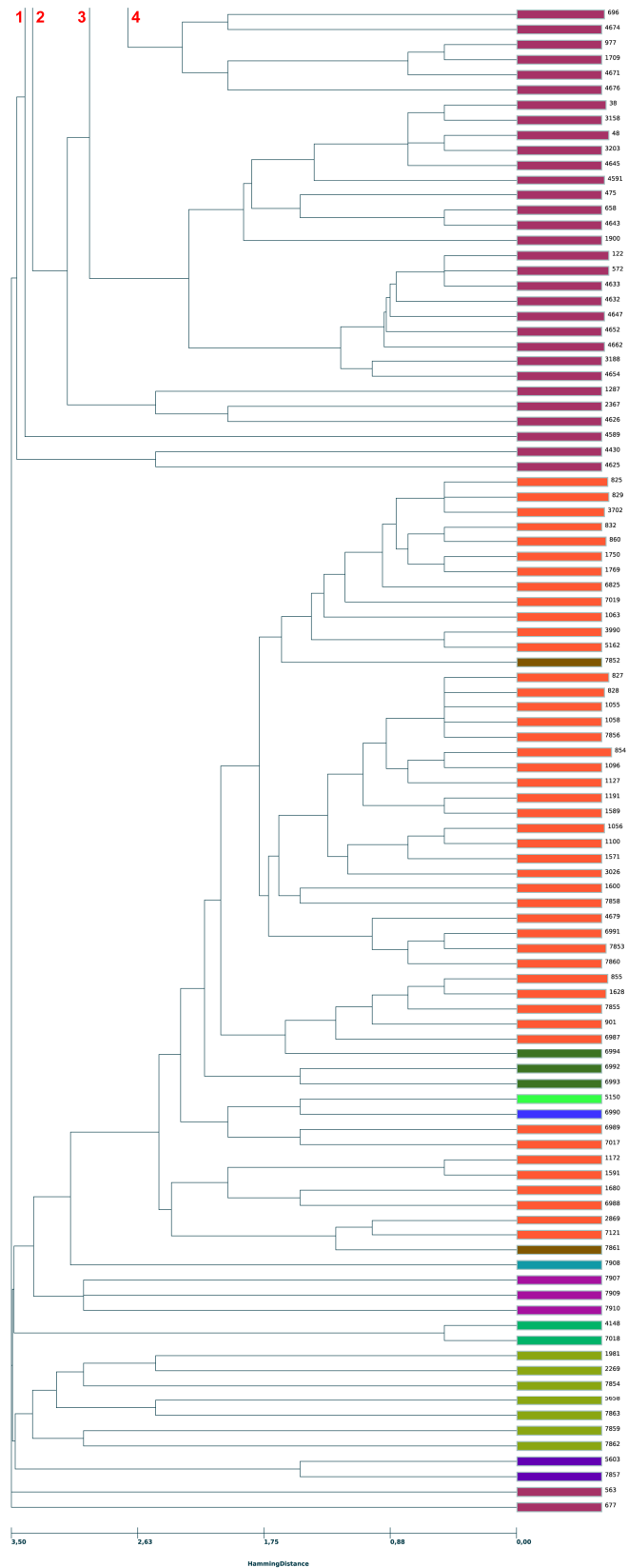
Neben dem *minimum spanning tree* ist auch ein UPGMA-Dendrogramm (Abbildungen 6 und 7) erstellt worden. Hier sind alle *C. jejuni*- und *C. coli*-Sequenztypen entsprechend ihrer Verwandtschaftsverhältnisse aufgeführt. Untereinander stehende Sequenztypen besitzen eine enge Verwandtschaft, was durch die stammbaumartigen Verbindungen gekennzeichnet ist. Als Maßstab ist unter dem Dendrogramm die Hamming-Distanz angegeben. Je kleiner dieser Wert ist, desto höher ist der Verwandtschaftsgrad. Innerhalb der Spezies können so phylogenetisch eng verwandte Sequenztypen erkannt werden. Aus diesem Dendrogramm lässt sich, wie auch schon weiter oben beschrieben eine Abgrenzung der beiden Spezies *C. jejuni* und *C. coli* vornehmen. Außerdem sind die *C. coli*-Sequenztypen entsprechend ihrer Zuteilung in die drei Kladen farblich markiert.



**Abbildung 6: UPGMA-Dendrogramm: Kladeneinteilung, Teil 1**

(Zur besseren Veranschaulichung ist das UPGMA-Dendrogramm vertikal getrennt auf zwei Seiten abgebildet. Die aufgeteilten Verbindungen sind mit entsprechenden Indizes versehen. Farbcodierung: magenta: *C. jejuni*)





**Abbildung 7: UPGMA-Dendrogramm: Kladeneinteilung, Teil 2**

Farbcodierung: magenta: *C. jejuni*, orange: *C. coli* Klade 1A, braun, hellgrün und dunkelblau: *C. coli* Klade 1B, ockerfarben, mintgrün und dunkellila: *C. coli* Klade 1C, khakigrün: *C. coli* Klade 2, dunkelgrün, türkis und lila: *C. coli* Klade 3

#### 4.2 *Isoschizomer-Digestions-Assay* der genomischen *C. jejuni*- und *C. coli*-DNS

Die Untersuchung der *C. jejuni*- und *C. coli*-Isolate auf ihr Methylierungsverhalten mittels *Isoschizomer-Digestions-Assays* zeigte, dass keiner der *C. jejuni*-Stämme sensitiv für den Verdau mit dem methylierungsspezifischen Enzym *DpnI* war. Von den *C. coli*-Isolaten, die auf DAM- und DCM-Methylierung untersucht worden sind, zeigten 14 der 95 untersuchten Isolate eine DAM-Methylaseaktivität und neun Isolate eine DCM-Methylaseaktivität (siehe Tabelle 16).

Im Vergleich zu *C. jejuni* weisen somit ca. 15 % der *C. coli*-Isolate eine Suszeptibilität für den Verdau der DNS mit dem Restriktionsenzym *DpnI* auf, welches methyliertes Adenin in GATC-Sequenzen erkennt und schneidet. Knapp 10 % der Isolate waren für den enzymatischen Verdau mit *EcoRII* nicht sensibel. *EcoRII* schneidet nur unmethylierte 5'-CC(A/T)GG-3 Sequenzen, somit gelten Sequenzen, die nicht *EcoRII* sensibel sind, als DCM-methyliert.

Bezüglich der Herkunft der Isolate und des Methylierungsverhaltens ist keine klare Korrelation zu erkennen. Die meisten Methylasen haben Ihren Ursprung in Hühnerisolaten mit fünf von 20 Isolaten.

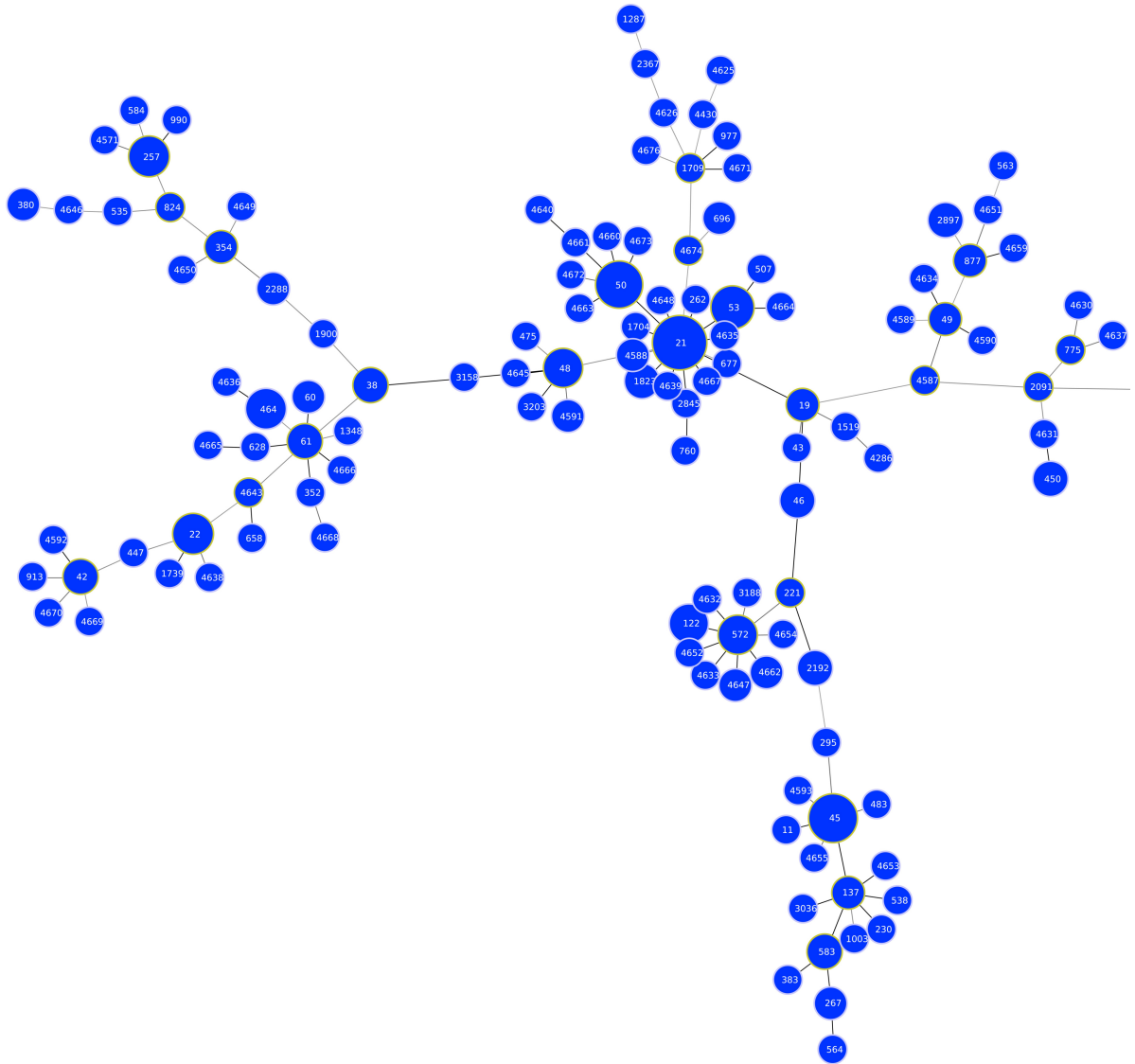
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die untersuchten *C. coli*-Stämme entsprechend ihrem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad einer der drei Kladen zuzuordnen (siehe 4.1). Auffällig ist, dass alle Isolate, die eine Methylaseaktivität zeigen, der Klade 1 angehören. Stämme dieser Klade stammen hauptsächlich von Schweine-Isolaten, aber auch von Geflügel und menschlichen Isolaten (Sheppard et al. 2008, 2010; Zautner et al. 2015).

Als zusammenfassendes Ergebnis ist zu nennen, dass die DAM-Methylierung, in der hier untersuchten Kohorte, höher prävalent ist, als die DCM-Methylierung. DAM-Methylierung ist außerdem prävalent in porcinen und aviären Isolaten, die DCM-Methylierung beschränkt sich hauptsächlich auf Säugetiere.

**Tabelle 16: DAM- und DCM-Methylaseaktivität von *C. coli*-Stämmen**

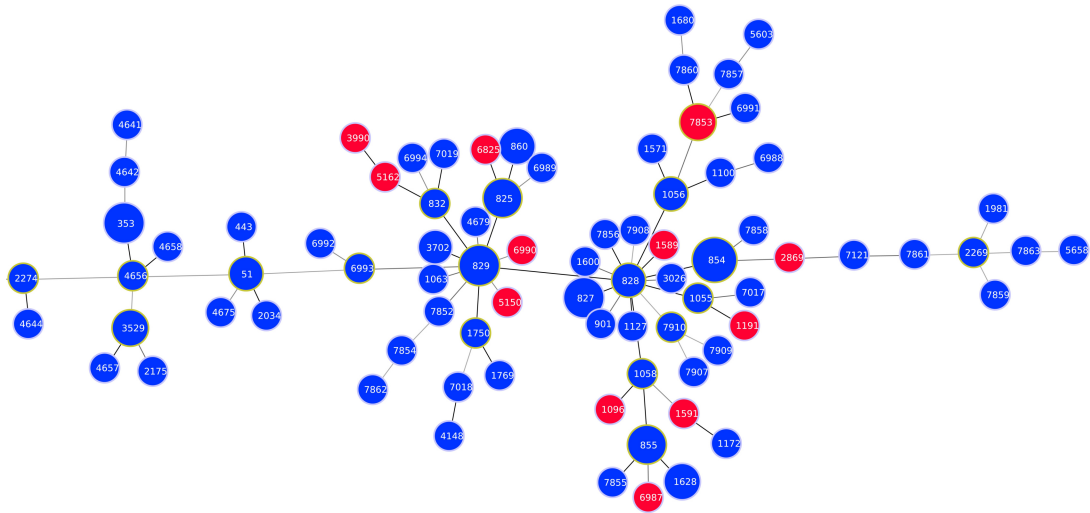
Isolatherkunft	Anzahl	DAM-Aktivität	DCM-Aktivität
Mensch	18	1	2
Rind	5	1	1
Schwein	8	2	2
Schaf	3	1	0
Affe	2	1	1
Ziege	2	0	0
Rothirsch	1	0	0
Europ. Fischotter	1	0	1
Huhn	20	5	1
Pute	9	2	0
Wasservogel	7	1	0
Taube	1	0	0
Fasan	1	0	0
Wachtel	1	0	0
Schalentiere	1	0	0
Oberflächengewässer	15	0	1
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>14</b>	<b>9</b>

Wie bereits zuvor sind auch für die Methylierungsergebnisse der einzelnen Isolate Minimum Spanning Trees berechnet worden. Auf den folgenden beiden Abbildungen werden die Sequenztypen der untersuchten Isolate mit berechnetem Verwandtschaftsgrad im *minimum spanning tree* aufgezählt. In blau sind alle unmethylierten Stämme gekennzeichnet und in rot diejenigen, die Methylase-Aktivität zeigen.



**Abbildung 8: *Minimum spanning tree*: DAM-Methylierung, Teil 1**

(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)



**Abbildung 9: *Minimum spanning tree*: DAM-Methylierung, Teil 2**

(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)

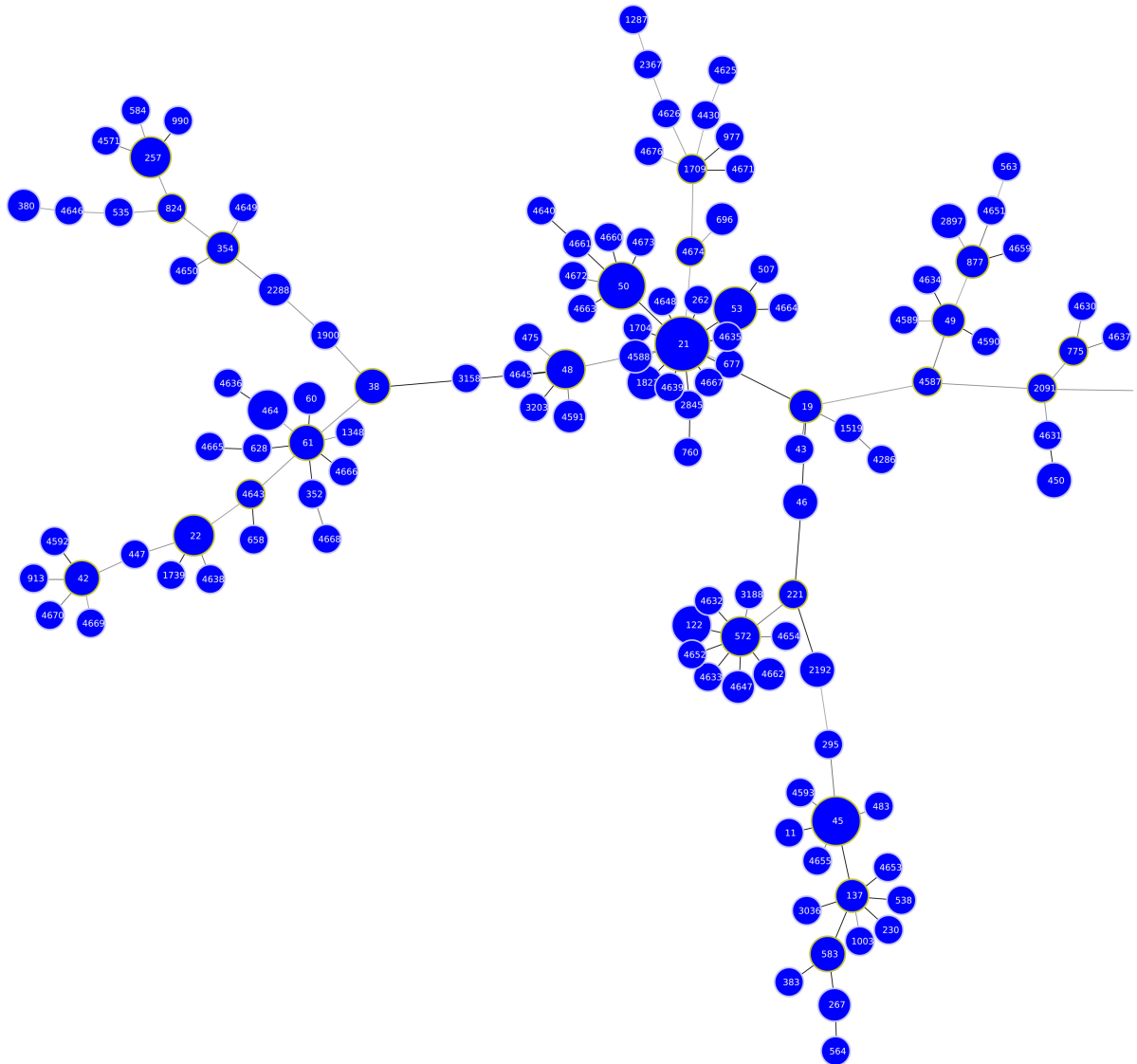
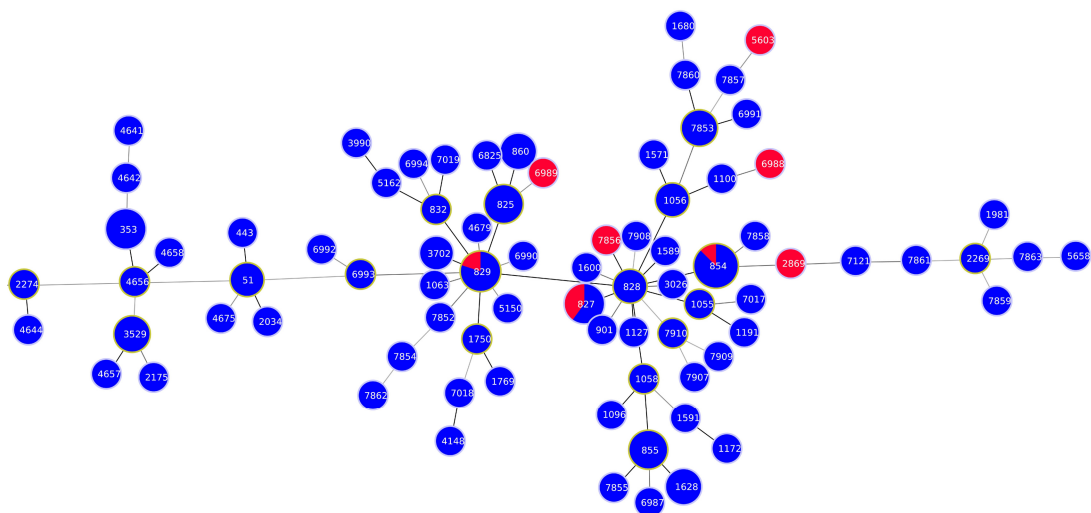


Abbildung 10: *Minimum spanning tree*: DCM-Methylierung, Teil 1

(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)



**Abbildung 11: *Minimum spanning tree*: DCM-Methylierung, Teil 2**

(Zur besseren Veranschaulichung ist der *minimum spanning tree* horizontal getrennt auf zwei Seiten abgebildet)

### 4.2.1 DAM-/DCM-Aktivität und Phylogenetik

Bezüglich des Verwandtschaftsverhältnisses und der DAM-/DCM-Aktivität ist im Anhang (Abbildungen 15-18) jeweils ein UPGMA-Dendrogramm abgebildet. Darauf zu erkennen sind alle *C. coli*- und *C. jejuni*-Sequenztypen, die Methylaseaktivität zeigen, farblich markiert. Durch die unmittelbare Nähe der Isolate zueinander ist eine Verwandtschaft der Isolate zu erkennen.

