

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

**Identifizierung von virulenzassoziierten Antigenen
bei enteropathogenen Yersinien und
*Campylobacter jejuni***



Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Niefnecker
aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:..... Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Mitberichterstatter:Priv. Doz. Dr. Susanne Krauss-Etschmann

.....Priv. Doz. Dr. Thomas Ochsenkühn

Betreuung:..... Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:30.09.2009

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und noch keiner Hochschule zu Prüfungszwecken vorgelegt wurde. Ich habe noch nicht versucht eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 17.03.2009

Julia Niefnecker

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.1.1	<i>Yersinia</i> assoziierte Erkrankungen	2
1.1.1.1	<i>Y. pestis</i> und die Pest	2
1.1.1.2	<i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i> assoziierte Erkrankungen.....	3
1.1.1.2.1	Yersiniose	3
1.1.1.2.2	Reaktive Arthritis.....	3
1.1.1.2.3	Erythema nodosum	4
1.1.2	Epidemiologie der Yersinien-Infektion	4
1.1.3	Pathogenese und Immunantwort der enteralen <i>Yersinia</i> Infektion.....	5
1.1.3.1	Die Yop Effektorproteine	5
1.1.3.2	YadA (<i>Yersinia adhesin A</i>).....	7
1.1.3.3	Invasin A	8
1.1.3.4	Enterotoxin Yst.....	9
1.1.3.5	Myf-Antigen und pH6-Antigen	9
1.1.3.6	Das Membranprotein Ail (<i>Attachment invasion locus</i>).....	10
1.1.4	Diagnostik von <i>Yersinia</i> sp. Infektionen	10
1.1.4.1	Mikrobielle Diagnostik.....	10
1.1.4.2	Molekularbiologische Diagnostik.....	10
1.1.4.3	Serologische Diagnostik	11
1.2	Die Gattung <i>Campylobacter</i>	11
1.2.1	<i>Campylobacter</i> assoziierte Erkrankungen	12
1.2.1.1	Enterokolitis.....	13
1.2.1.2	Guillain-Barré-Syndrom (GBS).....	13
1.2.1.3	<i>Campylobacter jejuni</i> assoziierte Reaktive Arthritis	14
1.2.2	Epidemiologie von <i>Campylobacter</i> sp. Infektionen	14
1.2.3	Pathogenese der <i>C. jejuni</i> Infektion.....	15
1.2.3.1	JlpA.....	16
1.2.3.2	CadF	17
1.2.3.3	CiaB.....	17
1.2.3.4	FlaC	17
1.2.3.5	Cj1496c.....	18
1.2.4	Glykosylierungssysteme.....	18
1.2.5	Proteinsekretion bei Gram-negativen Bakterien.....	19
1.2.6	Immunantwort	21
1.2.6.1	Angeborene Immunantwort.....	21
1.2.6.2	Spezifische Immunantwort	22
1.2.7	Diagnostik von <i>Campylobacter</i> sp. Infektionen	23
1.2.7.1	Mikrobielle Diagnostik.....	23
1.2.7.2	Molekularbiologische Diagnostik.....	23
1.2.7.3	Serologische Tests zur <i>Campylobacter</i> -Differenzierung.....	24
1.2.7.4	Serologische Diagnostik	24
	Ziel der Arbeit.....	25
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Geräte.....	26
2.2	Chemikalien und Biochemikalien	27
2.3	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	28
2.3.1	Bakterienstämme	28
2.3.2	Plasmide	29

INHALTSVERZEICHNIS

2.3.3	Oligonukleotide.....	30
2.4	Nährmedien und Antibiotika.....	32
2.4.1	Nährmedien.....	32
2.4.2	Antibiotika.....	33
2.5	Mikrobiologische Methoden.....	33
2.5.1	Kultivierungsverfahren.....	33
2.5.2	Stammhaltung.....	33
2.5.3	Phänotypische Untersuchungen.....	33
2.6	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	34
2.6.1	Plasmidisolierung.....	34
2.6.2	Isolierung genomischer DNA.....	34
2.6.3	Modifikation von DNA.....	34
2.6.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	34
2.6.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	35
2.6.6	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
2.6.7	Polymerasenkettenreaktion (PCR).....	35
2.6.8	Kompetente Zellen und Elektroporation.....	36
2.6.8.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Elektroporation.....	36
2.6.8.2	Herstellung elektrokompetenter <i>C. jejuni</i> Zellen und Elektroporation.....	37
2.6.9	DNA-Sequenzanalyse.....	37
2.6.10	Konstruktion der Plasmide.....	37
2.6.10.1	Expressionsplasmide.....	37
2.6.10.2	Suizidplasmide.....	39
2.7	Biochemische und Analytische Methoden.....	39
2.7.1	Isolierung von sezernierten Proteinen (COPs) von <i>C. jejuni</i> und Yops von Yersinien aus dem Kulturüberstand.....	39
2.7.2	Isolierung von SSPs (<i>soluble supernatant proteins</i>) und Membranvesikeln.....	41
2.7.3	YadA Expression.....	41
2.7.4	Präparation von <i>C. jejuni</i> Gesamtzelllysaten.....	41
2.7.5	Proteinbestimmung.....	41
2.7.6	SDS-PAGE.....	42
2.7.7	2-Dimensionale Gelelektrophorese.....	43
2.7.7.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung.....	43
2.7.7.2	Äquilibrierung der IPG-Streifen.....	45
2.7.7.3	Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	45
2.7.8	Färbemethoden.....	46
2.7.8.1	Coomassiefärbung nach Weber und Osborn (1969).....	46
2.7.8.2	Kolloidale Coomassiefärbung nach Neuhoff <i>et al.</i>	46
2.7.8.3	Ponceau S-Färbung.....	47
2.7.9	Auswertung der zweidimensionalen Gele.....	47
2.7.10	Westernblot.....	47
2.7.11	Line Assays.....	49
2.7.11.1	Miniblotter 45.....	49

INHALTSVERZEICHNIS

2.7.11.2	Isoflow Dispenser	50
2.7.12	Antikörper	50
2.7.12.1	Kaninchen Antisera und Seren	50
2.7.12.2	Sekundäre Antikörper	51
2.7.13	Lektin-Blot	51
2.7.14	Perjodatoxidation	51
2.8	Proteinreinigung	52
2.8.1	Produktion von rekombinanten Proteinen	52
2.8.2	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)	53
2.8.3	Ionenaustauschchromatographie	54
2.8.4	Gelfiltration	54
2.9	Immunologische Methoden	55
2.9.1	Herstellung von anti- <i>Y. enterocolitica</i> Kaninchen Seren	55
2.9.2	Herstellung von anti- <i>C. jejuni</i> Kaninchen Seren	55
2.10	Biophysikalische Methoden	56
2.10.1	MALDI-TOF	56
2.11	<i>in silico</i> Analysen	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Identifizierung neuer virulenzassoziierter <i>Yersinia</i> Antigene	58
3.1.1	Die Antigene MyfA und PsaA	58
3.1.1.1	Klonierung von <i>myfA</i> und <i>psaA</i>	59
3.1.1.2	Produktion und Reinigung von MyfA, MyfA-Teilfragmenten und PsaA	60
3.1.1.3	Immunoblot mit rekombinanten MyfA- und PsaA-Proteinen	61
3.1.2	Das virulenzassoziierte Protein YadA	63
3.1.2.1	Klonierung der Kopf-Halsstruktur von YadA	63
3.1.2.2	Expression und Reinigung der Kopf-Halsstruktur von YadA	64
3.1.2.3	Immunoblot mit rekombinanten YadA ₇₂₋₂₈₀ Protein	65
3.1.3	Das RTX-like Protein RtxA	66
3.1.3.1	Klonierung des RtxA Proteins	67
3.1.3.2	Produktion und Reinigung der RtxA Teilfragmente	67
3.1.4	<i>Yersinia</i> „Line Assay“	68
3.1.5	Evaluierung der rekombinanten <i>Yersinia</i> Antigene	70
3.1.5.1	Evaluierung der <i>Yersinia</i> Antigenen YadA ₇₂₋₂₈₀ und Rtx3	70
3.1.5.2	Evaluierung der Antigene MyfA und PsaA	72
3.2	Identifizierung neuer <i>Campylobacter jejuni</i> Antigene	73
3.2.1	Das Sekretom von <i>Campylobacter jejuni</i>	73
3.2.2	Immunoblot mit Anti- <i>C. jejuni</i> Hyperimmunseren	76
3.2.3	Immunoblot mit <i>Campylobacter</i> Patientenseren	77
3.2.4	Identifizierung von COPs mittels MALDI-TOF	78
3.2.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese mit dem Sekretom von <i>C. jejuni</i>	80
3.2.6	Zweidimensionaler Immunoblot der COPs mit Anti- <i>C. jejuni</i> Hyperimmunseren	83
3.2.7	Zweidimensionaler Immunoblot der Cops mit Patientenseren	84
3.2.8	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Gesamtzelllysaten	85
3.2.9	Zweidimensionaler Immunoblot des Zelllysates mit Patienten Seren	86
3.2.10	Rekombinante Herstellung der identifizierten <i>C. jejuni</i> Antigene	87

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.11	Rekombinante Herstellung potentieller Antigene.....	89
3.2.11.1	CadF (Campylobacter adhesion to fibronectin).....	89
3.2.11.2	<i>Campylobacter</i> Invasions Antigen B (CiaB).....	90
3.2.11.3	Das Lipoprotein JlpA (<i>jejuni lipoprotein A</i>).....	90
3.2.11.4	Das Flagellin FlaC.....	91
3.2.11.5	Das hypothetische Glykoprotein Cj1496c.....	92
3.2.12	Evaluierung der <i>C. jejuni</i> Antigene im Line Assay.....	93
3.2.13	Nachweis von Glykoproteinen mittels Lektin Blot.....	96
3.2.14	Sekretom Subfraktionierung.....	101
3.2.14.1	Subfraktionierung des Sekretoms von <i>C. jejuni</i> Lior 11 wt.....	101
3.2.14.2	Das Sekretom in Abhängigkeit des Fla-T3SS und des TAT-Systems.....	103
3.2.14.3	Beweglichkeitsuntersuchung von L11 Δ flgC und L11 Δ tatC.....	109
4	Diskussion.....	111
4.1	Verbesserung der Sensitivität des <i>Yersinia</i> Immunoblots.....	113
4.2	Verbesserung der Sensitivität des <i>Campylobacter</i> Immunoblots.....	116
4.2.1	Proteom-basierte Identifizierung neuer <i>Campylobacter</i> Antigene.....	116
4.2.2	Antigene Eigenschaften bekannter virulenzassoziiierter Proteine.....	118
4.2.3	Evaluierung der neuen <i>Campylobacter</i> Antigene.....	120
4.3	Das Sekretom von <i>C. jejuni</i>	124
5	Zusammenfassung.....	133
6	Literaturverzeichnis.....	135
7	Anhang.....	156
7.1	Evaluierung der rekombinanten <i>Yersinia</i> Antigene.....	156
7.1.1	Evaluierung der <i>Yersinia</i> Antigenen YadA ₇₂₋₂₈₀ und Rtx3.....	156
7.1.2	Evaluierung der Antigene MyfA und PsaA.....	158
7.1.3	Tabellen.....	161

ABKÜRZUNGSVERZEICHNISS

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäure
BFCs-Agar	engl.: <i>Blood free Campylobacter selectivity</i> Agar
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>Bovine Serum Albumine</i>)
CBB	Coomassie Brilliantblau
CIAB	engl.: <i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CIN-Agar	<u>C</u> efsulodin- <u>I</u> rgasan- <u>N</u> ovobiocin Agar
Cm ^R	Plasmidvermittelte Chloramphenicol-Resistenz
COPs	engl.: <i>Campylobacter outer proteins</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Ribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL-Lösung	<i>enhanced chemiluminescence</i> - Lösung
g	Gramm
h	Stunde (engl.: <i>hour</i>)
H ₂ O _{dest}	einfach destilliertes Wasser
HRP	Meerrettisch-Peroxidase (engl.: <i>horse-radish peroxidase</i>)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IgA	Immunglobuline der Klasse A
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IgM	Immunglobuline der Klasse M
IMAC	engl.: <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium
LKZ	Lebendkeimzahl
M	Molar
mA	Milliampere

ABKÜRZUNGSVERZEICHNISS

MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight</i> (engl.)
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Molekulargewicht (engl.: <i>molecular weight</i>)
MyfA	engl.: <i>Mucoid Yersinia factor A</i>
NaCl	Natriumchlorid
nt	Nukleotide
OD _x	Optische Dichte der Wellenlänge x nm
OMV	engl.: <i>outer membrane vesicle</i>
ORF	Offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pI	Isoelektrischer Punkt
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBA	Sojabohnen Agglutinin (engl.: <i>Soy bean Agglutinin</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSPs	engl.: <i>soluble supernatant proteins</i>
Tab.	Tabelle
TAT	engl.: <i>twin arginine translocation</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
YadA	engl.: <i>Yersinia adhesin A</i>
Yops	engl.: <i>Yersinia outer proteins</i>

1 Einleitung

Zooanthroponosen sind Infektionskrankheiten, die auf natürlichem Wege vom Tier auf den Menschen übertragen werden (Alpers *et al.*, 2004). Sie werden durch ein Tierreservoir charakterisiert, bei denen der Erreger unter natürlichen Bedingungen vorkommt. Die Tiere können hierbei durch den Zoonoseerreger erkranken oder auch asymptomatische Träger sein. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt entweder über direkten Kontakt oder indirekt über Tierprodukte (kontaminierte Lebensmittel) oder Arthropoden (Stechmücken, Flöhe) (Alpers *et al.*, 2004). Viele Zoonosen unterliegen laut dem Infektionsschutzgesetzes (IfSG) der Meldepflicht. Die am häufigsten gemeldeten Zoonoseerreger sind Salmonellen und *Campylobacter* gefolgt von enteropathogenen Yersinien.

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* wurden nach dem Schweizer Bakteriologen Alexandre Émile Jean Yersin benannt. Yersin isolierte im Jahr 1894 als Erster den Erreger der Pest, *Yersinia pestis*, und deckte die Rolle der Ratten und der Rattenflöhe bei der Übertragung der Pest auf. Yersinien sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien der Familie der Enterobacteriaceae, die der Subdivision der γ -Proteobacteria zugeordnet werden. Insgesamt werden 11 Arten unterschieden (Garrity *et al.*, 2004), von denen drei humanpathogen sind: Der Erreger der Pest *Y. pestis* und die enteropathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Die enteropathogenen Yersinien sind psychrophil und können sich im Temperaturbereich von 0-45°C vermehren, wobei die optimale Wachstumstemperatur zwischen 25-28°C liegt (Bockemühl and Wong, 2003).

Y. enterocolitica kann in 6 Biotypen (1A, 1B, 2, 3, 4, und 5) eingeteilt werden, die aufgrund von biochemischen Stoffwechselreaktionen unterschieden werden (Wauters *et al.*, 1987). Serologisch wird *Y. enterocolitica* in ungefähr 60 Serotypen unterteilt, von denen 11 Serotypen mit humanen Infektionen assoziiert sind (Bottone, 1999). In Europa sind die häufigsten Serotypen O:3 (Biotyp 4) und O:9 (Biotyp 2) und in seltenen Fällen O:5,27 (Biotyp 2). Dagegen ist in den USA die häufigste Serogruppe O:8 (Biotyp 1B). Bei *Y. pseudotuberculosis* unterscheidet man 21 Serotypen (Wren, 2003), wobei die häufigsten Serotypen in Europa O I, O II, O III und O IV sind.

Y. pestis entwickelte sich wahrscheinlich vor 1.500 – 20.000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O I (Achtman *et al.*, 1999; Skurnik *et al.*, 2000). Eine O-Serotypisierung von *Y. pestis* ist nicht möglich, da aufgrund von Mutationen im O-Antigen-Gencluster kein O-Antigen produziert

wird (Skurnik *et al.*, 2000). Dagegen wird *Y. pestis* aufgrund der Fähigkeit Glycerol zu fermentieren und Nitrat zu reduzieren in drei Biotypen unterteilt. Der Biotyp Antiqua (Glycerol positiv, Nitrat positiv) hat seinen Ursprung in Afrika und war wahrscheinlich Auslöser der ersten Pandemie (Justinianische Pest, 5.-7. Jahrhundert). Biotyp Medievalis (Glycerol positiv, Nitrat negativ) ist aus Zentralasien im Mittelalter nach Europa eingeschleppt worden und ist für die zweite Pandemie verantwortlich („Schwarzer Tod“, 13.-15. Jahrhundert). Biotyp Orientalis (Glycerol negativ, Nitrat positiv) ist weltweit verbreitet und wird mit der dritten Pandemie ab 1894 assoziiert (moderne Pest, 1870 bis heute) (Achtman *et al.*, 1999).

1.1.1 *Yersinia* assoziierte Erkrankungen

1.1.1.1 *Y. pestis* und die Pest

Die natürlichen Wirtstiere von *Y. pestis* sind Nagetiere. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt über den Biss von Flöhen, insbesondere des Rattenfloh (*Xenopsylla cheopis*), die über die Nagetiere mit *Y. pestis* infiziert werden. *Y. pestis* bildet im Proventriculus des Flohs zusammenhängende biofilmartige Aggregate und blockiert auf diese Weise den Eingang des Proventriculus. Dies führt dazu, dass der Floh beim Versuch der Nahrungsaufnahme die aggregierten Yersinien durch retrogrades Würgen unter die Haut von Menschen bzw. von Nagetieren bringt (Wren, 2003). Von dort wird *Y. pestis* in Makrophagen zu den regionalen Lymphknoten transportiert und vermehrt sich in diesen (Perry and Fetherston, 1997). Dies bewirkt das klinische Bild der Beulenpest, die durch Entzündung und Anschwellen von einem oder mehreren Lymphknoten charakterisiert ist. Über Hautverletzungen oder über Platzen der Pestbeulen kann *Y. pestis* in die Blutbahn eindringen und zur Entwicklung der primären Pestsepsis führen. Diese hat meistens die sekundäre Infektion von weiteren Organen zur Folge, wodurch sich zum Beispiel eine sekundäre Lungenpest entwickeln kann. Die primäre Lungenpest wird von Mensch zu Mensch durch Tröpfcheninfektion übertragen. Als Antibiotikatherapie sind Gentamicin und Streptomycin die Mittel der Wahl (Bockemühl and Wong, 2003). Als Impfstoffe können attenuierte oder Formalin-inaktivierte *Y. pestis* Stämme verwendet werden (Meyer, 1970). Die Schutzimpfung wird aber nur für Risikogruppen empfohlen und ist zudem nur gegen Beulenpest, nicht aber gegen Lungenpest wirksam.

1.1.1.2 *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* assoziierte Erkrankungen

Enteropathogene Yersinien sind weltweit verbreitet. *Y. enterocolitica* ist ein häufig und *Y. pseudotuberculosis* ein selten gemeldeter Krankheitserreger beim Menschen. *Y. pseudotuberculosis* wird nicht selten bei Nagetieren und Wildvögeln indiziert. *Y. enterocolitica* ist in allen warmblütigen Wild-, Nutz- und Haustieren zu finden. Schweine sind wichtige Reservoirs der humanpathogenen Serotypen O:3 und O:9, die vor allem die Tonsillen der Schweine besiedeln. Enteropathogene Yersinien können aber auch aus Boden-, Wasser- und Lebensmittelproben isoliert werden (Bockemühl and Wong, 2003). Die Infektion des Menschen erfolgt in den meisten Fällen über kontaminierte Lebensmittel und über kontaminiertes Wasser. In seltenen Fällen findet eine Übertragung auch über Schmierinfektionen statt (Bockemühl and Roggentin, 2004).

1.1.1.2.1 Yersiniose

Enterale Yersiniosen können sich in 3 klinischen Formen manifestieren: (1) selbstlimitierende Enteritis, (2) terminale Ileitis oder mesenteriale Lymphadenitis und (3) Septikämie mit Abszessbildungen in Milz und Leber (Bockemühl and Wong, 2003). Wässrige, seltener blutige Stuhlgänge sind typisch für *Y. enterocolitica* Infektionen und werden nur vereinzelt bei Infektionen mit *Y. pseudotuberculosis* beobachtet. Blutiger Durchfall geht mit Fieber, Erbrechen und Bauchschmerzen einher. Für *Y. pseudotuberculosis* Infektionen sind terminale Ileitis, mesenteriale Lymphadenitis und Pseudoappendizitis ohne Durchfall typisch (Bockemühl and Roggentin, 2004). Die Septikämie tritt nur bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen auf. Es kann zur Abszessbildung in Leber und Milz kommen und weiterhin zu Pneumonie, Meningitis, Endokarditis, septische Arthritis oder Osteomyelitis (Bottone, 1997). In einzelnen Fällen können postinfektiöse Folgeerkrankungen nach einer Yersinien Infektion auftreten. Die häufigsten Folgeerkrankungen sind reaktive Arthritis und Erythema nodosum.

1.1.1.2.2 Reaktive Arthritis

Die reaktive Arthritis (ReA) ist eine extraintestinale postinfektiöse Folgeerkrankung und ist durch eine sterile immunvermittelte Entzündung der Gelenke charakterisiert. ReA wird zum klinischen Spektrum der Spondylarthropathien gezählt und tritt nach einer Latenzphase von Tagen bis wenigen Wochen nach einer Infektion auf. Hierbei handelt es sich um urogenitale Infektionen, in der Regel verursacht durch *Chlamydia trachomatis*, oder gastrointestinale Infektionen mit Yersinien, Salmonellen, Shigellen oder *Campylobacter jejuni* (Wuorela and Granfors, 1998). Die Erreger können nicht aus Gelenkpunktaten isoliert werden, persistieren aber wahrscheinlich in lymphatischen Geweben, zum Beispiel in Lymphknoten oder in der Submukosa des Darms (Granfors *et al.*, 1998).

Dies führt zu einer fortwährenden Stimulation einer erregerorientierten Immunantwort. In den entzündeten Gelenken konnten Antigene von Yersinien (Lipopolysaccharid, *Yersinia heat shock antigen*) und so genannte bakterielle "Ghosts" nachgewiesen werden (Granfors *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 1990). Des Weiteren sind im Blut erhöhte IgA-Titer nachweisbar (de Koning *et al.*, 1989). Zwischen 60 und 85% aller Patienten sind HLA-B27 positiv (Schiellerup *et al.*, 2008; Wollenhaupt, 2007). Eine Assoziation von HLA-B27 mit ReA nach einer *Campylobacter* Infektion besteht im Gegensatz zu Yersinien nach Schiellerup *et al.* (2008) nicht. Hauptmanifestation reaktiver Arthritiden ist die Mon- oder Oligoarthritis, die überwiegend die Gelenke der unteren Extremitäten betrifft. Jedes Gelenk kann in den Entzündungsprozess einbezogen sein, jedoch sind Knie- und Sprunggelenke am häufigsten betroffen (Wollenhaupt, 2007). Im Yersinien-Ratteninfektionsmodell kann ähnlich wie beim Menschen eine reaktive Arthritis entstehen, die durch Immunkomplexe und Komplementaktivierung verursacht wird (Gaede *et al.*, 1992).

1.1.1.2.3 Erythema nodosum

Erythema nodosum ist die häufigste Form einer Pannikulitis und äußert sich durch eine schmerzhafte akute Entzündung der Subkutis, wobei auch die Kapillarwände betroffen sind. Unter der Haut kommt es zur Bildung von unscharf begrenzter und geröteter Knötchen mit einem Durchmesser von 1-3 cm (Schwartz and Nervi, 2007). Das Auftreten von Erythema nodosum ist in den meisten Fällen idiopathisch oder durch eine Streptokokken Infektion hervorgerufen. Bei bis zu 22 % der Patienten konnten in Fallstudien weitere bakterielle Infektionen als Ursache des Erythema nodosum festgestellt werden, einschließlich Infektionen mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Cribier *et al.*, 1998; Debois *et al.*, 1978; Helander *et al.*, 1973; Knapp *et al.*, 1981).

1.1.2 Epidemiologie der Yersinien-Infektion

Für das Jahr 2007 meldet das Robert Koch Institut insgesamt 4987 Erkrankungen aufgrund einer *Yersinia* Infektion (Robert Koch Institut, 2007). Die bundesweite Inzidenz betrug 6,1 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner, wobei eine regionale Häufung in Sachsen-Anhalt, Sachsen und Thüringen zu beobachten ist (Robert Koch Institut, 2007). Bei 90 % der Yersiniosen war *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 nachgewiesen worden. Ein geringerer Anteil wurde von *Y. enterocolitica* Serotyp O:9 (6 %) oder Serotyp O:5,27 (0,8 %) verursacht. In Deutschland wird inzwischen auch vereinzelt *Y. enterocolitica* O:8 (0,2 %) nachgewiesen, ein in Nordamerika endemischer Erregertyp (Robert Koch Institut, 2007). Der Labordiagnostische Nachweis einer Infektion mit pathogenen Yersinien ist gemäß § 7 IfSG meldepflichtig. In den letzten Jahrzehnten sind keine Pest-Fälle in Deutschland aufgetreten. Dagegen wurden in den Ländern Brasilien, Demokratische Republik Kongo,

Madagaskar, Myanmar, Peru, USA und Vietnam jährlich von 1954-1997 Pestfälle gemeldet (WHO, 2000). Laut WHO betrug die Todesrate von Pest innerhalb der letzten 45 Jahre 11,8 % (WHO, 2000). Die Pest gehört in Deutschland gemäß § 30 IfSG zu den Quarantäne-Krankheiten.

1.1.3 Pathogenese und Immunantwort der enteralen *Yersinia* Infektion

Nach oraler Aufnahme von enteropathogenen Yersinien replizieren sich diese im Dünndarm und penetrieren dort die Mukosa über die M-Zellen der Peyer-Plaques. Daraufhin erfolgt die Ausbreitung in die mesenterialen Lymphknoten und über das Blutgefäßsystem in Leber und Milz. Alle humanpathogenen Stämme von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* besitzen ein 70-75 kb großes Virulenzplasmid, das pYV-Plasmid (Portnoy and Falkow, 1981). Das pYV-Plasmid kodiert ein Typ III Sekretionssystem und eine Reihe von Effektorproteinen, die sogenannten Yops (*Yersinia outer proteins*). Die Yops werden kontaktabhängig in die Wirtszelle injiziert und modulieren die Abwehrfunktionen von Phagozyten. Das ebenfalls auf dem pYV-Plasmid kodierte *Yersinia adhesin A* (YadA) vermittelt die Adhärenz an diverse Epithel- und Immunzellen. Zusätzlich gibt es noch chromosomal-kodierte Pathogenitätsfaktoren: das die Invasion vermittelnde Protein Invasin, das sezernierte hitzestabile Enterotoxin Yst, das in der äußeren Membran verankerte fibrilläre Protein MyfA (*mucooid Yersinia factor A*) und das Membranprotein Ail (*attachment invasion locus*).

1.1.3.1 Die Yop Effektorproteine

Das auf dem pYV-Plasmid kodierte Typ III Sekretionssystem ist ein an eine Nadel erinnernder Injektionsapparat, der kontaktabhängig die Yop Effektorproteine in die Wirtszelle injiziert (Ghosh, 2004). Die ebenfalls auf dem pYV-Plasmid kodierten Yop Effektorproteine erfüllen immunmodulatorische Funktionen. Gene für fünf Yops sind auf dem pYV bei allen humanpathogenen Arten vorhanden: YopH, YopM, YopE, YopO/YpkA und YopP/YopJ; YopT wird von *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* und von einigen *Y. pseudotuberculosis* synthetisiert (Trosky *et al.*, 2008). **YopH** ist eine hochaktive Protein-Tyrosinphosphatase mit einer Größe von 51 kDa (Guan and Dixon, 1990). Durch die Dephosphorylierung von Wirtszellproteinen, wie zum Beispiel der fokalen Adhäsionskomponente p130^{Cas} (Substrat der Cas-Kinase), der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin, werden Aktinstrukturen, einschließlich der fokalen Adhäsionskomplexe, aufgelöst (Cornelis, 2002;Guan and Dixon, 1990). Dies führt zur Inhibierung der Integrin-vermittelten Phagozytose (Persson *et al.*, 1997). YopH verhindert zusätzlich die NADH-abhängige Sauerstoffradikalbildung (ROS) von Makrophagen (Bliska and Black, 1995) und die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten (Gerke *et al.*, 2005;Yao *et al.*, 1999). Des Weiteren induziert YopH die

Apoptose in T-Zellen (Bruckner *et al.*, 2005). Neben YopH wirken auch die Effektorproteine YopE, YopT und YopO/YpkA anti-phagozytotisch. Als GTPase aktivierendes Protein (GAP) inhibiert **YopE** die GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1, was zur Depolymerisierung der Aktinfasern führt und einen zytotoxischen Effekt auf die Zielzelle hat (Andor *et al.*, 2001;Black and Bliska, 2000;Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). Das Effektorprotein **YopT** spaltet als Cystein-Protease den Prenyl-Anker mit Cysteinrest am C-Terminus der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 ab und verursacht auf diese Weise die Freisetzung der GTPasen von der Zytoplasmamembran (Shao *et al.*, 2003). Dies führt zum Verlust der lokalen Funktionalität der GTPasen und schließlich zum Auflösen der Aktinfasern (Shao *et al.*, 2003). **YopO** (*Y. enterocolitica*) und YpkA (*Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) sind multifunktionale Proteine, die aus mehreren Domänen aufgebaut sind: eine N-terminale Serin/Threonin Kinase Domäne (Galyov *et al.*, 1993), gefolgt von einer Rho-GTPase Bindedomäne (Barz *et al.*, 2000;Dukuzumuremyi *et al.*, 2000) und einer C-terminalen Aktin Bindedomäne (Galyov *et al.*, 1993;Juris *et al.*, 2000). Die Serin/Threonin Kinase Aktivität wird erst durch die Bindung an Aktin induziert (Juris *et al.*, 2000). YopO/YpkA phosphoryliert die α -Untereinheit G α q von G-Proteinen und inhibiert auf diese Weise die GTP-Bindung (Navarro *et al.*, 2007). YopO/YpkA bewirkt die Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts und verhindert die Phagozytose durch Makrophagen (Grosdent *et al.*, 2002;Juris *et al.*, 2000). **YopP** (*Y. enterocolitica*) und das homologe Protein YopJ (*Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) lösen Apoptose in Makrophagen und dendritischen Zellen aus (Boland and Cornelis, 1998;Erfurth *et al.*, 2004;Ruckdeschel *et al.*, 1997). YopP/YopJ hat einerseits eine Serin/Threonin-Acetyltransferase-Aktivität, die MAPK Signaltransduktionswege durch Acetylierung der Kinasen (Erk, JNK, p38) inhibiert und somit die anschließende Phosphorylierung verhindert und andererseits eine Deubiquitinase-Aktivität (Mittal *et al.*, 2006;Mukherjee *et al.*, 2006). Des Weiteren verhindert YopP/YopJ die Freisetzung von Zytokinen, indem es die Aktivierung von NF- κ B verhindert, und unterdrückt somit eine pro-inflammatorische Immunantwort (Boland and Cornelis, 1998;Ruckdeschel *et al.*, 1998;Schesser *et al.*, 1998). Das **YopM** Effektorprotein ist ein saures Protein, das 13-20 Leucin-reiche Wiederholungsmotive (LRR) und eine Transportsequenz für den Zellkern besitzt. Der Transport von YopM in den Zellkern erfolgt in Vesikeln (Benabdillah *et al.*, 2004;Skrzypek *et al.*, 1998). YopM interagiert mit den Kinasen PRK2 und RSK1, die beide eine Rolle bei der Regulation der Transkription und des Zellzyklus spielen (McDonald *et al.*, 2003). Auf diese Weise kann YopM die Expression von Genen, die für den Zellzyklus und für das Zellwachstum wichtig sind, induzieren (Sauvonnet *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte eine Interaktion von YopM mit dem Serumprotein Alpha1-Antitrypsin nachgewiesen werden (Heusipp *et al.*, 2006). Über die Funktion dieser Interaktion ist bis jetzt noch nichts bekannt. Obwohl die genaue Wirkungsweise von

YopM noch unklar ist, ist YopM essentiell für die Mausvirulenz (Leung *et al.*, 1990; Trulzsch *et al.*, 2004).

1.1.3.2 YadA (*Yersinia adhesin A*)

YadA ist auf dem pYV-Plasmid kodiert und bildet trimere fibrilläre Strukturen auf der Zelloberfläche von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. (Bolin *et al.*, 1982; Bölin & Wolf-Watz, 1984; Balligand *et al.*, 1985). Das *yadA* Gen von *Y. pestis* ist aufgrund einer Deletion eines einzelnen Nukleotides (Stopcodon) ein Pseudogen, weshalb *Y. pestis* kein YadA exprimiert (Skurnik and Wolf-Watz, 1989). Die Transkription von *yadA* ist abhängig von dem Aktivator VirF (*Y. enterocolitica*) bzw. LcrF (*Y. pseudotuberculosis*), der die Transkription bei 37°C, nicht aber bei Temperaturen unter 30°C ermöglicht (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992; Skurnik and Toivanen, 1992). YadA kann innerhalb von Minuten nach einer Temperaturerhöhung auf 37°C in der äußeren Membran detektiert werden (Bolin *et al.*, 1982). Der trimere Autotransporter YadA stellt den Prototyp einer neuen Klasse von nicht-Fimbrien Adhäsinen dar, die als oligomere „*coiled coil*“-Adhäsine (Oca) bezeichnet werden (Roggenkamp *et al.*, 2003). YadA bildet hitzestabile Oligomere auf der Zelloberfläche, die eine Art „Lollipop“-Struktur formen, bestehend aus einer N-terminalen Kopfdomäne, gefolgt von einer Hals- und Stieldomäne und einem C-terminalen Membrananker (Abb. 1.1) (Hoiczkyk *et al.*, 2000). Als Adhäsine enteropathogener Yersinien vermittelt YadA Adhärenz an Epithelzellen (Heesemann *et al.*, 1987), Neutrophile (Roggenkamp *et al.*, 1996; Ruckdeschel *et al.*, 1996) und verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen, Laminin und Fibronectin (Emody *et al.*, 1989; Flügel *et al.*, 1994; Schulze-Koops *et al.*, 1993; Tamm *et al.*, 1993; Tertti *et al.*, 1992). Des Weiteren vermittelt YadA Autoagglutination, was die Bildung von Mikrokolonien und Mikroabszessen in lymphatischen Geweben und Organen, insbesondere in Leber und Milz, induzieren kann (Balligand *et al.*, 1985). Zusätzlich bindet YadA den Komplementfaktor H und das C4b-bindende Protein (Balligand *et al.*, 1985; Kirjavainen *et al.*, 2008; Pilz *et al.*, 1992; Skurnik *et al.*, 1984). Auf diese Weise verhindert YadA die Aktivierung der Komplementsystems, was die YadA-abhängige Serumresistenz erklären kann.

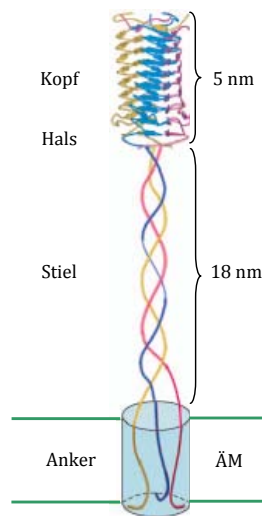


Abb. 1.1: „Lollipop“-Struktur von YadA. Trimere „Lollipop“-Struktur von YadA bestehend aus einer N-terminalen Kopfdomäne, gefolgt von einer Hals- und Stieldomäne und einem C-terminalen Membrananker. ÄM: Äußere Membran. Abbildung nach (Heesemann *et al.*, 2006).

1.1.3.3 Invasin A

Invasin ist ein auf der Zelloberfläche exponiertes Protein, das mit der N-terminalen Region in der äußeren Membran verankert ist. Der C-Terminus des *Y. pseudotuberculosis* Invasins besteht aus 5 globulären Domänen (D1-D5) (Hamburger *et al.*, 1999). Die Domänen D4 und D5 sind essentiell für die Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen (Isberg and Leong, 1990). Die Domänen D1, D2 und D3 bewirken die Oligomerisierung von Invasin auf der Zelloberfläche und führen zur verstärkten Invasivität (Dersch and Isberg, 1999). Dem Invasin von *Y. enterocolitica* fehlt die Domäne D2 (Young *et al.*, 1990), was ein möglicher Grund für die geringere Invasivität von *Y. enterocolitica* sein könnte. Das Invasin, kodiert von dem chromosomalen Gen *inv*, wird nur von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* synthetisiert (Isberg *et al.*, 1987; Miller and Falkow, 1988), nicht aber von *Y. pestis*, da das *inv* Gen durch die Insertion eines IS-Elements inaktiviert ist (Simonet *et al.*, 1996). Invasin vermittelt die Invasion in und die Translokation über die M-Zellen der intestinalen Mukosa (Isberg *et al.*, 1987; Marra and Isberg, 1997). Es bindet spezifisch an $\alpha\beta 1$ -Integrine und vermittelt die Aufnahme über den „zipper“-Mechanismus (Isberg and Leong, 1990). $\beta 1$ -Integrine werden auf der Dünndarmmukosa nur von M-Zellen exponiert, was die Spezifität von Yersinien für diesen Zelltyp erklärt (Clark *et al.*, 1998). Invasin vermittelt auch die Aufnahme von Yersinien in Makrophagen (Wiedemann *et al.*, 2001). Die Expression von *inv* erfolgt bei moderaten Temperaturen und wird bei 37°C durch das DNA-bindende Protein H-NS unterdrückt (Heroven *et al.*, 2004). Der Transkriptionsaktivator von *inv* bei moderaten Temperaturen ist RovA, der die Derepression durch die Verdrängung von H-NS bewirkt (Heroven *et al.*, 2004; Nagel *et al.*, 2001).

1.1.3.4 Enterotoxin Yst

Y. enterocolitica produziert das chromosomal kodierte hitzestabile Enterotoxin Yst. Es besteht aus einem 30 Aminosäuren großen Peptid, das bei Wachstumstemperaturen unter 30°C im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann (Feeley *et al.*, 1979). Yst ähnelt dem hitzestabilen Toxin STI von *Escherichia coli* (Delor *et al.*, 1990; Takao *et al.*, 1984; Takao *et al.*, 1985). Beide Toxine aktivieren die Guanylat-Zyklase vom Darmepithel, was zu einer Erhöhung von cGMP mit nachfolgender Aktivierung der Elektrolytsekretion im Darm führt (Rao *et al.*, 1979). Daraus entwickelte sich die Hypothese, das Yst bei der Induktion der Diarrhö beteiligt ist. Die Rolle als Virulenzfaktor wird durch die Arbeit von Delor *et al.* unterstützt, die zeigten, dass Yst nur von pathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen produziert wird und die Deletion von Yst zu attenuierten Yersiniose im Kaninchenmodell führt (Delor and Cornelis, 1992). *Y. pseudotuberculosis* produziert das Enterotoxin Yst nicht (Pai and Mors, 1978), was die nur schwach ausgeprägte Diarrhö bei *Y. pseudotuberculosis* erklären könnte.

1.1.3.5 Myf-Antigen und pH6-Antigen

Das Myf-Antigen von *Y. enterocolitica* und das homologe pH6-Antigen von *Y. pseudotuberculosis* (PsaA Protein) und *Y. pestis* sind chromosomal kodierte Virulenzfaktoren (Iriarte *et al.*, 1993; Lindler *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1996). Das Myf-Antigen bildet Fimbrienstrukturen aus MyfA (*mucoide Yersinia factor A*)-Untereinheiten auf der Zelloberfläche (Iriarte *et al.*, 1993). Der *myf* Locus beinhaltet neben dem *myfA* Gen, das die Fimbrienuntereinheit MyfA kodiert, noch zwei weitere Gene, *myfB* und *myfC*. Das Gen *myfB* kodiert ein putatives Chaperon der PapD Familie; *myfC* kodiert ein putatives Protein der äußeren Membran, das an „Usher“-Proteine für die Assemblierung von Fimbrien erinnert (Holmgren *et al.*, 1992; Iriarte *et al.*, 1993). Der Transport des Myf-Antigens an die Zelloberfläche erfolgt über den Chaperon/Usher-vermittelten Transport. Die Produktion des Myf-Antigens wie auch des pH6-Antigens von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, wird bei 37°C und einem niedrigen pH-Wert (pH 6) induziert (Iriarte *et al.*, 1993; Lindler *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1996). Das Myf-Antigen konnte bis jetzt nur bei humanpathogenen Serotypen von *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (Gierczynski *et al.*, 2002; Iriarte *et al.*, 1993; Toyos *et al.*, 1986). Das pH6-Antigen vermittelt, im Gegensatz zum Myf-Antigen, die Agglutination von Erythrozyten (Iriarte *et al.*, 1993; Lindler *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1996). Die genaue Funktion des Myf-Antigens in der Pathogenese ist noch unbekannt.

1.1.3.6 Das Membranprotein Ail (*Attachment invasion locus*)

Ein weiterer chromosomal kodierter Virulenzfaktor ist das Membranprotein Ail (*Attachment invasion locus*), das bis jetzt nur bei humanpathogenen *Yersinia* Stämmen nachgewiesen wurde (Miller *et al.*, 1989). Ail ist ein Protein von 17 kDa, das 8 membrandurchspannende β -Faltblätter und 4 extrazelluläre Schleifen in der äußeren Membran bildet (Miller *et al.*, 1990). Es vermittelt, unabhängig von Invasin, die Invasion in verschiedene Zelllinien (Miller and Falkow, 1988). Des Weiteren ist Ail neben YadA bei der Serumresistenz von Yersinien beteiligt, indem es das C4b-bindende Protein und den Komplementfaktor H bindet (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005; Kirjavainen *et al.*, 2008). Für die Pathogenität ist Ail nicht essentiell (Pepe *et al.*, 1995).

1.1.4 Diagnostik von *Yersinia* sp. Infektionen

1.1.4.1 Mikrobielle Diagnostik

Für die Isolierung von *Yersinia pestis* aus Blut- oder Biopsieproben können nicht-selektive Medien verwendet werden. Die mikrobielle Diagnostik enteropathogener Yersinien aus Stuhlproben erfolgt bei 25-30°C auf festen Selektivmedia, wie zum Beispiel Mac-Conkey Agar oder CIN-Ager (Antibiotika: Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin, (Schiemann, 1979). Die Inkubation erfolgt bei 25-30°C für 24-48 Stunden. Eine Kälteanreicherung bei 4°C in 0,15 M PBS (pH 7,4; Inkubation bis zu 3 Wochen) wird bei Stuhlproben von Patienten mit einer terminalen Ileitis oder mit postinfektiösen Erkrankungen verwendet, da in diesen Fällen die Anzahl der ausgeschiedenen Organismen gering ist (Bockemühl and Wong, 2003). Für die biochemische Differenzierung wird die „Bunte Reihe“ durchgeführt. Die Beweglichkeit im halbfesten Agar wird zur Unterscheidung der humanpathogenen Arten angewendet. *Y. pestis* ist stets unbeweglich. Im Gegensatz dazu sind *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bei 22-30°C beweglich und bei 37°C stets unbeweglich.

1.1.4.2 Molekularbiologische Diagnostik

Für die Routine Diagnostik von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind molekularbiologische Nachweismethoden normalerweise nicht notwendig. Sie können aber bei Patienten mit chronischen Infektion oder postinfektiösen Erkrankungen eine Rolle spielen. Für die Identifizierung von enteropathogenen Yersinien mittels PCR werden verschiedene Virulenzgene, wie *inv*, *ail*, *yst*, *yadA* und *virF* verwendet (Fenwick and Murray, 1991; Ibrahim *et al.*, 1997; Jourdan *et*

al., 2000; Nakajima *et al.*, 1992; Neubauer *et al.*, 2000). Für die molekularbiologische Identifizierung von *Y. pestis* mittels PCR werden die Plasmid-Gene *pla* (pPla) und *cafI* (pF) benutzt (Loiez *et al.*, 2003; Norkina *et al.*, 1994).

1.1.4.3 Serologische Diagnostik

Durch die Agglutinationsreaktion mit spezifischen Antikörpern gegen die O- und H-Antigene ist eine Serotypisierung von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* möglich (Bockemühl and Wong, 2003). Für den Nachweis erregerspezifischer Serumantikörper werden ELISA oder Immunoblots mit nativen oder rekombinanten *Yersinia outer proteins* (Yops) genutzt. Bei der Verwendung von spezifischen Antigenen entfallen im Gegensatz zur Verwendung von Gesamtzellextrakten störende kreuzreagierende Proteine. Ein weiterer Vorteil von ELISA und Immunoblots ist die getrennte Erfassung der Antikörperklassen IgG, IgA und IgM, wodurch die differenzialdiagnostische Abklärung Yersinien induzierter reaktiver Arthritiden unterstützt wird. Da die Yops von allen pathogenen Yersinien Arten produziert werden, ist keine Art- und Serotypunterscheidung möglich. Für die serologische Diagnostik einer *Y. pestis* Infektion dient das F1 Antigen als Zielprotein. Der Nachweis kann durch einen passiven Hämagglutinationstest oder mittels ELISA erfolgen (Bockemühl and Wong, 2003).

1.2 Die Gattung *Campylobacter*

Der Name *Campylobacter* leitet sich von dem griechischen Wort *kampylos* (deutsch: gekrümmt) ab und wurde von Sebald und Veron (1963) eingeführt. *Campylobacter* sind gram-negative, gekrümmte S-förmige oder spiralförmige Stäbchenbakterien. Unter schlechten Umweltbedingungen, Stressbedingungen oder bei älteren Kulturen können auch kokkoide Formen auftreten (Ng *et al.*, 1985). *Campylobacter* ssp. sind beweglich und besitzen ein einzelnes polares Flagellum an einem oder beiden Zellenden. Zusammen mit den Gattungen *Arcobacter*, *Dehalospirillum* und *Sulfurospirillum* bildet *Campylobacter* die Familie *Campylobacteraceae*, die zur Subdivision der ϵ -*Proteobacteria* gehören (Garrity *et al.*, 2004). Die Gattung *Campylobacter* umfasst 16 Arten und sechs Unterarten (On, 2001). *C. jejuni* und *C. coli* sind die wichtigsten humanpathogenen Arten (Lastovica and Skirrow, 2000) und zählen zusammen mit *C. lari* und *C. upsaliensis* zu den sogenannten thermophilen *Campylobacter* Arten, bei denen die optimale Wachstumstemperatur bei 42°C liegt. Die meisten *Campylobacter* Arten sind mikroaerophil und benötigen für optimales Wachstum eine Atmosphäre mit 5 % Sauerstoff (Park, 2002).

Campylobacter ssp. können nach verschiedenen Methoden in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. Die Biotypisierung nach Lior basiert auf der Produktion von Hydrogensulfid und der Hydrolyse von DNA und erlaubt die Einteilung von *C. jejuni* in vier Biotypen und die von *C. coli* in zwei Biotypen (Lior, 1984). Die Serotypisierung nach Lior beruht auf hitzelabilen Proteinoberflächenantigenen (H-Antigene) und ermöglicht durch Objektträgeragglutination mit absorbierten Antiseren eine Einteilung in 160 Serotypen (Lior *et al.*, 1982). Bei der Serotypisierung nach Penner werden die hitzestabilen Lipooligosaccharidantigene (O-Antigene) für die Einteilung in 65 Serotypen verwendet (Penner and Hennessy, 1980). Eine Einteilung nach den verschiedenen Lipooligosaccharid Genloci ermöglicht die Unterscheidung von 8 verschiedenen LOS Klassen (A-H) (Parker *et al.*, 2005).

Die erste Genomsequenz von *C. jejuni* wurde im Jahr 2000 veröffentlicht und besitzt eine Größe von ungefähr 1700 kbp und einen G+C Gehalt von 30,6 % (Parkhill *et al.*, 2000). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden vier weitere *C. jejuni* Genome publiziert (Fouts *et al.*, 2005; Hofreuter *et al.*, 2006; Pearson *et al.*, 2007; Poly *et al.*, 2007). Der Vergleich der genomischen Informationen zeigt einen erheblichen Unterschied der verschiedenen *C. jejuni* Isolate auf.

1.2.1 *Campylobacter* assoziierte Erkrankungen

Campylobacter Arten sind weltweit verbreitet. Sie sind häufig im Darmtrakt von warmblütigen Tieren zu finden, ohne dass diese Krankheitssymptome aufzeigen. Geflügel und wild lebende Vögel sind das am häufigsten vorkommende Reservoir. *C. jejuni* wurde aber auch in Schweinen, Rindern, Hunden und Katzen indiziert (Szewzyk *et al.*, 2000). Die Infektion des Menschen erfolgt meistens durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, wie zum Beispiel nicht durchgegartes Geflügel- und Rinderfleisch (Wilson *et al.*, 2008) oder Rohmilch (Altekruse *et al.*, 1999; RKI, 2000). Weitere mögliche Risikofaktoren sind eine Übertragung durch Haustiere, kontaminiertes Trinkwasser oder Auslandsreisen (Ekdahl and Andersson, 2004; Szewzyk *et al.*, 2000; Workman *et al.*, 2005). Janssen *et al.* gehen davon aus, dass ungefähr 50 % der Infektionen keinem bekannten Risikofaktor zugeordnet werden können (Janssen *et al.*, 2008). Die Infektionsdosis von *C. jejuni* ist sehr gering und kann bei nur 500 Bakterien liegen (Black *et al.*, 1988). Eine Infektion mit *C. jejuni* äußert sich als eine akute, selbstlimitierende gastrointestinale Erkrankung. In einzelnen Fällen treten postinfektiöse Folgeerkrankungen auf, wie zum Beispiel das Guillain-Barré-Syndrom (Paralyse der Extremitäten) oder die reaktive Arthritis. Die Infektion kann aber auch asymptomatisch verlaufen (Newell and Nachamkin, 1992).

1.2.1.1 Enterokolitis

Als Enterokolitis bezeichnet man eine Entzündung des Dünndarms und des Dickdarms. Die typischen klinischen Symptome einer *Campylobacter*-assoziierten Enterokolitis sind Bauchschmerzen, wässriger, gelegentlich blutiger Durchfall, Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit und abdominale Krämpfe, die bis zu fünf Tage anhalten (Skirrow and Blaser, 1992). Die klinischen Symptome der Campylobakteriose können durch zwei Mechanismen entstehen (Hu and Kopecko, 2000): Adhärenz und Toxinproduktion des Erregers führen zur wässrigen Diarrhö, Invasion und Vermehrung in der Mukosa führen zu einer inflammatorischen und blutigen Diarrhö. Die Inkubationszeit liegt zwischen einem bis sieben Tagen.

1.2.1.2 Guillain-Barré-Syndrom (GBS)

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) wurde erstmals 1916 von Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré und André Strohl als aufsteigende Lähmung beschrieben (Guillain *et al.*, 1916). Das GBS ist der Prototyp einer post-infektiösen Autoimmunerkrankung und ist durch eine Entzündung des peripheren Nervensystems charakterisiert, die zu einer neuromuskulären Lähmung führen kann. Der Beginn der Krankheit ist rasch und dauert bis zu vier Wochen (Asbury and Cornblath, 1990). Das GBS äußert sich durch Schwächegefühl und Sensibilitätsstörungen in den Armen und Beinen und endet oft in Lähmungserscheinungen. Bei ungefähr 20 % der betroffenen Patienten betrifft die Lähmung auch die Atemmuskulatur, was eine Intensivbehandlung mit künstlicher Beatmung zur Folge hat. Während einer bis zu zwei Wochen andauernden Plateauphase stabilisieren sich die Symptome. Bis zu 20 % der Patienten zeigen ein Jahr nach dem Beginn der Krankheit noch Schwerbehinderungen (Rees *et al.*, 1998). Die Mortalität liegt zwischen 5-10 % (Kuwabara, 2004). Eine Therapie, die entweder aus einer Plasmapherese oder einer intravenösen Immunglobulintherapie besteht, besitzt keine immunologische Spezifität und kann die Symptome oft nur lindern (Willison, 2005). GBS wird in unterschiedliche Subtypen unterteilt (Hughes and Cornblath, 2005). Die akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie AIDP (*acute inflammatory demyelinating polyneuropathy*) entsteht wahrscheinlich durch Makrophagen vermittelte Demyelinisierung der Axone (Hafer-Macko *et al.*, 1996b). Im Gegensatz dazu wird bei der akuten motorischen axonalen Neuropathie AMAN (*acute motor axonal neuropathy*) und bei der akuten motorischen und sensorischen axonalen Neuropathie AMSAN (*acute motor and sensory axonal neuropathy*) die Axonmembran geschädigt (Hafer-Macko *et al.*, 1996a). Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine vorhergehende Infektion der Atemwege oder des Gastrointestinaltrakts mit dem Ausbruch der

Krankheit assoziiert ist (Govoni and Granieri, 2001), wobei *C. jejuni* bei 30-40 % der GBS Patienten als Auslöser identifiziert werden konnte (Schwerer, 2002). Die Pathogenese der *Campylobacter*-assoziierten GBS ist komplex und beinhaltet sowohl bakterielle Virulenzfaktoren als auch Wirtsfaktoren. Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Lipooligosaccharid (LOS) Strukturen von bestimmten *C. jejuni* Serotypen mit den Zuckerresten der Ganglioside von Nervenzellen (molekulares Mimikry) kann zur Bindung an Ganglioside der Nervenzellen führen und somit eine Schädigung des Axons auslösen (Ang *et al.*, 2004; Yuki *et al.*, 2004). Bei vielen GBS Patienten konnten spezifische Antikörper gegen Ganglioside nachgewiesen werden (Schwerer, 2002). Bestimmte LOS Biosynthese Loci von *C. jejuni* sind für die Synthese der Gangliosid nachahmenden Strukturen verantwortlich (Godschalk *et al.*, 2004). Molekulare Mimikry der Gangliosid Strukturen ist ein entscheidender, aber nicht der einzige Faktor bei der Ausbildung des GBS, da auch Wirtsfaktoren maßgeblich daran beteiligt sind. Eine Subvariante des GBS ist das Miller-Fisher-Syndrom (MFS), bei dem nur die extraokularen Nerven betroffen sind. Das MFS ist durch die Triade Ataxie, Areflexie und Ophthalmoplegie charakterisiert ist (FISHER, 1956).

1.2.1.3 *Campylobacter jejuni* assoziierte Reaktive Arthritis

Die reaktive Arthritis (ReA) stellt sich histopathologisch als Synovitis/Synovialitis der Gelenke ohne Beteiligung der Gelenkknorpel dar und wird zum klinischen Spektrum der Spondylarthropathien gezählt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass 2-7 % der *Campylobacter*-Patienten eine ReA entwickeln (Hannu *et al.*, 2002; Kosunen *et al.*, 1981; Leirisalo-Repo *et al.*, 2003; Lochter and Krogh, 2002), wobei die Symptome ca. 14 Tage nach der Infektion auftreten (Janssen *et al.*, 2008). In einer Studie von Pacheco-Tena konnte bei Patienten mit juveniler Spondylarthropathie DNA von *C. jejuni* in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (Pacheco-Tena *et al.*, 2001). Eine Assoziation von HLA-B27 mit ReA nach einer *Campylobacter* Infektion besteht nach Schiellerup *et al.* (2008) nicht; dagegen besteht ein positiver Zusammenhang zwischen HLA-B27 und ReA nach einer *Salmonella*-, *Shigella*- und *Yersinia*- Infektion (Schiellerup *et al.*, 2008).

1.2.2 Epidemiologie von *Campylobacter* sp. Infektionen

Im Jahr 2007 wurden dem Robert Koch Institut 66.107 durch *Campylobacter*-Arten verursachte Gastroenteritiden gemeldet, wobei von einer erheblichen Dunkelziffer (Fälle ohne Meldungen bis zu 10 fach) auszugehen ist. Die Gesamtinzidenz lag bei 80,3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Bei den identifizierten Erregern handelte es sich bei 71,1 % um *Campylobacter jejuni*, bei 20,8 % um *C. coli/jejuni* (nicht differenziert), bei 6,3 % um *C. coli* und bei 1 % um *C. lari*. Unter den übrigen 0,9

% wurden 0,5 % als *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. butzleri*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. upsaliensis* oder *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* spezifiziert, für 0,4 % wurde unter Spezies „andere/sonstige“ angegeben (Robert Koch Institut, 2007). Der Labordiagnostischer Nachweis einer *Campylobacter* Infektion ist gemäß § 7 IfSG meldepflichtig. In den Vereinigten Staaten von Amerika lag die Inzidenz der Campylobakteriose im Jahr 2005 bei 12,72 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (Centers of Disease Control and Prevention, 2006). Diese geringe Inzidenz im Vergleich zu Europe weist wahrscheinlich auf eine unzuverlässige Diagnostik hin. In der EU lag die Inzidenz bei 51,6 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner, wobei die Anzahl der gemeldeten Fälle sehr variierten (< 0,1-302,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) (EFSA, 2006). Bakteriämie tritt bei weniger als 1 % der Patienten mit einer *Campylobacter* Infektion auf und betrifft v. a. immunsupprimierte oder sehr junge bzw. sehr alte Patienten (Allos, 2001). Weniger als ein Campylobakteriose Patient von 1000 entwickelt das Guillain-Barré-Syndrom (Allos, 1997). Die weltweite Inzidenz des Guillain-Barré-Syndroms liegt bei 1-2 Erkrankungen pro 100.000 Menschen (Govoni and Granieri, 2001; Hughes and Rees, 1997). In den Entwicklungsländern betrifft eine *Campylobacter* Infektion v. a. Kleinkinder und kommt bei Erwachsenen kaum vor. Man geht von einer geschätzten Inzidenz von 40.000 Infektionen pro 100.000 Kleinkindern < 5 Jahre aus (Calva *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1988; Taylor, 1992) und der Anteil von *Campylobacter* sp. in Stuhlproben von Kleinkindern mit Durchfall liegt zwischen 5 und 18 % (Coker *et al.*, 2002).

1.2.3 Pathogenese der *C. jejuni* Infektion

Nach der oralen Aufnahme von *C. jejuni* gelangen diese nach der Passage durch den Magen in den Darm, binden dort an den Mukus oder die intestinalen Zellen und replizieren sich. Dies kann entweder zu einer asymptomatischen Kolonisierung oder zu Durchfallsymptomen führen (Janssen *et al.*, 2008). Beweglichkeit, Chemotaxis und die S-förmige Morphologie sind wichtige Pathogenitätsfaktoren, die es *Campylobacter* ermöglichen den Mukus zu durchdringen und mit den darunterliegenden Epithelzellen zu interagieren (Yao *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 1997). Eine erste Interaktion ist zwischen dem Flagellum von *Campylobacter* und der Wirtszelle zu beobachten (Hu *et al.*, 2008). Die Adhärenz an Epithelzellen erfolgt über Adhäsine, wie zum Beispiel Lipoprotein JlpA, Adhäsine CadF (*Campylobacter* *adhesion to fibronectin*), das bifunktionale Protein Peb1 und der Autotransporter CapA (Ashgar *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2001; Konkel *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1998). Auch die variable Polysaccharidkapsel ist wichtig für die Adhärenz und spielt bei der Serumresistenz und der Kolonisierung im Tiermodell eine Rolle (Bacon *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus der anschließenden Invasion ist noch nicht vollständig geklärt. *C. jejuni* besitzt kein virulenzassoziiertes

Typ III Sekretionssystem wie Yersinien und Salmonellen (Parkhill *et al.*, 2000). Stattdessen gibt es Hinweise, dass das Typ III Sekretionssystem des Flagellenapparates virulenzassoziierte Proteine sekretieren könnte (Konkel *et al.*, 2004). Die sogenannten Cia-Proteine (*Campylobacter invasions antigens*) werden Kontakt- oder Stimulus-abhängig durch das Flagellen Filament sekretiert und bewirken die Invasion von einigen *C. jejuni* Stämmen (Konkel *et al.*, 1999b; Konkel *et al.*, 2004). Auch das dem Flagellin homologe Protein FlaC wird durch den Flagellenapparat sekretiert und spielt bei der Invasion von *C. jejuni* eine Rolle (Song *et al.*, 2004). Der Mechanismus der Invasion und die Invasionsrate sind Stamm- und Wirtzell-abhängig. Am Invasionsmechanismus ist Mikrotubulin (MT) und/oder Aktinfilamente (AF) beteiligt (Biswas *et al.*, 2003; Hu and Kopecko, 1999; Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007a; Oelschlaeger *et al.*, 1993). Der AF-vermittelten Invasion geht eine Aktivierung von Cdc42 und Rac1 voraus und ist abhängig vom Fibronectin-bindenden Protein CadF (Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007a). Nach MT-abhängiger Invasion befindet sich *C. jejuni* in sogenannten *Campylobacter containing vacuoles* (CCV), die mit Mikrotubulin und Dynein assoziiert sind und sich zum perinuklearen Bereich bewegen (Hu and Kopecko, 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass *C. jejuni* in CCV in intestinalen Epithelzellen überlebt, indem es die Fusion mit Lysosomen verhindert, und dass die MT-abhängige Invasion für diese Überlebensstrategie notwendig ist, da die Lysosomenfusion in Makrophagen (keine MT-Assoziation) nicht verhindert wird (Watson and Galan, 2008). Im Folgenden werden die potentiellen Virulenzfaktoren JlpA, CadF, CiaB, FlaC und Cj1496c genauer erläutert, da diese im Zuge der Arbeit näher analysiert werden sollten.

1.2.3.1 JlpA

Das Gen *jlpA* (Cj0983) kodiert ein Lipoprotein von 42 kDa, das über den N-Terminus und den C-Terminus in der äußeren Membran von *C. jejuni* verankert ist (Jin *et al.*, 2001). Während des Wachstums in Flüssigmedium wird JlpA in den Kulturüberstand abgegeben. JlpA ist spezifisch für *C. jejuni* und konnte bei keiner anderen *Campylobacter* Art nachgewiesen werden und zeigt auch keine relevanten Homologien zu anderen Proteinen. Des Weiteren konnten Jin *et al.* zeigen, dass JlpA eine Rolle bei der Adhärenz an Epithelzellen spielt. JlpA interagiert mit zelloberflächenexponierten Hsp90 α von Epithelzellen und führt zur Aktivierung von NF- κ B und p38 MAP Kinasen, die eine wichtige Rolle in der proinflammatorischen Immunantwort der Wirtszelle spielen (Jin *et al.*, 2003). Die Expression von *jlpA* und damit auch die Adhärenz von *C. jejuni* wird durch MUC2, ein wichtiger Bestandteil der gastrointestinalen Schleimhaut, erhöht (Tu *et al.*, 2008). Dagegen hat JlpA keinen Einfluss auf die Invasion von Epithelzellen (Jin *et al.*, 2001; van Alphen *et al.*, 2008).

1.2.3.2 CadF

CadF (Cj1478c) ist ein konserviertes, zelloberflächenexponiertes Protein von 37 kDa, das spezifisch an Fibronectin bindet und Adhärenz an intestinale Zellen vermittelt (Konkel *et al.*, 1997). Fibronectin ist ein großes, multifunktionales extrazelluläres Matrixprotein, das unter anderen in der Adhäsion von Säugerzellen und bei der Anhaftung von pathogenen Bakterien an die Wirtszelle eine Rolle spielt. Mehrere *in vitro* Studien konnten zeigen, dass CadF für die maximale Bindung und die anschließende Invasion von *C. jejuni* an bzw. in intestinale Epithelzellen notwendig ist (Konkel *et al.*, 1999a;Monteville *et al.*, 2003;Monteville and Konkel, 2002). CadF spielt auch *in vivo* eine Rolle, da eine *cadF* Nullmutante den Intestinaltrakt von Hühnern nicht mehr kolonisieren kann (Monteville *et al.*, 2003;Ziprin *et al.*, 1999). CadF von *C. coli* besitzt eine 13 AS große Insertion im mittleren Proteinabschnitt. Dies könnte der Grund für die geringere Invasion von *C. coli* im Vergleich zu *C. jejuni* sein (Krause-Gruszczynska *et al.*, 2007b). Somit lässt sich vermuten, dass CadF bei der Kolonisierung des Menschen und bei der Entstehung der Enteritis eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor spielt und als diagnostisches Antigen eingesetzt werden kann.

1.2.3.3 CiaB

CiaB (Cj0914c) ist ein Protein von 73 kDa, das *in vitro* in das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen transloziert wird und für die Invasion von *C. jejuni* notwendig ist (Konkel *et al.*, 1999b). Die Sekretion von weiteren sieben Cia Proteinen (CiaA, CiaC-CiaH) ist abhängig von CiaB. Wirtszellkomponenten, Gallensalze und Rinderserumalbumin dienen als Signal für die Induktion der Synthese und Sekretion der Cia Proteine (Konkel *et al.*, 1999b;Konkel *et al.*, 2004;Rivera-Amill *et al.*, 2001).

1.2.3.4 FlaC

FlaC (Cj0720c) ist ein konserviertes Protein von *C. jejuni* und homologe Sequenzen von *flaC* sind in *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* zu finden (Song *et al.*, 2004). FlaC weist Sequenzhomologien zu den N- und C-terminalen Regionen der Flagelline FlaA und FlaB auf, es ist aber nicht für den Aufbau eines funktionellen Flagellums oder für die Beweglichkeit notwendig. FlaC wird wahrscheinlich über das Flagellum sekretiert und die sezernierte Form besitzt, möglicherweise auf Grund von posttranslationalen Glykosylierungen, eine Größe von 27 kDa, die zytoplasmatische Form ist 26 kDa groß. FlaC bindet *in vitro* an intestinale Epithelzellen und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellinvasion (Song *et al.*, 2004) und stellt ein potentiell wichtiges Antigen dar.

1.2.3.5 Cj1496c

Cj1496c kodiert ein periplasmatisches Glykoprotein, das eine Rolle bei der Adhärenz und Invasion von *C. jejuni in vitro* spielt (Kakuda and DiRita, 2006). *In vivo* konnte bei Cj1496c Deletionsmutanten eine verminderte Kolonisierung von Küken festgestellt werden. Die Cj1496c Deletionsmutante weist im Vergleich zum Wildtyp einen extrem schwärmenden Phänotyp auf, was möglicherweise auf eine vermehrte Phosphorylierung des Chemotaxisproteins CheY zurückzuführen ist (Kakuda and DiRita, 2006). Die Glykosylierung scheint keinen Einfluss auf die Stabilität und die Funktion des Proteins zu haben. Cj1496c könnte aufgrund der Funktion ein potentielles Antigen sein.

1.2.4 Glykosylierungssysteme

Die posttranslationale Glykosylierung von Proteinen ist ein typischer Prozess in Eukaryoten, nicht aber bei Prokaryoten. Besondere Aufmerksamkeit hat deshalb das N- und O-Glykosylierungssystem von *C. jejuni* erlangt.

Die O-Glykosylierung betrifft die posttranslationale Modifikation des Flagellins und wurde 1989 erstmals beobachtet (Logan *et al.*, 1989). Als Zucker konnte Pseudaminsäure identifiziert werden, ein der Sialinsäure ähnlicher Zucker mit 9 Kohlenstoffen (Logan *et al.*, 2002; Thibault *et al.*, 2001). Die Glykosylierung des Flagellins ist ausschlaggebend für die Flagellenassemblierung. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen der Pseudaminsäure-Biosynthese die Mobilität aufhebt, wobei nicht glykosylierte Flagellin intrazellulär akkumuliert (Goon *et al.*, 2003; Thibault *et al.*, 2001). Mindestens 19 Serin und Threonin Reste können in den Flagellinen FlaA und FlaB von *Campylobacter* glykosyliert werden. Die O-Glykosylierung ist unabhängig von einem Sequenzmotiv und wird wahrscheinlich durch die Tertiärstruktur bestimmt (Thibault *et al.*, 2001). Der Locus der flagellaren Glykosylierung umfasst ungefähr 50 Gene (Parkhill *et al.*, 2000) und liegt im selben Gencluster wie die Flagellin-Untereinheiten *flaA* und *flaB*. Die genetische Organisation des O-Glykosylierungslokus ist sehr variable (Logan *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu ist die N-Glykosylierungs-Insel bzw. der sogenannte Protein-Glykosylierungs (*pgl*)-Locus hoch konserviert (Szymanski *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999). Als Zucker wurde ein Heptasaccharid bestehend aus einer linearen Kette aus einem Bacillosamin, 5 N-Acetyl-Galaktosaminen und einer Glukose Verkettung identifiziert (Young *et al.*, 2002). Das Schlüsselenzym der N-Glykosylierung ist die Oligosaccharyltransferase PglB (Wacker *et al.*, 2002). Die Synthese des Heptasaccharids findet wahrscheinlich im Zytoplasma gekoppelt an einen Lipidträger statt, der anschließend über die Zytoplasmamembran ins Periplasma transloziert wird, wo der Transfer des Zuckerrestes auf die Zielproteine stattfindet. Dies setzt voraus, dass Prä-

Glykoproteine sekretiert werden müssen. Mehr als 30 potentielle Glykoproteine wurden in *C. jejuni* identifiziert (Young *et al.*, 2002). Die Anheftung des Heptasaccharids an die Proteine geschieht über Asparaginreste, die in dem Sequenzmotif Asn-Xaa-Ser/Thr liegen (Young *et al.*, 2002).

Über die genaue Funktion der Glykosylierung von Proteinen bei *C. jejuni* ist noch nicht viel bekannt. Die O-Glykosylierung des Flagellins resultiert in antigener Variation (Harris *et al.*, 1987). Die N-Glykosylierung spielt eine Rolle *in vitro* bei der Anheftung und Invasion in eukaryotische Zellen und bei der Kolonisierung des Intestinaltraktes von Mäusen (Szymanski *et al.*, 2002). Wahrscheinlich bewirkt eine N-Glykosylierung von Proteinen auch Schutz vor proteolytischer Spaltung, verstärkt die Proteinstabilität und Löslichkeit und dient als Signal (Helenius and Aebi, 2001; Herrmann *et al.*, 1996). Die Glykosylierung von Proteinen kann auch für die Immunreaktivität verantwortlich sein (Szymanski *et al.*, 1999).

1.2.5 Proteinsekretion bei Gram-negativen Bakterien

Gram-negative Bakterien besitzen eine Reihe von Sekretionssystemen, die den Transport von Proteinen über die innere und äußere Membran ermöglichen. Das Sec-System und das Twin-Arginin-Translokations (TAT)-System sind für den Export von Proteinen über die Zytoplasmamembran in das Periplasma zuständig. Die zu transportierenden Proteine besitzen in beiden Fällen eine N-terminale Signalsequenz (Berks *et al.*, 2005; Thanassi and Hultgren, 2000). Die Systeme unterscheiden sich aber dahingegen, dass das TAT-System gefaltete Proteine mit Co-Faktoren transportieren kann und das Sec-System nur ungefaltete Proteine exportiert (Palmer *et al.*, 2005; Thanassi and Hultgren, 2000). Bei dem Typ-V-Sekretionssystem (T5SS), auch Autotransporter-System genannt, werden Proteine Sec-abhängig über die Zytoplasmamembran transportiert. Im Anschluss wird die N-terminale Signalsequenz abgespaltet und der C-terminale Bereich des Proteins inseriert in die äußere Membran, indem es einen Sekretionskanal aus β -Faltblättern ausbildet. Die sogenannte *passenger* Domäne wird durch diesen Kanal an die Zelloberfläche geschleust und durch Proteolyse freigesetzt (Dautin and Bernstein, 2007). Das Typ-II-Sekretionssystem (T2SS) vermittelt den Transport von extrazellulären Enzymen und Toxinen. Der Transport über die Zytoplasmamembran ist Sec-abhängig. Über die äußere Membran wird das Protein über einen multimeren Komplex aus Sekretin-Proteinen und weiteren 10-15 Proteinen, von denen die Funktion meist noch unbekannt ist, in die extrazelluläre Umgebung geschleust (Russel, 1998; Thanassi and Hultgren, 2000). Das Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) ist mit dem VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens* homolog und kann sowohl Proteine als auch DNA transportieren (Burns, 1999). Einige Substrate benötigen das Sec-System, andere werden direkt aus dem Zytosol in das extrazelluläre

Milieu sekretiert (Cascales and Christie, 2003; Thanassi and Hultgren, 2000). Das Typ-I-Sekretionssystem (T1SS) ist Sec-unabhängig und Proteine werden direkt aus dem Zytosol über die Zytoplasmamembran und die äußere Membran transportiert. Das T1SS besteht aus nur 3 Untereinheiten und die zu transportierenden Proteine besitzen ein C-terminales Sekretionssignal (Binet *et al.*, 1997). Das Sec-unabhängige Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) erinnert an eine molekulare Spritze, die Proteine in eukaryotische Zellen injizieren kann. Die Sekretion der Yops von *Yersinia* stellt den Prototyp des T3SS dar (Cornelis, 2006). Das T3SS zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Flagellum, bei dem auch die Sekretion von nicht-flagellaren Proteinen gezeigt werden konnte und deshalb auch flagellares Typ-III-Sekretionssystem (Fla-T3SS) genannt wird (Konkel *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Young *et al.*, 1999). Ein weiterer Mechanismus für die Freisetzung von Proteinen oder anderen Zellbestandteilen ist die Bildung von Membranvesikeln der äußeren Membran (*outer membrane vesicles* OMV). OMVs, auch Typ-VI-Sekretionssystem genannt, sind Proteoliposomen, die aus Lipiden und Proteinen der äußeren Membran, Lipopolysacchariden und periplasmatischen Komponenten bestehen (Beveridge, 1999). Bis jetzt konnten diverse Gram-negative Bakterienarten identifiziert werden, die diese Vesikel während der Wachstumsphase „abschnüren“, wie zum Beispiel *Neisseria meningitidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori* und *Borrelia burgdorferi* (Beveridge, 1999; Devoe and Gilchrist, 1973; Horstman and Kuehn, 2000; Kadurugamuwa and Beveridge, 1999; Keenan *et al.*, 2000; Shoberg and Thomas, 1993; Wai *et al.*, 1995). Die Vesikel können an verschiedenen Virulenzmechanismen beteiligt sein, wie zum Beispiel am Transport von Toxinen und periplasmatischen Enzymen, DNA-Aufnahme und -Transport und Modulation des Immunsystems (Ciofu *et al.*, 2000; Fiocca *et al.*, 1999; Horstman and Kuehn, 2000; Kadurugamuwa and Beveridge, 1995; Kahn *et al.*, 1982; Kolling and Matthews, 1999). Die Vesikel können mit Membranen der Wirtszelle oder von Bakterien fusionieren und somit die aktiven Virulenzfaktoren in die Zielzelle freisetzen (Fiocca *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2002).

Die Sequenzierung des Genoms von *C. jejuni* NCTC 11168 ergab, dass *C. jejuni* das Sec-abhängige Proteinexportsystem, das TAT-System und das *signal recognition particle* (SRP)-System besitzt (Parkhill *et al.*, 2000). Es konnte des Weiteren ein Fla-T3SS aber kein Typ-IV-Sekretionssystem nachgewiesen werden (Parkhill *et al.*, 2000). Komponenten eines Typ II-Sekretionssystem, die essentiell für die natürliche Transformation sind, sind vorhanden (Wiesner *et al.*, 2003). Ein homologes Protein von TpsB des *two-partner* Sekretionssystems (Tps) konnte in einigen *Campylobacter* Arten (*C. jejuni* NCTC11168, *C. coli* RM2228 und *C. lari* RM2100) detektiert werden (Parkhill *et al.*, 2000). Die Produktion von Vesikeln der äußeren Membran stellt einen weiteren Mechanismus der Proteinfreisetzung von *C. jejuni* dar (Blaser *et al.*, 1983; Logan and Trust,

1982). In Abbildung 1.2 sind die Möglichkeiten, wie *C. jejuni* Proteine freisetzen kann dargestellt. Vergleichend ist das T3SS von *Y. enterocolitica* mit abgebildet.

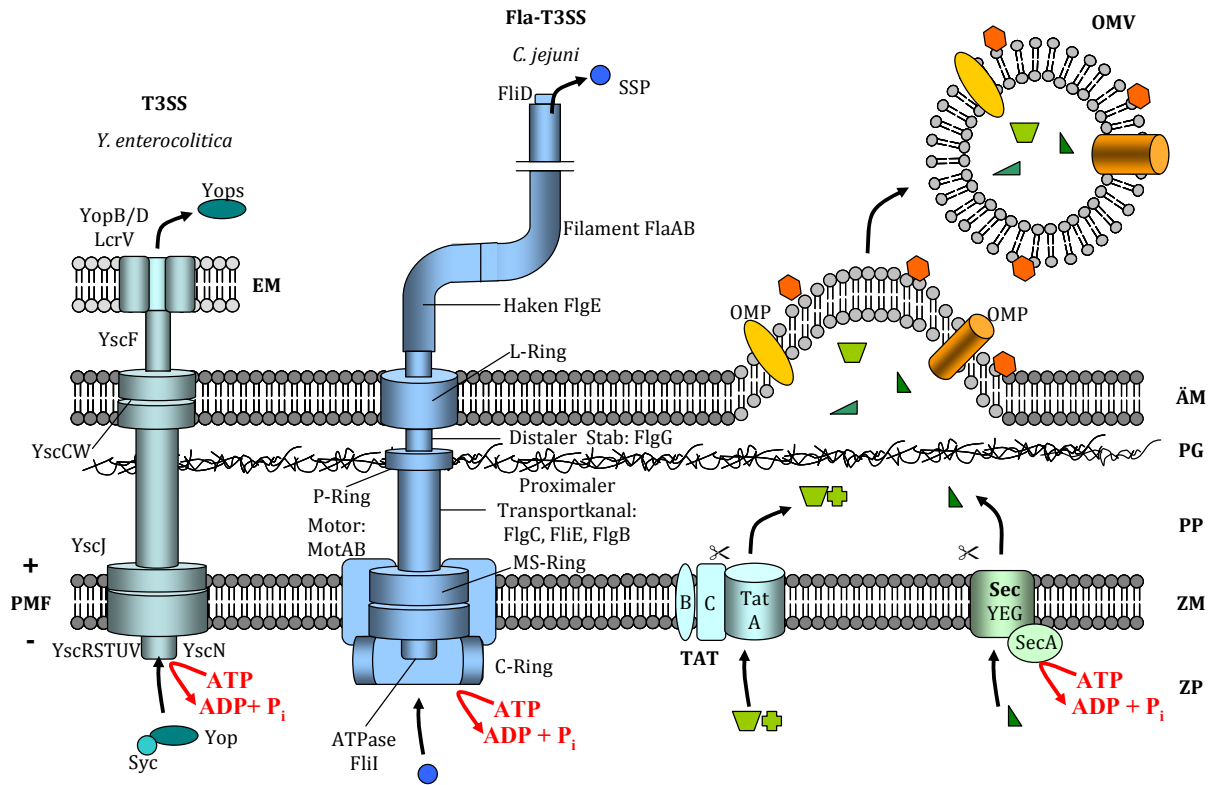


Abb. 1.2: Freisetzungsmechanismen von Proteinen bei *C. jejuni*. Schematische Darstellung des Fla-T3SS von *C. jejuni* im Vergleich zum T3SS von *Y. enterocolitica*. Proteine werden durch das Fla-T3SS direkt aus dem Zytoplasma (ZP) in den Kulturüberstand freigesetzt. Das TAT- und das Sec-Sekretionssystem transportieren Proteine aus dem ZP über die Zytoplasmamembran (ZM) in das Periplasma (PP). Von dort können Proteine über Vesikel der äußeren Membran (ÄM) freigesetzt werden. OMP: *outer membrane protein*; PG: Peptidoglykan; EM: eukaryotische Membran. PMF: *Proton motive force*.

1.2.6 Immunantwort

1.2.6.1 Angeborene Immunantwort

Die ersten Hindernisse nach der oralen Aufnahme von *Campylobacter* sind die saure Umgebung des Magens und der Mukus des Gastrointestinaltrakts. Nach deren Passage interagiert *Campylobacter* mit den darunterliegenden intestinalen Epithelzellen und aktiviert die Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) (Chen *et al.*, 2006; Hickey *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2008; Zilbauer *et al.*, 2007). Dies führt zur Rekrutierung von dendritischen Zellen, Makrophagen

und Neutrophilen, die mit *C. jejuni* interagieren und eine proinflammatorischen Antwort mit Zytokin-Ausschüttung bewirken (Johanesen and Dwinell, 2006; Jones *et al.*, 2003; Mellits *et al.*, 2002). Über die Interaktion von *C. jejuni* mit Monozyten und Makrophagen gibt es geteilte Ansichten. Zum einen konnte gezeigt werden, dass *C. jejuni* in Monozyten für bis zu sieben Tage überleben kann und Apoptose der Monozyten auslöst (Hickey *et al.*, 2005; Kiehlbauch *et al.*, 1985). Wassenaar *et al.* gehen aber aufgrund des geringem Vorkommens von Bakteriämien davon aus, dass *C. jejuni* normalerweise nicht in Makrophagen überleben kann, und konnten zeigen, dass es nur wenige Makrophagenpopulationen gibt, die die phagozytierten Bakterien nicht eliminieren können (Wassenaar *et al.*, 1997). Intestinale Epithelzellen besitzen eine Reihe von sogenannten *pattern recognition* Rezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Bakterien spielen und die NF- κ B abhängige proinflammatorische Immunantwort stimulieren. Toll-like Rezeptoren (TLR) sind für die Erkennung von konservierten bakteriellen Strukturen zuständig und NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) Proteine erfassen als intrazelluläre Rezeptoren konservierte Strukturen der Bakterienzellwand von invasiven Pathogenen. *Campylobacter* umgeht die Flagellin-vermittelte Aktivierung von TLR5 durch eine veränderte Primärstruktur des Flagellins (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Auch TLR9, welcher der Erkennung von CpG Dinukleotiden dient, wird auf Grund des AT-reichen Genoms nicht effizient stimuliert (Andersen-Nissen *et al.*, 2005; Dalpke *et al.*, 2006). TLRs scheinen aber dennoch eine wichtige Rolle bei der Eindämmung einer *C. jejuni* Infektion zu spielen. *MyD88*^{-/-} Mäuse sind defizient in den murinen TLR Signalwegen und werden im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen stark mit *C. jejuni* kolonisiert (Watson *et al.*, 2007). Kürzlich wurde NOD1 als wichtiger Rezeptor bei der Aktivierung des Immunsystems durch *C. jejuni* identifiziert (Zilbauer *et al.*, 2007).

1.2.6.2 Spezifische Immunantwort

Die meisten Campylobakteriose Patienten entwickeln eine humorale Immunantwort. Zirkulierende Antikörper gegen *Campylobacter* Antigene sind sechs bis sieben Tage nach dem Beginn der Krankheit nachweisbar (Newell and Nachamkin, 1992). Der spezifische Serum IgA Titer erreicht nach sieben bis zehn Tagen den Höhepunkt, nimmt anschließend schnell wieder ab und korreliert mit einer akuten Infektion. Sekretorisches IgA (sIgA) kann im Dünndarmsaft nachgewiesen werden (Black *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu erreicht der spezifische Serum IgG Titer drei bis vier Wochen nach dem Beginn der Symptome sein Maximum und ist noch bis zu einem Jahr nachweisbar (Cawthraw *et al.*, 2002; Strid *et al.*, 2001). In Studien mit Freiwilligen wurde gezeigt, dass eine *Campylobacter* Infektion eine kurzzeitige Immunität gegen homologe Stämme bewirkt (Black *et al.*,

1988). Die Bedeutung der humoralen Immunantwort wird auch dadurch ersichtlich, dass Patienten mit primären Immundefekten, wie der Agammaglobulinämie, häufiger chronische Infektion mit Bakteriämie und Reaktiver Arthritis entwickeln (Arai *et al.*, 2007;Freeman and Holland, 2007). Antikörper spielen auch zusammen mit dem Komplementsystem eine wichtige Rolle bei der Opsonierung von *Campylobacter* und der anschließenden Phagozytose durch Neutrophile (Bernatowska *et al.*, 1989). In Entwicklungsländern erwerben Kleinkinder bei der Erstinfektion eine gewisse Immunität gegen erneute symptomatische Infektionen, aber keinen Schutz gegen erneute Kolonisierungen mit *Campylobacter* sp. (Taylor, 1992).

1.2.7 Diagnostik von *Campylobacter* sp. Infektionen

1.2.7.1 Mikrobielle Diagnostik

Für die mikrobielle Diagnostik werden Stuhlkulturen auf Selektiv-Agarplatten angelegt, die im Anschluss unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C oder 42°C für 48 Stunden inkubiert werden. Ein Anreicherungsmedium ist nicht notwendig, da infizierte Patienten normalerweise 10^6 bis 10^9 *C. jejuni* Bakterien pro Gramm Stuhl ausscheiden (Blaser, 1999). Zur Unterdrückung der Begleitflora werden Antibiotika in verschiedenen Kombinationen dem Selektivmedium zugesetzt, wie zum Beispiel Cefoperazon, Cycloheximid, Trimethoprim, Rifampicin, Vancomycin und Polymyxin B. Im Anschluss der Isolierung können biochemische Tests durchgeführt werden, um die Art der isolierten *Campylobacter* Gattung zu bestimmen. So lassen sich *C. jejuni* und *C. coli* anhand der Hippurat Hydrolyse differenzieren, die bei *C. jejuni* positiv ist. Aber es gibt auch hippuratnegative *C. jejuni*-Stämme, die somit fälschlicherweise als *C. coli* identifiziert werden (Totten *et al.*, 1987). Ein weiterer phänotypischer Marker ist die Empfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure. Nahezu alle *C. coli* Stämme weisen eine Resistenz gegen hohe Konzentrationen von Nalidixinsäure auf, wohingegen die meisten *C. jejuni* Stämme empfindlich reagieren (Lior, 1984). Aber die stetige Zunahme der quinolonresistenten *C. jejuni* Stämme limitiert die Anwendung der Nalidixinsäureresistenz als diagnostischen Marker (Endtz *et al.*, 1990;Gootz and Martin, 1991).

1.2.7.2 Molekularbiologische Diagnostik

Aufgrund der schwierigen und langwierigen Anzuchtbedingungen von *Campylobacter* ssp. werden neue direkte Nachweismethoden entwickelt. Es gibt mehrere PCR-basierte Ansätze für den direkten Nachweis von *Campylobacter* ssp. in Stuhlproben. Ein bewährtes Zielgen ist *ceuE* (Gonzalez *et al.*,

1997), für das auch eine Multiplex PCR entwickelt wurde, die zusätzlich die Differenzierung zwischen *C. jejuni* und *C. coli* zulässt (Houng *et al.*, 2001). Weitere Zielgene sind *flaA* und *flaB* (Oyofe *et al.*, 1992; Waegel and Nachamkin, 1996), *cadF* (Konkel *et al.*, 1999a) und das 16 sRNA Gen (Giesendorf and Quint, 1995). Persson und Olsen entwickelten eine Multiplex PCR für die Differenzierung von *C. jejuni* (*hipO*) und *C. coli* (*asp*) mit interner Positivkontrolle (16S rDNA Gen) (Persson and Olsen, 2005). Da es auf Grund von inhibierenden Faktoren in den Stuhlproben zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann (Iijima *et al.*, 2004; Wilson, 1997) und die Nachweisgrenze mit 10^5 *Campylobacter* Zellen pro Milliliter Stuhl über der der Stuhlkultur liegt (Persson and Olsen, 2005), sind weitere Entwicklungen notwendig, bevor die Tests standardisiert angewendet werden können.

1.2.7.3 Serologische Tests zur *Campylobacter*-Differenzierung

In Latexagglutination Tests werden spezifische polyklonale Antikörper verwendet, um Proteine der äußeren Membran oder antigene Epitope des Flagellums zu detektieren. Als Probe wird eine Bakteriensuspension eingesetzt und mit dem Latexreagenz gemischt. Nach kurzer Inkubationszeit zeigt eine Agglutination ein positives Ergebnis an. Dieser Test dient häufig zur Bestätigung der mikrobiellen Diagnostik auf Gattungsniveau (Nachamkin and Barbagallo, 1990). Eine Artunterscheidung ist nicht möglich. Der Test ist kommerziell erhältlich.

Ein kulturunabhängiger, direkter Nachweis von *Campylobacter* in Stuhlproben ermöglicht ein Enzym Immunoassay (EIA).

1.2.7.4 Serologische Diagnostik

Serologische Verfahren in der Diagnostik ermöglichen den Nachweis von erregerspezifischen Serumantikörpern. Hierbei findet zum einen der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und zum anderen der Immunoblot Anwendung. In beiden Tests wird die Bindung von Patienten-Serumantikörper an *Campylobacter*-Antigene mittels enzymmarkierten Anti-Human-Immunglobulinen klassenspezifisch nachgewiesen (Anti-IgG, Anti-IgA). Serologische Tests werden nach einer Verdachtsdiagnose angewendet, um klassenspezifische *Campylobacter* Antikörper zu identifizieren und so postinfektiöse Komplikationen differentialdiagnostisch abzuklären. Sie wird aber auch dann verwendet, wenn die Stuhlkultur negativ war und postinfektiöse Symptome auftreten. Gründe für eine negative Stuhlkultur sind ein zu langer Zeitraum zwischen Beginn der gastrointestinalen und der postinfektiösen Symptome, eine antibiotische Therapie oder eine asymptomatische Infektion.

Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von neuen Antigenen für die Verbesserung der serologischen Diagnostik von Yersiniosen und Campylobakteriosen. Im Rahmen des *Yersinia* Projektes sollten neue virulenzassoziierte Antigene, die eine Art- und Serotypenunterscheidung ermöglichen, identifiziert werden. Hierfür sollten vier virulenzassoziierte Proteine auf ihre Antigenität untersucht werden: Das MyfA (*mucoïd Yersinia factor*) sowie das homologe PsaA (*pH 6 Antigen fimbrial subunit*) von *Y. pseudotuberculosis*, das *Yersinia adhesin A* Protein YadA und das RtxA Toxin von *Y. enterocolitica*.

Durch die Identifizierung von neuen *Campylobacter jejuni* Antigenen sollte die Sensitivität der serologischen *Campylobacter* Diagnostik und der Differentialdiagnose des Guillain-Barré Syndroms verbessert werden. Hierfür sollten Proteine sowohl aus dem Sekretom, d. h. Proteine, die von *C. jejuni* ins Medium abgegeben/sezerniert werden, als auch Proteine des Gesamtzelllysates hinsichtlich ihrer Antigenität unter der Verwendung von Patientenserum und Kaninchen-Hyperimmunserum überprüft werden. Zusätzlich sollten die virulenzassoziierten Proteine JlpA, CadF, CiaB, FlaC und Cj1496c hinsichtlich ihres antigenen Potentials untersucht werden. Des Weiteren sollten die Proteine des Sekretoms von verschiedenen *C. jejuni* Stämmen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels MALDI-TOF identifiziert werden.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des FORINGEN Verbundes (Projekt DT-5): „Entwicklung einer Mikrosphären-basierten Multiplex-Serologie zur Differenzialdiagnostik der reaktiven Arthritis“ in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Forschung und Entwicklung der MIKROGEN GmbH (Neuried) erstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Blot-Apparatur	Mini-Trans-Blot	Bio-Rad (München)
Elektrophoresekammer für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsgerät	ECM399 BTX	Genetronics (San Diego)
Filmentwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji (Düsseldorf)
French Press	French Pressure Cell 40K SLM	Aminco (Silver Springs)
Gel-Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Isoelektrische Fokussierungs-Apparatur	IPGphor	Bio-Rad (München)
Liniergerät	Isoflow Dispenser	Imagene Technology (Hanover, New Hampshire)
PCR-Cycler	Unocycler	VWR (Darmstadt)
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Proteinaufreinigungsanlage	SMART™ System	Amersham Pharmacia Biotech (München)
Proteinaufreinigungsanlage	ÄKTA Explorer	Amersham Pharmacia Biotech (München)
Semi-Dry Blot-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad (München)
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K	Beckman Coulter (Krefeld)
Ultrazentrifuge	Optima TL	Beckman Coulter (Krefeld)

Neben den in Tab. 2.1 aufgelisteten Geräten, wurden Laborstandardgeräte eingesetzt.

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

Tab. 2.2: Bezugsquellen für Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie/Biochemikalie	Firma
1 kb DNA-Leiter Gene Ruler	Fermentas (St. Leon-Rot)
AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase	Applied Biosystems (Darmstadt)
Blood Free Campylobacter Selectivity Agar Base	Sigma-Alderich (Taufkirchen)
CampyBAP Agarplatten	Becton Dickinson (Heidelberg)
CIAB	Fermentas (St. Leon-Rot)
dNTP Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
ECL Western Blotting Reagents	GE Healthcare (Freiburg)
Fuji RX New 13x18	Fuji (Düsseldorf)
GENbox microaerophil	BioMerieux (Nürtingen)
Immobilon-P PVDF Transfer Membran	Millipore GmbH (Eschborn)
Iodacetamid	Bio-Rad (München)
IPG ReadyStrip pH 3-10 NL / pH 6-11 7 cm	Bio-Rad (München)
Millex-HV Filter 0.45 µm	Millipore GmbH (Eschborn)
N-Acetyl-D-Galaktosamin	Sigma-Alderich (Taufkirchen)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Precision Plus Proteinstandard prestained	Bio-Rad (München)
Proteinstandard "BenchMark Pre-Stained"	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinstandard Seeblue prestained	Invitrogen (Karlsruhe)
Protran BA Nitrozellulose Transfer Membran	Schleicher und Schüll (Dassel)
Protran BA85 Nitrozellulose Transfer Membran 150 x 150 mm	Schleicher und Schüll (Dassel)
<i>recomLine</i> Campylobacter IgG/IgA	Mikrogen (Neuried)
<i>recomLine</i> Yersinia IgG/IgA	Mikrogen (Neuried)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)
RPMI	Invitrogen (Karlsruhe)
SBA agarose bound	Linaris (Wertheim-Bettlingen)
Soybean Agglutinin	Sigma-Alderich (Taufkirchen)
T4 DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), E. Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad "pro analysis" bezogen.

2.3 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Bakterienstämme

Tab. 2.3: *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ , Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1</i> Δ (lac-proAB) / F ⁻ [<i>traD36 proAB</i> [*] <i>lacI</i> ^f <i>lacZ</i> Δ M15]	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
BL21 (DE3) pLys	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pLysS (Cm^R)</i>	Studier und Moffart (1986)
BL21CodonPlus (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal lambda(DE3) endA Hte (argU ileY leuW Cam^r)</i>	Stratagene, La Jolla

Tab. 2.4: *Yersinia* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
108-P	<i>Y. enterocolitica</i> , Patientenisolat, ST O:3 BG 4	Heesemann <i>et al.</i> , 1984
Y-11	<i>Y. enterocolitica</i> , Patientenisolat, ST O:3 BG 4	Stammsammlung, Dr. Neubauer
Y-114	<i>Y. enterocolitica</i> , Patientenisolat, Serotyp O:3	Stammsammlung MvP
96-P	<i>Y. enterocolitica</i> , Patientenisolat, ST O:9 BG 2	Saken <i>et al.</i> , 1994
YpI	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , Patientenisolat, Serotyp I	Stammsammlung MvP

Tab. 2.5: *Campylobacter* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Penner 19	<i>C. jejuni</i> Penner 19, Referenzstamm	Stammsammlung Prof. Groß
Lior 11	<i>C. jejuni</i> Lior 11, Referenzstamm	Stammsammlung Prof. Groß
No. 4	<i>C. jejuni</i> Patientenisolat 4	Klinikum GH
N87	<i>C. jejuni</i> Patientenisolat N87	Klinikum GH
Cj-K5	<i>C. jejuni</i> Penner 19 nach Kaninchenpassage	diese Arbeit
Cj-K6	<i>C. jejuni</i> Patientenisolat 4 nach Kaninchenpassage	diese Arbeit
Cj-K7	<i>C. jejuni</i> Lior 11 nach Kaninchenpassage	diese Arbeit
Cj-K8	<i>C. jejuni</i> Patientenisolat N87 nach Kaninchenpassage	diese Arbeit
N116	<i>C. jejuni</i> Patientenisolat	Klinikum GH
N117	<i>C. jejuni</i> Patientenisolat	Klinikum GH
N108	<i>C. fetus</i> Patientenisolat	Klinikum GH
L11- <i>flgC</i> ::Kan	<i>C. jejuni</i> Lior 11- <i>flgC</i>	diese Arbeit
L11- <i>tatC</i> ::Kan	<i>C. jejuni</i> Lior 11-TAT	diese Arbeit

2.3.2 Plasmide

Tab. 2.6: Plasmide und Expressionsvektoren

Plasmid/Expressionsvektor	Eigenschaften	Referenz
pET-21b	Expressionsvektor mit C-terminalen His-tag und T7-Promotor	Novagen (Darmstadt)
pUC18	Klonierungsvektor	New England Biolabs (Frankfurt)
pGEM-T	Klonierungsvektor	Promega (Mannheim)
pET21b-myfA	<i>myfA</i> ¹⁻⁴⁷⁷ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-psaA	<i>psaA</i> ¹⁻⁴⁷⁴ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-YadA ₇₂₋₂₈₀	<i>yadA</i> ²¹⁴⁻⁸⁴⁰ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-myfΔC	<i>myfA</i> ¹⁻⁴⁴¹ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-myfΔNC	<i>myfA</i> ¹²¹⁻⁴⁴¹ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-myfΔN	<i>myfA</i> ¹²¹⁻⁴⁷⁷ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-rtx1	<i>rtxA</i> ¹⁻³²³¹ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-rtx2	<i>rtxA</i> ³²³²⁻⁶⁴²⁶ in pET-21b über <i>Sall/NdeI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-rtx3	<i>rtxA</i> ⁶⁴²⁷⁻⁹⁶³⁹ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-jlpA	<i>jlpA</i> ¹⁻¹¹¹⁶ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-jlpA ₁₆₋₁₈₅	<i>jlpA</i> ⁴⁶⁻⁵⁵⁵ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-flaC	<i>flaC</i> ¹⁻⁷⁴⁷ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-ciaB	<i>ciaB</i> ¹⁻¹⁸³⁰ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-cadF	<i>cadF</i> ¹⁻⁹⁵⁷ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b- CadF ₁₆₇₋₃₁₄	<i>cadF</i> ⁵⁰²⁻⁹⁴² in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-yceI	<i>yceI</i> ⁶⁴⁻⁵⁷⁰ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-nlpA	<i>nlpA</i> ⁹⁴⁻⁷³⁸ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-Cj0143c	<i>cj0143c</i> ⁶¹⁻⁸⁸⁸ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-Cj1670c	<i>cj1670c</i> ⁵⁵⁻⁶⁶⁰ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pET21b-Cj1496c	<i>cj1496c</i> ⁵²⁻⁵¹⁶ in pET-21b über <i>NdeI/XhoI</i> kloniert	diese Arbeit
pWM1001	GFP-Plasmid mit <i>C. jejuni</i> Promotor	Miller <i>et al.</i>
pUC-flgC	<i>flgC</i> mit 572 nt upstream und 796 nt downstream in pUC18 über <i>NdeI/BamHI</i>	diese Arbeit
pKflgC	Kanamycin Resistenzkassette aus pWM1001 in pUC-flgC über <i>HindIII</i> (Insertion in <i>flgC</i>)	diese Arbeit
pGEM-TAT12	<i>tatC</i> in pGEM-T	
pGEM-TAT34	<i>tatC</i> mit 424 bp Deletion in pGEM-T	diese Arbeit
pKTAT	Kanamycin Resistenzkassette aus pWM1001 in pGEM-TAT über <i>BamHI</i> (Insertion in <i>tatC</i>)	diese Arbeit
pGEX-YopD	pGEX-6P-3 mit <i>yopD</i> von <i>Y. enterocolitica</i>	S. Roeder

2.3.3 Oligonukleotide

Tab. 2.7: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (3' → 5')	Verwendung
CadF1f-NdeI	GTA ATT <u>CCA TAT GAA</u> AAA AAT ATT CTT ATG TTT AG	Amplifizierung von <i>cadF</i> mit Einführung einer NdeI Schnittstelle
CadF957rev-XhoI	ATC <u>TAC TCG AGT</u> CTT AAA ATA AAT TTA GCA TC	Amplifizierung von <i>cadF</i> mit Einführung einer XhoI Schnittstelle
CjcadF502f	AAT TAT <u>CCA TAT GGG</u> TTT TGG TGG CAA AAA G	Amplifizierung von <i>cadF</i> ab nt 502 mit Einführung einer NdeI Schnittstelle, putativer C-terminaler antigener Bereich
CjcadF942rev-XhoI	TTA <u>CTC GAG</u> AGC ATC CAC TCT TCT ATT	Amplifizierung von <i>cadF</i> ab nt 942 mit Einführung einer XhoI Schnittstelle, putativer C-terminale antigener Bereich
JlpA1f-NdeI	GTA ATT <u>CCA TAT GAA</u> AAA AGG TAT TTT TCT CTC	Amplifizierung von <i>jlpA</i> mit Einführung einer NdeI Schnittstelle
JlpA1116rev-XhoI	ATC <u>TAC TCG AGA</u> AAT GAC GCT CCG CCC	Amplifizierung von <i>jlpA</i> mit Einführung einer XhoI Schnittstelle
CjjlpA46f-NdeI	AAT TAA <u>CCA TAT GTC</u> AGC TTG CGG AAA TTC	Amplifizierung von <i>jlpA</i> ab nt 46 mit Einführung einer NdeI Schnittstelle, putativer N-terminaler antigener Bereich
CjjlpA555rev-XhoI	TAA <u>CTC GAG</u> ATC TAT ATA ATT GTT TTC CTG	Amplifizierung von <i>jlpA</i> ab nt 555 mit Einführung einer XhoI Schnittstelle, putativer N-terminaler antigener Bereich
FlaC1f-NdeI	GTA ATT <u>CCA TAT GAT</u> GAT CTC TGA TGC AAC TAT	Amplifizierung von <i>flaC</i> mit Einführung einer NdeI Schnittstelle
FlaC747rev-XhoI	ATC <u>TAC TCG AGT</u> TGT AAT AAA TTA GCA ATT TTC	Amplifizierung von <i>flaC</i> mit Einführung einer XhoI Schnittstelle
CiaB1f-NdeI	GTA ATT <u>CCA TAT GAA</u> TAA TTT TAA AGA AAT AGC TAA	Amplifizierung von <i>ciaB</i> mit Einführung einer NdeI Schnittstelle
CiaB1830rev-XhoI	ATC <u>TAC TCG AGT</u> TTT TTC TTA CTT TCA AAT	Amplifizierung von <i>ciaB</i> mit Einführung einer XhoI Schnittstelle
flgCgc-f-NdeI	GTA TAA <u>GCA TAT GCA</u> AAT GGA TGG AAC TTT A	Amplifizierung von <i>flgC</i> mit genomischen Kontext (nt 569191- nt 567328), Einführung einer NdeI Schnittstelle
flgCgc-rev-BamHI	GAT TAA <u>GGA TCC TAA</u> AAA TAG ATC AAA TTT ATC	Amplifizierung von <i>flgC</i> genomischen Kontext (nt 569191- nt 567328), Einführung einer BamHI Schnittstelle
Kan-f-HindIII	ACT TGT <u>AAG CTT</u> ATC GAT AAA CCC AGC GAA	Amplifizierung der Kan-Kassette (nt 7526- nt 8954) aus pWM1001 und Einführung einer HindIII Schnittstelle
Kan-rev-HindIII	ACT ACG <u>AAG CTT</u> TTT AGA CAT CTA AAT	Amplifizierung der Kan-Kassette (nt 7526- nt 8954) aus pWM1001 und Einführung einer HindIII Schnittstelle
CjKan171rev	AAT ATA TTC AAG GCA ATC TGC CTC CTC	Sequenzierung von pKflgC
CjKan1311f	GAA GAA CAG TAT GTC GAG CTA TTT TTT GAC	Sequenzierung von pKflgC
Cj569566f	CAA GCT CAA GCT CCT TAT GAT G	Überprüfung der <i>flgC</i> Deletion, bindet außerhalb des rekombinanten Bereichs
Cj567053rev	GGC TTA GAC ATG CAT CGT AG	Überprüfung der <i>flgC</i> Deletion, bindet außerhalb des rekombinanten Bereichs
Cj-TAT-1 ⁺	AAA TTT AGA AGG CGG GCG TGT T	Amplifizierung von <i>tatC</i> . Ligation über poly-A in pGEM-T
Cj-TAT-2 ⁺	GCA AAA ATT CTA AAG GCT GTA AA	Amplifizierung von <i>tatC</i> . Ligation über poly-A in pGEM-T
Cj-TAT3-BamHI ⁺	AAA GGA TCC TTC ATT GCG GTA AAT AAG GC	inverse Oligonukleotide für die Einführung einer BamHI Schnittstelle und einer Deletion von 424 bp in <i>tatC</i>
Cj-TAT4-BamHI ⁺	AAA GGA TCC TCA ATT TTT AAT GGC AGG ACC	inverse Oligonukleotide für die Einführung einer BamHI Schnittstelle und einer Deletion von 424 bp in <i>tatC</i>
Kan-f-BamHI	ACT TGT GGA TCC ATC GAT AAA CCC AGC GAA	Amplifizierung der Kan-Kassette (nt 7526- nt 8954) aus pWM1001 und Einführung einer BamHI Schnittstelle
Kan-rev-BamHI	ACT ACG GGA TCC TTT AGA CAT CTA AAT	Amplifizierung der Kan-Kassette (nt 7526- nt 8954) aus pWM1001 und Einführung einer BamHI Schnittstelle
Cj-TAT5	GGA ATT TCA GGT TCA AGT GAG TTA	Überprüfung der <i>tatC</i> Deletion

MATERIAL UND METHODEN

Cj-TAT6	CTT AGG ACC TGA TAA ACT TCC AGA	Überprüfung der <i>tatC</i> Deletion
CjnlpA94f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GCC</u> TCA TGC TGA AAT CCT AG	Amplifizierung von <i>nlpA</i> ab nt 94 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
CjnlpA738rev-XhoI	TTA <u>CTC</u> <u>GAG</u> TAT GAT AAA TTG TTT GAT TTT ATC	Amplifizierung von <i>nlpA</i> ab nt 738 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
CjyceI64f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GAA</u> AGA ATA TAC TTT AGA TAA AGC	Amplifizierung von <i>yceI</i> ab nt 64 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
CjyceI570rev-XhoI	TTA <u>CTC</u> <u>GAG</u> TTT TTC GTT CGC TTC AAC TTC	Amplifizierung von <i>yceI</i> ab nt 570 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
CjcadF502f	AAT TAT <u>CCA</u> TAT <u>GGG</u> TTT TGG TGG CAA AAA G	Amplifizierung von <i>cadF</i> ab nt 502 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
CjcadF942rev-XhoI	TTA <u>CTC</u> <u>GAG</u> AGC ATC CAC TCT TCT ATT	Amplifizierung von <i>cadF</i> ab nt 942 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
CjilpA46f-NdeI	AAT TAA <u>CCA</u> TAT <u>GTC</u> AGC TTG CGG AAA TTC	Amplifizierung von <i>ilpA</i> ab nt 46 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
CjilpA555rev-XhoI	TAA <u>CTC</u> <u>GAG</u> ATC TAT ATA ATT GTT TTC CTG	Amplifizierung von <i>ilpA</i> ab nt 555 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
Cj1670c-55f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GGA</u> TGA AAA TCC TTT CAA GAC AG	Amplifizierung von C1670c ab nt 55 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
Cc1670c-660rev-XhoI	TTA <u>CTC</u> <u>GAG</u> AAG CAG ATT AAT CAT ATA TCC AG	Amplifizierung von Cj1670c ab nt 660 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
Cj0143c-61f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GGA</u> GCA AGA ACA AAA TAC TAG	Amplifizierung von Cj0143c ab nt 61 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
Cj0143c-888rev-XhoI	TTA CTC GAG TAA ATT ATG AGA AAA GGC ATC	Amplifizierung von Cj0143c ab nt 888 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
Cj1496c-52f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GGC</u> TGA ACA AGA TTG TGA G	Amplifizierung von Cj1496c ab nt 52 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
Cj1496c-516rev-XhoI	TTA <u>CTC</u> <u>GAG</u> ATT ACT AGC ATT ATT ATC TAA	Amplifizierung von Cj1496c ab nt 516 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
YEO3_rtxA-1f_NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GCC</u> CGT GGG TGG GAA	Amplifizierung von <i>rtxA</i> ab nt 1 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
Ye_rtxA_3231rev_XhoI	ATC TAC TCG <u>AGG</u> GTG CCA TCT CCG ACA TG	Amplifizierung von <i>rtxA</i> ab nt 3231 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
YEO3_rtxA-3232f_Sall	ATC <u>GTC</u> <u>GAC</u> AAG GTT ACC CTT GCT	Amplifizierung von <i>rtxA</i> ab nt 3232 und Einführung einer Sall Schnittstelle
YEO3_rtxA2-rev_XhoI	ATT <u>GCT</u> CGA GCC CAC TAT AAC GGG TTT T	Amplifizierung von <i>rtxA</i> ab nt 6426 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
YEO3_rtxA_6427f_NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GCA</u> AGT TAT TGT ACA	Amplifizierung von <i>rtxA</i> ab nt 6427 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
Ye_rtxA_9639rev_XhoI	ATC TAC TCG AGT ACG GTG TGG ACA TTA C	Amplifizierung von <i>rtxA</i> ab nt 9639 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
YeO:3-myfA-f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GAA</u> TAT GAA AAA ATT GGT	Amplifizierung von <i>myfA</i> ab nt 1 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
myfA_121f_NdeI	GTA ATC <u>CCA</u> TAT <u>GGC</u> AAC AAA AAC TGT	Amplifizierung von <i>myfA</i> ab nt 121 und Einführung einer NdeI Schnittstelle
myfA_441rev_XhoI	TTA CTC <u>GAG</u> TTC ACC TGC TTT AAC	Amplifizierung von <i>myfA</i> ab nt 441 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
Ye_myfA_rev	ATC TAC TCG <u>AGC</u> TCG ACA TAT TCC TCA A	Amplifizierung von <i>myfA</i> ab nt 473 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
YpsI-psaA-f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GAA</u> AAT GAA ATG TTT T	Amplifizierung von <i>psaA</i> ab nt 1f und Einführung einer NdeI Schnittstelle
YpsI-psaA-rev-XhoI	TTA <u>GCT</u> <u>CGA</u> <u>GAA</u> ATC CAT ACT CTT CAA C	Amplifizierung von <i>psaA</i> ab nt 474 und Einführung einer XhoI Schnittstelle
YeO:3-yadA-217f-NdeI	GTA ATT <u>CCA</u> TAT <u>GAT</u> TGC GAT TGG TGC TAC TGC	Amplifizierung von <i>yadA</i> ab nt 217f und Einführung einer NdeI Schnittstelle
YeO:3-yadA-840rev_XhoI	ATT <u>GCT</u> CGA GCA TAT TCA AAA CAT CTT TAG AC	Amplifizierung von <i>yadA</i> ab nt 840rev und Einführung einer XhoI Schnittstelle

⁺ (van Mourik *et al.*, 2008)

2.4 Nährmedien und Antibiotika

2.4.1 Nährmedien

Nährmedien wurden mit H₂O_{dest} angesetzt und anschließend bei 1 bar und 121 °C für 15 min autoklaviert.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Bacto-Trypton	10 g/L
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/L Bacto-Agar	
Beweglichkeitsagar	LB-Medium mit 3 g/L Bacto-Agar	
Brain-Heart-Infusion Medium (BHI Medium)	37 g/L	
BHI Agar	BHI-Medium mit 15 g/L Bacto-Agar	
Blood free Campylobacter Agar Base	36 g/L	
Einfriermedium	LB-Medium mit 15 % Glycerin	
SOC Medium	Bacto-Trypton	20 g/L
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	0,5 g/L
	KCl	250 mM
	Glucose	20 mM

2.4.2 Antibiotika

Tab. 2.8: Verwendete Antibiotikakonzentrationen und -lösungsmittel

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O _{dest}	10 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O _{dest}	5 mg/ml	50-200 µg/ml
Tetrazyklin	70 % Ethanol	2 mg/ml	20 µg/ml
Cefoperazon	H ₂ O _{dest}	8 mg/ml	32 µg/ml

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Kultivierungsverfahren

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme (Tab. 2.3) und der *Yersinia* Stämme (Tab. 2.4) erfolgte in LB-Medium bzw. BHI-Medium in einem Schüttelinkubator (180 U/min) bei 37°C bzw. 27°C unter aeroben Bedingungen. Die *Campylobacter* Stämme (Tab. 2.4) wurden in BHI-Medium unter mikroaerophilen Bedingungen in einer GENbox 2,5 L der Firma BioMerieux (Nürtingen) bei 37°C und 120 U/min kultiviert.

2.5.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung der *E. coli* und *Yersinia* Stämme erfolgte in Einfriermedium (2.4.1) bei -80°C. *Campylobacter* Stämme wurden im MicroBank System der Firma PRO-LAB Diagnostic (Richmond Hill, Kanada) bei -80°C gelagert.

2.5.3 Phänotypische Untersuchungen

Für die Überprüfung der Beweglichkeit von *C. jejuni* Stämmen wurde 1 µl einer Vorkultur in Beweglichkeitsagar (2.4.1) pipetiert und anschließend ca. 36 h unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die Beweglichkeit ist durch Ausschwärmen von *C. jejuni* in den Agar erkennbar.

2.6 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.6.1 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml Übernachtskultur mittels des NucleoSpin Plasmid-Kits der Firma Macherey-Nagel (München) nach Angaben des Herstellers isoliert, in 30-50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.6.2 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus 2 ml Übernachtskulturen mittels des NucleoSpin Tissue-Kits der Firma Macherey-Nagel (München) nach Angaben des Herstellers isoliert. Es wurde dabei nach dem empfohlenen Protokoll für Gram-negative Bakterien verfahren. Die DNA wurde in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.6.3 Modifikation von DNA

Die *in vitro*-Veränderungen von DNA-Molekülen, wie Restriktionen und Ligationen, wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Vermeidung von Religationen für 30 min bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt

2.6.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1,0-1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet. Vor dem Lauf wurde zu den Proben 1 x DNA-Probenpuffer gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragment-Größen diente ein 1 kb-Leiter-Standard Gene Ruler. Der Gellauf wurde in horizontalen Mini-Gelkammern der Maße 7,5 cm x 7,5 cm bzw. 11 cm x 7,5 cm (Länge x Breite) bei konstant 90 V für 30-60 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gele im Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt. Die Detektion und Dokumentation der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm.

TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Essigsäure	40 mM
	EDTA	1 mM
10 x DNA-Probenpuffer	Glycerin	50 %
	EDTA	0,1 M
	SDS	1 %
	Bromphenolblau	0,1 %
Agarosegel	Agarose	1,0-1,5 % in TAE-Puffer
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{dest}	

2.6.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des "QIAquick Gel Extraction Kit" von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert.

2.6.6 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ ermittelt.

2.6.7 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR) dient der Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten und wurde nach Mullis *et al.* (1986) durchgeführt. Die zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens komplementären Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) hergestellt. Als DNA-Matrize wurde chromosomale DNA (50-100 ng) oder ein Bakterienzellysate eingesetzt. Zur Gewinnung des Bakterienzellysates wurden 100 µl einer Übernachtskultur in 900 µl H₂O_{dest} gekocht (95 °C, 10 min) und anschließend abzentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde als DNA-Matrize für die PCR verwendet. Als DNA-Polymerasen wurde entweder die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Darmstadt) oder die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Die

Reaktionsansätze und die verwendeten PCR-Programme sind den Tabellen 2.9 und 2.10 zu entnehmen.

Tab. 2.9: Reaktionsansatz und -programm für die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Die Annealing-Temperatur lag 2 °C unter dem Schmelzpunkt der Primerpaare

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm	
DNA	100 ng	Anfangsdenaturierung	94°C 10 min
5' Primer (100 µM)	0,5 µl		
3' Primer (100 µM)	0,5 µl	Denaturierung	94°C 30 sek
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl	Annealing	x°C 30 sek 30 x
10 x Reaktionspuffer	5 µl	Elongation	72°C 1 min/kb
DNA Polymerase	0,5 µl		
H ₂ O _{dest} ad	50 µl	Finale Elongation	72°C 7 min

Tab. 2.10: Reaktionsansatz und -programm für die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase. Die Annealing-Temperatur lag 2 °C unter dem Schmelzpunkt der Primerpaare

Reaktionsansatz		Reaktionsprogramm	
DNA	100 ng	Anfangsdenaturierung	98°C 30 sek
5' Primer (100 µM)	0,5 µl		
3' Primer (100 µM)	0,5 µl	Denaturierung	98°C 10 sek
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl	Annealing	x°C 15 sek 30 x
5 x Reaktionspuffer	10 µl	Elongation	72°C 15 sek/kb
DNA Polymerase	0,5 µl		
H ₂ O _{dest} ad	50 µl	Finale Elongation	72°C 5 min

2.6.8 Kompetente Zellen und Elektroporation

2.6.8.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen und Elektroporation

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden die Stämme JM109, DH5α, BL21 (DE3) pLys und BL21 (DE3) CodonPlus verwendet. Eine in LB-Medium angezogene Übernachtskultur wurde 1:50 in LB-Medium verdünnt und bei 37 °C inkubiert. In der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0,5-0,6) wurde die Bakteriensuspension für 15-20 min auf Eis gekühlt, anschließend für 10 min bei 4000 U/min 4°C zentrifugiert und zweimal mit H₂O_{dest} gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschstschritte mit 10 % Glycerin/H₂O_{dest}. Die so präparierten Bakterien wurden in 10 % Glycerin/H₂O_{dest} resuspendiert, als 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit der DNA in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF (time constant > 4ms). Die Zellen wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf Selektivagarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen.

2.6.8.2 Herstellung elektrokompetenter *C. jejuni* Zellen und Elektroporation

Für die Herstellung elektrokompetenter *C. jejuni* Zellen wurde der Stamm Lior 11 verwendet. Der Stamm wurde auf vier Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Die Zellen wurden mit je 2 ml BHI-Medium pro Platte geerntet und bei 3000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden dreimal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen und im Anschluss in Waschpuffer aufgenommen, in 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und zusammen mit der DNA in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF (time constant > 4ms). Die Zellen wurden in 100 µl SOC aufgenommen und auf einer nicht selektiven Agarplatte über Nacht bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 1 ml BHI-Medium geerntet und bei 5000 U/min pelletiert. Die Zellen wurden in 100 µl BHI-Medium resuspendiert und auf einer selektiven Agarplatte für 3-5 Tage bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert.

Waschpuffer	Saccharose	272 mM
	Glycerin	15 %

2.6.9 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des "Cycle Sequencing", welches auf dem nach Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert. Die Sequenzanalyse und -auswertung erfolgte durch die Firma Metabion GmbH (Martinsried).

2.6.10 Konstruktion der Plasmide

2.6.10.1 Expressionsplasmide

Für die rekombinante Herstellung neuer potentieller Antigene von *Yersinia* und *C. jejuni* wurden die in Tabelle 2.6 beschriebenen Expressionsplasmide konstruiert. Die Plasmide pET21b-myfA, pET21b-myfΔC, pET21b-myfΔNC und pET21b-myfΔN entstanden durch PCR-Amplifikation des *myfA* Gens von chromosomaler DNA aus *Y. enterocolitica* O:3 mit den Oligonukleotid-Paaren YeO:3-myfA-f-NdeI und Ye_myfA-rev, YeO:3-myfA-f-NdeI und myfA_441rev_XhoI,

myfA_121f_NdeI und myfA_441rev_XhoI bzw. myfA_121f_NdeI und Ye_myfA-rev (Tab. 2.7). Das Plasmid pET21b-psaA entstand durch die PCR-Amplifikation des *psaA* Gens von chromosomaler DNA aus *Y. pseudotuberculosis* I mit dem Oligonukleotid-Paar YpsI-psaA-fNdeI und YpsI-psaA-rev-XhoI (Tab. 2.7). Die Plasmide pET21b-rtx1, pET21b-rtx2 und pET21b-rtx3 entstanden durch PCR-Amplifikation des *rtxA* Gens von chromosomaler DNA von *Y. enterocolitica* O:3 mit den Oligonukleotid-Paaren YEO3-rtxA-1f_NdeI und Ye-rtxA_3231rev_XhoI, YEO3_rtxA-3232f_Sall und YEO3_rtxA2-rev_XhoI bzw. YEO3_rtxA_6427f_NdeI und Ye_rtxA_9639rev_XhoI (Tab. 2.7). Für das Plasmid pET21b-yadA₇₂₋₂₈₀ wurde die *yadA* Kopf- und Halsregion (nt 214-840) vom pYV Plasmid von *Y. enterocolitica* O:3 mit dem Oligonukleotid-Paar YeO:3-yadA-217f-NdeI und YeO:3-yadA-840rev_XhoI amplifiziert (Tab. 2.7). Die Plasmide pET21b-jlpA und pET21b-jlpA₁₆₋₁₈₅ wurden durch die PCR-Amplifikation des *jlpA* Gens von chromosomaler DNA aus *C. jejuni* L11 mit den Oligonukleotid-Paaren JlpA1f-NdeI und JlpA1116rev-XhoI bzw. CjJlpA46f-NdeI und CjJlpA555rev-XhoI konstruiert (Tab. 2.7). Für die Plasmide pET21b-flaC und pet21b_ciaB wurde das *flaC* bzw. *ciaB* Gen von chromosomaler DNA aus *C. jejuni* L11 mit den Oligonukleotid-Paaren FlaC1f-NdeI und FlaC747rev-XhoI bzw. CiaB1f-NdeI und CiaB1830rev-XhoI amplifiziert (Tab. 2.7). Die Plasmide pET21b-cadF und pET21b-cadF₁₆₇₋₃₁₄ entstanden durch die PCR-Amplifikation des *cadF* Gens von chromosomaler DNA aus *C. jejuni* L11 mit den Oligonukleotid-Paaren CadF1f-NdeI und CadF957rev-XhoI bzw. CjcadF502f und CjcadF942rev-XhoI (Tab. 2.7). Die Plasmide pET21b-nlpA und pET21b-yceI wurden durch die PCR-Amplifikation des *nlpA* bzw. *yceI* Gens von chromosomaler DNA aus *C. jejuni* L11 mit den Oligonukleotid-Paaren CjnlpA94f-NdeI und CjnlpA738rev-XhoI bzw. CjyceI64f-NdeI und CjyceI570rev-XhoI konstruiert (Tab. 7.2). Für die Plasmide pET21b-Cj0143c und pet21b-Cj1670c wurde das *cj0143c* bzw. *cj1670c* Gen von chromosomaler DNA aus *C. jejuni* L11 mit den Oligonukleotid-Paaren Cj0143c-61f-NdeI und Cj0143c-888rev-XhoI bzw. Cj1670c-55f-NdeI und Cj1670c-660rev-XhoI amplifiziert (Tab. 2.7). Das Plasmid pET21b-Cj1496c entstand durch die PCR-Amplifikation des *cj1496c* Gens von chromosomaler DNA aus *C. jejuni* L11 mit den Oligonukleotid-Paaren Cj1496c-52f-NdeI und Cj1496c-516rev-XhoI (Tab. 2.7).

Die gewonnenen Genabschnitte wurden mit den in Tab. 2.6 genannten Restriktionsenzymen verdaut. Die Ligation erfolgte in den mit den entsprechenden Enzymen linearisierten Expressionsvektor pET-21b. Bei allen hier beschriebenen, neu konstruierten Plasmiden wurde die Korrektheit durch DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

2.6.10.2 Suizidplasmide

Für die Konstruktion einer Flagellen-negativen *C. jejuni* Mutante wurde das Gen *flgC* durch die Einführung einer Kanamycin-Kassette inaktiviert. Hierfür wurde ein Suizidplasmid konstruiert, das nicht in *Campylobacter* Stämmen replizieren und über homologe Rekombination ins das Genom eingebaut werden kann. Zuerst wurde der DNA-Abschnitt 572 Nukleotide stromaufwärts und 796 Nukleotide stromabwärts des *flgC* Gens von *C. jejuni* Lior 11 mit den Oligonukleotiden flgCgc-f-NdeI und flgCgc-rev-BamHI amplifiziert und über die NdeI/BamHI Schnittstellen in den Vektor pUC18 kloniert, wodurch pUC-flgC entstand. Im Anschluss wurde die Kanamycin-Kassette von pWM1001 unter Hinzufügen der Restriktionsschnittstelle HindIII mit den Oligonukleotiden Kan-f-HindIII und Kan-rev-HindIII amplifiziert. Anschließend wurde die Kanamycin-Kassette in die HindIII Schnittstelle, die in dem *flgC* Gen liegt, in pUC-flgC ligiert, wodurch das Suizidplasmid pKflgC entstand.

Für das Ausschalten des TAT Sekretionssystems in *C. jejuni* Lior11 wurde das Gen *tatC* durch das Einführen einer Kanamycin-Kassette inaktiviert. Zu diesem Zweck wurde ein Suizidplasmid nach van Mourik *et al.* (2008) konstruiert. Das Gen *tatC* und die flankierenden Regionen wurden mit den Oligonukleotiden Cj-TAT1 und CjTAT2 amplifiziert und anschließend über die poly-A Überhänge in den Vektor pGEM-T kloniert, um das Plasmid pGEM-TAT12 zu erhalten. Mit einer inversen PCR (Oligonukleotid-Paar Cj-TAT3BamHI und Cj-TAT4BamHI) wurde eine Deletion von 424 bp und eine BamHI Schnittstelle eingeführt. Nach Selbstligation wurde das erhaltene Plasmid pGEM-TAT34 mit BamHI verdaut und mit einer Kanamycin-Kassette ligiert, die mit den Oligonukleotiden Kan-f-BamHI und Kan-rev-BamHI aus dem Plasmid pWM1001 amplifiziert wurde. Das daraus resultierende Suizidplasmid wurde pKTAT genannt.

2.7 Biochemische und Analytische Methoden

2.7.1 Isolierung von sezernierten Proteinen (COPs) von *C. jejuni* und Yops von

Yersinien aus dem Kulturüberstand

In Anlehnung an die Yops (*Yersinia outer proteins*) von *Yersinia* wurden die von *Campylobacter* ins Medium sezernierten Proteine COPs (*Campylobacter outer proteins*) genannt. Für die Vorkultur wurden zunächst *C. jejuni* Stämme auf Columbia-Agar Platten für 2-3 Tage mikroaerophil bei 37°C angezüchtet, in 10 ml BHI-Medium aufgenommen und bei 37 °C und 100 U/min unter

mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Nach 7 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet (4000 U/min, 5 min), in 1 ml BHI aufgenommen und zur Beimpfung der Hauptkultur verwendet (OD₅₀₀ 0,1-0,2). Nach 16-18 h Wachstum wurden die Zellen pelletiert (4500 U/min, 30 min, 4 °C). Das Zellpellet kann für die Herstellung von Gesamtzelllysaten weiterverwendet werden (2.7.4). Der Kulturüberstand wurde erneut zentrifugiert (4000 U/min) und anschließend sterilfiltriert (Millex-HV Filter, 0.45 µm, PVDF, 33 mm). Der so gewonnene Überstand kann auch für die Isolierung von SSPs (*soluble supernatant proteins*) und Membranvesikeln verwendet werden (2.7.2). Die Proteine im Überstand wurden mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) über Nacht bei 4 °C gefällt. Nach dem Pelletieren der gefällten Proteine (10000 U/min, 30 min, 4 °C), wurden diese für 20 min in Aceton inkubiert und anschließend zweimal mit Aceton gewaschen (10000 U/min, 10 min). Nach dem Trocknen der so gewonnenen COPs wurden diese entweder in SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE (2.7.6) oder in Lysepuffer für die 2 Dimensionale Gelelektrophorese (2.7.7) aufgenommen.

SDS-Probenpuffer	1M MgCl ₂	5 ml
	10 % SDS	20 ml
	Glycerin	5 ml
	β-Mercaptoethanol	2,5 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	1 M Tris, pH 8,8	4,9 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml

Lysepuffer für 2-DE	Urea	9 M
	CHAPS	2 %
	DTT	1 %
	Carrier Ampholyte	2 %

30 g Urea in 50 ml H₂O_{dest} lösen, 0,5 g Serdolit MB-1 zugeben, 10 min rühren und abfiltrieren. Zu 48 ml dieser Lösung 1,0 g CHAPS, 0,5 g DTT, 1,0 ml Pharmalyte pH 3-10 und 50 mg Pefabloc Protease Inhibitor geben und in 1 ml Portionen bei – 80°C lagern.

Für die Isolierung von Yops wurde eine Yersinien-Kultur in BHI-Medium bei 27 °C über Nacht geschüttelt, 1:40 mit BHI verdünnt und 2 h bei 37 °C weiterschüttelt. Die Stimulation der Sekretion erfolgte durch Zugabe von 5 mM EGTA, 0,2 % Glukose und 10 mM MgCl₂ für 2-3 Stunden bei 37 °C. Im Anschluss wurde die Kultur für 15 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Kulturüberstand abgenommen. Die Proteine wurden wie die COPs mit 10 % TCA (siehe

oben) gefällt. Das Pellet wurde in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.7.2 Isolierung von SSPs (*soluble supernatant proteins*) und Membranvesikeln

Der unter 2.7.2 beschriebene Überstand wurde in einem 45 Ti Rotor von Beckman Coulter (Krefeld) für 3 h bei 37000 U/min und 4°C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet, welches die OMVs enthält, in 20 mM Tris HCl (pH 8.0) resuspendiert. Der Überstand wurde mit 10 % TCA über Nacht gefällt und wie die COPs (3.7.1) mit Aceton gewaschen. Die so erhaltenen SSPs wurden in Lysepuffer aufgenommen.

2.7.3 YadA Expression

Für die Expression von YadA wurde eine Yersinien-Kultur in RPMI-Medium bei 37 °C über Nacht ohne Schütteln angesetzt. Bei YadA Expression zeigt sich eine flockige Pelletbildung und der Überstand ist annähernd klar. 1 ml der Kultur wird abzentrifugiert (14000 U/min, 2 min). Das Pellet wird in SDS-Probenpuffer (2.7.1) aufgenommen und auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen.

2.7.4 Präparation von *C. jejuni* Gesamtzelllysaten

Das unter 2.7.2 beschriebene Zellpellet wurde zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen, in 0,9 % NaCl mit einer Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette von Roche (Mannheim) aufgenommen und in der French Press in drei Zyklen (1000 psi) aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde bei 10000 U/min für 30 min zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wurde über Nacht mit 10 % TCA bei 4°C gefällt. Nach dem Pelletieren der gefällten Proteine (10000 U/min, 30 min, 4 °C), wurden diese für 20 min in Aceton inkubiert und anschließend zweimal mit Aceton und einmal mit Wasser gewaschen (10000 U/min, 10 min). Nach dem Trocknen des Zelllysates wurde dieses in Lysepuffer (2.7.1) für die 2 Dimensionale Gelelektrophorese aufgenommen.

2.7.5 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach Bradford mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (Bio-Rad, München) verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Photometer bei 595 nm. Anhand der Eichgerade erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben.

2.7.6 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Die SDS-Gele wurden mit Hilfe von Acrylamid/Bis Lösung 29:1 von SERVA hergestellt. Es wurden 0,75 mm dicke Flachgele der Größe 8 x 7 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 5 %. Im Trenngel variierte die Acrylamidkonzentration je nach gewünschter Auftrennung der Proteine zwischen 10 % und 15 %. Als Proteinstandard wurde der Proteinstandard "BenchMark Pre-Stained" oder „Seebblue prestained“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der Gellauf wurde in einer Anlage für Minigele (Mini-PROTEAN 3 der Firma Bio-Rad, München) bei konstant 80 V für 20 min und anschließend bei 180 V in 1 x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit SDS-Probenpuffer (2.7.1) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach dem Gellauf wurden die Gele in Coomassie-Lösung (2.7.8.1) gefärbt.

Tab. 2.11: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	10 % Trenngel (5 ml)	12 % Trenngel (5 ml)	15 % Trenngel (5 ml)	4% Sammelgel (1 ml)
1 M Tris/HCl, pH 8,0	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
0,5 M Tris/HCl	-	-	-	0,13 ml
H ₂ O _{dest}	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	0,68 ml
30 % Acrylamid-Lösung	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	0,17 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	10 µl
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl	50 µl	10 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl

10 x SDS-Laufpuffer

Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10 g
H ₂ O _{dest}	ad 1 l

2.7.7 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Für die Proteom-Analyse von *C. jejuni* wurde eine 2-Dimensionale Gelelektrophorese nach *Görg et al.* durchgeführt (Gorg *et al.*, 1988). Bei dieser Methode werden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

2.7.7.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurden IPG Streifen von 7 cm Länge der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Diese müssen vor der Verwendung rehydratisiert werden und auf eine Dicke von 0,5 mm aufquellen. Hierfür wurde die sogenannte „in Gel Rehydratisierung“ durchgeführt. Es wurden 150 µg Protein in einem Volumen von 130 µl eingesetzt. Die Proteinprobe wurde mit dem Rehydratisierungspuffer versetzt, wobei ein Mischungsverhältnis von 1:1, Probe zu Rehydratisierungspuffer, nicht überschritten werden darf, da sonst die Gesamtleitfähigkeit des Streifens zu hoch wird und das Erreichen des vorgegebenen Spannungsgradienten sowie die Auftrennung der Proteine verhindert wird. Membranvesikel wurden auf Grund ihrer hohen Hydrophobizität in OMV (*outer membrane vesicle*)-Rehydrierungslösung aufgenommen. Die Proteinprobe wurde im Fokussierungsschlitten (Bio-Rad, München) sorgfältig verteilt. Die IPG Streifen wurden vorsichtig von der Schutzfolie gelöst und mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Probe gelegt, wobei das mit dem „+“ markierten Ende auf die Anode zeigt. Der IPG-Streifen wurden mit 500 µl Mineralöl überschichtet und der Fokussierungsschlitten in die PROTEAN IEF cell (Bio-Rad, München) gestellt. Die Rehydrierung wurde aktiv bei 50 V für 12 h durchgeführt und die isoelektrische Fokussierung erfolgte ohne Pause im Anschluss. Hierfür wurde folgendes Programm ausgewählt (Tab. 2.12). Nach Ende der Fokussierung wurden die Streifen herausgenommen und entweder bei -80 °C gelagert oder sofort weiterbearbeitet.