### 4.3 SMRT-Sequenzierung von *C.coli BFR-CA-9557*

Der ausgewählte Stamm, *C. coli BFR-CA-9557*, wurde mehrfach unabhängig, reproduzierbar positiv auf DAM-Methylierung getestet. Er stammt aus einem Masthuhn-Herz und repräsentiert damit einen Stamm, der potenziell lebensmittelassoziierte Infektionen beim Menschen hervorrufen kann.

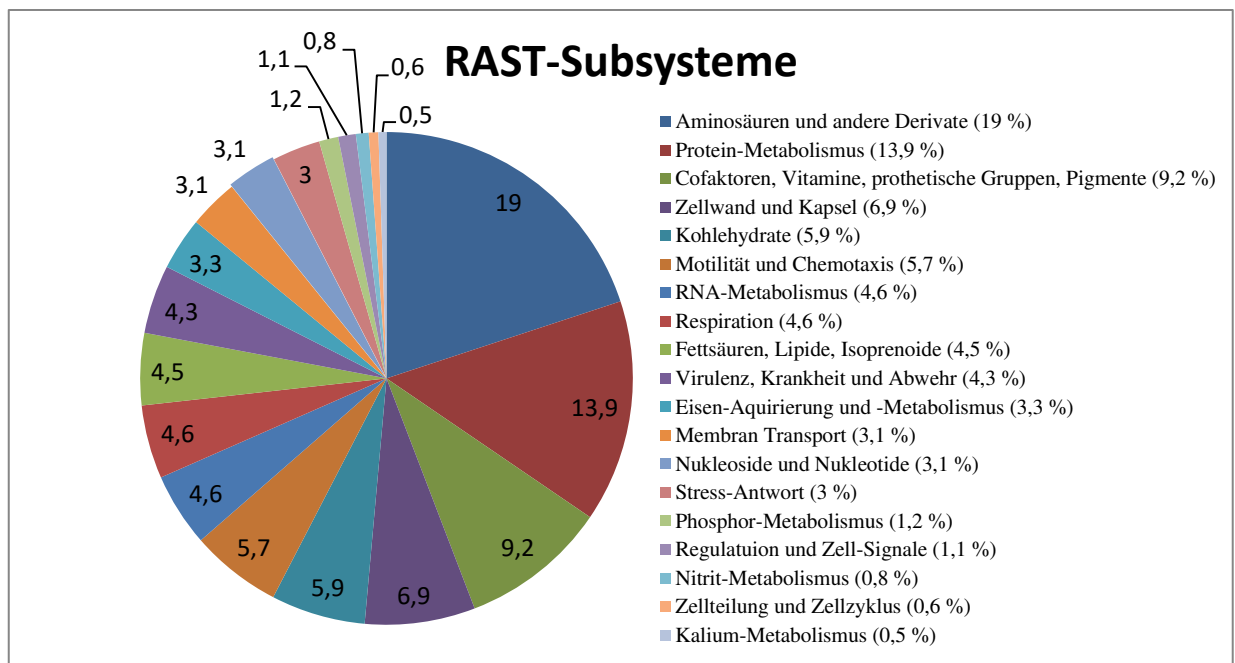
Die MLST-Typisierung des Isolates ergab den Sequenztyp ST1589 und den klonalen Komplex CC-28. Somit ist er in die Klade 1 einzuordnen. Außerdem wurde eine Resistenztestung auf verschiedene Antibiotika vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass eine Resistenz gegenüber Chinolonen vorlag, der Stamm aber sensibel gegenüber Makroliden, Tetrazyklinen und Aminoglykosiden war.

Die Sequenzierung des *C. coli BFR-CA-9557*-Genoms mit einer Pac *SMRT-Cell* ergab 74.742 *Continuous long reads* (CLR) mit einer mittleren totalen Länge von 14.514 Basenpaaren. Aus den CLRs konnten 142.135 *subreads* mit sehr guter Qualität und einer mittleren Länge von 7.602 bp extrahiert werden.

Anschließend wurde durch Anwendung des *Pacific-Bioscience high-quality de novo genome assembly*-Algorithmus (HGAP.2) ein einzelnes durchgehendes *Contig* von 1.720.506 Basenpaaren Länge mit einer mittleren 500-fachen Abdeckung und einer Konfidenz von > 99,99 % konstruiert, das somit dem gesamten Genom entspricht. Der Guanin/Cytosin-Gehalt dieses *Contigs* liegt bei 31,4 %. Das in der NCBI-Datenbank am engsten verwandte Genom ist das Genom des *C. coli*-Isolats 15-537360 (Taxonomie ID 1358410, 87 % Deckungsgleichheit). Plasmide konnten nicht detektiert werden.



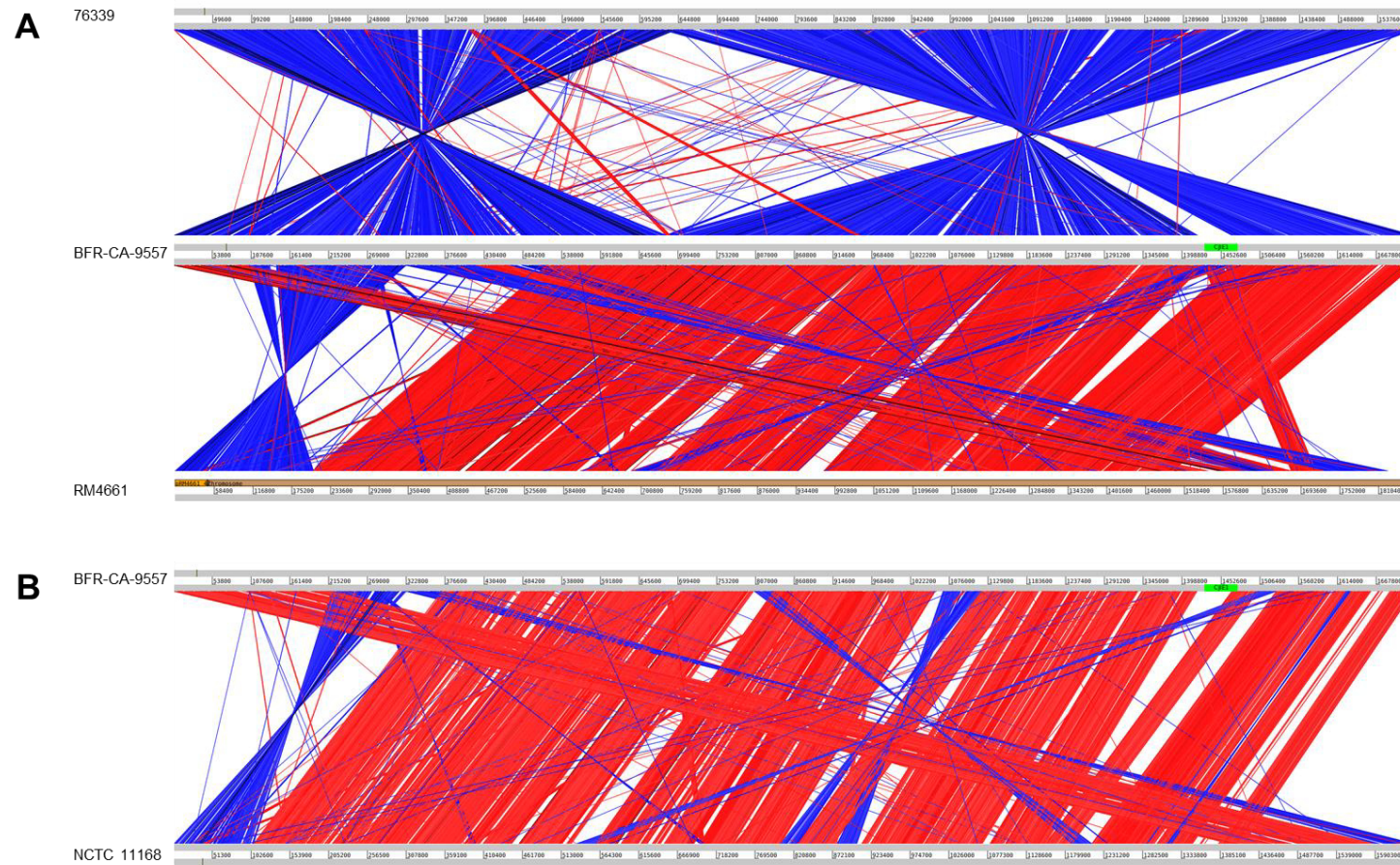
Ferner sind mithilfe der NCBI-Annotationspipeline, RAST und Prodigal 1637/1769/1797 kodierende Sequenzen annotiert worden, außerdem 275/366/453 vermutete hypothetische Proteine. Daneben konnten durch die NCBI-Software 54 RNA Gene entdeckt werden, 52 RNAs durch RAST und 54 RNAs mittels Prodigal. Überdies konnte RAST verschiedene Subsysteme, darunter vor allem Amino-Säure-Metabolismen (19 %), Protein-Metabolismen (13,9 %) sowie Cofaktoren, Vitamine, Prothetische Gruppen und Pigmente (9,2 %), identifizieren (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Durch RAST identifizierte Subsysteme**

### 4.3.1 Vergleich BFR-CA-9557 mit anderen *Campylobacter*-Isolaten

Der SMRT-sequenzierte Stamm BFR-CA-9557 ist mit den *C. coli*-Isolaten 76339 (Klade 3) und *RM4661* (Klade 1) verglichen worden. Dafür kam das *Artemis Comparison Tool* (ACT) zur Anwendung. Dies ist in Abbildung 13 zu sehen. Mithilfe von BLAST sind homologe Regionen identifiziert worden. Diese sind durch rote (die gleiche Richtung) oder blaue (entgegengesetzte Richtung) Segmente gekennzeichnet. *C. coli*-76339 zeigt drei homologe Regionen, die entgegengerichtet zu *C.coli-BFR-CA-9557* sind. Eine Übereinstimmung zu der identifizierten Region von CJE1 (grüne Box) gibt es hier nicht. Im Vergleich dazu liegt innerhalb des Plasmids zwischen *C. coli RM4661* und *BFR-CA-9557* eine lange Strecke homologer Abschnitte am Anfang und am Ende des Chromosoms vor. Dieser Abschnitt enthält allerdings sowohl kleinere Lücken als auch inverse Homologien. Eine ähnliche Ausprägung stellt der Vergleich zu dem Isolat *C. jejuni NCTC 11168* dar. Das lässt vermuten, dass eine nähere phylogenetische Verwandtschaft des untersuchten Genoms (Klade 1) zu *C. jejuni*-Stämmen besteht als zu *C. coli*-Stämmen der Klade 3.



**Abbildung 13: Vergleich BFR-CA-9557 mit anderen Isolaten**

Vergleich des *C. coli* BFR-CA-9557 Genoms mit *C. coli* RM-4661 und -76339 (A) und mit *C. jejuni* NCTC 11168 (B) mithilfe des Artemis Comparison Tool (ACT).

### 4.3.2 Poly-G/C-Abschnitte und Polysaccharidkapsel

Die Analyse auf poly-G/C-Abschnitte innerhalb des identifizierten *BFR-CA-9557*-Genoms brachte 17 homopolymere Abschnitte mit mindestens acht G- oder C-Nukleotiden hervor (siehe Tabelle 17, 18). Die meisten dieser Abschnitte tauchen in der Nähe von hypothetischen Proteinen auf. Zwei dieser Regionen konnten als Teile des Genlocus der bakteriellen Polysaccharidkapsel (*cps*, *capsular polysaccharid gene locus*) und nahe dem ORF für eine Glykosyltransferase (EC 2.4.99) beschrieben werden. Andere, durch RAST entdeckte Poly-G/C-Motive befinden sich in der Umgebung von ORFs für z.B. Transferasen oder Ligasen. Der zuvor beschriebene *cps*-locus für *BFR-CA-9557* liegt im Bereich von 1,656,271 bis 1,691,672 (1,660,702-1,686,508 ohne flankierende *kps*-Regionen) und misst 35,401 Basenpaare. Er codiert für 29 ORFs (25,806 bp, 21 ORFs; ohne flankierende *kps*-Regionen) und ist vergleichbar mit dem größten bekannten *Campylobacter cps*-Cluster, welches 38 kb, ohne flankierende *kps*-Regionen, misst (*C. jejuni* strain X; Karlyshev et al. 2013).

Die *cps*-Genloci anderer *C. coli*- oder *C. jejuni*-Isolate sind in ihrer Größe und ihrem Gehalt sehr variabel. Außerdem gibt es nur drei andere Gene, die eine vergleichbare Variabilität aufweisen. Dazu gehören sowohl das periplasmatische Polysaccharidkapsel-Exportsystem Protein-Gen (*kpsD*), das GDP-Mannose-4,6-Dehydratase-Gen als auch das periplasmatische Polysaccharidkapsel-Biosynthese/-export Protein-Gen (*wcbA/kpsC*). Die höchste Sequenzähnlichkeit existiert zu dem Isolat *RM4661* (Abdeckung 71 %, Identität 99 %) und zu FB1 (Abdeckung 54 %, Identität 99 %). Wohingegen die Sequenzüberlappung zum *C. jejuni* Stamm X 28 %, bei einer Identität von 87 %, entspricht.

**Tabelle 17: Position der poly-G tracts im BFR-CA-9557-Genom**

Poly-G im Vorwärtsstrang			Pos. verw. zu		ORF-Lokalisation		
Position	Länge	RAST annotation zum nächsten ORF	ATG		start	stop	Strang
46933	9	Hypothetisches Protein	-52	- 2292	46985	49225	+
258726	10	FIG00470070: Hypothetisches Protein	-15	- 1924	258741	260650	+
689956	10	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-Glutamat Ligase (EC 6.3.2.9)	-6	- 1232	691179	689971	-
851085	10	FIG00470965: Hypothetisches Protein	556	-671	850529	851756	+
1562460	10	Putative Transferase	-48	-590	1562508	1563050	+
1565336	9	FIG00469667: Hypothetisches Protein	251	-423	1565085	1565759	+
1575332	10	Motilitäts- Akkessorischer-Faktor	167	- 1780	1575165	1577112	+
1645063	9	Eisen-Transport-Protein B	1576	-269	1643487	1645332	+

**Tabelle 18: Position der poly-C tracts im BFR-CA-9557-Genom**

Poly-C im Vorwärtsstrang			pos. verw. zu		ORF-Lokalisation		
Position	Länge	RAST annotation zum nächsten ORF	ATG	STOP	start	stop	Strang
442261	11	Putatives Lipoprotein vom Eisen-Transporter-System	139	-3	442254	442132	-
1099189	10	Hypothetisches Protein	739	-7	1099187	1098459	-
1257487	9	Phosphoglycerol-Transferase	1728	-256	1257735	1255767	-
1427910	9	Filamentous-Haemagglutinin-Domäne-Protein	1554	-9	1427911	1426364	-
1547848	9	FIG00469527: Hypothetisches Protein	637	-596	1548436	1547219	-
1587049	8	Hypothetisches Protein	679	-575	1587617	1586377	-
1607917	9	FIG00470049: Hypothetisches Protein	2305	34	1607875	1605620	-
1660758	9	CMP-N-acetylneuraminat-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase (EC 2.4.99.-)	64	-620	1661370	1660702	-
1668862	8	CMP-N-acetylneuraminat-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase (EC 2.4.99.-)	40	-1587	1670442	1668829	-

### 4.3.3 *N-linked flagellar glycosylation locus*

Der sich von Position 1.319.815 bis 1.332.144 (über 12.329 Basenpaare) ausdehnende, flagellare *N*-Glykosylierungs-Locus beinhaltet 10 ORFs und ist zu 99 % identisch zu korrespondierenden Loci anderer *C. coli*-Isolate, wie beispielsweise RM4661 (Klade 1) oder 76339 (Klade 3). Vergleicht man den Genlocus mit anderen *C. jejuni*-Stämmen, z.B. M1 oder 81116, fällt eine Insertion des Lipid Carrier UDP-N-acetylgalactosamin-Transferase-Gens und des  $\alpha$ -1,4-*N*-acetylgalactosamin Transferase *pglH*-Gens auf. Strangaufwärts des flagellaren *N*-Glykosylierungs-Locus befindet sich der Lipooligosaccharid-Biosynthese-Locus (LOS-Locus). Dieser dehnt sich vom Genort des UDP-Glucose-4-Epimerase-Gens *galE* bis hin zum D-Glycero-D-Mannose-Heptose-1,7- Bisphosphat- Phosphatase-Gens *rfaD* aus.

Die im Genom von *Campylobacter* häufig variable Region des LOS-Locus beinhaltet acht bis 19 ORFs, je nach Isolat, abhängig von Gengehalt sowie Organisation. Insgesamt wurden 19 LOS-Klassen beschrieben (Zautner *et al.* 2015; Parker *et al.* 2008, 2005). Im Genom von BFR-CA-9557 wurden im Los-Locus (Position 1,332,138 – 1,349,328 → eine Länge von 17,190 bp) 17 ORFs entdeckt. LOS wird in diesem Fall unsialysiert exprimiert, was durch die fehlenden homologen Gene für die Sialyltransferase *cstIII/III* und *N*-Acetylgalactosaminotransferase *neuABC* deutlich wird. Wie in 1.2.3 beschrieben, sind die Stämme mit einem sialinisierten LOS besonders hoch invasiv, im Vergleich zu den Stämmen mit einem nicht-sialinisierten LOS. Sie stehen außerdem im Zusammenhang mit den durch *Campylobacter* ausgelösten GBS-Formen. Somit ist zu festzuhalten, dass der untersuchte Stamm BFR-CA-9557 ein niedrigeres Invasivitätspotenzial besitzt. Experimentell wurde dies in Invasivitätsassays mit Colonicarcinom-Zellen (Caco2) bestätigt.

Der dargestellte Genlocus kann nicht exakt einer bereits für *C. jejuni* beschriebenen LOS-Klasse zugeordnet werden. Die höchste Ähnlichkeit weist der Genlocus für die LOS-Klassen E, P, O und H auf.

#### 4.3.4 Virulenz-assoziierte Gene

Sowohl Gene für die Dimethylsulfoxide-Reduktase-Systeme (DMSO-Reduktase) als auch für die Gamma-Glutamyltranspeptidase (*ggt*) konnten nicht im Genom von *BFR-CA-9557* detektiert werden, was typischerweise Klade 1-Isolaten entspricht. Es konnten jedoch drei andere homologe Gene für das Eisen-Transport-Protein TonB identifiziert werden. Dies entspricht normalerweise den Kladen 2- und 3-Isolaten. Auch das *cdt*-Operon wurde genauer untersucht, mit dem Ergebnis, dass alle drei Untereinheiten vollständig vorhanden sind. CdtABC bewirkt eine Zelldistension, was als Aufblähen und Anschwellen der Zellen beobachtet werden kann, und einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Übergangsphase. CdtABC wirkt dadurch zytotoxisch auf die Wirtszellen und stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dar (siehe 1.2.3).

#### 4.3.5 *Campylobacter jejuni integrated element 1-like element (CJIE1)*

Ein 39,483 bp großer *Campylobacter jejuni integrated element 1* (CJIE1)-homologer Prophage konnte auf Position 1,427,993-1,467,476 identifiziert werden. Verglichen mit CJIE1 des *C. jejuni* RM1221 liegt eine Sequenzidentität von 96 % vor, bei einer Abdeckung von 86 %.

#### 4.3.6 Methylierungsmotive und RM-Systeme im Genom von *BFR-CA-9557*

Mit der Methode der SMRT-Sequenzierung können neben der Genomsequenz, von z.B. *BFR-CA-9557*, auch die Basenmodifikationen durch Analyse der Sequenzierungskinetik bestimmt werden. Durch Nutzung der Modifikation- und Motiv-Detektion der SMRT-Analysis-Software konnten 45,881 *N*-6-methylierte Adenine (2,7 % vom Genom), 1788 4-methylierte Cytosinbasen (0,1 % vom Genom) und 53,350 unspezifisch modifizierte Basen, welche durch die Software nicht genauer identifiziert werden konnten, gefunden werden.

Die identifizierten methylierten Basen wurden dann in zehn verschiedene dominant vorkommende Methylierungsmuster eingeteilt, siehe Tabelle 19, wobei alle Motive auf eine *N*-6-Adeninspezifische Methyltransferase zurückzuführen sind. Eine kleine Gruppe (2,8 %) der <sup>m6</sup>A-Basen, alle der <sup>m4</sup>C-methylierten-Basen sowie alle unspezifisch modifizierten Basen konnten keinem Motiv zugeordnet werden.

Sowohl die in Tabelle 19 beschriebenen Methylierungsmotive G1 und G2 als auch H1 und H2 stellen jeweils Partnermotive dar. Die Motive A und B präsentieren Palindrom-Sequenzen. Alle zuvor genannten Motive haben gemeinsam, dass sie an beiden Strängen methyliert sind wohingegen die Motive C, D, E und F nur an einem Strang eine Methylierungsstelle aufweisen. Die meisten Motivgruppen, A, B, C, E, G und H, sind fast komplett über das gesamte Genom hinweg in methylierter Form detektierbar gewesen. Ihre Methylierungshäufigkeit lag dabei zwischen 98,67 % und 99,75 %. Dagegen lag die Methylierungshäufigkeit des <sup>m6</sup>Methylierungsmotivs F nur bei 69,69 %.

Um die detektierten Methylierungsmuster mit anderen bereits bekannten Mustern zu vergleichen, wurde das *recognition sequence search feature* auf der Restriktions Enzyme Database-REBASE verwendet (Roberts *et al.* 2015). Mit diesem Tool konnten nur zwei der acht Motive aus Tabelle 19 zu bereits bekannten Restriktions-Systemen zugeordnet werden. Dazu zählen die Motive GATC und RAATTY. Beide gehören zu den TypII-Restriktions-Systemen (<http://rebase.neb.com/cgi-bin/pacbioget?17032>). Die übrigen Motive repräsentieren unbekannte *recognition sequences*, wobei die langen Motive G und H am wahrscheinlichsten spezifisch für *C. coli* sind oder für den hier untersuchten Stamm.

Bezüglich der RM-Systeme konnten mithilfe vom REBASE *sequence search feature* und NCBI, G2L und Prodigal/Prokka vier ORFs, die für Untereinheiten von Typ I-RM-Systemen kodieren, sieben ORFs, die für Untereinheiten von Typ II-RM-Systemen kodieren und drei ORFs, die für Untereinheiten von Typ VI-RM-Systemen kodieren, entdeckt werden.

Nur zwei der durch REBASE vorhergesagten *recognition sequences* korrespondieren zu einem spezifischen Motiv, welches durch SMRT-Sequenzierung identifiziert wurde (GAATTC/ RAATTY).



**Tabelle 19: Methylierungsmotive von *C. coli*-BFR-CA-9557**

Nr.	Motiv	Modifizierte Position	Modifizierungstyp	% Motive detektiert	# der Motive detektiert	# der Motive im Genom	Mittl. Modifikation QV <sup>1</sup>	Mittl. Motivdeckung	Partner-Motiv
A	RAATTY	3	m <sup>6</sup> A	98.67	27795	28170	309.40	235.73	RAATTY
B	GATC	2	m <sup>6</sup> A	99.66	7512	7538	344.25	257.15	GATC
C	RCATC	3	m <sup>6</sup> A	99.43	4381	4406	274.48	256.54	
D	CAAGAA	6	m <sup>6</sup> A	99.71	2069	2075	290.35	249.45	
E	GGGTDA	6	m <sup>6</sup> A	99.44	1607	1616	327.70	254.15	
F	DACATTGB	4	m <sup>6</sup> A	69.69	223	320	80.60	255.05	
G1	TAAANNNNGTG	3	m <sup>6</sup> A	99.75	392	393	271.96	259.91	CACNNNNNTTTA
G2	CACNNNNNTTTA	2	m <sup>6</sup> A	99.75	392	393	331.81	263.02	TAAANNNNGTG
H1	CAAYNNNNN-NTTYG	3	m <sup>6</sup> A	99.58	237	238	316.89	246.49	CRAANNNNNNRTTG
H2	CRAANNNNN-RTTG	4	m <sup>6</sup> A	99.58	237	238	276.97	247.15	CAAYNNNNNNTTYG

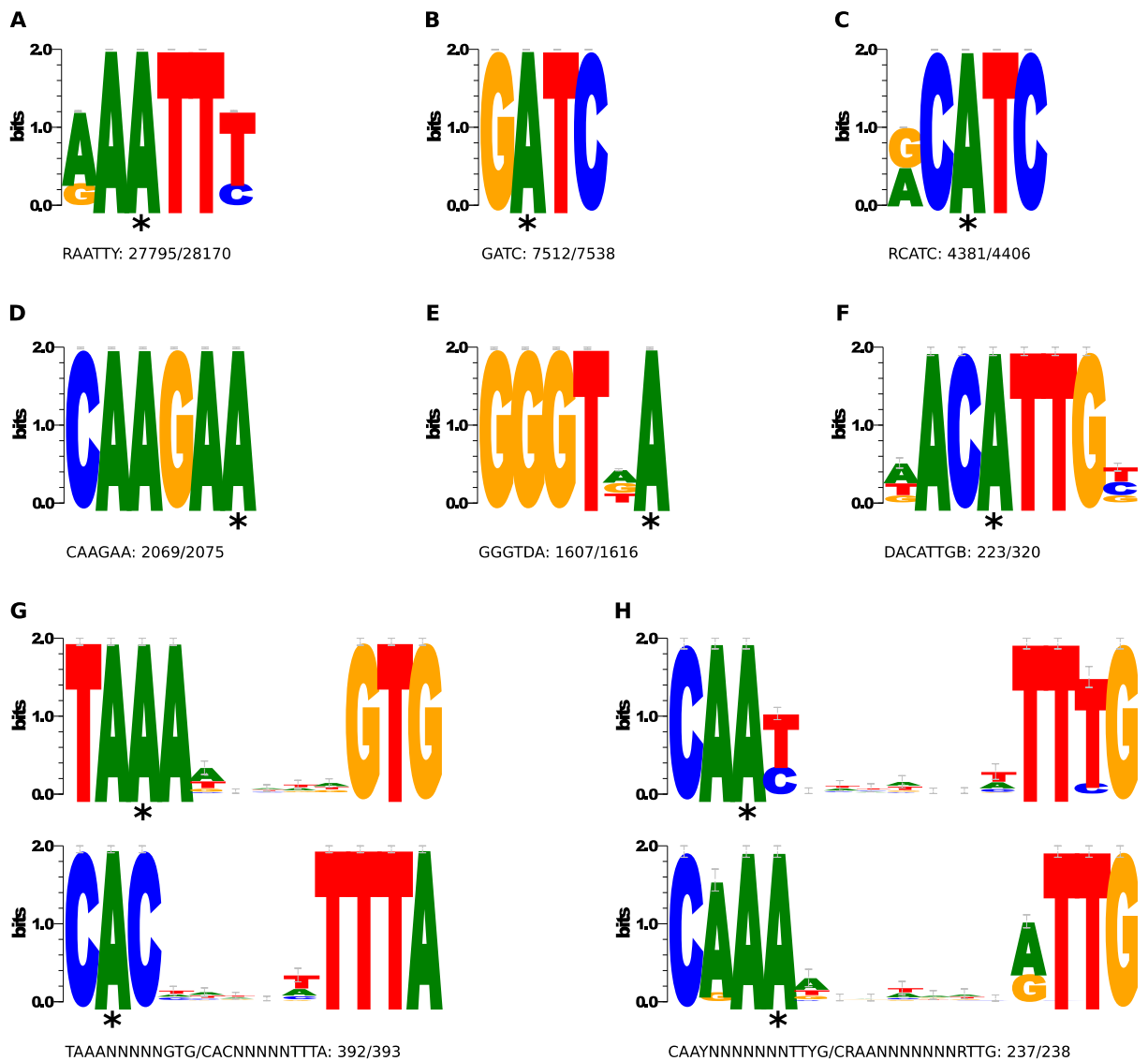
1 QV = quality value

Das Motiv A, RAATTY (s. Abbildung 14), wurde durch die DNS-Modifizierungsmethylase *FokIM\_2* (adeninspezifische Methyltransferase, ORF #02605) identifiziert und das Motiv B, GAATTC, wurde durch die DNS-Modifizierungsmethyltransferase *DpnA* (ORF #2895) identifiziert. Zusätzlich erkannte REBASE in ORF #8910 einen zweiten möglichen Kandidaten für eine GATC-spezifische DNS-Modifikations-Methyltransferase. Im Vergleich dazu ergaben Analysen des gleichen Genortes mit RAST oder Prodigal eine 16S-rRNA-(Guanin(966)-N(2))-Methyltransferase.

Für die zwei Methylierungsmotive GAGNNNNNGT und GGATG, assoziiert mit der Typ I-Restriktions-Modifikations-System-2c-DNS-Methyltransferase-Untereinheit M (ORF #6540) bzw. mit einem Homolog der DNA-Modifikationsmethylase FokI (ORF #720), konnten keine korrespondierenden Motive durch SMRT-Sequenzierung im Genom von *BFR-CA-9557* festgestellt werden. Auch die mittels REBASE untersuchten, verbleibenden zehn Gene für RM-System-Untereinheiten, konnten nicht mit einem spezifischen Methylierungsmotiv assoziiert werden. Somit konnte durch REBASE keines der Motive C, D, E, F, G und H einem korrespondierenden RM-System zugeordnet werden. Wahrscheinlich beruht es auf der Tatsache, dass nur die Motive A (RAATTY) und B (GATC), nicht aber

die restlichen Motive in den publizierten Genomen von *C. jejuni* und *H. pylori* vorhanden sind (Zautner *et al.* 2015; O’Loughlin *et al.* 2015; Krebs *et al.* 2014; Murray *et al.* 2012).

Motiv B (GATC) ist in keinem der publizierten *C. jejuni*-Methylome präsent, jedoch im Methylom von *H. pylori* 26695 und *H. pylori* J99-R3 (Zautner *et al.* 2015; Murray *et al.* 2012). In den *H. pylori*-Genomen wird es durch eine Restriktions-Modifikations-System-IIM-Untereinheit erzeugt, die auf den ORFs hp0092 (*H. p.* 26695) und jhp0085 (*H. p.* J99-R3) kodiert ist (Zautner *et al.* 2015; Lin *et al.* 2001; Kong *et al.* 2000). Die homologe Gensequenz von *C. coli* BFR-CA-9557 stimmt in 76 % mit der von *H. pylori* 26695 (hp0092) überein (553/730; *Query coverage*: 86 %). Im Gegensatz dazu wurde Motiv A (RAATTY) in keinem der *H. pylori* Methylome entdeckt, aber in den *C. jejuni* Isolaten *C. jejuni* F38011, NCTC11168 und NCTC 81-176. Für die übereinstimmenden drei Isolate konnte eine Zuteilung zu einer RM-System-Untereinheit vorgenommen werden (Zautner *et al.* 2015; O’Loughlin *et al.* 2015; Murray *et al.* 2012). Für das zu cj0208 (NCTC 11168) homologe Gen in *C. coli* BFR-CA-9557 wurde eine Sequenzidentität von 85% demonstriert (893/1050; *Query coverage*: 95 %).



**Abbildung 14: Sequenz-Logo der acht Methylierungsmotive**

Alle acht Methylierungsmotive sind mittels des WebLogo 3 server ([weblogo.threeplusone.com/create.cgi](http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi)) als Sequenz-Logo dargestellt. Die Höhe des jeweiligen Logos indiziert den Konservierungsgrad (bits). Die Höhe der einzelnen Buchstaben stellt die relative Frequenz der Base dar. Sternchen unter einigen der Buchstaben kennzeichnen modifizierte bzw. methylierte Basen. Die zwei Motive H und G sind Partnermotive, die in beiden Strängen eine Methylierung aufweisen. Alle Motive werden von N-6-Adenin-spezifischen Methyltransferasen erkannt.

Ergänzend zu dem soeben beschriebenen Isolat *C.coli* BFR-CA-9557, welches positiv auf GATC-Methylierung getestet wurde und der Klade 1 angehört, ist jeweils ein Isolat aus Klade 2 und 3 mittels SMRT-Sequenzierung untersucht worden. Die Spezifika der beiden Genome und Methylome werden im Folgenden genauer beschrieben.

#### **4.4 SMRT-Sequenzierung von *Campylobacter coli* CCS249-07-13784**

Das untersuchte *C.coli*-Isolat *CCS249-07-13784* wurde von der Universität Ljubljana in Slovenien zur Verfügung gestellt und entstammt aus Oberflächenflusswasser. Mithilfe von MLST-Typisierung wurde der Sequenztyp 7859 ermittelt. Er gehört der Klade 2 an und zeigt kein methylierungsspezifisches Restriktionsmuster.

Das Ergebnis der Sequenzierung des *C.coli*-Isolats *CCS249-07-13784*, mithilfe einer SMRT-Cell, ergab 75.350 *Continuous long reads* (CLR), mit einer mittleren Länge von 12.564 Basenpaaren. Daraus sind 106.142 *subreads*, mit einer durchschnittlichen Länge von 8.905 bp, extrahiert worden.

Wie schon zuvor bei der Analyse vom Isolat *C. coli* BFR-CA-9557 beschrieben, konnten auch für das hier untersuchte Isolat Methylierungsmotive identifiziert werden. Diese sind in Tabelle 20 und 21 abgebildet. Durch die PacBio SMRT Analysis Software konnten zehn Methylierungsmotive entdeckt werden, von denen die Sequenzen 1 und 2 sowie 6 und 7 Partnermotive darstellen. Die Motive 3 und 4 stellen Palindromsequenzen dar. Sechs der zehn Motive sind durch die N-6-Adeninspezifische Methyltransferase erkannt worden, zwei Motive enthalten <sup>m4</sup>C-methylierte Basen und zwei Motive unspezifisch modifizierte Basen. REBASE deckt sich in sieben Motiven mit denen von PacBio.

**Tabelle 20: Methylierungsmotive von *C. coli*-CCS249-07-13784**

Nr	Motiv	Modifizierte Position	Modifizierungstyp	% Motive detektiert	#-der Motive detektiert	# Motive Genom	der im	Mittl. Modifikation QV <sup>1</sup>	Mittl. Motivdeckung	Partner-Motiv
1	CAGNNNNNNTGA	2	m <sup>6</sup> A	100%	467	467		257,16	178,31	TCANNNNNNCTG
2	TCANNNNNNCTG	3	m <sup>6</sup> A	99,79%	466	467		245,17	177,96	CAGNNNNNNTGA
3	CATG	2	m <sup>6</sup> A	100%	6368	6368		251,30	177,19	CATG
4	RAATTY	3	m <sup>6</sup> A	99,97%	30495	30504		244,53	173,10	RAATTY
5	GARGAG	5	m <sup>6</sup> A	99,59%	1207	1212		236,41	176,16	
6	CCGT	1	m <sup>4</sup> C	99,51%	1641	1649		129,30	178,06	ACGG
7	ACGG	2	m <sup>4</sup> C	93,94%	1549	1649		108,27	178,11	CCGT
8	GCGGAGNANNNNH	5	unknown	55%	44	80		62,25	177,02	
9	HTCANNNNNNCATG	4	m <sup>6</sup> A	45,57%	36	79		106,08	176,97	
10	HNDNNRCGGTANY	8	unknown	30,27%	56	185		51,09	177,43	

**Tabelle 21: Methylierungsmotive von *C. coli*-CCS249-07-13784 (REBASE)**

Nr	Motiv	Modifizierte Position	Modifizierungstyp	% Motive detektiert	Länge	Mittl. Motivdeckung	Typ/Subtyp	Enzyme
1	RAATTY	3	m <sup>6</sup> A	100%	364	173.1	II alpha	M.Cco249I
2	CAGNNNNNNTGA	2	m <sup>6</sup> A	100%	495	178.1	I gamma	M.Cco249II
3	ACGG	2	m <sup>4</sup> C	93.9 %		178.1	II	Unbekannt
4	CATG	2	m <sup>6</sup> A	100%		177.2	II	Unbekannt
5	GARGAG	5	m <sup>6</sup> A	99.6%		176.2	II	Unbekannt
6	GCGGAGNANNNNH	5	unknown	55.0%		177.0	II	Unbekannt
7	HNDNNRCGGTANY	8	unknown	30.3%		177.4	II	Unbekannt

Dem Motiv CATG konnte kein Enzym eindeutig zugeordnet werden, da es zwei mögliche Kandidaten gibt. Die Motive GCGGAGNANNNNH und HNDNNRCGGTANY sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Artefakte und sind möglicherweise zu ACGG zugehörig.

#### 4.5 SMRT-Sequenzierung von *Campylobacter coli* CCS17341-20

Das untersuchte *C.coli*-Isolat CCS17341-20 wurde ebenfalls von der Universität Ljubljana in Slovenien zur Verfügung gestellt und entstammt Oberflächenflusswasser. Mithilfe von MLST-Typisierung wurde der Sequenztyp 7907 ermittelt. Er gehört der Klade 3 an und zeigte kein methylierungsspezifisches Restriktionsmuster.

Mittels einer SMRT-Cell™ konnte das Isolat *Campylobacter coli* CCS17341-20 sequenziert werden. Dies ergab 75.166 *Continuous long reads* (CLR) mit einer durchschnittlichen Länge von 10.555 Basenpaaren. Aus den CLRs konnten 102.008 subreads, mit einer mittleren Länge von 7.764 bp, extrahiert werden.

Auch für das Isolat *C. coli* CCS17341-20 sind mithilfe des „*recognition sequence search feature*“ auf der Restriktions Enzyme Database-REBASE (Roberts et al. 2015) sowie der PacBio SMRT Analysis Software Methylierungsmotive identifiziert worden (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23). Mit der PacBio SMRT Analysis Software wurden sechs Methylierungsmotive entdeckt, davon stellen die Motive 3 und 4 Palindrom-Sequenzen dar. Alle Motive sind durch die *N*-6-Adeninspezifische Methyltransferasen erkannt worden. Von den sechs durch PacBio SMRT Analysis Software identifizierten Methylierungsmotiven hat REBASE vier Motive zu Restriktions-Systemen zugeordnet. Die anderen beiden durch PacBio entdeckten Motive wurden durch REBASE nicht identifiziert.