Rehydrierungslösung	Harnstoff	8 M
	CHAPS	2 %
	DTT	0,4 %
	Carrier Ampholyte	0,5 %

24 g Harnstoff werden in 50 ml H₂O_{dest} gelöst und 0,5 g Serdolit werden zugegeben. Nach 10 min rühren wird die Lösung gefiltert. Zu 48 ml dieser Lösung 1,0 g CHAPS, 250 µl Carrier Ampholyte

und einige Körnchen Bromphenolblau zugeben und mit H₂O_{dest} auf 50 ml auffüllen. 2 ml Portionen bei -80°C lagern. Unmittelbar vor der Verwendung wurden 5,6 mg DTT zugegeben

OMV-Rehydrierungslösung	Harnstoff	7 M
	Thioharnstoff	2 M
	CHAPS	2 %
	Amidosulfobetain-14	2 %
	Tributylphosphin	2 mM
	Tris	20 mM
	DTT	65 mM
	Carrier Ampholyte	2 %

8,2 g Harnstoff und 3 g Thioharnstoff werden in 20 ml H₂O_{dest} gelöst und 0,2 g Serdolit zugegeben. Nach 10 min rühren wird die Lösung gefiltert. Zu dieser Lösung 0,4 g CHAPS, 0,4 g Amidosulfobetain-14, 200 µl Tributylphosphin, 50 mg Tris, 400 µl Carrier Ampholyte und einige Körnchen Bromphenolblau zugeben und mit H₂O_{dest} auf 20 ml auffüllen. 2 ml Portionen bei -80°C lagern. Unmittelbar vor der Verwendung wurden 40 mg DTT zugegeben.

Tab. 2.12: IPGPhor-Programm für die isoelektrische Fokussierung von IPG-Streifen (70 mm)

Temperatur Max. Stromstärke Probenvolumen	20°C		
	0,05 mA pro IPG-Streifen 130 µl		
	Spannung	Zeit	Bemerkung
R – Rehydrierung	50 V	12 h	aktives Einquellen
S1 – Konditionierung	500 V	1 h	entfernt Salzionen und geladenen Kontaminationen
S2 – Spannungsaufbau	1500 V	30 min	Erhöhung der Spannung bis zur max. Voltstärke
S3 – Fokussierung	4000 V	8000 Vhrs	Fokussierung
S4	500 V	∞	Verhindert Diffusion der fokussierten Proteinen oder Fokussierungs-Artefakte

2.7.7.2 Äquilibrierung der IPG-Streifen

Die IPG-Streifen müssen vor der zweiten Dimension äquilibriert werden, damit die fokussierten Proteine vollständig mit dem SDS interagieren können. Hierfür wurden die Streifen je 15 min zuerst in Puffer I und anschließend in Puffer II auf einem Schüttler inkubiert. Im ersten Schritt werden Disulfidbrücken durch DTT reduziert und im zweiten Schritt verhindert Iodacetamid durch Alkylierung der Sulfhydrylgruppen eine Reoxidation. Zusätzlich wird freies DTT alkyliert, das sonst bei der SDS PAGE stören könnte. Die Streifen wurden danach kurz auf Whatman Papier abgetropft und in SDS-Laufpuffer (2.7.6) geschwenkt und waren dann bereit für die SDS-PAGE.

Äquilibrierungs-Puffer	Urea	180g
	Glycerin	150 g
	SDS	10 g
	1,5 M Tris pH 8,8	16,7 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 500 ml
Puffer I	Äquilibrierungs-Puffer mit 1 % (w/v) DTT	
Puffer II	Äquilibrierungs-Puffer mit 4 % (w/v) Iodacetamid	

2.7.7.3 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970) (2.7.6), wobei kein Sammelgel gegossen wurde. Es wurden 1,0 mm dicke Flachgele der Größe 7 x 10 cm verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug 12 %. Die Gele wurden mit Hilfe eines Mini-PROTEAN 3 multi-Gießstand der Firma Bio-Rad (München) gegossen. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden auf das Polyacrylamidgel gelegt und mit einem Spatel vorsichtig auf die Gelfront gedrückt. Ein mit Proteinstandard-getränkter Filterpapierstreifen wurde neben den IPG-Streifen auf die Gelfront gelegt und mit Agaroseabdichtlösung überschichtet. Der Gellauf erfolgte bei konstant 200 V für 45 min. Die Gele wurden im Anschluss entweder mit kolloidalen Coomassie gefärbt oder für den Immunoblot weiterbearbeitet.

Agaroseabdichtlösung	0,5 % Agarose in SDS-Laufpuffer (2.7.6) einige Körnchen Bromphenolblau
-----------------------------	---

2.7.8 Färbemethoden

2.7.8.1 Coomassiefärbung nach Weber und Osborn (1969)

SDS-Gele (2.7.6) wurden 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt und im Anschluss in Entfärberlösung entfärbt.

Coomassie-Lösung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	Coomassie Brillant Blau (CBB) R	0,15 %
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
Entfärberlösung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	75 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l

2.7.8.2 Kolloidale Coomassiefärbung nach Neuhoff *et al.*

Die 2D Gele (2.7.7) wurden über Nacht in kolloidaler Coomassie Lösung gefärbt (Neuhoff *et al.*, 1985). Die Entfärbung erfolgt in H₂O_{dest}.

Lösung A 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure
 10 % (w/v) Ammoniumsulfat

16 ml ortho-Phosphorsäure wurden zu 768 ml H₂O_{dest} gegeben. Anschließend 80 g Ammoniumsulfat in dieser Lösung lösen.

Lösung B 5 % CBB G250
 1g CBB in 20 ml H₂O_{dest} lösen.

Lösung C 16 ml Lösung B in Lösung A geben.

Lösung D	0,08 % CBB G250
	1,6 % ortho-Phosphorsäure
	8 % Ammoniumsulfat
	20 % Methanol

Unmittelbar vor dem Gebrauch 200 ml Methanol zu Lösung C geben.

2.7.8.3 Ponceau S-Färbung

Die Ponceau S-Färbung dient zur Überprüfung, ob Proteine nach dem Elektrotransfer auf die Nitrozellulose- oder PVDF-Membran (Westernblot, 2.7.10) übertragen wurden. Die Ponceau S-Färbung ist reversibel und stört eine folgende Immundetektion nicht. Die Membran wurde 15 min in Ponceau S-Lösung gefärbt und anschließend mit H_2O_{bisest} wieder entfernt.

Ponceau S-Lösung	0,2 % Ponceau S
	0,2 % Essigsäure

2.7.9 Auswertung der zweidimensionalen Gele

Die aufgetrennten Proteinmuster der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden mittels der 2D-Analysesoftware „PDQuest“ der Firma Bio-Rad (München) nach Herstellerangaben ausgewertet. Dabei wurden drei unabhängige Kulturen von jedem Stamm (*C. jejuni* Lior 11, L11 Δ *flgC*, L11 Δ *tatC*) in die Betrachtung und den Vergleich aller Fraktionen (ZL, COPs, SSPs, OMVs) einbezogen. Für die Berechnung der Veränderung der Signalintensitäten der Proteinspots wurden die Mittelwerte der entsprechenden Kulturen verwendet. Für die Identifikation ausgewählter Proteine wurde die MALDI-TOF-Massenspektroskopie (2.10.1) herangezogen.

2.7.10 Westernblot

Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen aus 1-Dimensionalen Gelen erfolgte in einer Mini Trans-Blot Kammer der Firma Bio-Rad (München) konstant bei 200 mA für 1 h in 1 x Blotting-Puffer.

Der Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF- oder Nitrozellulosemembranen aus 2-Dimensionalen Gelen erfolgte in einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Cell Kammer der Firma Bio-Rad (München) konstant bei 150 mA für 2 h. Hierfür wurden zuerst 3 Blätter Whatman-Papier mit Anoden-Lösung I, und 6 Blätter Whatman-Papier mit Anodenlösung II getränkt und auf die Trans-Blot Kammer gelegt.

MATERIAL UND METHODEN

Nach Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol wurde das 2D-Gel kurz in Kathoden-Lösung geschwenkt und mit 9 in Kathoden-Lösung getränkten Whatman-Papieren bedeckt.

Anschließend wurde die Nitrozellulose- und die PVDF-Membran zur Absättigung von unspezifischen Bindungen für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C in Blockierungs-Lösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS-T folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 1 Stunde. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal mit 1x PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde die Peroxidase entweder mit dem „ECL Western Blotting System“ (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben entwickelt und ein Röntgenfilm zur Belichtung aufgelegt, oder mit Substrat-Lösung direkt auf der Membran gefärbt und die Färbereaktion mit 1 N Schwefelsäure abgestoppt.

10 x Blotting-Puffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
Anoden-Lösung I - pH 10,5	Tris	36,3 g
	Methanol	200 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
Anoden-Lösung II - pH 10,4	Tris	3,03 g
	Methanol	200 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
Kathoden -Lösung - pH 7,5	ε-Amino-Caprinsäure	5,2 g
	Methanol	200 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
10 x PBS - pH7,4	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,4 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l

PBS-T	10 x PBS	10 ml
	Tween 20	2 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
Blockierungs-Lösung	Milchpulver	10 g
	PBS-T	ad 1 l
	immer frisch herstellen	
Substrat-Lösung	Diaminobenzidin	50 mg
	1M Tris, pH 7,4	5 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 100 ml
	30 % H ₂ O ₂	50 µl
	immer frisch herstellen	
1 N Schwefelsäure	95-97 % Schwefelsäure	27,4 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 1 l
	bei RT 6 Monate haltbar	

2.7.11 Line Assays

2.7.11.1 Miniblotter 45

Die „Line Assays“ mit rekombinanten Antigenen wurden in einem Miniblotter 45 System der Firma Immunitics (Boston, USA) hergestellt. Die rekombinanten Proteine wurden hierfür mit der Kathodenlösung (2.7.10) nach gewünschter Konzentration verdünnt (Maximalvolumen 150 µl). Die Schaumstoffunterlage wurde in die Apparatur gelegt. Eine Nitrozellulosemembran (160 mm x 160 mm) wurde mit Anodenlösung II (2.7.10) getränkt und auf die Schaumstoffunterlage gelegt. Die Abdeckung wurde festgeschraubt und restliche Anodenlösung II abgesaugt. Die Proteinlösungen wurden luftblasenfrei in die Kanäle pipetiert und 2 h bei RT inkubiert. Nachdem die Proteinlösung abgesaugt wurde, wurde die Apparatur auseinander gebaut und die Nitrozellulosemembran 1 h bei 37°C in Blockierungslösung (2.7.10) inkubiert. Die Membran wurde mit H₂O_{dest} gespült, mit dem Streifenschneider (Gasser Apparatebau und Laborzubehör, Teufen, Schweiz) in 2,5 mm breite Streifen geschnitten, getrocknet und bei 4°C gelagert.

2.7.11.2 Isoflow Dispenser

Bei der Firma Mikrogen GmbH (Neuried) wurden die rekombinanten Proteine in unterschiedlichen Verdünnungen mit dem Isoflow Dispenser auf eine Nitrozellulose-Membran als breite Linien aufgetragen. Zusätzlich wurde eine „Cut off“-Kontrolle aufgetragen, deren Intensität den Bezugswert für die spätere Auswertung darstellt. Die Membranen wurden in Blockierungslösung inkubiert und nach drei Waschschritten über Nacht getrocknet. Anschließend wurde die Membran nummeriert und in Streifen geschnitten. Der anschließende Line-Assay erfolgte wie bei den kommerziell erwerblichen Line-Kits der Mikrogen GmbH.

2.7.12 Antikörper

2.7.12.1 Kaninchen Antiseren und Seren

Tab. 2.13: Kaninchen Antisera

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
YK1	Präimmunserum Kaninchen 1	diese Arbeit (2.9.1)
YK2	Präimmunserum Kaninchen 2	diese Arbeit (2.9.1)
YK3	Präimmunserum Kaninchen 3	diese Arbeit (2.9.1)
YK4	Präimmunserum Kaninchen 4	diese Arbeit (2.9.1)
a-YK1	p.o.-Kaninchen anti- <i>Y. enterocolitica</i> Y-108-P	diese Arbeit (2.9.1)
a-YK2	p.o.-Kaninchen anti- <i>Y. enterocolitica</i> Y-114	diese Arbeit (2.9.1)
a-YK3	p.o.-Kaninchen anti- <i>Y. enterocolitica</i> Y-11	diese Arbeit (2.9.1)
a-YK4	p.o.-Kaninchen anti- <i>Y. enterocolitica</i> Y-96-P	diese Arbeit (2.9.1)
a-Y108-i.v.	i.v.-Kaninchen anti- <i>Y. enterocolitica</i> Y-108-P	MvP
a-Y96-i.v.	i.v.-Kaninchen anti- <i>Y. enterocolitica</i> Y-96-P	MvP
a-Y-P-1	i.c.-Kaninchen anti- <i>Y. pseudotuberculosis</i> I	MvP
CK5	Präimmunserum Kaninchen 5	diese Arbeit (2.9.2)
CK6	Präimmunserum Kaninchen 6	diese Arbeit (2.9.2)
CK7	Präimmunserum Kaninchen 7	diese Arbeit (2.9.2)
CK8	Präimmunserum Kaninchen 8	diese Arbeit (2.9.2)
po-CK5	p.o.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K5	diese Arbeit (2.9.2)
po-CK6	p.o.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K6	diese Arbeit (2.9.2)
po-CK7	p.o.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K7	diese Arbeit (2.9.2)
po-CK8	p.o.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K8	diese Arbeit (2.9.2)
iv-CK5	i.v.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K5	diese Arbeit (2.9.2)
iv-CK6	i.v.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K6	diese Arbeit (2.9.2)
iv-CK7	i.v.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K7	diese Arbeit (2.9.2)
iv-CK8	i.v.-Kaninchen anti- <i>C. jejuni</i> K8	diese Arbeit (2.9.2)
JS69	Kaninchen anti- <i>E. coli</i> -JS69	MvP
54a	Kaninchen anti- <i>E. coli</i> -54a	AG Wilske
Anti-MyfA	Kaninchen anti-MyfA	Dr. Roggenkamp

Des Weiteren standen 57 Campylobakteriose und 9 Yersiniose Patientenseren (Prof. Groß; Prof. Pfister; Serologische Diagnostik MvP), bei denen eine *C. jejuni* bzw. *Yersinia* Infektion

bakteriologisch und/oder serologisch nachgewiesen wurde, sowie 7 Blutspenderseren (AG Wilske) und anti-Yop negative Humanseren (YNHS, YNVN) zur Verfügung.

2.7.12.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.14: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
ZαK-IgG-HRP	Ziege-anti-(Kaninchen-IgG)-Antikörper-HRP	Sigma-Alderich (Taufkirchen)
KαH-IgG-HRP	Polyklonales Kaninchen-antihumanes IgG-HRP-Konjugat	Dako Cytomation (Glostrup)
KαH-IgA-HRP	Polyklonales Kaninchen-antihumanes IgA-HRP-Konjugat	Dako Cytomation (Glostrup)
Ni-NTA-AP	Ni-NTA-AP-Konjugat	Qiagen (Hilden)

2.7.13 Lektin-Blot

Lektine sind Proteine, die eine spezifische Affinität für Zuckerreste besitzen und können deshalb für den Nachweis von glykosylierten Proteinen verwendet werden. Das Lektin der Sojabohne (*Glycine max*; *soy bean agglutinin* SBA) besitzt eine spezifische Affinität für N-Acetyl-D-Galaktosamin. Ein Peroxidase-Konjugat von SBA ermöglicht die direkte Detektion von Glykoproteinen auf Nitrozellulose-Membranen. Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf die Membran (2.7.10) wurden die proteinfreien Bereiche über Nacht in PBS-T bei 4°C blockiert. Hierbei darf weder Milchpulver noch BSA verwendet werden (Glykoproteine). Das SBA-Peroxidase Konjugat (1 mg/ml; Sigma-Alderich, Taufkirchen) wurde als 1:200 Verdünnung in PBS-T eingesetzt, so dass eine Endkonzentration von 5 µg/ml vorlag. Die Inkubation fand bei RT für 1 h unter Schütteln statt. Die Membran wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und ein Röntgenfilm zur Belichtung aufgelegt.

Als Negativkontrolle wurde das SBA-Peroxidase Konjugat 1 h bei RT mit N-Acetyl-D-Galaktosamin (10 mg/ml; Sigma-Alderich, Taufkirchen) vorinkubiert (Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000). Im Anschluss wurde der Ansatz wie oben beschrieben im Lektin-Blot eingesetzt.

2.7.14 Perjodatoxidation

Perjodsäure führt zur Oxidation von cis-ständigen Hydroxylanten (Diolen, Glykolsplaltung). Wie andere vicinale Diolen werden auch Monosaccharide durch Perjodsäure gespalten und es kommt zur Ausbildung von zwei Aldehydgruppen. Auch glykosylierte Proteine können durch die Behandlung von Perjodsäure deglykosyliert werden. Dadurch kann zum Beispiel der Einfluss von Glykolresten auf

eine spezifische Antikörper-Bindung untersucht werden. Hierfür wurden die Proteine nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit 10 mM NaIO₃ in 50 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 4,5 für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach kurzen Spülen mit Natrium-Acetatpuffer wurde die Membran dreimal in PBS-T gewaschen und für einen Immunoblot oder Lektin-Blot weiterverwendet.

2.8 Proteinreinigung

2.8.1 Produktion von rekombinanten Proteinen

Für die Expression von Proteinen mit His-„Tag“ wurde das T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem (Studier and Moffatt, 1986) verwendet. Über den verwendeten Expressionsvektor pET-21-b konnten C-terminal an das Protein sechs Histidine angefügt werden. Bei pET-Vektoren wird das Zielgen nicht direkt hinter dem *Ptaq*-Promotor, sondern hinter den T7- Φ 10-Promotor eingesetzt. Die für die Transkription des T7- Φ 10-Promotors notwendige T7-RNA-Polymerase ist in *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) pLysS und *E. coli* BL21 CodonPlus (Tab. 2.3) chromosomal kodiert. Da die chromosomal lokalisierte T7-RNA-Polymerase durch den *Ptaq*-Promotor reguliert wird, erfolgt die Expression der T7-RNA-Polymerase IPTG-abhängig. Dieses System zeichnet sich durch eine wesentlich stringenteren Kontrolle der Expression aus als Systeme, bei denen das Zielgen direkt hinter dem *Ptaq* liegt.

Für die Expression wurde im großen Maßstab 1 l LB-Medium supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika mit einer rekombinanten Übernachtskultur 1:50 beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,8 angezogen. Die Expression wurde durch die Zugabe von 0,2 M IPTG induziert und erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 U/min, 20 min, 4°C) geerntet und bei -20°C gelagert. Als Negativkontrolle wurde eine nicht induzierte Kultur verwendet. Die Überexpression des Proteins wurde mittels SDS-PAGE (2.7.6) überprüft.

Für Vortests wurden kleinere Volumina (5-100 ml LB-Medium) 1:50 mit einer rekombinanten Übernachtskultur beimpft. Bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,8 wurden die Bakterien zur Expression des rekombinanten Proteins mit 0,1 M IPTG induziert und nach 2 h Wachstum geerntet.

2.8.2 Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)

Die Affinitätschromatographie basiert auf der reversiblen Interaktion zwischen einem Protein und einem spezifischen Liganden, der an eine Chromatographie-Matrix gebunden ist. Histidin kann aufgrund des freien Elektronenpaars am Stickstoff des Imidazol-Rings Metalle komplexieren. Bei der IMAC bildet die stationäre Phase eine Agarosematrix, die über einen Chelator (z.B. NTA) an zweiwertige Metallionen (z.B. Ni²⁺) gekoppelt ist. Wird ein Protein mit Histidin-Peptid über die beladene Matrix geleitet, bindet es an das zweiwertige Metallion. Die Elution erfolgt durch Imidazol, das dem Heterozyklus des Histidins entspricht und so das His-„Tag“-Protein von der Matrix verdrängt. Für Vortests wurden die His-„Tag“-Proteine im kleinen Maßstab mit Nickel NTA-Beads der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Im großen Maßstab wurden Pellets in Puffer A supplementiert mit 4 mM PMSF und 250 U Benzonase resuspendiert und durch drei French Press-Zyklen (1000 psi) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (15000 U/min, 30 min) wurde der klare Überstand auf eine HisTrap HP-Säule aufgetragen, die am Chelator zweiwertige Nickelionen gebunden hat. Die Ni²⁺-Matrix wurde mit dem oben erwähnten Puffer gewaschen und das Zielprotein durch einen Imidazolgradient (0-500 mM in Puffer B) eluiert. Der Gradient wurde nach 10 ml bei 10 % Puffer B gestoppt bis die Basislinie stabil war, da unter diesen Bedingungen unspezifisch gebundene Proteine eluieren. Danach wurde ein 90 ml Gradient angelegt, der mit 100 % Puffer B endet. Das Zielprotein eluiert meist bei 25-30 % Imidazol. Die Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (2.7.6) oder Immunoblot (2.7.10) kontrolliert.

Puffer A	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	NaCl	300 mM
	(Harnstoff	6-8 M)
	Imidazol	5 mM

Puffer B	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	NaCl	300 mM
	(Harnstoff	6-8 M)
	Imidazol	500 mM

2.8.3 Ionenaustauschchromatographie

Das Verfahren der Ionenaustauschchromatographie beruht auf der elektrostatischen Bindung von geladenen Molekülen an eine gegensätzlich geladene Matrix. Proteine tragen je nach pH-Wert eine positive, keine oder eine negative Nettoladung. Der isoelektrischen Punkt (pI) ist der pH Wert, an dem das Protein keine Nettoladung aufweist. Proteine können dadurch an eine entsprechende Matrix, die ihrerseits positiv oder negativ geladen ist, binden. Die Elution erfolgt meist durch die Zugabe von Salz (z.B. NaCl). Proteine mit geringer Nettoladung werden dabei schneller verdrängt als Proteine mit einer hohen Nettoladung.

Die Proteinprobe wurde mit einer Entsalzungssäule (Desalting column HiPrep 26/10) umgepuffert bevor sie auf eine MonoQ- oder MonoS-Säule gegeben wurde, die vorher mit Äquilibrierungs-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Äquilibrierungs-Puffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem 0-100 % Gradienten des Elutionspuffers. Die positiven Fraktionen wurden für die anschließende Gelfiltration (2.8.3) vereinigt.

Äquilibrierungs-Puffer für die MonoS	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	pH: ~1 ½ Einheiten unter dem pI des Proteins	

Äquilibrierungs-Puffer für die MonoQ	Tris	50 mM
	pH: ~1 ½ Einheiten über dem pI des Proteins	

Elutionspuffer für die MonoS	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	NaCl	1 M

Elutionspuffer für die MonoQ	Tris	50 mM
	NaCl	1 M

2.8.4 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine aufgrund ihrer Größenunterschiede aufgereinigt. Als Matrix dient eine poröse Polymerstruktur. Große Moleküle können nicht in die Poren der Polymere diffundieren und wandern innerhalb des Ausschlußvolumens als erste durch die Säule. Kleine Proteine diffundieren in die porösen Gelpartikel und eluieren entsprechend später.

Gelfiltrationen wurden mit einer Superdex 75 PC 3.2/30 oder Superdex 200 PC 3.2/30 durchgeführt. Die Säulen wurden mit dem gewünschten Puffer äquilibriert (Phosphat-Puffer) und anschließend die Proteinprobe aufgetragen. Die Eluate wurden fraktioniert und mit SDS-PAGE analysiert (2.7.6).

Phosphat-Puffer	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	100 mM
	(Harnstoff	6 M)

2.9 Immunologische Methoden

2.9.1 Herstellung von anti-*Y. enterocolitica* Kaninchen Seren

Für die Identifizierung neuer *Yersinia* Antigene wurden anti-*Y. enterocolitica* Hyperimmunsere in Kaninchen im Rahmen von TV-Nr. 209.1/211-2531.6-15/03 zur Verfügung gestellt. Die Hyperimmunsere wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (13, 21, 29 und 35 Tage nach Infektion) von peroral infizierten Kaninchen erhalten (Heesemann *et al.*, 1988). Für die Infektion wurden die *Y. enterocolitica* Stämme Y-114, Y-11, 108-P und Y-96 ($2 \cdot 10^9$ in 10 % Carbonatpuffer) verwendet. Für die Gewinnung des Serums wurde das erhaltene Blut 1 h bei RT inkubiert und dann bei 5000 U/min zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert (Tab. 2.13). Die Langzeitlagerung findet bei -80°C statt.

2.9.2 Herstellung von anti-*C. jejuni* Kaninchen Seren

Um neue *C. jejuni* Antigene zu identifizieren wurden anti-*C. jejuni* Hyperimmunsere von Kaninchen im Rahmen von TV-Nr. 209.1/211-2531.6-15/03 zur Verfügung gestellt. Die Kaninchen wurden wie in Tabelle 2.15 angegeben immunisiert. Es wurden die *C. jejuni* Stämme P19, L11, No.4 und N87 verwendet.

Tab. 2.15: Immunisierungsprotokoll

Tag	Bemerkung
0. Tag	Präimmunserum (2 ml) Per orale Immunisierung ($1 \cdot 10^9$ Zellen in 10 % Carbonatpuffer)
7. Tag	Abstrich, Kotprobe und Isolierung der Rückisolate Cj-K5, Cj-K6, Cj-K7 und Cj-K8
12. Tag	Blutprobe aus der Ohrvene
26. Tag	Abstrich, Kotprobe und Blutprobe aus der Ohrvene
30. Tag	Blutprobe aus der Ohrvene
36. Tag	Blutprobe aus der Ohrvene
39. Tag	Intravenöse Immunisierung in die Ohrvene mit den Rückisolaten ($1 \cdot 10^7$ Zellen in 10 % Carbonatpuffer) Abstrich und Kotprobe
47. Tag	Blutprobe aus der Ohrvene
49. Tag	Intravenöse Immunisierung der Kaninchen 5 und 7 in die Ohrvene mit den Rückisolaten Cj-K5 bzw. Cj-K7
50. Tag	Entblutung von Kaninchen 5
53. Tag	Entblutung von Kaninchen 7
55. Tag	Entblutung von Kaninchen 8

2.10 Biophysikalische Methoden

2.10.1 MALDI-TOF

Proteine wurden durch MALDI-TOF (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-Of-Flight*) Analyse identifiziert. Hierfür wurden die Proteine manuell mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus den Gelen ausgestochen. Die anschließende Probenbearbeitung und massenspektrometrische Analyse erfolgte im Labor von Herrn Prof. Imhoff im Adolf-Butenandt-Institut (Schillerstr. 44, 80336 München) der LMU-München in einem Voyager DE STR (Applied Biosystems, Foster City, USA) im reversen Modus. Die Kalibrierung der Peptidmassen erfolgte intern auf die bekannten Massen der Autolysepeptide von Trypsin. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Herrn Tilman Schlunk und Herrn Pierre Schilcher mit Hilfe der Suchmaschine Mascot.

2.11 *in silico* Analysen

Für die Analyse von Proteinen mit unbekannter Funktion wurde für die Suche nach Protein-Motiven die Datenbanken MOTIF (<http://motif.genome.jp>), Pfam 23.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk>) und PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>) verwendet (Finn *et al.*, 2008; Hulo *et al.*, 2008). Das Alignment von DNA- oder Protein-Sequenzen wurde mittels DNAMAN (Lynnon Corporation, Quebec, Kanada) oder mit dem „Multiple Sequenz Alignment“ von F. Corpet erstellt (Corpet, 1988).

Die zelluläre Lokalisation von Proteinen mit unbekannter Funktion wurde mit PSORTb Version 2.0.2 (<http://www.psort.org/psortb>) und „Proteome Analyst - Subcell Specialization Server 2.5“ (<http://pasub.cs.ualberta.ca:8080/pa/Subcellular>) berechnet (Gardy *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004). Für die Vorhersage von potentiellen Signalsequenzen in Proteinen wurde LipoP Version 1.0 und SignalP Version 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services>) verwendet (Bendtsen *et al.*, 2004; Juncker *et al.*, 2003). Antigene Bereiche wurden mit dem Antigenicity Plot nach dem Algorithmus von Hopp und Woods bestimmt (<http://www.bioinformatics.org/JaMBW/3/1/7/>) (Hopp and Woods, 1981).

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer virulenzassoziierter *Yersinia* Antigene

Für die Yersiniose Diagnostik wurden neue virulenzassoziierte Antigene untersucht: Das MyfA von *Y. enterocolitica* und das homologe Protein PsaA von *Y. pseudotuberculosis*, sowie das Adhäsion YadA und das RtxA Toxin von *Y. enterocolitica*.

3.1.1 Die Antigene MyfA und PsaA

Das Myf-Antigen von *Y. enterocolitica* und das homologe pH6-Antigen von *Y. pseudotuberculosis* sind chromosomal kodierte Virulenzfaktoren (Iriarte *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996). MyfA konnte bis jetzt nur bei humanpathogenen Serotypen (O:3; O:9; O:5,27; O:8) von *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (Iriarte *et al.*, 1993; Toyos *et al.*, 1986). MyfA führt zur Clusterbildung der Bakterienzellen, ist mit der Pathogenität korreliert und stellt ein potentiell Antigen für die Diagnostik dar. Das MyfA Antigen ist zu 43 % identisch mit dem homologen Protein PsaA von *Y. pestis*, das das sogenannte pH6-Antigen bildet (Iriarte *et al.*, 1993). Ein Sequenzvergleich von MyfA von *Y. enterocolitica* O:9 und PsaA (pH6-Antigen) von *Y. pseudotuberculosis* ergab, dass ca. 43 % der Aminosäuren identisch sind, wobei die homologen Bereiche v. a. am C- und N-Terminus zu finden sind (Abb. 3.1).

Myfa_Protein_09	MNMKKEVKKPLAIAVLM LASGMVNMVHAEPTVINSKDIS	40
PsaAProtein	MKMKCFAKNALAVTILMIAACGMANAS...TVINSKDIS	36
Consensus	m mk f k la lm a gm n tvinskd s	
Myfa_Protein_09	ATKIVKEGGSFVVEFKATENEIVSGKLDADTPAFHLMVSD	80
PsaAProtein	GEVTVKQGNTEHVDFAPNTGEIFAGKQPGDVTMFTLIMGD	76
Consensus	tvk g f v f ei gk d f l m d	
Myfa_Protein_09	SGEHKGWNRPTGASEGGQMV SADGTRVLDLHTNELSWDND	120
PsaAProtein	TAPHCGWRLIPTGDSKGGYMSADGDYVGLYSYMSWVGI	116
Consensus	h gw ptg s gg m sadg v l sw	
Myfa_Protein_09	HWWI...DDGSERVEATFFLAACDEVMKAGEYQFTGRVEEY	157
PsaAProtein	DNNWYINDDSPKDIKDHLYVKACTVLEKPTTYKFTGRVEEY	156
Consensus	dd ag k y ftgrveey	
Myfa_Protein_09	V	158
PsaAProtein	V	157
Consensus	v	

Potentielle identische Epitope

Abb. 3.1: Sequenzvergleich der Proteine MyfA von *Y. enterocolitica* O:9 und PsaA von *Y. pseudotuberculosis*. Die gelb markierten Sequenzabschnitte stellen die homologen Bereiche und potentiell identischen Epitope am C- und N-Terminus dar.

Die Proteine MyfA und PsaA sollten rekombinant hergestellt werden und hinsichtlich ihrer serologischen Bedeutung und einer möglichen serologischen Differenzierung der enteropathogenen Yersinien Arten untersucht werden.

3.1.1.1 Klonierung von *myfA* und *psaA*

Das gesamte Gen *myfA* von *Y. enterocolitica* O:3 und das homologe Gen *psaA* von *Y. pseudotuberculosis* I wurden von chromosomaler DNA amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in den Expressionsvektor pET-21-b kloniert. Die Korrektheit der daraus resultierenden Plasmide pET21b-*myfA* und pET21b-*psaA* wurde mittels Sequenzierung überprüft (2.6.9). Des Weiteren wurden 3 Teilfragmente von *myfA* ohne die potentiellen identischen Epitope in pET-21-b kloniert, um das mögliche Auftreten von Kreuzreaktivitäten im Immunoblot untersuchen zu können (Abb. 3.2). Hierfür wurde wie unter 2.6.10.1 beschrieben vorgegangen. Daraus resultierten die Plasmide pET21b-*myf*ΔC, pET21b-*myf*ΔNC und pET21b-*myf*ΔN. Das rekombinante MyfΔC ist am C-Terminus um 12 AS und das rekombinante MyfΔN am N-Terminus um 40 AS verkürzt. Das rekombinante MyfΔNC ist sowohl am C-Terminus um 12 AS als auch am N-Terminus um 40 AS verkürzt. Die Transformation der Konstrukte erfolgte in *E. coli* BL21 pLys (2.6.8.1).

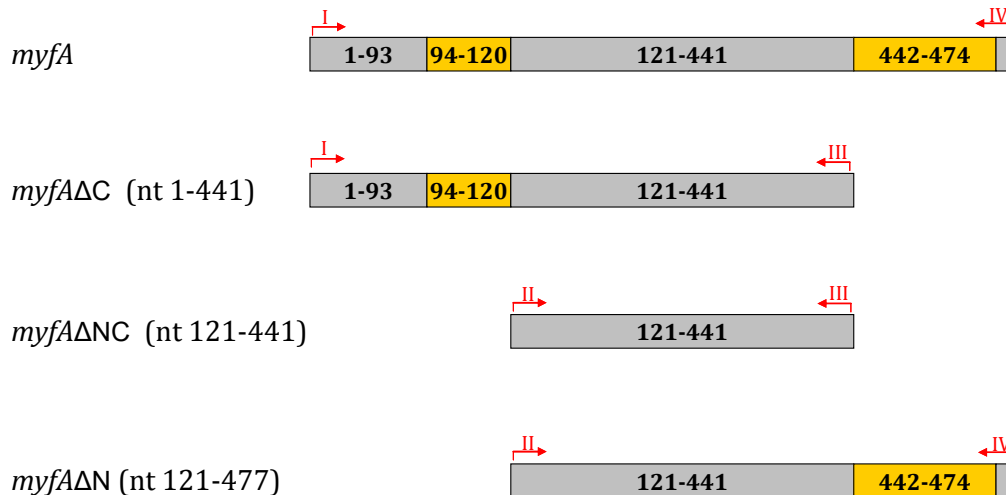


Abb. 3.2: Klonierung von *myfA* und *myfA* Teilfragmenten. Die gelben Abschnitte stellen die potentiellen identischen Epitope mit PsaA von *Y. pseudotuberculosis* dar. Die Zahlen geben die Nukleotide wider. Die römischen Zahlen kennzeichnen die verwendeten Oligonukleotide (I: YeO:3-*myfA*-f-NdeI; II: *myfA*_121f_NdeI; III: *myfA*_441rev_XhoI; IV: Ye-*myfA*_rev). Alle Teilfragmente wurden in den Expressionsvektor pET-21-b kloniert.

3.1.1.2 Produktion und Reinigung von MyfA, MyfA-Teilfragmenten und PsaA

Die Überexpression der His-tag Fusionen erfolgte in *E. coli* BL21 pLys bei 37°C. Die Proteine wurden anschließend unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (2.8). Die Reinigung von MyfA erfolgte zuerst über eine His-Trap HP-Säule (2.8.2). Restliche Verunreinigungen wurden im Anschluss über eine Ionenaustauschersäule (MonoQ) entfernt (2.8.3). Die Elution erfolgte in 50 mM Tris und 5 M Harnstoff bei pH 6,6. Die Reinigung von Myf Δ C und von Myf Δ NC erfolgte über Affinitätschromatographie (His-Trap HP Säule) in 40 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol und 8 M Harnstoff bei pH 7,8. Myf Δ N wurde zuerst über eine His-Trap HP Säule und anschließend über eine Ionenaustauschersäule gereinigt (MonoQ). Die endgültige Reinigung erfolgte über Gelfiltration (Superdex 75) in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT und 8 M Harnstoff bei pH 7 (2.8.3). Die Reinigung von PsaA wurde mittels Affinitätschromatographie (His-Trap HP Säule) durchgeführt und in 40 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol und 6 M Harnstoff bei pH 7,8 eluiert (2.8.2). Da die rekombinanten Proteine im „Line Assay“ verwendet wurden, durften keine *E. coli* Rückstände vorhanden sein. Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot (2.7.10) mit Kaninchen Anti-*E. coli* JS69 Serum (Tab. 2.13) bestätigt (Abb. 3.3). Die neben der jeweiligen Hauptbande angefärbten schwächeren Nebenbanden scheinen Degradationsfragmente von MyfA bzw. PsaA und nicht *E. coli* Proteine zu sein (Negativer Immunoblot, Abb. 3.3 B).

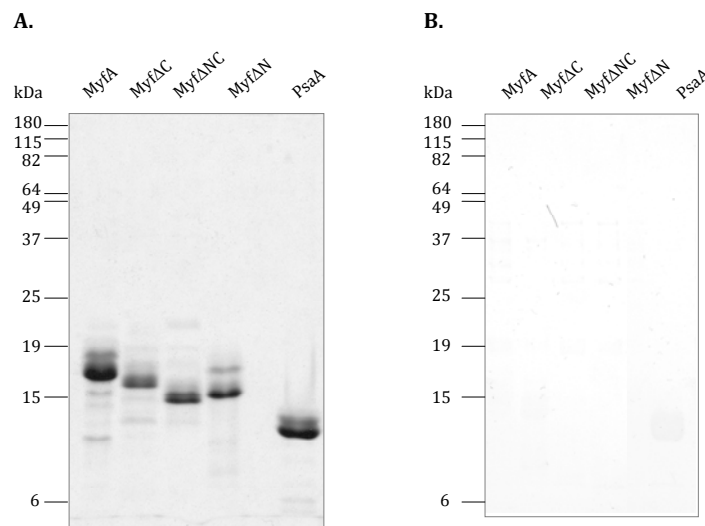


Abb. 3.3: SDS-PAGE und Immunoblot mit den rekombinanten Proteinen MyfA, Myf Δ C, Myf Δ NC, Myf Δ N und PsaA. (A) Die Proteine MyfA, Myf Δ C, Myf Δ NC, Myf Δ N und PsaA wurden als His-tag-Fusionen rekombinant in *E. coli* BL21pLys überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt Coomassie Blau Färbung. (B) Elektrophoretische Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Inkubation mit Anti-*E. coli* JS69 Serum (1:200) und Z α K-IgG-HRP.

Das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine wurde sowohl anhand der Aminosäuresequenz berechnet, als auch aufgrund des Laufverhaltens im SDS-Gel experimentell bestimmt. Der isoelektrische Punkt wurde ebenfalls anhand der Aminosäuresequenz berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Eine Abweichung des berechneten und des Molekulargewichtes im SDS-Gel ist vor allem bei PsaA zu beobachten.

Tab. 3.1: Molekulargewicht (MW) und isoelektrischer Punkt (pI) der rekombinanten Proteine. Die Werte wurden durch die Aminosäuresequenz der Proteine berechnet bzw. aufgrund des Laufverhaltens im SDS-Gel bestimmt. Der Hexa-Histidin-Tag ist mit in die Berechnung einbezogen.

Protein	berechnetes MW (kDa)	experimentell ermitteltes MW (kDa)	berechneter pI
MyfA	18,4	~ 17	5,25
MyfΔC	16,9	~ 16	5,70
MyfΔNC	12,8	~ 15	4,80
MyfΔN	14,3	~ 15,5	4,62
PsaA	18,3	~ 11	6,80

3.1.1.3 Immunoblot mit rekombinanten MyfA- und PsaA-Proteinen

Die Proteine MyfA und PsaA wurden im Immunoblot hinsichtlich ihrer Antigenität untersucht (2.7.10). Hierfür wurden die Proteine in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wurde in Streifen geschnitten. Die Streifen wurden mit verschiedenen verdünnten Anti-Seren inkubiert (Abb. 3.4).

Mit einem Anti-His Nickel-NTA-Konjugat (Abb. 3.4 Streifen 1) wurden die His-getaggten Proteine nachgewiesen. Die Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchenserum (a-YK1, a-YK4, a-Y-108-i.v., a-Y-96-i.v.; Tab. 2.13) zeigten sowohl mit MyfA als auch mit dem homologen Protein PsaA eine Reaktion im Immunoblot (Abb. 3.4 Streifen 2 a-d). Auch das Anti-MyfA Serum (Tab. 2.13; Abb. 3.4 Streifen 5) reagierte mit beiden Proteinen. Dahingegen zeigte das Anti-*Y. pseudotuberculosis* Kaninchenserum (a-Y-P-1; Tab. 2.13) keine Reaktion mit dem rekombinanten MyfA Protein (Abb. 3.4 Streifen 3). Die Yop-positiven Yersiniose Patientenserum (2.7.12.1) zeigten eine Reaktion mit beiden Proteinen (Abb. 3.4 Streifen 6). Die Kreuzreaktivität zwischen MyfA und PsaA könnte auf die homologen Bereiche am C- und N-Terminus zurückzuführen sein (Abb. 3.1), weshalb die Teilfragmente MyfΔC, MyfΔNC und MyfΔN hergestellt wurden.

ERGEBNISSE

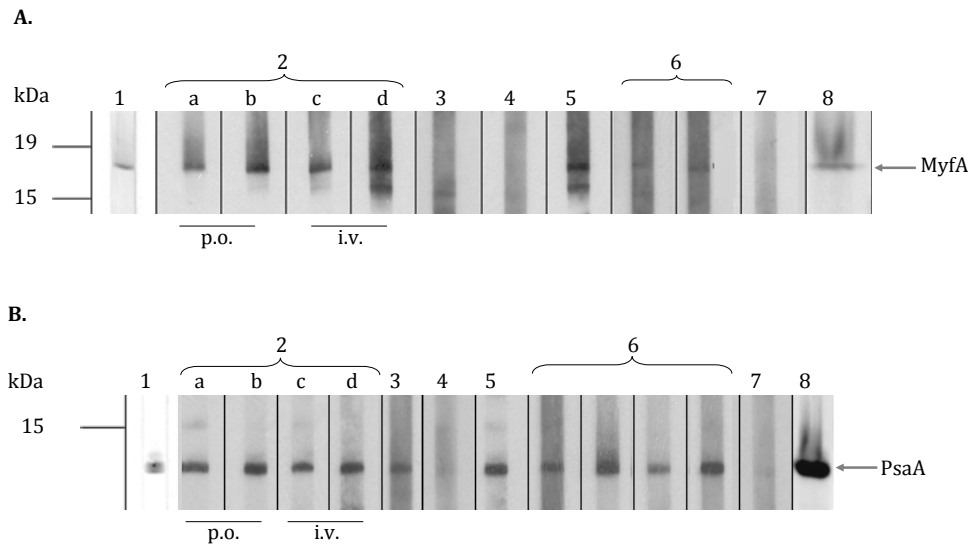


Abb. 3.4: MyfA und PsaA Immunoblot. (A) MyfA und (B) PsaA wurden als His-tag-Fusionen rekombinant in *E. coli* BL21pLys überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die in Streifen geschnitten wurde. 1) Anti-His Ni-NTA-Konjugat; 2) Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchenserum. a: a-YK1; b: a-YK4; c: a-Y-108-i.v.; d: a-Y-96-i.v.; 3) Anti-*Y. pseudotuberculosis* Kaninchenserum a-Y-P-1; 4) Präimmun-Serum YK1; 5) Anti-MyfA-Serum; 6) Yop-positive Patientenserum; 7) Yop-negatives humanes Serum YNHS; 8) SDS-Gel Coomassie Blau Färbung. Serumverdünnungen 1:200. Als Sekundärantikörper wurden Z α K-IgG-HRP bzw. K α H-IgG-HRP verwendet.

Aufgrund der möglichen kreuzreaktiven Bereiche wurden die Teilfragmente von MyfA ebenfalls hinsichtlich ihrer Antigenität getestet (Abb. 3.5). Hierfür wurden die MyfA-Teilfragmente zusammen mit dem gesamten MyfA in einem 15 %igen-SDS-Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die eingesetzten Proteinmengen betragen für das SDS-Gel ~ 2 μ g, für den Immunoblot ~ 1 μ g. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Anti-MyfA-Serum, a-YK3 bzw. a-YK4 und a-Y-P-1 (Tab. 2.13; Abb. 3.5). Das am C-Terminus verkürzte Protein Myf Δ C zeigte eine kaum detektierbare Reaktion mit den Antiseren a-YK3 und a-YK4. Dahingegen zeigte das am N-Terminus verkürzte Protein Myf Δ N mit dem Anti-MyfA-Serum und mit a-YK4 eine mit dem Gesamtprotein vergleichbare Reaktion. Das an beiden Enden verkürzte Protein Myf Δ NC zeigte keine Reaktion mit den verwendeten Anti-Seren. Der C-Terminus von MyfA könnte somit einen wichtigen antigenen Bereich darstellen. Die detektierten Proteinbanden von MyfA, die größer als die 18,4 kDa sind, stellen wahrscheinlich Polymere von MyfA dar, da die Proben vor dem Auftragen nicht aufgeköcht wurden und die Multimere von MyfA scheinen stärker antigen zu sein als das Monomer. Das verwendete Y-P-1 Serum zeigte keine Kreuzreaktionen mit MyfA und den MyfA-Teilfragmenten. Alle MyfA-Teilfragmente zusammen mit dem gesamten MyfA Protein und dem PsaA Protein wurden im „Line Assay“ untersucht (3.1.4).

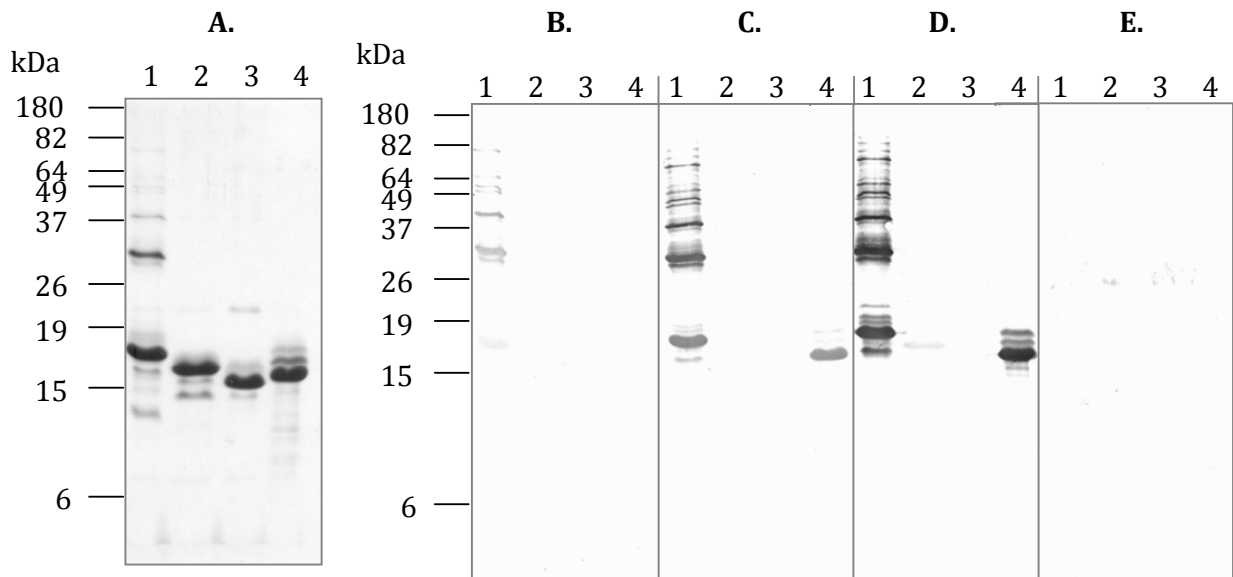


Abb. 3.5: SDS-Gel und Immunoblot mit MyfA und MyfA-Teilfragmenten. (1) MyfA und die Teilfragmente (2) Myf Δ C, (3) Myf Δ NC und (4) Myf Δ N wurden als His-tag-Fusionen rekombinant in *E. coli* BL21pLys überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine (~ 1 μ g Protein) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. **(A)** Coomassie Blau Färbung des SDS-Geles (~ 2 μ g Protein); **(B)** a-YK3 (1:200); **(C)** a-YK4 (1:200); **(D)** Anti-Myf-Serum (1:400); **(E)** a-Y-P-1(1:200). Als Sekundärantikörper wurde Z α K-IgG-HRP verwendet (1:1000).

3.1.2 Das virulenzassoziierte Protein YadA

YadA ist ein auf dem pYV-Plasmid kodierter Virulenzfaktor, der trimere „Lollipop“-Strukturen auf der Zelloberfläche von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* bildet (Balligand *et al.*, 1985;Bolin *et al.*, 1982;Bolin and Wolf-Watz, 1984;Hoiczkyk *et al.*, 2000). YadA ist ein multifunktionales Protein und vermittelt Zelladhärenz (Heesemann *et al.*, 1987;Roggenkamp *et al.*, 1996;Ruckdeschel *et al.*, 1996), Adhärenz an verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix (Emody *et al.*, 1989;Flügel *et al.*, 1994;Schulze-Koops *et al.*, 1993;Tamm *et al.*, 1993;Terti *et al.*, 1992), Autoagglutination (Balligand *et al.*, 1985) und Serumresistenz (Balligand *et al.*, 1985;Kirjavainen *et al.*, 2008;Pilz *et al.*, 1992;Skurnik *et al.*, 1984). Diese Eigenschaften und die für das Immunsystem gut zugängliche Lokalisierung auf der Zelloberfläche machen YadA zu einem potentiellen Antigen für die serologische Diagnostik.

3.1.2.1 Klonierung der Kopf-Halsstruktur von YadA

Die Kopffregion der Oca-Adhäsine ist variabel und wahrscheinlich für die verschiedenen Adhäsionseigenschaften verantwortlich. Aus diesem Grund wurde ein Teil der Kopffregion mit dem

angrenzenden Teil der Halsregion ausgewählt, um als potentiell Antigen getestet zu werden. Hierfür wurden die nt 216 bis 840 von *yadA* von dem pYV-Plasmid von *Y. enterocolitica* 108-P amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in pET21-b kloniert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pET21b-*yadA*₇₂₋₂₈₀ genannt und in *E. coli* BL21 pLys transformiert.

3.1.2.2 Expression und Reinigung der Kopf-Halsstruktur von *YadA*

Die Überexpression der His-tag *YadA*₇₂₋₂₈₀-Fusion erfolgte in *E. coli* BL21 pLys bei 37°C. Das rekombinante Protein wurde anschließend unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe von Affinitätschromatographie (His-Trap HP-Säule) aufgereinigt (2.8). Die Elution erfolgte mit 40 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol und 8 M Harnstoff bei pH 8,2. Die Reinheit der rekombinanten *YadA*₇₂₋₂₈₀ Proteins wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot (2.7.10) mit Anti-*E. coli* JS69 Serum (Tab. 2.13) bestätigt (Abb. 3.6).

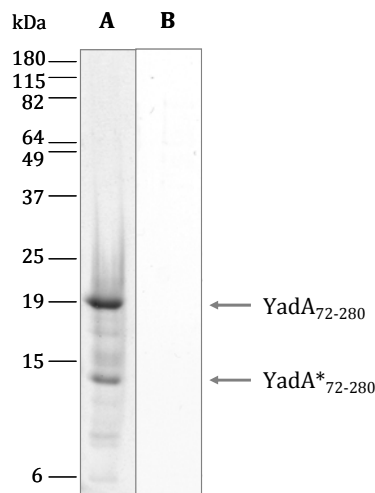


Abb. 3.6: 15 % SDS-PAGE und Immunoblot mit dem rekombinanten *YadA*₇₂₋₂₈₀ Protein. *YadA*₇₂₋₂₈₀ wurde als His-tag-Fusion rekombinant in *E. coli* BL21pLys überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. **(A)** Coomassie Färbung des SDS-Geles. **(B)** Elektrophoretische Übertragung von *YadA*₇₂₋₂₈₀ auf Nitrozellulosemembran. Inkubation mit Anti-*E. coli* JS69 (1:200) / Z α K-IgG-HRP für die Prüfung auf *E. coli* Rückstände im rekombinanten *YadA*₇₂₋₂₈₀ Eluat.

Es ist auffällig, dass zwei dominante Proteinbanden von dem rekombinanten *YadA*₇₂₋₂₈₀ im SDS-Gel zu sehen sind. Das berechnete Molekulargewicht von *YadA*₇₂₋₂₈₀ beträgt 22,2 kDa und der isoelektrische Punkt liegt bei 7,47. Aus dem SDS-Gel ergibt sich eine ungefähre Größe von *YadA*₇₂₋₂₈₀ von 19 kDa und 14 kDa (*YadA**₇₂₋₂₈₀). Das Phänomen der Doppelbanden trat auch bei mehrmaligen Wiederholungen auf.

3.1.2.3 Immunoblot mir rekombinanten YadA₇₂₋₂₈₀ Protein

Die Antigenität des rekombinanten YadA₇₂₋₂₈₀ Proteins wurde im Immunoblot untersucht (Abb.3.7). Hierfür wurden YadA₇₂₋₂₈₀ in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wurde in Streifen geschnitten und die Streifen wurden mit verschiedenen Seren inkubiert (Abb. 3.7). Mit einem Anti-His Nickel-NTA-Konjugat (Abb. 3.7 Streifen 1) wurde das His-Fusionsprotein YadA₇₂₋₂₈₀ ebenfalls als Doppelbande nachgewiesen. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass es sich nicht um eine Verunreinigung mit *E. coli* Proteinen handelt, sondern um den „His-getaggten“ C-Terminus des YadA₇₂₋₂₈₀ Proteins. Die Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchen Seren reagierten mit dem rekombinanten YadA Protein, wobei die durch parenterale (i.v.) Infektion erhaltenen Hyperimmunsereen a-Y-108-i.v. und a-Y-96-i.v. (Abb. 3.7 Streifen 2 c bzw. 2 d) eine stärkere Reaktion zeigten als die durch perorale Infektion a-YK1 und a-Y-K4 (Abb. 3.7 Streifen 2 a bzw. 2 b). Das Anti-*Y. pseudotuberculosis* Kaninchenserum a-Y-P-1 zeigte keine Reaktion (Abb. 3.7 Streifen 3). Die Yop-positiven Patientensereen (2.7.12.1) reagierten unterschiedlich stark mit dem rekombinanten Protein (Abb. 3.7 Streifen 4). Das rekombinante YadA₇₂₋₂₈₀ Protein wurde weiter im Line Assay hinsichtlich der Antigenität untersucht (3.1.2).

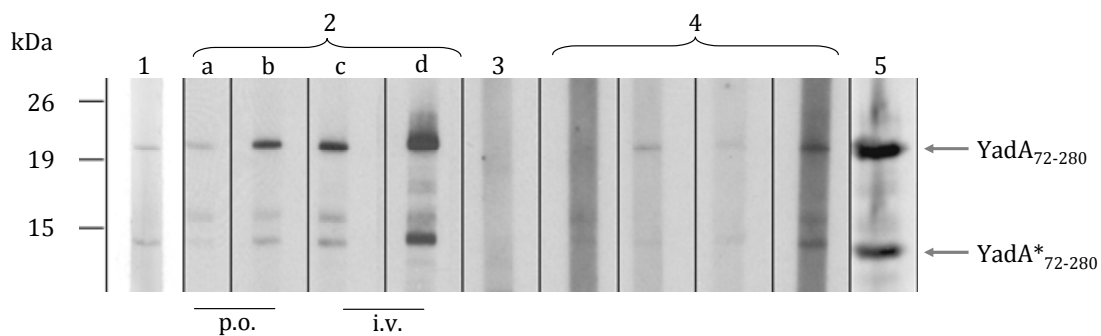


Abb. 3.7: YadA₇₂₋₂₈₀ Immunoblot. Die Kopfreion von YadA wurde als His-tag-Fusion rekombinant in *E. coli* BL21pLys überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde YadA₇₂₋₂₈₀ elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die in Streifen geschnitten wurde. 1) Anti-His Ni-NTA-Konjugat; 2) Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen. a: a-YK1; b: a-YK4; c: a-Y-108-i.v.; d: a-Y-96-i.v.; 3) Anti-*Y. pseudotuberculosis* Kaninchenserum a-Y-P-1; 4) Yop-positiven Patientensereen; 5) Coomassie Blau Färbung. Serumverdünnungen 1:200. Als Sekundärantikörper wurden ZaK-IgG-HRP bzw. Polyklonales K α H-IgG-HRP verwendet.

3.1.3 Das RTX-like Protein RtxA

Das RtxA Protein gehört zur Familie der *multifunctional autoprocessing repeats in toxin*-Toxine (MARTX) (Satchell, 2007). Es ist zu 61% identisch mit dem RtxA Toxin von *Vibrio cholerae*. Über die pathogenetische Bedeutung oder Funktion von RtxA von *Yersinia* ist nichts bekannt. Aus der *rtxA* Gensequenz kann ein 3212 Aminosäuren großes Protein hergeleitet werden, das für die MARTX-Familie typische C-terminale Glycin-reiche Sequenzmotiv und das C-terminale Sekretionssignal besitzt. Die hydrophobe porengebildende Domäne am N-Terminus fehlt (Golubov, 2005). RtxA konnte bisher nur bei den europäischen enteropathogenen *Yersinia enterocolitica* Serotypen O:3 und O:9 nachgewiesen werden.

Ein rekombinantes Fragment von RtxA (Aminosäuren 1-708), Rtx79 genannt (Golubov, 2005), wurde hinsichtlich der Antigenität im Immunoblot untersucht. Rtx79 wurde in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wurde in Streifen geschnitten und die Streifen wurden mit verschiedenen Seren inkubiert (Abb. 3.8).

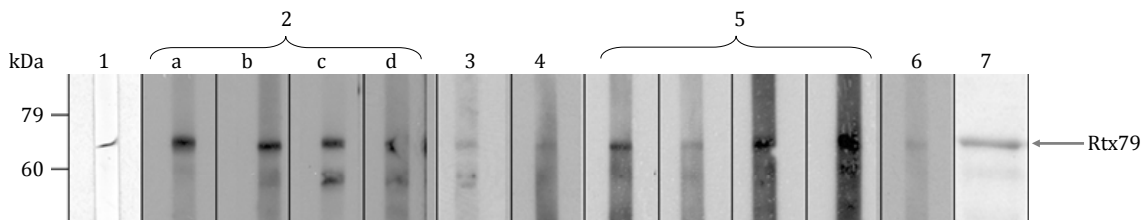


Abb. 3.8: Rtx79 Immunoblot. Das rekombinante Rtx79 wurde in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde Rtx79 elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die in Streifen geschnitten wurde. 1) Anti-His Ni-Konjugat; 2) Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchenseren. a: a-YK1; b: a-YK4; c: a-Y-108-i.v.; d: a-Y-96-i.v.; 3) Anti-*Y. pseudotuberculosis* Kaninchenserum a-Y-P-1; 4) Präimmun-Serum YK1; 5) Yop-positive Patientenseren; 6) Yop-negatives humanes Serum YNHS; 7) Coomassie Blau Färbung. Serumverdünnungen 1:200. Als Sekundärantikörper wurden ZaK-IgG-HRP bzw. KaH-IgG-HRP verwendet.

Mit einem Anti-His Ni-NTA-Konjugat (Abb. 3.8 Streifen 1) wurde das His-getaggte Rtx79 nachgewiesen. Alle vier verwendeten Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchenseren (Tab. 2.13; Abb. 3.8 Streifen 2 a-d) und die Yop-positiven Patientenseren (2.7.12.1; Abb. 3.8 Streifen 5) reagierten mit dem rekombinanten Rtx79 Protein. Das Anti-*Y. pseudotuberculosis* Kaninchenserum a-Y-P-1 (Tab. 2.13; Abb. 3.8 Streifen 3), das Präimmun-Serum Y-K1 (Tab. 2.13; Abb. 3.8 Streifen 4) und das humane Yop-negative Serum YNHS (2.7.12.1; Abb. 3.8 Streifen 6) zeigten jeweils eine sehr

schwache Reaktion. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten weitere Teilstücke von RtxA rekombinant hergestellt und hinsichtlich ihrer Antigenität und Spezifität untersucht werden.

3.1.3.1 Klonierung des RtxA Proteins

Das Gen *rtxA*, das das RtxA Protein kodiert, besitzt eine Größe von 9639 bp. Aus diesem Grund wurde das Gen in drei gleich große Abschnitte geteilt, die wie unter 2.6.10.1 in pET-21b kloniert wurden (Abb. 3.9). Die daraus resultierenden Plasmide pET21b-rtx1, pET21b-rtx2 und pET21b-rtx3 wurden in *E. coli* BL21 pLys transformiert.

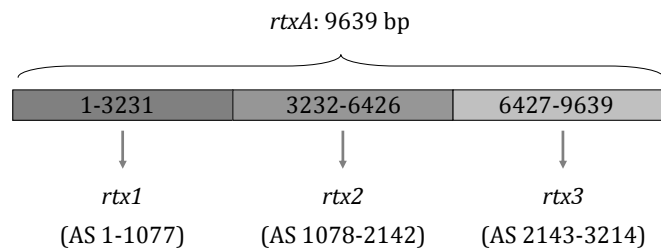


Abb. 3.9: Klonierte Teilfragmente von *rtxA*. Aufgrund der Größe von 9639 bp wurde das Gen *rtxA* in drei gleich große Abschnitte geteilt und in den Expressionsvektor pET-21b kloniert. Die Teilfragmente wurden *rtx1*, *rtx2* und *rtx3* genannt. In Klammern sind die kodierten Aminosäuren (AS) angegeben.

3.1.3.2 Produktion und Reinigung der RtxA Teilfragmente

Die Überexpression der His-getaggen RtxA-Teilfragmente erfolgte in *E. coli* BL21 pLys bei 37°C. Eine Überproduktion war nur beim Protein Rtx3 zu beobachten. Das Protein Rtx1 zeigte eine sehr schwache Produktion, die auch durch Variation der Kulturbedingungen nicht verbessert werden konnte. Eine Produktion von Rtx2 konnte nicht nachgewiesen werden. In Tabelle 3.2 ist das berechnete Molekulargewicht mit dem jeweiligen isoelektrischen Punkt zusammen mit dem im SDS-Gel experimentell bestimmten Molekulargewicht der Teilfragmente angegeben. Bei der Aufreinigung des stark produzierten Rtx3 ließ sich das Protein weder unter nativen noch unter denaturierenden Bedingungen eluieren. Die Konstrukte wurden für die weitere Evaluierung der Mikrogen GmbH übergeben.

Tab. 3.2: Molekulargewicht (MW) und isoelektrischer Punkt (pI) der rekombinanten Proteine. Die Werte wurden durch die Aminosäuresequenz der Proteine berechnet. Der Hexa-Histidin-Tag ist mit in die Berechnung einbezogen.

Protein	berechnetes MW (kDa)	experimentell ermitteltes MW(kDa)	berechneter pI
Rtx1	112,9	~ 120	9,26
Rtx2	120,5	/	9,03
Rtx3	118,2	~ 120	4,59

3.1.4 Yersinia „Line Assay“

Bevor die serologische Brauchbarkeit der neuen Yersinien Antigene MyfA, Myf Δ C, Myf Δ NC, Myf Δ N, PsaA und YadA₇₂₋₂₈₀ evaluiert wurde, wurden weitere Vortests im Form des „Line Assays“ gemacht, um die Antigenität der rekombinanten Proteine beurteilen zu können. Als Positivkontrolle wurde YopD rekombinant hergestellt. Das Plasmid pGEX-YopD (Tab. 2.6) wurde in *E. coli* BL21 pLys transformiert und die Expression wurde bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurde das rekombinante YopD über eine Ionenaustauschersäule (MonoS) aufgereinigt und in 50 mM MES und 8 M Harnstoff eluiert (2.8.3). Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen aller rekombinanten Proteine mittels Bradford bestimmt (3.7.4), die der Tabelle 3.3 zu entnehmen sind.

Tab. 3.3: Proteinkonzentrationen der rekombinanten Proteine. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford ermittelt.

Protein	Proteinkonzentration
YopD	unter der Nachweisgrenze
YadA ₇₂₋₂₈₀	1,2 mg/ml
MyfA	2 mg/ml
Myf Δ C	1,2 mg/ml
Myf Δ NC	2,2 mg/ml
Myf Δ N	2,5 mg/ml
PsaA	1,2 mg/ml

Dann wurden „Line Assays“ mit dem Miniblotter 45 angefertigt (2.7.11.1). Die rekombinanten Proteine wurden unverdünnt und in 1:2, 1:4 und 1:8 Verdünnungen eingesetzt, um die geeignete Proteinkonzentration, bei der keine unspezifischen Reaktionen auftreten, zu bestimmen. Die Nitrozellulosemembran wurde im Anschluss in Streifen geschnitten. Die Streifen wurden mit Präimmunsereen (K1, K2, K3, K4), Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen (a-YK1, a-YK2, a-YK3, a-YK-4) bzw. Anti-*E. coli* JS69 Serum inkubiert und die Reaktivität im IgG untersucht. Die Auswertung ergab, dass eine 1:8 Verdünnung der Proteine eingesetzt werden muss, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Im nächsten Schritt wurden „Line Assays“ mit einer 1:8 Verdünnung der

ERGEBNISSE

rekombinanten Proteine hergestellt und mit Kaninchen Präimmunsereen bzw. mit Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen inkubiert, um die IgG-Reaktivität zu testen (Abb. 3.10 A). Zur Überprüfung und um Vergleichswerte für die spezifische Reaktivität der hergestellten Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen zu erhalten, wurde die IgG-Reaktivität im recomLine Yersinia der Mikrogen GmbH mitgetestet (Abb. 3.10 B). Wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist, reagierte kein Kaninchen Präimmunsereum (Y-K1, Y-K2, Y-K3, Y-K4) mit den rekombinanten Yersinien Antigenen. Das Reaktivitätsmuster der Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen mit den recomLine Yersinia Antigenen (YopM, YopH, V-AG, YopD, YopN, YopE) zeigte, dass die Immunisierung der Kaninchen erfolgreich war. Alle Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen reagierten sowohl mit den neuen Antigenen YadA₇₂₋₂₈₀ und MyfA als auch mit der Positivkontrolle YopD. Die Reaktivität gegen die verkürzten MyfA Fragmente war bei allen Seren geringer als die Reaktivität gegen das gesamte MyfA Protein. Alle Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen reagierten nur schwach mit dem PsaA Protein, was einen Hinweis für eine mögliche serologische Unterscheidung zwischen MyfA und PsaA ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mit den Konstrukte pET21b-yadA₇₂₋₂₈₀, pET21b-myfA und pET21b-psaA weitere Evaluierungsschritte durchgeführt. Die verkürzten MyfA-Konstrukte wurden aufgrund der geringeren Reaktivität nicht weiter verwendet.