**Tabelle 22: Methylierungsmotive von *C.coli-CCS17341-20***

Nr	Motiv	Modifizierte Position	Modifizierungstyp	% Motive detektiert	# der Motive detektiert	# der Motive im Genom	Mittl. Modifikation QV <sup>1</sup>	Mittl. Motivdeckung	Partner-Motiv
1	CTAYNNNNNNNTTC	3	<sup>m6</sup> A	100 %	276	276	230,47	166,22	
2	GAAVNNNNNNRTAG	3	<sup>m6</sup> A	100 %	201	201	214,39	163,82	
3	AGTNNNNNNNACT	1	<sup>m6</sup> A	100 %	616	616	236,12	165,89	AGTNNNNNNNACT
4	YGAATTR	4	<sup>m6</sup> A	100 %	574	574	250,13	164,18	
5	RAATTY	3	<sup>m6</sup> A	99,95 %	26553	26566	233,67	163,46	RAATTY
6	YGAATV	4	<sup>m6</sup> A	99,73 %	2224	2230	225,77	164,93	

**Tabelle 23: Methylierungsmotive von *C. coli-CCS17341-20* (REBASE)**

Nr	Motiv	Modifizierte Position	Modifizierungstyp	% Motive detektiert	Länge	Mittl. Motivdeckung	Typ/Subtyp	Enzym
1	RAATTY	3	<sup>m6</sup> A	100 %	364	163.5	II alpha	M.Cco17341I
2	AGTNNNNNNNACT	1	<sup>m6</sup> A	100 %	636	165.9	I gamma	M.Cco17341II
3	CTAYNNNNNNNTTC	3	<sup>m6</sup> A	100 %	495	166.2	I gamma	M.Cco17341III
4	YGAATV	4	<sup>m6</sup> A	99.7 %	617	164.9	III beta	M.Cco17341IV

Das Enzym M.Cco17341ORFBP stellt den besten Kandidaten für das Motiv YGAATV dar. Dasselbe Motiv sowie ein eng verwandtes Gen ist bereits im Genom von *Campylobacter jejuni* 32488 identifiziert worden. Die beiden Motive CTAYNNNNNNNTTC und GAAVNNNNNNRTAG stellen gegebenenfalls komplementäre Stränge dar mit dem realen Motiv GAANNNNNNRTAG.

## 5 Diskussion

### 5.1 Kladen und Verwandtschaft

Durch MLST-Typisierung lassen sich eng verwandte Bakterienstämme oder einzelne Isolate einer mikrobiellen Spezies voneinander unterscheiden (Urwin und Maiden 2003). Sheppard *et al.* (2008) teilten mithilfe dieser Methode die mikrobielle Spezies *C. coli* entsprechend ihrem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad in drei Kladen auf. In weiteren Studien zeigte sich, dass Klade 1-Isolate hauptsächlich von Schweine-Isolaten, teilweise auch von Geflügel- und menschlichen Isolaten stammen (Sheppard *et al.* 2008, 2010). Klade 2- und 3-Isolate wurden typischerweise aus Oberflächenflusswasser isoliert (Litrup *et al.* 2007; Sheppard *et al.* 2010). Im Vergleich mit den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten lässt sich bezüglich Klade 2- und 3-Isolaten eine Übereinstimmung erkennen. Auch hier stammen die meisten Klade 2- und Klade 3-Isolate aus Oberflächenflusswasser. Zusätzlich sind drei Puten-Isolate der Klade 3 zugehörig. Einzig die Klade 1 ist von einer höheren Diversität geprägt (siehe 4.1.2). Sheppard *et al.* zeigten zudem in mehreren Studien, dass die drei Kladen in unterschiedlichem Maße Gene von *C. jejuni* in ihr Genom integriert haben bzw. auch Gene an *C. jejuni* abgegeben haben. Der höchste Genfluss lag zwischen Klade 1 und *C. jejuni* vor (Sheppard *et al.* 2008). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass alle humanen Infektionen mit *C. coli* vorwiegend durch Isolate der Klade 1 verursacht worden sind, welche im Zuge der Evolution wahrscheinlich eine neue Nische im Bereich der Landwirtschaft besetzten. Diese Nische wird ebenfalls durch *C. jejuni* besiedelt. Aufgrund dessen kann daraus geschlossen werden, dass die physiologischen Gegebenheiten, also die Besiedlung der gleichen Nische durch zwei verwandte Stämme, dazu geführt haben, dass ein vermehrter Genaustausch stattgefunden hat, um sich an die Gegebenheiten bestmöglich anzupassen (Sheppard *et al.* 2010).

Die beiden klonalen Komplexe ST-828 und ST-1150 machen einen Großteil der Klade 1 aus und stellen außerdem den Großteil der aus der Landwirtschaft typisierten Isolate dar (Sheppard *et al.* 2013). Eine Studie von Skarp-de Haan *et al.* (2014) lässt vermuten, dass auch zwischen den drei Kladen Genaustausch stattfindet. Dabei fanden Untersuchungen zum Gamma-Glutamyl-Transpeptidase-Gen *ggt* statt. GGT gehört normalerweise zum Kerngenom von *Helicobacter pylori* und ist eine hochkonservierte Genregion. Auch in *C.*



*jejuni*-Stämmen ist dieser Genort zu finden (Skarp-de Haan *et al.* 2014; Rossi *et al.* 2012). Innerhalb der Spezies *Campylobacter* konnte GGT bisher nur in *C. jejuni*-Isolaten nachgewiesen werden und nur in speziellen klonalen Komplexen (Hofreuter *et al.* 2008; Skarp-de Haan *et al.* 2014; Zautner *et al.* 2011). Skarp de Haan *et al.* (2014) haben GGT auch in einem *C. coli*-Stamm nachweisen können, was zuvor noch nicht bekannt war. Das führt zu der Frage, wieviel Genaustausch zwischen beiden mikrobiellen Spezies *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen, die wenig bis keine Introgression aufzeigen, stattfindet (Skarp-de Haan *et al.* 2014).

Als Ursache könnte zum Beispiel ein vermutetes respiratorisches System bei Klade 3-Stämmen gelten. Dieses System erlaubt es dem Bakterium, sich in mehreren ökologischen Nischen auszubreiten. Durch diese Variabilität kann es zu einer Ko-Infektion eines Wirts oder zu einer Ko-Kolonisation einer ökologischen Nische mit Isolaten aus verschiedenen Kladen kommen. Dies bietet die Möglichkeit eines Genaustausches (Skarp-de Haan *et al.* 2014).

## 5.2 Methylierung der genomischen *C. jejuni*- und *C. coli*-DNS

DNS-Methylierung ist ein wichtiger Mechanismus in prokaryotischer DNS (Zautner *et al.* 2015; Kumar und Rao 2013). Sie beeinflusst zum einen die Genexpression (Srikhanta *et al.* 2005; Zautner *et al.* 2015) durch Stoppen der Transkription, zum anderen die Initiation der Replikation (Zautner *et al.* 2015; Yamaki *et al.* 1988; Braun *et al.* 1985) und Mismatch-Reparatur (Zautner *et al.* 2015; Marinus und Casadesus 2009). Des Weiteren dient sie dem Schutz des Wirtsgenoms vor fremder DNS als Bestandteil von RM-Systemen. RM-Systeme der beiden Spezies *C. jejuni* und *H. pylori* wurden bereits ausgiebig erforscht (Zautner *et al.* 2015; O'Loughlin *et al.* 2015; Krebs *et al.* 2014; Yun *et al.* 2012). Studien lassen vermuten, dass die Methylierung der DNS außerdem die Genom-Regulation beeinflusst. Die Prävalenz und die Eigenschaften von nicht RM-System-assoziierten Methylierungssystemen sind bisher jedoch nur wenig erforscht (Blow *et al.* 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde das Methylom von *C. coli* genauer untersucht.

Schon Gomez-Eichelmann *et al.* (1991) zeigten, dass Dcm-Methylierung nur in Stämmen der Familie *Enterobacteriaceae* mit hohem genetischen Verwandtschaftsgrad zu *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella* vorkommt.

Etwa 15 % der in dieser Arbeit untersuchten *C. coli*-Isolate wiesen phänotypisch eine DNS-Methylierung auf. Dagegen konnte dies für die vorliegenden *C. jejuni*-Isolate durch Isoschizomer-Digestions-Assay nicht nachgewiesen werden. Unterschiede im Methylierungsverhalten der einzelnen hier verwendeten *C. coli*-Isolate lassen darauf schließen, dass ein Wirts-assoziiertes DNS-Modifikations-System vorliegt (Zautner *et al.* 2015; Wright *et al.* 2010; Edmonds *et al.* 1992). Bereits Wright *et al.* (2010) zeigten, dass bei häufig vorkommenden Sequenztypen, aber unterschiedlichem Methylierungsverhalten, ein horizontaler Gentransfer des Gens, welches für die Methylierung verantwortlich ist, zwischen nahe verwandten *C. coli*-Isolaten stattfindet. Anderfalls kann es auch zu einer Inaktivierung oder Verlust des Gens gekommen sein (Wright *et al.* 2010).

Eine Untersuchung von Blow *et al.* (2016), bei der 230 verschiedene Bakterien untersucht worden sind, gibt möglicherweise einen neuen Einblick in das Methylierungsverhalten von Bakterien und Archaeen. Im Genom vieler Prokaryoten sind MTasen präsent, wobei sowohl die Fülle, die Motive der DNS-Methylierung als auch die funktionelle Diversität dieser MTasen bisher unbekannt blieben. Unklar war bisher auch, inwieweit MTasen, welche mit RM-Systemen assoziiert sind, ebenfalls regulatorische Funktionen besitzen. In 93 % der untersuchten Isolate von Blow *et al.* konnte Methylierungsverhalten nachgewiesen werden. Im Zuge dessen erforschte man 834 verschiedene Methylierungsmotive und 620 DNS-Methyltransferasen. Außerdem konnten bei 48 % der Organismen Typ II-MTasen identifiziert werden, welche nicht mit RM-Systemen assoziiert sind. Diese sogenannten Waisen-MTasen ließen sich in den verschiedensten Bakterien- und Archaeen-Stämmen finden. Die Waisen-MTasen zeigen motivspezifische Methylierungsmuster, die sich mit Funktionen der Genregulation sowie der DNS-Replikation vereinbaren lassen (Blow *et al.* 2016). Waisen-MTasen sind mit inkompletter Methylierung ihrer Zielmotive assoziiert. Laut Blow *et al.* (2016) sind die assoziierten Methylierungsmotive in den Transkriptions-Initiationsbereichen in den nicht kodierenden Sequenzen strangaufwärts hin zu kodierenden Genen statistisch signifikant häufiger nicht-methyliert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sie eine regulatorische Rolle einnehmen (Blow *et al.* 2016). Zu den Waisen-MTasen gehört, unter anderem die hier verwendete DAM-Methylase, eine Typ II-MTase. Auch

Blow *et al.* (2016) vermuten, dass durch horizontalen Gentransfer MTasen und RM-Systeme unter den Organismen transferiert werden.

Wie in dieser Arbeit untersucht, gibt es viele bekannte Typ II-RM-Systeme, da diese die DNS an der gleichen Stelle schneiden an der sie auch binden, und somit gut zu untersuchen sind. Typ I-RM-Systeme schneiden die DNS weit entfernt von ihrer Bindungsstelle. Typ IIG- und Typ III-RM-Systeme liefern teilweise inkomplette Schnittmotive (Blow *et al.* 2016; Pingoud *et al.* 2014). Dies macht es bisher schwer, diese RM-Systeme mit etablierten Methoden, wie z.B. die Analyse der Methylierungsmotive durch Restriktions-Verdau, zu identifizieren. Mithilfe der SMRT-Sequenzierung ist dies nun möglich (Blow *et al.* 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle *C. coli*- und *C. jejuni*-Isolate auf ihr Methylierungsverhalten mithilfe eines Restriktions-Verdau untersucht. Wie bereits zuvor beschrieben, lassen sich dadurch nicht alle RM-Systeme gut charakterisieren, so dass auch unter den untersuchten Isolaten ein höherer Anteil an Methylierungen zu erwarten ist.

### 5.3 SMRT-Sequenzierung

Im Gegensatz zu *C. coli* wurden für *C. jejuni*, *C. lari* und *C. upsaliensis* bereits Typ III-RM-Systeme beschrieben. Bisher wurde noch kein Methylom von *C. coli* untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte der restriktionsspezifische Verdau mit *DpnI* jedoch Unterschiede im Methylierungsverhalten an GATC-Sequenzen verschiedener Isolate. Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Unterschiede auf wirtsassoziierte DNS-Modifikationssysteme zurückzuführen sind (Edmonds *et al.* 1992; Wright *et al.* 2010; Zautner *et al.* 2015). Gegenstand dieser Untersuchung war es das erste Methylom von *C. coli* mittels SMRT-DNS-Sequenzierung zu analysieren (siehe Methoden). Dadurch war es möglich Methylierungsmotive und RM-System-Genloci gleichzeitig zu identifizieren.

Es gibt zum jetzigen Zeitpunkt sieben vollständig geschlossene *C. coli*-Genome (Zautner *et al.* 2015; Skarp-de Haan *et al.* 2014; Tatusova *et al.* 2014; Chen *et al.* 2013; Pearson *et al.* 2013), sowie einige nicht-geschlossene Genome. Diese Daten sind in der NCBI-Datenbank zu finden (Zautner *et al.* 2015; Criscuolo *et al.* 2014; Richards *et al.* 2013;

Sheppard *et al.* 2013; Fouts *et al.* 2005). Die Länge der sieben geschlossenen *C. coli*-Genomsequenzen reicht von 1,685 bis 1,872 Mbp (Megabasenpaare). Der Anteil der Basen Guanin und Cytosin beträgt 31-32 %. Sie enthalten 1715 bis 1970 vermutete Gene, inklusive 1642 bis 1861 Protein-kodierende *ORFs* (Zautner *et al.* 2015; Skarp-de Haan *et al.* 2014; Tatusova *et al.* 2014; Chen *et al.* 2013; Pearson *et al.* 2013).

Für die SMRT-DNS-Sequenzierung wurde zunächst ein *C. coli*-Isolat (*C. coli*-CA-9557) ausgewählt, welches mittels des in 3.4 beschriebenen *Isoschizomer-Digestions-Assay* positiv auf methylierte GATC-Sequenzen getestet worden ist. Dieses Isolat gehört der Klade 1 an. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für das erste untersuchte Isolat (*C. coli*-CA-9557), unter Verwendung einer SMRT-Cell™, eine Genomsequenz mit einer Länge von 1.7 Mbp. Der Guanin- und Cytosin-Anteil dieses *Contigs* lag bei 31,4 %. Eine ähnliche Anzahl (NCBI, RAST und Prodigal: 1637/1769/1797) vermuteter Gene im Vergleich zu den sieben bereits untersuchten Genomen, sowie 275/366/453 hypothetische Protein-kodierende Sequenzen, konnten identifiziert werden.

Im Anschluss an die Untersuchung des Isolates *C. coli*-CA-9557 wurden zwei Isolate ausgewählt, die jeweils Klade 2 (*C. coli* CCS249-07-13784) und Klade 3 (*C. coli* CCS17341-20) vertreten. Beide zeigten keine methylierungsspezifischen Restriktionsmuster. Wie zuvor, wurde unter Verwendung einer SMRT-Cell™ das Genom der beiden Isolate sequenziert. Dabei ließ sich je ein 1,860 Mbp sowie ein 1,589 Mbp langes *Contig* konstruieren.

#### 5.4 Das *C. coli*-Methylom

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Analyse des Methyloms von drei *C. coli*-Isolaten aus den Kladen 1-3 mittels SMRT-Sequenzierung. Dafür wurden die Isolate BFR-CA-9557 (Klade 1), CCS249-07-13784 (Klade 2) und CCS17341-20 (Klade 3) ausgewählt. Der Klade-1-Stamm ist im enzymatischen Verdau mit 5'-G<sup>m</sup>ATC-3' spezifischen Restriktionsendonukleasen positiv getestet worden. Die beiden anderen Isolate dagegen negativ.

Die biologische Funktion der RM-Systeme der untersuchten Isolate ist schwer vorausszusagen. Insbesondere dann, wenn diese nicht mit einem spezifischen Methylierungsmotiv assoziiert werden konnten. Die Mehrheit der Methylierungsmotive sowie Methylasen des

Genoms der untersuchten Isolate wurde neu beschrieben wurden. Von *H. pylori* ist bekannt, dass RM-Systeme eine wichtige Rolle in der Bildung von DNS-Aufnahme-Barrieren spielen, um das Eindringen von Plasmiden, Phagen und chromosomaler DNS zu verhindern (Zautner *et al.* 2015; Ando *et al.* 2000). Außerdem sind *H. pylori*-Bakterien grundsätzlich sehr anfällig für die Aufnahme von DNS. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass diese Tatsache stark zwischen den unterschiedlichen Isolaten variiert. Isolate, die eine niedrige endogene RM-System Aktivität besitzen, zeigen die höchste Transformations-Effizienz. Insbesondere *MboI*-Homologe, welche in der vorliegenden Arbeit für den *Isoschizomer digestion assay* verwendet wurden (siehe 3.4), sind bei *H. pylori* eine wichtige Komponente für die DNS-Aufnahme-Barriere (Zautner *et al.* 2015; Ando *et al.* 2000). Das zu *MboI*-homologe RM-System in *H. pylori* wird *HpyIII* genannt und ist eine hoch konservierte Genregion in *H. pylori*-Stämmen welche dem Schutz vor Verdauung durch das Restriktionsenzym *MboI* dient.

In *MboI*-sensitiven Stämmen konnte kein *hpyIII*-Gen gefunden werden. Im Gegenzug dazu aber eine zu *C. jejuni* *cj1602* homologe Sequenz *hrmA*. *HpyIII*-negative aber *hrmA*-positive Isolate stehen im Zusammenhang mit Magenkarzinomen bei asiatischen Patienten. Hierbei ist die Pathogenese jedoch unklar (Zautner *et al.* 2015; Ando *et al.* 2002).

Neben der Rolle für den DNS-Aufnahmeprozess stellt die hohe Variabilität innerhalb der Spezies *H. pylori* bezogen auf die RM-System-Konfiguration und der damit verbundenen Facettenreichheit des Methylierungsstatus der DNS eine gute Grundlage für ein neues Typisierungssystem dar (Zautner *et al.* 2015; Xu *et al.* 2000). Dieses auf dem Methylierungsmuster der DNS basierende System könnte hilfreich sein, sowohl verschiedene *H. pylori* Isolate, als auch mit *H. pylori* verwandte bakterielle Spezies, wie z. B. *C. jejuni* oder *C. coli*, für epidemiologische und klinische Zwecke voneinander zu unterscheiden.

Wie bereits erwähnt, untersuchten Blow *et al.* (2016) eine große Anzahl an Bakterienstämmen auf ihr Methylierungsverhalten. Unter anderem wurden sogenannte Waisen-MTasen identifiziert. Diese wurden in Familien eingeteilt. Die am häufigsten vorkommende Waisen-MTase Familie methyliert das Motiv RAATY, welches auch in den hier untersuchten *C. coli*-Isolaten aller drei Kläden vorkommt. Weiter zeigten Blow *et al.* (2016), dass Waisen-MTasen phylogenetisch stark konserviert sind und sie vermuten somit, dass diese neben dem Schutz der DNS noch weitere Funktionen erfüllen.

## 5.5 Ausblick

Morozova *et al.* (2016) untersuchten 2016 die Dynamik von RM-Systemen bei der Invasion eines Wirts mit unmodifizierten genomischen Methylierungsmotiven durch *E.coli* und konnten zeigen, dass es eine deutliche Zeitverzögerung in der Synthese der Restriktions-Endonukleasen gibt. Die untersuchten *E. coli*-Stämme waren mit Plasmiden bestückt, die ein Esp1396I-Typ-II-R-M-System mitbrachten. Durch die zeitverzögerte Synthese der Restriktions-Endonukleasen hatten die Methylasen ausreichend Zeit, die DNS zu methylieren und somit zu schützen. Des Weiteren konnte in der Studie gezeigt werden, dass vor dem Auftreten der Restriktionsendonuklease Esp1396I, die intrazelluläre Konzentration der Esp1396I Methyltransferase einen deutlichen Konzentrationsanstieg zeigte. Dies erlaubt dem Bakterium eine rasche Methylierung der Wirts-DNS.