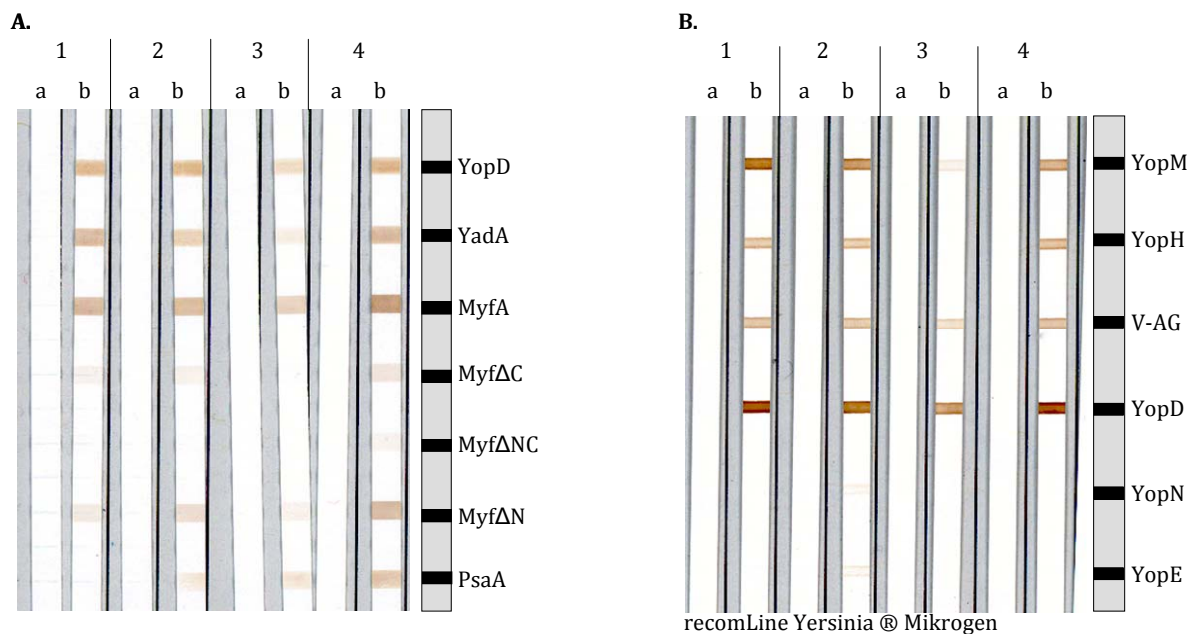


Abb. 3.10: IgG-Reaktivität der anti-*Y. enterocolitica* Kaninchensereen (a-YK) mit den neuen rekombinanten Yersinien Antigenen und mit den Antigenen des recomLine Yersinia. (A) „Line Assay“ mit den rekombinanten Yersinien Antigenen YopD, YadA₇₂₋₂₈₀, MyfA, MyfΔC, MyfΔNC, MyfΔN und PsaA. Die rekombinanten Yersinien Antigene wurden in einer 1:8 Verdünnung mit Hilfe eines Miniblotters 45 auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht, die anschließend in Streifen geschnitten wurde. **(B)** recomLine Yersinia (Mikrogen GmbH). 1a: YK1; 1b: a-YK1; 2a: YK2; 2b: a-YK2; 3a: YK3; 3b: a-YK3; 4a: YK4; 4b: a-YK4. Als Sekundäntikörper wurde ZaK-IgG-HRP verwendet.

Des Weiteren wurden erste Voruntersuchungen der IgG-Reaktivität von 7 Patientenseren und 7 Blutspenderseren gegen die neuen Antigene im „Line Assay“ durchgeführt. Hierfür wurden die „Line Assay“-Streifen mit den Patientenseren bzw. mit den Blutspenderseren inkubiert. Anschließend wurde die IgG-Reaktivität getestet. Die Voruntersuchung ergab, dass 71 % der Patientenseren und 29 % der Blutspenderseren mit YopD reagierten. Gegen YadA waren 85 % der Patientenseren und alle Blutspenderseren positiv. Gegen das gesamte MyfA Protein reagierten 14 % und gegen das am N-Terminus verkürzte Myf Δ N 28 % der Patientenseren. Mit dem am C-Terminus und an beiden Enden verkürzte Myf Δ C bzw. Myf Δ NC Protein reagierte kein Serum positiv. Die IgG-Reaktivität gegen PsaA betrug bei den Patientenseren 42 % und bei den Blutspenderseren 57 %. Aufgrund der geringen Anzahl an verwendeten Seren sind diese Aussagen aber nicht signifikant. Deshalb wurden die Proteine mit einer großen Anzahl an Patienten- und Blutspenderseren evaluiert (3.1.5).

3.1.5 Evaluierung der rekombinanten *Yersinia* Antigene

Die Evaluierung der rekombinanten *Yersinia* Antigene YadA₇₂₋₂₈₀, Rtx3, MyfA und PsaA wurde in Zusammenarbeit mit der Mikrogen GmbH durchgeführt und ist im Anhang unter Punkt 7.1 ausführlich dargestellt.

3.1.5.1 Evaluierung der Yersinien Antigenen YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3

Die serologische Bedeutung der neuen Yersinien-Antigene YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3 wurde anhand der antigenspezifischen Reaktivitäten von drei verschiedenen Serengruppen in „Line Assays“ untersucht: Yersiniose-Patientenseren sowie Yop-positive und -negative Blutspenderseren des bayerischen Roten Kreuzes. Das **YadA₇₂₋₂₈₀** Protein zeigte in allen Serengruppen eine IgG- und IgA-Reaktivität. Jedoch war die IgG-Reaktivität gegen YadA₇₂₋₂₈₀ in den Yersiniose Patientenseren (67 %) stärker als die der Yop-negativen Blutspenderseren (21 %) und die der Yop-positiven Blutspenderseren (16 %) (Anhang Tab. 7.4 und Tab. 7.5). Auffallend war die starke IgA-Reaktivität, die bei den Yersiniose Patienten bei 94 % und bei den Yop-positiven bzw. Yop-negativen Blutspenderseren bei 58 % bzw. 42 % lag (Anhang Tab. 7.4 und Tab. 7.5). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Bindung von aufgereinigten humanen IgA mit YadA₇₂₋₂₈₀ überprüft und auch bestätigt (C. Nölting, Mikrogen GmbH, Ergebnisse nicht gezeigt). Zusätzlich konnte mit dem Yop-negativen humanen Serum YNVN (2.7.12.1) die unspezifische Bindung von IgG und IgA an natives YadA (2.7.3) von verschiedenen *Y. enterocolitica* Serogruppen gezeigt werden (Abb. 3.11). Die fehlende Reaktion mit den nativen Yops

ERGEBNISSE

(2.7.1) bestätigte, dass keine spezifischen Serumantikörper in dem verwendeten Serum YNVN gegen Yersinien vorhanden sind (negative *Yersinia*-Serologie).

Das Teilfragment 3 des RtxA-Antigens (**Rtx3**) reagierte nur mit der Antikörperklasse IgG. Jedoch zeigten sowohl Yop-positive als auch Yop-negative Seren diese Reaktivität (Anhang. Tab. 7.4 und Tab. 7.5). Eine IgA-Reaktivität gegen das Rtx3 war nicht nachzuweisen.

Die Ergebnisse der serologischen Beurteilung von YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3 sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

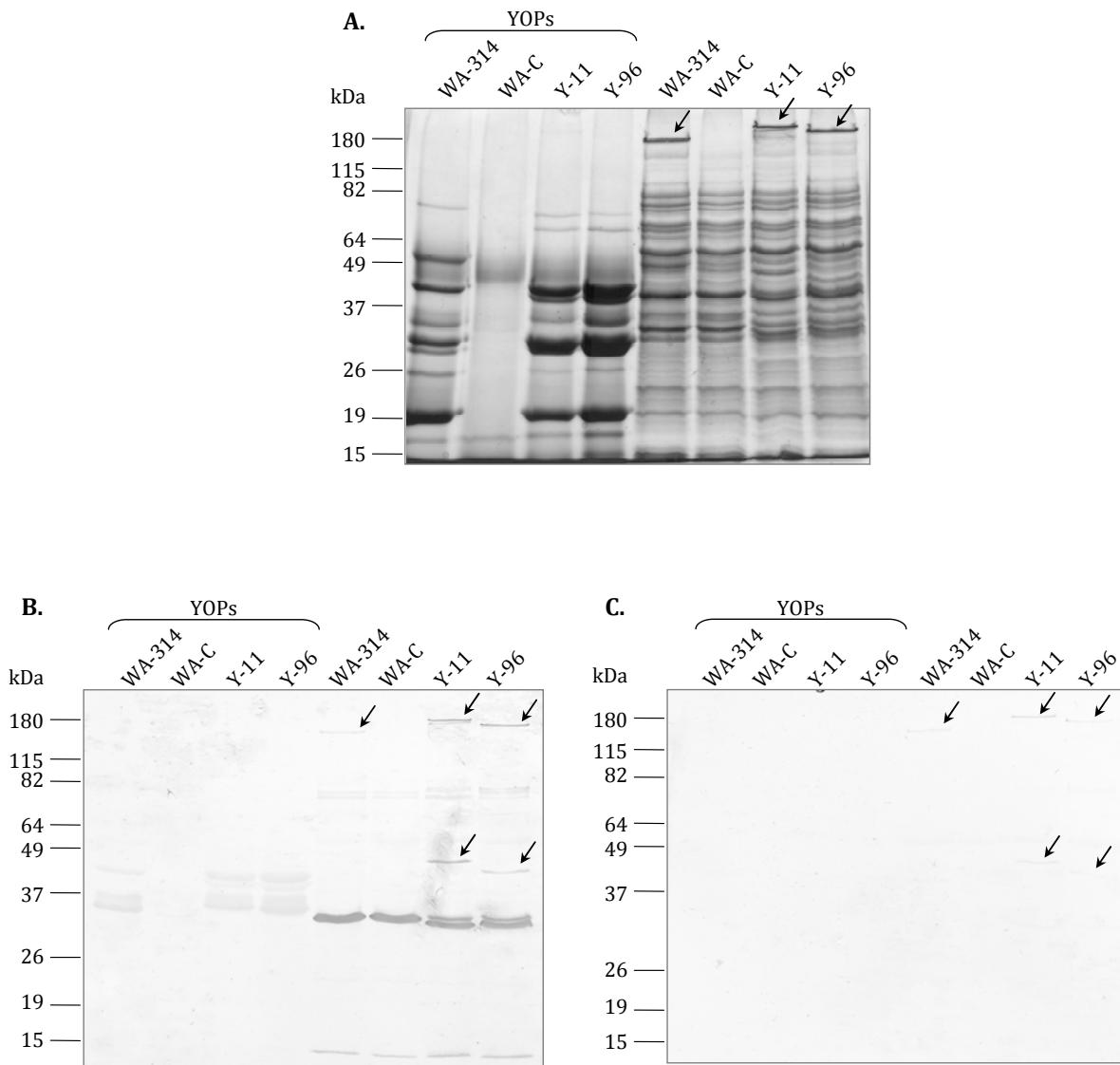


Abb. 3.11: Immun-unabhängige Bindung von humanem IgG und IgA an natives YadA. Von den Yersinien Stämmen WA-314 (O:8), WA-C (O:8 Δ pYV), Y-11 (O:3) und Y-96 (O:9) wurden die Yops isoliert und die YadA Expression induziert. Auftrennung der Proteine in einem 10 %igen SDS-Gel und anschließender Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Inkubation mit dem humanen Yersinien Kontrollserum YNVN (1:100). **(A)** 10 %iges SDS-Gel Coomassie Blau gefärbt. **(B)** KaH-IgG-HRP (1:2000); **(C)** KaH-IgA-HRP (1:2000). YadA (Oligo- und Monomere) wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Tab. 3.4: Zusammenfassung der IgG- und IgA-Reaktivitäten gegen die neuen Yersinien Antigene YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3. YopD wurde als positiver Referenzwert mit aufgeführt. KTL: Patientenseren aus Finnland (Granfors *et al.*, 1998); Y+ BSS: Yersinien positive Blutspenderseren; BSS: Yersinien negative Blutspenderseren.

	IgG			IgA		
	YopD	YadAKopf	Rtx3	YopD	YadAKopf	Rtx3
KTL n=18 Reaktivität	17 94%	12 67%	11 61%	17 94%	17 94%	0
Y+ BSS n=19 Reaktivität	17 90%	3 16%	13 68%	13 68%	11 58%	0
BSS n=19 Reaktivität	3 16%	4 21%	8 43%	2 10,5	8 42%	0

3.1.5.2 Evaluierung der Antigene MyfA und PsaA

Die serologischen Bedeutung der neuen Yersinien-Antigene MyfA von *Y. enterocolitica* und PsaA von *Y. pseudotuberculosis* wurde anhand der IgG-, IgM- und IgA-Antwort mit 3 verschiedenen Serengruppen im „Line Assays“ untersucht: Blutspender des Bayerischen Roten Kreuzes, Yersiniose-Patienten aus Finnland (Granfors *et al.*, 1998) und Yersiniose-Patienten aus Deutschland. Als Referenzwerte wurden die rekombinant hergestellten YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE-Antigene verwendet.

Die positiven Yersiniose-Patienten aus Deutschland wurden mit einer IgA- und IgG-Reaktivität gegen YopD von 100 % als Referenzwert definiert (Anhang Tab. 7.8). Die IgM-Reaktivität gegen YopD lag bei 9 % (Anhang Tab. 7.11). 17 % der Patientenseren reagierten im IgG und 4 % im IgA mit MyfA (Anhang Tab. 7.8). Die Reaktivität gegen PsaA lag im IgG bei 65 % und im IgA und IgM jeweils bei 4 %. Von den Patientenseren aus Finnland reagierten je 89 % im IgG und IgA mit YopD (Anhang Tab. 7.7). 78 % der finnischen Patientenseren zeigten eine IgM-Reaktivität gegen YopD (Anhang Tab. 7.10). Eine Reaktivität gegen MyfA war nur im IgG nachzuweisen (61 %) (Anhang Tab. 7.7). Die Reaktivitäten gegen PsaA betragen im IgG 22 %, im IgA 17 % und im IgM 6 %. Von den Blutspenderseren waren 48 % im IgG, 15 % im IgA und 5 % im IgM positiv mit YopD (Anhang Tab. 7.6 und Tab. 7.9). Gegen MyfA lag die IgG Reaktivität bei 10 %. IgA- und IgM-Antikörper gegen MyfA wurden nicht nachgewiesen. Gegen PsaA besaßen 23 % der Blutspenderseren IgG-Antikörper, 8 % IgA-Antikörper und 5 % IgM-Antikörper (Anhang Tab. 7.6 und Tab. 7.9). Die Ergebnisse der Reaktivitäten ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tab. 3.5: IgG-, IgM- und IgA-Reaktivitäten von Blutspenderseren (BRK, n=40), Yersiniose Patientenseren aus Finnland (KLK; n=18) und aus Deutschland (YeD; n=23) mit den rekombinant hergestellten Antigenen YopD, MyfA und PsaA.

	IgG			IgA			IgM		
	YopD	MyfA	PsaA	YopD	MyfA	PsaA	YopD	MyfA	PsaA
BRK n=40	19	4	9	6	0	3	2	0	2
Reaktivität	48%	10%	23%	15%	0	8%	5%	0	5%
KTL n=18	16	11	4	14	0	3	14	0	1
Reaktivität	89%	61%	22%	89%	0	17%	78%	0	6%
YeD n=23	23	4	15	23	1	1	2	0	1
Reaktivität	100%	17%	65%	100%	4%	4%	9%	0	4%

3.2 Identifizierung neuer *Campylobacter jejuni* Antigene

Für die Identifizierung neuer virulenzassoziiertes Antigene von *Campylobacter jejuni* sollten die Proteine, die während des Wachstums ins Medium abgegeben werden, hinsichtlich ihrer Antigenität mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunsere von Kaninchen (2.9.2) und mit Patientenseren untersucht werden. Potentielle Antigene sollten rekombinant hergestellt und evaluiert werden.

3.2.1 Das Sekretom von *Campylobacter jejuni*

Um neue virulenzassoziiertes *Campylobacter* Antigene zu identifizieren, wurde das Sekretom von *C. jejuni* untersucht. Das Sekretom wurde als die Summe aller Proteine definiert, die über verschiedene Sekretionssysteme oder über den Vesikel-vermittelten Transport unter definierten Kulturbedingungen ins Medium freigesetzt werden. Proteine, die über Sekretionssysteme sezerniert werden, wurden SSPs (*soluble supernatant proteins*) genannt; Proteine, die in Vesikel der äußeren Membran freigesetzt werden, wurden als OMVs (*outer membrane vesicles*) bezeichnet. Die Summe der beiden Fraktionen SSP und OMV wurde in Anlehnung an die Yops der Yersinien COPs (*Campylobacter outer proteins*) genannt.

Die Sekretion von Proteinen kann bei *Campylobacter* durch Wirtszellkomponenten induziert werden. Bei *in vitro* Versuchen wird dieser Effekt durch die Kokultivierung mit Epithelzellen erzielt, durch die *C. jejuni* mindestens 14 Proteine *de novo* synthetisiert (Konkel and Cieplak, Jr., 1992). Diese Proteine wurden Cia (*Campylobacter invasion antigen*)-Proteine genannt, da sie die Invasion von *C. jejuni* in Epithelzellen beeinflussen (Konkel *et al.*, 1999b). Die Produktion und Sekretion der Cia-

ERGEBNISSE

Proteine kann auch durch Zugabe von 1 % Hitze-inaktiviertem Serum (z. B. fötales bovines Serum FBS) ins Medium induziert werden (Rivera-Amill *et al.*, 2001). Gallensalze haben ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Produktion der Cia-Proteine (Rivera-Amill *et al.*, 2001). Für die Untersuchung der Proteinfreisetzung von *C. jejuni* wurde zuerst die Zugabe von verschiedenen FBS-Konzentrationen ins BHI-Medium getestet. Hierfür wurden die COPs von *C. jejuni* K8 wie unter 2.7.1 beschrieben isoliert, wobei dem BHI-Medium 0 %, 0,2 %, 0,5 % bzw. 1 % FBS zugegeben wurde. Die COPs wurden anschließend in einer 10 % SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (Abb. 3.12 A.). Als Negativkontrolle wurde reines FBS mit TCA gefällt und ebenfalls in der SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.12 A.). Die COPs wurden im Anschluss im Immunoblot mittels Anti-*C. jejuni* Hyperimmunserum iv-CK8 untersucht (Abb. 3.12 B.).

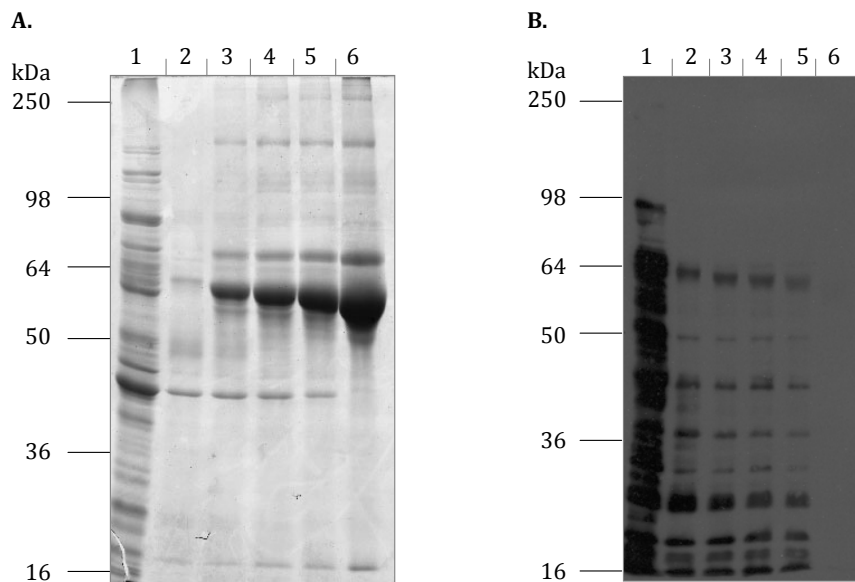


Abb. 3.12: Proteinfreisetzung in Abhängigkeit der FBS-Konzentration. (A) *C. jejuni* K8 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt und die darin enthaltenen COPs wurden in einer SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. **(B)** Elektrophoretische Übertragung des Zellysates und der COPs auf eine Nitrozellulosemembran. Immunoblot mit iv-CK8 Serum (1:200) und α K-IgG-HRP. 1) Zellysat bei Wachstum in BHI; 2) COPs bei Wachstum in BHI; 3) COPs bei Wachstum in BHI mit 0,2% FBS; 4) COPs bei Wachstum in BHI mit 0,5 % FBS; 5) COPs bei Wachstum in BHI mit 1 % FBS; 6) FBS (nach TCA-Fällung).

In Abbildung 3.12 A. ist zu erkennen, dass durch die Zugabe von FBS ins BHI-Medium die Analyse der sekretierten Proteine nur schwer möglich ist, da die Serumproteine in zu hoher Konzentration vorkommen und die COPs überlagern. Des Weiteren ist der Abbildung 3.12 B zu entnehmen, dass durch die Zugabe von FBS die Menge der freigesetzten Proteine in den Kulturüberstand nicht erhöht

ERGEBNISSE

wird, da das spezifische Anti-*C. jejuni* Hyperimmunserum unabhängig von der FBS-Konzentration immer die gleichen Proteine detektiert.

Da die Zugabe von FBS ins Medium für die Untersuchung des Sekretoms ungeeignet ist und die Freisetzung von Proteinen dadurch auch nicht verstärkt wird, wurde das Sekretom nach Anzucht in Voll- und Minimalmedium untersucht. Als Vollmedium wurde BHI-Medium gewählt; als Minimalmedium wurde RPMI verwendet. Die COPs wurden wie unter 2.7.1 beschrieben isoliert und in der SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend im Immunoblot mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunserum iv-CK8 untersucht (Abb. 3.13).

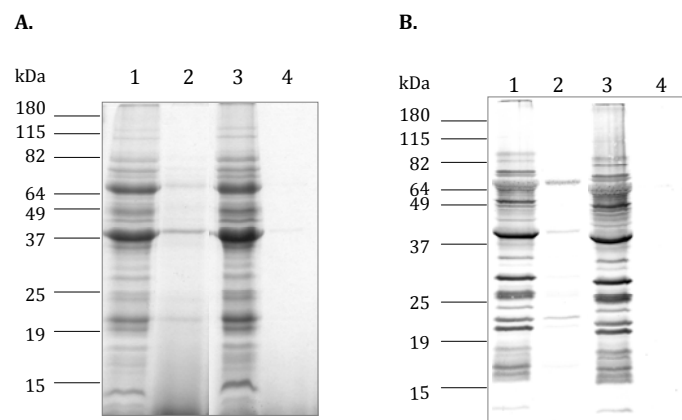


Abb. 3.13: Proteinfreisetzung in Abhängigkeit des Anzuchtmediums. (A) *C. jejuni* K8 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt und die darin enthaltenen COPs wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. **(B)** Elektrophoretische Übertragung des Zelllysates und der COPs auf eine Nitrozellulosemembran. Immunoblot mit iv-CK8 Serum (1:200) und α K-IgG-HRP. 1) Zelllysate bei Wachstum in BHI; 2) COPs bei Wachstum in BHI; 3) Zelllysate bei Wachstum in RPMI; 4) COPs bei Wachstum in RPMI.

Wie der Abbildung 3.13 zu entnehmen ist, wurden bei Wachstum in RPMI-Medium im Gegensatz zum Wachstum in BHI-Medium keine COPs sekretiert. Die Zelllysate zeigen dagegen keine Unterschiede. Aus diesem Grund wurde das BHI-Medium als Anzuchtmedium für die weiteren Versuche gewählt.

Im nächsten Schritt wurde der Zeitpunkt, zu dem die Proteinfreisetzung beginnt, überprüft, um ein standardisiertes Protokoll zu erstellen. Hierfür wurden die COPs von *C. jejuni* K8 wie unter 2.7.1 beschrieben isoliert, wobei die Zellen nach 4, 8, 16, 24 und 32 Stunden Wachstum geerntet und der Überstand mit TCA gefällt wurde. Die COPs wurden anschließend in einer 10 % SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (Abb. 3.14 A) und im Immunoblot mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunserum iv-CK8 untersucht (Abb. 3.14 B). In Abbildung 3.14 ist zu sehen, dass bereits nach 4 Stunden Wachstum Proteine in den Kulturüberstand freigesetzt werden. Die größte

Proteinkonzentration ist nach 16 Stunden Wachstum zu beobachten. Aus diesem Grund wurde die Wachstumszeit für die weiteren Versuche auf 16 Stunden festgesetzt. Zusätzlich ist zu erkennen, dass im Kulturüberstand von *C. jejuni* potentielle Antigene enthalten sind, die mit dem Anti-*C. jejuni* Hyperimmunserum reagierten.

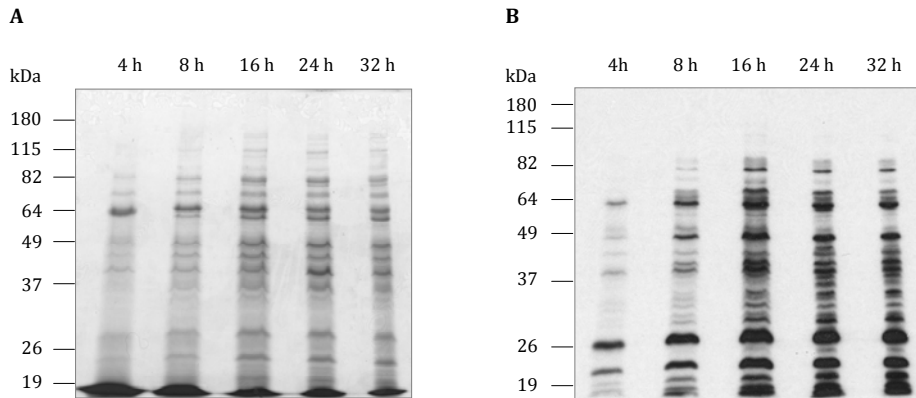


Abb. 3.14: Proteinfreisetzung in Abhängigkeit der Inkubationszeit. (A) *C. jejuni* K8 wurde nach 4, 8, 16, 24 und 32 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt und die darin enthaltenen COPs wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. **(B)** Elektrophoretische Übertragung der COPs auf eine Nitrozellulosemembran. Immunoblot mit iv-CK8 Serum (1:200) und α K-IgG-HRP.

3.2.2 Immunoblot mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunseren

Kaninchen wurden sowohl per oral (po) und später intravenös (iv) mit *C. jejuni* infiziert, um zwei Arten von Hyperimmunseren zu erhalten (2.9.2). Das po-Hyperimmunserum könnte der Reaktivität von Patientenseren mit einer selbstlimitierenden gastrointestinalen Campylobakteriose entsprechen. Das iv-Hyperimmunserum könnte die Reaktivität einer extraintestinalen *Campylobacter* Infektion simulieren. Die Reaktivität der po- und iv-Hyperimmunseren mit den COPs wurde verglichen. Hierfür wurden COPs von *C. jejuni* K8 wie unter 2.7.1 beschrieben isoliert. Die COPs wurden in einer 10 % SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und im Anschluss im Immunoblot mit *C. jejuni* Hyperimmunserum po-CK8. und iv-CK8 untersucht (Abb. 3.15). Wie in der Abbildung 3.15 zu sehen ist, unterscheidet sich das Reaktivitätsmuster und die Reaktivitätsintensität im Immunoblot der zwei verwendeten Seren. Somit könnte es möglich sein mit spezifischen Antigenen sowohl intestinale als auch extraintestinale Infektionen mit *Campylobacter* zu erkennen.

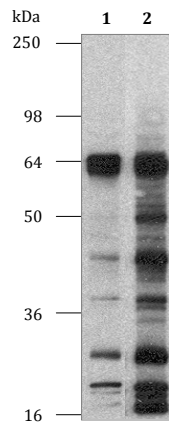


Abb. 3.15: Reaktivitätsmuster von po-CK8 und iv-CK8 mit COPs. *C. jejuni* K8 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt und die darin enthaltenen COPs wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Immunoblot mit (1) po-CK8 und (2) iv-CK8 Serum (1:200). Z α K-IgG-HRP.

3.2.3 Immunoblot mit Campylobakteriose Patientenseren

Für die Identifizierung und Evaluierung neuer *C. jejuni* Antigene standen 57 Patientenseren zur Verfügung, bei denen eine Infektion serologisch und/oder bakteriologisch nachgewiesen wurde. Die COPs wurden deshalb hinsichtlich ihrer Antigenität mit Patientenseren untersucht (Abb. 3.16). Hierfür wurden COPs von *C. jejuni* K8 wie unter 2.7.1 beschrieben isoliert, in einer 10 % SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und im Immunoblot mit 5 Patientenseren untersucht (Abb. 3.16). Das Hyperimmunserum iv-CK8 wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Patientenseren zeigten ein ähnliches Reaktionsmuster wie das po-CK8 und das iv-CK8 Serum (Abb. 3.16). Somit scheinen die *C. jejuni* Hyperimmunseren für die Identifizierung von spezifischen *C. jejuni* Antigenen im Immunoblot geeignet zu sein.

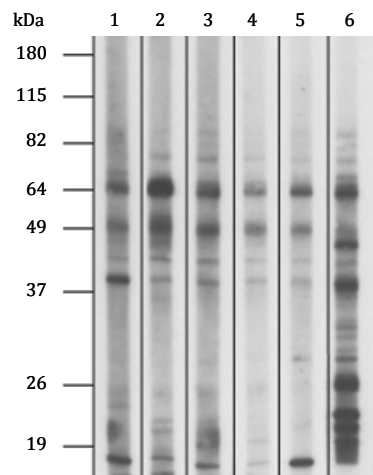


Abb. 3.16: Reaktivitätsmuster von Patientenseren und iv-CK8 mit COPs. *C. jejuni* K8 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt und die darin enthaltenen COPs wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die in Streifen geschnitten wurde. Immunoblot mit (1-5) Campylobakteriose Patientenseren / α H-IgG-HRP und (6) iv-CK8 Serum (1:200) / α K-IgG-HRP.

3.2.4 Identifizierung von COPs mittels MALDI-TOF

Für die Identifizierung der potentiellen Antigene wurde die Methode SDS-Gelelektrophorese in Verbindung mit MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight*) angewendet (2.10.1). Hierfür wurden die Proteine aus dem SDS-Gel mit einer 1 ml Kunststoff Pipettenspitze (blau) ausgestochen und vom Zentrallabor für Proteinanalyse des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU-München (Prof. Imhof) analysiert. In Abbildung 3.17 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Proteine umfassen Flagellen-Bestandteile, Porine, *Heat Shock* Proteine, Eisenaufnahme- und Transportproteine, Proteine für den Schutz vor Sauerstoff, Proteine mit unbekannter Funktion und bekannte Antigene (Tab. 3.6). Im Anschluss wurde versucht, die identifizierten Proteine den Antigenen im Immunoblot zuzuordnen. Diese Vorgehensweise erwies sich als äußerst schwierig und nicht sehr aussagekräftig, da die SDS-PAGE nicht streng reproduzierbar sind. Darüber hinaus können mehrere Proteine die gleiche elektrophoretische Mobilität haben. Aus diesem Grund wurde auf zweidimensionale Proteinelektrophorese (2D-PAGE) übergegangen.

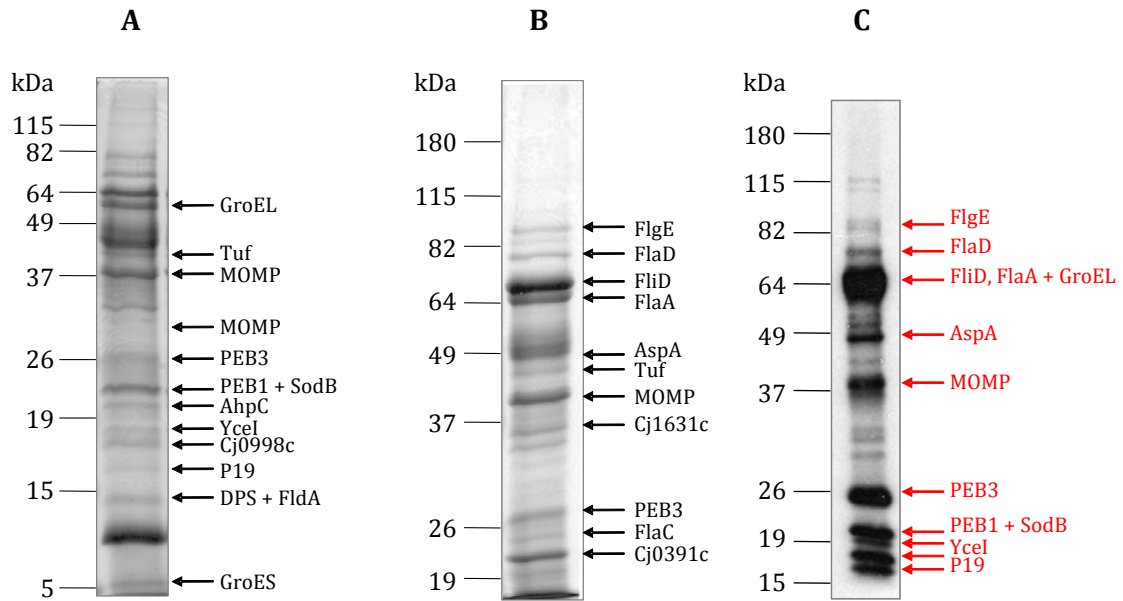


Abb. 3.17: MALDI-TOF Analyse der COPs. *C. jejuni* K8 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt. Die COPs wurden in einem **(A)** 15 %igen SDS-Gel bzw. **(B)** 10 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt, ausgestochen und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert (schwarze Pfeile). Die SDS-Gele wurden mit Coomassie gefärbt. **(C)** Zuordnung der identifizierten Proteine zu den Antigenen im Immunoblot (10 %iges SDS-Gel) mit roten Pfeilen. Detektion der Antigene mit iv-CK8 (1:200) und Z α K-IgG-HRP.

ERGEBNISSE

Tab. 3.6: COPs von *C. jejuni* identifiziert aus dem eindimensionalen SDS-Gel. Funktion, Molekulargewicht (MW) und GeneID der Proteine wurde der ExPasy-Datenbank und NCBI entnommen. Die zelluläre Lokalisation wurde wenn nicht bekannt mit PSORTb Version 2.0.2 und „Proteome Analyst - Subcell Specialization Server 2.5“ berechnet (Gardy *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004). ÄM: Äußere Membran; EZ: extrazellulär; FA: Flagellum-assoziiert; nb: nicht benannt; P: Periplasma; SS: Signalsequenz; TMH: Transmembranhelix; ZP: Zytoplasma.

Protein	Gen-Lokus	Funktion	zelluläre Lokalisation	GeneID	MW (kDa)
AhpC	Cj0334	Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase (Detoxifikation)	ZP	904658	21,9
AspA	Cj0087	Aspartat-Ammonim-Lyase	ZP	904412	51,8
Cj0391c	Cj0391c	putatives protein	nb	904714	22,8
Cj0998c	Cj0998c	putatives periplasmatisches Protein	P	905289	20,5
Cj1631c	Cj1631c	konserviertes Protein mit unbekannter Funktion	ÄM	905904	33
DPS	Cj1534c	DNA protection during starvation protein	ZP	905816	17,2
FlaA	Cj1339c	Flagellin A	EZ, FA	905631	59,1
FlaC	Cj0720c	Flagellin C	EZ, FA	905038	26,6
FlaD	Cj0887c	putatives Flagellin D	EZ, FA	905178	82,1
FldA	Cj1382c	Flavodoxin	nb	905675	17,1
FlgE	Cj1729c	flagellares Hakenprotein	EZ, FA	906004	89,4
FliD	Cj0548	flagellares Deckelprotein	EZ, FA	904875	69,2
GroEL	Cj1221	Chaperonin GroEL	ZP	905511	57,9
GroES	Cj1220	10 kDa Chaperonin	ZP	905510	9,5
MOMP	Cj1259	<i>Major outer membrane protein</i>	ÄM	905550	46,4
P19	Cj1659	periplasmatisches Protein p19	P	905931	19,6
PEB1	Cj0921c	bifunktionelles Adhesin/ABC Transporter Aspartat/Glutamat-Bindeprotein	P	906008	28,2
PEB3	Cj0289c	Antigen PEB3	P	904613	27,5
SodB	Cj0169	Superoxid Dismutase	nb	904414	24,8
Tuf	Cj0470	Elongation Faktor Tu	ZP	904796	43,6
YceI	Cj0420	putatives periplasmatisches Protein	P	904744	20,0

3.2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese mit dem Sekretom von *C. jejuni*

Für die bessere Identifizierung der *C. jejuni* Antigene wurden die COPs von *C. jejuni* L11 mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese wie unter 2.7.7 beschrieben aufgetrennt (Gorg *et al.*, 1988; O'Farrell *et al.*, 1977). Die isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension fand in dem pH Bereich 3-10 statt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine nach dem Molekulargewicht in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden mit kolloidaler Coomassie Lösung gefärbt (2.7.8.2). Im Anschluss wurden alle Proteine aus dem SDS-Gel mit einer 1 ml Pipettenspitze

ERGEBNISSE

ausgestochen und für die MALDI-TOF Analyse vorbereitet. Die MALDI-TOF Analyse erfolgte am Zentrum für Proteinanalytik (Prof. Imhof) des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU-München (2.10.1). Das „Mastergel“ der sekretierten Proteinen ist in Abbildung 3.18 zu sehen. Insgesamt konnten 32 verschiedene Proteine identifiziert werden. Die Proteine umfassen Flagellen-Bestandteile, Porine, *Heat Shock* Proteine, Eisenaufnahme- und Transportproteine, Proteine für den Schutz vor Sauerstoff, Proteine mit unbekannter Funktion und bekannte Antigene. Die genauen Daten zu den identifizierten Proteinen sind der Tabelle 3.7 zu entnehmen.

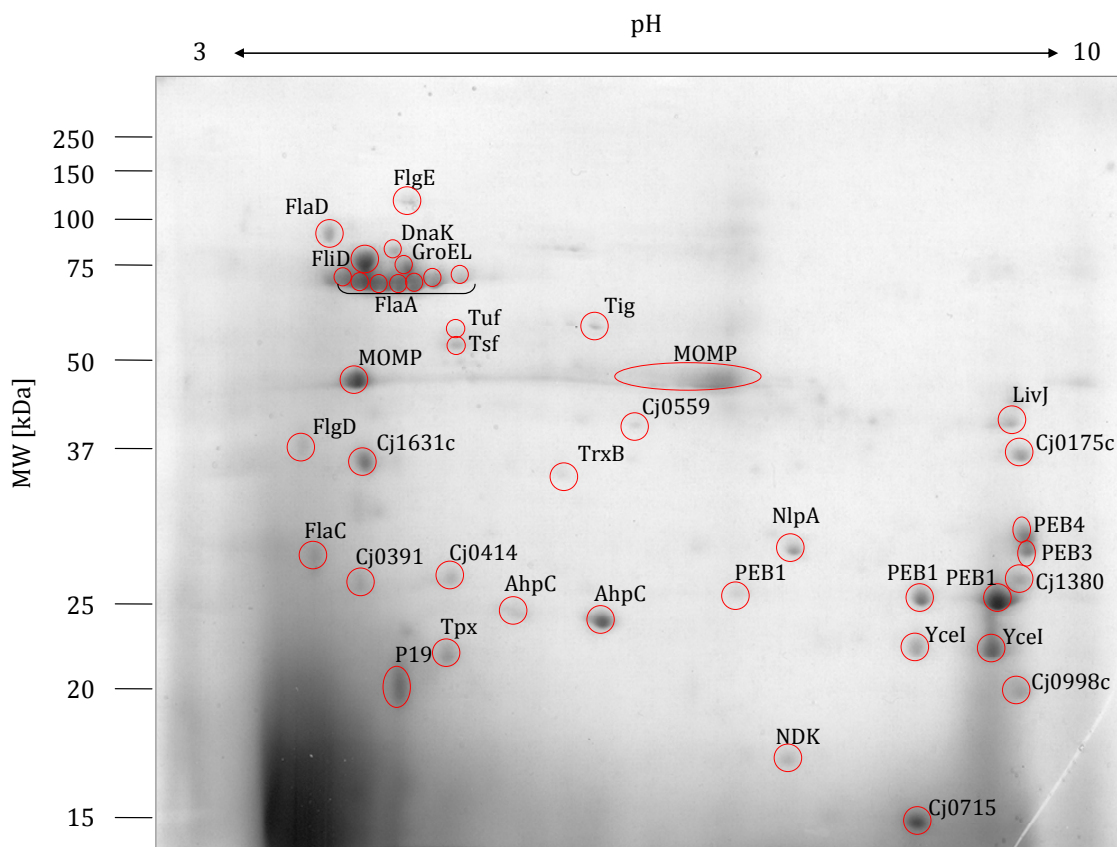


Abb. 3.18: 2D „Mastergel“ der COPs. *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt. COPs wurden zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert. Das SDS-Gel wurde mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt. Angaben zu den Proteinen sind der Tabelle 3.7 zu entnehmen.

ERGEBNISSE

Tab. 3.7: COPs von *C. jejuni*. Funktion, Molekulargewicht (MW), isoelektrischer Punkt (pI) und GeneID der Proteine wurde der ExPasy- und NCBI-Datenbank entnommen. Die zelluläre Lokalisation wurde wenn nicht bekannt mit PSORTb Version 2.0.2 und Proteome Analyst - Subcell Specialization Server 2.5“ berechnet (Gardy *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004). ÄM: Äußere Membran; EZ: extrazellulär; FA: Flagellum-assoziiert; nb: nicht benannt; P: Periplasma; SS: Signalsequenz; TMH: Transmembranhelix; ZP: Zytoplasma.

Protein	Gen-Lokus	Funktion	zelluläre Lokalisation	GeneID	MW (kDa)	pI
AhpC	Cj0334	Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase (Detoxifikation)	ZP	904658	21,9	5,66
Cj0175c	Cj0175c	putatives periplasmatisches Eisen-Bindeprotein	P	904513	37,4	9,16
Cj0391c	Cj0391c	putatives protein	nb	904714	22,8	4,92
Cj0414	Cj0414	putative Oxidoreduktase Untereinheit	nb, mögliche TMH	904738	26,9	5,50
Cj0559	Cj0559	Putative Pyridin Nukleotid-Disulfid Oxidoreduktase	ZP	905160	33,7	5,73
Cj0715	Cj0715	Transthyretin-ähnliches Protein	P	905032	13,8	8,65
Cj0998c	Cj0998c	putatives periplasmatisches Protein	P	905289	20,5	9,11
Cj1380	Cj1380	putatives periplasmatisches Protein, Chaperon	P	905673	26,6	8,96
Cj1631c	Cj1631c	konserviertes Protein mit unbekannter Funktion	nb	905904	33	4,78
DnaK	Cj0759	Chaperon DnaK	ZP	905069	67,3	4,98
FlaA	Cj1339c	Flagellin A	EZ, FA	905631	59,1	5,29
FlaB	Cj1338c	Flagellin B	EZ, FA	905630	57,9	5,40
FlaC	Cj0720c	Flagellin C	EZ, FA	905038	26,6	4,42
FlaD	Cj0887c	putatives Flagellin D	EZ, FA	905178	82,1	4,53
FlgD	Cj0042	Assemblierungsprotein des flagellaren Basalkörpers	FA	904379	31,1	4,3
FlgE	Cj1729c	flagellares Hakenprotein	EZ, FA	906004	89,4	5,14
FliD	Cj0548	flagellares Deckelprotein	EZ, FA	904875	69,2	4,82
GroEL	Cj1221	Chaperonin GroEL	ZP	905511	57,9	5,02
LivJ	Cj1019c	Aminosäuren ABC Transporter, periplasmatisches Bindeprotein	P	905311	40,1 kDa	8,77
MOMP	Cj1259	<i>Major outer membrane protein</i>	ÄM	905550	46,4	4,73
NDK	Cj0332c	Nukleosid Diphosphat Kinase	ZP	904656	15,1	6,15
NlpA	Cj0772c	putatives Lipoprotein NlpA	P	905082	28,6	6,92
P19	Cj1659	periplasmatisches Protein p19	P	905931	19,6	5,23
PEB1	Cj0921c	bifunktionelles Adhesin/ABC Transporter Aspartat/Glutamat-Bindeprotein	P	906008	28,2	8,8
PEB3	Cj0289c	Antigen PEB3	P	904613	27,5	9,49
PEB4	Cj0596	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase PEB4	ÄM	904921	30,5	9,23
Tig	Cj0193c	<i>Trigger</i> Faktor (Chaperon)	ZP	904535	50,9	5,69
Tpx	Cj0779	Thiol Peroxidase (Detoxifikation)	P	905088	18,4	5,13
TrxB	Cj0146c	Thioredoxin Reduktase	ZP	904481	33,1	5,60
Tsf	Cj1181c	Elongationsfaktor Ts	ZP	905471	39,6	5,24
Tuf	Cj0470	Elongationsfaktor Tu	ZP	904796	43,6	5,11
YceI	Cj0420	putatives periplasmatisches Protein	P	904744	20,0	7,29

3.2.6 Zweidimensionaler Immunoblot der COPs mit Anti-*C. jejuni*

Hyperimmunseren

Um herauszufinden, bei welchen der identifizierten Proteine es sich um reaktive Antigene handelt, wurden 2D Immunoblots angefertigt und mit po-CK8 bzw. iv-CK8 inkubiert (2.7.10). Wie aufgrund der Ergebnisse im eindimensionalen Immunoblot zu erwarten war (Abb. 3.12), unterschieden sich die Reaktivitätsmuster und die Reaktivitätsintensitäten von po-CK8 und iv-CK8 auch im 2D Immunoblot. Die im 2D-Gel identifizierten Proteine aus dem „Mastergel“ (Abb. 3.18) wurden anschließend den antigenen Proteinen zugeordnet (Abb. 3.19). Eine Reaktivität mit dem Präimmunserum CK8 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.19 A).

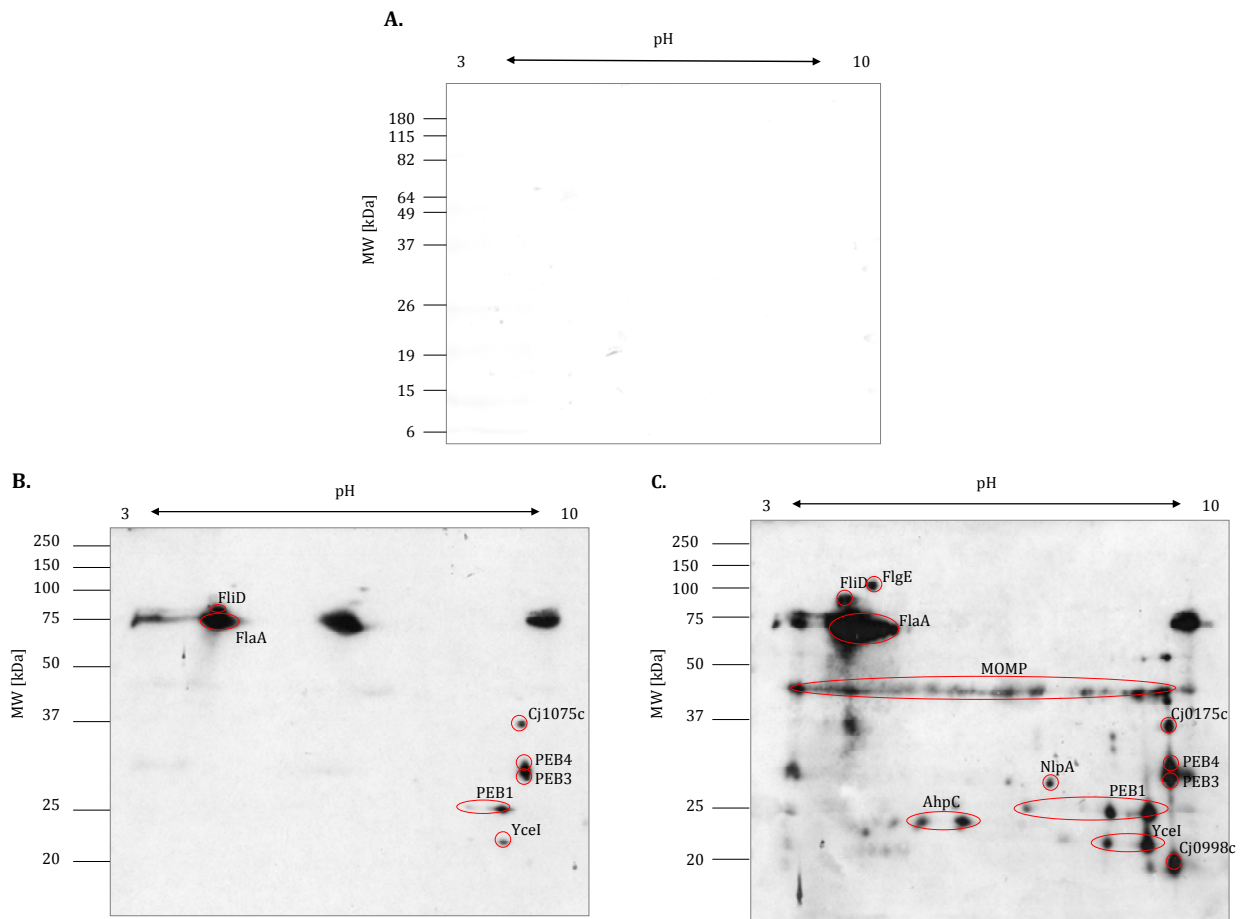


Abb. 3.19: 2D Immunoblot der COPs. *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt. COPs wurden zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Elektrophoretischer Transfer der COPs auf eine Nitrozellulosemembran. Detektion der Antigene mit (A) CK8 (B) po-CK8 und (C) iv-CK8 (1:200) und α K-IgG-HRP. Zuordnung der Antigene zu den identifizierten Proteinen aus dem „Mastergel“ (Abb. 3.18). Angaben zu den Proteinen sind der Tabelle 3.7 zu entnehmen.

Das reaktivste Antigen war das Flagellin FlaA, das sowohl mit po-CK8 als auch mit iv-CK8 eine starke Reaktion zeigte. Des Weiteren reagierten auch die Proteine YceI, PEB1, PEB3, PEB4 und das Protein Cj0175c mit beiden Seren. Mit dem iv-CK8 Serum konnten noch weitere Flagellenbestandteile detektiert werden: das flagellare Hakenprotein FlgE und das flagellare Deckelprotein FliD. Von dem Porin MOMP konnten mehrere Isoformen, die sich über die ganze Breite des SDS-Geles zogen, nachgewiesen werden. Von dem Protein PEB1 konnten auch 2 weitere Isoformen detektiert werden. Die Proteine NlpA, AphC und Cj0998c zeigten ebenfalls eine Reaktion mit dem iv-CK8 Serum.

3.2.7 Zweidimensionaler Immunoblot der Cops mit Patientenserum

Im nächsten Schritt wurde die Antigenität der COPs mit 6 Patientenseren und einem Blutspenderserum untersucht. Ein Beispiel ist der Abbildung 3.20 zu entnehmen. Die verwendeten Patientenseren zeigten ein ähnliches Reaktionsmuster wie das po-CK8 Serum. Die Reaktion des Blutspenderserums mit dem Flagellin (FlaA) ist auf unspezifische Kreuzreaktionen zurückzuführen, weshalb FlaA als diagnostisches Antigen nicht geeignet ist. Da bei den Proteinen NlpA und YceI nur eine Reaktion mit dem Patienten Serum zu beobachten war, wurden diese Proteine genauer untersucht (3.2.10).

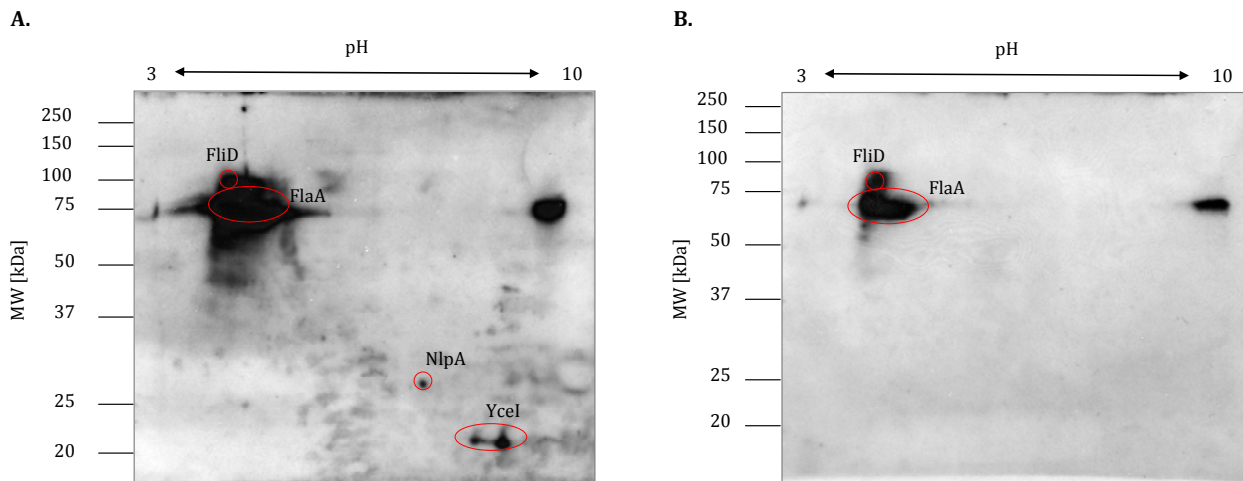


Abb. 3.20: 2D Immunoblot der COPs. *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt. COPs wurden zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Elektrophoretischer Transfer der COPs auf eine Nitrozellulosemembran. Detektion der Antigene mit (A) Patientenserum und (B) Blutspenderserum. Sekundärantikörper α H-IgG-HRP. Zuordnung der Antigene zu den identifizierten Proteinen aus dem „Mastergel“ (Abb. 3.18). Angaben zu den Proteinen sind der Tabelle 3.7 zu entnehmen.

3.2.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Gesamtzelllysaten

Da auch im Zelllysat potentielle Antigene vorhanden sind, wurde dieses mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Hierfür wurde wie unter 2.7.4 beschrieben vorgegangen. Das Zelllysat wurde anschließend in der ersten Dimension im pH Bereich von 3-10 und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht in einem 12 %igen Gel aufgetrennt (2.7.7). Die Gele wurden in kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt (2.7.8.2) bzw. elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um Antigene mit iv-CK8 zu detektieren. Die positiven Proteine wurden ausgeschnitten und mit MALDI-TOF Analyse identifiziert (Zentrum für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU München; 2.10.1). Eine Reaktivität mit dem Präimmenserum CK8 konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind der Abbildung 3.21 zu entnehmen. 6 neu identifizierte Proteine sind in der Tabelle 3.8 beschrieben. Unter den positiven Proteinen waren auch solche, die aufgrund ihrer geringen Konzentration im SDS-Gel kaum zu detektieren waren und deshalb nicht identifiziert werden konnten. Da sich diese Proteine im basischen Bereich befinden, wurden 2D-Gele angefertigt, bei denen die isoelektrische Fokussierung bei einem pH-Bereich von 6-11 durchgeführt wurde. Bei der zweiten Dimension wurden die Proteine in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt, mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt bzw. im 2D Immunoblot mit iv-CK8 inkubiert (ohne Abbildung). Die noch nicht identifizierten Proteine wurden wieder für die MALDI-TOF Analyse ausgeschnitten. Hierbei konnte das Protein a (Abb. 3.21) als eine Isoform von Cj0143c identifiziert werden. Die Proteine b und c konnten nicht identifiziert werden.

Tab. 3.8: Neu identifizierte Antigene im Zelllysat von *C. jejuni*. Die identifizierten Proteine sind alphabetisch nach der entsprechenden Bezeichnung aufgelistet. Funktion, Molekulargewicht (MW), isoelektrischer Punkt (pI) und GeneID der Proteine wurde der Expasy-Datenbank und NCBI entnommen. Die zelluläre Lokalisation wurde wenn nicht bekannt mit PSORTb und „Proteome Analyst - Subcell Specialization“ berechnet (Gardy *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004). ÄM: Äußere Membran; P: Periplasma; ZP: Zytoplasma.

Protein	Gen-Lokus	Beschreibung	Lokalisation	GeneID	MW (kDa)	pI
CadF	Cj1478c	Fibronectin-bindendes Protein	ÄM	905765	36	6,19
Cj0143c	Cj0143c	putatives periplasmatisches Protein ZntC eines ABC-Transporters	P	904476	34,6	7,25
Cj1670c	Cj1670c	putatives periplasmatisches Protein	P	905945	25,3	9,03
TrxB	Cj0146c	Thioredoxin Reduktase	ZP	904481	33,1	5,5

ERGEBNISSE

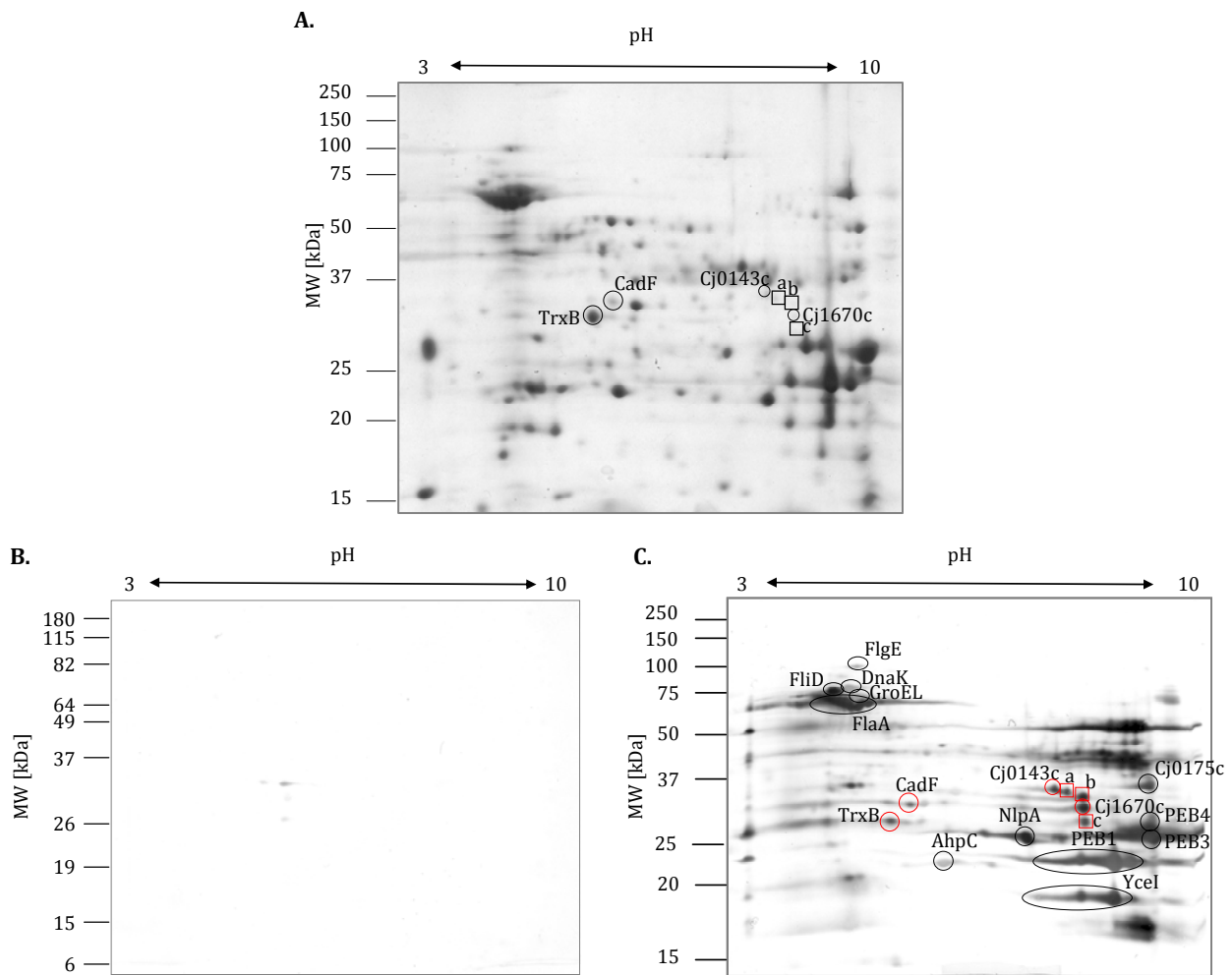


Abb. 3.21: 2D Gel und Immunoblot von *C. jejuni* Zelllysate. *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zellbruchstücken wurde das Zelllysate TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. **(A)** Färbung des 2D Gels mit kolloidalen Coomassie-Lösung. Elektrophoretischer Transfer des Zelllysates auf eine Nitrozellulosemembran. Detektion der Antigene mit **(B)** CK8 bzw. **(C)** iv-CK8 (1:200) und α K-IgG-HRP. Neue reaktive Proteine wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert (MALDI-TOF). Die identifizierten Proteine sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Nicht identifizierte Proteine sind mit einem roten Viereck und a, b und c gekennzeichnet. Schon identifizierte Proteine aus dem „Mastergel“ (Abb. 3.18) sind mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet. Protein a wurde später als Isoform von Cj0143c identifiziert. Angaben zu den Proteinen sind der Tabelle 3.7 und 3.8 zu entnehmen.

3.2.9 Zweidimensionaler Immunoblot des Zelllysates mit Patienten Seren

Im Anschluss wurden 2D Immunoblots auch mit Patienten- und Blutspenderseren durchgeführt. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.22 zu sehen. Es sollten nur die Antigene weiter untersucht werden, die keine Reaktion mit dem Blutspenderserum zeigten. Hierbei handelte es sich zum einen um das von dem Gen *cj0143c* kodierte Protein ZntC, das wahrscheinlich ein periplasmatisches Bindeprotein von

einem ABC-Transportsystem darstellt. Zum anderen wurde ein hypothetisches periplasmatisches Protein identifiziert, das von dem Gen *cj1670c* kodiert wird (Tab. 3.8).

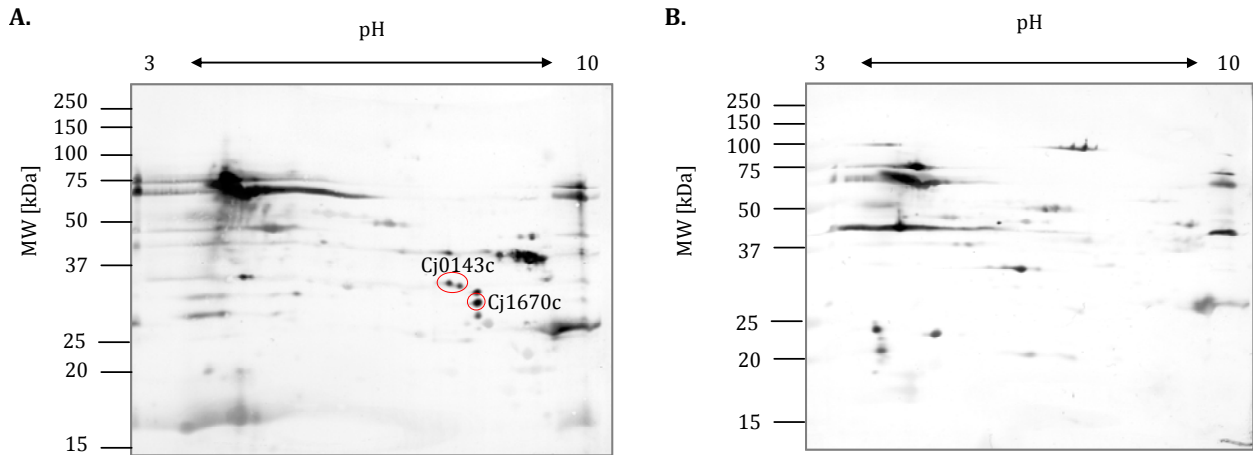


Abb. 3.22: 2D Immunoblot von *C. jejuni* Zelllysat. *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zellbruchstücken wurde das Zelllysat TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Elektrophoretischer Transfer des Zelllysates auf eine Nitrozellulosemembran. Detektion der Antigene mit **(A)** Patientenserum und **(B)** Blutspenderserum (1:200). Sekundärantikörper α H-IgG-HRP. Antigene, die spezifisch mit dem Patientenserum reagierten, wurden rot markiert. Angaben zu den Proteinen sind der Tabelle 3.8 zu entnehmen.

3.2.10 Rekombinante Herstellung der identifizierten *C. jejuni* Antigene

Die identifizierten Antigene NlpA, YceI, Cj0143c und Cj1670c wurden rekombinant in *E. coli* als His-tag Fusionen hergestellt. Hierfür wurden die Gene *nlpA*, *yceI*, *Cj0143c* und *Cj1670c* ohne Signalsequenz von chromosomaler DNA von *C. jejuni* L11 amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in den Expressionsvektor pET21-b kloniert. Die Transformation der daraus entstandenen Konstrukte pET21b-nlpA, pET21b-yceI, pET21b-Cj0143c und pET21b-Cj1670c erfolgte in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Dieser Expressionsstamm besitzt zusätzlich Kopien der tRNA Gene *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA) und *leuW* (CUA). Dadurch können Proteine aus Bakterienarten, die andere Codons als *E. coli* bevorzugen, exprimiert werden. Die Überexpression der rekombinanten Antigene erfolgte bei 37°C (2.8.1). NlpA wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Der erste Reinigungsschritt umfasste eine Affinitätschromatographie (HisTrap), gefolgt von einer Ionenaustauscherchromatographie (MonoS) und einer Gelfiltration (SuperdexS75). Die Elution erfolgt mit 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl und 6 M Harnstoff bei einem pH Wert von 7,5. YceI wurde unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Nach einer Affinitätschromatographie (His-Trap) folgten Ionenaustauscherchromatographien (MonoS und MonoQ) und eine Gelfiltration

ERGEBNISSE

(SuperdexS75). Die Elution erfolgte in 20 mM NaH₂PO₄ und 100 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7,1. Cj0143c und Cj1670c wurden nativ aufgereinigt. Wieder kamen Affinitätschromatographie (His-Trap), Ionenaustauscherchromatographien (MonoQ bzw. MonoS) und eine Gelfiltration (SuperdexS75) zum Einsatz. Für die Elution wurde 20 mM NaH₂PO₄ und 100 mM NaCl pH 8,0 für Cj0143c und pH 7,0 für Cj1670c verwendet. Die gereinigten Proteine wurden in einem 15 %igen SDS-Gel überprüft. Das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt der rekombinanten Proteine sind der Tabelle 3.9 zu entnehmen. Da die rekombinanten Proteine im „Line Assay“ verwendet wurden, durften keine *E. coli* Bestandteile vorhanden sein. Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot (2.7.10) mit Kaninchen Anti-*E. coli* JS69 Serum (Tab. 2.13) bestätigt (Abb. 3.23 B). Die im SDS-Gel sichtbaren zusätzlichen Proteinbanden von Cj1670c stellen wahrscheinlich Abbauprodukte dar (Abb. 3.23 A). Die rekombinanten Proteine wurden auch hinsichtlich ihrer Antigenität mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunserum iv-CK8 getestet. YceI ist im SDS-Gel kaum detektierbar (Abb. 3.23 A), dafür aber im Immunoblot mit iv-CK8 (Abb. 3.23 C). Die Proteine Cj1670c und Cj0143c sind mit iv-CK8 nicht nachweisbar (Abb. 3.23 C). Trotzdem wurden alle Proteine im Line Assay hinsichtlich ihrer Antigenität mit Patientenseren überprüft (3.2.12).

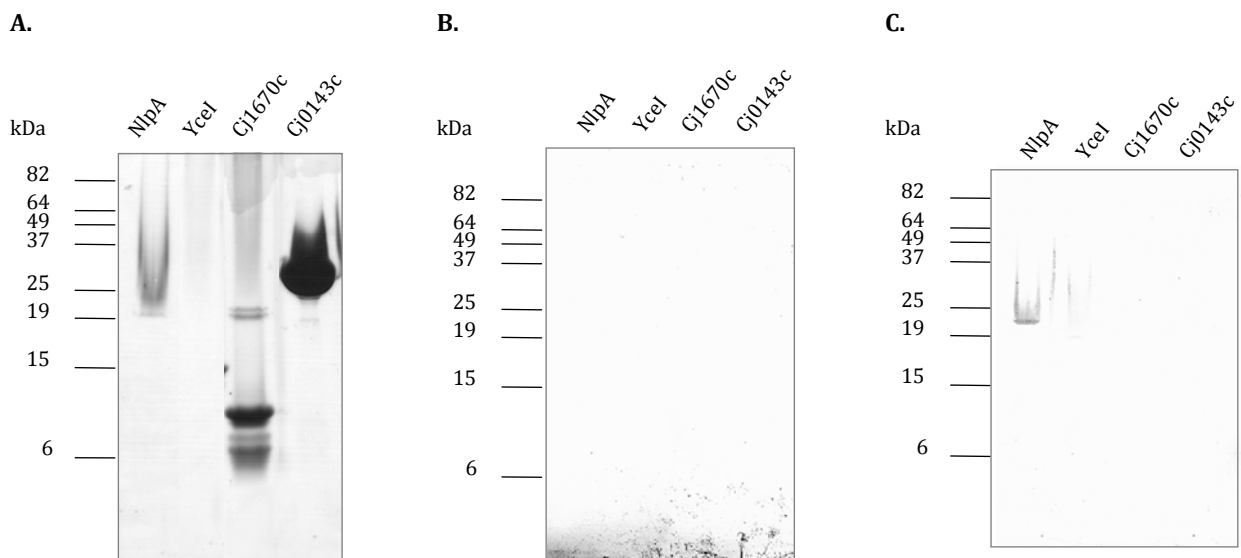


Abb. 3.23: SDS-PAGE und Immunoblot mit den rekombinanten Proteinen NlpA, YceI, Cj1670c und Cj0143c. NlpA, YceI, Cj1670c und Cj0143c wurden als His-tag-Fusionen rekombinant in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. (A) Coomassie Färbung des SDS-Geles. (B). Immunoblot mit Anti-*E. coli* JS69 Serum (1:200). (C) Immunoblot mit iv-CK8. Als Sekundärantikörper wurde Z α K-IgG-HRP verwendet.

Tab. 3.9: Molekulargewicht (MW) und isoelektrischer Punkt (pI) der rekombinanten Proteine. Die Werte wurden durch die Aminosäuresequenz der Proteine berechnet. Der Hexa-Histidin-Tag ist mit in die Berechnung einbezogen.

Protein	berechnetes MW (kDa)	experimentell bestimmtes MW (kDa)	berechneter pI
NlpA	25,2	22	7,3
YceI	20,1	/	8,0
Cj1670c	24	20 und 10	7,94
Cj0143c	33	33	6,97

3.2.11 Rekombinante Herstellung potentieller Antigene

Zusätzlich zu den zweidimensionalen Analysen der COPs und des Zelllysates von *C. jejuni* wurde in der Literatur nach potentiellen Antigenen und virulenzassoziierten Proteinen recherchiert. Es wurden die Proteine CadF, CiaB, JlpA, FlaC und Cj1496c beschrieben.

3.2.11.1 CadF (Campylobacter adhesion to fibronectin)

CadF (Cj1478c) ist ein konserviertes, zelloberflächenexponiertes Protein von 37 kDa, das spezifisch an Fibronectin bindet und Adhärenz an intestinale Zellen vermittelt (Konkel *et al.*, 1997). Das Gen *cadF* von *C. jejuni* L11 wurde von chromosomaler DNA amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in den Expressionsvektor pET21-b kloniert. Das daraus entstandene Konstrukt pET21b-cadF wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Die Überexpression des rekombinanten CadF erfolgte bei 37°C (2.8.1). Da sich herausstellte, dass CadF für *E. coli* toxisch ist, wurde ein verkürztes Konstrukt (nt 502-942) in pET-21b kloniert. Das Plasmid pET21b-cadF₁₆₇₋₃₁₄ wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert und bei 37°C exprimiert. Das rekombinante Protein CadF₁₆₇₋₃₁₄ (AS 167-314) besitzt nach dem Algorithmus von Hopp und Woods (1981) antigene Bereiche (Antigenicity Plot, <http://www.bioinformatics.org/JaMBW/3/1/7/>) (Hopp and Woods, 1981). Die Reinigung erfolgte mit Nickel NTA-Beads (2.8.2). CadF₁₆₇₋₃₁₄ wurde in einem 15 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (2.7.6) und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.7.10), die im Anschluss in Streifen geschnitten wurde. Jeweils ein Streifen wurde mit *Anti-C. jejuni* Hyperimmenserum (iv-CK5, iv-CK6, iv-CK7 bzw. iv-CK8), *Anti-E. coli* Serum (JS69 bzw. 54a), Blutspenderserum (n=5) bzw. Patientenserum (n=47) inkubiert. Da weder die *Anti-C. jejuni* Hyperimmenserum noch die Patientenserum positiv reagierten, wurde CadF₁₆₇₋₃₁₄ nicht weiter untersucht.

3.2.11.2 *Campylobacter* Invasions Antigen B (CiaB)

CiaB (Cj0914c) ist ein Protein von 73 kDa, das *in vitro* in das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen transloziert wird und für die Invasion von *C. jejuni* notwendig ist (Konkel *et al.*, 1999b). Das Gen *ciaB* von *C. jejuni* L11 von chromosomaler DNA amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in den Expressionsvektor pET21-b kloniert. Das Konstrukt pET21b-*ciaB* wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Die Überexpression des rekombinanten CiaB erfolgte bei 37°C (2.8.1). CiaB wurde in einem 15 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (2.7.6) und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.7.10), die im Anschluss in Streifen geschnitten wurde. Jeweils ein Streifen wurde mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunsereum (iv-CK5, iv-CK6, iv-CK7 bzw. iv-CK8), Anti-*E. coli* Serum (JS69 bzw. 54a), Blutspenderserum (n=5) bzw. Patientensereum (n=47) inkubiert. Da weder die Hyperimmunsereen noch die Patientensereen positiv reagierten, wurde CiaB nicht weiter untersucht.

3.2.11.3 Das Lipoprotein JlpA (*jejuni* lipoprotein A)

Das Gen *jlpA* (Cj0983) kodiert ein Lipoprotein von 42 kDa, das über den N-Terminus und den C-Terminus in der äußeren Membran von *C. jejuni* verankert ist (Jin *et al.*, 2001). Das Gen *jlpA* von *C. jejuni* L11 wurde von chromosomaler DNA amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in den Expressionsvektor pET21-b kloniert. Das daraus entstandene Konstrukt pET21b-*jlpA* wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Die Überexpression des rekombinanten JlpA erfolgte bei 37°C (2.8.1). Da sich herausstellte, dass JlpA ähnlich wie CadF für *E. coli* toxisch ist, wurde ein verkürztes Konstrukt (nt 46-555) in pET-21b kloniert. Das Plasmid pET21b-*jlpA*₁₆₋₁₈₅ wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert und bei 37°C exprimiert. Das rekombinante Protein JlpA₁₆₋₁₈₅ (AS 16-185) besitzt nach dem Algorithmus von Hopp und Woods (1981) antigene Bereiche (Antigenicity Plot, <http://www.bioinformatics.org/JaMBW/3/1/7/>) (Hopp and Woods, 1981). Die Reinigung erfolgte mit Nickel NTA-Beads (2.8.2). JlpA₁₆₋₁₈₅ wurde in einem 15 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (2.7.6) und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.7.10), die im Anschluss in Streifen geschnitten wurde. Jeweils ein Streifen wurde mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunsereum (iv-CK5, iv-CK6, iv-CK7 bzw. iv-CK8), Anti-*E. coli* Serum (JS69 bzw. 54a), Blutspenderserum (n=5) bzw. Patientensereum (n=47) inkubiert (Abb. 3.24).

ERGEBNISSE

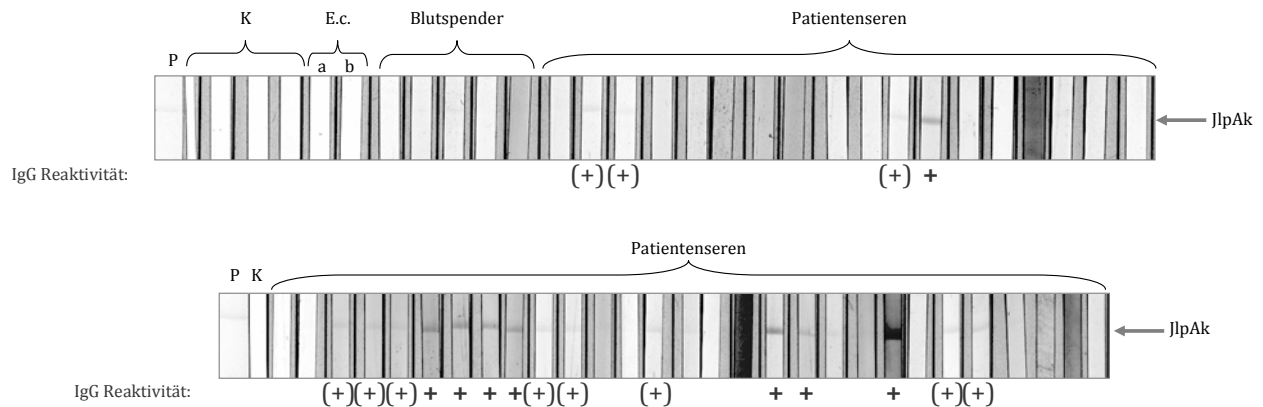


Abb. 3.24: Immunoblot mit dem rekombinanten Protein JlpA₁₆₋₁₈₅. JlpK₁₆₋₁₈₅ wurde als His-tag-Fusion rekombinant in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Protein elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die in Streifen geschnitten wurde. P: Ponceau Rot Färbung. K: Hyperimmunsereen iv-CK5, iv-CK6, iv-CK7 bzw. iv-CK8; E.c.: Anti-*E. coli* Seren a) JS69 und b) 54a. Serumverdünnung 1:200. Sekundärantikörper: ZαK-IgG-HRP bzw. KαH-IgG-HRP. Die IgG-Reaktivität wurde mit + als positiv und mit (+) als grenzwertig beurteilt.

Obwohl bei den Hyperimmunsereen keine Reaktion zu beobachten war, reagierten 8 der Patientensereen stark und 11 Patientensereen grenzwertig im IgG gegen das rekombinante JlpA₁₆₋₁₈₅. Die negative Reaktion mit den Anti-*E. coli* Seren zeigte, dass das Protein frei von *E. coli* Proteinen war. JlpA₁₆₋₁₈₅ wurde in „Line Assays“ weiter evaluiert (3.2.12).

3.2.11.4 Das Flagellin FlaC

FlaC (Cj0720c) ist ein konserviertes Protein von *C. jejuni* und homologe Sequenzen von *flaC* kommen in *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* vor (Song *et al.*, 2004). Das Gen *flaC* von *C. jejuni* L11 wurde von chromosomaler DNA amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in den Expressionsvektor pET21-b kloniert. Das daraus entstandene Konstrukt pET21b-*flaC* wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Die Überexpression des rekombinanten FlaC erfolgte bei 37°C (2.8.1). Die Reinigung erfolgt mit Nickel-NTA Beads (2.8.2). FlaC wurde in einem 15 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (2.7.6) und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.7.10), die im Anschluss in Streifen geschnitten wurde. Jeweils ein Streifen wurde mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunsereum (iv-CK5, iv-CK6, iv-CK7 bzw. iv-CK8), Anti-*E. coli* Serum (JS69 bzw. 54a), Blutspendersereum (n=5) bzw. Patientensereum (n=10) inkubiert. Da keine positiven IgG-Reaktivitäten nachzuweisen waren, wurde FlaC nicht weiter untersucht.

3.2.11.5 Das hypothetische Glykoprotein Cj1496c

Cj1496c kodiert ein hypothetisches periplasmatisches Glykoprotein, das eine Rolle bei der Adhärenz und Invasion von *C. jejuni in vitro* spielt (Kakuda and DiRita, 2006). Das Gen *cj1496c* von *C. jejuni* L11 wurde von chromosomaler DNA amplifiziert und wie unter 2.6.10.1 beschrieben in den Expressionsvektor pET21-b kloniert. Das daraus entstandene Konstrukt pET21b-Cj1496c wurde in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Die Überexpression des rekombinanten Cj1496c erfolgte bei 37°C (2.8.1). Cj1496c wurde nativ aufgereinigt. Der erste Reinigungsschritt umfasste eine Affinitätschromatographie (HisTrap) (2.8.2), gefolgt von einer Ionenaustauscherchromatographie (MonoQ) und einer Gelfiltration (SuperdexS75). Die Elution erfolgt in 20 mM NaH₂PO₄ und 100 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7,0. Das rekombinante Cj1496c Protein besitzt ein Molekulargewicht von 18,6 kDa und einen pI-Wert von 5,37. Die Reinheit des aufgereinigten Proteins wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot (2.7.10) mit Kaninchen Anti-*E. coli* Serum JS69 (Tab. 2.13) bestätigt (Abb. 3.25 B).

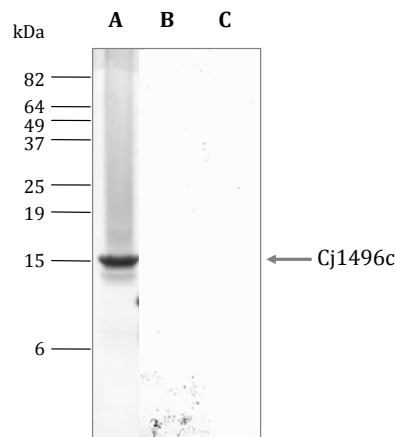


Abb. 3.25: SDS-PAGE und Immunoblot mit dem rekombinanten Protein Cj1496c. Cj1496c wurde als His-tag-Fusion rekombinant in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL überexprimiert, aufgereinigt und in einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das Protein elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. **(A)** Coomassie Färbung des SDS-Geles. **(B)** Immunoblot mit Anti-*E. coli* Serum JS69 (1:200). **(C)** Immunoblot mit iv-CK8 (1:200) und Z α K-IgG-HRP.

Die Antigenität von Cj1496c wurde mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmenserum (iv-CK8) getestet (Abb. 3.25 B). Obwohl Cj1496c im Immunoblot nicht mit dem Hyperimmenserum reagierte, wurde das Protein im „Line Assay“ mit einer großen Anzahl von Patientenseren überprüft (3.2.12).

3.2.12 Evaluierung der *C. jejuni* Antigene im Line Assay

Für die nachfolgenden Arbeiten wurden im Zuge des FORINGEN Projektes Gerätschaften und Materialien von der Mikrogen GmbH zur Verfügung gestellt.

Die rekombinanten Proteine NlpA, YceI, Cj0143c, Cj1670c, JlpA₁₆₋₁₈₅ und Cj1496c wurden im „Line Assay“ hinsichtlich ihrer IgG- und IgA-Reaktivität mit einer großen Anzahl von Campylobakteriose Patientenseren und Blutspenderseren des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) getestet (2.7.12.1). Hierfür wurden die aufgereinigten His-tag Fusionen in einer 1:8 Verdünnung in 85 mM Tris pH 8,5 auf eine Nitrozellulosemembran wie unter 2.7.11.2 beschrieben aufgetragen. Die Membran wurde nach Absättigung in Magermilchpulver in Streifen geschnitten und beschriftet. Der Zusatz von Detergenzien (z. B. SDS) in den Tris Puffer brachten in Vortests keine Steigerung der Sensitivität. Für die serologische Beurteilung der Antigene standen Campylobakteriose Patientenseren (n=53) (2.7.12.1), bei denen bakteriologisch und/oder serologisch eine *C. jejuni* Infektion nachgewiesen wurde, und Blutspenderseren (BSS) des Bayerischen Roten Kreuzes (n=100) zur Verfügung. Als Referenzwert und für die Beurteilung der Seren wurde der *RecomLine* Campylobacter (Mikrogen) verwendet. Von den 53 Patientenseren wurden 56,6 % im IgG und 13,2 % im IgA als *Campylobacter* positiv bewertet. Von den IgA positiven Patientenseren waren alle außer ein Serum (NK_11) auch im IgG positiv (Anhang Tab. 7.12 und Tab. 7.13). Von den 100 Blutspenderseren wurden 13 % im IgG und 3 % im IgA *Campylobacter* positiv beurteilt. Von denen im IgA positiven Blutspenderseren war das Serum BRK1140 auch im IgG positiv (Anhang Tab 7.14 und Tab. 7.15).

Von den Patientenseren zeigten 30 (56,6 %) eine IgG-Reaktivität gegen NlpA. Drei der NlpA-IgG positiven Seren reagierten auch im IgA mit NlpA (Anhang Tab. 7.12 und Tab. 7.13). Nur ein bzw. kein Patientenserum zeigte im IgG bzw. IgA eine Reaktion mit JlpA₁₆₋₁₈₅. Mit YceI reagierten 4 Patientenseren im IgG, von denen 2 serologisch als *Campylobacter* negativ eingestuft wurden (*RecomLine* Campylobacter). Im IgA war keine Reaktion sichtbar. 7 Patientenseren, von denen 2 serologisch als *Campylobacter* negativ eingestuft wurden (*RecomLine* Campylobacter), zeigten IgG-Antikörper gegen Cj1496c. Wiederum aber war keine IgA Reaktion zu beobachten. Mit Cj1670c reagierten 9 Patientenseren (17,0%) im IgG positiv, von denen 3 Seren serologisch als *Campylobacter* negativ beurteilt wurden (NK_8, NK_9 und GH11a). Eines der Cj1670c-IgG-positiven Seren zeigte eine positive Reaktion im IgA (GH17a). 12 der Patientenseren (22,6 %) hatten IgG-Antikörper gegen Cj0143c, von denen 7 serologisch als *Campylobacter* negativ bewertet wurden (*RecomLine* Campylobacter). Eines dieser Cj0143c-IgG-positiven Seren reagierte auch im IgA

ERGEBNISSE

positiv (NK_3) und das Serum NK_11 zeigte eine alleinige Reaktion im IgA gegen Cj0143c (Anhang Tab. 7.12 und Tab. 7.13).

Bei den Blutspenderseren zeigten 34 Proben (34 %) eine IgG-Reaktivität mit NlpA. Eines dieser Seren (BRK1087) war auch im IgA positiv gegen NlpA (Anhang Tab. 7.14 und Tab 7.15) und nur 2 dieser Seren (BRK1102 und BRK1149) wurden als *Campylobacter* positiv beurteilt. Jeweils nur ein Serum (*Campylobacter* negativ) reagierte im IgG positiv mit JlpA₁₆₋₁₈₅ und YceI (Anhang Tab. 7.14 und Tab. 7.15). 5 Blutspenderseren, darunter das serologisch *Campylobacter* positiv bewertete Serum BRK1174, besaßen Antikörper gegen das Protein Cj1496 (Anhang Tab. 7.14 und Tab. 7.15). Von diesen Seren reagierten 2 auch im IgA positiv (BRK1132 und BRK1142). Zusätzlich zeigten 2 Seren eine alleinige IgA-Reaktion mit Cj1670c (BRK1110 und BRK1139). 5 Seren zeigten eine IgG-Reaktivität gegen Cj0143c, von denen eines als *Campylobacter* positiv bewertet wurde (BRK1138). 3 Seren zeigten ein IgA-Reaktivität gegen Cj0143c (Anhang Tab. 7.14 und Tab. 7.15).

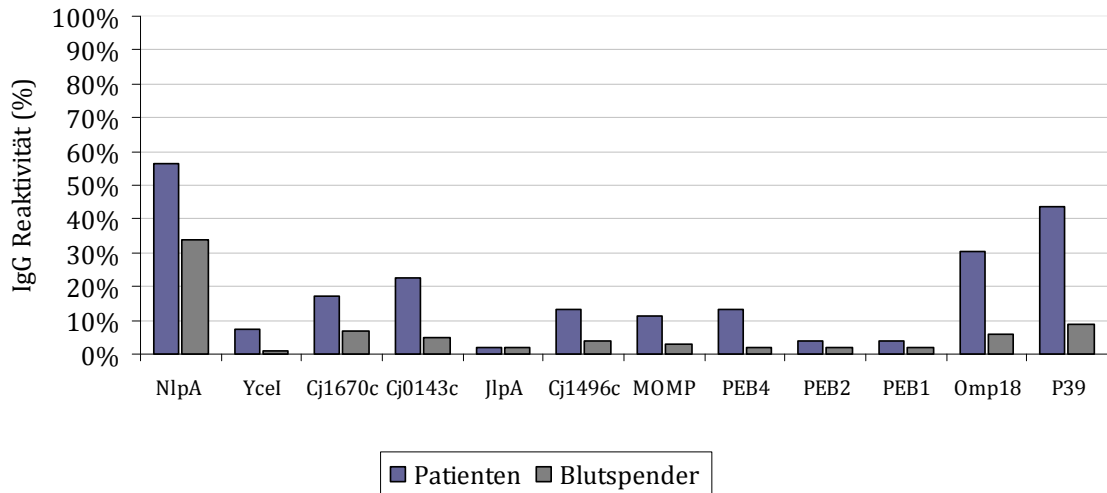
Die Ergebnisse der IgG- und IgA-Reaktivitäten sind der Abbildung 3.26 A und B zu entnehmen. Die Daten sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tab. 3.10: Reaktivität von IgG- und IgA-Antikörpern mit den *Campylobacter* Antigene NlpA, YceI, Cj1670c, Cj0143c, JlpA₁₆₋₁₈₅ und Cj1496c bei *Campylobacter* Patientenseren (n=53) und bei Blutspenderseren (BSS, n=85).

	NlpA		YceI		Cj1670c		Cj0143c		JlpA		Cj1496c	
	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Patienten (n=53)	30	3	4	0	9	0	12	2	1	0	7	0
Reaktivität	57%	6%	8%	0	17%	0	23%	4%	2%	0	13%	0
BSS (n=100)	34	1	1	0	7	4	5	3	2	0	5	0
Reaktivität	34%	1%	1%	0	7%	4%	5%	3%	2%	0	5%	0

ERGEBNISSE

A. IgG Reaktivität



B. IgA Reaktivität

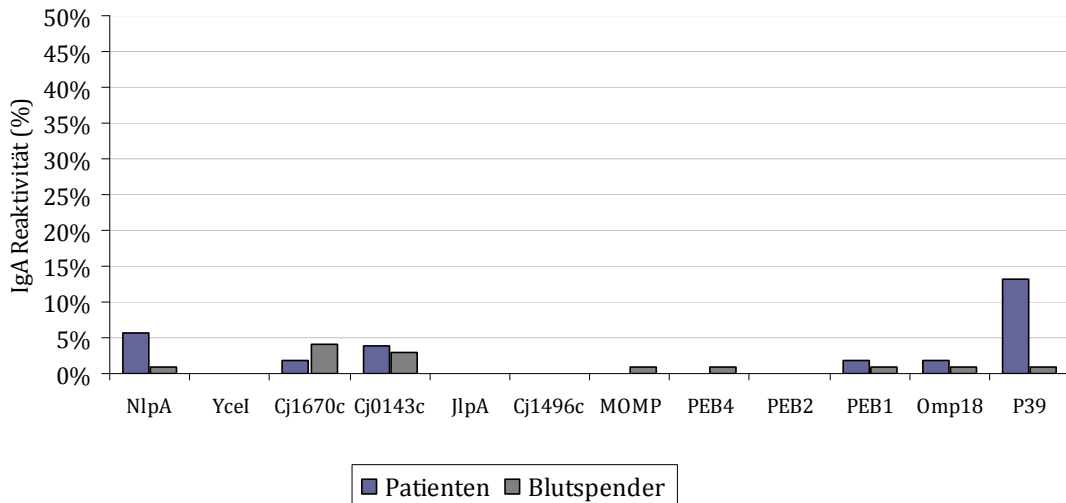


Abb. 3.26: (A) IgG-Reaktivität und (B) IgA-Reaktivität der neuen *C. jejuni* Antigene im „Line Assay“ verglichen mit den Antigenen des RecomLine Campylobacter (Mikroorgan). Die rekombinanten Proteine NlpA, JlpA₁₆₋₁₈₅, YceI, Cj1496c, Cj1670c und Cj0143c wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht, die im Anschluss in Streifen geschnitten wurde. Die Streifen wurden mit Patientenserum (n=53) bzw. mit Blutspenderserum (n=100) inkubiert (Serumverdünnung 1:100) und hinsichtlich der IgG-Reaktivität getestet. Als Referenzwerte wurde die IgG-Reaktivität (A) und die IgA-Reaktivität (B) der Seren mit den etablierten Antigenen MOMP, PEB4, PEB2, PEB1, Omp18 und P39 des RecomLine Campylobacter verglichen. Die IgG-Reaktivität ist in Prozent angegeben.

3.2.13 Nachweis von Glykoproteinen mittels Lektin Blot

Bei *Campylobacter* wurde eine N- und O-Glykosylierung nachgewiesen (Logan *et al.*, 1989; Szymanski *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1999). Die Glykosylierung von Proteinen kann ihre Immunreaktivität beeinflussen (Szymanski *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob die neuen *C. jejuni* Antigene NlpA, YceI, Cj0143c und Cj1670c glykosyliert sind, wurden Lektinblots durchgeführt (2.7.13). Lektine sind Proteine, die spezifisch Zuckerreste binden und für den Nachweis von glykosylierten Proteinen verwendet werden. Das Lektin der Sojabohne (*Glycine max*; *soy bean agglutinin* SBA) besitzt eine spezifische Affinität für den Zucker N-Acetyl-D-Galaktosamin. Bei der Verwendung von SBA-Peroxidase-Konjugat (SBA-PO) können Glykoproteinen direkt auf einer Nitrozellulose-Membrane detektiert werden. Für die Abspaltung von Zuckerresten wurde Perjodsäure verwendet, das durch Oxidation der Zuckerreste Glykoproteine deglykosyliert. Zuerst wurden eindimensionale Immunoblots mit den COPs durchgeführt, um zu überprüfen, ob Glykoproteine im Kulturüberstand von *C. jejuni* nachgewiesen werden können. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Perjodsäurebehandlung der auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine in eine veränderten Immunreaktivität mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunseren von Kaninchen (iv-CK8) resultiert. Hierfür wurden die COPs nach dem Molekulargewicht in einem 10 %igen Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Im Anschluss wurde die Membran in Streifen geschnitten und mit aufsteigenden Konzentrationen von Perjodsäure behandelt (0-20 mM). Die Streifen wurden mit iv-CK8 bzw. mit SBA-PO inkubiert (Abb. 3.27). Wie der Abbildung 3.27 zu entnehmen ist, befinden sich im Kulturüberstand von *C. jejuni* Glykoproteine, die mit SBA-PO detektiert werden können. Mit steigender Perjodsäurekonzentration bindet das SBA-PO immer schwächer an die Glykoproteine, bis bei einer Perjodsäurekonzentration von 20 mM fast keine Bindung mehr nachweisbar ist. Dies zeigt, dass die Perjodsäurebehandlung die Deglykosylierung der Glykoproteine bewirkt. Dahingegen hat die Deglykosylierung keinen sichtbaren Einfluss auf die Antikörperbindung von iv-CK8. Dies führt zur Vermutung, dass die Zuckerreste von *Campylobacter*-Glykoproteinen keinen Einfluss auf die Antikörperbindung besitzt.

Als Negativkontrolle wurde das verwendete SBA-PO mit N-Acetyl-D-Galaktosamin (N-AcGal) inkubiert, was bei einem Verhältnis von 1:10 (SBA-PO:N-AcGal) zur Absättigung der Bindungsstellen des Lektins und somit zu keiner Bindung an Glykoproteine führt (Ergebnisse nicht gezeigt).

ERGEBNISSE

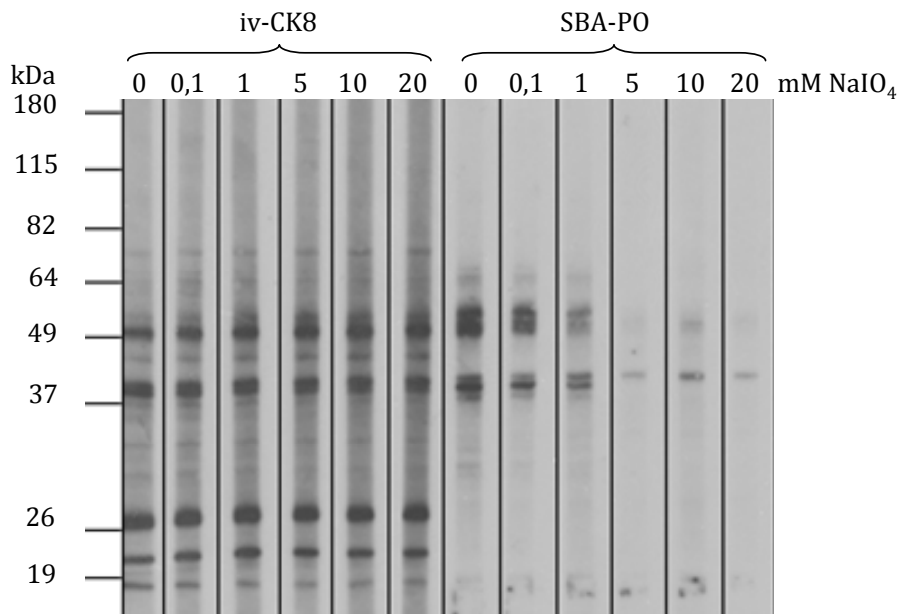


Abb. 3.27: Detektion von Glykoproteinen im Kulturüberstand von *C. jejuni*. *C. jejuni* K8 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt und die darin enthaltenen COPs wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die in Streifen geschnitten wurde. Anschließend wurden die Streifen mit steigenden Konzentrationen von Perjodsäure inkubiert. Antigene wurden mit iv-CK8 (1:200) / Z α K-IgG-HRP, Glykoproteine mit SBA-PO in 50 mM Natrium-Acetat Puffer pH 4,5 (5 μ g SBA/ml) detektiert.

Der Einfluss der Glykosylreste auf die Antikörperbindung wurde auch mit Patientenseren getestet (Abb. 3.28). Hierfür wurden unbehandelte und mit 10 bzw. 20 mM Perjodsäure behandelte Nitrozellulosestreifen mit COPs mit Patientenseren (1-5) inkubiert. Als Kontrollen wurden Streifen auch mit iv-CK8 bzw. SBA-PO behandelt. Wie in Abbildung 3.28 zu sehen ist, ist kein Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit 10 mM Perjodsäure behandelten und mit Patientenseren inkubierten Streifen zu erkennen. Die Antigenerkennung durch iv-CK8 wird durch die Deglykosylierung auch nicht beeinflusst. Nur das Lektin zeigt eine verminderte Reaktion mit den mit Perjodsäure behandelten Proteinen.

ERGEBNISSE

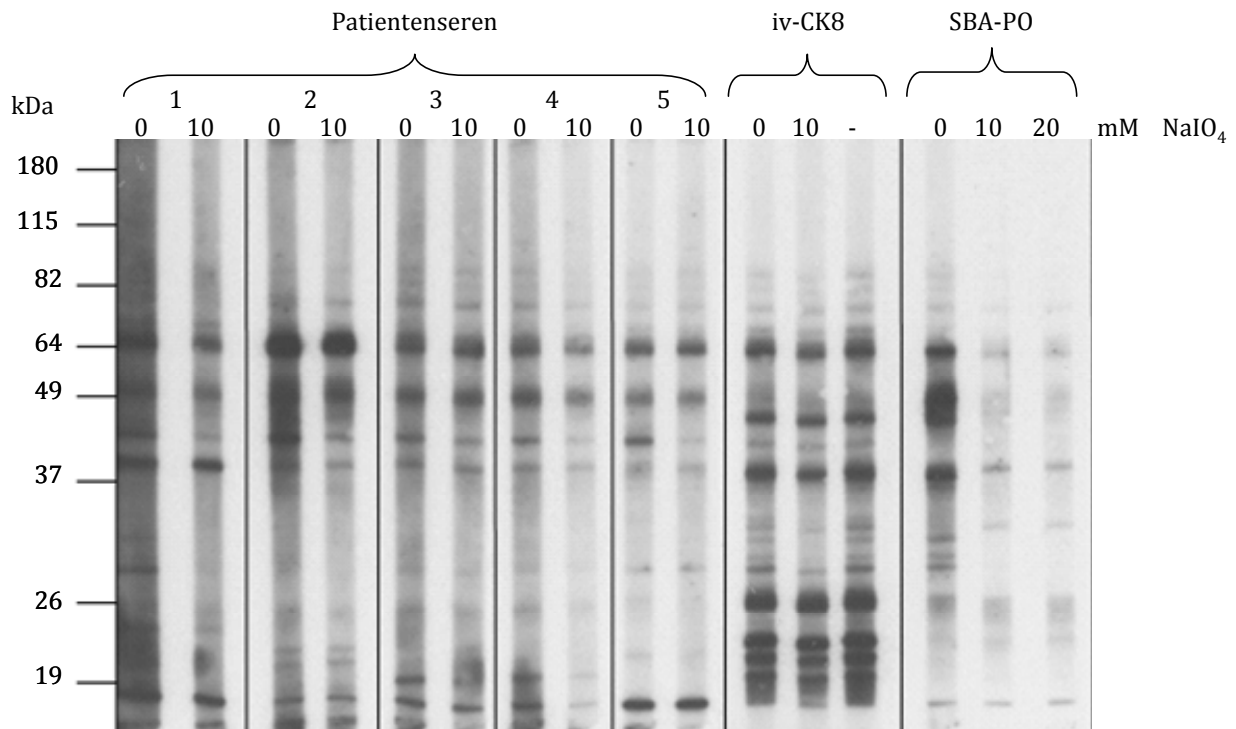


Abb. 3.28: Detektion von Glykoproteinen im Kulturüberstand von *C. jejuni*. *C. jejuni* K8 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurde der Kulturüberstand mittels TCA gefällt und die darin enthaltenen COPs wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die in Streifen geschnitten wurde. Anschließend wurde ein Teil der Streifen mit 10 bzw. 20 mM Perjodsäure inkubiert. Antigene wurden mit Patientenseren (1-5; 1:200) bzw. iv-CK8 (1:200) und α H-IgG-HRP bzw. α K-IgG-HRP detektiert. Glykoproteine wurden mit SBA-PO in 50 mM Natrium-Acetat Puffer pH 4,5 (5 μ g SBA/ml) nachgewiesen.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die neu identifizierten Antigene NlpA, YceI, Cj0143c und Cj1670c glykosyliert sind. Hierfür wurden 2 dimensionale Lektinblots angefertigt (2.7.13). Wie der Abbildung 3.29 zu entnehmen ist, handelt es sich bei den Proteinen Cj0143c, Cj1670c und PEB3 um Glykoproteine, die mit dem Sojabohnen Lektin detektiert werden können. Diese Proteine sind sowohl im Zelllysate (Abb. 3.29 A) als auch im Kulturüberstand (Abb. 3.29 B) nachzuweisen. Nach Behandlung der auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine mit 20 mM Perjodsäure sind die Glykoproteine mit dem Sojabohnen Lektin nicht mehr zu detektieren (Abb. 3.29 C und D). Bei den Antigenen NlpA und YceI handelt es sich nicht um mit SBA-PO detektierbare Glykoproteine.

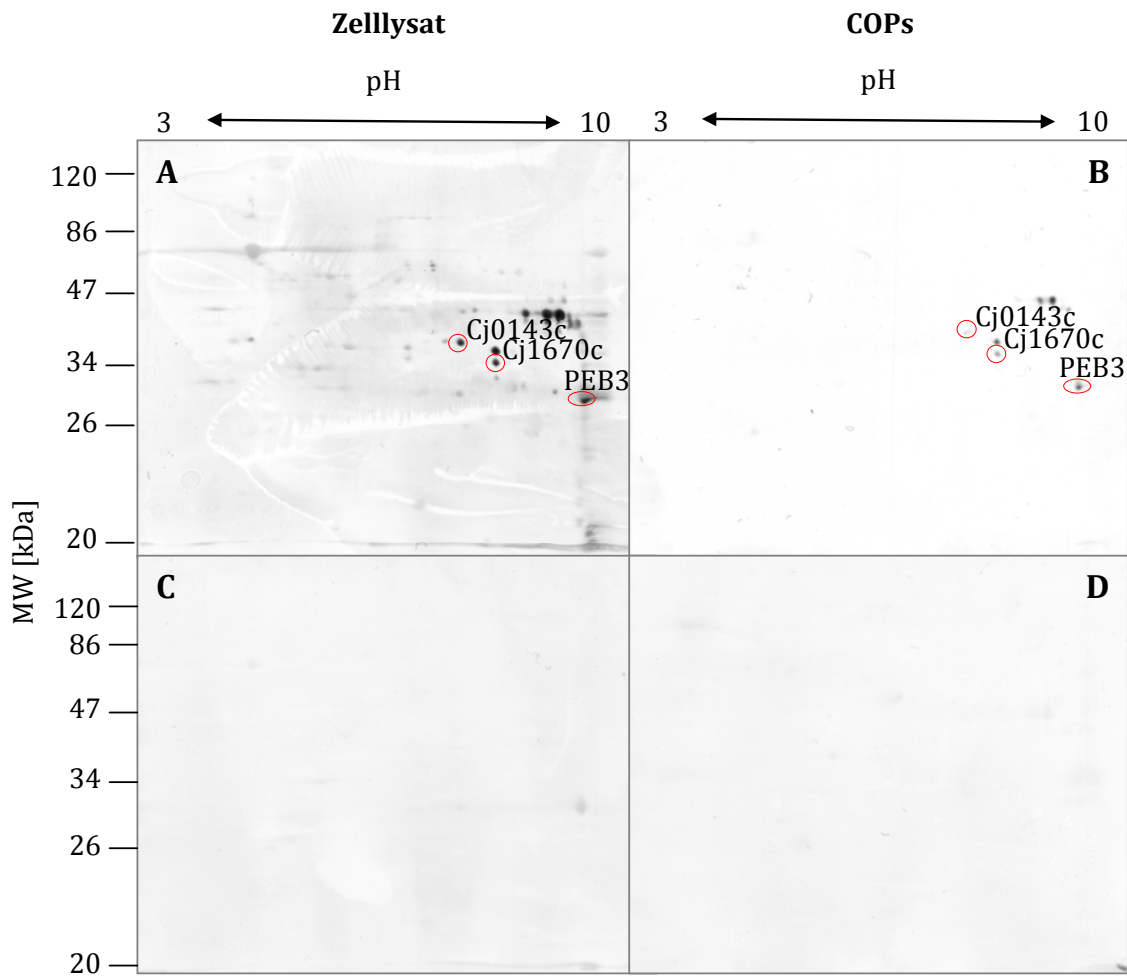


Abb. 3.29: 2D Lektinblot von *C. jejuni* Zelllysate (A und C) und von COPs (B und D). *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zellbruchstücken wurde das Zelllysate TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt (A und C). Die COPs aus dem Kulturüberstand wurden mit TCA gefällt (B und D). In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Elektrophoretischer Transfer des Zelllysates bzw. der COPs auf eine Nitrozellulosemembran. **A)** Detektion von Glykoproteinen im Zelllysate mit SBA-PO. **B)** Detektion von Glykoproteinen im Kulturüberstand mit SBA-PO. **C)** Detektion von Glykoproteinen nach Perjodsäurebehandlung (20 mM) im Zelllysate mit SBA-PO. **D)** Detektion von Glykoproteinen nach Perjodsäurebehandlung (20 mM) im Kulturüberstand mit SBA-PO in 50 mM Natrium-Acetat Puffer pH 4,5 (5 µg SBA/ml). Die Glykoproteine sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

Ob die Deglykosylierung der Glykoproteine Cj0143c, Cj01670c und PEB3 einen Einfluss auf die Antikörperbindung besitzt, wurde mit Hyperimmenserum aus Kaninchen überprüft. Hierfür wurden 2 dimensionale Immunoblots mit Zelllysate und COPs angefertigt, wobei jeweils die auf die Nitrozellulose transferierten Proteine im Immunoblot und nach 20 mM Perjodsäurebehandlung mit iv-CK8 nachgewiesen wurden (Abb. 3.30). Wie in der Abbildung 3.30 zu sehen ist, werden die

ERGEBNISSE

Glykoproteine Cj0143c, Cj1670c und PEB3 auch nach Perjodsäurebehandlung nachgewiesen. Somit scheinen die Glykosylreste nicht ausschlaggebend für die Antikörpererkennung zu sein.

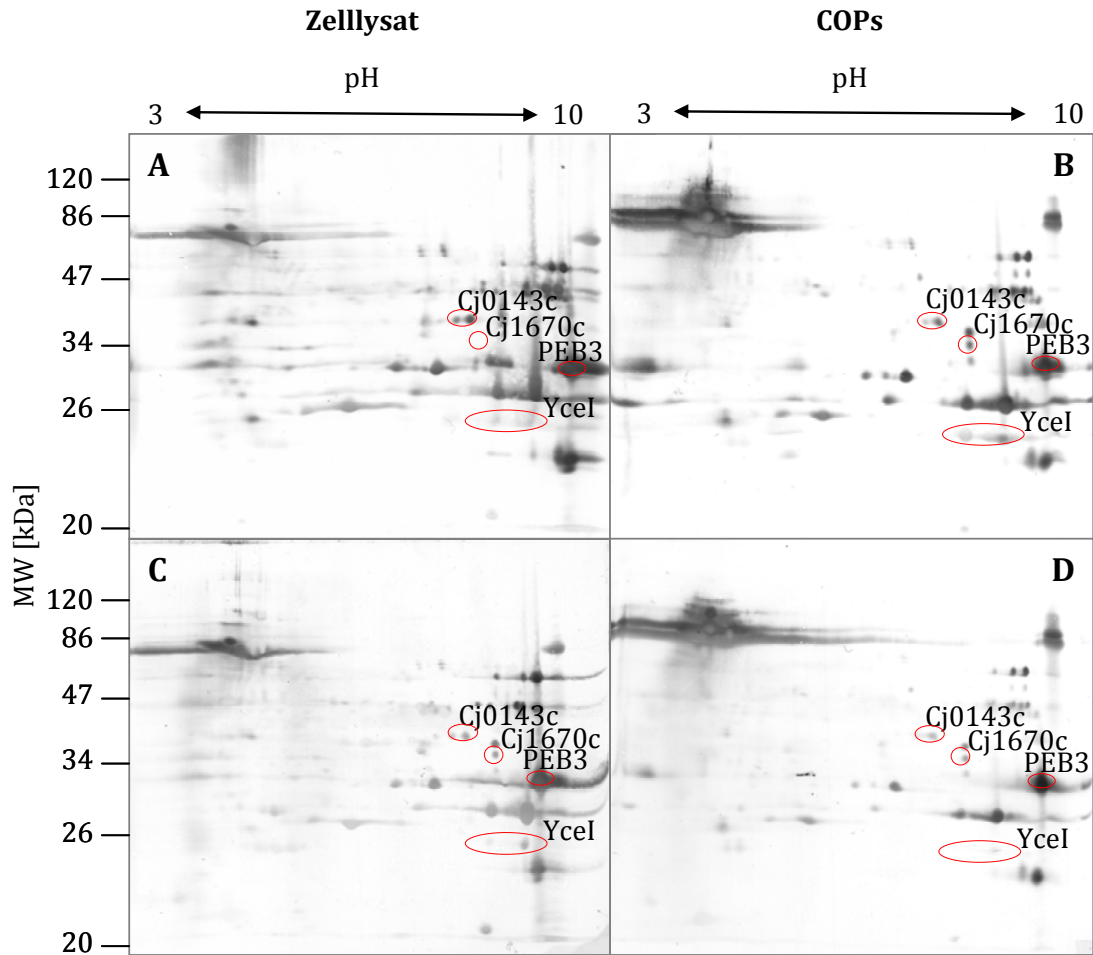


Abb. 3.30: 2D Immunoblot von *C. jejuni* Zellysat (A und C) und von COPs (B und D). *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zellbruchstücken wurde das Zellysat TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt (A und C). Die COPs aus dem Kulturüberstand wurden mit TCA gefällt (B und D). In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Elektrophoretischer Transfer des Zellysates bzw. der COPs auf eine Nitrozellulosemembran. **(A)** Detektion von Antigenen im Zellysat mit iv-CK8 **(B)** Detektion von Antigenen im Kulturüberstand mit iv-CK8 **(C)** Detektion von Antigenen nach Perjodsäurebehandlung (20 mM) im Zellysat mit iv-CK8 **(D)** Detektion von Glykoproteinen nach Perjodsäurebehandlung (20 mM) im Kulturüberstand mit iv-CK8 (1:200). Als Sekundärantikörper wurden α K-IgG-HRP verwendet. Die Glykoproteine sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

3.2.14 Sekretom Subfraktionierung

Es wurde das Sekretom von *C. jejuni* in Abhängigkeit eines funktionales Flagellenapparates (Fla-T3SS) und des TAT-Sekretionssystems untersucht. Da *C. jejuni* kein zusätzliches Typ-III-Sekretionssystem besitzt (Parkhill *et al.*, 2000) und gezeigt wurde, dass die Sekretion von einigen Proteinen vom Fla-T3SS abhängig ist, wurde eine Fla-T3SS defiziente *C. jejuni* Mutante hergestellt (2.6.10.2). Um das Fla-T3SS auszuschalten, wurde das Gen *flgC*, das ein Protein des flagellaren Basalkörpers kodiert, im Wildtypstamm *C. jejuni* Lior 11 (L11) durch die Einführung einer Kanamycin-Kassette ausgeschaltet. Die Fla-T3SS defiziente Mutante wurde L11 Δ *flgC* genannt. Des Weiteren wurde der Export von Proteinen in Abhängigkeit des Twin Arginin Translokations (TAT)-Systems untersucht, indem eine TAT-negative *C. jejuni* Mutante konstruiert wurde (2.6.10.2). Um das TAT-Sekretionssystem zu inaktivieren, wurde das Gen *tatC*, das die Translokase des TAT-Systems kodiert, im Wildtypstamm L11 durch die Einführung einer Kanamycin-Kassette ausgeschaltet. Die TAT-defiziente Mutante wurde L11 Δ *tatC* genannt. Das Sekretom wurde in SSPs (*soluble supernatant proteins*) und OMVs (*outer membrane vesicles*), ein weiterer Mechanismus für die Proteinfreisetzung, unterteilt (2.7.2) und zweidimensional auftrennt (2.7.7). Zusätzlich wurde das Gesamtzelllysate der 3 Stämme L11, L11 Δ *flgC* und L11 Δ *tatC* untersucht (2.7.4)

3.2.14.1 Subfraktionierung des Sekretoms von *C. jejuni* Lior 11 wt

Um zu untersuchen, welche Proteine von *C. jejuni* sekretiert werden und welche sich in der SSP- und OMV-Fraktion wiederfinden, wurden 2 dimensionale Gele mit dem Gesamtzelllysate, den COPs, den SSPs und den OMVs angefertigt. Anschließend wurden die 2 dimensional Gele mittels der Software PDQuest analysiert und Proteine massenspektrometrisch identifiziert (Abb.3.31). In Tabelle 3.11 ist die Verteilung der identifizierten Proteine in den verschiedenen Fraktionen aufgelistet. Insgesamt konnten 23 Proteine identifiziert werden. Stark basische Proteine wurden aufgrund der schlechten Auftrennung in der 1. Dimension nicht in die Bewertung aufgenommen, da diese mit PDQuest nicht auszuwerten sind. Alle identifizierten Proteine wurden in der Fraktion COPs detektiert. 4 der Proteine waren nicht im Zelllysate nachweisbar: Cj1631c, FlaD, FlgD und FlgE2. In der löslichen Fraktion SSP konnten dieselben Proteine bestimmt werden wie in der COPs Fraktion, mit Ausnahme von MOMP, das nur in sehr geringen Mengen vorlag. 12 der Proteine (52,2 %) waren auch in der OMV Fraktion nachweisbar. Wenn die Lokalisation nicht bekannt war wurde sie mit PSORTb Version 2.0.2 berechnet (Gardy *et al.*, 2005). Ein Protein (~4,3 %) ist in der äußeren Membran lokalisiert. 7 Proteine (~30,5 %) sind mit dem Flagellum assoziiert und liegen somit

ERGEBNISSE

extrazellulär vor. Bei 5 der Proteine (~22 %) handelt es sich um periplasmatische Proteine. 7 Proteine (~ 30,5 %) sind im Zytosol lokalisiert und bei weiteren 3 Proteinen (~13 %) konnte die zelluläre Lokalisation nicht bestimmt werden.

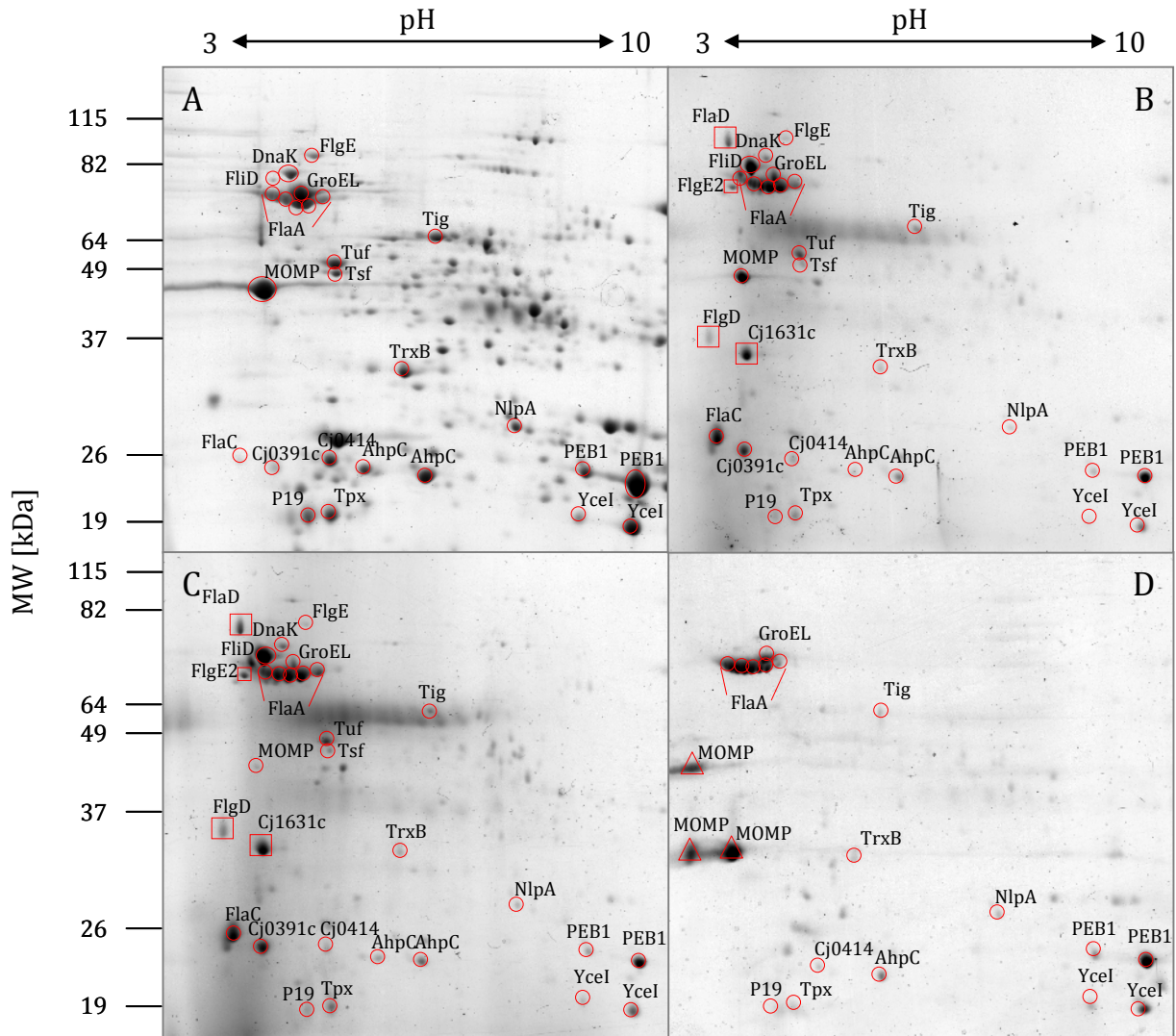


Abb.3.31: Sekretomanalyse von *C. jejuni* Lior 11. A) ZL B) COPs C) SSPs D) OMVs. *C. jejuni* L11 wurde nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zellbruchstücken wurde das Zytosol und Periplasma mit TCA gefällt (A). TCA-Fällung der COPs aus dem Kulturüberstand (B). Ultrazentrifugation des Kulturüberstandes. Der Überstand wurde mit TCA gefällt und enthält die SSPs (C). Das Pellet enthält die OMVs und wurde in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen (D). Die Fraktionen wurden zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Proteine, die in jeder Fraktion vorkommen, wurden mit einem Kreis gekennzeichnet. Proteine, die nur im Überstand zu detektieren waren, wurden mit einem Quadrat gekennzeichnet. Dreiecke kennzeichnen MOMP Isotypen.

ERGEBNISSE

Tab. 3.11: Proteine des Sekretoms von *C. jejuni* und deren Zuordnung in die Fraktionen Zytosol und Periplasma (ZP), *Campylobacter outer proteins* (COPs), *Soluble supernatant proteins* (SSPs) und *Outer membrane vesicles* (OMV). Ein Plus (+) kennzeichnet das Vorhandensein des Proteins in der entsprechenden Fraktion. ÄM: Äußere Membran; EZ: extrazellulär; FA: Flagellum-assoziiert; nb: nicht benannt; P: Periplasma; SS: Signalsequenz; TMH: Transmembranhelix; Z: Zytosol.

Protein	Beschreibung	zelluläre Lokalisation	ZP	COPs	SSPs	OMVs
AhpC	Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase	Z	+	+	+	+
Cj0391c	putatives protein	nb	+	+	+	-
Cj0414	putative Oxidoreduktase Untereinheit	nb, mögliche TMH	+	+	+	+
Cj1631c	konserviertes Protein mit unbekannter Funktion	nb	-	+	+	-
DnaK	Chaperon DnaK	Z	+	+	+	-
FlaA	Flagellin A	EZ, FA	+	+	+	+
FlaC	Flagellin C	EZ, FA	+	+	+	-
FlaD	putatives Flagellin D	EZ, FA	-	+	+	-
FlgD	Assemblierungsprotein des flagellaren Basalkörpers	FA	-	+	+	-
FlgE2	flagellares Hakenprotein	EZ, FA	-	+	+	-
FlgE	flagellares Hakenprotein	EZ, FA	+	+	+	-
FliD	flagellares Deckelprotein	EZ, FA	+	+	+	-
GroEL	Chaperonin GroEL	Z	+	+	+	+
MOMP	Major outer membrane protein	ÄM	+	+	(+)	+
NlpA	putatives Lipoprotein NlpA	nb	+	+	+	+
P19	periplasmatisches Protein p19	P	+	+	+	+
PEB1	bifunktionelles Adhesin/ABC Transporter Asp/Glu-Bindeprotein	P	+	+	+	+
Tig	Trigger Faktor (Chaperon)	Z	+	+	+	+
Tpx	Thiol Peroxidase (Detoxifikation)	nb	+	+	+	+
TrxB	Thioredoxin Reduktase	Z	+	+	+	+
Tsf	Elongationsfaktor Ts	Z	+	+	+	-
Tuf	Elongationsfaktor Tu	Z	+	+	+	-
Ycel	putatives periplasmatisches Protein	P	+	+	+	+

3.2.14.2 Das Sekretom in Abhängigkeit des Fla-T3SS und des TAT-Systems

Um die Rolle des Fla-T3SS und des TAT-Sekretionssystems zu untersuchen, wurde das Sekretom von einer Flagellen-negativen (*L11ΔflgC*) und einer TAT-negativen (*L11ΔtatC*) *C. jejuni* Mutante analysiert und mit dem Sekretom des Wildtyps (*L11wt*) verglichen. Hierfür wurden die einzelnen Fraktionen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Das erhaltene Proteinmuster

ERGEBNISSE

wurde anschließend mit der Software PDQuest analysiert. Im ersten Schritt wurden die Zellysate der drei Stämme miteinander verglichen (Abb. 3.32). Anschließend wurden die COPs, die SSPs und die OMVs der drei Stämme gegenübergestellt (Abb. 3.33, Abb. 3.34 und Abb. 3.35). Eine Zusammenfassung der veränderten Proteinfreisetzung ist der Tabelle 3.12 zu entnehmen. Das Chaperonin GroEL konnte in allen vier Fraktionen des Wildtyps aber auch der Mutanten nachgewiesen werden. Das Chaperon DnaK und das flagellare Hakenprotein 2 konnte bei allen drei Stämmen in den Fraktionen ZP, COPs und SSPs detektiert werden, nicht aber in der Fraktion OMVs. Das Flagellin FlaA war bei der Flagellen-negativen Mutante nur in der Zytosol/Periplasma-Fraktion und bei der TAT-negativen Mutante in keiner Fraktion nachzuweisen. Beim Wildtyp war das Flagellin in allen vier Fraktionen vorhanden. Die Proteine Cj1631c, FlaC und FlgE2 waren nur in den Fraktionen COPs und SSPs vom Wildtyp nachweisbar. Die Proteine Cj0391c und FlaC waren in geringen Mengen im Zytosol und Periplasma und in größeren Mengen in den Fraktionen COPs und SSPs des Wildtyps detektierbar.

Tab. 3.12: Proteine, deren Produktion und Freisetzung sich bei *C. jejuni* L11 wt, L11ΔflgC und L11ΔtatC unterscheiden. Zuordnung der Proteine in die Fraktionen Zytosol und Periplasma (ZP), *Campylobacter outer proteins* (COPs), *Soluble supernatant proteins* (SSPs) und *Outer membrane vesicles* (OMV). Das Plus (+) kennzeichnet das Vorhandensein und Quantifizierung des Proteins in der entsprechenden Fraktion.