Weiter beschreibt Morozova, dass suboptimale Level der Methyltransferasen zu einer Akkumulation von unmodifizierter DNS führen, die dann durch Nukleasen abgebaut werden und letztlich zum Zelltod führen können (Morozova *et al.* 2016; Ichige und Kobayashi 2005). Ein zu hoher Anteil an Restriktionsendonukleasen würde zum gleichen Ergebnis führen. Ebenfalls kann eine zu hohe Methylasenaktivität die Möglichkeit eröffnen, dass infizierende Phagen-DNS vor dem Abbau geschützt wird und somit die bakterielle Population gefährdet wird. Das gleiche Ergebnis würde sich aus einer zu niedrigen Endonukleasenaktivität ergeben (Morozova *et al.* 2016; Enikeeva *et al.* 2010).

Die Studie lässt vermuten, dass RM-Systeme einem sehr sensiblen Gleichgewicht unterliegen. Kleine Änderungen des Gleichgewichts können zu großen Auswirkungen führen. Dieses Wissen kann man sich zunutze machen und aktiv in die Modifikation von DNS eingreifen.

Dies ist bereits für Nukleasen, das sind Enzyme, welche Nukleinsäuren abbauen, geschehen. Im Jahr 1962 entdeckte Werner Arber die Restriktionsenzyme als Werkzeuge der Gentechnik. Restriktionsenzyme, auch als Restriktionsendonukleasen bezeichnet, sind Enzyme, die doppelsträngige DNS-Moleküle an spezifischen Nukleotidsequenzen zerschneiden können. In dieser Arbeit sind gentechnisch hergestellte, rekombinante Nukleasen, Restriktionsendonukleasen, verwendet worden. Methylasen übertragen Methylgruppen auf Biomoleküle, wie z. B. DNS. In der Bakteriologie wird dadurch die DNS vor dem Abbau

durch Endonukleasen geschützt. Häufig kommen Methylasen und Endonukleasen gemeinsam in Form von RM-Systemen vor (Zautner *et al.* 2015).

Die hier untersuchten Methylasen können in der Zukunft ggf. in der Biotechnologie eingesetzt werden, wie heute bereits die verschiedenen Nukleasen. Mit Einsatz von rekombinanten Methylasen können spezifische DNS-Sequenzen modifiziert werden und somit vor dem Abbau durch Endonukleasen geschützt werden.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Analyse des Methyloms eines Isolats aus jeder der drei *C. coli*-Kladen mittels SMRT-Sequenzierung. Dafür wurde aus Klade 1 ein Stamm ausgewählt, BFR-CA-9557, der im enzymatischen Verdau mit 5'-G<sup>m</sup>ATC-3'-spezifischen Restriktionsendonukleasen positiv getestet worden war. Aus Klade 2 wurde *C. coli* CCS249-07-13784 und aus Klade 3 *C. coli* CCS17341-20 ausgewählt. Beide zeigten keine methylierungsspezifischen Restriktionsmuster. Unter Verwendung je einer SMRT-Zelle konnte das gesamte Genom der Isolate sequenziert werden. Dabei konnte für BFR-CA-9557 ein 1,7 Mbp großes Genom, für CCS249-07-13784 ein 1,860 Mbp und für CCS17341-20 ein 1,589 Mbp großes Genom identifiziert werden.

Durch SMRT Analysis Modification und Motiv-Detektion konnten zehn dominant vorkommende Methylierungsmotive für *C. coli*-CA-9557 identifiziert werden. Daneben wurden mithilfe von REBASE und drei anderen Annotationsalgorithmen 14 RM-System-Untereinheiten identifiziert. Von den zehn Methylierungsmotiven korrespondieren nur zwei Motive mit den durch REBASE vorgeschlagenen Motiven. Die übrigen acht Motive entsprechen keinem in der Database bereits vorhandenen Motiv anderer Bakterienstämme, wie z.B. der verwandten Stämme von *Helicobacter pylori* oder *C. jejuni*. Somit stellen diese charakteristische Motive für *C. coli* bzw. *C. coli*-Isolat BFR-CA-9557 dar. Zu den wichtigen Erkenntnissen, die aus dem Genom des untersuchten Stammes BFR-CA-9557 gewonnen werden konnten, zählt die Anwesenheit des CJIE1-like-Element-Phagen.

Für *Campylobacter coli* CCS249-07-13784 sind durch die PacBio SMRT Analysis Software zehn Methylierungsmotive entdeckt worden, die sich mit REBASE in sieben Motiven decken. Sechs der zehn Motive sind durch die N-6-Adeninspezifische Methyltransferase erkannt worden, zwei Motive enthalten <sup>m4</sup>C-methylierte Basen. Außerdem sind für *Campylobacter coli* CCS17341-20 sechs Methylierungsmotive identifiziert worden, davon konnte REBASE vier Motive zu Restriktions-Systemen zuordnen. Alle Motive sind durch die N-6-Adeninspezifische Methyltransferase erkannt worden.



## 7 Literaturverzeichnis

- Aizawa SI (2001): Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* 202, 157–164
- Ajene AN, Walker CLF, Black RE (2013): Enteric Pathogens and Reactive Arthritis: A Systematic Review of Campylobacter, Salmonella and Shigella-associated Reactive Arthritis. *J Health Popul Nutr* 31, 299-307
- Allos BM (2001): Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clin Infect Dis* 32, 1201–1206
- Ando T, Xu Q, Torres M, Kusugami K, Israel DA, Blaser MJ (2000): Restriction–modification system differences in *Helicobacter pylori* are a barrier to interstrain plasmid transfer. *Mol Microbiol* 37, 1052–1065
- Ando T, Wassenaar TM, Peek RM, Aras RA, Tschumi AI, Van Doorn LJ, Kusugami K, Blaser MJ (2002): A *Helicobacter pylori* restriction endonuclease-replacing gene, *hrgA*, is associated with gastric cancer in Asian strains. *Cancer Res* 62, 2385–2389
- Artemis comparison tool, Sanger Institute; <http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>; letzter Zugriff am 24.01.2017
- Barbeyron T, Kean K, Forterre P (1984): DNA adenine methylation of GATC sequences appeared recently in the *Escherichia coli* lineage. *J Bacteriol* 160, 586
- Barras F, Marinus MG (1988): Arrangement of Dam methylation sites (GATC) in the *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Res* 16, 9821-9838
- Batz MB, Henke E, Kowalczyk B (2013): Long-term consequences of foodborne infections. *Infect Dis Clin North Am* 27, 599–616
- Bayliss CD (2009): Determinants of phase variation rate and the fitness implications of differing rates for bacterial pathogens and commensals. *FEMS Microbiol Rev* 33, 504–520
- Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kühl AA, Dashti JI, Zautner AE, Muñoz M, Loddenkemper C (2011a): Novel murine infection models provide deep insights into the “Ménage à Trois” of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PLoS ONE* 6(6)
- Bereswill S, Plickert R, Fischer A, Kühl AA, Loddenkemper C, Batra A, Siegmund B, Göbel UB, Heimesaat MM (2011b): What you eat is what you get: Novel *Campylobacter* models in the quadrangle relationship between nutrition, obesity, microbiota and susceptibility to infection. *Eur J Microbiol Immunol* 1, 237-248
- Bird A (2007): Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398
- Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ (1988): Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* 157, 472–479
- Blow MJ, Clark TA, Daum CG, Deutschbauer AM, Fomenkov A, Fries R, Froula J, Kang DD, Malmstrom RR, Morgan RD (2016): The epigenomic landscape of prokaryotes. *PLoS Genet* 12(2)
- Boye E (1991): The hemimethylated replication origin of *Escherichia coli* can be initiated in vitro. *J Bacteriol* 173, 4537-4539
- Braun RE, O’Day K, Wright A (1985): Autoregulation of the DNA replication gene *dnaA* in *E. coli* K-12. *Cell* 40(1), 159–169

- Braun J, Kingsley G, Van der Heijde D, Sieper J (2000): On the difficulties of establishing a consensus on the definition of and diagnostic investigations for reactive arthritis. Results and discussion of a questionnaire prepared for the 4th International Workshop on Reactive Arthritis, Berlin, Germany, July 3-6, 1999. *J Rheumatol* 27(9), 2185-2192
- Browman DT, Hoegg MB, Robbins SM (2007): The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol* 17, 394-402
- Butzler JP (2004): Campylobacter, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 10, 868-876
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P (2016): Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 387, 1531-1539
- Chen Y, Mukherjee S, Hoffmann M, Kotewicz ML, Young S, Abbott J, Luo Y, Davidson MK, Allard M, McDermott P (2013): Whole-genome sequencing of gentamicin-resistant *Campylobacter coli* isolated from U.S. retail meats reveals novel plasmid-mediated aminoglycoside resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 5398-5405
- Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Knazawa I (1993): Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 43, 1911-1917
- Criscuolo A, De La Blanchardière A, Coeuret S, Passet V, Saguët-Rysanek V, Vergnaud M, Verdon R, Leclercq A, Lecuit M, Brisse S (2014): Draft Genome Sequence of *Campylobacter coli* Strain IPSID-1 Isolated from a Patient with Immunoproliferative Small Intestinal Disease. *Genome Announc* 2, 0079-14
- CRISPR-finder: <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/>; letzter Zugriff am 24.01.2017
- Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Groß U (2010): *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* 300, 205-211
- Day CJ, Hartley-Tassell LE, Shewell LK, King RM, Tram G, Day SK, Semchenko EA, Korolik V (2012): Variation of chemosensory receptor content of *Campylobacter jejuni* strains and modulation of receptor gene expression under different in vivo and in vitro growth conditions. *BMC Microbiol* 12, 128
- De Wood D, Pooley C (2008): *Campylobacter jejuni*, EMU. USDA, ARS [Public domain], via Wikimedia Commons: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/df/ARS\\_Campylobacter\\_jejuni.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/df/ARS_Campylobacter_jejuni.jpg)
- Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJL, Urwin R, Maiden MCJ (2001): Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 39, 14-23
- Dingman DW (1990): Presence of N6-methyladenine in GATC sequences of *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus* KLN2. *J Bacteriol* 172, 6156-6159
- Dreiseikelmann B, Wackernagel W (1981): Absence in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* of the sequence-specific deoxyribonucleic acid methylation that is conferred in *Escherichia coli* K-12 by the dam and dcm enzymes. *J Bacteriol* 147, 259-261
- Dryden DTF, Murray NE, Rao DN (2001): Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 29, 3728-3741
- Edmonds P, Hall BM, Edwards WR, Hartline KM (1992): Presence of methylated adenine in GATC sequences in chromosomal DNAs from *Campylobacter* species. *J Bacteriol* 174, 8156-8157
- Enikeeva FN, Severinov KV, Gelfand MS (2010): Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: who wins? *J Theor Biol* 266, 550-559

- Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, Brinkac LM, DeBoy RT, Parker CT, Daugherty SC (2005): Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple campylobacter species. *PLoS Biol* 3, 72-85
- Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV (2000): Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter*. 2. Auflage; ASM International, Washington, 121-138
- Garcia Rodríguez L, Ruigómez A, Panés J (2006): Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 130, 1588–1594
- Geier GE, Modrich P (1979): Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J Biol Chem* 254, 1408–1413
- Godschalk PCR, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC (2004): The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome. *J Clin Invest* 114, 1659-1665
- Gómez-Eichelmann MC (1979): Deoxyribonucleic acid adenine and cytosine methylation in *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *J Bacteriol* 140, 574-579
- Gomez-Eichelmann MC, Levy-Mustri A, Ramirez-Santos J (1991): Presence of 5-methylcytosine in CC(A/T)GG sequences (Dcm methylation) in DNAs from different bacteria. *J Bacteriol* 173, 7692-7694
- Gradel KO, Nielsen HL, Schönheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H (2009): Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* 137, 495–501
- Grant CC, Konkel ME, Cieplak W Jr, Tompkins LS (1993): Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun* 61, 1764-1771
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007): CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* 35, W52
- Gunn JS (2000): Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect* 2, 907–913
- Hallet B, Sherratt DJ (1997): Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol Rev* 21, 157–178
- Hazeleger WC, Wouters JA, Rombouts FM, Abee T (1998): Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl Environ Microbiol* 64, 3917-3922
- Heimesaat MM, Lugert R, Fischer A, Alutis M, Kühl AA, Zautner AE, Tareen AM, Göbel UB, Bereswill S (2014): Impact of *Campylobacter jejuni* cj0268c knockout mutation on intestinal colonization, translocation, and induction of immunopathology in gnotobiotic IL-10 deficient mice. *PLoS ONE* 9
- Helms M, Simonsen J, Mølbak K (2006): Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clin Infect Dis* 42, 498–506
- Hofreuter D, Novik V, Galán JE (2008): Metabolic diversity in *campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe* 4, 425–433
- Hoskisson P, Smith M (2007): Hypervariation and phase variation in the bacteriophage “resistome”. *Curr Opin Microbiol* 10, 396–400
- Howard SL, Jagannathan A, Soo EC, Hui JPM, Aubry AJ, Ahmed I, Karlyshev A, Kelly JF, Jones MA, Stevens MP (2009): *Campylobacter jejuni* glycosylation island important in cell charge, legionaminic acid biosynthesis, and colonization of chickens. *Infect Immun* 77, 2544–2556
- Hughes CA, Johnson RC (1990): Methylated DNA in *Borrelia* species. *J Bacteriol* 172, 6602-6604

- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M (2007): Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int J Food Microbiol* 117, 237–257
- Ibáñez M, Alvarez I, Rodríguez-Peña J, Rotger R (1997): A ColE1-type plasmid from *Salmonella enteritidis* encodes a DNA cytosine methyltransferase. *Gene* 196, 145–158
- Ichige A, Kobayashi I (2005): Stability of EcoRI restriction-modification enzymes in vivo differentiates the EcoRI restriction-modification system from other postsegregational cell killing systems. *J Bacteriol* 187, 6612–6621
- Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, Van Pelt W, Wagenaar JA, Owen RJ (2008): Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev* 21, 505–518
- Jess T, Simonsen J, Nielsen NM, Jørgensen KT, Bager P, Ethelberg S, Frisch M (2011): Enteric *Salmonella* or *Campylobacter* infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Gut* 60, 318–324
- Johnson RC (2002): Bacterial Site-Specific DNA Inversion Systems. In: Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz A (Hrsg.): *Mobile DNA II*. ASM Press, Washington, 230–271
- Jolley KA, Chan MS, Maiden MC (2004): mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5, 86
- Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM (2015): Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev* 28, 687–720
- Kalischuk LD, Buret AG (2010): A role for *Campylobacter jejuni*-induced enteritis in inflammatory bowel disease? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, G1–G9
- Karlyshev AV, Wren BW (2001): Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *Campylobacter jejuni* strains using alcian blue dye. *J Clin Microbiol* 39, 279–284
- Kim JO, Weiser JN (1998): Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 177, 368–377
- Komano T (1999): Shufflons: multiple inversion systems and integrons. *Annu Rev Genet* 33, 171–191
- Kong H, Lin LF, Porter N, Stickel S, Byrd D, Posfai J, Roberts RJ (2000): Functional analysis of putative restriction–modification system genes in the *Helicobacter pylori* J99 genome. *Nucleic Acids Res* 28, 3216–3223
- Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson J, Cieplak J (1997): Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 24, 953–963
- Konkel ME, Monteville MR, Rivera-Amill V, Joens LA (2001): The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Curr Issues Intest Microbiol* 2, 55–71
- Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J (2004): Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* 186, 3296–3303
- Krause-Gruszczynska M, Van Alphen LB, Oyarzabal OA, Alter T, Hänel I, Schliephake A, König W, Van Putten JPM, Konkel ME, Backert S (2007): Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* 274, 9–16
- Krebs J, Morgan RD, Bunk B, Spröer C, Luong K, Parusel R, Anton BP, König C, Josenhans C, Overmann J (2014): The complex methylome of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* 42, 2415–2432
- Kumar R, Rao DN (2013): Role of DNA methyltransferases in epigenetic regulation in bacteria. *Subcell Biochem* 61, 81–102

- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008): MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9, 299-306
- Kuroki S, Saida T, Nukina M, Haruta T, Yoshioka M, Kobayashi Y, Nakanishi H (1993): *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barré syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain beta-N-acetylglucosamine residues. *Ann Neurol* 33, 243-247
- Lara-Tejero M, Galán JE (2000): A bacterial toxin that cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science* 290, 354-357
- Leirisalo-Repo M (2005): Reactive arthritis. *Scand J Rheumatol* 34, 251-259
- Levinson G, Gutman GA (1987): Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4, 203-221
- Lin J, Michel LO, Zhang Q (2002) CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2124-2131
- Lin J, Cagliero C, Guo B, Barton YW, Maurel MC, Payot S, Zhang Q (2005): Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 187, 7417-7424
- Lin LF, Posfai J, Roberts RJ, Kong H (2001): Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2740-2745
- Litrup E, Torpdahl M, Nielsen EM (2007): Multilocus sequence typing performed on *Campylobacter coli* isolates from humans, broilers, pigs and cattle originating in Denmark. *J Appl Microbiol* 103, 210-218
- Logan SM, Schoenhofen IC, Guerry P (2008): O-linked flagellar glycosylation in *Campylobacter*. In: Nachamkin I, Szymanski C, Blaser M (Hrsg.): *Campylobacter*. 3. Auflage; ASM Press, Washington 2008, 471-481
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012): Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220-230
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA (1998): Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* 95, 3140-3145
- Malik-Kale P, Parker CT, Konkel ME (2008): Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. *J Bacteriol* 190, 2286-2297
- Man SM, Kaakoush NO, Mitchell HM (2011): The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 152-168
- Marchant J, Wren B, Ketley J (2002): Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. *Trends Microbiol* 10, 155-159
- Marinus MG, Morris NR (1973): Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 114, 1143-1150
- Marinus MG, Casadesus J (2009): Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS Microbiol Rev* 33, 488-503
- Masanta WO, Heimesaat MM, Bereswill S, Tareen AM, Lugert R, Groß U, Zautner AE (2013): Modification of intestinal microbiota and its consequences for innate immune response in the pathogenesis of campylobacteriosis. *Clin Dev Immunol* 2013, 526860
- May MS, Hattma, S (1975): Analysis of bacteriophage deoxyribonucleic acid sequences methylated by host- and R-factor-controlled enzymes. *J Bacteriol* 123, 768-770