Protein	Beschreibung	L11 wt				L11ΔflgC				L11ΔtatC			
		ZP	COPs	SSPs	OMVs	ZP	COPs	SSPs	OMVs	ZP	COPs	SSPs	OMVs
Cj0391c	putatives protein	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cj0414	putative Oxidoreduktase	+++	+	+	+	+++	+	+	+	+/-	-	-	-
Cj1631c	konserviertes Protein mit unbekannter Funktion	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FlaA	Flagellin A	+	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	(+)
FlaC	Flagellin C	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FlgD	Assemblierungsprotein des flagellaren Basalkörpers	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FlgE2	flagellares Hakenprotein 2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FlgE	flagellares Hakenprotein	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
FliD	flagellares Deckelprotein	+	+++	+++	-	+	(+)	-	-	-	-	-	-

ERGEBNISSE

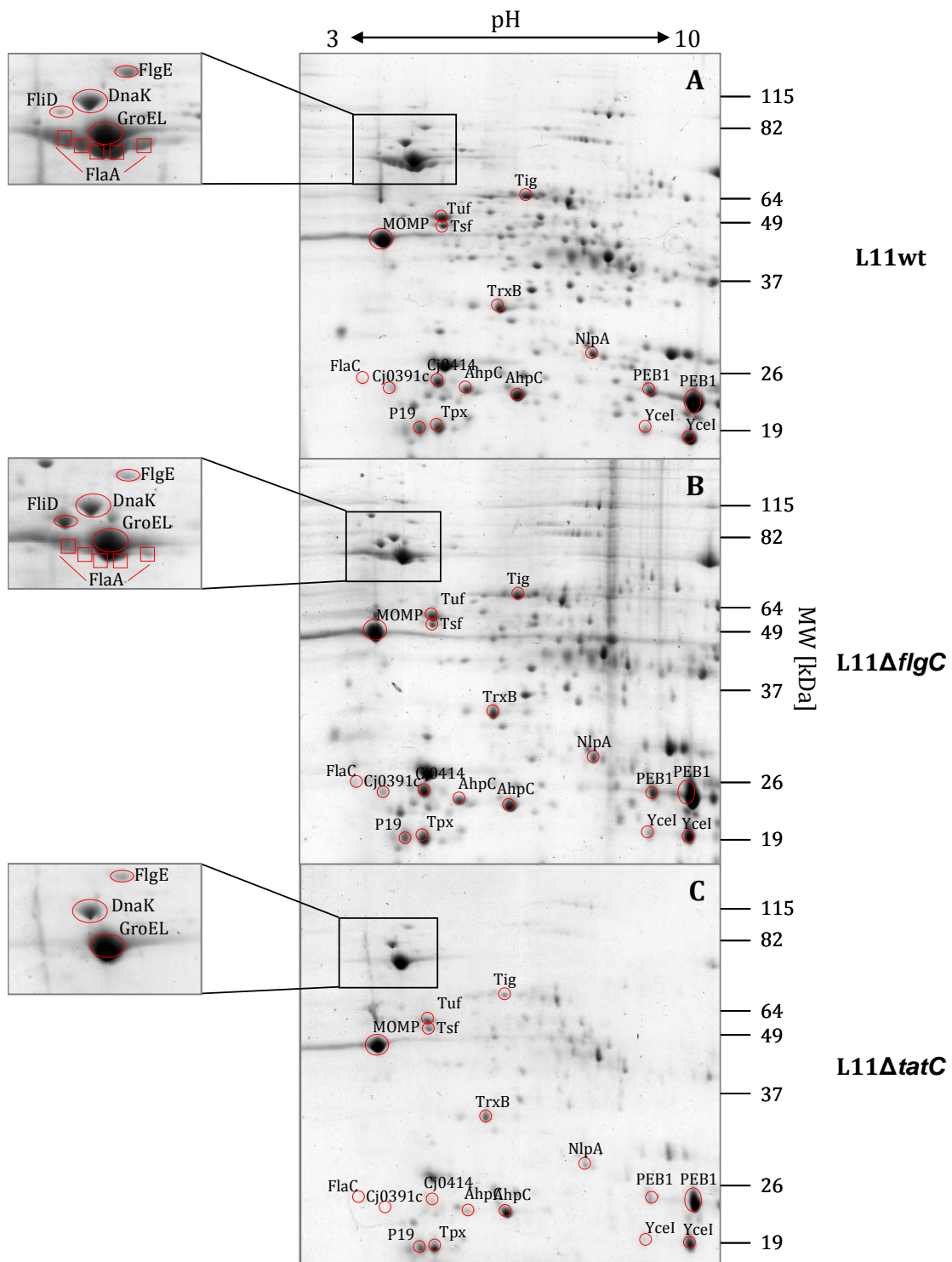


Abb.3.32: ZP von A) *C. jejuni* L11, B) L11ΔflgC und C) L11ΔtatC. *C. jejuni* L11, L11ΔflgC und L11ΔtatC wurden nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zellbruchstücken wurde das Zytosol und das Periplasma mit TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Proteine, die von allen 3 Stämmen produziert wurden, wurden mit einem Kreis gekennzeichnet. Proteine, bei denen eine veränderte Produktion zu detektieren war, wurden vergrößert und mit einem Quadrat gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

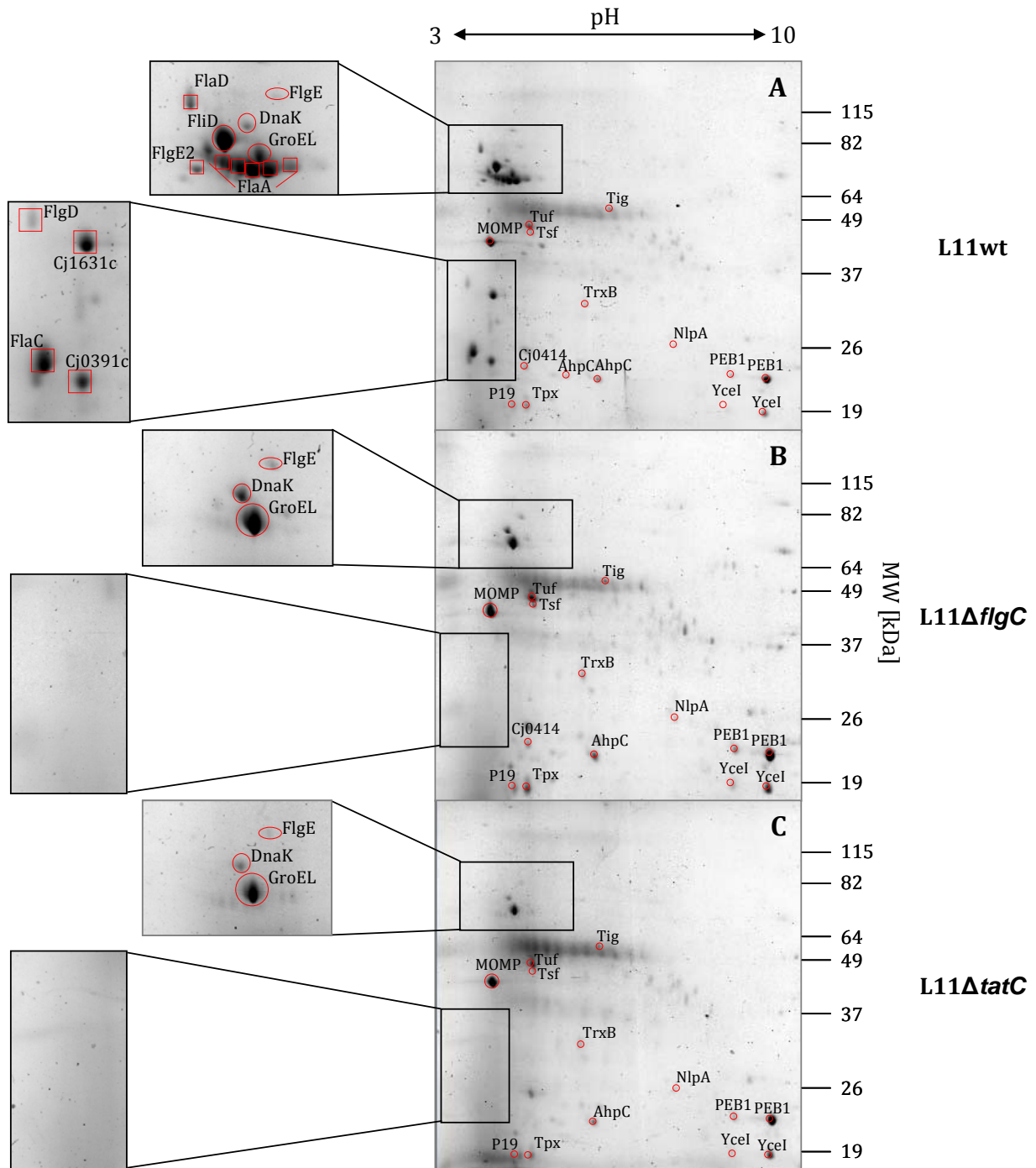


Abb.3.33: COPs von A) *C. jejuni* L11, B) L11ΔflgC und C) L11ΔtatC. *C. jejuni* L11, L11ΔflgC und L11ΔtatC wurden nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden der Kulturüberstand mit TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Proteine, die von allen 3 Stämmen freigesetzt wurden, wurden mit einem Kreis gekennzeichnet. Proteine, bei denen eine veränderte Freisetzung zu detektieren war, wurden vergrößert und mit einem Quadrat gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

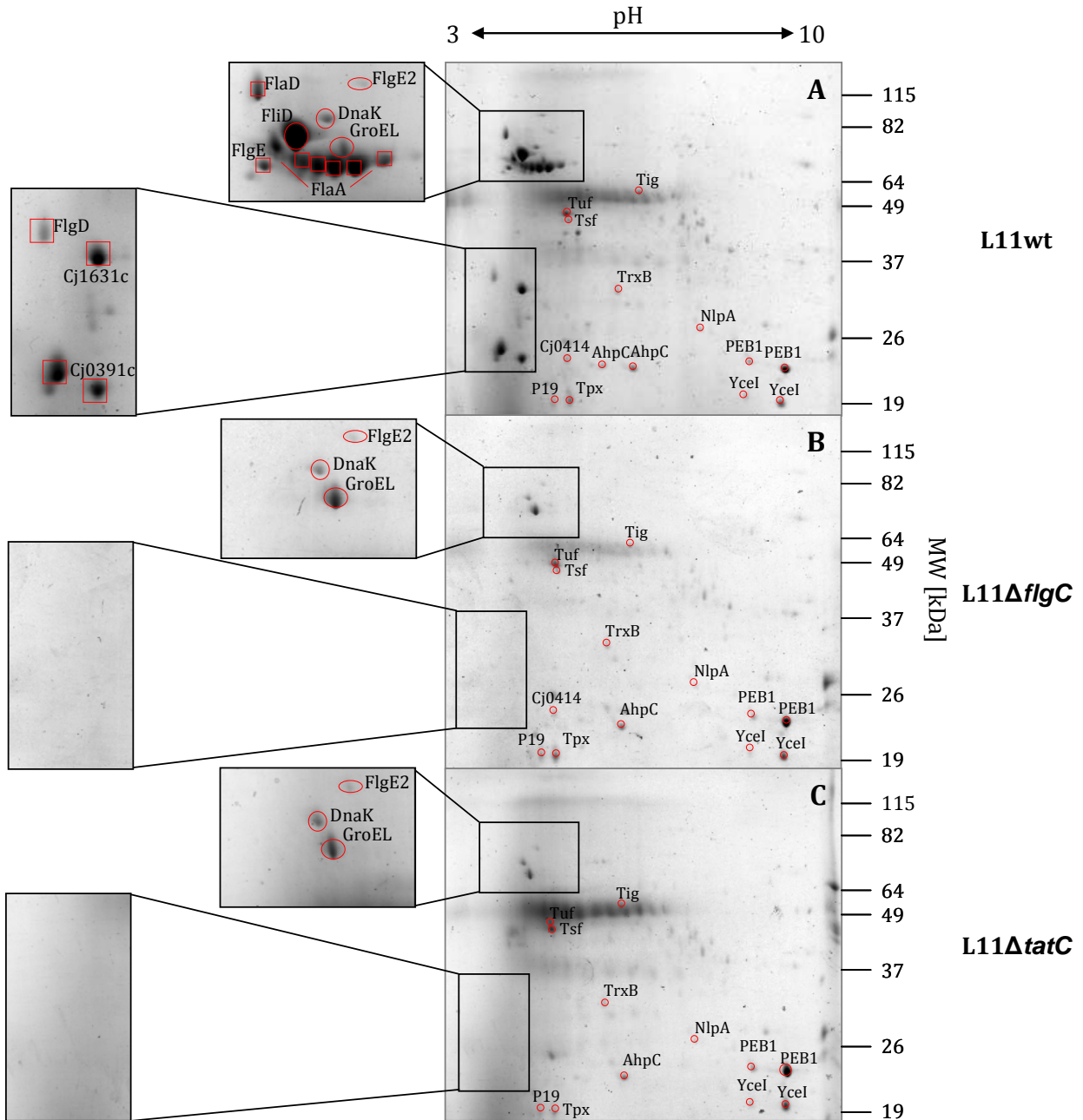


Abb.3.34: SSPs von A) *C. jejuni* L11, B) L11ΔflgC und C) L11ΔtatC. *C. jejuni* L11, L11ΔflgC und L11ΔtatC wurden nach 16 h Wachstum geerntet. Nach niedertouriger Zentrifugation wurde der Kulturüberstand ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde mit TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Proteine, die von allen 3 Stämmen freigesetzt wurden, wurden mit einem Kreis gekennzeichnet. Proteine, bei denen eine veränderte Freisetzung zu detektieren war, wurden vergrößert und mit einem Quadrat gekennzeichnet

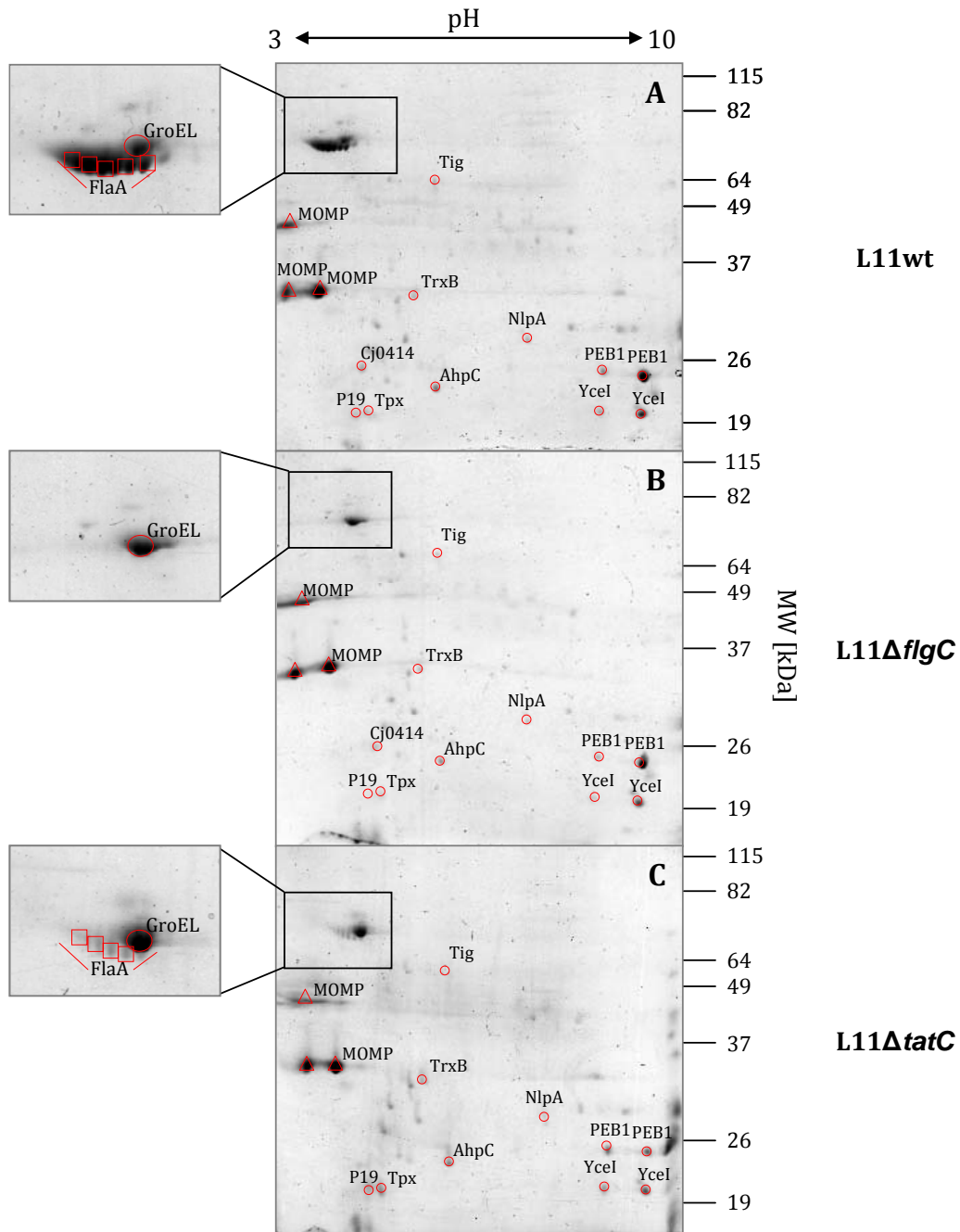


Abb.3.35: OMVs von A) *C. jejuni* Lior 11, B) L11ΔflgC und C) L11ΔtatC. *C. jejuni* L11, L11ΔflgC und L11ΔtatC wurden nach 16 h Wachstum geerntet. Nach niedertouriger Zentrifugation wurde der Kulturüberstand ultrazentrifugiert und das Pellet in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen. Die OMVs wurden zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Proteine, die von allen 3 Stämmen freigesetzt wurden, wurden mit einem Kreis gekennzeichnet. Proteine, bei denen eine veränderte Freisetzung zu detektieren war, wurden vergrößert und mit einem Quadrat gekennzeichnet

Die putative Oxidoreduktase Cj0414 enthält eine mögliche TAT-Signalsequenz (van Mourik *et al.*, 2008). Wie in Abbildung 3.36 zu sehen ist, ist Cj0414 in L11 Δ *tatC* im Vergleich zu *C. jejuni* wt und L11 Δ *flgC* nur in geringen Mengen vorhanden. Im Kulturüberstand (COPs) von L11 Δ *tatC* kann Cj0414 nicht nachgewiesen werden.

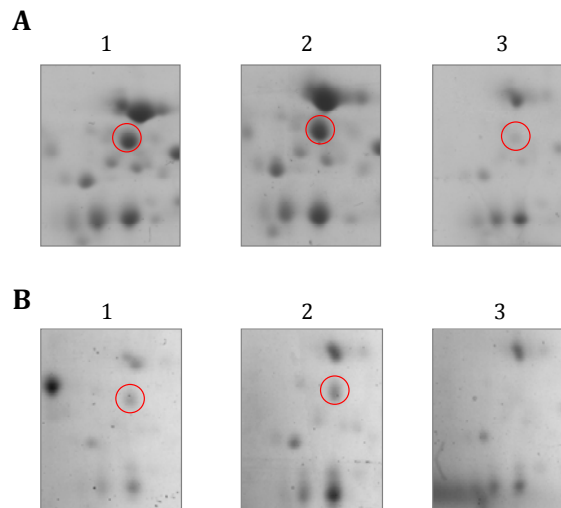


Abb.3.36: Cj0414 in CP (A) und Kulturüberstand (B). 1) *C. jejuni* L11, 2) L11 Δ *flgC* und 3) L11 Δ *tatC* wurden nach 16 h Wachstum geerntet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zellbruchstücken wurde das Zelllysate mit TCA gefällt und zweidimensional aufgetrennt (A). Der Kulturüberstand wurde mit TCA gefällt und enthält die COPs. CP und COPs wurden zweidimensional aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-10, in der zweiten Dimension in einem 12 %igen SDS-Gel nach dem Molekulargewicht. Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Vergrößerung des Gelabschnittes mit Cj0414 (roter Kreis).

3.2.14.3 Beweglichkeitsuntersuchung von L11 Δ *flgC* und L11 Δ *tatC*

Um die Inaktivierung des Flagellensystems zu überprüfen, wurde der Verlauf der Beweglichkeit von L11 Δ *flgC* im Beweglichkeitsagar (0,3 %iger Agar) getestet (2.5.3). Da bei L11 Δ *tatC* kein Flagellin im Kulturüberstand nachweisbar war, wurde auch dieser Stamm auf Beweglichkeit überprüft (Abb. 3.37). Wie der Abbildung 3.37 zu entnehmen ist, ist weder die Mutante L11 Δ *flgC*, noch die Mutante L11 Δ *tatC* beweglich. Bei Wildtyp wurde Schwärmen im halbfesten Agar und somit Beweglichkeit nachgewiesen. Damit führt die Deletion von *flgC* oder *tatC* zum Verlust der Beweglichkeit.

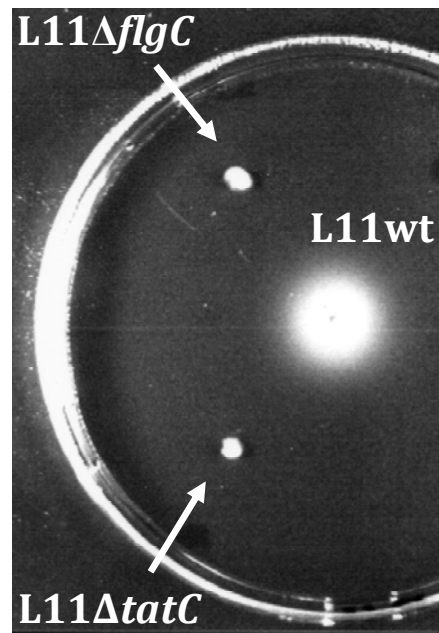


Abb.3.37: Beweglichkeit von *C. jejuni* L11 wt, L11ΔflgC und L11ΔtatC. 1 µl einer Vorkultur wurde in den Beweglichkeitsagar pipetiert und anschließend 36 h unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die Beweglichkeit ist durch Ausschwärmen des L11 wt Stammes in den Agar erkennbar.

4 Diskussion

Der Nachweis von klassenspezifischen Serumantikörpern gehört zusammen mit dem Erregernachweis zum Repertoire der Labordiagnostik von Infektionskrankheiten. Bei den frühen klassischen serologischen Methoden wie Agglutination und Komplementbindungsreaktion (KBR) wird neben der spezifischen Reaktion der Antikörper mit Erregerantigenen auch die Antikörpereffektorfunktion bestimmt. Ein Nachteil dieser klassischen Methoden ist die schlechte Charakterisierung und Standardisierung der Antigene und die bei Erhöhung der Sensitivität verbundenen Verringerung der Spezifität. Darüber hinaus lassen sich diese Methoden nicht gut automatisieren. Durch die Erfindung des ELISA-Prinzips und der Herstellung rekombinanter Erregerantigene konnten viele Nachteile der klassischen serologischen Methoden behoben werden. Die hier erarbeiteten Ergebnisse gehen in diese Richtung und sollen die serologischen Diagnostikverfahren für Yersiniose und Campylobakteriose verbessern. Von vielen Bakterienarten gibt es pathogene und nicht-pathogene innerhalb einer Art, was zur Pathotypisierung geführt hat. Entsprechend kann erwartet werden, dass virulenzassoziierte Antigene für die serologische Diagnostik die erste Wahl sein sollten. Um einen diagnostischen Test zu evaluieren, kann die „Vierfeldertafel“ verwendet werden (Abb. 4.1). Aus dieser lassen sich die Sensitivität und die Spezifität eines diagnostischen Tests ablesen. Die Sensitivität wird als der Anteil positiver Testergebnisse unter Kranken definiert und zeigt die Fähigkeit eines Test an, Personen mit fragwürdiger Erkrankung vollständig herauszufiltern. Die Spezifität ist definiert als der Anteil negativer Testergebnisse unter Gesunden und gibt die Fähigkeit des Tests an, ausschließlich Personen mit der fraglichen Krankheit zu erfassen.

Zustand der getesteten Person			
	krank	gesund	
positives Testergebnis	rp	fp	alle Testpositiven: rp + fp
negatives Testergebnis	fn	rn	alle Testnegativen: fn + rn
	alle Erkrankten: rp + fn	alle Gesunden: fp + rn	
	⇩	⇩	
	Sensitivität = $rp / (rp + fn)$	Spezifität = $rn / (fp + rn)$	

Abb. 4.1: Vierfeldertafel bei diagnostischen Tests. rp: richtig positiv; fp: falsch positiv; fn: falsch negativ; rn: richtig negativ.

Bei der serologischen Diagnostik werden verschiedene Immunglobulinklassen, die spezifisch gegen Erregerantigene gerichtet sind, detektiert. Immunglobuline (Ig) sind antigenerkennende Moleküle und werden von B-Zellen produziert. Die fünf wichtigsten Immunglobulinklassen sind IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Immunglobuline derselben Antigenespezifität werden von ausdifferenzierten B-Zellen, den sogenannten Plasmazellen, als Antikörper sezerniert. B-Zellen können T-Zell-abhängig von T-Helfer 2-Zellen (T_H2) in lymphatischen Geweben aktiviert werden. Die B-Zellen binden Antigene über ihren B-Zell-Rezeptor (membrangebundenes IgM). Die Antigene werden anschließend über Endozytose aufgenommen und durch Proteasen in Peptide gespalten, die über MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse II-Moleküle präsentiert werden. Die Bindung des T-Zell Rezeptors an den MHC-II/Peptid Komplex liefert das erste Signal der B-Zell-Aktivierung. Das zweite Signal ist die Bindung des CD40L auf T_H2 an CD40 der B-Zelle. Durch beide Signale wird die klonale Expansion der B-Zelle und die Freisetzung von Interleukin-4 (IL-4), ein Wachstumsfaktor für B-Zellen, durch die T-Zelle stimuliert. Dadurch differenzieren die B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen aus. Zusätzlich schüttet die T-Zelle Zytokine aus, die den Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zelle bewirken, wodurch auch Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgE gebildet werden können. Auch die Ausbildung von Gedächtnis-B-Zellen ist T-Zell-abhängig. Die Bindung von Antigenen an B-Zell-Rezeptoren erfolgt über die B-Zell-Epitope der Antigene. B-Zell-Epitope können aufgrund der Aminosäuresequenz bestimmt werden und beinhalten oft hydrophile Aminosäuren, die auf der Oberfläche von nativen Antigenen liegen und somit gut zugänglich für die Antikörperbindung sind. Kreuzreaktivitäten entstehen, wenn verschiedene Antigene dasselbe oder ein strukturell ähnliches Epitop besitzen, an das derselbe Antikörper binden kann.

Die Campylobakteriose und die Yersiniose zählen zusammen mit der Salmonellose zu den drei häufigsten bakteriellen Enteritiserkrankungen in Deutschland (Robert Koch Institut, 2007). Die genaue Anzahl der Erkrankungen ist nicht bekannt, da man von einer erheblichen Dunkelziffer ausgeht. Häufig wird bei subklinischen und nur sehr kurz andauernden Symptomen kein Arzt konsultiert oder die Krankheit wird ätiologisch nicht abgeklärt und gemeldet. Die Prävalenz von *Yersinia* Yop-spezifischen IgG- Antikörpern unter Blutspendern in Deutschland liegt bei bis zu 43 % (Maki-Ikola *et al.*, 1997). Dies gibt einen Hinweis auf eine große Anzahl von subklinischen und nicht gemeldeten *Yersinia* Infektionen. Bei Patienten mit postinfektiösen Folgeerkrankungen können keine Erreger mehr aus Stuhlproben isoliert werden, weshalb die serologische Diagnostik eine essentielle Methode für die Abklärung der postinfektiösen Erkrankung darstellt. Serologische Nachweismethoden zur Diagnostik von Infektionskrankheiten, die auf Ganzzelllysaten beruhen, wie die Widal-Reaktion oder die Komplementbindungsreaktion, führen meist zu Kreuzreaktionen und

somit zu einer geringen diagnostischen Sensitivität und Spezifität. Aus diesem Grund werden Enzymimmunoassays (EIA) oder Immunoblots gegen rekombinant hergestellte Antigene verwendet. In der aktuellen serologischen Yersinien-Diagnostik werden EIAs und Immunoblots mit rekombinanten hergestellten virulenzassoziierten Yops und dem V-Antigen für den Nachweis von spezifischen IgA-, IgG, und IgM-Antikörpern durchgeführt. Die Spezifität dieser Tests sollte in dieser Arbeit durch die Identifizierung neuer virulenzassoziiertes Yersinien Antigene verbessert werden. Die gegenwärtige serologische *Campylobacter* Diagnostik verwendet rekombinant hergestellte nicht virulenzassoziierte Proteine, wie das MOMP, PEB1, PEB2, PEB4, Omp18 und P39 für den Nachweis von IgA- und IgG-Antikörpern im EIA und im Immunoblot. Durch die Identifizierung von neuen *Campylobacter jejuni* Antigenen sollte die Sensitivität der serologischen *Campylobacter* Diagnostik und der Differentialdiagnose des Guillain-Barré Syndroms verbessert werden. Hierfür wurden Proteom- und Sekretomanalysen von *C. jejuni* durchgeführt. Die dadurch identifizierten Antigene sollten zusammen mit bekannten virulenzassoziierten Proteinen auf ihre Antigenität mit Patientenseren getestet werden.

Des Weiteren sollte die Rolle des flagellaren Typ-III-Sekretionssystem (Fla-T3SS) und des TAT-Systems bei der Proteinsekretion von *C. jejuni* untersucht werden.

4.1 Verbesserung der Sensitivität des *Yersinia* Immunoblots

Für die Verbesserung der Sensitivität des *Yersinia* Immunoblots wurden die virulenzassoziierten Proteine YadA, RtxA, MyfA und PsaA rekombinant hergestellt und hinsichtlich der Antigenität untersucht.

Das RtxA Protein wurde gewählt, da es bis jetzt nur in humanpathogenen *Yersinia* Stämmen identifiziert werden konnte. Aufgrund des großen Molekulargewichts wurde RtxA willkürlich in 3 Fragmente geteilt (Abb. 3.9). Die Teilfragmente Rtx1 (AS 1-1077) bzw. Rtx2 (AS 1078-2142) konnten nur schwach bzw. nicht überexprimiert werden. Ein Grund hierfür könnte Toxizität der Teilfragmente für den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pLys sein. Möglicherweise war die Expression von Rtx1 auch aufgrund der N-terminalen Glycin-reichen Wiederholungsmotiven (AS 400-979) erschwert (MOTIF Analyse: <http://motif.genome.jp/>). Das Teilfragment Rtx3 wurde überexprimiert, konnte aber im Anschluss nicht von der Ni-NTA-Säule eluiert werden. Dies könnte daran liegen, dass am C-Terminus von RtxA Hämolyisin-Typ Calcium-Bindungsregionen vorkommen (AS 2888-3079, MOTIF Analyse: <http://motif.genome.jp/>), die das Nickel-NTA der Aufreinigungssäule stark komplexieren könnten. Da das *rtx3* Fragment von der Mikrogen GmbH ohne His-tag kloniert wurde, war die Reinigung über Ionenaustauscher-Säulen möglich. Im „Line

Assay“ konnte eine unspezifische IgG-Reaktivität nachgewiesen werden, wobei 61 % der Yop-positiven Patientenseren, 68 % der Yop-positiven Blutspenderseren und 43 % der Yop-negativen Blutspenderseren reagierten (Tab. 3.4). Aufgrund dieses Ergebnisses und die Tatsache, dass keine IgA-Reaktivität nachgewiesen wurde, wurde das Rtx3 Protein als zu unspezifisch für die serologische Diagnostik eingestuft.

Von dem virulenzassoziierten und auf dem pYV Plasmid kodierten YadA wurde die Kopf-Hals-Struktur rekombinant hergestellt (AS 72-280). Nach der Aufreinigung waren zwei dominante Proteinbanden zu erkennen (Abb. 3.6), die beide als YadA identifiziert wurden (MALDI-TOF, Ni-NTA-Konjugat; Abb. 3.7 Streifen 1). Erste Vorversuche im Immunoblot zeigten mit den Hyperimmunsereen von Kaninchen eine starke IgG-Reaktivität (Abb. 3.7 und Abb. 3.10). Im „Line Assay“ zeigten 67 % der Yop-positiven Patientenseren, 16 % der Yop-negativen Blutspenderseren und 21 % der Yop-positiven Blutspenderseren eine IgG-Reaktivität (Tab. 3.4). Eine IgA-Reaktivität war bei 94 % der Yop-positiven Patientenseren, bei 58 % der Yop-positiven Blutspenderseren und auch bei 42 % der Yop-negativen Blutspenderseren nachzuweisen (Tab. 3.4). Die hohe IgA-Reaktivität v. a. bei Yop-negativen Blutspendern gab Anlass zur Vermutung, dass YadA IgA-Antikörper unspezifisch bindet. Die IgA-Bindung wurde im Immunoblot mit gereinigten humanen IgA bestätigt (C. Nölting, Mikrogen GmbH). Des Weiteren konnte im Immunoblot mit nativen YadA und einem Yop-negativen humanem Serum sowohl eine unspezifische IgA- als auch eine unspezifische IgG-Bindung nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Eine immun-unabhängige Bindung von Immunglobulinen ist für mehrere bakterielle Proteine bekannt. Erstmals wurde sie für das Protein A von *Staphylococcus aureus* und für das Protein G von Streptokokken beschrieben (Forsgren and Sjoquist, 1966;Kronvall, 1973). Auch die Eib (*Escherichia coli immunoglobulin binding*) Proteine von *E. coli*, die wie YadA zur Familie der nicht fibrillären Adhäsine gehören (Hoiczky *et al.*, 2000), zeigen eine unspezifische Bindung von Immunglobulinen (Sandt *et al.*, 1997;Sandt and Hill, 2000). Dabei weisen die Eib Proteine eine unterschiedliche Bindung der Immunglobulinklassen auf: alle Eib Proteine (EibA-G) binden den Fc-Teil von IgG, aber nur EibC, -D, -F und -G binden IgA (Lu *et al.*, 2006;Sandt and Hill, 2000;Sandt and Hill, 2001). Der C-Terminus von EibF (AS 318-459) enthält die für die IgG Fc-Bindung spezifische Sequenz, wohingegen die IgA-Bindung durch den N-Terminus (AS 181-208) vermittelt wird (Sandt and Hill, 2001). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die im „Line Assay“ vorherrschende unspezifische IgA-Reaktivität sein, da das rekombinante YadA₇₂₋₂₈₀ Protein nur die N-terminale Region umfasst. Dahingegen zeigte das native YadA Protein von verschiedenen *Y. enterocolitica* Stämmen neben der IgA-Reaktivität auch eine starke immun-unabhängige IgG-Reaktivität (Abb. 3.11). Aufgrund dieser Tatsache eignet sich das rekombinante YadA₇₂₋₂₈₀ Protein nicht für die serologische Diagnostik.

Das MyfA Protein von *Y. enterocolitica* und das homologe PsaA Protein von *Y. pseudotuberculosis* wurden bis jetzt nur bei humanpathogenen Serogruppen nachgewiesen (Gierczynski *et al.*, 2002; Iriarte *et al.*, 1993; Toyos *et al.*, 1986). Ein Sequenzvergleich beider Proteine ergab, dass ca. 43 % der Aminosäuren identisch sind und dass sich homologe Bereiche v. a. am N- und C-Terminus des Proteins befinden (Abb. 3.1). Um mögliche Kreuzreaktivitäten untersuchen zu können, wurden neben dem gesamten MyfA Protein auch verkürzte MyfA-Fragmente rekombinant hergestellt (Abb. 3.2). Von PsaA wurde das gesamte Protein rekombinant produziert. Erste Untersuchungen im Immunoblot mit Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchenserum ergab eine positive IgG Reaktion mit MyfA und PsaA (Abb. 3.4). Da spezifische Serumantikörper gegen MyfA im Kanincheninfektionsmodell nachgewiesen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass *Y. enterocolitica* MyfA *in vivo* exprimiert. Das Anti-*Y. pseudotuberculosis* Kaninchenserum Y-P-1 diskriminierte zwischen MyfA und PsaA, indem es nur mit PsaA reagierte. Dahingegen zeigten die Anti-*Y. enterocolitica* Kaninchenserum auch eine Reaktion mit PsaA (Abb. 3.4). Ein Immunoblot mit den verkürzten MyfA-Fragmenten ergab, dass sich die antigenen Epitope v. a. C-terminal befinden (Abb. 3.5). Da sich die Reaktivität im „Line Assay“ aber bei dem Gesamtprotein MyfA als am stärksten zeigte (Abb. 3.10), wurde für die Evaluierung mit Patienten- und Blutspenderseren das gesamte MyfA und PsaA ohne Leadersequenz und His-tag kloniert und aufgereinigt (Mikrogen GmbH). Für die Evaluierung standen 40 Blutspenderseren aus Bayern, 18 Yop-positive Patientenseren aus Finnland und 23 Yop-positive Patientenseren aus Deutschland zu Verfügung. Von den Blutspenderseren reagierten 48 % im IgG positiv mit YopD, was den hohen Durchseuchungsgrad mit Yersinien in Deutschland bestätigt (Maki-Ikola *et al.*, 1997). Von den Yop-positiven Patientenseren aus Finnland reagierten im IgG 61 % mit MyfA und 22 % mit PsaA (Tab. 3.5 und Anhang Tab. 7.7). Umgekehrt zeigte sich dagegen die IgG-Reaktivität der Patientenseren aus Deutschland. Hier reagierten 17 % mit MyfA und 65 % mit PsaA (Tab. 3.5 und Anhang Tab. 7.8). Der Trend der höheren IgG-Reaktivität mit PsaA ist auch bei den Blutspenderseren zu beobachten. Hier reagierten 10 % mit MyfA und 23 % mit PsaA (Tab. 3.5 und Anhang Tab. 7.6). Dies könnte ein Hinweis sein, dass in Deutschland auch häufig Infektionen mit *Y. pseudotuberculosis* auftreten. Möglicherweise unterscheiden sich auch die MHC Klasse II Moleküle von Personen aus Deutschland von denen aus Finnland, so dass andere Epitope der Antigene erkannt und präsentiert werden. Die IgM-Reaktivität von PsaA lag bei den Patientenseren aus Finnland bei 5,6 % und bei denen aus Deutschland bei 4,3 % (Tab. 3.5; Anhang Tab. 7.10 und Tab. 7.11). Von den Blutspenderseren reagierte eine Probe im IgM mit PsaA, die auch eine starke Reaktion im IgG zeigte (Tab. 3.5 und Anhang Tab. 7.9). Insgesamt besitzen beide Proteine zusammen eine Sensitivität für den IgG-Test von 78 % (bezogen auf die Yop-positiven Patientenseren aus Deutschland). Dies ist eine höhere Sensitivität als durch die anderen verwendeten

rekombinanten Antigenen erzielt wird. Diese liegt bei YopM, YopE und dem V-Antigen bei jeweils 35 %, bei YopH bei 57 % und bei YopN bei 17 % (Anhang Tab. 7.8). Die IgA-Reaktivität fällt beim Yersinien Immunoblot mit Ausnahme von YopD sehr gering aus und die Sensitivität im IgA von PsaA und MyfA liegt bei ca. 9 %. Damit ist sie ungefähr gleichzusetzen mit der Sensitivität von YopM (Anhang Tab. 7.8). Eine Aussage über die Spezifität zu treffen ist nur schwer möglich, da die Blutspendenserien hierfür nicht ausreichend charakterisiert sind.

Aufgrund der Ergebnisse der Sensitivität wurden MyfA und PsaA als rekombinante Antigene zum serologischen Nachweis der humanen Yersinien-Infektionen und/oder deren Folgeerkrankungen als Patent angemeldet.

4.2 Verbesserung der Sensitivität des *Campylobacter* Immunoblots

4.2.1 Proteom-basierte Identifizierung neuer *Campylobacter* Antigene

Bisher wurden die *C. jejuni* Proteine FlaA, MOMP, PEB1, PEB3, PEB4 und CadF als Antigene beschrieben (Blaser *et al.*, 1984;Burucoa *et al.*, 1995;Janvier *et al.*, 2000;Mills and Bradbury, 1984;Nachamkin and Hart, 1985;Pei *et al.*, 1991;Shoaf-Sweeney *et al.*, 2008;Wenman *et al.*, 1985). Diese Antigene, mit Ausnahme von CadF, sind schon länger bekannt und auf kommerziell erhältlichen Immunoblots und ELISA-Tests vorhanden.

Für die Verbesserung des *Campylobacter* Immunoblots sollten neue potentielle Antigene mittels Proteomanalysen identifiziert. Hierfür wurde im ersten Schritt das Sekretom von *C. jejuni* untersucht. Das Sekretom enthält die Summe aller Proteine, welche über verschiedene Sekretionssysteme oder über den Vesikel-vermittelten Transport ins Kulturmedium freigesetzt werden. Sekretierte Proteine spielen bei Salmonellen, Yersinien und Shigellen eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktoren und können deshalb als potentielle virulenzassoziierte Antigene betrachtet werden. Es wurde gezeigt, dass bei *Campylobacter* die Sekretion von Proteinen durch Wirtszellkomponenten, wie zum Beispiel durch Kokultivierung mit Epithelzellen oder durch Zugabe von Serum oder Gallensalzen induziert wird (Konkel and Cieplak, Jr., 1992;Rivera-Amill *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von Proteinen in verschiedenen Kultivierungsmedien untersucht, indem der Kulturüberstand nach Zentrifugation und Sterilfiltration mit TCA gefällt und in einem SDS-Gel aufgetrennt wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von fötalem bovines Serum (FBS) zum *Brain heart infusion* (BHI)-Medium die Proteinfreisetzung nicht erhöht (Abb. 3.12). Vielmehr stören die Serumproteine, da sie in großer Konzentration vorliegen und aufgrund der Probenaufbereitung (TCA-Fällung) mit im SDS-Gel aufgetrennt werden. Dadurch werden die

sezernierten Proteine überlagert und sind für eine weitere Analyse (z. B. MALDI-TOF) nicht zugänglich. Im Immunoblot mit Anti-*C. jejuni* Kaninchenserum wurden unabhängig von der FBS-Zugabe und -Konzentration die gleichen Proteine detektiert (Abb. 3.12 B). Die sekretierten Proteine wurden in Anlehnung an die Yops der Yersinien COPs (*Campylobacter outer proteins*) genannt. Die COPs sind wahrscheinlich nicht mit den beschriebenen Cia-Proteine identisch, die nach Kultivierung in Mueller-Hinton Brühe und EMEM-Minimalmedium isoliert wurden (Konkel *et al.*, 1999b). Der Vergleich von BHI- und Minimalmedium (RPMI) in der vorliegenden Arbeit ergab, dass die Proteinfreisetzung nur in BHI-Medium stattfindet, nicht aber in RPMI-Medium (Abb. 3.13). Zeitlich ist bei *C. jejuni* Proteinfreisetzung nach 4 Stunden Inkubation nachzuweisen und erreicht nach 16 Stunden Inkubation das Maximum (Abb. 3.14). Für die Detektion von Antigenen wurden verschiedene Anti-*C. jejuni*-Hyperimmunsere, die durch per orale (po-CK) und nachfolgender intravenösen Applikation von lebenden *C. jejuni* hergestellt wurden (iv-CK), verwendet. Die Hyperimmunsere po-CK5, po-CK6, po-CK7 und po-CK8 könnten mit der Reaktivität von Patientensere mit einer gastrointestinalen *C. jejuni* Infektion vergleichbar sein, wohingegen die Hyperimmunsere iv-CK5, iv-CK6, iv-CK7 und iv-CK8 der Reaktivität von Patientensere mit extraintestinalen Folgeerkrankungen (systemische Infektionen) entsprechen könnten. Im Immunoblot zeigten die iv-CK-Sere eine stärkere Reaktivität verglichen mit der von po-CK-Sere (Abb. 3.15). Ein Vergleich von Patientensere mit den Hyperimmunsere ergab im Immunoblot mit COPS ein ähnliches Reaktivitätsmuster (Abb. 3.16). Somit sind Anti-*C. jejuni* Sere, die durch experimentelle Infektionen von Kaninchen erzielt wurden, für die Identifizierung von *Campylobacter*-Antigenen im Immunoblot geeignet. Potentielle Antigene konnten mittels MALDI-TOF identifiziert werden (Abb. 3.17 und Tab. 3.6). Als endgültige Methode wurde nach anfänglicher eindimensionaler Proteinelektrophorese auf zweidimensionale Proteinelektrophorese übergegangen, da sich die Zuordnung von identifizierten Proteinen im SDS-Gel zu reaktiven Proteinen im Immunoblot als schwierig erwies. Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension hinsichtlich des isoelektrischen Punktes und in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Dadurch ergeben sich hoch aufgelöste Einzelproteinspots, die ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert werden können. Zusätzlich gibt es Computerprogramme (PDQuest, BioRad, München), welche die Zuordnungen von Proteinen in mehreren Gelen erleichtert. Bei der Sekretomanalyse von *C. jejuni* konnten 32 unterschiedliche Proteine identifiziert werden (Abb. 3.18 und Tab. 3.7), die im Abschnitt 4.2 näher besprochen werden. Um unter diesen Proteinen Antigene zu detektieren, wurden zweidimensionale Immunoblots angefertigt. Mit dem Hyperimmunserum po-CK8 konnten 7 Antigene detektiert werden (Abb. 3.19 A): Das Flagellin FlaA, das flagellare Deckelprotein FliD, das periplasmatische

Aspartatbindungsprotein PEB1, das Antigen PEB3, die Prolyl-cis-trans Isomerase PEB4, das periplasmatische Protein YceI und das Protein Cj0175c. Mit dem Hyperimmunserum iv-CK8 konnten 5 weitere Antigene nachgewiesen werden (Abb. 3.19 B): Das flagellare Hakenprotein FlgE, das Hauptprotein der äußeren Membran MOMP, die Alkyl-Hydroperoxid Reduktase AhpC, das Lipoprotein NlpA und das Protein Cj0998c. Mit Patientenseren konnten im zweidimensionalen Immunoblot das Lipoprotein NlpA und das hypothetische periplasmatische Protein YceI detektiert werden (Abb. 3.20 A). NlpA und YceI zeigten keine Kreuzreaktivität mit dem verwendeten Blutspenderserum (Abb. 3.20 B). Das Flagellin A und das flagellare Deckelprotein FliD wiesen dagegen Kreuzreaktivitäten auf, weswegen diese Proteine als diagnostische Marker ungeeignet sind. Das Flagellin ist zusätzlich das immundominanteste Protein (Nachamkin and Hart, 1985) und zeigte mit allen verwendeten Seren eine starke Reaktion. Bei der antigenen Proteomanalyse mit Zelllysaten von *C. jejuni* konnten mit iv-CK8 weitere 4 Antigene detektiert werden, die bei der Sekretomanalyse nicht nachzuweisen waren: das Fibronectin-bindende Protein CadF, die Thioredoxin Reduktase TrxB und die Proteine Cj0143c und Cj1670c (Abb. 3.20). Im zweidimensionalen Immunoblot reagierten nur die Proteine Cj0143c und Cj1670c mit Patientenseren (Abb. 3.22). Zwei Proteine, die im Immunoblot reagierten (Abb. 3.21, rote Vierecken) konnten aufgrund der geringen Konzentration im SDS-Gel nicht identifiziert werden. Somit konnten mir der Sekretom- und Proteomanalyse von *C. jejuni* 4 neue Antigene identifiziert werden: das Lipoprotein NlpA, das hypothetische periplasmatische Protein YceI und die Proteine Cj0143c und Cj1670c mit unbekannter Funktion. Die Antigene wurden rekombinant in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL hergestellt und aufgereinigt (Abb. 3.23 A). Bei einem Vortest mit dem Hyperimmunserum iv-CK8 war im Immunoblot nur bei den Proteinen NlpA und YceI eine Reaktion zu erkennen, nicht aber bei den Proteinen Cj0143c und Cj1670c (Abb. 3.23 C). Alle 4 Proteine wurden mit einer großen Anzahl von Patienten- und Blutspenderseren evaluiert (s. Abschnitt 4.2.3).

4.2.2 Antigene Eigenschaften bekannter virulenzassoziierter Proteine

Zusätzlich zu der Identifizierung neuer Antigene mit der Proteomanalyse wurden 5 bekannte virulenzassoziierte Proteine von *C. jejuni* hinsichtlich der Antigenität untersucht: CadF, CiaB, JlpA, FlaC und Cj1496c.

CadF ist ein konserviertes Protein auf der Zelloberfläche von *C. jejuni*, das spezifisch an Fibronectin bindet und Adhärenz an intestinale Zellen vermittelt (Konkel *et al.*, 1997). CadF ist in der äußeren Membran lokalisiert und gehört zu der OmpA-Familie. Am N-Terminus (AS 15-170) befindet sich eine OmpA-ähnliche Transmembrandomäne und der C-terminale Bereich liegt im Periplasma. Die

Überexpression des gesamten CadF Proteins in *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)RIL war nicht erfolgreich. Auch Konkel und Kollegen beschrieben diese Tatsache (Konkel *et al.*, 1997). Möglicherweise bildet CadF Poren in der *E. coli* Membran aus, die eine toxische Wirkung haben. Aus diesem Grund wurde ein verkürztes Protein von AS 167 bis 314 (CadF₁₆₇₋₃₁₄) rekombinant hergestellt. Nach dem Algorithmus von Hopp und Woods besitzt diese Region antigene Bereiche (Hopp and Woods, 1981). Nach erfolgreicher Aufreinigung wurden „Line Assays“ durchgeführt. Weder die Anti-*C. jejuni* Hyperimmunseren noch Patientenseren reagierten positiv mit CadF₁₆₇₋₃₁₄. Gegen das native CadF Protein dagegen konnte im zweidimensionalen Immunoblot eine IgG-Reaktivität mit iv-CK8 nachgewiesen werden (Abb. 3.24). CadF besitzt antigene Eigenschaften, da maternale Antikörper gegen CadF in Küken nachgewiesen werden konnten (Shoaf-Sweeney *et al.*, 2008) und in früheren Studien humane Antikörper nachgewiesen wurden (Cordwell *et al.*, 2008; Konkel *et al.*, 1997). Möglicherweise liegt der rekombinant hergestellte Bereich von CadF im nativen Zustand nicht oberflächenexponiert vor oder der antigene Bereich liegt im N-terminalen Bereich, wodurch Patienten-Serumantikörper das verkürzte CadF₁₆₇₋₃₁₄ nicht erkennen. Aus diesem Grund eignet sich das rekombinante CadF₁₆₇₋₃₁₄ nicht als Antigen für die serologische Diagnostik.

Das *Campylobacter* Invasionsantigen B (CiaB) soll *in vitro* in das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen transloziert werden und die Invasion von *C. jejuni* induzieren (Konkel *et al.*, 1999b). Das gesamte CiaB Protein wurde rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Im „Line Assay“ mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunseren und Patientenseren konnten jedoch keine Serumantikörper nachgewiesen werden, weshalb CiaB als diagnostischer Marker nicht geeignet erscheint.

Das Lipoprotein JlpA ist in der äußeren Membran von *C. jejuni* verankert und spielt eine Rolle bei der Adhärenz (Jin *et al.*, 2001). Ähnlich wie CadF konnte auch JlpA nicht als gesamtes Protein in *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)RIL überexprimiert werden. Aus diesem Grund wurde ein verkürztes Protein von AS 16-185 (JlpA₁₆₋₁₈₅) hergestellt, der antigene Bereiche beinhalten sollte (Hopp and Woods, 1981). JlpA₁₆₋₁₈₅ wurde aufgereinigt und im „Line Assay“ mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunseren und Patientenseren untersucht. Obwohl die Kaninchenhyperimmunseren keine Reaktion zeigten, konnte bei 40 % der Patientenseren eine IgG-Reaktivität nachgewiesen werden, von denen aber 23 % nur eine sehr schwache Reaktion aufwiesen (Abb. 3.24).

Campylobacter exprimiert neben den Flagellin-Genen *flaA* und *flaB* das Flagellin-ähnliche Gen *flaC*. Das Flagellin-ähnliche Protein FlaC weist Sequenzhomologien zu den N- und C-terminalen Regionen der Flagelline FlaA und FlaB auf. FlaC wird wahrscheinlich über das Flagellum sekretiert und bindet *in vitro* an intestinale Epithelzellen (Song *et al.*, 2004). Das gesamte Protein FlaC wurde rekombinant hergestellt, in *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)RIL überexprimiert und aufgereinigt. In

„Line Assays“ mit Anti-*C. jejuni* Hyperimmunsereen und Patientensereen konnten keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, wodurch FlaC als diagnostischer Marker nicht geeignet erscheint. Cj1496c ist ein Glykoprotein, welches eine Rolle bei der Adhärenz und Invasion von *C. jejuni* *in vitro* spielt (Kakuda and DiRita, 2006). Mit der Annahme, dass Cj1496c für das Immunsystem zugänglich ist, wurde das gesamte Protein rekombinant in *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)RIL hergestellt, aufgereinigt und in „Line Assays“ analysiert (4.2.3). Im Immunoblot konnte keine Reaktion mit dem Hyperimmunserum iv-CK8 nachgewiesen werden.

Von den 5 virulenzassoziierten Proteinen zeigte JlpA antigene Eigenschaften. Das Protein Cj1496c wurde ohne Voruntersuchungen in den „Line Assay“ mit aufgenommen.

4.2.3 Evaluierung der neuen *Campylobacter* Antigene

Von den 53 Kultur- und/oder serologisch positiven *Campylobacter* Patientensereen konnten mit dem *RecomLine Campylobacter* (Mikrogen GmbH) bei 57 % spezifische IgG-Antikörper und bei 13 % spezifische IgA-Antikörper gegen *C. jejuni* Antigene nachgewiesen werden. Von den Blutspendern wurden 13 % im IgG und 3 % im IgA als positiv eingestuft. Um die Sensitivität der serologischen *Campylobacter* Diagnostik zu verbessern, wurden die neu identifizierten Antigene NlpA, YceI, Cj0143c, Cj1670c, JlpA und Cj1496c mit 56 Patientensereen und 100 Blutspendersereen hinsichtlich der Antigenität getestet.

Das in der Sekretomanalyse identifizierte Antigen NlpA reagierte im IgG sehr häufig: 34 % der Blutspendersereen und 57 % der Patientensereen zeigten eine positive Reaktion. Aufgrund der Aminosäuresequenz kann NlpA der Lipoprotein 9-Familie zugeordnet werden (Finn *et al.*, 2008). Die Lipoprotein 9-Familie enthält mehrere antigene Proteine, die eine Rolle in der Virulenz spielen (Chanyangam *et al.*, 1991; Cooney and Lo, 1993). Ein Datenbank-Sequenzvergleich zeigte, dass NlpA von *C. jejuni* zu 45 % identisch mit dem Lipoprotein 28 von *E. coli* ist (*Basic protein Blast*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Zusätzlich wurden in der *C. jejuni* NCTC 11168 Genomsequenz zwei weitere *nlpA*-ähnliche Gene stromabwärts gefunden (Cj0771c und Cj0770c). Ein Vergleich der NlpA Proteinsequenzen von *C. jejuni* mit NlpA-ähnlichen Proteinen von *E. coli* K12, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhi, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas putida* zeigte, dass die Sequenzen zwischen 42 % und 55 % identisch sind. Besonders auffallend ist ein Bereich aus 12 Aminosäuren, der bei fast allen Sequenzen identisch ist (Abb. 4.2). Aufgrund des häufigen Vorkommens der Lipoprotein 9 Struktur und des konservierten 12 Aminosäurenbereiches sind Kreuzreaktivitäten wahrscheinlich, aufgrund derer NlpA für die serologische Diagnostik nicht geeignet ist.

DISKUSSION

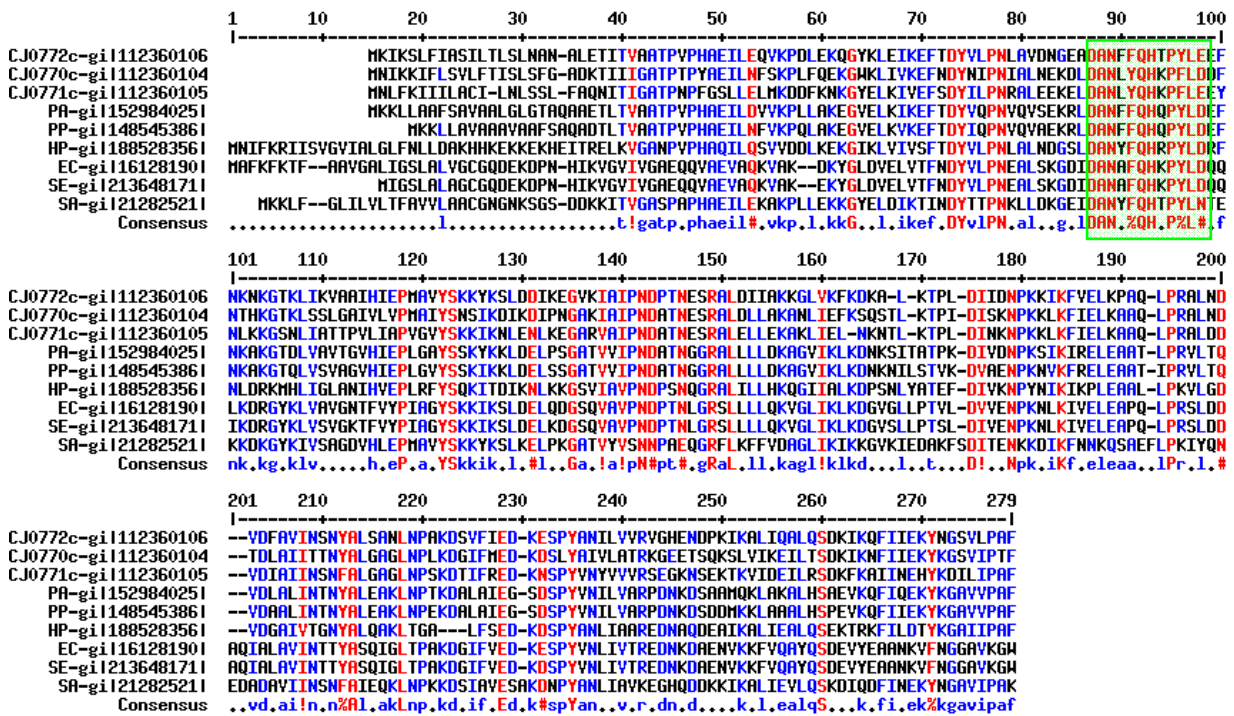


Abb. 4.2: Sequenzvergleich NlpA-ähnlicher Proteine. Aminosäuren (AS) mit hoher Übereinstimmung sind rot, dargestellt, AS mit geringer Übereinstimmung sind blau dargestellt. Ein Bereich aus 12 AS, der bei allen Sequenzen fast identisch ist, ist grün markiert. CJ0772, CJ0770c und CJ0771c: *C. jejuni* NCTC 11168; PA: *Pseudomonas aeruginosa* PA7; PP: *Pseudomonas putida* F1; HP: *Helicobacter pylori* Shi470; EC: *E. coli* K12; SE: *Salmonella enterica* subsp. enterica Serovar Typhi str. J185; SA: *Staphylococcus aureus* subsp. aureus. Der Sequenzvergleich wurde mit „Multiple Sequence Alignment“ von F. Corpet erstellt (Corpet, 1988).

Gegen das Protein YceI, das auch in der Sekretomanalyse identifiziert wurde, zeigten nur 8 % der Patientenserum eine IgG-Reaktivität. YceI ist ein putatives periplasmatisches Protein und gehört zu der YceI-ähnlichen Familie der „Pfam Datenbank“ (Finn *et al.*, 2008). YceI von *E. coli*, welches zu 36 % identisch ist mit YceI von *C. jejuni*, ist ein periplasmatisches Protein, das durch einen hohen pH-Wert induziert wird (Stancik *et al.*, 2002). Tt1927b von *Thermus thermophilus* HB8 ist ein Polyisoprenoid-Bindeprotein und ist zu 30 % identisch mit YceI von *C. jejuni* (Handa *et al.*, 2005). Man geht davon aus, dass YceI-ähnliche Proteine eine Rolle in der Elektronentransportkette spielen, indem die Polyisoprenoid-Moleküle, wie zum Beispiel Quinone, binden. YceI von *C. jejuni* wurde als Glykoprotein charakterisiert (Young *et al.*, 2002). Möglicherweise spielen die Glykosylreste eine wichtige Rolle bei der Erkennung durch Serumantikörper. Dies könnte ein Grund sein, warum das native YceI von *C. jejuni* im zweidimensionalen Immunoblot im Gegensatz zum rekombinanten YceI im „Line Assay“ erkannt wird. Das Lektin der Sojabohne detektierte YceI nicht (Abb. 3.29). Ein Grund hierfür könnte sein, dass YceI ein Glykosylrest besitzt, der durch das Sojabohnen Lektin nicht erkannt wird. Die Perjodatbehandlung führte zu einer verminderten Reaktivität von iv-CK8 mit

YceI verglichen mit dem unbehandelten YceI (Abb. 3.30). Die Deglykosylierung des YceI-Proteins durch das Perjodat könnte möglicherweise zur verminderten Antigenerkennung führen.

Mit dem Protein Cj1670c reagierten 17 % der Patientenseren im IgG. Eine IgA-Reaktivität war nicht nachzuweisen. Bei den Blutspenderseren konnte eine IgG-Reaktivität von 7 % und eine IgA-Reaktivität von 4 % detektiert werden (Tab. 3.10). Für Cj1670c, auch CgpA (*Campylobacter glycoprotein A*) genannt, wurde die Glykosylierung mit N-Acetylgalaktosamin nachgewiesen (Linton *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2002). Die Glykosylierung konnte auch in dieser Arbeit im zweidimensionalen Lektinblot gezeigt werden (Abb. 3.29). Die Deglykosylierung von Cj1670c scheint aber die Antikörperbindung (iv-CK8) nicht zu vermindern (Abb. 3.30). Eine etwas schwächere Bindung der Antikörper nach der Perjodsäurebehandlung ist bei allen Proteinen zu beobachten, was möglicherweise eine unspezifische Auswirkung der Perjodsäure und des dabei verwendeten Puffer mit pH 4,5 ist. Die Mehrheit der Patienten scheinen aber keine Serumantikörper gegen Cj1670c zu bilden. Vor allem die fehlende IgA-Reaktivität von Cj1670c macht das Protein als diagnostischen Marker ungeeignet.

Gegen Cj0143c zeigten 23 % der Patientenseren eine IgG-Reaktivität und 4 % eine IgA-Reaktivität. Die Reaktivität der Blutspender war mit 5 % im IgG relativ gering. Dagegen ist die IgA-Reaktivität von 3 % der Blutspender mit der der Patientenseren gleichzusetzen (Tab. 3.10). Eine Datenbankanalyse nach konservierten Domänen ergab, dass Cj0143c eine ZntC Domäne besitzt, die wahrscheinlich einen Rezeptor für den ABC-Transport von Metallionen bildet (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). Cj0143c ist als Ortholog von ZnuA von anderen Gram-negativen Bakterien charakterisiert worden (Davis *et al.*, 2008). ZnuA bildet in *E. coli* zusammen mit ZnuB und ZnuC ein Zink ABC-Transport System (Patzner and Hantke, 2000). Cj0143c ist zusammen mit Cj0142c und Cj0141c in einem Operon organisiert, deren Transkription Zink-abhängig ist (Davis *et al.*, 2008). Das Protein Cj0143c spielt eine Rolle bei der Kolonisierung von Hühnern (Davis *et al.*, 2008). Bei Cj0143c handelt es sich wiederum um ein Glykoprotein, das am Asparagin 28 glykosyliert wird (Davis *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2002). Dies konnte mit einem zweidimensionalen Lektinblot bestätigt werden (Abb. 3.19). Nach Perjodatbehandlung war die Lektinbindung aufgehoben. Dagegen veränderte die Deglykosylierung das Bindeverhalten der Antikörper nicht (Abb. 3.30). Die Glykosylierung von Cj0143c spielt keine Rolle bei der Bindung von Zink und bei der Kolonisierung von Hühner (Davis *et al.*, 2008). Cj0143c scheint ein Antigen zu sein, gegen das ein Teil (ca. 25 %) der *Campylobacter* Patienten Antikörper (IgG) bilden.

Gegen das Protein JlpA₁₆₋₁₈₅ zeigten je 2 % der Patienten- und Blutspenderseren eine IgG-Reaktivität (Tab. 3.10). Eine IgA-Reaktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis aus dem „Line Assay“ steht im Gegensatz zum Ergebnis aus dem Immunoblot. Hier reagierten 40 % der

Patientenseren mit JlpA₁₆₋₁₈₅, wobei 23 % nur eine sehr schwache Reaktion zeigten (Abb. 3.24). Nur eines der 8 Seren, die im Immunoblot stark mit JlpA₁₆₋₁₈₅ reagierten, zeigte eine starke IgG-Reaktivität im „Line Assay“ (NK-13). Die Methode des „Line Assays“ unterscheidet sich zu der des Immunoblots, weshalb sich die Antigenität der Proteine unterschiedlich verhalten kann. Im „Line Assay“ wird keine SDS-PAGE mit vorheriger Erhitzung der Probe auf 100°C für die Auftrennung der Proteine genutzt, sondern die gereinigten und zum Teil renaturierten Proteine werden direkt auf die Nitrozellulosemembran aufliniert. Der Einsatz von Detergenzien im „Line Assay“ wurde im Vorfeld überprüft und führte zu keiner Steigerung der Sensitivität. Unterschiedliche Denaturierungsprozesse oder Unterschiede in der Epitopenpräsentation des Antigens auf der Nitrozellulosemembran können zu den verschiedenen Reaktivitäten führen.

Gegen das hypothetische periplasmatische Glykoprotein Cj1496c zeigten 13 % der Patientenseren und 5 % der Blutspenderseren eine IgG-Reaktivität (Tab. 3.10). Eine IgA Reaktivität wurde nicht nachgewiesen. Möglicherweise spielt der Glykosylrest eine Rolle bei der Antigenerkennung. Trotz der Funktion als Adhäsion und Invasin *in vitro* (Kakuda and DiRita, 2006), scheint nur ein geringer Anteil der *Campylobacter* Patienten Serumantikörper zu bilden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Protein Cj0143c, welches als Antigen eine Sensitivität von ca. 23 % aufweist, zur Verbesserung der *Campylobacter* Diagnostik beitragen kann. Möglicherweise gibt es weitere Antigene, die durch die hier verwendete Methode nicht erfasst wurden: so werden stark hydrophobe Proteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nur schwer aufgetrennt, da sie während der isoelektrischen Fokussierung ausfallen können. Zusätzlich wurden Proteine, die während der Probenaufbereitung ausfallen, nicht mit verwendet. Auch könnten posttranslationale Modifikationen ein Grund für die relativ geringe Reaktivität mit Serumantikörpern sein. Zudem scheint die spezifische Antikörper Produktion bei *Campylobacter* Patienten nicht so stark zu sein wie zum Beispiel bei Yersiniose-Patienten. Möglicherweise spielen Wirtszellfaktoren ähnlich wie bei der Bildung von Anti-Gangliosid-Antikörpern und der Ausbildung des Guillain-Barré Syndroms eine Rolle. Des Weiteren könnte auch die starke Heterogenität von *C. jejuni* Stämmen für die Ausbildung von Stamm-spezifischen Antikörpern verantwortlich sein, die keine Kreuzreaktivität aufweisen. Auch könnten Kulturbedingungen, die *in vivo* Bedingungen noch ähnlicher sind, zur Produktion von Proteinen führen, die unter den verwendeten Kulturbedingungen nicht produziert wurden. Möglichkeiten für neue Kulturbedingungen sind der Zusatz von Desoxycholen, Noradrenalin und spezifischen Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) (Cogan *et al.*, 2007; Guccione *et al.*, 2008; Malik-Kale *et al.*, 2008).

4.3 Das Sekretom von *C. jejuni*

Die Sequenzierung des Genoms von *C. jejuni* NCTC 11168 ergab, dass *C. jejuni* das Sec-abhängige Proteinexportsystem und das Twin-Arginin Translokations (TAT)-System für den Transport von Proteinen über die Zytoplasmamembran ins Periplasma besitzt (Parkhill *et al.*, 2000). Zusätzlich weist *C. jejuni* das *signal recognition particle* (SRP)-System auf. Es konnte des Weiteren ein Flagellen-Typ-III- (Fla-T3SS) aber kein Typ-IV-Sekretionssystem nachgewiesen werden (Parkhill *et al.*, 2000). Komponenten eines Typ II-Sekretionssystem sind vorhanden und sind essentiell für die natürliche Transformation (Wiesner *et al.*, 2003). In einigen *Campylobacter* Arten (*C. jejuni* NCTC11168, *C. coli* RM2228 und *C. lari* RM2100) konnte ein homologes Protein von TpsB des *two-partner* Sekretionssystems (Tps) detektiert werden (Parkhill *et al.*, 2000). Auch die Produktion von Vesikeln der äußeren Membran stellt einen Mechanismus der Proteinfreisetzung von *C. jejuni* dar (Blaser *et al.*, 1983; Logan and Trust, 1982).

Von *C. jejuni* wurde in dieser Arbeit eine Sekretomanalyse durchgeführt, indem die gesamten Überstandsproteine (COPS), die löslichen Überstandsproteine (SSP) und die OMVs miteinander verglichen wurden (3.2.14.1). Insgesamt konnten 32 verschiedene Proteine identifiziert werden (Abb. 3.18, Tab. 3.7). Diese Anzahl ist mit der des Sekretoms von *H. pylori* vergleichbar, das neben den flagellaren Bestandteilen vor allem aus den Virulenzfaktoren VacA, der Serin-Protease HtrA und der Urease B, der γ -Glutamyltranspeptidase und aus Proteinen mit unbekannter Funktion besteht (Bumann *et al.*, 2002). Für die vergleichende Sekretomanalyse wurden aber stark basische Proteine aufgrund der schlechten Auftrennung in der 1. Dimension (pH 3-10) und Proteine, die kleiner als 15 kDa sind (12 %iges SDS-Gel), nicht mit in die Bewertung aufgenommen. Dabei handelte es sich um die Proteine LivJ, Cj0175c, PEB4, PEB3, Cj1380c, Cj0998c, Cj0175 und NDK. Auch das Protein Cj0559 wurde aufgrund der geringen Proteinmenge nicht mit berücksichtigt. Somit gingen 23 Proteine mit in die Bewertung ein.

30,5 % der identifizierten Proteine waren Flagellen-assoziiert, weshalb sie als extrazelluläre Proteine eingestuft wurden. Die Freisetzung von Flagellin und Flagellen-assoziierten Proteinen in den Kulturüberstand ist bekannt (Bumann *et al.*, 2002; Galka *et al.*, 2008; Komoriya *et al.*, 1999; Nouwens *et al.*, 2002). Das dominanteste Protein ist das Flagellin FlaA, welches in allen Fraktionen nachzuweisen war. Durch die Glykosylierung des Flagellins entstehen verschieden geladene Flagellinmoleküle, die als verschiedene Isoformen im zweidimensionalen Gel zu sehen sind (Abb. 3.18 und Abb. 3.31). Das Flagellin konnte auch in Vesikeln von *Legionella pneumophila* nachgewiesen werden (Galka *et al.*, 2008). Die Sekretion des Flagellin-ähnlichen Proteins FlaC erfolgt über das Fla-T3SS (Konkel *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004). FlaC ist in großen Mengen im

Kulturüberstand nachzuweisen und nur in sehr geringen Mengen im Zellysat (Abb. 3.31). In den Vesikeln wurde es nicht detektiert, was dem Fla-T3SS-Transport entspricht. FlaC ist ein Virulenzfaktor, der *in vitro* an intestinale Epithelzellen bindet und eine wichtige Rolle bei der Zellinvasion spielt (Song *et al.*, 2004). Als diagnostischer Marker scheint FlaC aber trotz alledem nicht geeignet zu sein (3.2.11.4). FlaD ist ein putatives Flagellin, welches über Ähnlichkeiten zu FlaA und FlaB charakterisiert wurde. Über die molekulare Funktion des Proteins ist noch nichts bekannt. FlaD konnte nur im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 3.31). Möglicherweise wird es ähnlich wie FlaC über das Flagellum sekretiert. Das Assemblierungsprotein FlgD des flagellaren Basalkörpers konnte ebenfalls nur im Überstand nachgewiesen werden. FlgD wird der FlgD-Familie zugeordnet, dessen Namensgeber FlgD von *Salmonella typhimurium* essentiell für den Aufbau des flagellaren Hakens ist (Ohnishi *et al.*, 1994). Allerdings konnte es bis jetzt noch nicht in isolierten Flagellen detektiert werden. Es bildet wahrscheinlich, ähnlich wie FliD im Flagellenfilament ein Deckelprotein des flagellaren Hakens (Ohnishi *et al.*, 1994). Das Hakenprotein FlgE2 konnte nur im Überstand nachgewiesen werden, nicht aber im Zellysat oder in den Vesikeln. Das flagellare Hakenprotein (FlgE) konnte sowohl im Zellysat als auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden, nicht aber in den Vesikeln (Abb. 3.31). FlgE2 ist möglicherweise eine Untereinheit des flagellaren Hakens. Das Flagellen-assoziierte Protein FliD war sowohl im Zellysat als auch im Überstand, nicht aber in den Vesikeln nachzuweisen, was den Fla-T3SS-Transport bestätigt (Abb. 3.31).

Nur eines der identifizierten Proteine war ein Protein der äußeren Membran: das *major outer membrane protein* MOMP. Es war v. a. im Zellysat und in den Membranvesikeln nachzuweisen, aber kaum in der löslichen Fraktion des Kulturüberstandes (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Somit wird MOMP nur in Form der Membranvesikeln in den Kulturüberstand abgegeben.

Bei 13 % der freigesetzten Proteine handelte es sich um periplasmatische Proteine. Periplasmatische Proteine können entweder durch die Aufnahme in Membranvesikeln, durch den Transport über die äußere Membran oder durch Zellyse in den Kulturüberstand gelangen. Die Thiolperoxidase Tpx von *C. jejuni* spielt eine wichtige Rolle bei oxidativen Stress (Atack *et al.*, 2008). Tpx war im Kulturüberstand und in Membranvesikeln nachweisbar (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Für Tpx von *E. coli* wurde eine periplasmatische Lokalisation angenommen, obwohl es das zytoplasmatische Thioredoxinsystem als Elektronendonator verwendet (Cha *et al.*, 1995). Mit dem Analyse-Programm „Proteome Analyst - Subcell Specialization Server 2.5“ wurde ebenfalls eine periplasmatische Lokalisation von Tpx von *C. jejuni* festgestellt (Lu *et al.*, 2004). Es ist wahrscheinlich, dass Tpx in Vesikel verpackt in den Kulturüberstand gelangt. Das periplasmatische Protein P19 konnte in allen Fraktionen nachgewiesen werden. P19 wird Eisen- und Fur (*ferric uptake regulator*)-abhängig

reguliert (van Vliet *et al.*, 1998). Aus diesem Grund nimmt man an, dass P19 (Cj1659) zusammen mit der putativen Eisen-Permease (Cj1658) eine Rolle bei der Eisenaufnahme spielt. P19 wurde als Glykoprotein charakterisiert (Young *et al.*, 2002). Das Protein PEB1 ist ein bifunktionales Protein: zum einen ist PEB1 die periplasmatische Bindedomäne eines ABC-Transporters für Aspartat und Glutamat, zum anderen wird PEB1 als ein auf der Zelloberfläche exponiertes Adhäsion angesehen (Kervella *et al.*, 1993; Leon-Kempis *et al.*, 2006; Pei and Blaser, 1993). PEB1 kann im Kulturüberstand nachgewiesen werden, aber der genaue Transportmechanismus von PEB1 über die äußere Membran ist nicht bekannt (Leon-Kempis *et al.*, 2006). PEB1 besitzt zwei Signalsequenzen für die Peptidase I (AS 26) und II (AS 17) und ähnelt so der Endonuklease (Egl) von *Pseudomonas solanacearum* (Pei and Blaser, 1993). Egl besitzt ein Lipoprotein-Signalpeptid (Peptidase II) und eine Signalsequenz für die Peptidase I (Huang and Schell, 1992). Das putative periplasmatische *Campylobacter* Protein YceI konnte im Zelllysate, löslich im Kulturüberstand und in Membranvesikeln nachgewiesen werden (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Über die genaue Funktion von *Campylobacter*-YceI ist noch nichts bekannt. YceI von *E. coli* wird durch einen basischen pH-Wert induziert (Stancik *et al.*, 2002). Tt1927b von *Thermus thermophilus* HB8 ist ein Polyisoprenoid-Bindeprotein, weshalb YceI-ähnliche Proteine wahrscheinlich eine Rolle in der Elektronentransportkette spielen (Handa *et al.*, 2005). Der Mechanismus, wie *Campylobacter*-YceI als gelöstes Protein in den Kulturüberstand gelangen kann ist nicht klar. NlpA kann der Lipoprotein 9-Familie zugeordnet werden, welche mehrere antigene Proteine enthält, die eine Rolle in der Virulenz spielen (Chanyangam *et al.*, 1991; Cooney and Lo, 1993). Trotzdem enthält NlpA von *C. jejuni* keine Lipoprotein Signalsequenz (Juncker *et al.*, 2003). NlpA konnte in allen Fraktionen nachgewiesen werden (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Das nicht essentielle Lipoprotein 28 von *E. coli* wird von dem Gen *nlpA* kodiert, besitzt eine Lipoprotein Signalsequenz und ist in der Zytoplasmamembran lokalisiert (Yamaguchi and Inouye, 1988; Yu *et al.*, 1986). Die Transkription von *nlpA* wird bei enterotoxischen *E. coli* von dem Virulenzregulator Rns unterdrückt (Bodero *et al.*, 2007). Zusätzlich besitzt NlpA eine Rolle bei der Biogenese von Membranvesikeln (McBroom *et al.*, 2006). Möglicherweise spielt NlpA bei *C. jejuni* auch eine Rolle bei der Vesikelbiogenese. Drei Proteine konnten keiner zellulären Lokalisation zugeordnet werden. Das Protein Cj0391c konnte im Zelllysate und im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Das Protein Cj0414 konnte in allen Fraktionen, wohingegen das Protein Cj1631c nur im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Cj0414 ist eine putative Glukonat Oxidoreduktase, die pH- und Temperaturabhängig exprimiert wird (Pajaniappan *et al.*, 2008; Reid *et al.*, 2008). Bei einer Temperatur von 42°C wird die Expression von Cj0414 erhöht, was der Temperatur im Gastrointestinaltrakt von Hühnern entspricht. Dabei wird Glukonat wahrscheinlich nicht als

Kohlenstoffquelle, sondern als Elektronendonator genutzt (Pajaniappan *et al.*, 2008). Des Weiteren erhöht ein saurer pH-Wert die Transkription von *cj0414*, weshalb dieses Protein wahrscheinlich eine Rolle bei der Adaptation an saure Habitats spielt (Reid *et al.*, 2008). Über die Funktionen von Cj0391c und Cj1631c ist nichts bekannt und es konnten auch keine Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen gefunden werden.

Bei 30,5 % der freigesetzten Proteine wurde eine zytoplasmatische Lokalisation festgestellt. Bei Sekretom-Analysen anderer Bakterienarten (*Rhodococcus equi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*) konnten zytoplasmatische Proteine im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Barbey *et al.*, 2008; Malen *et al.*, 2007; Sibbald *et al.*, 2006; Tjalsma *et al.*, 2004; Trost *et al.*, 2005). Die zytoplasmatischen Chaperonproteine GroEL und DnaK und die zytoplasmatischen Elongationsfaktoren EF-TU und EF-TS waren sowohl im Zellysats als auch im Kulturüberstand nachzuweisen. Die in relativ großen Mengen synthetisierten Proteine GroEL und EF-TU könnten aufgrund von Zellyse in den Kulturüberstand gelangen. Für EF-TU von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass es Eigenschaften von Chaperonen aufweist und, ähnlich wie DnaK, an hydrophobe Regionen von ungefalteten Proteinen bindet (Caldas *et al.*, 1998; Malki *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass EF-TU und DnaK bei einem hypoosmotischen Schock über mechanosensitive Kanäle in das Periplasma gelangen (Berrier *et al.*, 2000). Für das zytoplasmatische Thioredoxin konnte ebenfalls der Export über mechanosensitive Kanäle und über Porine gezeigt werden (Ajouz *et al.*, 1998; Lunn and Pigiet, 1982). Die Thioredoxin Reduktase TrxB war in der Sekretom-Analyse ebenfalls im Kulturüberstand und in Membranvesikeln nachzuweisen (Abb. 3.31, Tab. 3.11). TrxB konnte auch bei einer Sekretom-Analyse von Staphylokokken detektiert werden (Sibbald *et al.*, 2006). Thioredoxin Reduktasen sind Flavoproteine, die die Reduktion von Thioredoxin mit Hilfe von NADPH katalysieren (Arner and Holmgren, 2000). Zytoplasmatische Proteine, die durch einen hypoosmotischen Schock freigesetzt werden, werden auch CPROS (*cytoplasmic proteins released by osmotic downshift*) genannt. Für den Mechanismus der Freisetzung der Proteine gibt es zwei Modelle: zum einen die Freisetzung durch mechanosensitive Kanäle und zum anderen durch eine molekulare Siebwirkung der teilweise durch den osmotischen Schock zerstörten Integrität der Zellhülle (Ajouz *et al.*, 1998; Vazquez-Laslop *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die zwei Mechanismen von der verwendeten Methode abhängig sind und dass durch das Pipettieren der Proben Proteine unabhängig von mechanosensitiven Kanälen freigesetzt werden, sondern über den molekularen Siebmechanismus in den Kulturüberstand gelangen (Ewis and Lu, 2005). Bei der molekularen Sieb-Theorie ist das Molekulargewicht der Proteine der ausschlaggebende und limitierende Faktor für die Freisetzung und liegt ungefähr bei 100 kDa (Vazquez-Laslop *et al.*, 2001). Für GroEL wurde eine zusätzliche extrazelluläre Lokalisation bei

pathogenen Bakterien wie *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori* und *Legionella pneumophila* und bei kommensalen Bakterien wie *Lactobacillus johnsonii* La1 festgestellt (Bergonzelli *et al.*, 2006;Dunn *et al.*, 1997;Engraber and Loos, 1992;Garduno *et al.*, 1998;Hennequin *et al.*, 2001). Auch für EF-TU konnte eine oberflächenexponierte Lokalisation und eine damit völlig neue Funktion nachgewiesen werden: EF-TU von *Mycoplasma pneumoniae* ist zusammen mit der Pyruvat-Dehydrogenase E1 β -Untereinheit auf der Zelloberfläche lokalisiert und bewirkt die Bindung an Fibronectin (Dallo *et al.*, 2002). Bei *C. jejuni* ist eine solche Lokalisation von GroEL und EF-TU noch nicht bekannt. Ein weiteres zytoplasmatisches Chaperonprotein, der *trigger* Faktor Tig, konnte auch im Kulturüberstand und in Membranvesikeln nachgewiesen werden (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Der an Ribosomen gebundene *trigger* Faktor interagiert co-translational mit wachsenden Polypeptidketten und besitzt eine Prolyl-cis-trans-Isomerase Aktivität (Hesterkamp *et al.*, 1996). Der Komplex zwischen dem *trigger* Faktor Tig und dem Protein-Substrat ist sehr kurzlebig und ATP-unabhängig (Maier *et al.*, 2001). Tig wurde auch im Kulturüberstand von Staphylokokken nachgewiesen (Sibbald *et al.*, 2006). Ein weiteres zytoplasmatisches Protein, das im Kulturüberstand und auch in Membranvesikeln zu detektieren war, ist die putative Alkyl-Hydroperoxid Reduktase AhpC (Abb. 3.31, Tab. 3.11). Die Expression von *ahpC* wird unter Eisen-limitierenden Bedingungen verstärkt (Baillon *et al.*, 1999;Holmes *et al.*, 2005). Ob dies auch der Fall bei oxidativen Stress ist, ist noch nicht bekannt. AhpC besitzt eine Größe von ca. 21 kDa und könnte somit als Monomer bis Pentamer über den molekularen Siebmechanismus in den Kulturüberstand gelangen. Bei einer Sekretom-Analyse von Staphylokokken war AhpC auch im Kulturüberstand und in Membranvesikeln nachweisbar (Sibbald *et al.*, 2006).

Auffallend an der Sekretom-Analyse war, dass neben Proteinen der Eisenaufnahme und oxidativen Stressantwort (P19, TrxB, AhpC, Tpx) auch zahlreiche Glykoproteine (AhpC, YceI, Tpx, Tsf, GroEL, P19) im Kulturüberstand nachzuweisen waren. Möglicherweise enthielt das BHI-Medium aufgrund der langen Wachstumszeiten einen alkalischen pH-Wert und somit Eisen-limitierende Bedingungen oder Eisenverbindungen, die für *C. jejuni* nicht zugänglich sind. Zudem bedeutete die Probenaufbereitung oxidativen Stress für die Bakterien. Es wurde gezeigt, dass Eisen-limitierende Bedingungen die Hyperglykosylierung von Proteinen zur Folge hat (Palyada *et al.*, 2004). Möglicherweise werden glykosylierte Proteine über das Fla-T3SS sekretiert.

Die Transkription der flagellaren Gene von *C. jejuni* ist anders kontrolliert als die klassische flagellare Transkriptionskaskade von Salmonellen, bei der die flagellaren Gene in 3 Klassen unterteilt werden (Kutsukake *et al.*, 1990). Gene aus Klasse 3, wie das Flagellin, werden von dem alternativen Sigmafaktor 28 (σ^{28}) kontrolliert und deshalb nicht transkribiert, bevor der Basalkörper

und der flagellare Haken, die von Klasse 2 Genen kodiert werden, aufgebaut ist. Bei der Kontrolle der flagellaren Transkription von *C. jejuni* spielen das Zweikomponenten-System FlgS/FldR, σ^{54} und σ^{28} eine Rolle (Wosten *et al.*, 2004). Die Transkription von *flaA* steht unter der Kontrolle von σ^{28} , *flaB* wird mit Hilfe von σ^{54} transkribiert (Hendrixson *et al.*, 2001). Der Transkriptionsregulator FlgR ist zusammen mit σ^{54} für die Transkription der Gene für den flagellaren Basalkörper notwendig, wohingegen der Sekretionsapparat σ^{70} -abhängig transkribiert wird (Wosten *et al.*, 2004). Mutationen im flagellaren Sekretionsapparat führen nicht zur vollständigen Repression der *flaA* Transkription, da wahrscheinlich der Repressor FlgM der σ^{28} Transkriptionskontrolle bei *C. jejuni* relativ schwach zu sein scheint und *flaA* auch σ^{28} -unabhängig transkribiert wird (Hendrixson and DiRita, 2003).

Um die Rolle von Fla-T3SS und des TAT-Systems bei der Freisetzung von Proteinen zu untersuchen, wurden Mutanten hergestellt. Um den flagellaren Sekretionsapparat auszuschalten, wurde das Gen *flgC*, das ein periplasmatisches Protein des flagellaren Basalkörpers kodiert, durch die Einführung einer Kanamycin-Kassette ausgeschaltet, wodurch die Mutante L11 Δ *flgC* entstand. Um das TAT-Sekretionssystem zu inaktivieren, wurde das Gen *tatC*, das die Translokase des TAT-Systems kodiert, ebenfalls durch die Einführung einer Kanamycin-Kassette ausgeschaltet, woraus die Mutante L11 Δ *tatC* resultierte. In Abbildung 4.3 sind die Auswirkungen der Mutationen auf Fla-T3SS und das TAT-System dargestellt. Im Anschluss wurde das Sekretom analysiert.

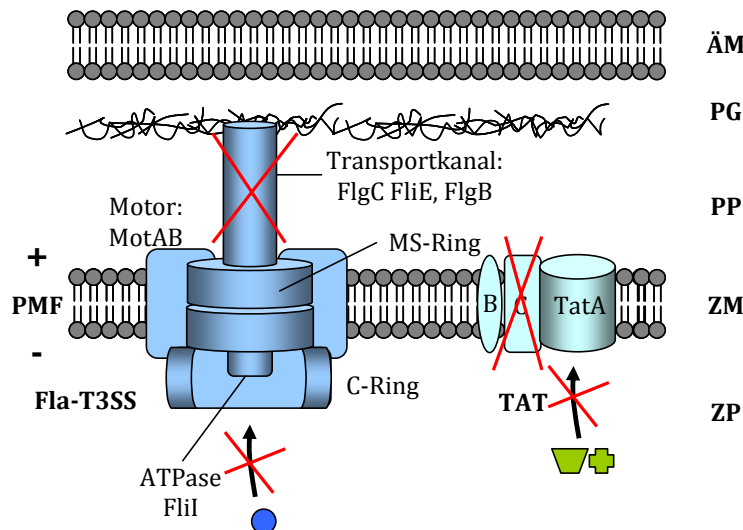


Abb. 4.3: Auswirkungen der Mutationen auf Fla-T3SS und das TAT-Sekretionssystem. Schematische Darstellung des Fla-T3SS von L11 Δ *flgC* und des TAT-Sekretionssystem von L11 Δ *tatC*. Durch die Inaktivierung von *flgC* kann der proximale Transportkanal von Fla-T3SS nicht mehr aufgebaut werden. Somit können Proteine nicht mehr in den Kulturüberstand freigesetzt werden. Durch die Inaktivierung von *tatC* ist das TAT-Sekretionssystem nicht mehr funktionell. Deshalb kann ein TAT-abhängiger Transport über die Zytoplasmamembran (ZM) nicht mehr stattfinden. ZP: Zytoplasma; ZM: Zytoplasmamembran; PP: Periplasma; PG: Peptidoglykan; ÄM: äußeren Membran; PMF: *Proton motive force*.

Durch die Inaktivierung von *flgC* kann der flagellare Sekretionsapparat nicht aufgebaut werden. Es wurde beschrieben, dass die Inaktivierung von *flgC* die Flagellensynthese verhindert und die Flagellin A Synthese reduziert wird (Konkel *et al.*, 2004). Zudem verhindert die *flgC* Inaktivierung die Sekretion der Cia Proteine (Konkel *et al.*, 2004). Bei L11 Δ *flgC* konnte kein Flagellin im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 3.33 und Abb. 3.34). In der Proteom-Analyse des Zytosols waren geringe Mengen von Flagellin sichtbar (Abb. 3.32 B), was darauf zurückzuführen ist, dass *flaA* wahrscheinlich auch σ^{28} -unabhängig transkribiert wird (Hendrixson and DiRita, 2003).

Das Flagellum scheint zudem in Verbindung mit dem TAT-System zu stehen. Das TAT-System ist für die Beweglichkeit von human- und pflanzenpathogene Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli* O157:H7, *Agrobacterium tumefaciens*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Y. pseudotuberculosis*, von Bedeutung (De Buck *et al.*, 2005; Ding and Christie, 2003; Lavander *et al.*, 2006; Ochsner *et al.*, 2002; Pradel *et al.*, 2003). So zeigten die TAT-Mutanten keine Beweglichkeit in Beweglichkeitsagar und auch die Flagellinmenge war erheblich reduziert, wie in zweidimensionalen Gelen nachgewiesen wurde. Dieser Phänotyp konnte noch nicht genau erklärt werden. Bei *E. coli* O157:H7 und *L. pneumophila* konnten TAT-Signalsequenzen in flagellaren Proteinen gezeigt werden. Ob dies aber der tatsächliche Grund für die fehlende Beweglichkeit ist, konnte bisher nicht bewiesen werden. Auch in der *C. jejuni* TAT-Mutante (L11 Δ *tatC*) konnte keine Beweglichkeit und eine reduzierte Flagellinmenge nachgewiesen werden (Abb. 3.32-35, Abb.3.37), weshalb das TAT-System für die Beweglichkeit von *C. jejuni* eine Rolle spielen sollte. Eine mögliche TAT-Sequenz in flagellaren Genen konnte nicht gezeigt werden (van Mourik *et al.*, 2008). Auch könnte ein verminderter Transport von TAT-abhängigen Redox-Enzymen die protonenmotorische Kraft (*proton motive force* PMF) vermindern, was negative Auswirkungen auf das Flagellum hätte. Neben dem Fehlen des Flagellins sind auch die gesamten Proteinmuster des Sekretoms von L11 Δ *tatC* und L11 Δ *flgC* sehr ähnlich (Abb. 3.33-3.35). Die Proteine FlgD, FlgE2, FliD, FlaC, Cj1631c und Cj0391c sind nur im Kulturüberstand des Wildtypstammes zu finden, weshalb sie wahrscheinlich Fla-T3SS-abhängig sekretiert werden. FlgD ist das Assemblierungsprotein des flagellaren Hakens. FlgD von *Salmonella typhimurium* ist essentiell für den Aufbau des flagellaren Hakens und bildet wahrscheinlich ein Haken-Deckelprotein (Ohnishi *et al.*, 1994). FlgE2 ist ein putatives Hakenprotein, das aber nicht essentiell für die Flagellenassemblierung und die Beweglichkeit ist und das im Operon *flgDE2* σ^{54} -abhängig transkribiert wird (Hendrixson *et al.*, 2001; Hendrixson and DiRita, 2003). Da beide Proteine im Zellysate des Wildtypstammes nicht detektiert wurden (Abb. 3.32 A), kann keine Aussage über die Transkription von *flgDE2* in den Mutanten gemacht werden. Wahrscheinlich werden beide Proteine produziert aber aufgrund des fehlenden Sekretionsapparates nicht an die Zelloberfläche transportiert. Das flagellare Hakenprotein FlgE konnte dagegen auch bei den

Mutanten im Kulturüberstand detektiert werden. Aufgrund der geringen Proteinmenge resultiert das Vorkommen von FlgE möglicherweise aus Zellyse. FliD ist das flagellare Deckelprotein und wird wahrscheinlich sowohl σ^{28} - als auch σ^{54} -abhängig transkribiert (Wosten *et al.*, 2004). FliD ist essentiell für die Assemblierung der Flagelle. FliD konnte nur im Kulturüberstand des Wildtypstammes detektiert werden, nicht aber bei den Mutanten, da wahrscheinlich ein funktionaler Flagellenapparat für den Transport von FliD notwendig ist. Für das Flagellin-ähnliche Protein FlaC konnte ein Flagellum-abhängiger Transport gezeigt werden (Konkel *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004). Das Fehlen von FlaC im Kulturüberstand der L11 Δ flgC Mutante entspricht diesem Befund (Abb. 3.33 und Abb. 3.34). FlaC war auch im Kulturüberstand von L11 Δ tatC nicht nachweisbar. Auch die Proteine Cj1631c und Cj0391c konnten nur im Kulturüberstand des Wildtypstammes nachgewiesen werden. Von dem Protein Cj1631c ist die Funktion nicht bekannt. Eine Domänensuche ergab, dass Cj1631c eine *EF-hand* Calcium-Bindungsdomäne besitzt (AS 165-177) (Zhou *et al.*, 2006). Eine Homologie zu bekannten *EF-hand* Calcium-Bindungsdomäne konnte nicht gefunden werden. Diese Proteine sind bei unterschiedlichen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel Antibiotikumresistenz, ABC-Transporter, Nukleinsäuremodifikationen und –Metabolismus, Stressantwort und Chemotaxis (Zhou *et al.*, 2006). Auch über die Funktion des Proteins Cj0391c ist noch nichts Genaues bekannt. Cj0391c wird wahrscheinlich σ^{28} -abhängig transkribiert und ist bei der Bildung von Biofilmen hoch reguliert (Carrillo *et al.*, 2004; Kalmokoff *et al.*, 2006).

Das Protein Cj0414, welches eine putative TAT-Sequenz besitzt (van Mourik *et al.*, 2008), konnte nur im Kulturüberstand des Wildtypstammes und von L11 Δ flgC nachgewiesen werden, nicht aber von L11 Δ tatC (Abb. 3.36). Da aber die Proteinmenge von Zellysate von L11 Δ tatC geringer war als die von L11 und L11 Δ flgC, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass Cj0414 aufgrund der TAT-Sequenz und den Transport über das TAT-System im Überstand nachweisbar ist.

In Abbildung 4.4 sind die möglichen Freisetzungsmechanismen der identifizierten Proteine des Sekretoms von *C. jejuni* zusammengefasst.

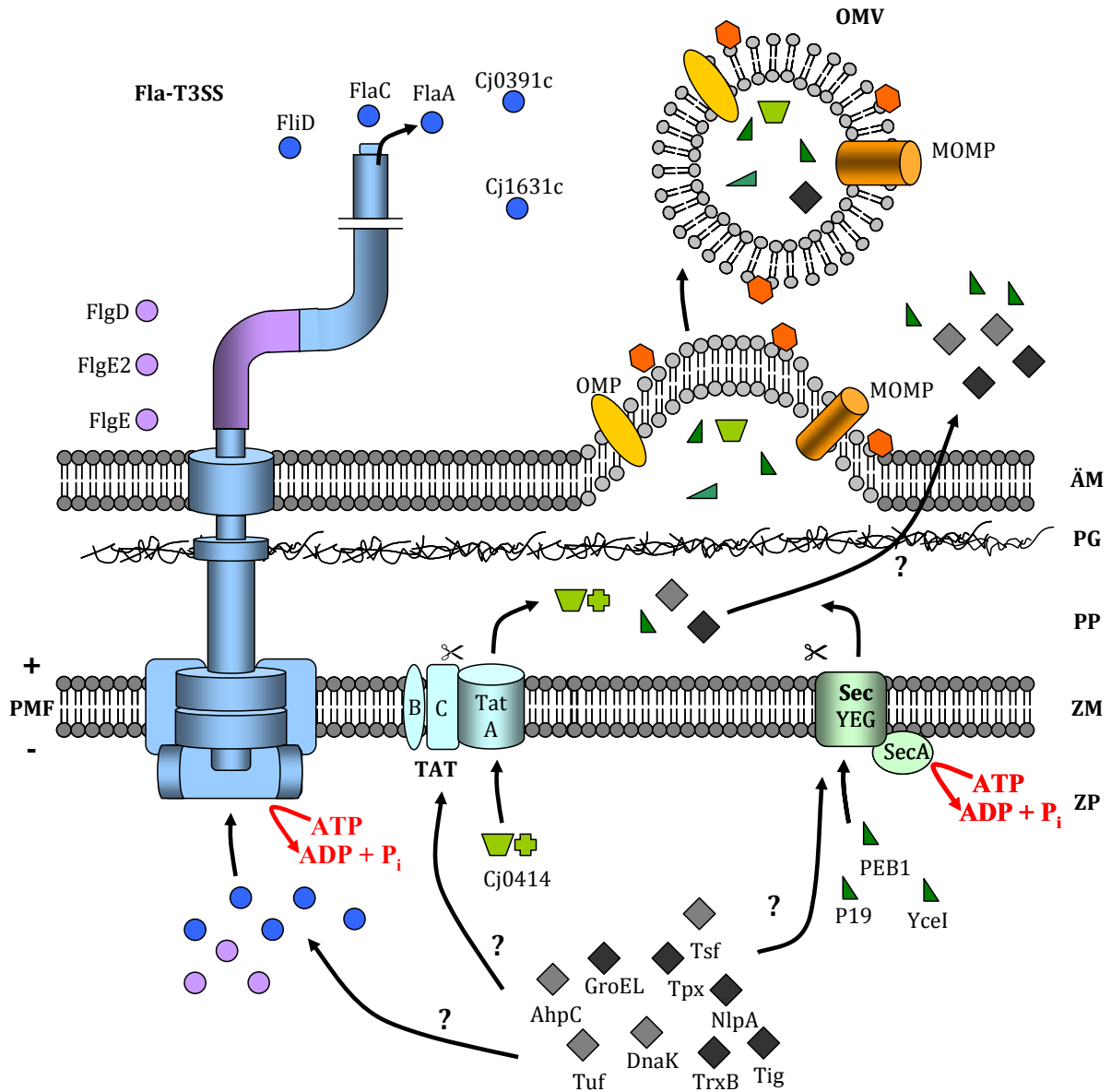


Abb. 4.4: Möglichen Freisetzungsmechanismen der identifizierten Proteine des Sekretoms von *C. jejuni*. Blaue Kreise: Fla-T3SS-abhängige Proteinsekretion; lila Kreise: flagellare Haken- und Haken-assoziierte Proteine; grüne Dreiecke: TAT- bzw. Sec-abhängiger Proteinexport ins Periplasma (PP); graue Vierecke: unbekannter Mechanismus der Proteinfreisetzung; ZP: Zytoplasma; ZM: Zytoplasmamembran; PP: Periplasma; PG: Peptidoglykan; ÄM: äußeren Membran; OMV: *outer membrane vesicles*; PMF: *Proton motive force*.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von neuen Antigenen von *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Campylobacter jejuni*, um die serologische Diagnostik von Yersiniose und Campylobakteriose zu verbessern. Antigene sind *in vivo* produzierte Erregerkomponenten, gegen die der infizierte Wirtsorganismus spezifische Antikörper produziert. Durch die Verwendung von Kaninchen-Anti-Erregerseren, die durch experimentelle Infektion erhalten wurden, sollten spezifische Antikörper unter Infektionsbedingungen erzielt werden. Die virulenzassoziierten Antigene YadA, RtxA und MyfA von *Y. enterocolitica* und PsaA von *Y. pseudotuberculosis* wurden rekombinant hergestellt und hinsichtlich der Antigenität getestet. Hierfür wurden die Anti-*Y. enterocolitica*-Kaninchenseren und serologisch und/oder bakteriologisch positive Yersiniose Patientenseren verwendet. Dabei zeigte sich, dass die rekombinante Kopf-Hals-Region der „Lollipop“-ähnlichen Struktur des Adhesins YadA unspezifisch humanes IgA bindet. Das native YadA bindet unspezifisch humanes IgA und IgG. Aus diesem Grund eignet sich das in der vorliegenden Arbeit hergestellte rekombinante YadA₇₂₋₂₈₀ nicht als serologisch-diagnostisches Antigen. Von RtxA, das zur Familie der MARTX-Toxine gezählt wird, wurde die C-terminale Region (AS 2143-3214), Rtx3 genannt, rekombinant hergestellt. Rtx3 zeigte eine unspezifische Reaktion mit Yop-negativen Blutspenderseren und zudem keine IgA-Reaktivität mit Yop-positiven Seren. MyfA von *Y. enterocolitica* und das homologe Protein PsaA von *Y. pseudotuberculosis* gehören zu den virulenzassoziierten Antigenen. Die rekombinant hergestellten Proteine MyfA und PsaA zeigten zusammen im IgG-„Line Assay“ eine Sensitivität von ca. 78 % mit Yop-positiven Patientenseren und können so zur Verbesserung der serologischen Yersinien Diagnostik beitragen. MyfA und PsaA wurden als rekombinante Antigene zum serologischen Nachweis der humanen Yersinien-Infektion und/oder deren Folgeerkrankungen zur Patentierung angemeldet.

Für die Identifizierung neuer *C. jejuni* Antigene wurden zweidimensionale Proteom- und Sekretomanalysen durchgeführt. Für die Detektion von Antigenen wurden Anti-*C. jejuni*-Hyperimmunsere von Kaninchen und serologisch und/oder bakteriologisch positive Campylobakteriose-Patientenseren verwendet. Hierbei konnten die Antigene NlpA, YceI, Cj1631c und Cj0143c identifiziert werden. Über die Funktion der Proteine ist nichts bekannt. Zusätzlich wurden bekannte virulenzassoziierte Proteine hinsichtlich der Antigenität untersucht: das Lipoprotein JlpA, das Adhesin CadF, das Flagellin-ähnliche Protein FlaC, das Invasin CiaB und das hypothetische Glykoprotein Cj1496c, das eine Rolle bei der Zellinteraktion spielt. Gegen die Proteine FlaC, CiaB und CadF konnten im Immunoblot mit Patientenseren keine Antikörper nachgewiesen werden. JlpA zeigte im Immunoblot im Gegensatz zum „Line Assay“ Reaktivitäten

mit Patientenseren. Das Lipoprotein NlpA erwies sich, wahrscheinlich aufgrund eines stark konservierten Bereichs, als zu unspezifisch für die serologische Diagnostik. Gegen die Proteine Cj1496c, YceI und Cj1631c enthielt nur ein geringer Teil der Patientenseren Antikörper. Die größte Sensitivität im „Line Assay“ konnte mit dem Protein Cj0413c erreicht werden, welches eine IgG-Reaktivität von 23 % und eine IgA-Reaktivität von 4 % aufwies.

In einem zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Sekretomanalyse von *C. jejuni*, bei der die löslichen Überstandsproteine und Vesikel der äußeren Membran untersucht wurden. Hierbei konnten 32 verschiedene Proteine identifiziert werden. Diese beinhalteten flagellare Proteine, Chaperone, Proteine für die Aufnahme von Eisen und für den Schutz vor oxidativen Stress, bekannte Antigene und Proteine mit unbekannter Funktion. Zudem wurde eine vergleichende Sekretomanalyse mit einer Flagellen-Typ-III-Sekretionssystem (Fla-T3SS)-negativen (*L11ΔflgC*) und einer TAT-negativen (*L11ΔtatC*) *C. jejuni* Mutante durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das TAT-Sekretionssystem einen Einfluss auf die Beweglichkeit hat, da die *L11ΔtatC* Mutante unbeweglich ist. Des Weiteren ähneln sich die Proteinmuster des Sekretoms beider Mutanten, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass bei der TAT-Mutante das Fla-T3SS nicht aufgebaut wird. Die Flagellen-assoziierten Proteine FlaA, FlgC, FlgE2, FliD, FlaC und die Proteine unbekannter Funktion Cj1631c und Cj0391c werden Fla-T3SS-abhängig sekretiert. Die putative Glukonat-Oxidoreduktase Cj0414 wird wahrscheinlich TAT-abhängig transportiert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die virulenzassoziierten Proteine MyfA und PsaA von Yersinien und das Protein Cj0413c von *C. jejuni* als serologisch nützliche Antigene identifiziert und das Sekretom von *C. jejuni* in Abhängigkeit des Flagellen-Typ-III-Sekretionssystems und des TAT-Systems charakterisiert werden.

6 Literaturverzeichnis

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14043-14048.

Ajouz, B., Berrier, C., Garrigues, A., Besnard, M., and Ghazi, A. (1998) Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **273**: 26670-26674.

Allos, B. M. (1997) Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis* **176 Suppl 2**: S125-S128.

Allos, B. M. (2001) *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* **32**: 1201-1206.

Alpers, K., Stark, K., Hellenbrand, W., and Ammon, A. (2004) Zoonotische Infektionen beim Menschen - Übersicht über die epidemiologische Situation in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **47**: 622-632.

Altekruse, S. F., Stern, N. J., Fields, P. I., and Swerdlow, D. L. (1999) *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**: 28-35.

Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Strobe, K. L., Barrett, S. L., Cookson, B. T., Logan, S. M. *et al.* (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9247-9252.

Andor, A., Trulzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J. *et al.* (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**: 301-310.

Ang, C. W., Jacobs, B. C., and Laman, J. D. (2004) The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol* **25**: 61-66.

Arai, A., Kitano, A., Sawabe, E., Kanegane, H., Miyawaki, T., and Miura, O. (2007) Relapsing *Campylobacter coli* bacteremia with reactive arthritis in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *Intern Med* **46**: 605-609.

Arner, E. S. and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6102-6109.

Asbury, A. K. and Cornblath, D. R. (1990) Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* **27 Suppl**: S21-S24.

Ashgar, S. S., Oldfield, N. J., Wooldridge, K. G., Jones, M. A., Irving, G. J., Turner, D. P. *et al.* (2007) CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *J Bacteriol* **189**: 1856-1865.

Atack, J. M., Harvey, P., Jones, M. A., and Kelly, D. J. (2008) The *Campylobacter jejuni* thiol peroxidases Tpx and Bcp both contribute to aerotolerance and peroxide-mediated stress resistance but have distinct substrate specificities. *J Bacteriol* **190**: 5279-5290.

Bacon, D. J., Szymanski, C. M., Burr, D. H., Silver, R. P., Alm, R. A., and Guerry, P. (2001) A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Mol Microbiol* **40**: 769-777.

Baillon, M. L., van Vliet, A. H., Ketley, J. M., Constantinidou, C., and Penn, C. W. (1999) An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **181**: 4798-4804.

LITERATURVERZEICHNIS

- Balligand, G., Laroche, Y., and Cornelis, G. (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* **48**: 782-786.
- Barbey, C., Budin-Verneuil, A., Cauchard, S., Hartke, A., Laugier, C., Pichereau, V. *et al.* (2008) Proteomic analysis and immunogenicity of secreted proteins from *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet Microbiol*.
- Barz, C., Abahji, T. N., Trulzsch, K., and Heesemann, J. (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* **482**: 139-143.
- Benabdillah, R., Mota, L. J., Lutzelschwab, S., Demoinet, E., and Cornelis, G. R. (2004) Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb Pathog* **36**: 247-261.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von, H. G., and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F., Donnicola, D., and Corthesy-Theulaz, I. E. (2006) GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **74**: 425-434.
- Berks, B. C., Palmer, T., and Sargent, F. (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**: 174-181.
- Bernatowska, E., Jose, P., Davies, H., Stephenson, M., and Webster, D. (1989) Interaction of campylobacter species with antibody, complement and phagocytes. *Gut* **30**: 906-911.
- Berrier, C., Garrigues, A., Richarme, G., and Ghazi, A. (2000) Elongation factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel mscL. *J Bacteriol* **182**: 248-251.
- Beveridge, T. J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725-4733.
- Biedzka-Sarek, M., Venho, R., and Skurnik, M. (2005) Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun* **73**: 2232-2244.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. *Gene* **192**: 7-11.
- Biswas, D., Itoh, K., and Sasakawa, C. (2003) Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Immunol* **47**: 469-473.
- Black, D. S. and Bliska, J. B. (2000) The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* **37**: 515-527.
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., and Blaser, M. J. (1988) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* **157**: 472-479.
- Black, R. E., Perlman, D., Clements, M. L., Levine, M. M., and Blaser, M. (1992) Human Volunteer Studies with *Campylobacter jejuni*. In *Campylobacter jejuni Current Status and Future Trends*. Nachamkin, I., Blaser, M., and Tompkins, L. S. (ed.) Washington, D.C.: pp. 207-215.
- Blaser, M. (1999) *Campylobacter jejuni* and related species. In *Principles and practices of infectious diseases*. Mandell, G. L., Bennett, J. E., and Dolin, R. (ed.) Churchill Livingstone, Philadelphia: pp. 2276-2285.
- Blaser, M. J., Hopkins, J. A., Berka, R. M., Vasil, M. L., and Wang, W. L. (1983) Identification and characterization of *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins. *Infect Immun* **42**: 276-284.

LITERATURVERZEICHNIS

- Blaser, M. J., Hopkins, J. A., and Vasil, M. L. (1984) Campylobacter jejuni outer membrane proteins are antigenic for humans. *Infect Immun* **43**: 986-993.
- Bliska, J. B. and Black, D. S. (1995) Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the Yersinia pseudotuberculosis tyrosine phosphatase. *Infect Immun* **63**: 681-685.
- Bockemühl, J. and Roggentin, P. (2004) Enterale Yersiniosen. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **47**: 685-691.
- Bockemühl, J. and Wong, J. D. (2003) Yersinia. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., and Tenover, R. C. (ed.) Washington, DC: pp. 672-683.
- Bodero, M. D., Pilonieta, M. C., and Munson, G. P. (2007) Repression of the inner membrane lipoprotein NlpA by Rns in enterotoxigenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **189**: 1627-1632.
- Boland, A. and Cornelis, G. R. (1998) Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect Immun* **66**: 1878-1884.
- Bolin, I., Norlander, L., and Wolf-Watz, H. (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**: 506-512.
- Bolin, I. and Wolf-Watz, H. (1984) Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun* **43**: 72-78.
- Bottone, E. J. (1997) Yersinia enterocolitica: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**: 257-276.
- Bottone, E. J. (1999) Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* **1**: 323-333.
- Bruckner, S., Rhamouni, S., Tautz, L., Denault, J. B., Alonso, A., Becattini, B. et al. (2005) Yersinia phosphatase induces mitochondrially dependent apoptosis of T cells. *J Biol Chem* **280**: 10388-10394.
- Bumann, D., Aksu, S., Wendland, M., Janek, K., Zimny-Arndt, U., Sabarth, N. et al. (2002) Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Infect Immun* **70**: 3396-3403.
- Burns, D. L. (1999) Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* **2**: 25-29.
- Burucoa, C., Fremaux, C., Pei, Z., Tummuru, M., Blaser, M. J., Cenatiempo, Y. et al. (1995) Nucleotide sequence and characterization of peb4A encoding an antigenic protein in Campylobacter jejuni. *Res Microbiol* **146**: 467-476.
- Caldas, T. D., El, Y. A., and Richarme, G. (1998) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J Biol Chem* **273**: 11478-11482.
- Calva, J. J., Ruiz-Palacios, G. M., Lopez-Vidal, A. B., Ramos, A., and Bojalil, R. (1988) Cohort study of intestinal infection with campylobacter in Mexican children. *Lancet* **1**: 503-506.
- Carrillo, C. D., Taboada, E., Nash, J. H., Lanthier, P., Kelly, J., Lau, P. C. et al. (2004) Genome-wide expression analyses of Campylobacter jejuni NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA. *J Biol Chem* **279**: 20327-20338.
- Cascales, E. and Christie, P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**: 137-149.
- Cawthraw, S. A., Feldman, R. A., Sayers, A. R., and Newell, D. G. (2002) Long-term antibody responses following human infection with Campylobacter jejuni. *Clin Exp Immunol* **130**: 101-106.

Centers of Disease Control and Prevention (2006) Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with pathogens transmitted Commonly Through Food-10 States, United States, 2005. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* **55**: 392-395.

Cha, M. K., Kim, H. K., and Kim, I. H. (1995) Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 28635-28641.

Chanyangam, M., Smith, A. L., Moseley, S. L., Kuehn, M., and Jenny, P. (1991) Contribution of a 28-kilodalton membrane protein to the virulence of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **59**: 600-608.

Chen, M. L., Ge, Z., Fox, J. G., and Schauer, D. B. (2006) Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* **74**: 6581-6589.

Ciofu, O., Beveridge, T. J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., and Hoiby, N. (2000) Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **45**: 9-13.

Clark, M. A., Hirst, B. H., and Jepson, M. A. (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**: 1237-1243.

Cogan, T. A., Thomas, A. O., Rees, L. E., Taylor, A. H., Jepson, M. A., Williams, P. H. *et al.* (2007) Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* **56**: 1060-1065.

Coker, A. O., Isokpehi, R. D., Thomas, B. N., Amisu, K. O., and Obi, C. L. (2002) Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis* **8**: 237-244.

Cooney, B. J. and Lo, R. Y. (1993) Three contiguous lipoprotein genes in *Pasteurella haemolytica* A1 which are homologous to a lipoprotein gene in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* **61**: 4682-4688.

Cordwell, S. J., Len, A. C., Touma, R. G., Scott, N. E., Falconer, L., Jones, D. *et al.* (2008) Identification of membrane-associated proteins from *Campylobacter jejuni* strains using complementary proteomics technologies. *Proteomics* **8**: 122-139.

Cornelis, G. R. (2002) The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* **291**: 455-462.

Cornelis, G. R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**: 10881-10890.

Cribier, B., Caille, A., Heid, E., and Grosshans, E. (1998) Erythema nodosum and associated diseases. A study of 129 cases. *Int J Dermatol* **37**: 667-672.

Dallo, S. F., Kannan, T. R., Blaylock, M. W., and Baseman, J. B. (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **46**: 1041-1051.

Dalpke, A., Frank, J., Peter, M., and Heeg, K. (2006) Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun* **74**: 940-946.

Dautin, N. and Bernstein, H. D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112.

Davis, L. M., Kakuda, T., and DiRita, V. J. (2008) A *Campylobacter jejuni* znuA orthologue is essential for growth in low zinc environments and chick colonization. *J Bacteriol* **191**: 1631-1640.

LITERATURVERZEICHNIS

- De Buck, E., Maes, L., Meyen, E., Van, M. L., Geukens, N., Anne, J. *et al.* (2005) Legionella pneumophila Philadelphia-1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1413-1420.
- de Koning, J., Heesemann, J., Hoogkamp-Korstanje, J. A., Festen, J. J., Houtman, P. M., and van Oijen, P. L. (1989) Yersinia in intestinal biopsy specimens from patients with seronegative spondyloarthropathy: correlation with specific serum IgA antibodies. *J Infect Dis* **159**: 109-112.
- Debois, J., Vandepitte, J., and Degreef, H. (1978) Yersinia enterocolitica as a cause of erythema nodosum. *Dermatologica* **156**: 65-78.
- Delor, I. and Cornelis, G. R. (1992) Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**: 4269-4277.
- Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G., and Cornelis, G. R. (1990) Nucleotide sequence of yst, the Yersinia enterocolitica gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect Immun* **58**: 2983-2988.
- Dersch, P. and Isberg, R. R. (1999) A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J* **18**: 1199-1213.
- Devoe, I. W. and Gilchrist, J. E. (1973) Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of Neisseria meningitidis. *J Exp Med* **138**: 1156-1167.
- Ding, Z. and Christie, P. J. (2003) Agrobacterium tumefaciens twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. *J Bacteriol* **185**: 760-771.
- Dukuzumuremyi, J. M., Rosqvist, R., Hallberg, B., Akerstrom, B., Wolf-Watz, H., and Schesser, K. (2000) The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* **275**: 35281-35290.
- Dunn, B. E., Vakil, N. B., Schneider, B. G., Miller, M. M., Zitzer, J. B., Peutz, T. *et al.* (1997) Localization of Helicobacter pylori urease and heat shock protein in human gastric biopsies. *Infect Immun* **65**: 1181-1188.
- EFSA (2006) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal* 2006.
- Ekdahl, K. and Andersson, Y. (2004) Regional risks and seasonality in travel-associated campylobacteriosis. *BMC Infect Dis* **4**: 54.
- Emody, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P. *et al.* (1989) Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol* **171**: 6674-6679.
- Endtz, H. P., Mouton, R. P., van der, R. T., Ruijs, G. J., Biever, M., and van, K. B. (1990) Fluoroquinolone resistance in Campylobacter spp isolated from human stools and poultry products. *Lancet* **335**: 787.
- Engraber, M. and Loos, M. (1992) A 66-kilodalton heat shock protein of Salmonella typhimurium is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun* **60**: 3072-3078.
- Erfurth, S. E., Grobner, S., Kramer, U., Gunst, D. S., Soldanova, I., Schaller, M. *et al.* (2004) Yersinia enterocolitica induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* **72**: 7045-7054.
- Ewis, H. E. and Lu, C. D. (2005) Osmotic shock: a mechanosensitive channel blocker can prevent release of cytoplasmic but not periplasmic proteins. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 295-301.

LITERATURVERZEICHNIS

- Feeley, J. C., Wells, J. G., Tsai, T. F., and Puhr, N. D. (1979) Detection of enterotoxigenic and invasive strains of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **5**: 329-334.
- Fenwick, S. G. and Murray, A. (1991) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. *Lancet* **337**: 496-497.
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R. *et al.* (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**: D281-D288.
- Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T. L. *et al.* (1999) Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* **188**: 220-226.
- FISHER, M. (1956) An unusual variant of acute idiopathic polyneuritis (syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia). *N Engl J Med* **255**: 57-65.
- Flügel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H. *et al.* (1994) Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem* **269**: 29732-29738.
- Forsgren, A. and Sjoquist, J. (1966) "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol* **97**: 822-827.
- Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Mandrell, R. E., Miller, W. G., Rasko, D. A., Ravel, J. *et al.* (2005) Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple campylobacter species. *PLoS Biol* **3**: e15.
- Freeman, A. F. and Holland, S. M. (2007) Persistent bacterial infections and primary immune disorders. *Curr Opin Microbiol* **10**: 70-75.
- Gaede, K., Mack, D., and Heesemann, J. (1992) Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats. *Med Microbiol Immunol* **181**: 165-172.
- Galka, F., Wai, S. N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B. *et al.* (2008) Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect Immun* **76**: 1825-1836.
- Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.
- Garduno, R. A., Faulkner, G., Trevors, M. A., Vats, N., and Hoffman, P. S. (1998) Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **180**: 505-513.
- Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C. J., Ester, M. *et al.* (2005) PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* **21**: 617-623.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Gerke, C., Falkow, S., and Chien, Y. H. (2005) The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by *Yersinia* to inhibit T cell activation. *J Exp Med* **201**: 361-371.
- Ghosh, P. (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795.

LITERATURVERZEICHNIS

- Gierczynski, R., Jagielski, M., and Rastawicki, W. (2002) [Evaluation of usefulness for selected virulence markers for identifying pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. IV. Genes *myfA* and *ureC*]. *Med Dosw Mikrobiol* **54**: 347-355.
- Giesendorf, B. A. and Quint, W. G. (1995) Detection and identification of *Campylobacter* spp. using the polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* **41**: 625-638.
- Godschalk, P. C., Heikema, A. P., Gilbert, M., Komagamine, T., Ang, C. W., Glerum, J. *et al.* (2004) The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest* **114**: 1659-1665.
- Golubov, A. Comparative genome analysis of *Yersinia* . 64-81. 2005. Ludwig-Maximilians-Universität München. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Gonzalez, I., Grant, K. A., Richardson, P. T., Park, S. F., and Collins, M. D. (1997) Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol* **35**: 759-763.
- Goon, S., Kelly, J. F., Logan, S. M., Ewing, C. P., and Guerry, P. (2003) Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the *Cj1293* gene. *Mol Microbiol* **50**: 659-671.
- Gootz, T. D. and Martin, B. A. (1991) Characterization of high-level quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 840-845.
- Gorg, A., Postel, W., and Gunther, S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-546.
- Govoni, V. and Granieri, E. (2001) Epidemiology of the Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Neurol* **14**: 605-613.
- Granfors, K., Merilahti-Palo, R., Luukkainen, R., Mottonen, T., Lahesmaa, R., Probst, P. *et al.* (1998) Persistence of *Yersinia* antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis. *Arthritis Rheum* **41**: 855-862.
- Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P., and Cornelis, G. R. (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 4165-4176.
- Guan, K. L. and Dixon, J. E. (1990) Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* **249**: 553-556.
- Guccione, E., Leon-Kempis, M. R., Pearson, B. M., Hitchin, E., Mulholland, F., van Diemen, P. M. *et al.* (2008) Amino acid-dependent growth of *Campylobacter jejuni*: key roles for aspartase (*AspA*) under microaerobic and oxygen-limited conditions and identification of *AspB* (*Cj0762*), essential for growth on glutamate. *Mol Microbiol* **69**: 77-93.
- Guillain, G., Barre, J. A., and Strohl, A. (1916) Sur un syndrome de radiculonévrite avec hyperalbuminose du liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Remarques sur les caractères cliniques et graphiques des réflexes tendineux. *Bull Soc Med Hop Paris* **40**: 1462-1470.
- Hafer-Macko, C., Hsieh, S. T., Li, C. Y., Ho, T. W., Sheikh, K., Cornblath, D. R. *et al.* (1996a) Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Ann Neurol* **40**: 635-644.
- Hafer-Macko, C. E., Sheikh, K. A., Li, C. Y., Ho, T. W., Cornblath, D. R., McKhann, G. M. *et al.* (1996b) Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* **39**: 625-635.
- Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R., and Bjorkman, P. J. (1999) Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**: 291-295.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hammer, M., Zeidler, H., Klimsa, S., and Heesemann, J. (1990) *Yersinia enterocolitica* in the synovial membrane of patients with *Yersinia*-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **33**: 1795-1800.
- Handa, N., Terada, T., Doi-Katayama, Y., Hirota, H., Tame, J. R., Park, S. Y. *et al.* (2005) Crystal structure of a novel polyisoprenoid-binding protein from *Thermus thermophilus* HB8. *Protein Sci* **14**: 1004-1010.
- Hannu, T., Mattila, L., Rautelin, H., Pelkonen, P., Lahdenne, P., Siitonen, A. *et al.* (2002) *Campylobacter*-triggered reactive arthritis: a population-based study. *Rheumatology (Oxford)* **41**: 312-318.
- Harris, L. A., Logan, S. M., Guerry, P., and Trust, T. J. (1987) Antigenic variation of *Campylobacter* flagella. *J Bacteriol* **169**: 5066-5071.
- Heesemann, J., Gross, U., and Gruter, L. (1987) Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 312-316.
- Heesemann, J., Schroder, J., and Ulrich, M. (1988) Analysis of the class-specific immune response to *Yersinia enterocolitica* virulence-associated antigens in oro-gastrically infected rabbits. *Microb Pathog* **5**: 437-447.
- Heesemann, J., Sing, A., and Trulzsch, K. (2006) *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* **9**: 55-61.
- Helander, I., Olkkonen, L., and Hopsu-Havu, V. K. (1973) *Yersinia* infection as a cause of erythema nodosum. *Z Haut Geschlechtskr* **48**: 399-404.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2369.
- Hendrixson, D. R., Akerley, B. J., and DiRita, V. J. (2001) Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility. *Mol Microbiol* **40**: 214-224.
- Hendrixson, D. R. and DiRita, V. J. (2003) Transcription of sigma54-dependent but not sigma28-dependent flagellar genes in *Campylobacter jejuni* is associated with formation of the flagellar secretory apparatus. *Mol Microbiol* **50**: 687-702.
- Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P. *et al.* (2001) GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* **147**: 87-96.
- Heroven, A. K., Nagel, G., Tran, H. J., Parr, S., and Dersch, P. (2004) RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of *invasin* and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **53**: 871-888.
- Herrmann, J. L., O'Gaora, P., Gallagher, A., Thole, J. E., and Young, D. B. (1996) Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J* **15**: 3547-3554.
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H., and Bukau, B. (1996) *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4437-4441.
- Heusipp, G., Spekker, K., Brast, S., Falker, S., and Schmidt, M. A. (2006) YopM of *Yersinia enterocolitica* specifically interacts with alpha1-antitrypsin without affecting the anti-protease activity. *Microbiology* **152**: 1327-1335.
- Hickey, T. E., Majam, G., and Guerry, P. (2005) Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. *Infect Immun* **73**: 5194-5197.
- Hickey, T. E., McVeigh, A. L., Scott, D. A., Michielutti, R. E., Bixby, A., Carroll, S. A. *et al.* (2000) *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68**: 6535-6541.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R. O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M. *et al.* (2006) Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect Immun* **74**: 4694-4707.
- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., and Heesemann, J. (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* **19**: 5989-5999.
- Holmes, K., Mulholland, F., Pearson, B. M., Pin, C., Nicholl-Kennedy, J., Ketley, J. M. *et al.* (2005) *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology* **151**: 243-257.
- Holmgren, A., Kuehn, M. J., Branden, C. I., and Hultgren, S. J. (1992) Conserved immunoglobulin-like features in a family of periplasmic pilus chaperones in bacteria. *EMBO J* **11**: 1617-1622.
- Hopp, T. P. and Woods, K. R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 3824-3828.
- Horstman, A. L. and Kuehn, M. J. (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* **275**: 12489-12496.
- Houng, H. S., Sethabutr, O., Nirdnoy, W., Katz, D. E., and Pang, L. W. (2001) Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* **40**: 11-19.
- Hu, L. and Kopecko, D. J. (1999) *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect Immun* **67**: 4171-4182.
- Hu, L. and Kopecko, D. J. (2000) Interactions of *Campylobacter* with eucaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms. In *Campylobacter*. Nachamkin, I. and Blaser, D. J. (ed.) Washington, DC: ASM, pp. 191-215.
- Hu, L., Tall, B. D., Curtis, S. K., and Kopecko, D. J. (2008) Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human intestinal Caco-2 cells. *Infect Immun* **76**: 5294-5304.
- Huang, J. Z. and Schell, M. A. (1992) Role of the two-component leader sequence and mature amino acid sequences in extracellular export of endoglucanase EGL from *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* **174**: 1314-1323.
- Hughes, R. A. and Cornblath, D. R. (2005) Guillain-Barre syndrome. *Lancet* **366**: 1653-1666.
- Hughes, R. A. and Rees, J. H. (1997) Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis* **176 Suppl 2**: S92-S98.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuče, B. A., de, C. E. *et al.* (2008) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res* **36**: D245-D249.
- Ibrahim, A., Liesack, W., Griffiths, M. W., and Robins-Browne, R. M. (1997) Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). *J Clin Microbiol* **35**: 1636-1638.
- Iijima, Y., Asako, N. T., Aihara, M., and Hayashi, K. (2004) Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. *J Med Microbiol* **53**: 617-622.
- Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., Delor, I., Diaz, R., Knutton, S., and Cornelis, G. R. (1993) The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **9**: 507-520.
- Isberg, R. R. and Leong, J. M. (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**: 861-871.

LITERATURVERZEICHNIS

- Isberg, R. R., Voorhis, D. L., and Falkow, S. (1987) Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**: 769-778.
- Janssen, R., Krogfelt, K. A., Cawthraw, S. A., van, P. W., Wagenaar, J. A., and Owen, R. J. (2008) Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev* **21**: 505-518.
- Janvier, B., Ayraud, S., Beby-Defaux, A., and Louis, F. J. (2000) Immunogens of interest for the diagnosis of *Campylobacter jejuni* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**: 263-268.
- Jin, S., Joe, A., Lynett, J., Hani, E. K., Sherman, P., and Chan, V. L. (2001) JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol* **39**: 1225-1236.
- Jin, S., Song, Y. C., Emili, A., Sherman, P. M., and Chan, V. L. (2003) JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell Microbiol* **5**: 165-174.
- Johanesen, P. A. and Dwinell, M. B. (2006) Flagellin-independent regulation of chemokine host defense in *Campylobacter jejuni*-infected intestinal epithelium. *Infect Immun* **74**: 3437-3447.
- Jones, M. A., Totemeyer, S., Maskell, D. J., Bryant, C. E., and Barrow, P. A. (2003) Induction of proinflammatory responses in the human monocytic cell line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* **71**: 2626-2633.
- Jourdan, A. D., Johnson, S. C., and Wesley, I. V. (2000) Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3750-3755.
- Juncker, A. S., Willenbrock, H., Von, H. G., Brunak, S., Nielsen, H., and Krogh, A. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* **12**: 1652-1662.
- Juris, S. J., Rudolph, A. E., Huddler, D., Orth, K., and Dixon, J. E. (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9431-9436.
- Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge, T. J. (1995) Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* **177**: 3998-4008.
- Kadurugamuwa, J. L. and Beveridge, T. J. (1999) Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology* **145** (Pt 8): 2051-2060.
- Kahn, M. E., Maul, G., and Goodgal, S. H. (1982) Possible mechanism for donor DNA binding and transport in *Haemophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 6370-6374.
- Kakuda, T. and DiRita, V. J. (2006) Cj1496c encodes a *Campylobacter jejuni* glycoprotein that influences invasion of human epithelial cells and colonization of the chick gastrointestinal tract. *Infect Immun* **74**: 4715-4723.
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T. L., Foss, M., Lau, P. C., Sanders, G. *et al.* (2006) Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *J Bacteriol* **188**: 4312-4320.
- Kato, S., Kowashi, Y., and Demuth, D. R. (2002) Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycescomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* **32**: 1-13.
- Keenan, J., Day, T., Neal, S., Cook, B., Perez-Perez, G., Allardyce, R. *et al.* (2000) A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 259-264.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kervella, M., Pages, J. M., Pei, Z., Grollier, G., Blaser, M. J., and Fauchere, J. L. (1993) Isolation and characterization of two *Campylobacter* glycine-extracted proteins that bind to HeLa cell membranes. *Infect Immun* **61**: 3440-3448.
- Kiehlbauch, J. A., Albach, R. A., Baum, L. L., and Chang, K. P. (1985) Phagocytosis of *Campylobacter jejuni* and its intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* **48**: 446-451.
- Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A. M., Skurnik, M., and Meri, S. (2008) *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000140.
- Knapp, W., Progel, B., and Knapp, C. (1981) [Immunopathological complications in enteric yersiniosis: incidence and serological diagnosis (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr* **106**: 1054-1060.
- Kolling, G. L. and Matthews, K. R. (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1843-1848.
- Komoriya, K., Shibano, N., Higano, T., Azuma, N., Yamaguchi, S., and Aizawa, S. I. (1999) Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **34**: 767-779.
- Konkel, M. E. and Cieplak, W., Jr. (1992) Altered synthetic response of *Campylobacter jejuni* to cocultivation with human epithelial cells is associated with enhanced internalization. *Infect Immun* **60**: 4945-4949.
- Konkel, M. E., Garvis, S. G., Tipton, S. L., Anderson, D. E., Jr., and Cieplak, W., Jr. (1997) Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **24**: 953-963.
- Konkel, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J., Garvis, S. G., and Yoon, J. (1999a) Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the cadF virulence gene and its product. *J Clin Microbiol* **37**: 510-517.
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Rivera-Amill, V., and Garvis, S. G. (1999b) Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol* **32**: 691-701.
- Konkel, M. E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B. *et al.* (2004) Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* **186**: 3296-3303.
- Kosunen, T. U., Ponka, A., Kauranen, O., Martio, J., Pitkanen, T., Hortling, L. *et al.* (1981) Arthritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *Scand J Rheumatol* **10**: 77-80.
- Krause-Gruszczynska, M., Rohde, M., Hartig, R., Genth, H., Schmidt, G., Keo, T. *et al.* (2007a) Role of the small Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in host cell invasion of *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol* **9**: 2431-2444.
- Krause-Gruszczynska, M., van Alphen, L. B., Oyarzabal, O. A., Alter, T., Hanel, I., Schliephake, A. *et al.* (2007b) Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* **274**: 9-16.
- Kronvall, G. (1973) A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G. *J Immunol* **111**: 1401-1406.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., and Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**: 741-747.
- Kuwabara, S. (2004) Guillain-Barre syndrome: epidemiology, pathophysiology and management. *Drugs* **64**: 597-610.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lambert de Rouvroit, C., Sluiter, C., and Cornelis, G. R. (1992) Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **6**: 395-409.
- Lastovica, A. J. and Skirrow, M. B. (2000) Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. In *Campylobacter*. Nachamkin, I. and Blaser, M. J. (ed.) Washington: A.
- Lavander, M., Ericsson, S. K., Broms, J. E., and Forsberg, A. (2006) The twin arginine translocation system is essential for virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **74**: 1768-1776.
- Leirisalo-Repo, M., Hannu, T., and Mattila, L. (2003) Microbial factors in spondyloarthropathies: insights from population studies. *Curr Opin Rheumatol* **15**: 408-412.
- Leon-Kempis, M. R., Guccione, E., Mulholland, F., Williamson, M. P., and Kelly, D. J. (2006) The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamate-binding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. *Mol Microbiol* **60**: 1262-1275.
- Leung, K. Y., Reisner, B. S., and Straley, S. C. (1990) YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* **58**: 3262-3271.
- Lindler, L. E., Klempner, M. S., and Straley, S. C. (1990) *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect Immun* **58**: 2569-2577.
- Linton, D., Allan, E., Karlyshev, A. V., Cronshaw, A. D., and Wren, B. W. (2002) Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **43**: 497-508.
- Lior, H. (1984) New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". *J Clin Microbiol* **20**: 636-640.
- Lior, H., Woodward, D. L., Edgar, J. A., Laroche, L. J., and Gill, P. (1982) Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol* **15**: 761-768.
- Locht, H. and Krogfelt, K. A. (2002) Comparison of rheumatological and gastrointestinal symptoms after infection with *Campylobacter jejuni/coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann Rheum Dis* **61**: 448-452.
- Logan, S. M., Kelly, J. F., Thibault, P., Ewing, C. P., and Guerry, P. (2002) Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. *Mol Microbiol* **46**: 587-597.
- Logan, S. M. and Trust, T. J. (1982) Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* **38**: 898-906.
- Logan, S. M., Trust, T. J., and Guerry, P. (1989) Evidence for posttranslational modification and gene duplication of *Campylobacter* flagellin. *J Bacteriol* **171**: 3031-3038.
- Loiez, C., Herwegh, S., Wallet, F., Armand, S., Guinet, F., and Courcol, R. J. (2003) Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **41**: 4873-4875.
- Lu, Y., Iyoda, S., Satou, H., Satou, H., Itoh, K., Saitoh, T. *et al.* (2006) A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**: 5747-5755.
- Lu, Z., Szafron, D., Greiner, R., Lu, P., Wishart, D. S., Poulin, B. *et al.* (2004) Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers. *Bioinformatics* **20**: 547-556.
- Lunn, C. A. and Pigiet, V. P. (1982) Localization of thioredoxin from *Escherichia coli* in an osmotically sensitive compartment. *J Biol Chem* **257**: 11424-11430.

LITERATURVERZEICHNIS

- Maier, R., Scholz, C., and Schmid, F. X. (2001) Dynamic association of trigger factor with protein substrates. *J Mol Biol* **314**: 1181-1190.
- Maki-Ikola, O., Heesemann, J., Toivanen, A., and Granfors, K. (1997) High frequency of Yersinia antibodies in healthy populations in Finland and Germany. *Rheumatol Int* **16**: 227-229.
- Malen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E., and Wiker, H. G. (2007) Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Proteomics* **7**: 1702-1718.
- Malik-Kale, P., Parker, C. T., and Konkel, M. E. (2008) Culture of Campylobacter jejuni with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. *J Bacteriol* **190**: 2286-2297.
- Malki, A., Caldas, T., Parmeggiani, A., Kohiyama, M., and Richarme, G. (2002) Specificity of elongation factor EF-TU for hydrophobic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 749-754.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., Weese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M. *et al.* (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: D237-D240.
- Marra, A. and Isberg, R. R. (1997) Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of Yersinia pseudotuberculosis across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* **65**: 3412-3421.
- McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S., and Kuehn, M. J. (2006) Outer membrane vesicle production by Escherichia coli is independent of membrane instability. *J Bacteriol* **188**: 5385-5392.
- McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B., and Dixon, J. E. (2003) The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* **278**: 18514-18523.
- Mellits, K. H., Mullen, J., Wand, M., Armbruster, G., Patel, A., Connerton, P. L. *et al.* (2002) Activation of the transcription factor NF-kappaB by Campylobacter jejuni. *Microbiology* **148**: 2753-2763.
- Meyer, K. F. (1970) Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. *Bull World Health Organ* **42**: 653-666.
- Miller, V. L., Bliska, J. B., and Falkow, S. (1990) Nucleotide sequence of the Yersinia enterocolitica ail gene and characterization of the Ail protein product. *J Bacteriol* **172**: 1062-1069.
- Miller, V. L. and Falkow, S. (1988) Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**: 1242-1248.
- Miller, V. L., Farmer, J. J., III, Hill, W. E., and Falkow, S. (1989) The ail locus is found uniquely in Yersinia enterocolitica serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* **57**: 121-131.
- Mills, S. D. and Bradbury, W. C. (1984) Human antibody response to outer membrane proteins of Campylobacter jejuni during infection. *Infect Immun* **43**: 739-743.
- Mittal, R., Peak-Chew, S. Y., and McMahon, H. T. (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18574-18579.
- Monteville, M. R. and Konkel, M. E. (2002) Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by Campylobacter jejuni occurs preferentially at the basolateral cell surface. *Infect Immun* **70**: 6665-6671.
- Monteville, M. R., Yoon, J. E., and Konkel, M. E. (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.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J. *et al.* (2006) Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**: 1211-1214.