- McNally DJ, Aubry AJ, Hui JPM, Khieu NH, Whitfield D, Ewing CP, Guerry P, Brisson JR, Logan SM (2007): Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives as novel flagellar glycans. *J Biol Chem* 282, 14463–14475
- Meisel A, Bickle TA, Krüger DH, Schroeder C (1992): Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage. *Nature* 355, 467–469
- Militello KT, Simon RD, Qureshi M, Maines R, Horne MLV, Hennick SM, Jayakar SK, Pounder S (2012) Conservation of Dcm-mediated cytosine DNA methylation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 328, 78-85
- Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME (2003): Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149, 153–165
- Morozova N, Sabantsev A, Bogdanova E, Fedorova Y, Maikova A, Vedyaykin A, Rodic A, Djordjevic M, Khodorkovskii M, Severinov K (2016): Temporal dynamics of methyltransferase and restriction endonuclease accumulation in individual cells after introducing a restriction-modification system. *Nucleic Acids Res* 44, 790-800
- Morrow IC, Parton RG (2005): Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* 6, 725–740
- Mund NLA, Masanta WO (2016): Association of *Campylobacter jejuni* ssp. *Jejuni* chemotaxis receptor genes with multilocus sequence types and source of isolation. *Eur J Microbiol Immunol* 19(3), 162-177
- Murphy C, Carroll C, Jordan KN (2003): Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* 95, 704–708
- Murray IA, Clark TA, Morgan RD, Boitano M, Anton BP, Luong K, Fomenkov A, Turner SW, Korlach J, Roberts RJ (2012): The methylomes of six bacteria. *Nucleic Acids Res* 40, 11450-11462
- Murray NE (2000): Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 412-434
- Myers JD, Kelly DJ (2005): A sulphite respiration system in the chemoheterotrophic human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 151, 233–242
- Novik V, Hofreuter D, Galán JE (2010): Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its interaction with epithelial cells. *Infect Immun* 78, 3540-3553
- O’Loughlin JL, Eucker TP, Chavez JD, Samuelson DR, Neal-McKinney J, Gourley CR, Bruce JE, Konkel ME (2015): Analysis of the *Campylobacter jejuni* genome by SMRT DNA sequencing identifies restriction-modification motifs. *PLoS ONE* 10
- Pacheco-Tena C, Zhang X, Stone M, Burgos-Vargas R, Inman R (2002): Innate immunity in host-microbial interactions: beyond B27 in the spondyloarthropathies. *Curr Opin Microbiol* 14, 373–382
- Palmer BR, Marinus MG (1994): The dam and dcm strains of *Escherichia coli*- a review. *Gene* 143, 1–12
- Park SF, Purdy D, Leach S (2000): Localized reversible frameshift mutation in the flhA gene confers phase variability to flagellin gene expression in *Campylobacter coli*. *J Bacteriol* 182, 207-210
- Parker CT, Horn ST, Gilbert M, Miller WG, Woodward DL, Mandrell RE (2005): Comparison of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources. *J Clin Microbiol* 43, 2771-2781
- Parker CT, Gilbert M, Yuki N, Endtz HP, Mandrell RE (2008): Characterization of lipooligosaccharide-biosynthetic loci of *Campylobacter jejuni* reveals new lipooligosaccharide classes: evidence of mosaic organizations. *J Bacteriol* 190, 5681-5689

- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S (2000): The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665–668
- Pearson BM, Gaskin DJH, Segers RP, Wells JM, Nuijten PJ, Van Vliet AH (2007): The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *J Bacteriol* 189, 8402-8403
- Pearson BM, Rokney A, Crossman LC, Miller WG, Wain J, Van Vliet AH (2013): Complete Genome Sequence of the *Campylobacter coli* Clinical Isolate 15-537360. *Genome Announc* 1(6), e01056-13
- PHYLOViZ Online: <https://online.phyloviz.net/index>; letzter Zugriff am 24.01.2017
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, Van den Brandt PA, Stobberingh EE (2006): Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511–521
- Pickett CL, Whitehouse CA (1999): The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol* 7, 292-297
- Pingoud A, Jeltsch A (2001): Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 29, 3705-3727
- Pingoud A, Wilson GG, Wende W (2014): Type II restriction endonucleases - a historical perspective and more. *Nucleic Acids Res* 42, 7489-7527
- Pope JE, Krizova A, Garg AX, Thiessen-Philbrook H, Ouimet JM (2007): *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 37, 48-55
- PubMLST.org: MLST databases and software: <http://pubmlst.org/>; letzter Zugriff am 24.01.2017
- PubMLST: Public Databases Mol. Typing Microb. Genome Divers, Primer für die MLST-Typisierung: <http://pubmlst.org/campylobacter/info/primers.shtml>; letzter Zugriff am 24.01.17
- RAST Server: RAST Annotation Server: <http://rast.nmpdr.org/>; letzter Zugriff am 24.01.2017
- Razin A, Riggs AD (1980): DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604–610
- REBASE, Official REBASE Homepage: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>; letzter Zugriff am 24.01.2017
- Ribeiro-Gonçalves B, Francisco AP, Vaz C, Ramirez M, Carriço JA (2016): PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. *Nucleic Acids Res* 44, W246
- Richards VP, Lefébure T, Bitar PD, Stanhope MJ (2013): Comparative characterization of the virulence gene clusters (lipooligosaccharide [LOS] and capsular polysaccharide [CPS]) for *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and related *Campylobacter* species. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 14, 200-213
- Rivera-Amill V, Kim BJ, Seshu J, Konkel ME (2001): Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J Infect Dis* 183, 1607–1616
- Rivera-Milla E, Stuermer CA, Málaga-Trillo E (2006): Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cell Mol Life Sci* 63, 343–357
- RKI 2006: Empfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut zur Pertussis-Schutzimpfung. Stand: Januar 2006. *Epidemiologisches Bulletin* 3, 22-28
- RKI: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Datenstand: 1. März 2015. Robert Koch-Institut, Berlin 2015

- Roberts RJ (1985): Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res* 13, 165-200
- Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D (2015): REBASE - a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 43, D298-D299
- Rossi M, Bolz C, Revez J, Javed S, El-Najjar N, Anderl F, Hyytiäinen H, Vuorela P, Gerhard M, Hänninen ML (2012): Evidence for conserved function of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in *Helicobacter* genus. *PLoS ONE* 7
- Schielke A, Rosner BM, Stark K (2014): Epidemiology of campylobacteriosis in Germany – insights from 10 years of surveillance. *BMC Infect Dis* 14, 30
- Schlagman S, Hattman S, May MS, Berger L (1976) In vivo methylation by *Escherichia coli* K-12 *mec+* deoxyribonucleic acid-cytosine methylase protects against in vitro cleavage by the RII restriction endonuclease (R. Eco RII). *J Bacteriol* 126, 990-996
- Schmidt-Ott R, Schmidt H, Feldmann S, Brass F, Krone B, Gross U (2006): Improved serological diagnosis stresses the major role of *Campylobacter jejuni* in triggering Guillain-Barré syndrome. *Clin Vaccine Immunol* 13, 779-783
- Schwerer B (2002): Antibodies against gangliosides: a link between preceding infection and immunopathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Microbes Infect* 4, 373-384
- Sheppard SK, McCarthy ND, Falush D, Maiden MC (2008): Convergence of *Campylobacter* species: implications for bacterial evolution. *Science* 320, 237-239
- Sheppard SK, Dallas JF, Wilson DJ, Strachan NJC, McCarthy ND, Jolley KA, Colles FM, Rotariu O, Ogden ID, Forbes KJ (2010): Evolution of an agriculture-associated disease causing *Campylobacter coli* clade: evidence from national surveillance data in Scotland. *PLoS ONE* 5
- Sheppard SK, Didelot X, Jolley KA, Darling AE, Pascoe B, Méric G, Kelly DJ, Cody A, Colles FM, Strachan NJ (2013): Progressive genome-wide introgression in agricultural *Campylobacter coli*. *Mol Ecol* 22, 1051-1064
- Skarp-de Haan C, Culebro A, Schott T, Revez J, Schweda EK, Hänninen ML, Rossi M (2014): Comparative genomics of unintegrated *Campylobacter coli* clades 2 and 3. *BMC Genomics* 15, 129
- SMRT Sequencing - Pacific Biosciences: <http://www.pacb.com/smrt-science/smrt-sequencing/>; letzter Zugriff am 21.12.16
- Sopwith W, Birtles A, Matthews M, Fox A, Gee S, James S, Kempster J, Painter M, Edwards-Jones V (2010): Investigation of food and environmental exposures relating to the epidemiology of *Campylobacter coli* in humans in northwest England. *Appl Environ Microbiol* 76, 129-135
- Srikhanta YN, Maguire TL, Stacey KJ, Grimmond SM, Jennings MP (2005): The phasevarion: a genetic system controlling coordinated, random switching of expression of multiple genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5547-5551
- Srikhanta YN, Fox KL, Jennings MP (2010): The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes. *Nat Rev Microbiol* 8, 196-206
- Stecher B, Hardt WD (2008): The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 16, 107-114
- Sutherland E, Coe L, Raleigh EA (1992): McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *J Mol Biol* 225, 327-348
- Tareen AM, Dasti JI, Zautner AE, Groß U, Lugert R (2010): *Campylobacter jejuni* proteins Cj0952c and Cj0951c affect chemotactic behaviour towards formic acid and are important for invasion of host cells. *Microbiology* 156, 3123-3135



- Tareen AM, Dasti JI, Zautner AE, Gross U, Lugert R (2011): Sulphite : cytochrome c oxidoreductase deficiency in *Campylobacter jejuni* reduces motility, host cell adherence and invasion. *Microbiology* 157, 1776–1785
- Tareen AM, Lüder CGK, Zautner AE, Groß U, Heimesaat MM, Bereswill S, Lugert R (2013): The *Campylobacter jejuni* Cj0268c protein is required for adhesion and invasion in vitro. *PLoS ONE* 8
- Tatusova T, Ciufo S, Fedorov B, O’Neill K, Tolstoy I (2014): RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic Acids Res* 42, D553-D559
- Thies FL, Hartung HP, Giegerich G (1998): Cloning and expression of the *Campylobacter jejuni* lon gene detected by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Microbiol Lett* 165, 329-334
- Thies FL, Karch H, Hartung HP, Giegerich G (1999) Cloning and expression of the dnaK gene of *Campylobacter jejuni* and antigenicity of heat shock protein 70. *Infect Immun* 67, 1194-1200
- Tock MR, Dryden DT (2005): The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol* 8, 466-472
- Townes JM (2010): Reactive arthritis after enteric infections in the United States: the problem of definition. *Clin Infect Dis* 50, 247–254
- Trauzeddel R, Girschick H (2013): AWMF, S1 Leitlinie: Reaktive Arthritis. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/027-057.html>; letzter Zugriff am 24.09.2016
- UPGMA-Dendrogramme: <http://www.megasoftware.net/mega6>; letzter Zugriff am 24.01.2017
- Urwin R, Maiden MC (2003): Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 11, 479–487
- Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L, Verbrugh H (1998): Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 275-293
- Van Belkum W, Van Leeuwen W, Scherer S, Verbrugh H (1999): Occurrence and structure-function relationship of pentameric short sequence repeats in microbial genomes. *Res Microbiol* 150, 617–626
- Van der Woude MW (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17, 581-611
- Van der Woude MW (2006): Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett* 254, 190–197
- Van der Woude MW (2011): Phase variation: how to create and coordinate population diversity. *Curr Opin Microbiol* 14, 205–211
- Vandamme P, De Ley J (1991): Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *Int J Syst Bacteriol* 41, 451–455
- Vandamme P, Van Doorn L, Al Rashid S, Quint W, Van der Plas J, Chan V, On S (1997): *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1055-1060
- Vovis GF, Horiuchi K, Zinder ND (1974): Kinetics of methylation of DNA by a restriction endonuclease from *Escherichia coli* B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3810-3813
- Waite RD, Penfold DW, Struthers JK, Dowson CG (2003): Spontaneous sequence duplications within capsule genes cap8E and tts control phase variation in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. *Microbiology* 149, 497–504
- Wassenaar TM (1997): Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* 10, 466-476
- Wassenaar TM, Blaser MJ (1999): Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect* 1, 1023–1033

- Wright S, Wilson S, Miller WG, Mandrell RE, Siletzky RM, Kathariou S (2010): Differences in methylation at GATC sites in genomic DNA of *Campylobacter coli* from turkeys and swine. *Appl Environ Microbiol* 76, 7314-7317
- Xu Q, Morgan RD, Roberts RJ, Blaser MJ (2000): Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9671-9676
- Yamaki H, Ohtsubo E, Nagai K, Maeda Y (1988): The *oriC* unwinding by dam methylation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 16, 5067-5073
- Yao R, Burr DH, Doig P, Trust TJ, Niu H, Guerry P (1994): Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 14, 883-893
- Yu DT (1999): Pathogenesis of Reactive Arthritis. *Intern Med* 38, 97-101
- Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T (2004): Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11404-11409
- Yun HC, Kreft RE, Castillo MA, Ehrlich GD, Guymon CH, Crouch HK, Chung KK, Wenke JC, Hsu JR, Spirk TL (2012): Comparison of PCR/electron spray ionization-time-of-flight-mass spectrometry versus traditional clinical microbiology for active surveillance of organisms contaminating high-use surfaces in a burn intensive care unit, an orthopedic ward and healthcare workers. *BMC Infect Dis* 12
- Zautner AE, Hermann S, Groß U (2010): *Campylobacter jejuni*—Die Suche nach Virulenz-assoziierten Faktoren. *Arch Lebensmittelhyg* 61, 91-101
- Zautner AE, Herrmann S, Corso J, Tareen AM, Alter T, Groß U (2011): Epidemiological association of different *Campylobacter jejuni* groups with metabolism-associated genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 77, 2359-2365
- Zautner AE, Ohk C, Tareen AM, Lugert R, Groß U (2012): Epidemiological association of *Campylobacter jejuni* groups with pathogenicity-associated genetic markers. *BMC Microbiol* 12, 171
- Zautner AE, Frickmann H: Epigenetic modifications in gram-negative bacteria and the induction of pathoepigenetic modifications in host tissue. In: Wan J (Hrsg.): *Introduction to genetics: DNA methylation, histone modification and gene regulation*. iConcept Press, o. O. 2013, 49-72
- Zautner AE, Johann C, Strubel A, Busse C, Tareen AM, Masanta WO, Lugert R, Schmidt-Ott R, Groß U (2014): Seroprevalence of campylobacteriosis and relevant post-infectious sequelae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 1019-1027
- Zautner AE, Goldschmidt AM, Thürmer A, Schuldes J, Bader O, Lugert R, Groß U, Stingl K, Salinas G, Lingner T (2015): SMRT sequencing of the *Campylobacter coli* BfR-CA-9557 genome sequence reveals unique methylation motifs. *BMC Genomics* 16, 1088
- Zautner AE, MasantaWO: *Campylobacter: Health Effects and Toxicity*. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (Hrsg.): *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, o. O. 2016, 596-601
- Zhang W, Brooun A, McCandless J, Banda P, Alam M (1996): Signal transduction in the archaeon *Halobacterium salinarum* is processed through three subfamilies of 13 soluble and membrane-bound transducer proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4649-4654