LITERATURVERZEICHNIS

- Nachamkin, I. and Barbagallo, S. (1990) Culture confirmation of *Campylobacter* spp. by latex agglutination. *J Clin Microbiol* **28**: 817-818.
- Nachamkin, I. and Hart, A. M. (1985) Western blot analysis of the human antibody response to *Campylobacter jejuni* cellular antigens during gastrointestinal infection. *J Clin Microbiol* **21**: 33-38.
- Nagel, G., Lahrz, A., and Dersch, P. (2001) Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol* **41**: 1249-1269.
- Nakajima, H., Inoue, M., Mori, T., Itoh, K., Arakawa, E., and Watanabe, H. (1992) Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J Clin Microbiol* **30**: 2484-2486.
- Navarro, L., Koller, A., Nordfelth, R., Wolf-Watz, H., Taylor, S., and Dixon, J. E. (2007) Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol Cell* **26**: 465-477.
- Neubauer, H., Hensel, A., Aleksic, S., and Meyer, H. (2000) Evaluation of a *Yersinia* adhesion gene (*yadA*) specific PCR for the identification of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Int J Food Microbiol* **57**: 225-227.
- Neuhoff, V., Stamm, R., and Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**: 427-448.
- Newell, D. G. and Nachamkin, I. (1992) Immune Responses Directed against *Campylobacter jejuni*. In *Campylobacter jejuni Current Status and Future Trends*. Nachamkin, I., Blaser, M., and Tompkins, L. S. (ed.) Washington, D.C.: pp. 201-206.
- Ng, L. K., Sherburne, R., Taylor, D. E., and Stiles, M. E. (1985) Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J Bacteriol* **164**: 338-343.
- Norkina, O. V., Kulichenko, A. N., Gintsburg, A. L., Tuchkov, I. V., Popov, Y., Aksenov, M. U. *et al.* (1994) Development of a diagnostic test for *Yersinia pestis* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* **76**: 240-245.
- Nouwens, A. S., Willcox, M. D., Walsh, B. J., and Cordwell, S. J. (2002) Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **2**: 1325-1346.
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., and O'Farrell, P. H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**: 1133-1141.
- Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (2002) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8312-8317.
- Oelschlaeger, T. A., Guerry, P., and Kopecko, D. J. (1993) Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6884-6888.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R. M., and Iino, T. (1994) FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 2272-2281.
- On, S. L. (2001) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 1S-15S.
- Oyofe, B. A., Thornton, S. A., Burr, D. H., Trust, T. J., Pavlovskis, O. R., and Guerry, P. (1992) Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**: 2613-2619.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pacheco-Tena, C., varado De La, B. C., Lopez-Vidal, Y., Vazquez-Mellado, J., Richaud-Patin, Y., Amieva, R. I. *et al.* (2001) Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset spondyloarthropathies. *Rheumatology (Oxford)* **40**: 920-927.
- Pai, C. H. and Mors, V. (1978) Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **19**: 908-911.
- Pajaniappan, M., Hall, J. E., Cawthraw, S. A., Newell, D. G., Gaynor, E. C., Fields, J. A. *et al.* (2008) A temperature-regulated *Campylobacter jejuni* gluconate dehydrogenase is involved in respiration-dependent energy conservation and chicken colonization. *Mol Microbiol* **68**: 474-491.
- Palmer, T., Sargent, F., and Berks, B. C. (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* **13**: 175-180.
- Palyada, K., Threadgill, D., and Stintzi, A. (2004) Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **186**: 4714-4729.
- Park, S. F. (2002) The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* **74**: 177-188.
- Parker, C. T., Horn, S. T., Gilbert, M., Miller, W. G., Woodward, D. L., and Mandrell, R. E. (2005) Comparison of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide biosynthesis loci from a variety of sources. *J Clin Microbiol* **43**: 2771-2781.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D. *et al.* (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403**: 665-668.
- Patzer, S. I. and Hantke, K. (2000) The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 24321-24332.
- Pearson, B. M., Gaskin, D. J., Segers, R. P., Wells, J. M., Nuijten, P. J., and van Vliet, A. H. (2007) The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *J Bacteriol* **189**: 8402-8403.
- Pei, Z. and Blaser, M. J. (1993) PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J Biol Chem* **268**: 18717-18725.
- Pei, Z., Burucoa, C., Grignon, B., Baqar, S., Huang, X. Z., Kopecko, D. J. *et al.* (1998) Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun* **66**: 938-943.
- Pei, Z. H., Ellison, R. T., III, and Blaser, M. J. (1991) Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **266**: 16363-16369.
- Penner, J. L. and Hennessy, J. N. (1980) Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol* **12**: 732-737.
- Pepe, J. C., Wachtel, M. R., Wagar, E., and Miller, V. L. (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* **63**: 4837-4848.
- Perry, R. D. and Fetherston, J. D. (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**: 35-66.
- Persson, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* **16**: 2307-2318.
- Persson, S. and Olsen, K. E. (2005) Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol* **54**: 1043-1047.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J., and Brade, V. (1992) Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. *Infect Immun* **60**: 189-195.
- Poly, F., Read, T., Tribble, D. R., Baqar, S., Lorenzo, M., and Guerry, P. (2007) Genome sequence of a clinical isolate of *Campylobacter jejuni* from Thailand. *Infect Immun* **75**: 3425-3433.
- Portnoy, D. A. and Falkow, S. (1981) Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **148**: 877-883.
- Pradel, N., Ye, C., Livrelli, V., Xu, J., Joly, B., and Wu, L. F. (2003) Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **71**: 4908-4916.
- Rao, M. C., Guandalini, S., Laird, W. J., and Field, M. (1979) Effects of heat-stable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum. *Infect Immun* **26**: 875-878.
- Rees, J. H., Thompson, R. D., Smeeton, N. C., and Hughes, R. A. (1998) Epidemiological study of Guillain-Barre syndrome in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **64**: 74-77.
- Reid, A. N., Pandey, R., Palyada, K., Whitworth, L., Doukhanine, E., and Stintzi, A. (2008) Identification of *Campylobacter jejuni* genes contributing to acid adaptation by transcriptional profiling and genome-wide mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1598-1612.
- Rivera-Amill, V., Kim, B. J., Seshu, J., and Konkell, M. E. (2001) Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J Infect Dis* **183**: 1607-1616.
- RKI (2000) Zwei Gastroenteritis-Ausbrüche durch *Campylobacter jejuni* nach dem Genuss von Rohmilch. *Epid Bull* **2000** **18**: 143-145.
- Robert Koch Institut (2007) *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007*. Berlin.
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., and Heesemann, J. (2003) Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**: 3735-3744.
- Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., and Heesemann, J. (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* **64**: 2506-2514.
- Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbühl, R., Kohler, S. *et al.* (1998) *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* **187**: 1069-1079.
- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Lafont, V., Mangeat, P., Heesemann, J., and Rouot, B. (1997) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect Immun* **65**: 4813-4821.
- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., and Heesemann, J. (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* **64**: 724-733.
- Russel, M. (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol* **279**: 485-499.
- Sandt, C. H. and Hill, C. W. (2000) Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 2205-2214.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sandt, C. H. and Hill, C. W. (2001) Nonimmune binding of human immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by distinct sequence segments of the EibF cell surface protein of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**: 7293-7303.
- Sandt, C. H., Wang, Y. D., Wilson, R. A., and Hill, C. W. (1997) *Escherichia coli* strains with nonimmune immunoglobulin-binding activity. *Infect Immun* **65**: 4572-4579.
- Satchell, K. J. (2007) MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infect Immun* **75**: 5079-5084.
- Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J. A., and Cornelis, G. R. (2002) Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem* **277**: 25133-25142.
- Schesser, K., Spiik, A. K., Dukuzumuremyi, J. M., Neurath, M. F., Pettersson, S., and Wolf-Watz, H. (1998) The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* **28**: 1067-1079.
- Schiellerup, P., Kroghfelt, K. A., and Loch, H. (2008) A comparison of self-reported joint symptoms following infection with different enteric pathogens: effect of HLA-B27. *J Rheumatol* **35**: 480-487.
- Schiemann, D. A. (1979) Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can J Microbiol* **25**: 1298-1304.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B., Bull, C. *et al.* (1993) Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun* **61**: 2513-2519.
- Schwartz, R. A. and Nervi, S. J. (2007) Erythema nodosum: a sign of systemic disease. *Am Fam Physician* **75**: 695-700.
- Schwerer, B. (2002) Antibodies against gangliosides: a link between preceding infection and immunopathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *Microbes Infect* **4**: 373-384.
- Shao, F., Vacratsis, P. O., Bao, Z., Bowers, K. E., Fierke, C. A., and Dixon, J. E. (2003) Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 904-909.
- Shoaf-Sweeney, K. D., Larson, C. L., Tang, X., and Konkel, M. E. (2008) Identification of *Campylobacter jejuni* proteins recognized by maternal antibodies of chickens. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6867-6875.
- Shoberg, R. J. and Thomas, D. D. (1993) Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect Immun* **61**: 3892-3900.
- Sibbald, M. J., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., de, J. A., Harmsen, H. J. *et al.* (2006) Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 755-788.
- Simonet, M., Riot, B., Fortineau, N., and Berche, P. (1996) Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun* **64**: 375-379.
- Skirrow, M. B. and Blaser, M. J. (1992) Clinical and Epidemiologic Considerations. In *Campylobacter jejuni Current Status and Future Trend*. Nachamkin, I., Blaser, M. J., and Tompkins, L. S. (ed.) Washington: pp. 3-8.
- Skrzypek, E., Cowan, C., and Straley, S. C. (1998) Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* **30**: 1051-1065.
- Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., and Wolf-Watz, H. (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **158**: 1033-1036.

LITERATURVERZEICHNIS

- Skurnik, M., Peippo, A., and Ervela, E. (2000) Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* **37**: 316-330.
- Skurnik, M. and Toivanen, P. (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **174**: 2047-2051.
- Skurnik, M. and Wolf-Watz, H. (1989) Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**: 517-529.
- Song, Y. C., Jin, S., Louie, H., Ng, D., Lau, R., Zhang, Y. *et al.* (2004) FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol* **53**: 541-553.
- Stancik, L. M., Stancik, D. M., Schmidt, B., Barnhart, D. M., Yoncheva, Y. N., and Slonczewski, J. L. (2002) pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 4246-4258.
- Strid, M. A., Engberg, J., Larsen, L. B., Begtrup, K., Molbak, K., and Krogfelt, K. A. (2001) Antibody responses to *Campylobacter* infections determined by an enzyme-linked immunosorbent assay: 2-year follow-up study of 210 patients. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 314-319.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., and Schleifer, K. H. (2000) Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol* **54**: 81-127.
- Szymanski, C. M., Burr, D. H., and Guerry, P. (2002) *Campylobacter* protein glycosylation affects host cell interactions. *Infect Immun* **70**: 2242-2244.
- Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J., and Guerry, P. (1999) Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **32**: 1022-1030.
- Takao, T., Tominaga, N., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T., and Miyama, A. (1984) Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem Biophys Res Commun* **125**: 845-851.
- Takao, T., Tominaga, N., Yoshimura, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T. *et al.* (1985) Isolation, primary structure and synthesis of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Eur J Biochem* **152**: 199-206.
- Tamm, A., Tarkkanen, A. M., Korhonen, T. K., Kuusela, P., Toivanen, P., and Skurnik, M. (1993) Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**: 995-1011.
- Taylor, D. N. (1992) *Campylobacter* Infections in Developing Countries. In *Campylobacter jejuni Current Status and Future Trends*. Nachamkin, I., Blaser, M., and Tompkins, L. S. (ed.) Washington, D.C: pp. 20-30.
- Taylor, D. N., Echeverria, P., Pitarangsi, C., Seriwatana, J., Bodhidatta, L., and Blaser, M. J. (1988) Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of *Campylobacter* infections in Thailand. *J Clin Microbiol* **26**: 863-868.
- Tertti, R., Skurnik, M., Vartio, T., and Kuusela, P. (1992) Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun* **60**: 3021-3024.
- Thanassi, D. G. and Hultgren, S. J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 420-430.

- Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J. *et al.* (2001) Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem* **276**: 34862-34870.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R. *et al.* (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 207-233.
- Totten, P. A., Patton, C. M., Tenover, F. C., Barrett, T. J., Stamm, W. E., Steigerwalt, A. G. *et al.* (1987) Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J Clin Microbiol* **25**: 1747-1752.
- Toyos, J., Diaz, R., Urra, E., and Moriyon, I. (1986) Analysis by coagglutination of the distribution of a 24,000-dalton surface protein in *Yersinia* isolates. *J Clin Microbiol* **23**: 804-805.
- Trosky, J. E., Liverman, A. D., and Orth, K. (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* **10**: 557-565.
- Trost, M., Wehmhoner, D., Karst, U., Dieterich, G., Wehland, J., and Jansch, L. (2005) Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics* **5**: 1544-1557.
- Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H., and Heesemann, J. (2004) Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* **72**: 5227-5234.
- Tu, Q. V., McGuckin, M. A., and Mendz, G. L. (2008) *Campylobacter jejuni* response to human mucin MUC2: modulation of colonization and pathogenicity determinants. *J Med Microbiol* **57**: 795-802.
- van Alphen, L. B., Bleumink-Pluym, N. M., Rochat, K. D., van Balkom, B. W., Wosten, M. M., and van Putten, J. P. (2008) Active migration into the subcellular space precedes *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* **10**: 53-66.
- van Mourik, A., Bleumink-Pluym, N. M., van, D. L., van Putten, J. P., and Wosten, M. M. (2008) Functional analysis of a *Campylobacter jejuni* alkaline phosphatase secreted via the Tat export machinery. *Microbiology* **154**: 584-592.
- van Vliet, A. H., Wooldridge, K. G., and Ketley, J. M. (1998) Iron-responsive gene regulation in a *campylobacter jejuni* fur mutant. *J Bacteriol* **180**: 5291-5298.
- Vazquez-Laslop, N., Lee, H., Hu, R., and Neyfakh, A. A. (2001) Molecular sieve mechanism of selective release of cytoplasmic proteins by osmotically shocked *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 2399-2404.
- Von Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M. V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* **36**: 737-748.
- Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P. G., Nita-Lazar, M., Haslam, S. M., North, S. J. *et al.* (2002) N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* **298**: 1790-1793.
- Waegel, A. and Nachamkin, I. (1996) Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **10**: 75-80.
- Wai, S. N., Takade, A., and Amako, K. (1995) The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **39**: 451-456.
- Wassenaar, T. M., Engelskirchen, M., Park, S., and Lastovica, A. (1997) Differential uptake and killing potential of *Campylobacter jejuni* by human peripheral monocytes/macrophages. *Med Microbiol Immunol* **186**: 139-144.
- Watson, R. O. and Galan, J. E. (2008) *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog* **4**: e14.

LITERATURVERZEICHNIS

- Watson, R. O., Novik, V., Hofreuter, D., Lara-Tejero, M., and Galan, J. E. (2007) A MyD88-deficient mouse model reveals a role for Nramp1 in *Campylobacter jejuni* infection. *Infect Immun* **75**: 1994-2003.
- Wauters, G., Kandolo, K., and Janssens, M. (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14-21.
- Wenman, W. M., Chai, J., Louie, T. J., Goudreau, C., Lior, H., Newell, D. G. *et al.* (1985) Antigenic analysis of *Campylobacter* flagellar protein and other proteins. *J Clin Microbiol* **21**: 108-112.
- WHO (2000) Plague. In *WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases*. World Health Organization (WHO): Department of Communicable Disease Surveillance and Response, pp. 25-31.
- Wiedemann, A., Linder, S., Grassl, G., Albert, M., Autenrieth, I., and Aepfelbacher, M. (2001) *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol* **3**: 693-702.
- Wiesner, R. S., Hendrixson, D. R., and DiRita, V. J. (2003) Natural transformation of *Campylobacter jejuni* requires components of a type II secretion system. *J Bacteriol* **185**: 5408-5418.
- Willison, H. J. (2005) The immunobiology of Guillain-Barre syndromes. *J Peripher Nerv Syst* **10**: 94-112.
- Wilson, D. J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A. J., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E. *et al.* (2008) Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet* **4**: e1000203.
- Wilson, I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3741-3751.
- Wollenhaupt, J. (2007) Spondylitis ankylosans und reaktive Arthritiden. In *Medizinische Therapie 2007 | 2008*. Springer Berlin Heidelberg: Schölmerich, J., pp. 584-591.
- Wood, A. C., Oldfield, N. J., O'Dwyer, C. A., and Ketley, J. M. (1999) Cloning, mutation and distribution of a putative lipopolysaccharide biosynthesis locus in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* **145 (Pt 2)**: 379-388.
- Workman, S. N., Mathison, G. E., and Lavoie, M. C. (2005) Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *J Clin Microbiol* **43**: 2642-2650.
- Wosten, M. M., Wagenaar, J. A., and van Putten, J. P. (2004) The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **279**: 16214-16222.
- Wren, B. W. (2003) The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **1**: 55-64.
- Wuorela, M. and Granfors, K. (1998) Infectious agents as triggers of reactive arthritis. *Am J Med Sci* **316**: 264-270.
- Yamaguchi, K. and Inouye, M. (1988) Lipoprotein 28, an inner membrane protein of *Escherichia coli* encoded by nlpA, is not essential for growth. *J Bacteriol* **170**: 3747-3749.
- Yang, Y., Merriam, J. J., Mueller, J. P., and Isberg, R. R. (1996) The psa locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect Immun* **64**: 2483-2489.
- Yao, R., Burr, D. H., Doig, P., Trust, T. J., Niu, H., and 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.
- Yao, R., Burr, D. H., and Guerry, P. (1997) CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Mol Microbiol* **23**: 1021-1031.

LITERATURVERZEICHNIS

- Yao, T., Meccas, J., Healy, J. I., Falkow, S., and Chien, Y. (1999) Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J Exp Med* **190**: 1343-1350.
- Young, G. M., Schmiel, D. H., and Miller, V. L. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6456-6461.
- Young, N. M., Brisson, J. R., Kelly, J., Watson, D. C., Tessier, L., Lanthier, P. H. *et al.* (2002) Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **277**: 42530-42539.
- Young, V. B., Miller, V. L., Falkow, S., and Schoolnik, G. K. (1990) Sequence, localization and function of the invasive protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **4**: 1119-1128.
- Yu, F., Inouye, S., and Inouye, M. (1986) Lipoprotein-28, a cytoplasmic membrane lipoprotein from *Escherichia coli*. Cloning, DNA sequence, and expression of its gene. *J Biol Chem* **261**: 2284-2288.
- Yuki, N., Susuki, K., Koga, M., Nishimoto, Y., Odaka, M., Hirata, K. *et al.* (2004) Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11404-11409.
- Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R., and Song, W. (2008) *Campylobacter*-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires *Campylobacter*-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF-kappaB. *Infect Immun* **76**: 4498-4508.
- Zhou, Y., Yang, W., Kirberger, M., Lee, H. W., Ayalasomayajula, G., and Yang, J. J. (2006) Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins* **65**: 643-655.
- Zilbauer, M., Dorrell, N., Elmi, A., Lindley, K. J., Schuller, S., Jones, H. E. *et al.* (2007) A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol* **9**: 2404-2416.
- Ziprin, R. L., Young, C. R., Stanker, L. H., Hume, M. E., and Konkel, M. E. (1999) The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Dis* **43**: 586-589.

7 Anhang

7.1 Evaluierung der rekombinanten Yersinia Antigene

Die Evaluierung der rekombinanten Yersinia Antigene YadA₇₂₋₂₈₀, Rtx3, MyfA und PsaA wurden in Zusammenarbeit mit der Mikrogen GmbH durchgeführt. Die Konstrukte wurden zu Beginn in Firmen interne Vektoren ohne His-tag umkloniert und die rekombinanten Proteine wurden mittels Anionen- und Kationenaustausch-Säulenchromatographie aufgereinigt.

7.1.1 Evaluierung der Yersinien Antigenen YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3

Um die serologische Bedeutung der neuen Yersinien-Antigene YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3 evaluieren zu können, wurden die antigenspezifischen Reaktivitäten von drei verschiedenen Serengruppen untersucht: Yersiniose-Patientenseren (n= 18) sowie Yersinien-positive (n=19) und -negative (n=19) Blutspenderseren des bayerischen Roten Kreuzes. Die Patientenseren wurden in Finnland aus Yersiniose- und Reaktive Arthritis (ReA)-Patienten isoliert, bei denen von Granfors und Kollegen *Y. enterocolitica* O:3 als ursprüngliche Erreger identifiziert wurde (Granfors *et al.*, 1998). Die Yersinien-positiven Blutspenderseren wurden anhand des YopD-spezifischen IgG- und IgA-Titers im *recomLine* Yersinia (Mikrogen GmbH, München) charakterisiert.

Zu Beginn wurden die Patientenseren aus Finnland mit dem *RecomLine* Yersinia getestet. Wie erwartet zeigten die Yersiniose Patientenseren sehr hohe spezifische IgG- (94 %) und IgA- (94%) Reaktivitäten gegen YopD (Tab. 7.3). Die anderen Yersinien-Antigene des *recomLine* Yersinia (YopM, YopH, YopN, YopE und V-AG) zeigten keine oder nur sehr schwache IgA-Reaktivitäten. Eine IgG-Antwort gegen diese Antigene wurde häufiger in Seren aus Yersiniose-Patienten als in Seren aus ReA-Patienten detektiert. Die IgG-Reaktivität gegen YopM in ReA-Patientenseren wich stark von der in Yersiniose-Patientenseren ab (40 % bzw. 75%).

Die serologische Untersuchung der neuen Yersinien Antigene YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3 erfolgte mittels „Line Assay“, bei dem die rekombinanten Proteine in drei verschiedenen Konzentrationen auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht wurden (2.7.11.2). Um erhaltene Signale analysieren zu können, wurde das etablierte YopD-Antigen des bestehenden *recomLine* Yersinia in den „Line Assay“ mit verwendet. Für die Auswertung wurde die Cutoff Kontrolle einbezogen, an deren Intensität die Antikörper-Reaktivität der verschiedenen Seren beurteilt wurde: mit 2+, 3+ bzw. 4+ wurden positive

Ergebnisse mit ansteigender Intensität beurteilt; mit 1+ wurde ein fragliches Ergebnis und mit 0 wurde ein negatives Testergebnis bewertet.

Eine IgG- und IgA-Antwort gegen das **YadA₇₂₋₂₈₀** Protein wurde in allen Serengruppen detektiert. Jedoch war die IgG-Reaktivität gegen YadA₇₂₋₂₈₀ in den Yersiniose Patientenseren (67 %) stärker als die der negativen Yersinien Blutspenderseren (BSS; 21 %) und die der Yersinien positiven Blutspenderseren (Y+ BSS; 16 %) (Tab. 7.4 und Tab. 7.5). Auffallend jedoch ist die sehr starke IgA-Reaktivität in allen Serengruppen. Diese liegt bei den Yersiniose Patienten bei 94 % und bei den Yersinien positiven bzw. Yersinien negativen Blutspenderseren bei 58 % bzw. 42 %. Dies gab Anlass zur Annahme, dass YadA unspezifisch IgA binden könnte. Aufgrund dieser Vermutung wurde die Bindung von aufgereinigten humanen IgA mit YadA₇₂₋₂₈₀ überprüft und auch bestätigt (C. Nölting, Mikrogen GmbH, Ergebnisse nicht gezeigt). Zusätzlich konnte mit einem Yersinien-negativen humanen Serum die unspezifische Bindung von IgG und IgA an natives YadA von verschiedenen *Y. enterocolitica* Serogruppen gezeigt werden (Abb. 3.11).

Das Teilfragment 3 des RtxA-Antigens (**Rtx3**) reagierte nur mit der Antikörperklasse IgG. Jedoch zeigten sowohl Yersinien-positive als auch Yersinien-negative Seren diese Reaktivität (Tab. 7.4 und Tab. 7.5). Eine IgA-Reaktivität gegen das Rtx3 war nicht nachzuweisen.

Die Ergebnisse der serologischen Beurteilung von YadA_{Kopd} und Rtx3 sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Tab. 7.1: Zusammenfassung der IgG- und IgA-Reaktivitäten gegen die neuen Yersinien Antigene YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3. YopD wurde als positiver Referenzwert mit aufgeführt. KTL: Patientenseren aus Finnland (Granfors *et al.*, 1998). Y+ BSS: Yersinien positive Blutspenderseren; BSS: Yersinien negative Blutspenderseren.

Serum	IgG			IgA		
	YopD	YadAKopf	Rtx3	YopD	YadAKopf	Rtx3
KTL n=18 Reaktivität	17 94%	12 67%	11 61%	17 94%	17 94%	0
Y+ BSS n=19 Reaktivität	17 90%	3 16%	13 68%	13 68%	11 58%	0
BSS n=19 Reaktivität	3 16%	4 21%	8 43%	2 10,5	8 42%	0

7.1.2 Evaluierung der Antigene MyfA und PsaA

Für die Bestimmung der serologischen Bedeutung der neuen Yersinien-Antigene MyfA von *Y. enterocolitica* und PsaA von *Y. pseudotuberculosis*, wurde die IgG-, IgM- und IgA-Antwort gegen diese Antigene mit Seren aus drei verschiedenen Serensammlungen mittels „Line Assays“ untersucht: Blutspender des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK, n=40), Yersiniose-Patienten aus Finnland (KTL, n=18, (Granfors *et al.*, 1998) und Yersiniose-Patienten aus Deutschland (YeD, n=23). Als Referenzwerte wurden die rekombinant hergestellten YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE-Antigene verwendet.

Von den getesteten Blutspenderseren aus Bayern (n=40) zeigten 48 % eine IgG-Reaktivität mit YopD (Abb. 7.1 und Tab. 7.6). Acht Serumproben wiesen eine IgG-Antwort auf, die nicht gegen YopD sondern ausschließlich gegen YopH (n=4), YopH und YopN (n=1), YopH und V-AG (n=1), YopM (n=1) und PsaA (n=1) gerichtet war. Drei der Seren (7,5 %) reagierten mit den beiden neuen Yersinien-Antigenen MyfA (n=4) und PsaA (n=9). Sieben YopD-IgG-positive Serumproben (17,5 %) zeigten eine IgA-Reaktivität mit YopD (Tab. 7.6). Drei der getesteten Seren reagierten im IgA positiv mit PsaA. Die Yop-IgG-negative Serumprobe Nr. 1080 zeigte eine sehr schwache Reaktivität mit PsaA. Die YopD- und PsaA IgG-hoch positiven Serumproben Nr. 1096 und Nr. 1110 wiesen auch eine starke (Serum Nr. 1096) bzw. schwache (Serum Nr. 1110) IgA-Antwort gegen PsaA auf (Tab. 7.6). Keine der getesteten Serumproben reagierte im IgA positiv mit MyfA (Tab. 7.6).

Bei den der getesteten Patientenseren aus Finnland (n=18) zeigten 17 (94 %) eine IgG-Antwort gegen YopD (Abb. 7.2; Tab. 7.7). Mit MyfA reagierten im IgG 11 der Patientenseren und 4 waren positiv für PsaA (Abb. 7.2; Tab. 7.7). IgA-Reaktivität mit YopD war bei 17 Serumproben zu beobachten (Tab. 7.7). Drei der getesteten Seren reagierten auch im IgA mit PsaA. Kein Serum zeigt eine IgA-Reaktivität gegen MyfA.

Alle getesteten Yersiniose-Patientenseren aus Deutschland (n=23) zeigten eine IgG-Reaktivität mit YopD (Abb. 7.3; Tab. 7.8). Bei 65 % konnte eine IgG-Reaktivität mit PsaA nachgewiesen werden. Vier der Patientenseren (17 %) reagierten im IgG mit dem Antigen MyfA (Abb. 7.3; Tab. 7.8). Zwei der Patientenseren (YeD BRK1038 und YeD BRK1025) reagierten im IgG sowohl mit MyfA als auch mit PsaA. Jedoch war die IgG-Reaktivität mit MyfA deutlich schwächer als die mit PsaA. Alle getesteten Yersiniose-Patientenseren wiesen eine IgA-Antwort gegen YopD (Tab. 7.8) auf. Je ein Patientenserum reagierte im IgA mit MyfA (YeD BRK976) und mit PsaA (YeD BRK1025). Diese Seren zeigten auch eine starke IgG-Antwort gegen MyfA bzw. PsaA (Tab. 7.8).

Des Weiteren wurde auch die IgM-Reaktivität der verschiedenen Patienten-Serengruppen gegen die Antigene getestet. In keinem der getesteten Blutspenderseren konnten IgM-Antikörper gegen YopD

nachgewiesen werden (Tab. 7.9; Abb. 7.1). Drei Seren wiesen einen IgM-Antikörper gegen YopH (n=2; Serum BRK1087, besitzt auch hohe IgG-Titer gegen YopD und PsaA; Serum BRK1099, zeigt auch einen hohen IgG-Titer gegen YopD) bzw. PsaA (n=1; Serum Nr. 1083, besitzt auch hohe IgG-Titer gegen YopD, MyfA und PsaA) auf. Keiner der getesteten Blutspenderseren Proben reagierte im IgM mit MyfA (Tab. 7.9; Abb. 7.2).

Bei den Patientenseren aus Finnland zeigten 15 Proben IgM-Antikörper gegen YopD (Tab. 7.10). Ein Serum (KTL52) wies zusätzlich zu einer IgM-Antwort gegen YopD auch eine starke Antwort gegen PsaA auf (Tab. 7.10; Abb. 7.3).

Nur 2 bzw. 3 der getesteten Patientenseren aus Deutschland zeigten eine schwache IgM-Reaktivität mit YopD bzw. mit YopE (Tab. 7.11). Ein Serum, (BRK968) reagierte sehr stark im IgM mit PsaA (Tab. 7.11; Abb. 7.3).

In Tabelle 7.2 sind die Ergebnisse der IgG-, IgM- und IgA-Reaktivitäten der drei verschiedenen Serengruppen mit den Antigenen MyfA, PsaA, YopM, YopH, YopD, YopN und YopE zusammengefasst.

Tab. 7.2: IgG-, IgM- und IgA-Reaktivitäten von Blutspenderseren (n=40; BSS), Yersiniose Patientenseren aus Finnland (n=18; TLK) und aus Deutschland (n=23; YeD) mit den rekombinant hergestellten Antigenen MyfA, PsaA, YopM, YopH, V-AG, YopD, YopN und YopE.

	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA
IgG								
BRK	10%	45%	3%	48%	8%	5%	10%	23%
KTL	56%	94%	72%	89%	22%	72%	61%	22%
YeD	35%	57%	43%	100%	17%	35%	17%	65%
IgM								
BRK	0	5%	0	5%	0	0	0	5%
KTL	0	6%	0	78%	0	0	0	6%
YeD	0	0	0	9%	0	13%	0	4%
IgA								
BRK	0	0	0	15%	3%	0	0	8%
KTL	6%	28%	6%	89%	11%	6%	0	17%
YeD	9%	4%	0	100%	0	4%	4%	4%

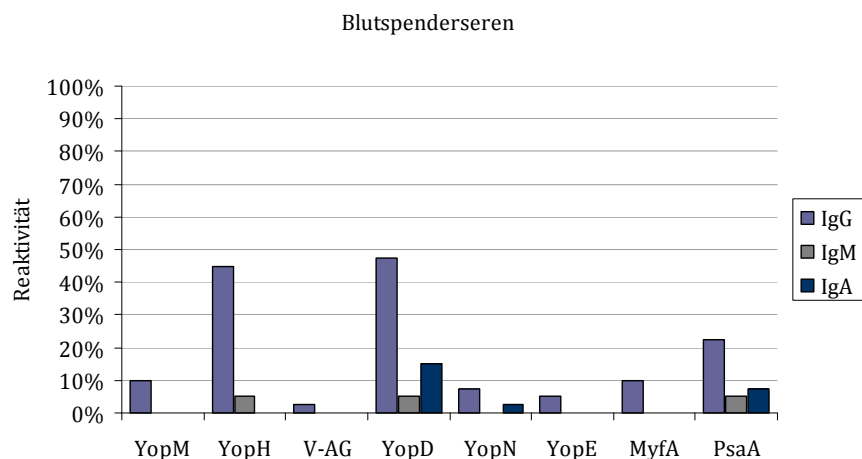


Abb. 7.1: IgG-, IgM- und IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Blutspenderseren des BRK (n=40).

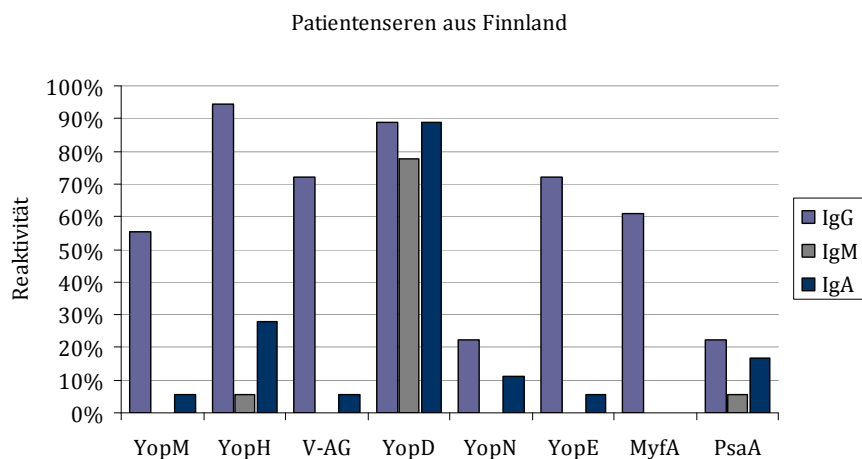


Abb. 7.2: IgG-, IgM- und IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Yersiniose Patientenseren aus Finnland (n=18).

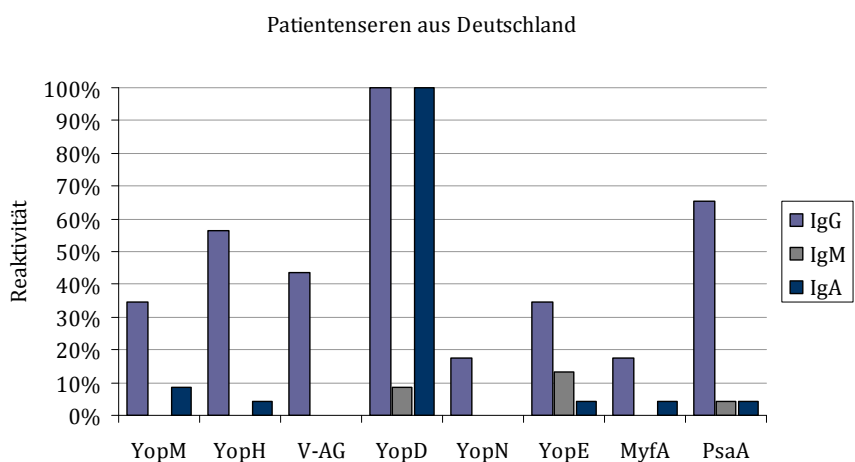


Abb. 7.3: IgG-, IgM- und IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Yersiniose Patientenseren aus Deutschland (n=23).

7.1.3 Tabellen

Tab. 7.3: IgG- und IgA-Reaktivität gegen Yersinia Yop-Antigene (recomLine Yersinia) von Yersiniose Patientenseren aus Finnland (Granfors *et al.*, 1998). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1+ = sehr schwache Reaktivität, 2+ = schwache Reaktivität, 3+ und 4+ = starke Reaktivität. ReA: Reaktive Arthritis.

KTL n=18	IgG						IgA						
	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	
ReA	1	1+	3+	3+	4+	2+	3+	0	0	0	2+	0	0
	5	2+	4+	1+	4+	0	1+	0	0	0	2+	0	0
	6	0	1+	1+	4+	0	0	0	0	0	4+	0	0
	11	0	3+	1+	3+	0	2+	0	0	0	1+	0	0
	16	0	2+	2+	3+	0	0	0	0	0	2+	0	0
	19	0	3+	0	4+	0	2+	0	0	0	2+	0	0
	24	2+	4+	3+	4+	0	3+	0	1+	0	4+	0	0
	34	0	3+	0	3+	0	1+	0	0	0	2+	0	0
	44	0	3+	1+	3+	0	1+	0	1+	0	4+	0	0
	50	2+	3+	0	4+	0	3+	0	0	0	3+	0	0
Yersiniose	23	0	2+	0	3+	0	0	0	0	0	2+	0	0
	35	2+	3+	3+	4+	0	1+	0	0	0	3+	0	0
	36	2+	2+	2+	4+	0	1+	0	0	0	3+	0	0
	40	3+	3+	3+	4+	1+	2+	1+	2+	1+	4+	2+	2+
	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	51	3+	4+	3+	4+	3+	3+	0	1+	0	2+	0	0
	52	1+	4+	2+	4+	2+	3+	0	0	0	2+	1+	0
	53	3+	4+	2+	4+	0	0	0	3+	0	4+	0	0
Reaktivität	10 56%	17 94%	13 72%	17 94%	4 22%	14 82%	1 6%	5 28%	1 6%	17 94%	2 11%	1 5,6%	

Tab. 7.4: IgG- und IgA-Reaktivität gegen die neuen Yersinien Antigene YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3 von Yersiniose Patienten aus Finnland (Granfors *et al.*, 1998). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt (s. Tab. 7.3).

KTL n=18	IgG			IgA			
	YopD	YadA72-280	Rtx3	YopD	YadA72-280	Rtx3	
ReA	1	4+	0	0	2+	3+	0
	5	4+	1+	1+	2+	4+	0
	6	4+	2+	1+	4+	2+	0
	11	3+	2+	2+	1+	4+	0
	16	3+	0	1+	2+	3+	0
	19	4+	2+	2+	2+	2+	0
	24	4+	2+	0	4+	2+	0
	34	3+	0	1+	2+	1+	0
	44	3+	3+	1+	4+	3+	0
	50	4+	3+	1+	3+	3+	0
Yersiniose	23	3+	1+	0	2+	0	0
	35	4+	1+	0	3+	4+	0
	36	4+	0	0	3+	4+	0
	40	4+	3+	2+	4+	3+	0
	47	0	2+	0	0	1+	0
	51	4+	0	2+	2+	1+	0
	52	4+	0	0	2+	3+	0
	53	4+	3+	2+	4+	3+	0
Reaktivität	17 94%	12 66,70%	11 61,10%	17 94%	17 94%	0 0	

ANHANG

Tab. 7.5: IgG- und IgA-Reaktivität gegen die neuen Yersinien Antigene YadA₇₂₋₂₈₀ und Rtx3 von Yersinien positiven (Y+ BSS) und Yersinien negativen Blutspendersonen (BSS). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1+ = sehr schwache Reaktivität, 2+ = schwache Reaktivität, 3+ und 4+ = starke Reaktivität.

Y+ BSS n=19	IgG			IgA		
	YopD	YadA72-280	Rtx3	YopD	YadA27-280	Rtx3
BRK1522	2+	0	2+	0	2+	0
BRK1562	4+	2+	1+	3+	3+	0
BRK1581	3+	0	0	3+	0	0
BRK1748	4+	2+	2+	3+	2+	0
BRK1766	4+	0	2+	3+	0	0
BRK1771	3+	0	0	3+	0	0
BRK1776	3+	0	2+	3+	0	0
BRK1800	4+	0	2+	3+	3+	0
BRK1801	4+	0	0	3+	1+	0
BRK1810	4+	0	2+	4+	2+	0
BRK1841	3+	0	2+	3+	0	0
BRK1874	4+	0	2+	3+	3+	0
BRK2025	0	0	0	0	3+	0
BRK2026	4+	0	2+	3+	4+	0
BRK2052	4+	0	0	2+	1+	0
BRK1679	4+	0	2+	0	0	0
Pannel3	4+	0	2+	0	0	0
Pannel4	0	0	0	0	1+	0
Pannel5	4+	2+	2+	0	0	0
Reaktivität	17 89,50%	3 15,80%	13 68,40%	13 68,40%	11 57,90%	0
BSS n=19	IgG			IgA		
	YopD	YadA27-280	Rtx3	YopD	YadA72-280	Rtx3
BRK2007	0	0	2+	0	0	0
BRK2012	0	0	2+	0	2+	0
BRK2015	0	0	2+	0	2+	0
BRK2017	0	2+	2+	1+	3+	0
BRK2021	0	3+	1+	0	0	0
BRK2024	2+	2+	0	0	2+	0
BRK2026	0	0	0	0	0	0
BRK2031	0	0	1+	0	0	0
BRK1819	0	0	0	0	2+	0
BRK1822	1+	0	0	0	0	0
BRK1826	0	0	0	1+	0	0
BRK1827	0	0	2+	0	3+	0
BRK1833	0	0	0	0	3+	0
BRK1855	0	0	0	0	0	0
BRK1896	0	0	2+	0	0	0
BRK1651	1+	0	0	0	0	0
BRK1024	0	0	0	0	0	0
BRK1161	0	0	0	0	0	0
BRK1121	0	1+	0	0	1+	0
Reaktivität	3 15,80%	4 21,10%	8 42,10%	2 10,50%	8 42,10%	0

ANHANG

Tab. 7.6: IgG- und IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Blutspenderseren des BRK (n=40). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität.

BRK n=40	IgG								IgA							
	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA
1075	1+	4+	0	4+	0	2+	4+	4+	0	0	0	0	0	0	0	0
1076	0	1+	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1077	0	2+	0	4+	0	4+	2+	0	0	0	0	1+	0	0	0	0
1078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+
1081	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1082	0	1+	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0
1083	0	0	0	4+	1+	0	4+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0
1084	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1085	0	3+	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1086	0	3+	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1087	0	0	0	4+	0	0	0	4+	0	0	0	4+	0	0	0	0
1088	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1089	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1090	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1091	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1093	2+	1+	0	4+	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0
1094	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0
1095	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1096	0	0	0	3+	0	0	3+	4+	0	0	0	0	0	0	0	3+
1097	0	1	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0
1098	0	1	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1099	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1101	1+	3+	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1102	0	3+	0	2+	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	0
1103	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1104	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1107	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1108	0	0	0	1+	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	0
1109	0	2+	0	2+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1110	0	0	0	2+	0	0	0	3+	0	0	0	3+	2+	0	0	1+
1111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1112	0	2+	0	4+	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0
1113	0	2+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1114	0	0	0	4+	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0
Reaktivität	4	18	1	19	3	2	4	9	0	0	0	6	1	0	0	3
	10%	45%	2,5%	48%	7,5%	5,0%	10%	23%				15%	2,5%			7,5%

ANHANG

Tab. 7.7: IgG- und IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Yersiniose Patientenseren aus Finnland (n=18) (Granfors et al., 1998). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität.

KTL n=18	IgG								IgA								
	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA	
ReA	1	1+	3+	3+	4+	2+	3+	1+	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
	5	2+	4+	1+	4+	0	1+	3+	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
	6	0	1+	1+	4+	0	0	0	0	0	0	0	4+	0	0	0	0
	11	0	3+	1+	3+	0	2+	1+	0	0	0	0	1+	0	0	0	0
	16	0	2+	2+	3+	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
	19	0	3+	0	4+	0	2+	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
	24	2+	4+	3+	4+	0	3+	1+	4+	0	1+	0	4+	0	0	0	3+
	34	0	3+	0	3+	0	1+	2+	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
	44	0	3+	1+	3+	0	1+	0	0	0	1+	0	4+	0	0	0	0
	50	2+	3+	0	4+	0	3+	1+	2+	0	0	0	3+	0	0	0	0
Yersiniose	23	0	2+	0	3+	0	0	0	3+	0	0	0	2+	0	0	0	4+
	35	2+	3+	3+	4+	0	1+	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0
	36	2+	2+	2+	4+	0	1+	1+	0	0	0	0	3+	0	0	0	0
	40	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	1+	1+	2+	1+	4+	2+	2+	0	1+
	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	51	3+	4+	3+	4+	3+	3+	1+	0	0	1+	0	2+	0	0	0	0
	52	1+	4+	2+	4+	2+	3+	1+	0	0	0	0	2+	1+	0	0	0
	53	3+	4+	2+	4+	0	0	1+	0	0	3+	0	4+	0	0	0	0
Reaktivität	10 56%	17 94%	13 72%	17 94%	4 22%	14 82%	11 61%	4 22%	1 5,6%	5 28%	1 6%	17 94%	2 11%	1 6,0%	0 0%	3 17%	

Tab. 7.8: IgG- und IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Yersiniose Patientenseren aus Deutschland (n=23). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt (s. Tab. 7.7).

YeD n=23	IgG								IgA							
	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA
TS262	0	0	0	2+	0	0	0	2+	0	0	0	2+	0	0	0	0
TS327	0	4+	2+	4+	3+	2+	0	2+	0	0	0	2+	0	0	0	0
BRK1534	1+	3+	3+	4+	1+	4+	3+	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
BRK976	0	4+	0	4+	0	4+	2+	0	0	0	0	2+	0	0	1+	0
BRK1038	2+	3+	2+	3+	0	0	1+	2+	0	0	0	2+	0	0	0	0
TS158	2+	3+	1+	4+	0	2+	0	3+	0	0	0	3+	0	0	0	0
TS58	2+	3+	0	4+	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
TS321	0	0	0	4+	0	0	0	2+	0	0	0	3+	0	0	0	0
TS326	0	4+	2+	4+	2+	2+	0	2+	0	0	0	2+	0	0	0	0
TS333	0	0	1+	4+	0	0	0	2+	0	0	0	3+	0	0	0	0
BRK1025	0	3+	0	4+	0	0	1+	4+	0	0	0	2+	0	0	0	3+
BRK1547	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0
TS111	0	0	0	4+	0	0	0	2+	0	0	0	3+	0	0	0	0
Bram-1	3+	4+	3+	4+	0	4+	0	3+	3+	3+	0	3+	0	0	0	0
TS252	1+	4+	2+	4+	2+	4+	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
TS262	0	0	0	3+	0	0	0	3+	0	0	0	3+	0	0	0	0
TS113	0	4+	2+	4+	0	3+	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0
BRK986	0	4+	0	4+	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
TS320	2+	0	0	2+	0	0	0	0	2+	0	0	1+	0	0	0	0
BRK1748	1+	0	1+	4+	0	0	0	3+	0	0	0	3+	0	2+	0	0
BRK1176	0	3+	0	3+	0	0	0	3+	0	0	0	4+	0	0	0	0
BRK1801	0	0	0	4+	0	0	0	3+	0	0	0	4+	0	0	0	0
BRK1810	0	0	0	4+	0	0	0	3+	0	0	0	4+	0	0	0	0
Reaktivität	8 35%	13 57%	8 35%	23 100%	4 17%	8 35%	4 17%	15 65%	2 9%	1 4%	0 0%	23 100%	0 0%	1 4%	1 4%	1 4%

ANHANG

Tab. 7.9: IgM-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Blutspendersonen (n=40). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität

BRK n=40	IgM							
	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA
1075	0	0	0	0	0	0	0	0
1076	0	0	0	0	0	0	0	0
1077	0	0	0	0	0	0	0	0
1078	0	0	0	0	0	0	0	0
1079	0	0	0	0	0	0	0	0
1080	0	0	0	0	0	0	0	0
1081	0	0	0	0	0	0	0	0
1082	0	0	0	0	0	0	0	0
1083	0	0	0	0	0	0	0	2+
1084	0	0	0	0	0	0	0	0
1085	0	0	0	0	0	0	0	0
1086	0	0	0	0	0	0	0	0
1087	0	1+	0	0	0	0	0	0
1088	0	0	0	0	0	0	0	0
1089	0	0	0	0	0	0	0	0
1090	0	0	0	0	0	0	0	0
1091	0	0	0	0	0	0	0	0
1092	0	0	0	0	0	0	0	0
1093	0	0	0	0	0	0	0	0
1094	0	0	0	0	0	0	0	0
1095	0	0	0	0	0	0	0	0
1096	0	0	0	0	0	0	0	0
1097	0	0	0	0	0	0	0	0
1098	0	0	0	0	0	0	0	0
1099	0	4+	0	0	0	0	0	0
1100	0	0	0	0	0	0	0	0
1101	0	0	0	0	0	0	0	0
1102	0	0	0	0	0	0	0	0
1103	0	0	0	0	0	0	0	0
1104	0	0	0	0	0	0	0	0
1105	0	0	0	0	0	0	0	0
1106	0	0	0	0	0	0	0	0
1107	0	0	0	0	0	0	0	0
1108	0	0	0	0	0	0	0	0
1109	0	0	0	0	0	0	0	0
1110	0	0	0	0	0	0	0	0
1111	0	0	0	0	0	0	0	0
1112	0	0	0	0	0	0	0	0
1113	0	0	0	0	0	0	0	0
1114	0	0	0	0	0	0	0	0
Reaktivität	0	2 5%	0	0	0	0	0	1 2,5%

ANHANG

Tab. 7.10: IgM-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Yersiniose Patientenseren aus Finnland (n=40). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität

KTL n=18	IgM								
	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA	
ReA	1	0	1+	0	4+	0	0	0	0
	5	0	0	0	3+	0	0	0	0
	6	0	0	0	2+	0	0	0	0
	11	0	0	0	1+	0	0	0	0
	16	0	0	0	1+	0	0	0	0
	19	0	0	0	3+	0	0	0	0
	24	0	0	0	3+	0	0	0	0
	34	0	0	0	0	0	0	0	0
	44	0	0	0	2+	0	0	0	0
	50	0	0	0	1+	0	0	0	0
Yersiniose	23	0	0	0	0	0	0	0	0
	35	0	0	0	4+	0	0	0	0
	36	0	0	0	3+	0	0	0	0
	40	0	0	0	1+	0	0	0	0
	47	0	0	0	0	0	0	0	0
	51	0	0	0	3+	0	0	0	0
	52	0	0	0	2+	0	0	0	3+
	53	0	0	0	4+	0	0	0	0
Reaktivität	0	1 5,6%	0	15 83,30%	0	0	0	1 5,6%	

Tab. 7.11: IgM-Antwort gegen rekombinant hergestellte MyfA, PsaA, YopM-, YopH-, V-AG-, YopD, YopN- und YopE Antigene unter Yersiniose Patientenseren aus Deutschland (n=23). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt (s. Tab. 7.10).

YeD n=23	IgM							
	YopM	YopH	V-AG	YopD	YopN	YopE	MyfA	PsaA
TS262	0	0	0	0	0	0	0	0
TS327	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK1534	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK976	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK1038	0	0	0	0	0	1+	0	0
TS158	0	0	0	0	0	1+	0	0
TS58	0	0	0	0	0	1+	0	0
TS321	0	0	0	1+	0	0	0	0
TS326	0	0	0	0	0	0	0	0
TS333	0	0	0	1+	0	0	0	0
BRK1025	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK1547	0	0	0	0	0	0	0	0
TS111	0	0	0	0	0	0	0	0
Bram-1	0	0	0	0	0	0	0	0
TS252	0	0	0	0	0	0	0	0
TS262	0	0	0	0	0	0	0	0
TS113	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK986	0	0	0	0	0	0	0	4+
TS320	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK1748	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK1176	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK1801	0	0	0	0	0	0	0	0
BRK1810	0	0	0	0	0	0	0	0
Reaktivität	0	0	0	2 9%	0	3 13%	0	1 4%

ANHANG

Tab. 7.12: IgG-Antwort gegen rekombinant hergestellte MOMP, PEB4, PEB2, PEB1, Omp18, P39, NlpA, JlpA₁₆₋₁₈₅, YceI, Cj1496c, Cj1670c und Cj0143c Antigene unter Patientenseren (n=53). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität

	MOMP	PEB4	PEB2	PEB1	Omp18	P39	NlpA	JlpA	YceI	Cj1496c	Cj1670c	Cj0143c	Beurteilung
NK_1	2+	1+	1+	0	3+	2+	2+	0	0	0	0	2+	positiv
NK_2	0	2+	0	0	3+	1+	3+	0	0	0	0	1+	positiv
NK_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3+	negativ
NK_4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3+	negativ
NK_6	1+	1+	0	0	1+	2+	4+	0	1+	2+	2+	1+	positiv
NK_7	1+	1+	0	0	2+	2+	4+	0	1+	2+	2+	1+	positiv
NK_8	0	0	0	0	0	0	0	1+	2+	2+	2+	0	negativ
NK_9	0	0	0	0	0	0	0	1+	2+	1+	2+	0	negativ
NK_11	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	1+	1+	negativ
NK_12	1+	0	0	0	0	2+	3+	0	1+	0	1+	1+	positiv
NK_13	0	4+	0	0	4+	4+	4+	2+	2+	2+	1+	1+	positiv
NK_14	0	2+	0	0	3+	1+	3+	0	0	0	1+	1+	positiv
NK_15	2+	0	0	0	2+	1+	0	0	0	0	0	2+	positiv
GI_17	0	4+	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	1+	positiv
GI_18	1+	0	0	0	0	0	0	0	1+	1+	1+	1+	negativ
GI_19	0	0	0	0	0	0	1+	0	1+	0	0	0	negativ
GI_21	2+	0	0	0	0	0	1+	0	1+	1+	1+	0	negativ
GI_23	1+	2+	0	0	0	2+	3+	0	0	0	1+	1+	positiv
GI_25	0	0	0	0	0	2+	3+	0	0	0	1+	0	positiv
GI_26	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	1+	negativ
GI_27	0	0	0	0	2+	0	0	0	2+	1+	1+	0	positiv
GI_29	0	0	1+	2+	4+	4+	0	0	1+	1+	2+	1+	positiv
GI_31	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	1+	1+	negativ
GI_1	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	negativ
GI_2	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	negativ
GI_3	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	1+	1+	negativ
GI_4	1+	0	0	0	0	3+	3+	0	0	2+	0	1+	positiv
GI_5	0	0	0	0	0	0	1+	0	1+	1+	1+	2+	negativ
GI_6	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	1+	negativ
GI_7	1+	0	0	0	1+	2+	2+	0	0	0	1+	1+	positiv
GI_8	1+	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
GI_9	0	0	0	0	2+	2+	2+	0	1+	0	1+	0	positiv
GI_10	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	2+	negativ
EP26	0	0	0	0	3+	2+	1+	0	0	0	0	0	positiv
EP28	0	1+	0	0	0	4+	0	0	0	0	1+	0	positiv
EP31	0	1+	0	0	0	2+	3+	0	1+	1+	1+	0	positiv
GH4a	1+	1+	3+	0	2+	4+	0	0	1+	0	1+	1+	positiv
GH5a	1+	0	0	0	1+	0	3+	0	0	0	1+	2+	negativ
GH6a	0	1+	0	0	2+	4+	4+	0	0	0	0	0	positiv
GH7a	2+	0	0	0	0	2+	4+	0	0	1+	0	1+	positiv
GH9a	1+	1+	0	0	0	4+	3+	0	1+	2+	1+	0	positiv
GH11a	1+	0	0	0	1+	1+	4+	0	0	1+	2+	1+	negativ
GH12a	1+	0	0	0	0	1+	1+	0	1+	1+	1+	2+	negativ
GH13a	1+	1+	0	0	2+	3+	1+	1+	0	0	4+	4+	positiv
GH14a	1+	3+	0	0	1+	1+	3+	0	0	0	2+	2+	positiv
GH16a	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
GH17a	0	0	0	0	1+	4+	0	0	0	0	2+	1+	positiv
GH23a	3+	0	0	1+	0	1+	3+	0	1+	3	1+	3	fraglich
SH	0	1+	2+	1+	2	2+	4+	0	0	0	0	1+	positiv
M. 27	0	1+	0	1+	2+	2+	3+	0	0	0	1+	1+	positiv
M. 29	1+	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	1+	1+	negativ
M. 33	0	2+	0	2+	1+	2+	3+	0	0	0	1+	1+	positiv
M. 34	2+	1+	0	0	0	2+	3+	0	0	0	1+	1+	positiv
n=53	6	7	2	2	16	23	30	1	4	7	9	12	30
Reaktivität	11%	13%	4%	4%	30%	43%	57%	2%	8%	13%	17%	23%	57%

ANHANG

Tab. 7.13: IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MOMP, PEB4, PEB2, PEB1, Omp18, P39, NlpA, JlpA₁₆₋₁₈₅, YceI, Cj1496c, Cj1670c und Cj0143c Antigene unter Patientenseren (n=53). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität

	MOMP	PEB4	PEB2	PEB1	Omp18	P39	NlpA	JlpA	YceI	Cj1496	Cj1670c	Cj0143c	Berurteilung
NK_1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
NK_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
NK_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	negativ
NK_4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
NK_6	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
NK_7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
NK_8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
NK_9	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
NK_11	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	2+	positiv
NK_12	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	positiv
NK_13	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	positiv
NK_14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
NK_15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
GI_18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
GI_23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_29	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
GI_31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_4	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	1+	negativ
GII_5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	1+	negativ
GII_6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GII_10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
EP26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
EP28	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
EP31	0	0	0	0	1+	2+	0	0	0	0	1+	0	positiv
GH4a	0	0	0	0	3+	2+	0	0	0	0	0	0	positiv
GH5a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GH6a	0	0	0	0	0	4+	0	0	0	0	0	0	positiv
GH7a	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	1+	negativ
GH9a	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
GH11a	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
GH12a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GH13a	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
GH14a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GH16a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
GH17a	0	0	0	0	0	4+	0	0	0	0	3+	0	positiv
GH23a	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	negativ
SH	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
M. 27	0	0	0	0	1+	1+	2+	0	0	0	0	0	negativ
M. 29	1+	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	1+	1+	negativ
M. 33	0	0	0	0	0	1+	2+	0	0	0	1+	1+	negativ
M. 34	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
n=53 Reaktivität	0	0	0	1 2%	1 2%	7 13%	3 6%	0	0	0	1 2%	2 4%	7 13%

ANHANG

Tab. 7.14: IgG-Antwort gegen rekombinant hergestellte MOMP, PEB4, PEB2, PEB1, Omp18, P39, NlpA, JlpA₁₆₋₁₈₅, YceI, Cj1496c, Cj1670c und Cj0143c Antigene unter Blutspenderseren (n=100). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität

	MOMP	PEB4	PEB2	PEB1	Omp18	P39	NlpA	JlpA	YceI	Cj1496c	Cj1670c	Cj0143c	Beurteilung
BRK1076	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1077	0	0	0	0	0	1+	2+	0	0	0	3+	0	negativ
BRK1078	0	0	0	0	0	0	3+	2+	0	0	1+	0	negativ
BRK1079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	negativ
BRK1081	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	1+	negativ
BRK1082	0	0	0	0	0	0	4+	0	0	2+	0	0	negativ
BRK1083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1084	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1085	0	0	0	0	0	1+	1+	0	0	0	0	2+	negativ
BRK1086	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	negativ
BRK1087	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	negativ
BRK1089	0	0	0	0	0	0	2+	0	2+	3+	1+	0	negativ
BRK1090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1091	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1092	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	negativ
BRK1093	0	0	0	1+	0	0	3+	0	0	0	1+	2+	negativ
BRK1094	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1095	0	0	0	1+	0	0	3+	0	1+	1+	1+	0	negativ
BRK1096	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1097	0	0	0	0	0	0	4+	0	0	3+	0	0	negativ
BRK1098	0	0	0	0	0	0	4+	0	0	1+	0	0	negativ
BRK1099	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1100	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1103	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1104	0	0	0	0	0	1+	1+	1+	0	0	0	0	negativ
BRK 1105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1106	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	1+	negativ
BRK 1108	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	1+	1+	negativ
BRK 1109	2+	1+	3+	0	0	2+	0	0	1+	1+	1+	0	fraglich
BRK 1110	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1111	0	0	0	0	0	0	3+	0	1+	2+	1+	1+	negativ
BRK 1112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1113	2+	0	0	0	1+	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1114	0	0	0	2+	1+	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1115	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	1+	2+	0	negativ
BRK 1116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	1+	negativ
BRK 1118	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1119	0	0	0	0	1+	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1121	1+	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1122	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	1+	2+	negativ
BRK 1123	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1124	0	0	0	0	1+	0	4+	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1125	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	1+	0	1+	negativ
BRK 1126	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1127	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	1+	1+	0	negativ
BRK 1128	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1129	0	0	0	0	0	1+	2+	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1131	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1132	0	0	0	0	0	1+	3+	0	0	0	3+	0	negativ
BRK 1133	0	0	0	0	0	0	4+	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1136	0	0	0	0	1+	0	3+	0	1+	1+	0	2+	negativ
BRK 1137	2+	1+	0	0	0	0	3+	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1138	0	0	0	0	1+	3+	0	0	0	0	1+	3+	positiv
BRK 1141	0	0	0	0	0	0	4+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1142	0	1+	0	0	1+	0	0	0	0	0	2+	0	negativ
BRK 1143	0	0	0	0	1+	0	1+	0	0	1+	0	0	negativ
BRK 1144	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ

ANHANG

BRK 1146	0	0	0	0	0	1+	4+	4+	0	1+	0	0	negativ
BRK 1147	0	0	0	0	1+	0	2+	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1150	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1151	0	0	0	0	0	0	2+	0	1+	1+	1+	0	negativ
BRK 1152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1153	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1154	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1156	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1157	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1158	0	0	0	0	0	0	4+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1159	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1163	0	0	0	0	1+	0	1+	0	1+	1+	1+	0	negativ
BRK 1164	0	0	0	0	0	1+	2+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1165	0	0	0	0	1+	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1167	0	0	0	0	0	1+	3+	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1168	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1173	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1075	0	0	0	3+	0	2+	1+	0	0	0	1+	1+	positiv
BRK1080	0	0	0	0	2+	1+	1+	0	0	0	0	1+	positiv
BRK1088	0	0	0	0	0	0	4+	0	1+	0	0	0	negativ
BRK 1101	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	positiv
BRK 1102	0	3+	0	0	0	0	2+	0	1+	1+	2+	1+	positiv
BRK 1134	0	0	0	0	0	1+	4+	0	0	1+	1+	1+	negativ
BRK 1139	0	0	0	0	0	2+	0	0	1+	1+	1+	1+	positiv
BRK 1140	0	0	0	0	2+	3+	1+	0	0	0	0	0	positiv
BRK 1148	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	1+	0	0	positiv
BRK 1149	1+	0	0	0	3+	2+	4+	0	0	0	0	0	positiv
BRK 1161	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	positiv
BRK 1169	0	0	0	0	2+	2+	0	0	0	1+	0	0	positiv
BRK 1170	0	0	0	0	2+	3+	0	0	0	1+	0	0	positiv
BRK 1174	0	0	0	0	2+	3+	0	0	0	2+	0	0	positiv
n=100	3	2	2	2	6	9	34	2	1	5	7	5	13
Reaktivität	3%	2%	2%	2%	6%	9%	34%	2%	1%	5%	7%	5%	13%

ANHANG

Tab. 7.15: IgA-Antwort gegen rekombinant hergestellte MOMP, PEB4, PEB2, PEB1, Omp18, P39, NlpA, JlpA₁₆₋₁₈₅, YceI, Cj1496c, Cj1670c und Cj0143c Antigene unter Blutspenderseren (n=100). Die Reaktivität wurde semi-quantitativ dargestellt mit folgendem Auswertungsschema: 1 = sehr schwache Reaktivität, 2 = schwache Reaktivität, 3 und 4 = starke Reaktivität

	MOM												Beurteilung
	P	PEB4	PEB2	PEB1	Omp18	P39	NlpA	JlpA	YceI	Cj1496c	Cj1670c	Cj0143c	
BRK1076	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK1078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK1079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1081	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1082	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1083	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	1+	0	negativ
BRK1084	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1085	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1086	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1087	0	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	1+	2+	negativ
BRK1089	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1091	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1092	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1093	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
BRK1094	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1095	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1096	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1097	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1098	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1099	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1103	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	negativ
BRK 1111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3+	0	negativ
BRK 1133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1137	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1138	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	negativ
BRK 1143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	2+	negativ

ANHANG

BRK 1145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1147	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1153	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1155	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1156	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1158	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1162	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1075	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1080	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK1088	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	0	positiv
BRK 1101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	2+	negativ
BRK 1102	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	1+	negativ
BRK 1134	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	positiv
BRK 1139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	1+	negativ
BRK 1140	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	0	positiv
BRK 1148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	negativ
BRK 1169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
BRK 1174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativ
n=100	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	4	3	3
Reaktivität	1%	1%		1%	1%	1%	1%				4%	3%	3%

DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und für jede Menge Ideen und Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Erwin Soutschek von der Mikrogen GmbH für die Zusammenarbeit im Rahmen des FORINGEN-Verbundes danken. Auch danke ich Christina Nölting für die Zusammenarbeit und die Unterstützung während der Zeit im „F&E“-Labor der Mikrogen GmbH.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Labors 406 für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima: PD Dr. Alexander Rakin, Julia Batzilla und Dr. Uladzimir Antonenka.

Bei Prof. Dr. Imhoff, Herrn Tilman Schlunk und Herrn Pierre Schilcher vom Zentrallabor für Proteinanalytik (Adolf-Butenandt-Institut) möchte ich mich für die massenspektrometrischen Analysen bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt dem „Büro 327“ für die fachliche und moralische Unterstützung: Beate Czech, Virginie Nägele, Susanna Roeder, Dr. Ulrike Schulte-Spechtel, Christoph Guggenberger und Stefan Wölke.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meiner Großmama und meinem Großpapa, bei meinen Freunden und natürlich bei Thomas für jegliche Unterstützung bedanken.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern für alles, was sie mir ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Julia Niefnecker
Geburtsdaten: 10.06.1981 in München
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung

März 2006-März 2009
Dissertation
Ludwig-Maximilians-Universität München,
Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische
Mikrobiologie bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann im
Rahmen des Bayerischen Forschungsverbundes
Infektogenomik (FORINGEN)
Titel: Identifizierung von virulenzassoziierten Antigenen bei
enteropathogenen Yersinien und *Campylobacter jejuni*

Januar 2005-Oktober 2005
Diplomarbeit
Ludwig-Maximilians-Universität München, Department
Biologie I, Bereich Mikrobiologie
bei Frau Prof. Dr. Kirsten Jung
Titel: Membranproteomanalyse von *Escherichia coli* unter
hyperosmotischen Stressbedingungen und
Funktionsanalyse von TrkH

2005
Diplom
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik, Biochemie und Pharmakologie
und Toxikologie

2002
Vordiplom
Oktober 2000 – Oktober 2005
Ludwig-Maximilians-Universität München,
Studiengang Diplom-Biologie

Schulbildung

2000
Abitur
1991-2000
Ludwigsgymnasium, München