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungen

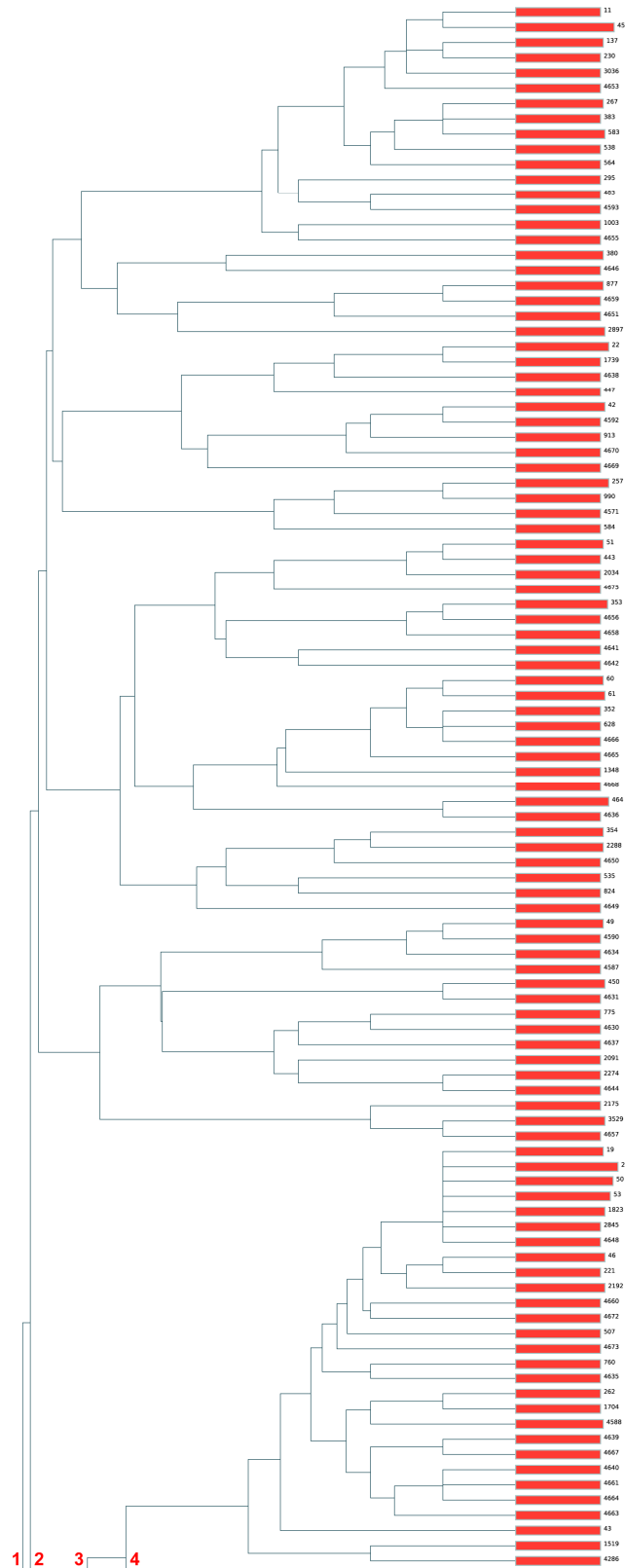


Abbildung 15: UPGMA-Dendrogramm: DAM-Methylierung, Teil 1

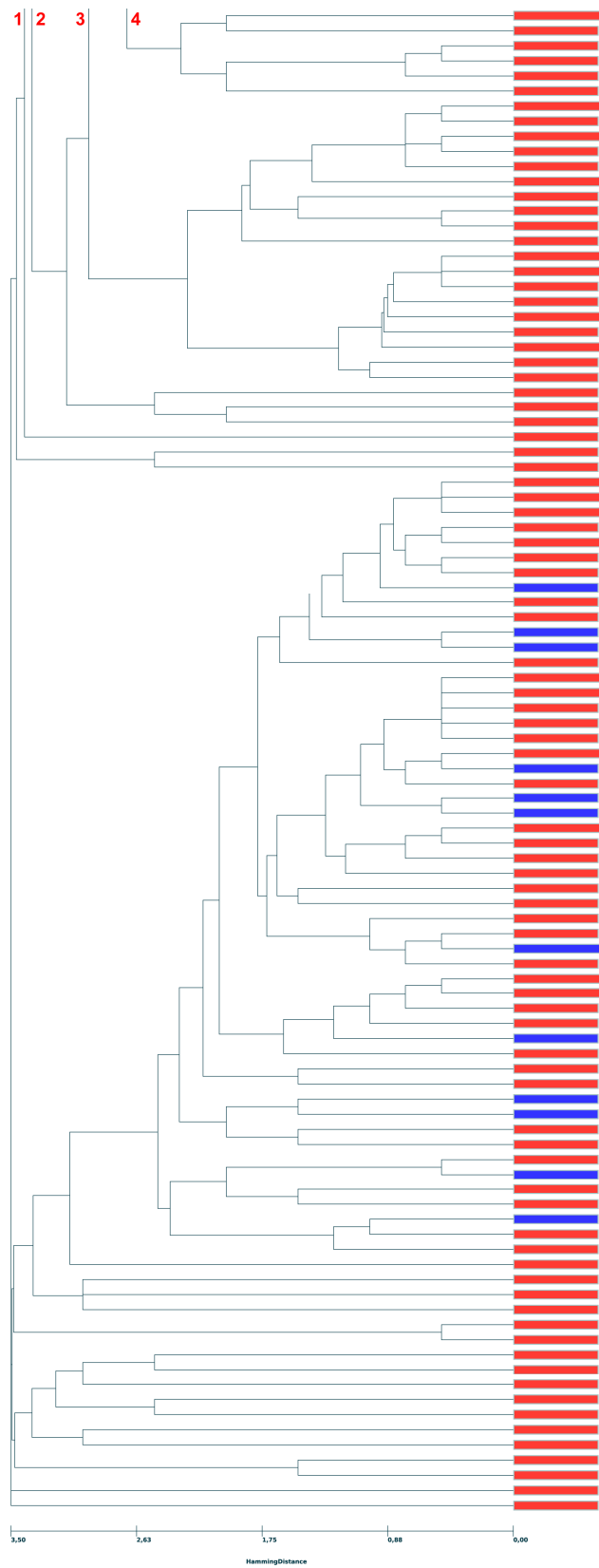


Abbildung 16: UPGMA-Dendrogramm: DAM-Methylierung, Teil 2

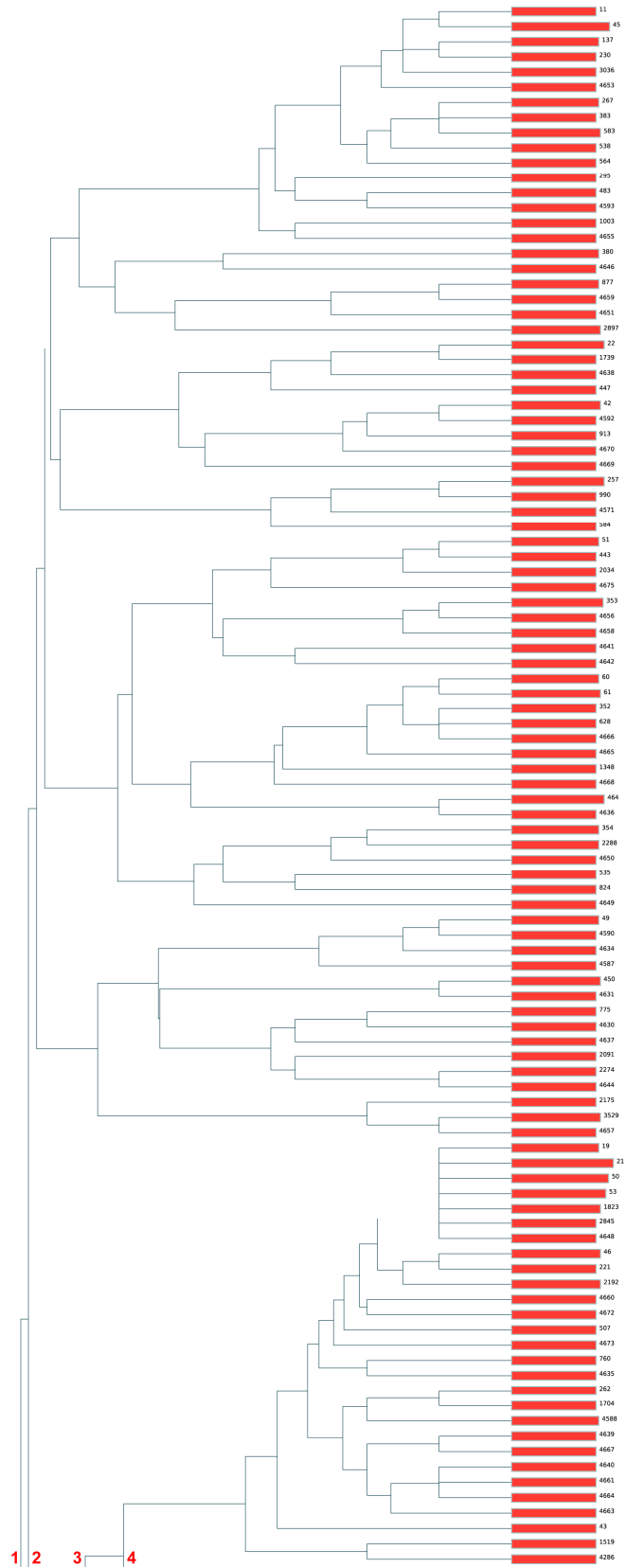


Abbildung 17: UPGMA-Dendrogramm: DCM-Methylierung, Teil 1

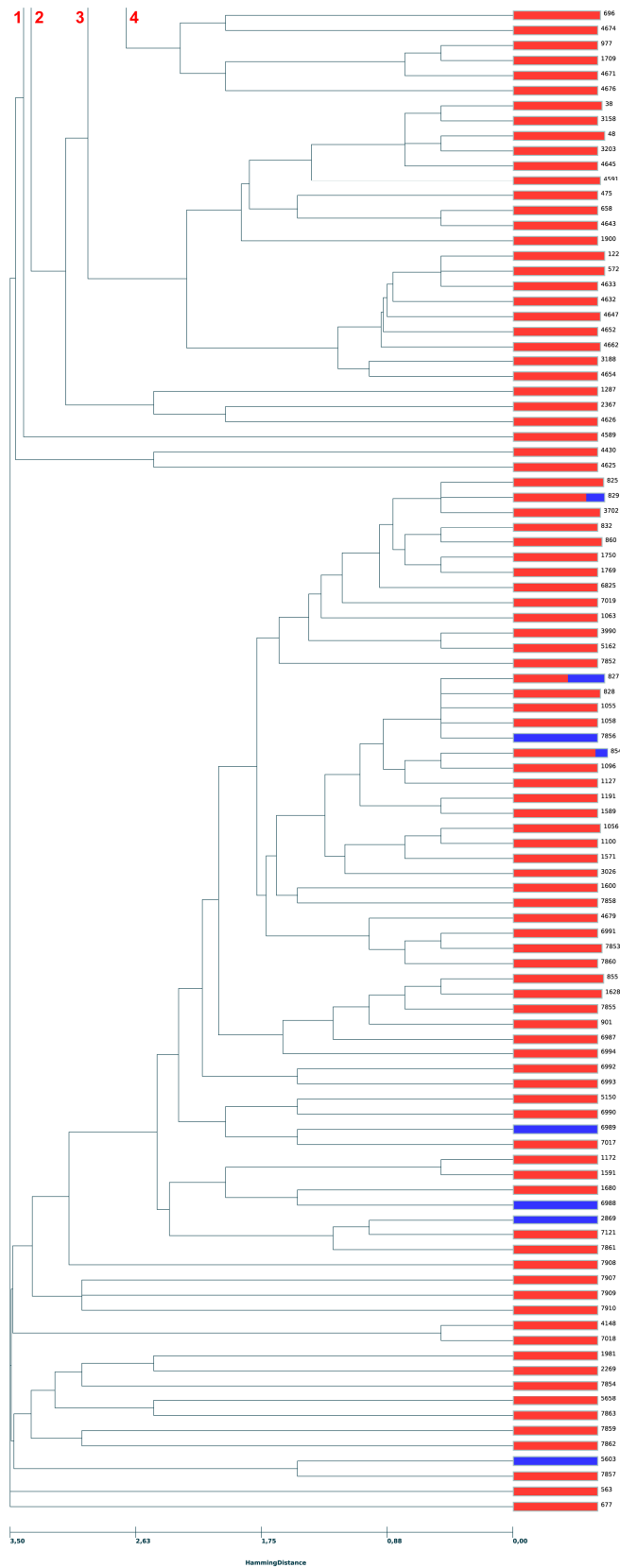


Abbildung 18: UPGMA-Dendrogramm: DCM-Methylierung, Teil 2

## 8.2 Verwendete Isolate

**Tabelle 24: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika der verwendeten C. coli-Stämme**

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkf	unc	Klade
1	BFR-CA-6144	Fleisch, Wild Fasan	828	829	33	39	30	82	113	43	17	1A
2	BFR-CA-7268	Muscheltiere	828	855	33	39	30	79	104	35	17	1A
3	BFR-CA- 8266	Wildschwein	828	1096	33	38	30	82	104	35	17	1A
4	BFR-CA- 8393	Puteneier	None	7018	114	195	103	115	459	164	79	1C
5	BFR-CA- 8905	Leber, Schwein	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
6	BFR-CA- 8971	Fischotter	828	829	33	39	30	82	113	43	17	1A
7	BFR-CA- 8980	Hirsch	828	855	33	39	30	79	104	35	17	1A
8	BFR-CA- 9124	Pute, Blinddarm	828	1055	33	39	30	82	104	47	17	1A
9	BFR-CA- 9211	Hühnereier, Schale	None	4148	114	195	103	140	459	164	79	1C
10	BFR-CA- 9317	Affe, Kot	828	827	33	39	30	82	104	56	17	1A
11	BFR-CA- 9614	Milch	828	827	33	39	30	82	104	56	17	1A
12	BFR-CA- 9625	Niere, Schwein	828	1056	32	39	30	82	104	43	36	1A
13	BFR-CA- 9707	Herz, Hähnchen	828	6825	33	39	30	116	113	47	17	1A
14	BFR-CA- 9965	Leber, Huhn	828	860	33	39	30	79	113	47	17	1A
15	BFR-CA- 10206	Fleisch, Schwein	828	2869	33	38	44	82	104	44	17	1A
16	BFR-CA- 10225	Fleisch, Gans	828	1769	33	176	30	115	113	43	17	1A
17	BFR-CA- 10258	Fleisch, Ente	828	5162	33	66	30	79	113	43	17	1A

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkt	unc	Klade
18	BFR-CA- 10460	Rind	None	1591	33	39	44	82	118	35	36	1A
19	BFR-CA- 10470	Leber, Pute	828	860	33	39	30	79	113	47	17	1A
20	BFR-CA- 10623	Ziege	828	825	33	39	30	82	113	47	17	1A
21	BFR-CA- 10659	Schaf	828	1750	33	39	30	115	113	43	17	1A
22	BFR-CA- 10673	Zuchttaube	828	825	33	39	30	82	113	47	17	1A
23	BFR-CA- 10733	Pute, Haut	828	3990	33	66	30	79	104	43	17	1A
24	BFR-CA- 10855	Kalb, Kot	828	825	33	39	30	82	113	47	17	1A
25	Ty4222	Mensch, Kot	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
26	Ty3717	Mensch, Kot	828	6987	33	38	30	79	104	35	36	1A
27	Ty5430	Mensch, Kot	None	6988	33	39	30	81	118	44	36	1A
28	Ty3946	Mensch, Kot	828	825	33	39	30	82	113	47	17	1A
29	Ty5293	Mensch, Kot	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
30	Ty4279	Mensch, Kot	828	901	33	39	30	79	104	43	41	1A
31	Ty2856	Mensch, Kot	828	6989	53	153	30	78	113	47	17	1A
32	Ty3935	Mensch, Kot	828	1100	33	39	30	82	104	44	36	1A
33	Ty09380 (Thalheim)	Mensch, Kot	None	7017	53	66	30	82	104	47	17	1A
34	Ty4536	Mensch, Kot	828	1056	33	39	30	82	104	43	36	1A
35	Ty32545 (Tunkel)	Mensch, Kot	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
36	Ty4543	Mensch, Kot	828	828	33	39	30	82	104	43	17	1A
37	Ty2048	Mensch, Kot	828	827	33	39	30	82	104	56	17	1A



Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkt	unc	Klade
38	Ty2384	Mensch, Kot	828	1127	33	153	30	82	104	43	17	1A
39	Ty4191	Mensch, Kot	None	1172	53	39	44	82	118	35	36	1A
40	Ty5587	Mensch, Kot	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
41	Ty5165	Mensch, Kot	828	1628	33	39	30	79	104	206	17	1A
42	Ty4207	Mensch, Kot	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
43	BFR-CA- 6266	Wachtel	828	829	33	39	30	82	113	43	17	1A
44	BFR-CA- 6377	Huhn, Fleisch	828	1600	33	39	65	140	104	43	17	1A
45	BFR-CA- 6656	Wildschwein, Fleisch	None	1680	53	38	30	81	118	225	36	1A
46	BFR-CA- 7041	Huhn, Fleisch	828	829	33	39	30	82	113	43	17	1A
47	BFR-CA- 7417	Schwan	828	855	33	39	30	79	104	35	17	1A
48	BFR-CA- 8230	Legehennen	828	3026	33	39	30	82	104	283	41	1A
49	BFR-CA- 8320	Ferkel, Kot	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
50	BFR-CA- 8905	Leber, Schwein	828	854	33	38	30	82	104	43	17	1A
51	BFR-CA- 9009	Ziege		829	33	39	30	82	113	43	17	1A
52	BFR-CA- 9226	Ente, Fleisch	828	855	33	39	30	79	104	35	17	1A
53	BFR-CA- 9271	Huhn, Leber	828	1628	33	39	30	79	104	206	17	1A
54	BFR-CA- 9310	Gans, Magen	828	1628	33	39	30	79	104	206	17	1A
55	BFR-CA- 9316	Löffelente, Darm	828	827	33	39	30	82	104	56	17	1A
56	BFR-CA- 9540	Broiler, Haut	None	828	33	39	30	82	104	43	17	1A
57	BFR-CA- 9557	Broiler, Herz	828	1589	33	39	30	82	189	43	17	1A

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc	Klade
58	BFR-CA- 9623	Lamm, Fleisch	828	6990	32	66	66	82	113	43	17	1(B)
59	BFR-CA- 9625	Schwein, Niere		1571	32	39	30	82	104	43	36	1A
60	BFR-CA- 9733	Huhn, Fleisch	828	832	33	39	30	79	113	43	17	1A
61	BFR-CA- 9743	Affe	None	5150	292	66	30	82	113	206	17	1B
62	BFR-CA- 9870	Brolier, Haut	828	7019	33	39	411	79	113	43	17	1A
63	BFR-CA- 10044	Ente, Fleisch	828	860	33	39	30	79	113	47	17	1A
64	BFR-CA- 10137	Schaffötus, Magen	828(?)	6991	33	38	30	82	104	85	36	1A
65	BFR-CA- 10382	Rind, Fleisch	828	827	33	39	30	82	104	56	17	1A
66	BFR-CA- 10430	Kalb, Kot	828	4679	33	38	30	82	113	43	36	1A
67	BFR-CA- 10783	Pute, Blinddarm	828	1058	33	39	30	82	104	35	17	1A
68	BFR-CA- 10865	Pute, Haut	828	1191	33	39	30	82	189	47	17	1A
69	meC0281	Pute	None	6992	118	39	30	79	429	3	12	3
70	meC0467	Pute	None	6993	33	39	30	82	113	3	12	3
71	meC0280	Pute	None	6994	33	39	30	79	503	25	294	3
72	CCS-48462	Huhn, Fleisch	828	7852	86	39	30	82	113	332	17	1B
73	CCS-48466	Huhn, Fleisch	None	7853	33	38	30	82	104	332	36	1A
74	CCS-48468	Huhn, Fleisch	None	7853	33	38	30	82	104	332	36	1A
75	CCS-17341/20	Oberflächengewässer	None	7907	121	492	451	659	317	208	485	3
76	CCS-1377	Oberflächengewässer	None	7908	334	552	30	241	598	600	471	3
77	CCS-248 07/13820	Oberflächengewässer	None	7855	33	39	30	79	104	35	211	1A

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkt	unc	Klade
78	CCS-52236	Huhn, Fleisch	None	7856	33	39	30	82	104	65	17	1A
79	CCS-17343/21	Oberflächengewässer	None	5603	136	188	69	113	270	277	152	1B
80	CCS-290 08 556	Oberflächengewässer	None	7857	135	188	69	113	143	332	152	1B
81	CCS-17344/23	Oberflächengewässer	None	5658	130	240	87	276	335	126	194	2
82	CCS-554	Oberflächengewässer	None	2269	130	86	88	245	288	129	76	2
83	CCS-264 07/14004	Oberflächengewässer	828	7121	32	39	44	82	104	44	17	1A
84	CCS-551	Oberflächengewässer	None	7854	86	528	88	269	755	316	156	2
85	CCS-265 07/14005	Oberflächengewässer	None	7909	121	553	452	602	738	240	183	3
86	CCS-29782	Huhn, Fleisch	None	7858	33	38	66	115	104	43	17	1A
87	CCS -249 07/13784	Oberflächengewässer	None	7859	137	189	174	241	756	126	76	2
88	CCS -48467	Huhn, Fleisch	None	7853	33	38	30	82	104	332	36	1A
89	CCS -52230	Huhn, Fleisch	828	3702	33	39	30	82	113	65	17	1A
90	CCS -07/803	Oberflächengewässer	None	7862	398	189	86	269	701	599	153	2
91	CCS -33759	Huhn, Fleisch	828	3702	33	39	30	82	113	65	17	1A
92	CCS -47509	Huhn, Fleisch	None	7860	33	38	30	82	118	332	36	1A
93	CCS -24982/43	Oberflächengewässer	None	7863	130	440	370	276	757	129	156	2
94	CCS -17343/22	Oberflächengewässer	None	1981	136	86	88	124	266	238	95	2
95	CCS -289 08/401	Oberflächengewässer	None	7910	121	39	453	660	758	584	470	3

**Tabelle 25: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika der verwendeten *C. jejuni*-Stämme**

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkf	unc
1	A02	Mensch	21	4588	59	1	1	3	2	1	282
2	A03	Mensch	21	1519	8	1	5	3	2	1	1
3	A04	Mensch		4626	2	28	4	64	74	112	125
4	A05	Mensch	21	507	2	1	21	89	2	1	5
5	A06	Mensch	49	4587	2	1	5	10	11	11	6
6	A08	Mensch	677	677	10	81	50	99	120	76	52
7	A09	Mensch	354	354	8	10	2	2	11	12	6
8	A10	Mensch	206	122	6	4	5	2	2	1	5
9	A11	Mensch	443	2034	7	17	2	15	22	3	12
10	A13	Mensch	206	3188	271	4	5	2	2	1	236
11	A14	Mensch	none	380	7	2	6	10	78	37	1
12	A16	Mensch	257	257	9	2	4	62	4	5	6
13	A17	Mensch	206	221	2	21	5	2	2	1	5
14	A18	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
15	A19	Mensch	45	11	48	7	10	4	1	7	1
16	A20	Mensch	206	572	62	4	5	2	2	1	5
17	A21	Mensch	21	4588	59	1	1	3	2	1	282
18	A22	Mensch	52	4630	9	25	2	10	294	3	249
19	A23	Mensch	283	267	4	7	40	4	42	51	1

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkt	unc
20	A24	Mensch	21	19	2	1	5	3	2	1	5
21	A25	Mensch	52	4589	172	312	61	378	261	413	6
22	A26	Mensch	206	572	62	4	5	2	2	1	5
23	A27	Mensch	none	464	24	2	2	2	10	3	1
24	A28	Mensch	206	122	6	4	5	2	2	1	5
25	A29	Mensch	658	658	2	4	2	4	19	3	6
26	A30	Mensch	42	447	1	2	42	4	3	40	3
27	A31	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
28	A32	Mensch	45	538	4	7	10	4	42	25	1
29	A33	Mensch	49	4590	3	1	5	17	11	11	249
30	A34	Mensch	206	572	62	4	5	2	2	1	5
31	A35	Mensch	206	122	6	4	5	2	2	1	5
32	B02	Mensch	21	53	2	1	21	3	2	1	5
33	B03	Mensch	460	535	9	30	2	2	89	59	6
34	B04	Mensch	48	475	2	4	1	4	19	62	5
35	B05	Mensch	45	137	4	7	10	4	42	7	1
36	B06	Mensch	446	4631	9	55	5	10	11	48	8
37	B07	Mensch	206	4632	62	63	5	2	2	1	5
38	B08	Mensch	206	4633	59	4	5	2	2	1	5
39	B09	Mensch	21	4286	8	1	1	3	11	1	1

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkf	unc
40	B10	Mensch	48	48	2	4	1	2	7	1	5
41	B11	Mensch	257	257	9	2	4	62	4	5	6
42	B12	Mensch	49	4634	3	1	52	17	11	11	6
43	B13	Mensch	257	257	9	2	4	62	4	5	6
44	B14	Mensch	21	4635	2	1	1	3	2	123	5
45	B15	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
46	B16	Mensch	354	354	8	10	2	2	11	12	6
47	B17	Mensch	21	1823	2	1	177	3	2	1	5
48	B18	Mensch	206	122	6	4	5	2	2	1	5
49	B19	Mensch	none	4636	158	2	2	2	10	3	1
50	B20	Mensch	52	4637	9	25	5	121	23	3	6
51	B21	Mensch	22	4638	1	10	307	4	3	3	3
52	B22	Mensch	none	380	7	2	6	10	78	37	1
53	B23	Mensch	22	22	1	3	6	4	3	3	3
54	B24	Mensch	21	4639	2	1	1	3	516	1	5
55	B25	Mensch	21	53	2	1	21	3	2	1	5
56	C01	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
57	C02	Mensch	21	760	2	1	52	3	2	100	5
58	C03	Mensch	21	4640	2	1	79	3	20	1	5
59	C04	Mensch	607	4641	8	2	52	53	11	3	6

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc
60	C05	Mensch	353	4642	7	2	52	299	10	3	6
61	C06	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
62	C07	Mensch	658	4643	1	4	2	4	19	3	6
63	C08	Mensch	283	383	4	7	12	4	42	51	1
64	C09	Mensch	1287	1287	84	106	29	28	136	1	35
65	C10	Mensch	none	4644	9	17	52	10	350	3	3
66	C11	Mensch	21	2845	2	1	52	3	2	1	5
67	C12	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
68	C13	Mensch	45	583	4	7	10	4	42	51	1
69	C14	Mensch	48	4645	2	4	1	2	416	1	5
70	C15	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
71	C16	Mensch	460	4646	7	30	301	2	89	37	1
72	C17	Mensch	48	4647	62	4	52	2	2	1	5
73	C18	Mensch	21	53	2	1	21	3	2	1	5
74	C19	Mensch	21	4648	2	1	53	3	2	1	5
75	C20	Mensch	443	51	7	17	2	15	23	3	12
76	C21	Mensch	354	4649	57	17	2	56	11	12	6
77	C22	Mensch	257	584	8	2	5	62	4	5	1
78	C23	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
79	C24	Mensch	443	51	7	17	2	15	23	3	12

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkt	unc
80	C25	Mensch	52	775	9	25	2	10	23	3	6
81	C26	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
82	C27	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
83	C28	Mensch	257	257	9	2	4	62	4	5	6
84	D01	Mensch		4907	22	201	29	64	127	7	23
85	D03	Mensch		7013	7	71	5	62	11	67	26
86	D04	Mensch		4359	1	355	42	4	90	25	8
87	D05	Mensch	658	658	2	4	2	4	19	3	6
88	D06	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
89	D07	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
90	D08	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
91	D09	Mensch	48	48	2	4	1	2	7	1	5
92	D10	Mensch	48	48	2	4	1	2	7	1	5
93	D11	Mensch	22	1947	1	94	6	4	3	3	3
94	D12	Mensch	464	464	24	2	2	2	10	3	1
95	D13	Mensch	464	464	24	2	2	2	10	3	1
96	D14	Mensch		1911	7	84	5	10	119	178	26
97	D15	Mensch		5272	2	103	2	28	17	34	23
98	D16	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
99	D18	Mensch		609	24	2	5	72	2	5	39



Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc
100	D19	Mensch		609	24	2	5	72	2	5	39
101	D20	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
102	D21	Mensch	21	50	2	1	12	3	2	1	5
103	E01	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
104	E02	Mensch	49	49	3	1	5	17	11	11	6
105	E03	Mensch	61	61	1	4	2	2	6	3	17
106	E04	Mensch	48	48	2	4	1	2	7	1	5
107	E05	Mensch	48	4591	59	4	1	2	7	1	236
108	E06	Mensch	48	4591	59	4	1	2	7	1	236
109	E07	Mensch	354	4650	8	10	2	2	89	12	249
110	E08	Mensch	none	4625	55	172	21	49	125	48	23
111	E11	Mensch	none	4651	7	112	42	62	11	2	259
112	E12	Mensch	446	450	47	55	5	10	11	48	8
113	E13	Mensch	206	4652	62	4	5	2	2	1	282
114	E14	Mensch	45	4653	5	7	10	4	42	7	1
115	E15	Mensch	257	4571	185	2	4	62	4	5	259
116	E16	Mensch	none	4654	62	4	4	2	2	1	236
117	E17	Mensch	45	4655	5	7	1	4	1	7	1
118	E18	Mensch	42	4592	1	2	3	4	5	9	69
119	E19	Mensch	22	22	1	3	6	4	3	3	3

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc
120	E21	Mensch	45	137	4	7	10	4	42	7	1
121	E22	Mensch	1332	696	2	1	4	28	58	25	58
122	E23	Mensch	257	257	9	2	4	62	4	5	6
123	HB7	Huhn	45	4593	4	7	10	1	1	30	1
124	HS01	Huhn	none	877	7	112	42	62	11	67	6
125	HS02	Huhn	353	353	7	17	5	2	10	3	6
126	HS03	Huhn	353	4656	7	17	5	2	18	3	6
127	HS04	Huhn	none	3529	7	84	5	10	119	178	247
128	HS05	Huhn	658	1900	7	4	2	2	19	1	6
129	HS06	Huhn	none	4657	7	84	52	10	119	178	247
130	HS07	Huhn	353	353	7	17	5	2	10	3	6
131	HS08	Huhn	353	4658	7	17	52	2	18	3	6
132	HS09	Huhn	353	353	7	17	5	2	10	3	6
133	HS10	Huhn	none	877	7	112	42	62	11	67	6
134	HS11	Huhn	45	45	4	7	10	4	1	7	1
135	HS12	Huhn	none	3529	7	84	5	10	119	178	247
136	HS13	Huhn	none	3529	7	84	5	10	119	178	247
137	HS14	Huhn	353	353	7	17	5	2	10	3	6
138	HS16	Huhn	none	4659	7	112	42	62	13	67	6
139	HR1	Huhn	none	2897	7	71	5	303	11	67	1

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkf	unc
140	HR4	Huhn	none	2897	7	71	5	303	11	67	1
141	HR5	Huhn	none	2897	7	71	5	303	11	67	1
142	HW1	Huhn	206	2192	2	7	5	2	2	1	5
143	HW2	Huhn	none	464	24	2	2	2	10	3	1
144	HW3	Huhn	none	464	24	2	2	2	10	3	1
145	HW4	Huhn	none	464	24	2	2	2	10	3	1
146	HW5	Huhn	206	2192	2	7	5	2	2	1	5
147	HW6	Huhn	206	2192	2	7	5	2	2	1	5
148	HW7	Huhn	none	464	24	2	2	2	10	3	1
149	av7089RP	Huhn	21	21	2	1	1	3	2	1	5
150	av7090TH	Huhn	none	2274	9	17	5	10	350	3	3
151	av7107BY	Huhn	42	42	1	2	3	4	5	9	3
152	av7111BY	Huhn	257	990	9	2	4	62	4	133	6
153	av7126RP	Huhn	353	353	7	17	5	2	10	3	6
154	av7252NI	Huhn	21	50	2	1	12	3	2	1	5
155	av7270BW	Huhn	354	2288	8	10	2	2	347	1	6
156	av7240BW	Huhn	21	4660	2	356	12	3	2	1	5
157	av7255BY	Huhn	21	21	2	1	1	3	2	1	5
158	av7258TH	Huhn	none	4676	22	201	315	56	127	25	23
159	av7267BB	Huhn	21	4661	2	1	12	3	20	1	5

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkf	unc
160	av7275RP	Huhn	48	4662	62	4	5	2	20	1	5
161	av7278BB	Huhn	21	50	2	1	12	3	2	1	5
162	av7280BY	Huhn	21	4663	2	1	12	3	70	1	5
163	av7289BY	Huhn	48	4662	62	4	5	2	20	1	5
164	av7292BB	Huhn	21	50	2	1	12	3	2	1	5
165	av7297BB	Huhn	21	50	2	1	12	3	2	1	5
166	av7085NW	Huhn	none	2367	2	28	29	28	74	267	124
167	av7073HE	Huhn	48	48	2	4	1	2	7	1	5
168	av7060SN	Huhn	206	572	62	4	5	2	2	1	5
169	av4002NI	Huhn			115		246	391	10	386	6
170	av4116NI	Huhn	446	450	47	55	5	10	11	48	8
171	av518	Huhn	21	21	2	1	1	3	2	1	5
172	av08B5020	Huhn	22	22	1	3	6	4	3	3	3
173	av151003ZH0097	Huhn	206	122	6	4	5	2	2	1	5
174	av08B5018	Huhn	22	22	1	3	6	4	3	3	3
175	av509	Huhn	1034	977	22	61	4	64	74	25	23
176	av356	Huhn	45	230	4	7	41	4	42	7	1
177	av245	Huhn	21	50	2	1	12	3	2	1	5
178	Cj bov55	Rind	21	50	2	1	12	3	2	1	5
179	Cj bov137	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc
180	Cj bov79	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
181	Cj bov66	Rind	21	4664	2	1	21	3	20	1	5
182	Cj bov 127	Rind	21	262	2	1	1	3	2	1	3
183	Cj bov 207	Rind	21	53	2	1	21	3	2	1	5
184	Cj bov 60	Rind	61	4665	1	4	301	2	6	3	42
185	Cj bov 159	Rind	206	572	62	4	5	2	2	1	5
186	Cj bov 277	Rind	61	352	1	4	2	2	6	3	38
187	Cj bov C246	Rind	48	48	2	4	1	2	7	1	5
188	Cj bov C535	Rind	61	4666	1	4	2	2	6	3	178
189	Cj bov C536	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
190	Cj bov C397	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
191	Cj bov C403	Rind	21	4667	2	1	1	3	4	1	5
192	Cj bov C539	Rind	48	38	2	4	2	2	6	1	5
193	Cj bov C250	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
194	Cj bov C567	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
195	Cj bov C508	Rind	21	19	2	1	5	3	2	1	5
196	Cj bov C405	Rind	48	38	2	4	2	2	6	1	5
197	Cj bov C540	Rind	48	38	2	4	2	2	6	1	5
198	Cj bov C537	Rind	42	42	1	2	3	4	5	9	3
199	Cj bov C399	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc
200	Cj bov C406	Rind	61	4668	13	1	2	2	6	3	38
201	Cj bov C486	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
202	Cj bov C325	Rind	61	628	1	4	2	2	6	3	42
203	Cj bov C401	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
204	Cj bov C248	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
205	Cj bov C402	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
206	Cj bov C171 (6332)	Rind		4669	1	2	307	4	90	112	5
207	Cj bov C086 (6367)	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
208	Cj bov C323 (7380)	Rind		4647	62	4	52	2	2	1	5
209	Cj bov C090 (6369)	Rind	48	3203	2	4	1	2	7	1	3
210	Cj bov C117 (6342)	Rind	22	22	1	3	6	4	3	3	3
211	Cj bov C084 (6366)	Rind	42	4670	15	2	3	4	5	9	5
212	Cj bov C404 (7428)	Rind	21	21	2	1	1	3	2	1	5
213	Cj bov C0172 (6333)	Rind	21	1823	2	1	177	3	2	1	5
214	Cj bov C0111 (6341)	Rind	48	3158	2	4	1	2	6	1	5
215	Cj bov C0148 (6539)	Rind	21	1704	2	1	1	3	2	1	8
216	Cj me C0128	Pute	none	2175	8	84	5	10	119	178	26
217	Cj me C0129	Pute	61	1348	108	4	2	146	6	3	6
218	Cj me C0130	Pute	354	2288	8	10	2	2	347	1	6
219	Cj me C0133	Pute	21	50	2	1	12	3	2	1	5

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc
220	Cj me C0280	Pute	828	None	33	39	30	79	503	25	294
221	Cj me C0281	Pute	828	None	118	39	30	79	429	3	12
222	Cj me C0282	Pute	446	450	47	55	5	10	11	48	8
223	Cj me C0283	Pute	443	443	24	17	2	15	23	3	12
224	Cj me C0287	Pute	21	21	2	1	1	3	2	1	5
225	Cj me C0306	Pute	1034	4671	22	15	1	64	74	25	23
226	Cj me C0318	Pute	21	21	2	1	1	3	2	1	5
227	Cj me C0340	Pute	21	50	2	1	12	3	2	1	5
228	Cj me C0374	Pute	257	824	9	2	2	2	11	5	6
229	Cj me C0408	Pute	45	45	4	7	10	4	1	7	1
230	Cj me C0467	Pute	828	None	33	39	30	82	113	3	12
231	Cj me C0475	Pute	257	257	9	2	4	62	4	5	6
232	Cj me C0001-1	Pute	21	21	2	1	1	3	2	1	5
233	Cj me C0438	Pute	21	1823	2	1	177	3	2	1	5
234	Cj me C0450	Pute	21	4672	2	17	12	3	2	1	78
235	Cj me C0816	Pute	1034	1709	22	15	4	64	74	25	23
236	Cj me C0847	Pute	52	2091	9	192	5	10	11	3	6
237	Cj me C0999	Pute	21	4673	22	1	12	3	2	1	5
238	Cj me C1466	Pute	1332	696	2	1	4	28	58	25	58
239	Cj me C1496	Pute	1034	4674	2	257	4	243	2	25	23

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkf	unc
240	Cj me C1541	Pute	none	4430	37	365	21	64	505	24	23
241	Cj me C0680	Pute	none	464	24	2	2	2	10	3	1
242	Cj me C0149	Pute	443	4675	7	17	284	15	13	3	294
243	11168	Mensch	21	43	2	1	5	3	4	1	43
244	81176	Mensch	42	913	1	2	3	27	5	9	6
245	BfR1764	Mensch	22	22	1	3	6	4	3	3	3
246	BfR3918	Mensch	42	42	1	2	3	4	5	9	3
247	BfR1780	Rind	45	583	4	7	10	4	42	51	1
248	BfR1781	Rind	45	583	4	7	10	4	42	51	1
249	BfR4232	Huhn	45	45	4	7	10	4	1	7	1
250	BfR4327	Huhn	45	1003	8	7	4	4	125	7	1
251	BfR3867	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
252	BfR3868	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
253	BfR3880	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
254	BfR3894	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
255	BfR3895	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
256	BfR3897	Wildvogel	45	45	4	7	10	4	1	7	1
257	BfR3899	Rind	45	45	4	7	10	4	1	7	1
258	BfR3906	Haushundstamm	45	45	4	7	10	4	1	7	1
259	BfR3914	Huhn	45	295	47	7	10	4	1	1	1



Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkf	unc
260	BfR3929	Rind	45	45	4	7	10	4	1	7	1
261	BfR3944	Huhn	45	45	4	7	10	4	1	7	1
262	BfR3949	Huhn	45	45	4	7	10	4	1	7	1
263	BfR4007	Mensch	45	45	4	7	10	4	1	7	1
264	BfR4009	Huhn	45	3036	4	7	10	4	396	7	1
265	BfR4010	Mensch	45	483	11	7	10	1	1	7	1
266	BfR3907	Mensch	283	267	4	7	40	4	42	51	1
267	BfR3942	Wasser	283	267	4	7	40	4	42	51	1
268	BfR3950	Huhn	283	564	4	7	40	92	42	51	1
269	BfR3865	Mensch	21	53	2	1	21	3	2	1	5
270	BfR3866	Mensch	21	53	2	1	21	3	2	1	5
271	BfR3869	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
272	BfR3871	Schaf	52	52	9	25	2	10	22	3	6
273	BfR3872	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
274	BfR3874	Mensch	22	1739	1	3	6	4	2	3	3
275	BfR3876	Mensch	21	53	2	1	21	3	2	1	5
276	BfR3881	Mensch	21	53	2	1	21	3	2	1	5
277	BfR3883	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
278	BfR3885	Rind	48	48	2	4	1	2	7	1	5
279	BfR3889	Rind	61	61	1	4	2	2	6	3	17

Nr.	Isolat	Ursprung	MLST-CC	MLST-ST	asp	gln	Glt	gly	pgm	tkr	unc
280	BfR3896	Wildvogel	177	54	17	2	9	5	24	2	4
281	BfR3898	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5
282	BfR3912	Rind	61	61	1	4	2	2	6	3	17
283	BfR3913	Schaf	21	21	2	1	1	3	2	1	5
284	BfR3922	Huhn	206	46	2	21	5	3	2	1	5
285	BfR3926	Huhn	206	46	2	21	5	3	2	1	5
286	BfR3927	Schaf	21	262	2	1	1	3	2	1	3
287	BfR3933	Mensch	177	563	17	5	8	5	8	2	4
288	BfR3935	Huhn	21	21	2	1	1	3	2	1	5
289	BfR3943	Mensch	61	60	1	4	2	16	6	3	17
290	BfR3947	Mensch	61	60	1	4	2	16	6	3	17
291	BfR3948	Huhn	49	49	3	1	5	17	11	11	6
292	BfR3951	Huhn	206	46	2	21	5	3	2	1	5
293	BfR4012	Mensch	21	21	2	1	1	3	2	1	5

**Tabelle 26: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika der verwendeten Referenzstämme**

<b>Nr.</b>	<b>Isolat</b>	<b>Ursprung</b>	<b>MLST-CC</b>	<b>MLST-ST</b>	<b>asp</b>	<b>gln</b>	<b>glt</b>	<b>gly</b>	<b>pgm</b>	<b>tkl</b>	<b>unc</b>	<b>Klade</b>
1	A12	Mensch		7861	130	39	44	82	104	44	68	1B
2	RM2228-ST1063	Huhn	828	1063	33	39	30	140	113	43	41	1A
3	81-176-ST913	Mensch	42	913	1	2	3	27	5	9	6	C. jejuni
4	NCTC11168-ST43	Mensch	283	267	4	7	40	4	42	51	1	C. jejuni
5	84-25-ST185	Mensch	21	43	2	1	5	3	4	1	5	C. jejuni
6	81116-ST267/NCTC 11828	Mensch	21	185	2	1	1	3	1	1	5	C. jejuni

### **8.3 Bisherige Veröffentlichung**

Zautner AE, Goldschmidt AM, Thürmer A, Schuldes J, Bader O, Lugert R, Groß U, Stingl K, Salinas G, Lingner T (2015): SMRT sequencing of the *Campylobacter coli* BfR-CA-9557 genome sequence reveals unique methylation motifs. *BMC Genomics* 16, 1088

## **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Andreas E. Zautner für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Übernahme der Erstbegutachtung bedanken. Durch die stets sehr gute und engagierte Betreuung sowohl während des praktischen als auch beim Verfassen des theoretischen Teils dieser Dissertation, hat er es ermöglicht, das mir bestmögliche Ergebnis mit dieser Arbeit zu erreichen.

Als weiteren Unterstützer für dieses Projekt möchte ich mich bei Herrn Wycliff Omurwa Masanta aus der Arbeitsgruppe Campylobacter für seine Hilfe bei der MLST-Typisierung der verwendeten Campylobacter-Stämme bedanken. Für die gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit gilt mein Dank ebenso allen Mitarbeitern aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie.

Für die gute Zusammenarbeit bei der SMRT-Sequenzierung bedanke ich mich bei dem Functional Genomics Center Zürich (FGCZ, Switzerland) sowie dem Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig.

## **Lebenslauf**

Als Tochter von Marlene Goldschmidt, geb. Goevert, und Vinzenz Goldschmidt bin ich am 29.10.1988 in Haselünne geboren. Ich habe zwei Geschwister, einen Bruder, Benjamin Goldschmidt und eine Schwester Isabell Goldschmidt. Ab 1995 besuchte ich für 4 Jahre die Grundschule Altenlingen. Im Übergang von Grundschule und Gymnasium absolvierte ich von 1999 bis 2001 die Orientierungsstufe der Marienschule in Lingen. Anschließend wechselte ich im Jahr 2001 auf das Gymnasium Johanneum (Europaschule) und erlangte dort 2008 die Allgemeine Hochschulreife. Daraufhin absolvierte ich von 2008 bis 2009 ein Freiwilliges Soziales Jahr beim Deutschen Roten Kreuz in Lingen und erlangte während dieser Zeit den Abschluss einer staatlich geprüften Rettungssanitäterin. Zum Wintersemester 2009 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Das erste Staatsexamen bestand ich im Herbst 2011, das zweite Staatsexamen im Herbst 2014 und das dritte Staatsexamen und somit der Abschluss des Studiums am 03.11.2015. Seit Juni 2016 bin ich als Assistenzärztin der Anästhesiologie in der Uniklinik Erlangen tätig.